



Universidad de Burgos

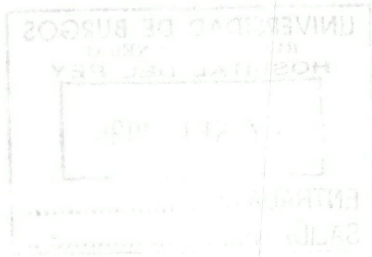
Departamento de Biotecnología y Ciencia de los alimentos

Area de Bioquímica y Biología Molecular



DEGRADACIÓN ACELERADA DE MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS EN REACTORES ENZIMÁTICOS SUPLEMENTADOS CON β -GLUCOSIDASA INMOVILIZADA

Memoria Tesis presentada por
Natividad Ortega Santamaria
para optar al grado de Doctor.
Septiembre 1996



X730065943

Tesis Doctoral realizada por

Dña Natividad **ORTEGA SANTAMARIA** para optar al Grado de Doctor.

Director de trabajo:

Dr. D. Manuel **PÉREZ-MATEOS**

Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos

Facultad de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Ciencias Químicas

Universidad de Burgos

Codirectora:

Dra. Dña. M^a Dolores **BUSTO NUÑEZ**

Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos

Facultad de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Ciencias Químicas

Universidad de Burgos



Don Manuel Pérez-Mateos, Director del Area de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Ciencias Químicas de la Universidad de Burgos,

CERTIFICA: Que el trabajo de Tesis Doctoral titulada “*Degradación acelerada de materiales lignocelulósicos en reactores enzimáticos suplementados con β -glucosidasa inmovilizada*” has sido realizado, bajo mi dirección, por **Dña Natividad Ortega Santamaria** en los laboratorios de Bioquímica de la Facultad de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y CC QQ.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, expide el presente certificado en Burgos, a seis de septiembre de mil novecientos noventa y seis.



A handwritten signature in blue ink, appearing to be "J. Mateos", written over the seal.

A Luis Angel, Mónica y Sara

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a todos aquellas personas que han colaborado en la realización de este trabajo.

Al Dr. Manuel Pérez-Mateos, Director de esta Tesis, por la planificación y dirección del trabajo que han hecho posible la culminación de la misma.

A la Dra. M^a Dolores Busto, mi sincero agradecimiento, por su ayuda, apoyo moral y amistad que me ha prestado en todo momento.

A todas aquellas personas que no han sido mencionadas, pero que han participado de alguna forma en este trabajo.

Y finalmente, mi profunda gratitud a mi familia, ya que sin su ayuda no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

INDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	3
1.2. HIPÓTESIS	9
1.3. OBJETIVOS	13
1.4. PLAN EXPERIMENTAL	17
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	23
2.1. DEGRADACIÓN DE MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS	25
2.1.1. COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA DE LOS MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS	27°
2.1.1.1. Polisacáridos	27
2.1.1.1.1. Celulosas	28
2.1.1.1.2. Hemicelulosas	29
2.1.1.2. Ligninas	29
2.1.1.3. Componentes extraños	30
2.1.1.4. Estructura de los materiales lignocelulósicos	31
2.1.2. MÉTODOS DE PRETRATAMIENTO	35
2.1.2.1. Pretratamientos físicos	36
2.1.2.2. Pretratamientos químicos	37
2.1.2.3. Pretratamientos biológicos	39
2.1.3. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA CELULOSA	41
2.1.3.1. Microorganismos celulolíticos	41
2.1.3.1.1. Hongos	42
2.1.3.1.2. Bacterias	43
2.1.3.2. Sistema enzimático celulolítico	44
2.1.3.2.1. Celulasas fúngicas	45
2.1.3.2.1.1. Endoglucanasas	50
2.1.3.2.1.2. Celobiohidrolasas	51
2.1.3.2.1.3. Sustratos de celobiohidrolasas y endo-	

3.1.1. CULTIVO DE MICROORGANISMOS CELULOLÍTICOS	119
3.1.1.1. Cultivo de <i>Aspergillus niger</i>	119
3.1.1.1.1. Cultivo en medio líquido	119
3.1.1.1.2. Cultivo en medio sólido	120
3.1.1.2. Cultivo de <i>Trichoderma reesei</i>	120
3.1.1.2.1. Cultivo en medio líquido	120
3.1.1.2.2. Cultivo en medio sólido	121
3.1.2. AISLAMIENTO ENZIMÁTICO	123
3.1.2.1. Extracción de β -glucosidasa de <i>A. niger</i>	123
3.1.2.2. Extracción de celulasas de <i>T. reesei</i>	123
3.2. TÉCNICAS DE INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS	125
3.2.1. INMOVILIZACIÓN EN GELES DE ALGINATO DE CALCIO	127
3.2.1.1. Reactivos	127
3.2.1.2. Protocolo experimental	127
3.2.2. INMOVILIZACIÓN EN GELES DE POLIACRILAMIDA	129
3.2.2.1. Reactivos	129
3.2.2.2. Protocolo experimental	130
3.2.3. INMOVILIZACIÓN POR ASOCIACIÓN A HUMATOS EDÁFICOS	131
3.2.3.1. Reactivos	131
3.2.3.2. Extracción de humatos edáficos	131
3.2.3.3. Protocolo experimental	132
3.2.4. INMOVILIZACIÓN CON HUMATOS POR ENTRECruzAMIENTO A TRAVÉS DE GLUTARALDEHÍDO	133
3.2.5. INMOVILIZACIÓN POR COPOLIMERIZACIÓN FENÓLICA	135
3.2.5.1. Reactivos	135
3.2.5.2. Protocolo experimental	135
3.3. ENSAYO DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	137
3.3.1. Ensayo de actividad β -glucosidasa	139
3.3.1.1. Reactivos	139
3.3.1.2. Protocolo experimental	140
3.3.1.3. Curva de calibrado	141

3.3.2. Ensayo de la actividad carboximetil-celulasa	142
3.3.2.1. Reactivos	142
3.3.2.2. Protocolo experimental	142
3.4. CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA	143
3.4.1. ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS	145
3.4.1.1. Cinética de Michaelis-Menten	145
3.4.1.2. Influencia del pH sobre la actividad enzimática	145
3.4.1.3. Efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad enzimática	146
3.4.2. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD ENZIMÁTICA	147
3.4.2.1. Estabilidad térmica de los enzimas	147
3.4.2.1.1. Pretratamiento térmico de 1 h	147
3.4.2.1.2. Vida media de los enzimas	147
3.4.2.2. Estabilidad frente a enzimas proteolíticos	147
3.4.2.3. Estabilidad operacional en medios edáficos	148
3.4.2.3.1. Descripción del suelo	148
3.4.2.3.2. Protocolo experimental	148
3.4.2.3.3. Determinación del contenido de humedad de las muestras	149
3.5. DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE LOS MATERIALES LIGNO-CELULÓSICOS	151
3.5.1. CARACTERIZACIÓN DE LA PAJA DE CEREAL	155
3.5.2. PRETRATAMIENTO DE LA PAJA DE CEREAL	157
3.5.2.1. Tratamiento con peróxido alcalino	157
3.5.2.1.1. Reactivos	157
3.5.2.1.2. Protocolo experimental	157
3.5.2.2. Tratamiento con butilamina	158
3.5.2.2.1. Reactivos	158
3.5.2.2.2. Protocolo experimental	158
3.5.2.3. Tratamiento con hidróxido de sodio	158
3.5.2.3.1. Reactivos	158

3.5.2.3.2. Protocolo experimental	158
3.5.3. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PAJA DE CEREAL Y DE CELULOSAS COMERCIALES	161
3.5.3.1. Efecto de la temperatura	162
3.5.3.2. Efecto del pH	162
3.5.3.3. Efecto de la concentración de enzimas	162
3.5.3.4. Efecto de la concentración de sustrato	163
3.5.3.5. Hidrólisis de los materiales lignocelulósicos con enzimas inmovilizados	163
3.5.4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS	165
3.5.4.1. Ensayo de azúcares reductores	165
3.5.4.1.1. Reactivos	165
3.5.4.1.2. Protocolo experimental	166
3.5.4.1.3. Curva de calibrado	166
3.5.4.2. Ensayo de la concentración de glucosa	167
3.5.4.2.1. Reactivos	167
3.5.4.2.2. Protocolo experimental	168
3.5.4.2.3. Curva de calibrado	
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	171
4.1. INMOVILIZACIÓN DE β -D-GLUCOSIDASA	173
4.1.1. INMOVILIZACIÓN DE β -GLUCOSIDASA POR ATRAPAMIENTO EN GELES	177
4.1.1.1. Inmovilización en geles de alginato	178
4.1.1.2. Inmovilización en geles de poliacrilamida	182
4.1.2. INMOVILIZACIÓN DE β -GLUCOSIDASA POR ASOCIACIÓN A POLÍMEROS FENÓLICOS	189
4.1.2.1. Inmovilización por asociación a humatos edáficos	189
4.1.2.2. Inmovilización con humatos a través de glutaraldehído	197
4.1.2.2.1. Estabilidad térmica	210
4.1.2.2.2. Estabilidad operacional	212
4.1.2.3. Inmovilización por copolimerización fenólica	215

4.1.2.3.1. Estabilidad térmica	216
4.1.2.3.2. Estabilidad operacional	216
4.2. CARACTERIZACIÓN DE B-GLUCOSIDASA INMOVILIZADA EN GELES DE ALGINATO Y POLIACRILAMIDA	223
4.2.1. CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS	227
4.2.1.1. Cinética de Michaelis-Menten	227
4.2.1.2. Influencia del pH sobre la actividad enzimática	230
4.2.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA DE INCUBACIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	233
4.2.3. ESTABILIDAD TÉRMICA	235
4.2.3.1. Pretratamiento térmico	235
4.2.3.2. Vida media	237
4.2.4. ESTABILIDAD A LA PROTEOLISIS	243
4.2.5. ESTABILIDAD OPERACIONAL	245
4.3. DEGRADACIÓN ACELERADA DE MATERIALES LIGNO- CELULÓSICOS	247
4.3.1. CARACTERIZACIÓN DE LA PAJA DE CEREAL	249
4.3.2. PRETRATAMIENTO DE LA PAJA DE CEREAL	251
4.3.3. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PAJA Y CELULOSAS COMERCIALES	257
4.3.3.1. Efecto de la temperatura sobre la hidrólisis enzimática de paja y de celulosas	258
4.3.3.2. Efecto del pH sobre la hidrólisis enzimática de paja y celulosas	266
4.3.3.3. Efecto de la concentración de enzima y sustrato sobre la hidrólisis enzimática de paja y celulosas	274
4.3.3.3.1. Efecto de la proporción de los enzimas celulolíticos	275
4.3.3.3.2. Efecto de la concentración del material ligno- celulósico	288
4.3.3.3.3. Relación entre las concentraciones del sistema enzimático y de los sustratos	297
4.3.3.4. Cinética de la hidrólisis enzimática de paja y de las celulosas	

comerciales	297
4.3.3.4.1. Cinética de Michaelis	298
4.3.3.4.2. Inhibición competitiva	301
4.3.4. DEGRADACIÓN ACCELERADA DE CÉLULOSAS Y PAJA CON ENZIMAS INMOVILIZADOS	309
5. CONCLUSIONES	319
6. BIBLIOGRAFÍA	325
7. ANEXO	345
7.1. CONTROL ESTADÍSTICO DE LA VARIANZA	347
7.2. SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	375
7.3. LISTADO DE TABLAS	379
7.4. LISTADO DE FIGURAS	385

1. INTRODUCCIÓN

1.1. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

La biomasa vegetal contiene celulosa que representa una extraordinaria fuente de riqueza potencial, dependiente únicamente del desarrollo de la tecnología necesaria para su utilización de forma económicamente rentable. Teniendo en cuenta que el valor anual medio de la energía solar incidente en la Tierra es de $3,67.12^{21}$ KJ, y estimando una eficiencia del proceso de fotosíntesis del 0,07%, puede calcularse que la producción anual de biomasa primaria es del orden de $1,8.10^{11}$ Tm. Si asumimos que el 40% de esta cantidad es celulosa, podrá concluirse que este polisacárido tiene un enorme potencial desde el punto de vista de obtención de energía.

Se han utilizado métodos muy variados para reciclar los sustratos lignocelulósicos. Se ha aprovechado su potencial energético para obtener energía directa o indirectamente mediante combustión, pirólisis, gasificación, etc., para obtener productos de aplicación en distintos campos industriales (etanol, ácido acético, azúcares, etc.) o para incrementar de la fertilidad del suelo mediante aporte cíclico de elementos nutritivos. De hecho, los azúcares fermentables, que potencialmente pueden extraerse de los residuos lignocelulósicos, tienen numerosas aplicaciones biotecnológicas. La glucosa obtenida a partir de estos materiales puede utilizarse como edulcorante, como fuente de energía para la producción de proteína unicelular (SCP) o para transformarse en otros productos químicos valiosos, como por ejemplo el etanol (Trevan *et al.*, 1990).

Evidentemente, para aprovechar los azúcares fermentables que contiene la celulosa, es necesario hidrolizarla previamente. La hidrólisis enzimática supone habitualmente el uso de biocatalizadores celulolíticos (celulasas) de origen microbiano. Según Dale (1980) es posible el crecimiento de un microorganismo en un medio de cultivo que contenga un sustrato específico como fuente exclusiva de carbono, para provocar la inducción del enzima necesario para degradar dicho sustrato. De esta forma, el enzima inducido puede aislarse y la tecnología enzimática se encargaría posteriormente de su manipulación en biorreactores apropiados para aplicaciones concretas (Perez-Mateos, 1989).

Los complejos enzimáticos inducibles están constituidos, fundamentalmente, por tres tipos de enzimas hidrolíticas: endo-glucanasas, exo-glucanasas y β -glucosidasas, capaces de hidrolizar los enlaces β -1,4-glucano de las cadenas de celulosa y de sus pro-

ductos de degradación para rendir glucosa como producto final (Bruchmann, 1980). Las celulasas más utilizadas proceden del hongo celulolítico *Trichoderma reesei*. Sin embargo, en las preparaciones enzimáticas de *T. reesei* la concentración de β -glucosidasa es menor que la se necesita para eliminar la inhibición por celobiosa que sufren las endo- y exo-glucanasas (Vallander y Eriksson, 1990). Por tanto, para alcanzar unos niveles adecuados de sacarificación es necesario suplementar los biorreactores con β -glucosidasa exógena (p.e. de *Aspergillus niger*), lo cual supone un incremento del coste del proceso.

Precisamente, uno de los aspectos fundamentales que permite que un proceso biotecnológico sea rentable económicamente es la aplicación de biocatalizadores inmovilizados, que suelen ser más estables y posibilitan su recuperación y reutilización (Gacesa y Hubbe, 1990; Perez-Mateos *et al.*, 1990). Según Trevan (1980), la inmovilización de un enzima implica su retención en una fase diferenciada que, aún estando separada, mantiene un intercambio con la fase general donde se encuentran dispersas y controladas las moléculas de sustrato, efectores e inhibidores. En cualquier caso, la inmovilización de un enzima provoca cambios en su medio ambiente y por tanto provoca cambios en sus propiedades específicas. El tipo y la magnitud de estos cambios dependerá del enzima y del método de inmovilización utilizado.

Adicionalmente, existen una serie de obstáculos naturales que dificultan la hidrólisis de la celulosa contenida en los residuos vegetales, como, por ejemplo, la presencia de lignina o las propias características estructurales de la celulosa (superficie específica y cristalinidad). Debido a estas dificultades, el proceso hidrolítico suele ser lento, por lo que los sustratos lignocelulósicos deben ser pretratados para hacerlos más susceptibles a la acción de los enzimas celulolíticos.

Este trabajo de Tesis Doctoral, centrado en la investigación relacionada con el aprovechamiento de materiales lignocelulósicos, está orientado al estudio de diferentes técnicas de inmovilización de β -glucosidasa con objeto de incrementar su estabilidad y posibilitar su reutilización. Adicionalmente, pretende la optimización de las condiciones de operación de biorreactores que trabajan en la hidrólisis de celulosas y paja de cereal, así como la utilización de β -glucosidasa inmovilizada en la degradación acelerada de

materiales lignocelulósicos. Todo ello como una vía más adecuada para un descenso del consumo de este enzima, y por tanto, de los costes del proceso.

1.2. HIPÓTESIS

Las hipótesis planteadas en este trabajo han sido las siguientes:

- 1.- La β -glucosidasa es un enzima limitante del proceso de degradación de los materiales lignocelulósicos.
- 2.- La β -glucosidasa y las celulasas intervinientes en el proceso de hidrólisis de celulosas pueden estabilizarse y reutilizarse mediante diversas técnicas de inmovilización.
- 3.- La degradación enzimática de los materiales lignocelulósicos puede acelerarse mediante el uso de enzimas inmovilizados.
- 4.- La celulosa soluble CMC, amorfa CMN-300 y microgranular C₆₄₁₃ pueden degradarse aceleradamente mediante la aplicación de carboximetilcelulasa (*T. reesei*) y β -glucosidasa (*A. niger*) inmovilizadas.
- 5.- La paja, y otros residuos agrícolas y forestales, pueden degradarse aceleradamente mediante la aplicación de carboximetilcelulasa (*T. reesei*) y β -glucosidasa (*A. niger*) inmovilizadas.
- 6.- La paja, y otros residuos agrícolas y forestales, pueden degradarse más fácilmente si se tratan químicamente, previamente a la hidrólisis enzimática.

Con objeto de comprobar estas hipótesis, se propusieron los objetivos detallados en el aptdo. 1.3 y se llevó a cabo el planteamiento experimental que se describe en el aptdo 1.4.

1.3. OBJETIVOS

Los objetivos planteados en este trabajo han sido los siguientes:

- 1.- Estudiar diferentes métodos de inmovilización de β -glucosidasa exocelular con objeto de determinar las mejores condiciones experimentales.
- 2.- Caracterizar la β -glucosidasa inmovilizada en relación a su contrapartida soluble.
- 3.- Estudiar comparativamente diversos procesos de pretratamiento de paja de trigo, con objeto de facilitar su hidrólisis enzimática.
- 4.- Optimizar las condiciones de operación en la hidrólisis de celulosa soluble (CMC), amorfa (CMN-300) y microgranular (C₆₄₁₃), aplicando carboximetilcelulasa (*T. reesei*) y β -glucosidasa (*A. niger*) libres e inmovilizadas.
- 5.- Optimizar las condiciones de operación en la degradación acelerada de paja de trigo nativa y pretratada, aplicando carboximetilcelulasa (*T. reesei*) y β -glucosidasa (*A. niger*) libres e inmovilizadas.
- 6.- Estudiar la aplicación de β -glucosidasa inmovilizada en la hidrólisis de celulosas comerciales y paja de trigo.

De acuerdo con estos objetivos, se diseñó el plan experimental descrito en el apartado siguiente.

1.3. PLAN EXPERIMENTAL

La realización de este trabajo se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente protocolo experimental:

1. Inmovilización de β -glucosidasa inducida en cultivos de *A. niger*.

1.1. Inmovilización de β -glucosidasa por atrapamiento en geles.

1.1.1. Inmovilización en geles de alginato de calcio.

1.1.1.1. Efecto de la concentración de alginato de sodio (1, 2 y 3%) y de CaCl_2 (0,05; 0,10 y 0,20 M).

1.1.1.2. Influencia del tiempo de agitación.

1.1.2. Inmovilización en geles de poliacrilamida.

1.1.2.1. Efecto de la concentración de acrilamida (5, 10, 15, 20 y 25%) y de bisacrilamida (0,4; 0,8; 1,2; 1,6 y 2,0%).

1.1.2.2. Influencia de la presencia de agentes protectores: ditioneol y celobiosa.

1.1.2.3. Influencia de la concentración de enzima.

1.2. Inmovilización de β -glucosidasa por asociación a humatos edáficos.

1.2.1. Efecto de la proporción humatos/enzima (0,5/1; 1/1; 2/1 y 5/1).

1.2.2. Influencia de la temperatura de tratamiento (4, 30 y 45°C) y del tiempo de tratamiento.

1.2.3. Inmovilización por asociación a humatos edáficos a través de glutaraldehído.

1.2.3.1. Efecto de la concentración del reactivo bifuncional (1; 2,5 y 5%).

1.2.3.2. Efecto de la proporción humatos/enzima (0,5/1; 1/1; 2/1 y 5/1).

1.2.3.3. Influencia de la temperatura de tratamiento (4, 30 y 45°C) y del tiempo de tratamiento.

1.2.3.4. Estudio de la estabilidad térmica del enzima libre y del enzima inmovilizado (pretratamiento térmico de 1 h a 30, 40, 50, 60, 70 y 90°C).

1.2.3.5. Estudio de la estabilidad operacional en medios edáficos del enzima libre e inmovilizado.

1.3. Inmovilización de β -glucosidasa por copolimerización fenólica.

1.3.1. Estudio de la estabilidad térmica.

1.3.1.1. Efecto del pretratamiento térmico de 1 h a 30, 40, 50, 60, 70 y 90°C, sobre el enzima libre y el copolímero β -glucosidasa/resorcinol.

1.3.1.2. Vida media del enzima libre y del copolímero β -glucosidasa/resorcinol a 55, 60 y 65°C.

1.3.2. Estudio de la estabilidad operacional en medios edáficos del enzima libre y del copolímero fenólico sintetizado.

2. Caracterización y estudio comparativo de la β -glucosidasa inmovilizada por atrapamiento en geles de alginato de calcio y de poliacrilamida en relación a su contrapartida soluble.

2.1. Cinética enzimática. Cálculo de las constantes K_m y V_{max} .

2.2. Influencia de la variación del pH del medio de incubación.

2.3. Efecto de la temperatura de incubación.

2.4. Estudio de la estabilidad térmica.

2.4.1. Pretratamiento térmico de 1 h.

2.4.2. Vida media del enzima libre e inmovilizado a 55, 60 y 70°C.

2.5. Estudio de la estabilidad operacional en medios edáficos.

2.6. Estudio de la estabilidad enzimática frente a la acción de enzimas proteolíticos (prónasa de *S. griseus*).

3. Degradación enzimática de materiales lignocelulósicos.

3.1. Estudio de diferentes métodos de pretratamiento de paja de trigo.

3.1.1. Utilización de H_2O_2 en medio básico.

3.1.2. Utilización de butilamina.

3.1.3. Utilización de NaOH.

- 3.2. Optimización de la condiciones experimentales del biorreactor utilizadas en la hidrólisis enzimática de carboximetilcelulosa, celulosa C₆₄₁₃ y CMN-300.
 - 3.2.1. Efecto de la temperatura de hidrólisis.
 - 3.2.2. Efecto del pH del medio.
 - 3.2.3. Efecto de la concentración y composición de la mezcla enzimática de CMCasa/ β -glucosidasa (1/0; 1/1; 2/1; 4/1 y 2/1)
 - 3.2.4. Efecto de la concentración de sustrato (0,5; 1,0; 2,5; 5,0 y 10,0%).
- 3.3. Optimización de las condiciones experimentales utilizadas para la hidrólisis enzimática de paja de trigo sin tratar y tratada con H₂O₂ y NaOH.
 - 3.3.1. Efecto de la temperatura de hidrólisis.
 - 3.3.2. Efecto del pH del medio.
 - 3.3.3. Efecto de la concentración y composición de la mezcla enzimática de CMCasa/ β -glucosidasa (1/0; 1/1; 2/1; 4/1 y 2/1)
 - 3.3.4. Efecto de la concentración de sustrato (0,5; 1,0; 2,5; 5,0 y 10,0%).
- 3.4. Estudio comparativo de las condiciones experimentales de hidrólisis con enzimas libres e inmovilizados, de los seis sustratos estudiados.
 - 3.4.1. Aplicación al biorreactor de CMCasa libre y β -glucosidasa libre.
 - 3.4.2. Aplicación de CMCasa libre y β -glucosidasa inmovilizada en geles de alginato de calcio.
 - 3.4.3. Aplicación de CMCasa libre y β -glucosidasa inmovilizada en geles de poliacrilamida.
 - 3.4.4. Aplicación de CMCasa y β -glucosidasa coinmovilizadas en geles de alginato de calcio.
 - 3.4.5. Aplicación de CMCasa y β -glucosidasa coinmovilizadas en geles de poliacrilamida.

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1. DEGRADACIÓN DE MATERIALES LIGNO- CELULÓSICOS

2.1.1. COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA DE LOS MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS

La celulosa es el principal componente de los materiales lignocelulósicos que constituyen el material de soporte de los tejidos vegetales. Los componentes de la materia lignocelulósica pueden clasificarse en tres grupos principales: polisacáridos, ligninas y otros componentes o sustancias extrañas.

2.1.1.1. POLISACÁRIDOS

Los componentes polisacáridos constan de carbohidratos de alto peso molecular (principalmente celulosa y hemicelulosa) que suponen del 60 al 80% del total de los materiales lignocelulósicos. La Tabla 2.1 presenta un análisis de los constituyentes mayoritarios de residuos agrícolas y forestales. Se muestra en estos datos que los residuos vegetales de las cosechas tienen un contenido medio en celulosa y lignina inferior al que presentan los residuos forestales. Por otra parte, la cantidad media de hemicelulosa es superior en los residuos agrícolas con respecto a los forestales.

Tabla 2.1. Composición química de los materiales lignocelulósicos (% peso)

Constituyentes	Residuos agrícolas ^a	Residuos forestales ^b
Celulosa	30 - 45	45 - 56
Hemicelulosa	16 - 27	10 - 25
Lignina	3 - 13	18 - 30
Proteínas (N x 6,25)	3,6 - 7,2	n.d. ^c

^a Fuente: Sloneker, (1976)

^b Fuente: Wenzel, (1970)

^c n.d.: no determinado

La paja presenta un contenido en celulosa más bajo que la madera pero, a pesar de ello, su fracción total de carbohidratos (holocelulosa) es aproximadamente igual a la de madera. Esto es debido a que, en comparación con la madera, contiene mayor canti-

dad de hemicelulosa que de lignina. Por otra parte, el contenido en cenizas es mayor en la paja que en la madera (Lázaro, 1991).

2.1.1.1.1. CELULOSAS

La celulosa existente en cada capa de la pared vegetal se presenta en haces delgados (con un diámetro de 35 Å) formados por largas cadenas de residuos de β -D-glucosa unidos mediante enlaces glucosídicos 1 \rightarrow 4, denominadas *fibras elementales*. La longitud de una molécula de celulosa constituyente de estas fibras elementales varía desde menos de 15 residuos de β -D-glucopiranosidos (γ -celulosas), hasta 10.000 - 14.000 residuos (α -celulosas). La longitud de una molécula de celulosa puede determinarse mediante el denominado *grado de polimerización* (DP) que mide el número de residuos de glucosa. En cada fibrilla elemental, las moléculas de celulosa están unidas lateralmente mediante puentes de hidrógeno con las moléculas adyacentes. Estas asociaciones permiten diferentes grados de paralelismo: unas regiones contienen moléculas altamente orientadas (llamadas "*celulosas cristalinas*"), mientras que otras tienen moléculas con una menor orientación (denominadas "*celulosas paracristalinas*" o "*amorfas*"). La agrupación de un cierto número de fibras elementales forman una microfibrilla de 100 Å de ancho y 50 Å de espesor, mientras que la zona del núcleo (donde existe una mayor orientación) suele estar rodeada por una vaina de celulosa amorfa y por cadenas de moléculas no celulósicas (Preston y Cronshaw, 1958).

Un conjunto de microfibrillas unidas lateralmente forma una macrofibrilla. Las microfibrillas y las macrofibrillas están orientadas de forma diferente en cada capa de la pared secundaria para dar mayor fuerza estructural a la pared vegetal. Las microfibrillas se hayan recubiertas por hemicelulosas y presentan incrustaciones de lignina. Los interespacios de las paredes celulares también están rellenos de hemicelulosa y lignina. Las hemicelulosas se encuentran unidas mediante enlaces covalentes a las ligninas (Jeffries, 1990). Con todo lo expuesto, resulta evidente que la celulosa de las paredes vegetales está muy protegida frente a la degradación biológica, no sólo por su estructuración específica sino también por su asociación adicional a otros polímeros accesorios.

2.1.1.1.2. HEMICELULOSAS

Las hemicelulosas son polisacáridos de bajo peso molecular, formados fundamentalmente por residuos D-xilosa, D-manosa, D-galactosa, D-glucosa, L-arabinosa, ácido O-metil-D-glucurónico, ácido D-galacturónico o ácido D-glucurónico y, menos frecuentemente, por L-ramnosa, L-fucosa y diversos azúcares metilados neutros. Son fácilmente hidrolizables en medio alcalino y en medio ácido se degradan más rápidamente que las celulosas. Aunque las hemicelulosas se consideran generalmente polisacáridos estructurales, es conveniente añadir que aparecen junto a otros polímeros vegetales (como los arabinogalactanos), que presentan otras funciones diferentes a las meramente estructurales.

Los xilanos y los mananos son los polisacáridos que más predominan en las hemicelulosas de las maderas duras y blandas, respectivamente.

Los xilanos (O-acetil-4-D-metilglucurono-xilano) están formados por aproximadamente 200 residuos de β -D-xilopiranososa, unidos entre sí mediante enlaces glucosídicos 1 \rightarrow 4. Algunas de estas unidades de xilosa llevan una cadena terminal simple formada por residuos de ácido 4-O-metil- α -D-glucurónico, unido directamente al carbono 2 de la xilosa. Entre cada siete o diez residuos de xilosa aparece un grupo O-acetilo unido al C-2 o más frecuentemente al C-3 (Timell, 1967).

Los mananos (galactoglucomananos) están formados por residuos β -D-glucopiranosidos y β -D-manopiranosidos unidos entre sí por enlaces 1 \rightarrow 4 y distribuidos de forma aleatoria. Alguna de estas unidades de hexosas lleva un residuo terminal de D-galactopiranosido unido a un C-6. Es probable que todos los galactomananos estén acetilados en su estado nativo. Los grupos acetilo se encuentran unidos a residuos de manosa (Timell, 1967).

2.1.1.2. LIGNINAS

Las ligninas son el tercer componente mayoritario de los materiales lignocelulósicos, constituyendo de un 20 a un 30% del total en la mayoría de las maderas, y de un 5 a un 15% del total en los residuos agrícolas de las cosechas (Kirk, 1988). Las ligninas se encuentran concentradas principalmente en los espacios que quedan entre las paredes de

células adyacentes (lamela media) y en la capa S2 de las paredes vegetales donde se depositan durante el proceso de lignificación de los tejidos de las plantas.

La lignina es un polímero amorfo tridimensional compuesto por tres tipos de unidades de fenilpropanoico (coniferol, alcohol sinapílico y alcohol p-cumárico) (Crawford, 1978). Todos los monómeros de las moléculas de lignina no se encuentran unidos de la misma forma: algunos están implicados en varios enlaces, mientras que otros únicamente en uno o dos. Además, las uniones intermonoméricas se establecen en diferentes posiciones a través de enlaces C-C o enlaces éter C-O (que en ocasiones son enlaces éster). Los anillos aromáticos suelen estar sustituidos con uno o dos grupos metoxi, y las uniones entre unidades carecen de estereoregularidad (Sarkarsen y Ludwig, 1971). Las ligninas son muy heterogéneas y contienen ramas de polímeros de estructura y tamaño indefinido con un peso molecular que varía desde pocos miles hasta más de un millón de Daltons (Bisaria, 1991).

Las ligninas de las paredes celulares, no sólo se encuentran incrustadas en las microfibras de celulosa, sino que también aparecen unidas física y químicamente a hemicelulosas (Azuma y Koshijima, 1988). Por ello, las ligninas forman una barrera física que impide la penetración de celulasas y hemicelulasas (Koshijima *et al.*, 1989).

2.1.1.3. COMPONENTES EXTRAÑOS

Se denominan componentes extraños a los materiales que no constituyen las paredes celulares. Estos componentes consisten en una amplia variedad de productos químicos que en función de su solubilidad en agua y en disolventes orgánicos neutros pueden agruparse en productos extraíbles y no extraíbles. Los “extractos” pueden a su vez dividirse en tres grupos: terpenos, resinas y fenoles. Los terpenos son polímeros derivados del isopreno. Las resinas incluyen una gran variedad de componentes no volátiles como grasas, ácidos grasos, alcoholes, fitoesteroles y otros compuestos. Los fenoles constan de un gran número de compuestos que aún no se han estudiado suficientemente, entre ellos los más importantes son los taninos, fenoles (“el corazón de la madera”) y otras sustancias afines. Además, entre ellos se encuentran carbohidratos de bajo peso molecular, alcaloides y lignina.

Los productos no extraíbles de los componentes extraños consisten principalmente en compuestos inorgánicos (como, p.e. sales minerales). Los componentes dominantes son carbonatos alcalinos y alcalinotérreos y oxalatos. En la paja, por ejemplo, abunda la sílice que se deposita en forma de cristales, además de otras sustancias que aparecen en pequeñas cantidades (tales como almidón, pectinas y proteínas).

A pesar de que aparecen en pequeñas cantidades, los materiales extraños son muy importantes puesto que hacen que la celulosa sea resistente al ataque de los insectos y, desde el punto de vista industrial, inhiben el blanqueado y el pulpeado.

2.1.1.4. ESTRUCTURA DE LOS MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS

En relación con la estructura de los materiales lignocelulósicos, la Fig. 2.1 muestra esquemáticamente la correspondiente a la pared celular de la madera. En ella puede observarse que los materiales lignocelulósicos se encuentran formando parte de las paredes vegetales, presentando una fina capa primaria que envuelve a una pared secundaria relativamente más gruesa.

La pared primaria de los tejidos leñosos tiene un espesor de 0,1 a 0,2 μm y contiene una organización aleatoria y libre de redes de microfibras de celulosa. La capa más externa de la pared secundaria (S_1) tiene una estructura fibrilar cruzada. En la capa S_2 , la principal porción de la pared secundaria (de 1 a 5 μm de espesor) está constituida por microfibras orientadas casi paralelamente al eje del lumen. En la capa S_3 , las microfibras forman una hélice plana con zonas interiores ("*warty layer*") formadas por productos protoplasmáticos de desecho. La porción central vacía (llamada lumen) aparece como consecuencia de la desintegración del protoplasma producida por el envejecimiento de la planta. Las paredes primarias de células adyacentes están cementadas juntas mediante peptinas y ligninas, denominándose *lamela media* la porción que aparece entre dos células adyacentes (Chahal, 1991).

En un esquema general, los elementos fibrilares que constan de celulosa, están enrollados en espirales, en torno a un "lumen" hueco, para dar a las fibras tenacidad y flexibilidad. Además, este cable es resistente a la humedad debido a la lignina y a las ce-

ras que contiene, lo cual le confiere resistencia química. La hemicelulosa proporciona una íntima interunión e incluso enlaces entre lignina y celulosa. La composición es perfecta: las cadenas de celulosa lineales son hidrófilas y confieren resistencia a la tensión, mientras la lignina amorfa o similares, que son hidrófobas, le dan resistencia química y protección frente al agua.

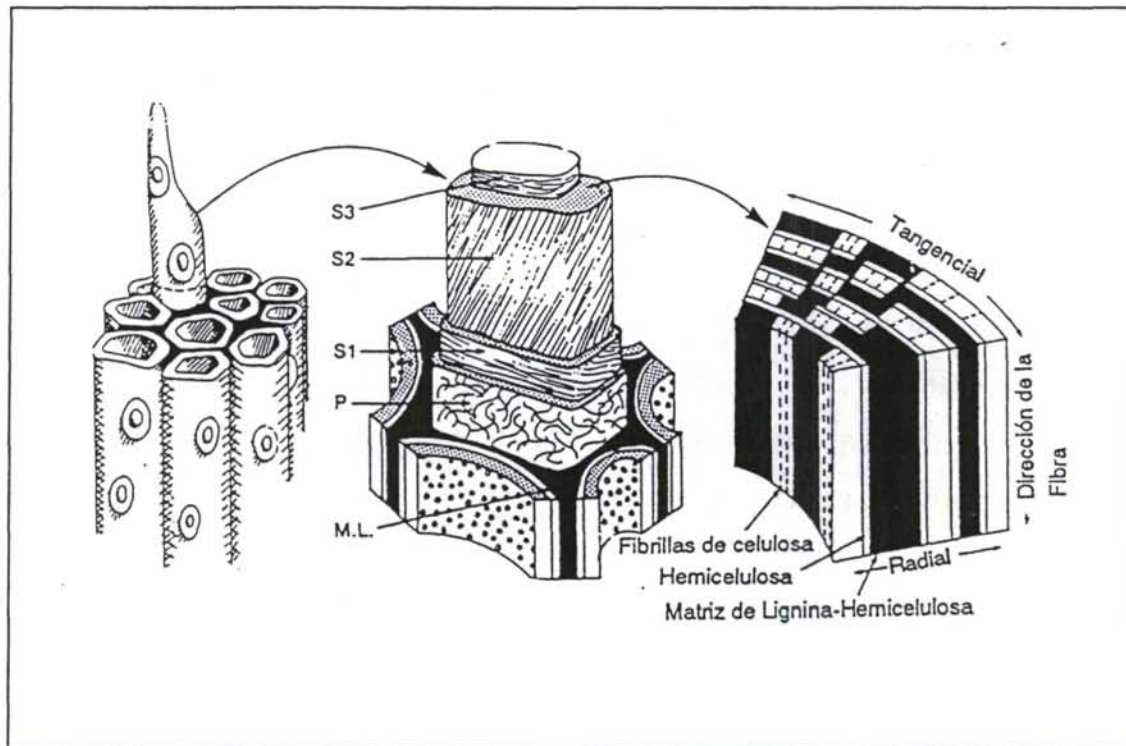


Fig. 2.1. Ilustración esquemática de la estructura de tejidos leñosos. S1-S3: paredes celulares secundarias; P: pared primaria; M.L: membrana intermedia. (Kirk, 1988).

La estructura de la pared celular de la paja de cereales se ha estudiado menos que la de madera. Comparándola con la de la madera, la paja es un material más heterogéneo. Las fibras de paja, que provienen de células e internodos principalmente, son bastante largas y delgadas con terminaciones puntiagudas. Sin embargo, además de estas fibras, la paja también contiene células cortas no fibrosas (como las células de la epidermis). Mientras que el 96% de las células de madera forman fibras, en la paja de cereal sólo el 35-39% de las células forman estructuras fibrilares.

Del simple examen de las características estructurales de la pared celular aparecen ya los dos obstáculos principales en la hidrólisis de la celulosa contenida en los ma-

teriales lignocelulósicos: la envoltura de la lignina que rodea las fibras de celulosa y la resistencia estructural de la celulosa.

2.1.2. METODOS DE PRETRATAMIENTO

La posibilidad de que los materiales celulósicos sean hidrolizados por vía enzimática está determinada fundamentalmente por la accesibilidad de los enzimas celolíticos a dichos materiales (Tanaka *et al.*, 1988). El contacto directo de las celulasas con sus sustratos es, obviamente, un requisito previo a la degradación enzimática (Kyriacou *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1994). Por lo tanto, cualquier estructura que limite físicamente la accesibilidad de los enzimas hacia sus sustratos, supondrá un retardo de la acción catalítica. Estas limitaciones han sido discutidas por Cowling (1975) y Fan *et al.*, (1980).

La cristalinidad de la celulosa y las incrustaciones de ligninas en las fibras de celulosa hacen que los materiales lignocelulósicos sean compuestos muy estables y resistentes a la biodegradación, presentándose muy inaccesibles a los enzimas. Cualquier modificación de la estructura de la lignina que incremente la eficacia del ataque químico o enzimático es de interés desde el punto de vista industrial (Durán *et al.*, 1988). Por lo tanto, a menos que las ligninas sean despolimerizadas, solubilizadas o eliminadas, no será factible la fácil hidrólisis de celulosa y hemicelulosa en bioconversiones que permitan la obtención de productos de interés tecnológico.

Aunque estudios recientes han demostrado que la cristalinidad no impide la hidrólisis total, es un inconveniente grave a la hidrólisis enzimática. Por ello, el tratamiento previo de estos materiales para permitir la despolimerización de las ligninas y el incremento de la accesibilidad a los enzimas es necesario para su posterior transformación (Chahal, 1991).

Hay otros factores, como el grado de polimerización (DP), el grado de sustitución de las cadenas celulósicas, el contenido en humedad, la madurez de la fibra o la asociación con otras sustancias, que también modifican la susceptibilidad del sustrato celulósico a la acción enzimática.

Los objetivos fundamentales de los pretratamientos, con objeto de modificar las características de estos materiales de modo que se incremente el rendimiento de la hidrólisis posterior, son los siguientes:

- Reducir la cristalinidad de la celulosa.
- Disociar el complejo lignina-celulosa.
- Aumentar el área superficial de la fibra de celulosa.
- Disminuir en la medida de lo posible la presencia de aquellas sustancias que dificulten el proceso.

Un pretratamiento eficaz debería reunir, además, otras características tales como consumo pequeño de energía, costes de inversión y mantenimiento bajos, uso de reactivos baratos y fácilmente recuperables y posibilidad de aplicación a diversos pretratamientos (Ladish *et al.*, 1983). Por otra parte, debe tenerse en cuenta que determinados productos, formados durante el pretratamiento, pueden inhibir bien el crecimiento de microorganismos celulolíticos (cuando los materiales lignocelulósicos pretratados se usan como fuente de carbono) o bien la actividad de los enzimas implicados.

Se han ensayado pretratamientos muy diferentes y se han realizado varias revisiones sobre este tema (Tarkow y Feist, 1969; Millett *et al.*, 1976). De los muchos métodos de pretratamiento ensayados, se ha comprobado que unos son efectivos en la ruptura del complejo lignina-carbohidratos y otros en la ruptura de la estructura altamente ordenada de la propia celulosa. En cualquier caso, la función principal de estos tratamientos es abrir la estructura de los materiales lignocelulósicos para mejorar el acceso de los enzimas celulolíticos.

Los métodos de pretratamiento pueden clasificarse, según su naturaleza, en: físicos, químicos y biológicos (Vallender y Eriksson, 1990).

2.1.2.1. PRETRATAMIENTOS FÍSICOS

Los pretratamientos físicos pueden subdividir los materiales lignocelulósicos en partículas finas, más fácilmente susceptibles a la hidrólisis ácida o enzimática, o bien pueden descomponer los sustratos lignocelulósicos al someterlos a fuerzas externas no

mecánicas. En este sentido, se consideran dos categorías generales de pretratamientos físicos: (1) mecánicos y (2) no mecánicos:

1. Los *pretratamientos mecánicos* utilizan fuerzas cortantes e impactantes para producir un sustrato fino de bajo índice de cristalinidad y elevada superficie específica. Sin embargo, las ligninas permanecen asociadas y siguen actuando como barreras en la accesibilidad del enzima (Bisaria, 1991). Ejemplos representativos de estos tratamientos son el uso de molino de bolas, de dos rodillos, de martillo, coloidal, de energía vibracional, homogenizadores de extrusión, etc. (Mandels *et al.*, 1974; Millett *et al.*, 1976).

2. Entre los *pretratamientos físicos no mecánicos* puede incluirse el uso de irradiación, temperatura o vapor de agua.

Debido a que la irradiación con electrones da lugar a una amplia despolimerización de los materiales, se ha empleado para mejorar la digestibilidad de pajas y maderas sometidos a la acción de microorganismos procedentes de rumiantes (Millett *et al.*, 1975).

También es conocido que el proceso de pirólisis (tratamiento de los materiales a elevadas temperaturas) produce despolimerización, oxidación o deshidratación en los materiales lignocelulósicos. Ya en 1956, Sarkov y Dobush relataron que un simple calentamiento de celulosa a 200°C (en queroseno o aire seco) producía una mejora en los rendimientos de la hidrólisis de estos materiales. En el otro extremo de la escala de temperaturas, la congelación a -75°C de una suspensión acuosa de materiales celulósicos mejoraba su reactividad química. Por otra parte, la utilización de vapor de agua producía un incremento en el tamaño de los poros y una hidrólisis parcial de las hemicelulosas.

2.1.2.2. PRETRATAMIENTOS QUIMÍCOS

Los pretratamientos químicos se han utilizado ampliamente para (i) eliminar la lignina que envuelve a la celulosa y para (ii) destruir la estructura cristalina de la celulosa.

Si bien los pretratamientos químicos son normalmente efectivos, presentan inconvenientes que no hay que ignorar. Ellos incluyen la utilización de equipos resistentes a la corrosión, lavado extensivo y eliminación de residuos químicos.

Los distintos productos químicos que suelen utilizarse en estos tratamientos, pueden englobarse en los grupos siguientes:

1. *Agentes hinchadores* (NaOH, NH₃): El tratamiento más común ha sido la utilización de hidróxido sódico, que provoca un incremento del área superficial como consecuencia de un hinchamiento y una ruptura de la estructura de la lignina.

2. *Ácidos diluidos* (HCl, H₂SO₄, H₃PO₄): Los ácidos se han utilizado principalmente para la hidrólisis de la celulosa más que como pretratamiento. Este procedimiento produce también una parcial hidrólisis de las hemicelulosas.

3. *Agentes oxidantes* (O₃, H₂O₂): Estos agentes modifican la estructura de la celulosa, introduciéndose en ella y oxidándola posteriormente. Algunos oxidantes reaccionan tanto en las regiones amorfas como en las regiones cristalinas de la celulosa, mientras que otros oxidantes atacan sólo las regiones amorfas. Los agentes oxidantes también atacan las ligninas, rompiendo asociaciones entre los polímeros de carbohidrato y lignina, produciendo un residuo más fácilmente hidrolizable por las celulasas.

4. *Gases* (SO₂, NO₂, ClO₂): El pretratamiento con gases tiene la ventaja de facilitar la penetración uniforme del sustrato, proporcionando así un ataque más uniforme. Los gases son capaces de romper las uniones entre ligninas y el carbohidrato. Por otra parte, trabajar con gases es más pesado que trabajar con líquidos y la recuperación de los gases residuales causa más problemas que los residuos líquidos.

5. *Disolventes orgánicos* (metanol, etanol, butanol, glicerol, dioxano, fenol, etilenglicol en presencia de ácidos de Lewis como catalizadores): Estos pretratamientos suponen el uso de un disolvente acuoso (etanol, butanol, etc.) en presencia de un catalizador para hidrolizar muchas de las uniones de carbohidrato en la hemicelulosa, así como las uniones lignina-carbohidrato y lignina-lignina. Los disolventes solubilizan la lignina, mientras que la celulosa permanece en estado sólido. Los ácidos orgánicos que son liberados del sustrato durante el proceso aceleran la deslignificación y dan como resultado la solubilización de hemicelulosas. Este pretratamiento tiene la ventaja de que los disolventes pueden ser recuperados y reciclados. También es interesante porque separa los materiales lignocelulósicos en celulosa sólida, lignina sólida (que ha sufrido pocas reacciones

de condensación) y una fracción líquida que contiene la hemicelulosa hidrolizada (Sarkarsen, 1980).

6. *Disolventes de la celulosa*: Estos disolventes pertenecen a cuatro categorías diferentes: (a) ácidos minerales concentrados (H_2SO_4 , HCl), (b) bases de amonio cuaternarias (NH_3 , hidrazina); (c) disolventes apróticos (DNSO, óxidos de sulfuro, dimetil formamida); y (d) complejos metálicos (cadoxen, cuoxam). Todos ellos actúan reduciendo la cristalinidad y solubilizando las celulosas y hemicelulosas. Algunos de estos disolventes transforman la celulosa I (celulosa nativa) en celulosa II, la cual es mucho más susceptible al ataque de los enzimas celulolíticos.

2.1.2.3. PRETRATAMIENTOS BIOLÓGICOS

Los tratamientos biológicos están relacionados con el uso de hongos (fundamentalmente hongos radicales blancos) y de algunas bacterias capaces de degradar la lignina. Los microorganismos no son capaces de eliminar completa y selectivamente la lignina, ya que no como fuente de carbono y energía utilizan preferentemente celulosa y/o hemicelulosa. Sin embargo, se han aislado celulasas, a partir de cepas mutantes de *Sporotrichum pulverulentum*, capaces de deslignificar la madera sin afectar a la celulosa (Eriksson *et al.*, 1980). A pesar de ello, estas cepas producen una pérdida significativa de hemicelulosa si no se añade glucosa durante la degradación de la lignina. En todo caso, los pretratamientos biológicos tienen el serio inconveniente de que requieren un tiempo de tratamiento muy largo, que oscila generalmente entre 2 y 5 semanas (Hatakka, 1983; Srivastara, 1989).

También se han realizado tratamientos enzimáticos para solubilizar ligninas (Kivaisi *et al.*, 1990) y hemicelulosas (Robert *et al.*, 1990). Sin embargo, estos procesos son demasiado caros debido a la baja actividad y estabilidad los enzimas empleados (Conchie *et al.*, 1988).

Por último, también es posible una combinación de estos procesos. Probablemente la explosión con vapor sea el tratamiento más prometedor en este sentido. La utilización de vapor a presión y temperatura elevadas (4 MPa y 185-240°C, respectivamente)

da como resultado la descomposición de algunas hemicelulosas que se convierten en ácidos urónicos y otros ácidos (principalmente acético), capaces de catalizar la reacción de despolimerización de hemicelulosa y lignina (Bisaria, 1991). Después del tratamiento con vapor, el residuo puede ser descargado explosivamente mediante una drástica disminución de la presión o vaciado tras un proceso gradual de "bleed-down" (Wood y Saddler, 1988). Este tipo de pretratamiento es atractivo porque permite el fraccionamiento selectivo de los tres tipos de componentes (celulosa, hemicelulosa y lignina) en un amplio rango de maderas y residuos agrícolas (Saddler *et al.*, 1982). Mientras que la lignina y la hemicelulosa recuperadas pueden ser transformadas en productos útiles, la celulosa puede ser hidrolizada más fácilmente.

Adicionalmente, se ha demostrado que la descompresión rápida no mejora la accesibilidad a la celulosa (Brownell y Saddler, 1986; 1987), por lo que se ha puesto a punto un proceso denominado RASH (Rapid Steam Hydrolysis), donde los gases y los productos solubles son continuamente extraídos (Schultz *et al.*, 1989). El tratamiento de los materiales lignocelulósicos con vapor en condiciones básicas aumenta la accesibilidad a la celulosa (Dekker y Wallis, 1983). Un tratamiento previo de maderas duras y blandas con SO₂, antes de la explosión, produce un residuo más susceptible de ser hidrolizado, cuando son sometidos posteriormente al proceso denominado AFEX (ammonia-freeze-explosion); este proceso consiste en el tratamiento de los materiales lignocelulósicos a presión con amoníaco líquido, seguido de una rápida disminución de la misma (Dale y Moreira, 1982).

2.1.3. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA CELULOSA

La hidrólisis enzimática de la celulosa consiste en la utilización de enzimas celolíticos, producidos por algunos hongos y bacterias, para obtener una solución de glucosa a partir del polisacárido que es originalmente insoluble. Las principales dificultades para hidrolizar por vía enzimática los materiales lignocelulósicos están relacionadas, por una parte con la baja actividad específica de los enzimas, por lo que el proceso requiere un consumo elevado de los biocatalizadores. Por otra parte, la propia estructura de los sustratos lignocelulósicos nativos exige que el material lignocelulósico, como ya se ha tratado en el apartado anterior, deba recibir un pretratamiento con el fin de obtener velocidades y eficacia de hidrólisis comercialmente rentables. No obstante, los procesos de hidrólisis enzimática tienen algunas ventajas sobre los de hidrólisis ácida, ya que los enzimas proporcionan un hidrolizado homogéneo, debido a su alta especificidad y además no generan productos secundarios procedentes de la degradación de la glucosa, que suelen ser de carácter tóxico para la fermentación y la nutrición. Estos procesos pueden llevarse a cabo además a temperaturas y presiones más bajas.

Sin embargo, y a pesar de los numerosos y continuados esfuerzos investigadores realizados, la complejidad del mecanismo de hidrólisis enzimática de la celulosa sigue siendo un desafío para bioquímicos, genetistas, microbiólogos y para todo aquél que desee utilizar la celulosa como una fuente de combustibles líquidos y alimentos.

En este apartado, se exponen los distintos sistemas enzimáticos celolíticos, sus fuentes, así como sus principales características y mecanismos de acción.

2.1.3.1. MICROORGANISMOS CELULOLÍTICOS

La biodegradación de la celulosa constituye una etapa esencial en el ciclo del carbono mediante la cual se mantiene el balance de este elemento en la biosfera. El grupo de enzimas, responsable último de este proceso, se denomina genéricamente “celulasas” y

corresponden en realidad a una mezcla de distintas actividades enzimáticas cuya acción conjunta produce finalmente la degradación de la celulosa nativa.

Las celulasas son producidas por plantas superiores, por algunos invertebrados y fundamentalmente por ciertos microorganismos como bacterias y hongos. Las plantas superiores producen celulasas como agentes morfogénicos. También algunos patógenos de plantas sintetizan celulasas para facilitar su penetración en el vegetal y la invasión posterior de los tejidos. En el caso de microorganismos, las celulasas se producen para obtener fuentes de carbono necesarias para su propio desarrollo. Los microorganismos capaces de utilizar celulosa como fuente hidrocarbonada y, por tanto con capacidad para producir el complejo celulolítico, se encuentran distribuidos en dos grupos principales: bacterias y hongos, aerobios o anaerobios, mesófilos o termófilos, que se desarrollan en gran variedad de hábitats (Ljungdahl y Eriksson, 1985). Las celulasas procedentes de microorganismos y concretamente las de origen fúngico han sido las más ampliamente estudiadas ya que se producen en grandes cantidades y se excretan al medio extracelular, lo que facilita su separación y aislamiento de los medios de cultivo.

2.1.3.1.1. HONGOS

En la naturaleza existe una continua degradación de restos vegetales gracias a la acción de microorganismos saprófitos. Los hongos más importantes, capaces de actuar sobre la madera y otros residuos forestales y agrícolas, pertenecen a diferentes especies y cepas, siendo excepcional que su degradación pueda realizarse por un solo monocultivo. De hecho, para la degradación de la madera se necesita la acción de distintas cepas de microorganismos (Kaarik, 1974), que la colonizan en tres etapas sucesivas (Garret, 1963). En la primera etapa, los tejidos de la madera son atacados por hongos saprófitos primarios, que metabolizan azúcares de bajo peso molecular y otros compuestos más fáciles de degradar que la celulosa. En la segunda etapa, aparecen ya hongos capaces de degradar la celulosa (hongos saprófitos secundarios), que viven gracias a los productos de la hidrólisis de la celulosa. En la tercera y última etapa se desarrollan aquellos microorganismos capaces de utilizar los productos liberados de la degradación de la lignina como fuente de C y energía.

Se han estudiado numerosos hongos con capacidad celulolítica. Entre ellos destacan, por sus rendimiento y acción, *Trichoderma viride* (Critzali y Brown, 1979), *Trichoderma reesei* [oficialmente *T. viride* QM6a (Mandels y Reese, 1964)], *Trichoderma koningii* (Wood, 1968), *Fusarium solani* (Wood, 1969), *Penicillium pinophilum / funiculosum* (Wood y McCrae, 1978), *Sporotrichum pulverulentum* (Eriksson, 1975), *Talaromyces emersonii* (Folan y Coughlan, 1979) y *Sclerotium rolfsii* (Lachke y Deshpande, 1988) y *Neocallimastix frontalis* (Wood *et al.*, 1986).

2.1.3.1.2. BACTERIAS

Entre las bacterias celulolíticas estudiadas se han encontrado tanto especies aerobias (p.e. *Pseudomonas*, *Cellulomonas*, *Cytophaga*, *Bacillus*, etc.), como anaerobias (p.e. *Clostridium*, etc.). Aunque un número importante de estas bacterias son capaces de sintetizar enzimas celulolíticos, sólo unas pocas especies han resultado suficientemente eficaces para su aplicación industrial (Enari *et al.*, 1983).

Algunas bacterias no secretan grandes cantidades de enzimas celulolíticos, pero, sin embargo, son capaces de desarrollarse sobre materiales celulósicos. Un ejemplo de este comportamiento corresponde a *Cellulomonas uda*. El examen microscópico de sus cultivos mostró que las bacterias no se enlazaban apreciablemente a las fibras de celulosa no digeridas, debido probablemente a que los enzimas celulolíticos eran de naturaleza endocelular (Hagget *et al.*, 1979).

Durante las dos últimas décadas se han incrementado los estudios sobre bacterias anaerobias, en parte como consecuencia del creciente interés en su utilización en procesos fermentativos. Adicionalmente, se han desarrollado métodos rutinarios que hacen posible que el estudio de las bacterias anaerobias resulte casi tan sencillo como el de microorganismos aerobios (Miller y Wollin, 1974).

Los mejores productores de enzimas celulolíticos extracelulares son, probablemente, bacterias anaerobias del género *Clostridium* (Zeikus, 1980). Las especies termófilas *Clostridium thermocellum* crecen sólo en celulosa o celobiosa. Los productos metabólicos de estos organismos son etanol, ácido acético, dióxido de carbono e hidrógeno, por lo que para su producción, pueden utilizarse directamente materiales celulósicos. La

principal limitación en este proceso parece derivarse de la baja tolerancia de las bacterias al etanol.

El creciente interés de estas bacterias se relaciona últimamente, además de con su actividad celulolítica, con la posibilidad de que estos microorganismos sean en sí mismos una fuente excelente de proteínas monocelulares (SCP) (Humphrey *et al.*, 1977).

2.1.3.2. SISTEMA ENZIMÁTICO CELULOLÍTICO

Los enzimas producidos por los organismos celulolíticos para degradar la celulosa constituyen un complejo formado por enzimas inducibles. Diversos disacáridos y azúcares oligoméricos, incluyendo algunos derivados, son inductores adecuados del sistema celulolítico. Sin embargo, todavía no se conocen con detalle los mecanismos de esta inducción enzimática. Este conocimiento supondría un gran paso desde un punto de vista biotecnológico, especialmente para la utilización comercial de las celulasas (Busto *et al.*, 1996).

La síntesis de los enzimas celulolíticos, como la de otros enzimas catabólicos, se encuentra inhibida por glucosa y otras fuentes de carbono fácilmente asimilables. Así por ejemplo, la glucosa reprime la síntesis de β -D-glucosidasa y endoglucanasas en presencia de celulosa y otros inductores. El hongo *Trichoderma reesei* crece bien en presencia de glucosa pero los enzimas celulolíticos solamente se sintetizan cuando la concentración de glucosa presente en el medio disminuye (Enari, 1983). La producción de celulasas en hongos está regulada también por otros fenómenos, además de la inducción y represión catabólica como es la inhibición de la síntesis de celulasas por la presencia de diversos fenoles. En este sentido, las fenol-oxidasas pueden regular la producción de celulasas por polimerización oxidativa de compuestos fenólicos relacionados con la lignina, los cuales pueden actuar como represores en la producción de enzimas en microorganismos fúngicos que se desarrollan en medios lignocelulósicos.

Los grupos enzimáticos que constituyen el complejo celulolítico, así como sus mecanismos, presentan importantes diferencias en función de la fuente de origen (hongos

o bacterias), por lo que a continuación se detallan las principales características de las celulasas de origen fúngico y bacteriano.

2.1.3.2.1. CELULASAS FÚNGICAS

El sistema enzimático celulolítico procedente de hongos incluye tres tipos de enzimas:

- Endoglucanasas (EC 3.2.1.4),
- Celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) y
- β -Glucosidasas (EC 3.2.1.21).

Las endoglucanasas son capaces de atacar la celulosa cristalina o amorfa (así como derivados solubles, como la carboximetilcelulosa) hidrolizando enlaces glucosídicos internos. El ataque sobre celulosa amorfa está caracterizado por la ruptura aleatoria de enlaces β -glucosídicos. En la hidrólisis de CM-celulosa, la viscosidad relativa está muy relacionada con la velocidad de liberación de azúcares reductores.

Las celobiohidrolasas degradan también celulosa amorfa liberando consecutivamente unidades de celobiosa a partir de los terminales no reductores del sustrato.

Por último, la β -glucosidasa completa el proceso hidrolítico por conversión de la celobiosa resultante a glucosa y/o por liberación de glucosa a partir de los terminales no reductores de cadenas de oligosacáridos de bajo peso molecular (Coughlan, 1985).

En la Tabla 2.2 se detalla la especificidad de varios tipos de enzimas presentes en un sistema celulolítico capaz de degradar celulosa cristalina. Adicionalmente, varios autores han descrito numerosos enzimas celulolíticos que presentan una especificidad anómala con respecto a las celulasas mencionadas. Esto hace que las definiciones dadas no sean precisas y que los enzimas descritos como puros no lo sean totalmente. En algunos ejemplos, las anomalías aparentes pueden ser reflejo de la existencia de complejos multienzimáticos similares a los que se han descrito entre endoglucanasas, xilanasas y β -glucosidasa de los sistemas celulolíticos de *T. reesei* (Sprey y Lambert, 1983). Incluso se

han encontrado complejos enzimáticos, electroforéticamente homogéneos, que se transforman en heterogéneos después de un tratamiento con octilglucósido urea.

Tabla 2.2. Acción de distintas celulasas sobre diferentes sustratos (Wood, 1990).

Enzima	Celulosa cristalina	Celulosa amorfa hinchada	CM-celulosa	Celooligosacáridos	Celobiosa
Exoglucanasa	Pequeña	Muy activa	Nula	Activa	Nula
Endoglucanasa	Nula	Muy activa	Muy activa	Activa	Nula
β -Glucosidasa	Nula	Nula	Nula	Activa	Activa

Con respecto a la existencia de complejos multienzimáticos, existe un debate continuo sobre la especificidad hacia los distintos sustratos y modo de acción de las celobiohidrolasas. Se ha descrito la existencia de formas inmunológicamente relacionadas entre sí y otras no relacionadas (celobiohidrolasa I y II) en los sistemas celulolíticos de *T. reesei* y *P. pinophilum* (Wood, 1989). Así, la degradación de celulosas cristalinas (algodón y Avicel) se lleva a cabo de forma extensiva por una celobiohidrolasa I purificada de *T. reesei* cuando actúa aisladamente (Chanzy *et al.*, 1983; Henrissat *et al.*, 1985), pero es despreciable si la que actúa es una celobiohidrolasa I de *T. koningii* (Wood y McCrae, 1972). Estas diferencias podrían ser resultado de la diferente especificidad entre enzimas de distinta procedencia. Sin embargo, también podrían ser la consecuencia de una asociación establecida entre trazas de endoglucanasas y celobiohidrolasas actuando en complejos estables en las condiciones que normalmente se realizan los estudios de fraccionamiento. La acción sinérgica entre celobiohidrolasas y trazas de endoglucanasas podría explicar muchas de las especificidades inusuales y los modos de acción de los enzimas que aparecen detallados en la literatura. Recientemente, se ha evidenciado la existencia de complejos multienzimáticos (celobiohidrolasas-endoglucanasas) en preparaciones de enzimas aislados de *T. reesei* y *P. pinophilum* (Wood *et al.*, 1988; 1989). Este complejo fue identificado al ser disociado en una columna de cromatografía de afinidad, preparada mediante acoplamiento de p-animobenzil-1-tio- β -D-celobiosido a Affigel 10 (Van Tilbeurgh *et al.*, 1984).

La mayor parte de los detalles esenciales del mecanismo de degradación de la celulosa por hongos se encuentra esquematizado en la Fig. 2.2, aunque es evidente (tal y como se comprobará en los apartados posteriores) que esta degradación no se conoce en su totalidad.

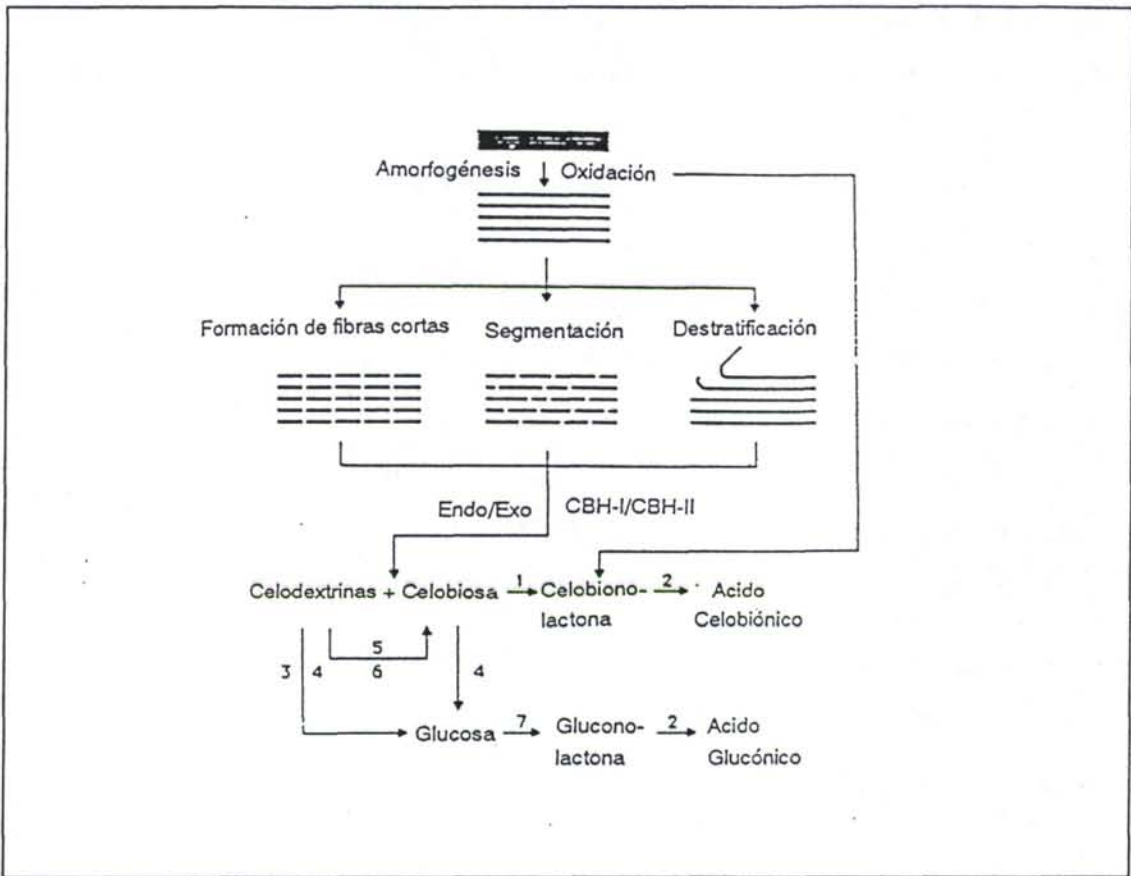


Fig. 2.2. Mecanismo de degradación de celulosa por hongos. Los enzimas numerados son: 1: celobio-oxideshidrogenasa; 2: lactonasa; 3: exoglucosidasa; 6: exocelobiohidrolasa; 7: gluco-oxidasa (Coughlan y Ljungdahl, 1988).

Reese *et al.* (1950) propusieron que era necesaria la acción de un componente C_1 para que los sustratos con alto grado de cristalinidad pudieran ser susceptibles a la acción de enzimas hidrolíticos. Este estado inicial de digestión de la celulosa fue denominado "amorfogénesis" (Coughlan, 1985). Koenigs (1975) sugirió que el ataque inicial a la celulosa se realizaba a través de un sistema H_2O_2/Fe^{2+} . La oxidación de los carbonos C_2 , C_3 ó C_6 podría romper el empaquetamiento ordenado de las cadenas de celulosa, permitien-

do que tuviera lugar la hidrólisis por endoglucanasas. De hecho, se ha sugerido que el H_2O_2 podría provocar no sólo la modificación de la celulosa sino también la liberación de cadenas (Miller, 1986). En contraste, Eriksson y Wood (1985) demostraron que los pre-tratamientos de algodón con H_2O_2/Fe^{2+} no eran efectivos a menos que se utilizase también ácido oxálico en el tratamiento. En ese caso, las endoglucanasas podrían efectuar la liberación de una cantidad significativa de azúcares reductores. Coughlan y Ljundah (1988) concluyeron con estas observaciones que el hierro quelado era más eficaz que el hierro libre.

Griffin *et al.* (1984) habían aislado, a partir de preparaciones de *T. reesei*, un factor no proteico de bajo peso molecular que contenía hierro. Este factor era capaz de generar microfibras o fibras cortas de la celulosa sin liberación de azúcares reductores, actuando de forma sinérgica con endo- y exoglucanasas para efectuar la solubilización del sustrato. Mientras que el sistema H_2O_2/Fe^{2+} generaba una cantidad significativa de fibras cortas después de un largo tiempo de incubación, este factor no proteico (aparentemente sin adición del peróxido de hidrógeno) operaba en un tiempo mucho más corto que variaba entre 5 minutos y 1 hora (Griffin *et al.*, 1984).

Vaheri (1982a; 1982b) encontró presencia de ácidos-ónicos en el sobrenadante de cultivos de *T. reesei* en los primeros estadios de la hidrólisis de la celulosa, sugiriendo que la oxidación era el primer paso de la degradación. De hecho, es reconocido que *N. frontalis* y otros hongos anaerobios pueden iniciar la degradación de la celulosa a través de otros mecanismos. También se planteó la posibilidad de que algunos microorganismos (aerobios o anaerobios) podían efectuar la degradación de este sustrato sin síntesis de enzimas hidrolíticos por otros procesos oxidativos o no hidrolíticos.

El siguiente paso en la degradación de la celulosa, después de tener lugar la amorfogénesis de forma extensiva, puede tomar diferentes rutas. Puede producirse la formación de fibras cortas (Halliwell, 1975), quizás como resultado de un enzima con actividad celobiohidrolásica I (Enari y Niku-Paavola, 1987). Alternativamente, la celulosa puede ser "segmentada". Esto implicaría un ataque multipuntual sobre el sustrato, por enzimas que actúan de forma aleatoria pero simultáneamente, sobre varias cadenas. Existen evidencias de esta posibilidad, junto con una "destratificación" adicional

(Halliwell, 1975). En este proceso, que puede tener lugar sin la liberación de azúcares reductores, pueden desmontarse una o más microfibras o capas de la celulosa al mismo tiempo. Mediante microscopía electrónica se ha encontrado una ampliación de los terminales de las fibras durante el proceso de digestión consistente con el proceso de destratificación (White, 1982). Una endoglucanasa de 128 kDa aislada recientemente de una cepa mutante de *Humicola griseovar thermoidea* efectuaba una rápida desintegración de Avicel sin liberación de azúcares reductores (Hayashida y Mo, 1986). Un escaning con microscopía electrónica mostró que la desintegración de las fibras superficiales de Avicel capa a capa rendía finas secciones con exposición de los terminales de las cadenas. Estudios de microscopía electrónica han mostrado que la celobiohidrolasa I de *T. reesei* efectúa una desfibrilación de celulosa del alga *Valonia macrophysa* (Chanzy *et al.*, 1983). Parece ser, por tanto, que el proceso de destratificación es operativo en varios sistemas enzimáticos.

El siguiente estado en la degradación de la celulosa es efectuado por exo- y endoenzimas que actúan de forma sinérgica, en uno u otro de los caminos descritos anteriormente. Estudios bioquímicos y de recombinación genética han demostrado que las celobiohidrolasas I y II y las endoglucanasas I y III de *T. reesei* contienen dos dominios, uno por el que se unen a la celulosa y otro que es el centro catalítico (Van Tilbeurgh *et al.*, 1986). La unión a la celulosa se realiza en un dominio rico en serina/treonina, con una región altamente glicosilada en el C-terminal de la celobiohidrolasa I y la endoglucanasa I, y en el N-terminal de la celobiohidrolasa II y la endoglucanasa III. Por ello, podemos pensar que el reconocimiento del sustrato por estas enzimas se realiza mediante glicoproteínas. La eliminación del dominio por el cual se une a la celulosa mediante un proceso de proteólisis, dio como resultado una pérdida de actividad hacia la celulosa cristalina. Sin embargo, el núcleo proteico (que contiene 12 puentes disulfuro) mantiene su actividad catalítica frente a celodextrinas solubles (Van Tilbeurgh *et al.*, 1986; Pettersson *et al.*, 1986).

El estadio final de la digestión de celulosa por hongos está catalizado por la β -glucosidasa, que actúa sobre la celobiosa y los residuos terminales no reductores de pequeños oligosacáridos producidos por acción de las celulasas, rindiendo como producto

final glucosa. Si en el medio se encuentran presentes exoglucohidrolasas, podrían participar en un proceso posterior. Las lactonas producidas en el proceso oxidativo inicial de digestión de la celulosa por algunos microorganismos, que utilizan una oxidasa / deshidrogenasa sobre la celobiosa, son convertidas en ácido celobiónico por una lactonasa específica (Coughlan y Ljungdahl, 1988).

En los subapartados siguientes se estudiarán las características más sobresalientes de los tres tipos principales de celulasas mencionados anteriormente.

2.1.3.2.1.1. Endoglucanasas

Las endoglucanasas son un grupo de enzimas capaces de hidrolizar aleatoriamente derivados solubles de celulosa amorfa (Eriksson y Wood, 1985). La celulosa cristalina no es solubilizada, pero una endoglucanasa (designada por E III), procedente del sistema celulolítico de *T. reesei*, es muy activa frente a esta celulosa, aunque presentaba baja actividad frente a CM-celulosa (Beldman *et al.*, 1985). Inusualmente, las endoglucanasas de *T. reesei* han sido descritas, en el trabajo de Nummi *et al.* (1983), como inactivas frente a celulosa amorfa preparada por molición de celulosa Whatman en etanol. Los resultados fueron interpretados como que el papel real de las endoglucanasas era hidrolizar celooligosacáridos solubles de bajo peso molecular liberados por acción de las celobiohidrolasas y no para participar en la hidrólisis de celulosa amorfa, como estaba previsto. Quizás deberíamos preguntarnos si la celulosa preparada en etanol puede considerarse, significativamente, como celulosa nativa amorfa.

De manera característica, las endoglucanasas se han encontrado en preparaciones de celulasas con una función aparentemente doble (Eriksson y Wood, 1985). El origen y la naturaleza de los distintos isocomponentes han sido objeto de muchos debates. Esta discusión ha conducido a la posibilidad de que la multiplicidad de los distintos componentes podría estar determinada genéticamente, ser el resultado de una proteólisis parcial (Nakayama *et al.*, 1976) o ser el resultado de una glicosilación diferencial de una cadena común de polipéptidos (Gum y Brown, 1977; Moloney *et al.*, 1985). La celobiosa es la unidad que se repite en la celulosa cristalina, por lo que se ha sugerido que, al menos, son necesarias dos endoglucanasas con estereoespecificidad diferente, de modo que la hidrólisis de la celulosa cristalina pueda realizarse de forma eficaz (Wood, 1981).

La posibilidad de que la proteólisis sea un factor esencial en el sistema celulolítico ha sido relatada en muchas publicaciones. Así, Eriksson y Pettersson (1982) publicaron que las proteasas de *S. pulverulentum* activaban la endoglucanasa y Knowles *et al.* (1988) especulaban sobre la posibilidad de que la liberación de las uniones del carbohidrato en el dominio de la endoglucanasa podría ser un mecanismo importante en la modificación de especificidad del sustrato para optimizar la actividad del enzima celulolítico.

2.1.3.2.1.2. Celobiohidrolasas

Durante muchos años se ha defendido la idea de que las celobiohidrolasas son exoglucanasas que liberan residuos consecutivos de celobiosa a partir de terminales no reductores de la cadena de celulosa. La celulosa amorfa es degradada rápidamente a celobiosa pero, sin embargo, la velocidad de hidrólisis de celulosa cristalina es lenta, dependiendo del grado de polimerización y de la cristalinidad de la celulosa (Wood, 1989). Recientemente, se han descrito propiedades de la celobiohidrolasa del tipo I que son consistentes con la sugerencia de que el ataque sobre la celulosa no se produce exclusivamente sobre los terminales de las cadenas. Así, Henrissat *et al.* (1985) han demostrado que celobiohidrolasa I, purificada de *T. reesei*, es capaz de degradar β -glucanos de cebada de una manera similar a como lo hacen las endoglucanasas. En contraste, levaduras recombinantes en las que se ha expresado el gen de este enzima producen enzimas sin actividad β -glucanásica (Knowles *et al.*, 1988).

La información obtenida por microscopía electrónica sobre el modo de actuación de la celobiohidrolasa es igualmente confuso. Así, Chanzy y Henrissat (1985) observaron que la celobiohidrolasa I de *T. reesei* (marcada con oro coloidal) se encontraba unida a microcristales del alga *Valonia* a lo largo de toda la microfibrilla. Esto se consideró significativo porque la microfibrilla de *Valonia* está compuesta únicamente por un cristal, que tiene un único terminal reductor y otro no reductor. Chanzy *et al.* (1983) vieron que una concentración no significativa del enzima se encontraba en la punta de la microfibrilla, donde los terminales no reductores de la cadena de celulosa podrían ser abundantes. En otro estudio similar, White y Brown (1981), trabajando con celulosa de la bacteria Gram (-) *Acetobacter xylinum*, observaron también que la celobiohidrolasa I de *T. reesei* se encontraba unida a lo largo de toda la microfibrilla. Sin embargo, existían diferencias entre

los dos estudios. Mientras Chanzy *et al.* (1983) observaron que su preparación de celobiohidrolasa causaba fibrilación de las microfibras de celulosa, White y Brown (1981) refirieron que la disgregación de las microfibras era debido a que su preparación contenía endoglucanasas, pero no celobiohidrolasas. Podría ser significativo que la celobiohidrolasa utilizada por Chanzy *et al.* (1983) pudiera solubilizar los microcristales de *Valonia* hasta una mezcla de celobiosa y glucosa, mientras que la celobiohidrolasa utilizada por White y Brown (1981) fuera aparentemente ineficaz en ausencia de endoglucanasa. Estos resultados conflictivos, obtenidos del mismo tipo de estudios utilizando el mismo enzima procedente del mismo hongo, tipifica la confusión que existe en este área de investigación. Ambas preparaciones fueron descritas como puras.

Otras observaciones sobre el modo de actuación de celobiohidrolasa II son igualmente confusas. Por ejemplo Chanzy *et al.* (1984) interpretaron los resultados de sus estudios con microscopía electrónica sobre celulosa de *Valonia microphysa* en el sentido de que el enzima celobiohidrolasa II procedente de *T. reesei* erosionaba sólo una de las dos puntas del microcristal, por lo que pensaron que se trataba de un final no reductor. Por ello, describieron la celobiohidrolasa II como una exoglucanasa verdadera. En contraste, tanto Enari y Niku-Paavola (1987) como Kyriacou *et al.* (1987) concluyeron, a partir de estudios bioquímicos con celobiohidrolasa II de la misma fuente, que este enzima tenía las propiedades típicas de una endoglucanasa. Wood *et al.* (1989), pensando en una actividad verdaderamente exoglucanásica, encontraron que la celobiohidrolasa II de *P. pinophilum* (purificada mediante cromatografía de afinidad sobre p-aminobencil-1-tio- β -D-celobiósido) podía efectuar sólo una pequeña disminución en el grado de polimerización de celulosa-ácido fosfórico hinchada, mientras que endoglucanasas del mismo hongo realizaban un rápido cambio. Wood *et al.* (1988) también demostraron que la celobiohidrolasa II de *T. reesei* (purificada mediante cromatografía de afinidad) tenía propiedades similares a las de celobiohidrolasa II de *P. pinophilum*.

En la actualidad la controversia en el modo de acción de las celobiohidrolasas I y II continúa.

2.1.3.2.1.3. Sustratos de celobiohidrolasas y endoglucanasas

Una de las dificultades para llegar a un acuerdo en el modo de acción de los componentes de las celulasas es consecuencia directa de la necesidad de tener que utilizar sustratos heterogéneos, pobremente definidos y difíciles de reproducir en los distintos laboratorios. Atendiendo un poco a esta problemática, y para obtener una información definitiva sobre el mecanismo de actuación de los distintos componentes del sistema celolítico, se han utilizado como sustratos distintos oligosacáridos y sus derivados. Estudios, en los que Van Tilbeurgh *et al.* (1984) utilizaban estos sustratos, han dado una información valiosa sobre el centro activo y los lugares de unión requeridos por las celobiohidrolasas. Así, se ha demostrado que tanto la celobiohidrolasa I como la II carecen de especificidad hacia el penúltimo enlace glucosídico del terminal no reductor. Sin embargo, no es conocido si el enzima exhibiría la misma forma de actuación cuando se trata de celulosas insolubles, donde los problemas estéricos pueden tener un importante efecto sobre las interacciones enzima-sustrato. Esta limitación no suele tenerse en cuenta en la literatura, y existe una tendencia lamentable de extrapolar y concluir el modo de acción de los enzimas que actúan sobre sustratos insolubles a partir de las observaciones realizadas cuando se usan derivados solubles (Wood, 1989).

La dificultad de deducir el modo de acción sobre un sustrato y asumir que esto es aplicable a otro ha sido demostrado recientemente por Wood (1989b). En esta experiencia, se realizó una comparación del modo de acción de las endoglucanasas mayoritarias procedentes de *P. pinophilum* cuando utilizaban como sustratos un celooligosacárido normal, otro reducido y un metilumbeliferil derivado. Se demostró que existía una preferencia de ruptura del enlace de tres de las cinco endoglucanasas utilizadas en el estudio y, además, variaba de acuerdo con el sustrato empleado en cada caso.

2.1.3.2.1.4. Acción sinérgica

Se sabe que la velocidad de hidrólisis de la celulosa cristalina cuando se utiliza una combinación de endo- y exo-enzimas es mayor que su acción individual. Sin embargo, las interacciones moleculares que envuelven este sinergismo, no se conocen con exactitud por lo que tampoco hay acuerdo en esta materia.

Este desacuerdo es una consecuencia directa de la amplia diversidad de opiniones existentes cuando se estudia el papel de los enzimas purificados. La mayoría, sin embargo, coinciden en que el sinergismo es mucho más marcado cuando se trata de celulosa cristalina (particularmente fibras de algodón), es bajo o incluso nulo cuando se trata celulosa amorfa ampliamente hidratada, y se encuentra ausente cuando se utilizan derivados solubles de la celulosa (Wood y McCrae, 1979).

Muchas hipótesis han sido formuladas en los últimos treinta y cinco años sobre el mecanismo de la acción sinérgica sobre la celulosa cristalina (Reese *et al.*, 1950; Wood y McCrae, 1972; Reese, 1977; Wood, 1981; Enari y Niku-Paavola, 1987; Ryu *et al.*, 1984; Chanzy *et al.*, 1983; Wood, 1985; Wood y McCrae, 1986a).

Reese *et al.* (1950) sugirieron que el ataque se iniciaba mediante un enzima no hidrolítico, capaz de separar las cadenas produciendo una celulosa "hinchada" como paso preliminar a la acción de enzimas hidrolíticos (Cx). Esta hipótesis (que guió la experimentación durante muchos años) fue abandonada por la mayoría de autores cuando se aisló una celobiohidrolasa que actuaba de forma sinérgica con endoglucanasas solubilizando celulosa cristalina. Reese (1977) no estaba convencido de que la celobiohidrolasa fuera el factor C₁, por lo que modificó su hipótesis sugiriendo que C₁ podría ser un tipo especial de endoglucanasa que efectuaba el hinchamiento de la celulosa por liberación de unos pocos enlaces covalentes. Las celobiohidrolasas (junto con las endoglucanasas), fueron relegadas al papel de hidrolizar la celulosa degradada ya parcialmente .

No existen evidencias claras que mantengan la hipótesis del factor C₁. Sin embargo, no hay discusión sobre el concepto de "hinchamiento" e hidratación de las cadenas de la celulosa cristalina como prerrequisito esencial para la ruptura enzimática de sus enlaces glucosídicos. Como la celobiohidrolasa es el enzima más fuertemente adsorbido (Coughlan, 1985), podría ser un buen candidato para iniciar el ataque, aunque algunas endoglucanasas también tienen gran afinidad por la celulosa cristalina (Ryu *et al.*, 1984). La adsorción de la celobiohidrolasa puede efectuar la necesaria relajación de los puentes de hidrógeno (Wood y McCrae, 1978) conduciendo a una destratificación de las cadenas individuales (Knowles *et al.*, 1988) y a una hidrólisis posterior. La unión y la acción estática pueden ser función de uno de los dos centros activos de la celobiohidrolasa

(Knowles *et al.*, 1988). Se ha mostrado que la hidrólisis es función del otro dominio (Van Tilbeurgh *et al.*, 1986; Tomme *et al.*, 1988). La estructura y función de una endoglucanasa de *T. reesei* (E III) parecen ser similares a las de la celobiohidrolasa del mismo sistema enzimático (Stahlberg *et al.*, 1988).

La disgregación de las microfibras de celulosa en el da como resultado un incremento de los niveles de álcali con respecto al control (Marsh *et al.*, 1953). Esto puede ser una medida muy sensible del ataque temprano sobre la celulosa cristalina y, quizás, de la disgregación de las cadenas individuales de la celulosa. El hinchamiento en medio alcalino ha sido descrito como una función de la endoglucanasa pero no de la celobiohidrolasa (Wood, 1975). La celobiohidrolasa II de *T. reesei* provocaba un hinchamiento de la celulosa en medio alcalino (Enari y Niku-Paavola, 1987), que no era producido por la celobiohidrolasa II de *P. pinophilum* (Wood y McCrae, 1986b).

Otra manifestación del ataque sobre las fibras de algodón que se ha utilizado para determinar cuál es el enzima que actúa primero sobre las cadenas de celulosa es la producción de fibras cortas. Se ha sugerido que la formación de estas pequeñas fibras podría no estar tan relacionada con el ataque a la celulosa cristalina como de áreas más débiles que atraviesan las fibras de algodón (Wood, 1989). Vaheri (1982a) consideraba que la oxidación de la celulosa era un primer paso importante y que la formación de ácidos-ónicos precedía a la generación de las fibras cortas, sugiriendo que existía una endoglucanasa que producía estos fragmentos más cortos. Sin embargo, los criterios en este aspecto son muy conflictivos. Así, la producción de estas pequeñas fibras se ha descrito como una propiedad tanto de la celobiohidrolasa I (Nummi *et al.*, 1983) como de la II (Enari y Niku-Paavola, 1987) procedentes de *T. reesei*. No obstante, Wood y McCrae (1986b) encontraron que no existía ninguna evidencia de que la producción de estas fibras cortas estuviera relacionada con la acción de las celobiohidrolasas I y II de *P. pinophilum*. Sin embargo, la adición a una mezcla de estas celobiohidrolasas I y II de trazas de endoglucanasa purificada rendía las fibras cortas mencionadas (Wood *et al.*, 1989). Por otra parte, se ha demostrado que un factor no proteico de bajo peso molecular aislado de *T. reesei* liberaba estas fibras del algodón (Griffin *et al.*, 1984).

La cuestión sobre cuál es el enzima que inicia el ataque sobre la celulosa cristalina, y cómo se manifiesta, sigue siendo un tema objeto de debate.

Las observaciones de White y Brown (1981), deducidas del uso de microscopía electrónica, son consistentes con el modelo más ampliamente aceptado. Este modelo se propuso en base a datos bioquímicos que explicaban el sinergismo entre celobiohidrolasas y endoglucanasas (Wood y McCrae, 1972). Se consideraba que el ataque se iniciaba por la actuación aleatoria de una endoglucanasa en las áreas amorfas de la celulosa, creando nuevos terminales no reductores, los cuales podían ser atacados por las celobiohidrolasas. Sin embargo, diversas publicaciones implican un mínimo o nulo sinergismo entre los dos enzimas, sugiriéndose que este modelo es una simplificación (Wood y McCrae, 1978; 1979).

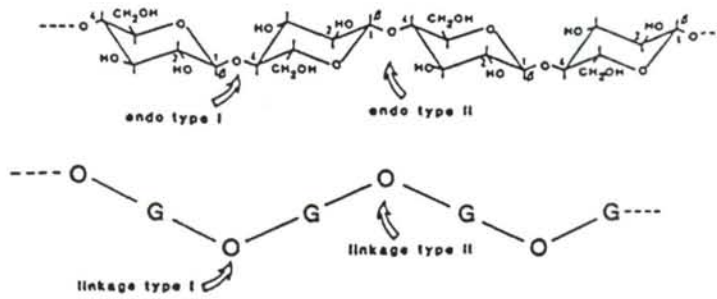
Wood (1981) intentó explicar estas anomalías en términos estereoquímicos de las cadenas de celulosa y dio la misma explicación para el sinergismo observado entre dos celobiohidrolasas no relacionadas inmunológicamente aisladas del sistema celulolítico de *P. pinophilum* (Wood, 1985). Henrissat *et al.* (1985) han demostrado que la acción sinérgica varía según sea el sustrato y las proporciones de celobiohidrolasa y endoglucanasa usadas, mientras que Woodward *et al.* (1988) publicaron que este sinergismo es más una función de la concentración de los enzimas. El significado de la adsorción competitiva de los componentes de las celulasas sobre la actividad sinérgica ha sido discutido por Ryu *et al.* (1984).

Las consideraciones estereoquímicas también pueden ser importantes para explicar el ataque de un enzima a una estructura tan compleja como la de la celulosa, puesto que los enzimas pueden exhibir un alto grado de estereoespecificidad. La naturaleza y extensión de esta estereoespecificidad ha sido demostrada por Sagar (1985) que concluyó que sólo una cara de la unidad de celulosa es hidrolizada por celulasas de *T. koningii* y *T. reesei*. Chanzy *et al.* (1984) llegaron a una conclusión similar trabajando con celulasas procedentes de *T. reesei*.

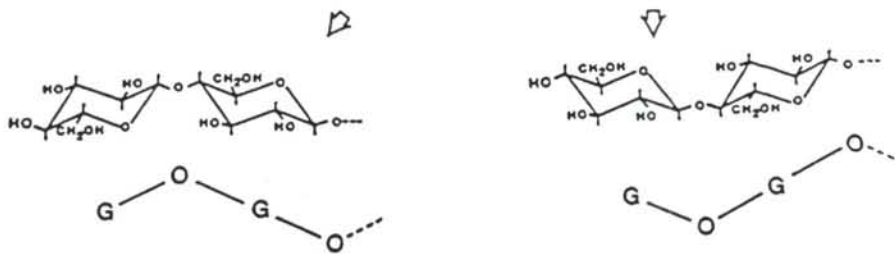
Wood *et al.* (1988; 1989) obtuvieron nuevos datos usando varios componentes purificados (dos celobiohidrolasas y cinco endoglucanasas) del sistema celulolítico de *P. pinophilum*. En sus trabajos se presenta un mecanismo claro de acción sinérgica basado

en consideraciones estéricas. Estos autores sugirieron que, mientras que el modelo que considera una acción secuencial era esencialmente acertado, parecía que parte de la hidrólisis de la celulosa cristalina de las fibras de algodón estaba efectuada al menos por celobiohidrolasas I y II presentes junto a endoglucanasas específicas (Fig. 2.3). De hecho, sólo una endoglucanasa estereoespecífica era necesaria en la hidrólisis cuando las dos celobiohidrolasas se encontraban simultáneamente juntas. Esto es consistente con la explicación de una configuración particular en la que un grupo de terminales no reductores son generados por la endoglucanasa (tipo I en la Fig. 2.3) en el primer paso de la hidrólisis, siendo estos finales de cadena sustratos que puede ser atacados por una celobiohidrolasa estereoespecífica (celobiohidrolasa I de la Fig. 2.3). La liberación continua de unidades de celulosa de los terminales de esta cadena podría entonces exponer un final de cadena contiguo que presentara diferente configuración, el cual podría ser atacado por otra celobiohidrolasa específica (celobiohidrolasa II de la Fig. 2.3). El ataque de otra endoglucanasa (tipo II, Fig. 2.3) podría generar terminales no reductores de otra configuración, que serían sustratos para otra celobiohidrolasa. De este modo el proceso operaría con la máxima eficacia.

Si esta hipótesis es sostenible o no depende fundamentalmente de la creencia de que ni la celobiohidrolasa ni la endoglucanasa pueden actuar independientemente en la solubilización rápida de celulosa cristalina de fibras de algodón y de que ambas celobiohidrolasas actúan en los terminales. De esta forma, es interesante reiterar, en este momento, que la cromatografía de celobiohidrolasas en geles de afinidad (preparados inicialmente por Van Tilbeurgh *et al.* en 1984 por acoplamiento del ligando p-aminobenzil-1-tio- β -celobiósido a Affigel 10), parece ser la clave, al menos en lo concerniente a la purificación de enzimas procedentes de *P. pinophilum*. Este método cromatográfico puede ser también utilizado para la purificación de celobiohidrolasas de *T. reesei*. Trabajos de Wood (1989b) han demostrado que celobiohidrolasa II de *T. reesei* tenía capacidad de degradar CM-celulosa, después de su purificación con distintos métodos cromatográficos, pero perdía esta actividad cuando se utilizaba la cromatografía de afinidad en gel. Preparaciones de celobiohidrolasa, purificada de *T. reesei* por diferentes



La liberación de las cadenas de celulosa puede ser efectuado tanto por endoglucanasas I como por endoglucanasas II atacando los enlaces glucosídicos tipo I o II.



Grupo de terminales no reductores tipo I

Grupo de terminales tipo II

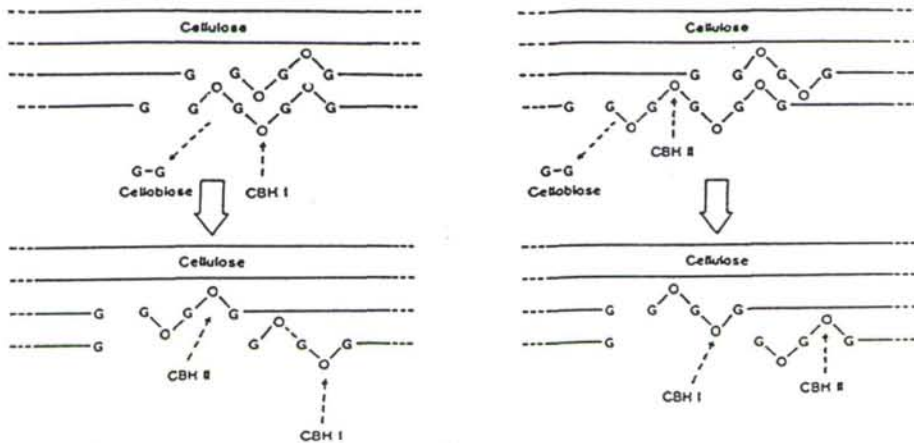


Fig. 2.3. Mecanismos de acción sinérgica de celulasa de *P. pinophilum*. Ver texto para la descripción. De Wood *et al.*, (1988).

métodos, han sido capaces de degradar de forma extensiva fibras de algodón sin necesidad de actividad endoglucanásica (Enari, 1985; Enari y Niku-Paavola, 1987).

Así pues, el mecanismo de acción sinérgica entre celulasas procedentes de hongos aerobios continúa siendo objeto de un intenso debate. Quizás la solución podría estar en el estudio de los enzimas producidos mediante clonaciones específicas.

Se han encontrado hongos anaerobios en el estómago de algunos animales que pueden jugar también un papel importante en la degradación de la celulosa de células vegetales (Bauchop, 1981; Orpin, 1984). Estos hongos producen un sistema de celulasas capaces de degradar celulosa cristalina, así como CM-celulosa y cadenas de oligosacáridos de bajo peso molecular. En la degradación de celulosa cristalina, el hongo más ampliamente estudiado ha sido *Neocallimastix frontalis* (Mountford y Asher, 1985). Estudios comparativos han demostrado que las celulasas producidas por una cepa de este hongo son más activas que las de *T. reesei* (Wood *et al.*, 1986).

2.1.3.2.2. CELULASAS BACTERIANAS

Aunque también se ha investigado la hidrólisis de celulosa por bacterias (Felix y Ljungdahl, 1993), se le ha prestado menos atención que a los sistemas celulolíticos fúngicos. Tal y como se ha explicado en el apartado anterior, los sistemas fúngicos tienen, principalmente, endoglucanasas y exocelobiohidrolasas extracelulares que actúan conjuntamente para hidrolizar la celulosa cristalina, rindiendo celobiosa como producto principal. Se han buscado estos mismos sistemas celulolíticos en las bacterias capaces de degradar la celulosa y se ha comprobado que el sistema celulolítico bacteriano es considerablemente diferente.

En general, el medio extracelular de los cultivos bacterianos, que crecen utilizando celulosa como fuente de energía, carecen de actividad frente a sustratos cristalinos, aunque la celulosa sea eficientemente hidrolizada en estos cultivos hasta celobiosa. Numerosas publicaciones, concernientes a sesenta bacterias diferentes, describen la presencia de endoglucanasas en el sobrenadante de estos cultivos, habiéndose purificado alguna de estas endoglucanasas. Las exocelobiohidrolasas bacterianas aún no han sido caracterizadas, pero es evidente que estos enzimas han de estar presentes en el sistema enzimático

celulolítico de *Acetivibrio cellulolyticus* (Saddler y Khan, 1980), de *Microbispora bispora* (Bartley *et al.*, 1984) y de *Cellulomonas uda* (Nakamura y Kitamura, 1988).

Se ha reconocido que las bacterias producen sistemas celulolíticos complejos, que consisten en varios polipéptidos diferentes. Frecuentemente están estrechamente unidos a los sustratos celulósicos y aparecen en el fluido del cultivo después de catalizar la hidrólisis extensiva de la celulosa. A veces, tienden a disociarse y formar polipéptidos individuales, muchos de los cuales presentan actividad endoglucanásica, pero carecen de actividad frente a la celulosa cristalina.

El complejo enzimático más ampliamente estudiado (denominado *celulosoma* por Lamed *et al.*, 1983a) es el producido por la bacteria anaerobia y termófila *Clostridium thermocellum*. Este complejo se sintetiza cuando la bacteria crece sobre celulosa y forma un pigmento insoluble en agua, que colorea a la celulosa de amarillo intenso (Ljungdahl *et al.*, 1983). Este complejo se ha denominado también YAS ("yellow affinity substance") y a la celulosa que lo contiene YAS-celulosa (Ljungdahl *et al.*, 1988), habiéndose descrito varias cepas de *C. thermocellum* capaces de producir el pigmento YAS (Duong *et al.*, 1983; Freier *et al.*, 1988). Es de destacar, en este sentido, los trabajos realizados en la Universidad de Georgia con cepas JW20 descritas por Freier *et al.* (1988) y las YM4 aisladas por Mori *et al.* (1987). Cepas diferentes estudiadas por otros investigadores, incluyendo el grupo de Lamed (e.g. Lamed y Bayer, 1988) y Demain (e.g. Johnson *et al.*, 1982), presentaban propiedades similares. Utilizando celulosa como sustrato, el crecimiento de *C. thermocellum* puede seguirse por la coloración amarilla del complejo YAS-celulosa formado. Esto permite la visualización de la actividad endoglucanásica del medio extracelular.

El aislamiento del sistema enzimático de cepas de *C. thermocellum* se basa en romper las uniones estrechas que se establecen en el complejo YAS-celulosa durante los primeros estadios de la fermentación. El caldo de cultivo de la fermentación se centrifugaba inicialmente para separar el sobrenadante del sólido (complejo YAS-celulosa) y se lavaba intensamente con tampón trietilamina-maleico 100 mM (pH 6,85) hasta actividad nula en las aguas de lavado (Ljungdahl *et al.*, 1988). El enzima extraído mediante agua destilada consistía en una mezcla de celulosomas y policelulosomas, que podían separar-

se por filtración en gel (utilizando Sepharosa 4B de Pharmacia Fine Chemicals), o por centrifugación en gradiente de densidad con sacarosa (Hon-nami *et al.*, 1986). Los celulosomas contenían elevada actividad endoglucanásica e hidrolizaban de forma eficiente a la celulosa cristalina.

El medio extracelular contenía enzimas celulolíticos libres de bajo peso molecular y celulosomas. Estos podían separarse mediante cromatografía de afinidad, utilizando como soporte el complejo YAS-celulosa, del que se habían extraído previamente todas las proteínas. Los celulosomas libres eran retenidos en la columna mientras que las endoglucanasas pasaban libremente a través de ella. Los celulosomas se liberaban posteriormente pasando agua como eluyente. Estos celulosomas eran similares a los de menor tamaño, que aparecían unidos inicialmente al complejo amarillo de celulosa, ya que presentaban una elevada actividad endoglucanásica e hidrolizaban celulosa cristalina. En contraste, la fracción de endoglucanasas de bajo peso molecular presentaba una actividad específica baja, y no era capaz de actuar frente a celulosa cristalina. Es posible que esta fracción de endoglucanasas consistiese en polipéptidos formados por disociación de los celulosomas.

Los celulosomas y los policelulosomas, obtenidos tal y como se ha indicado anteriormente, se aislaron en forma pura generando una entidad uniforme que durante los procesos de purificación (mediante filtración en gel y centrifugación) no variaba su actividad específica. Al estudiar con microscopía electrónica los celulosomas y policelulosomas de la cepa JW20 se observó que medían 21 y 61 nm respectivamente, aunque también se encontraron celulosomas de tamaños intermedios (Mayer *et al.*, 1987). De hecho, Lamed *et al.* (1983b) visualizaron un celulosoma de 18 nm en *C. thermocellum* YS. Asumiendo que los celulosomas son esféricos, su tamaño correspondería a valores de pesos moleculares de $2,6 \times 10^6$ (para el celulosoma de 18 nm) y 4×10^6 (para el de 21 nm). El peso molecular del policelulosoma de 61 nm fue estimado en 100×10^6 (Coughlan *et al.*, 1985).

Cuando se realizaba una electroforesis SDS-PAGE de los celulosomas y policelulosomas, se observaba que estaban formados por 14 polipéptidos diferentes, cuya masa se encontraba entre 45 y 210 kDa (Lamed y Bayer, 1988; Ljungdahl *et al.*, 1988). Des-

pués de varios tratamientos con SDS, varios de estos polipéptidos mantenían actividad endoglucanásica, pero no eran capaces de degradar celulosa cristalina. Los complejos celulolíticos contenían de un 6% a un 13% de carbohidratos, y se demostró que algunos de estos polipéptidos eran glicoproteínas. Los azúcares asociados eran xilosa, manosa, galactosa, glucosa y N-acetilglucosamina (Ljungdahl *et al.*, 1988). Si bien, parece que únicamente la galactosa y el aminoazúcar formaban parte integrante del complejo. Recientemente, Gerwing *et al.* (1989) aislaron dos oligosacáridos de un celulosoma (un disacárido y un tetrasacárido) por tratamiento alcalino con borohidruro. El tetrasacárido era un componente de la subunidad S1 del complejo de celulosa. El disacárido aún no ha sido asignado a ninguna subunidad específica. La subunidad S1 (la mayor de los polipéptidos del celulosoma con un $M_r=210$ K) era su principal antígeno y estaba aparentemente implicada en la adherencia del celulosoma a la célula y a la celulosa, aunque no estaba relacionada directamente con el proceso catalítico (Bayer *et al.*, 1983). Mayer *et al.* (1987) observaron al microscopio electrónico que los policelulosomas se encontraban ocasionalmente recubiertos de una delicada "película" y de unas microfibras ultrafinas que interconectaban los polipéptidos del celulosoma. Se ha demostrado que los celulosomas son complejos muy estables, que pueden ser almacenados a temperatura ambiente durante meses, en soluciones tamponadas a pH alrededor de 7,0 ó en etanol al 50%, sin pérdida de actividad. Lamed *et al.* (1983b) publicaron que la urea 6 M no causaba disociación del celulosoma.

El mecanismo por el cual el celulosoma es capaz de hidrolizar la celulosa no es totalmente conocido. Observaciones con microscopía electrónica revelaron que el celulosoma tenía de 35 a 50 subunidades, colocadas de forma que definían un reensamblaje de "flechas paralelas" (Mayer *et al.*, 1987). Este ordenamiento permite varios ataques o uniones a la fibra de celulosa. También se ha observado que la distancia media de centro a centro entre las uniones de los polipéptidos a la celulosa es aproximadamente de 4 nm. Esta distancia corresponde a la longitud de un oligosacárido formado por cuatro unidades de celobiosa (C4) (Blackwell, 1982). Asumiendo que cada polipéptido que ataca a la fibra de celulosa tiene un centro activo catalítico, podría pensarse que tiene lugar una serie de multicortes simultáneos que producen unidades C4. Estos oligosacáridos pueden

ser cortados dentro del celulosoma rindiendo oligosacáridos más pequeños y dando finalmente celobiosa como producto final.

El modo de acción de hidrólisis de la celulosa que se muestra en la Fig. 2.4 explicaría las propiedades que presentan los celulosomas. Esta hidrólisis supondría que: (1) la celobiosa es el producto mayoritario de la hidrólisis; (2) sólo el celulosoma tiene alta actividad frente a celulosa cristalina; (3) la actividad enzimática de los polipéptidos de los celulosomas es únicamente endoglucanásica y (4) la actividad celobiohidrolásica no se encuentra en ninguno de los componentes del celulosoma. Sin embargo, aún son desconocidas las funciones de varios de estos polipéptidos. Es posible, que alguno de éstos contenga actividad celobiohidrolásica o, más probablemente, que puedan ser celodextrinas especiales. Enzimas semejantes, encontrados en *Bacteroides succinogenes* (Huang y Forsberg, 1988), podrían hidrolizar los oligosacáridos formados por acción de las endoglucanasas.

Wu *et al.* (1988) han demostrado que no es necesario el celulosoma completo para conseguir la hidrólisis de celulosa cristalina. Estos autores aislaron un complejo proteínico de *C. thermocellum*, el denominado ATCC 27405, con un peso molecular aproximado de $6,5 \times 10^6$ kDa y, utilizando tratamientos suaves con SDS, aislaron dos proteínas de este complejo (de Mr 82 K y 250 K) que actuaban conjuntamente en la hidrólisis de Avicel. Desafortunadamente, no realizaron una comparación de la actividad específica del complejo y de las dos proteínas. Las condiciones suaves empleadas en el tratamiento con SDS no permitían la separación de todos los polipéptidos individuales del celulosoma. Por ejemplo, la proteína de 250 K podría ser en realidad un agregado de polipéptidos. De hecho, Lamed y Bayer (1988) y Ljungdahl *et al.* (1988) no encontraron ningún polipéptido de este tamaño en el celulosoma procedente de *C. thermocellum*.

Se han realizado numerosos trabajos usando técnicas de manipulación genética con objeto de estudiar el sistema de celulasas producido por *C. thermocellum*. Estos estudios han demostrado que en el genoma bacteriano se encuentran genes distintos que codifican 50 endoglucanasas, dos β -glucosidasas y dos xilanasas (Hazlewood *et al.*, 1988). Ljungdahl (1989) ha sugerido que estos resultados concuerdan con el concepto de celulosoma. Los estudios genéticos no han conducido a la detección de una exocelo-

biohidrolasa en *C. thermocellum*. En cualquier caso, es evidente que son necesarios más estudios para entender el proceso celolítico implicado en la catálisis llevada a cabo por el celulosoma. Sin embargo, cada vez está más claro que es justamente el celulosoma la entidad celolítica que actúa en *C. thermocellum*.

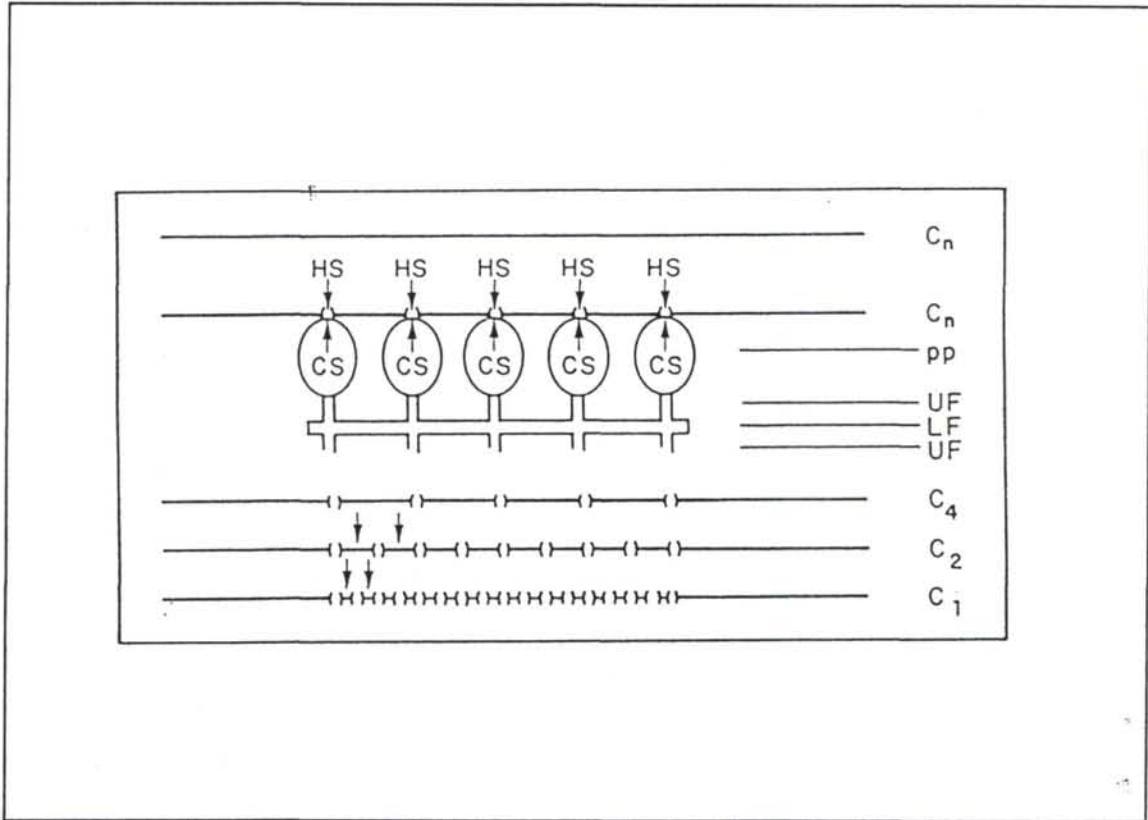


Fig. 2.4. Esquema de los principales aspectos estructurales del celulosoma de las cepas JW20 e YM4 de *C. thermocellum* y de las relaciones estructura inherente-función. Abreviaturas: CS, centro catalítico; HS, punto de hidrólisis, p.e. lugar en el que se rompe el enlace glucosídico de la cadena de celulosa; UF, fibras ultrafinas; LF, cadena central de composición desconocida; pp, polipéptidos; C_n, C₄, C₂, C₁, celodextrinas de varias longitudes, siendo C_n celulosa y C₁ celobiosa (Mayer *et al.*, 1987).

Aunque el término “celulosoma” no se ha empleado para designar un sistema celolítico procedente de otra bacteria que no sea *C. thermocellum*, es evidente que complejos análogos al celulosoma se producen también en otras bacterias anaerobias. Las propiedades de estos complejos han sido descritas por Coughlan y Ljungdahl (1988). Los polipéptidos que los forman tienen un peso molecular que oscila en el rango de 20-

210 kDa y el complejo presenta un peso molecular de aproximadamente 2×10^6 kDa. En la hidrólisis de celulosa cristalina es necesario la presencia de Ca^{2+} y ditioneitol, pero no para la actividad CM-celulasa. Además varias de estas bacterias sintetizan pigmentos cuando crecen sobre celulosa.

Por otra parte, se ha aislado un gran número de bacterias celulolíticas del suelo. Sin embargo, su sistema enzimático no ha sido completamente caracterizado. Los enzimas mejor estudiados han sido los procedentes de *Cellulomonas* spp. Estas bacterias crecen tanto aeróbica como anaeróbicamente. Sus sistemas de celulasas son en algunos aspectos similares a los de *C. thermocellum*. Producen varias endoglucanasas que se unen a la celulosa (Béguin y Eisen, 1978) y al menos una especie de pigmento amarillo (Stewart y Leatherwood, 1976). Sin embargo, parece que no producen celulosomas, aunque si tienen actividad celobiohidrolásica (Gilkes *et al.*, 1984; Nakamura y Kitamura, 1988). Las endoglucanasas son glicoproteínas pero parece que la glicosilación no es esencial para la actividad, como lo demuestra el hecho de que estos enzimas son operativos cuando se clonan en *Escherichia coli* (Gilkes *et al.*, 1984).

Especies de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Cytophaga*, *Herpetosiphon*, *Streptomyces*, *Thermoactinomyces* y *Thermomonospora* producen también enzimas celulolíticos (Ljungdahl y Eriksson, 1985). Se ha demostrado la presencia de múltiples endoglucanasas en el caldo de cultivo de muchas de estas bacterias aeróbicas, pero no parece existir en ellas actividad celobiohidrolásica. *Thermomonospora* spp. (capaces de sintetizar varias endoglucanasas) también producen varias proteasas (Hägerdal *et al.*, 1978; 1980). Estos autores llegaron a la conclusión de que el mismo gen codificaba diferentes enzimas que eran modificados posteriormente por las proteasas. Sin embargo, tanto Calza *et al.* (1988) como Wilson (1988) habían aislado y caracterizado cinco endoglucanasas de *T. fusca* y demostrado que eran proteínas diferentes. Ghangas y Wilson (1987) modificaron *Streptomyces lividans* utilizando un plásmido de *E. coli* que contenía la endoglucanasa E₅ de *T. fusca*. La endoglucanasa fue expresada y se encontró que era idéntica al enzima purificado de *T. fusca*.

Por tanto, y a la vista de las referencias anteriores, puede afirmarse sin ninguna duda que los enzimas celulolíticos bacterianos tienen propiedades diferentes y distintivas de las celulasas fúngicas.

2.2. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LOS MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS

Parece evidente, que la biomasa primaria y residual será en un futuro inmediato la principal fuente de recursos con que contará la Humanidad para la obtención de alimentos, productos químicos orgánicos e incluso combustibles líquidos y gaseosos, dado el agotamiento y creciente encarecimiento de la biomasa fósil (petróleo, carbón y gas natural) (Canacho *et al.*, 1985). En este sentido, la materia prima probablemente más abundante, renovable y barata es la biomasa celulósica en sus distintos tipos de residuos: (1) agrícolas (paja de trigo, paja de maíz, zuro, sarmientos de vid, orujos, etc.); (2) forestales (restos de corte, de limpieza y de clareo de los montes, restos de la elaboración de madera, etc.); (3) urbanos y (4) industriales.

En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de los residuos de naturaleza agrícola, y en concreto en la paja de cereal. En la agricultura española no sólo no suelen recuperarse este tipo de residuos, sino que frecuentemente se queman en los propios campos con lo que por un lado se desaprovecha una fuente potencial de material humificable y por otro, se destruye la microflora edáfica. Además, los residuos agrícolas, dado su carácter lignocelulósico, constituyen una materia prima renovable y abundante, cuyo aprovechamiento es altamente deseable.

Por otra parte, el desplazamiento de las materias primas de la industria química hacia la biomasa primaria y residual ha determinado un interés creciente por los procesos microbiológicos que permitan su aprovechamiento. Las ventajas de estos procesos se pueden resumir en los siguientes puntos:

- Se reduce el consumo de energía y se incrementa la seguridad debido a que generalmente se opera a presiones y temperaturas próximas a las ambientales.
- Disminuye el riesgo de contaminación en el entorno industrial a la vez que se utilizan residuos que por su naturaleza es necesario eliminar.
- Aumenta la productividad y el aprovechamiento de la materia prima, como se deduce de la comparación de los tiempos de duplicación de la biomasa microbiana con respecto a la vegetal o la de animales superiores, así como la selectividad de una reacción enzimática con la de una reacción química no biológica.

En la Fig. 2.5 se indican las principales vías que permiten el aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos. En ella podemos ver que los principales procesos pueden dividirse en dos grandes grupos: (1) procesos físico-químicos y (2) procesos bioquímicos. A pesar de que recientemente está recibiendo alguna atención la pirólisis y la gasificación, los procesos más prometedores parecen ser los bioquímicos, fundamentalmente aquéllos que conducen a la obtención de etanol y a la producción de biomasa (proteína microbiana monocelular, SCP) (Vázquez *et al.*, 1993).

La vía encaminada a la obtención de etanol es interesante debido a las mayores facilidades que en principio presenta esta sustancia como materia prima básica para la industria química orgánica y por su posible utilización como combustible en motores de explosión (Morgan *et al.*, 1981). Targonsky y Pielecki (1993) han descrito un proceso de bioconversión de paja en etanol donde 1 kg de paja de trigo rendía 270 ml de este combustible.

Por otra parte, los residuos celulósicos se caracterizan por su escaso contenido en proteínas y su baja digestibilidad, por lo que su utilización como piensos en su estado original es poco aconsejable. En cambio, cuando se someten a tratamientos tan sencillos, como por ejemplo, macerarlos en disoluciones de NaOH, su digestibilidad puede aumentar considerablemente. Si además se emplean como sustrato para el crecimiento de microorganismos celulolíticos se consigue aumentar su contenido proteico.

En la Fig. 2.6 se esquematizan las etapas necesarias para la producción de etanol y proteína microbiana SCP. Estos consisten en llevar a cabo en primer lugar, un pretratamiento seguido posteriormente de una hidrólisis enzimática. El residuo sólido obtenido se sometía a fermentación aerobia, para la obtención de SCP, o anaerobia en el caso de que el objetivo sea la producción de etanol.

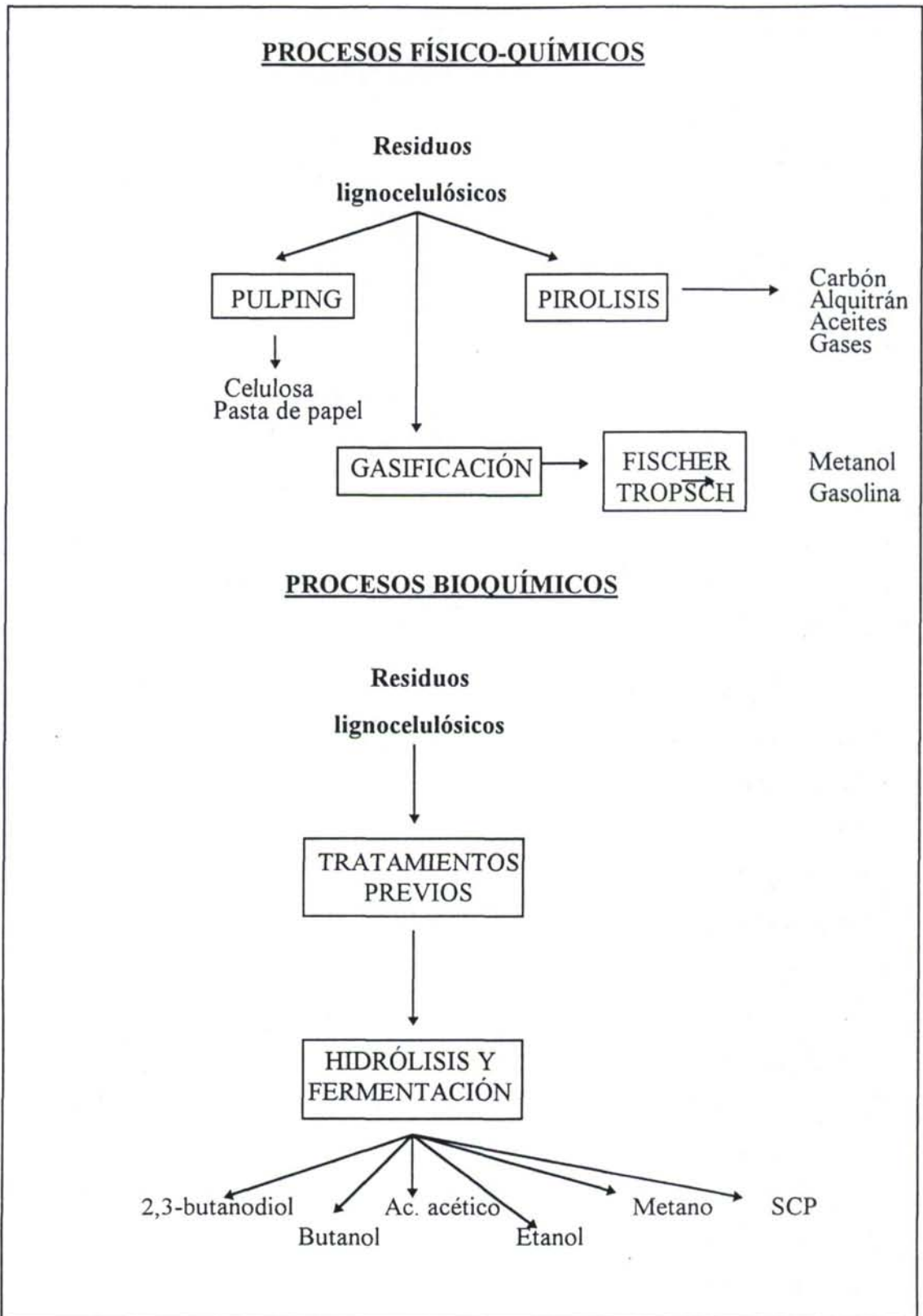


Fig. 2.5. Procesos físico-químicos para el aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos.

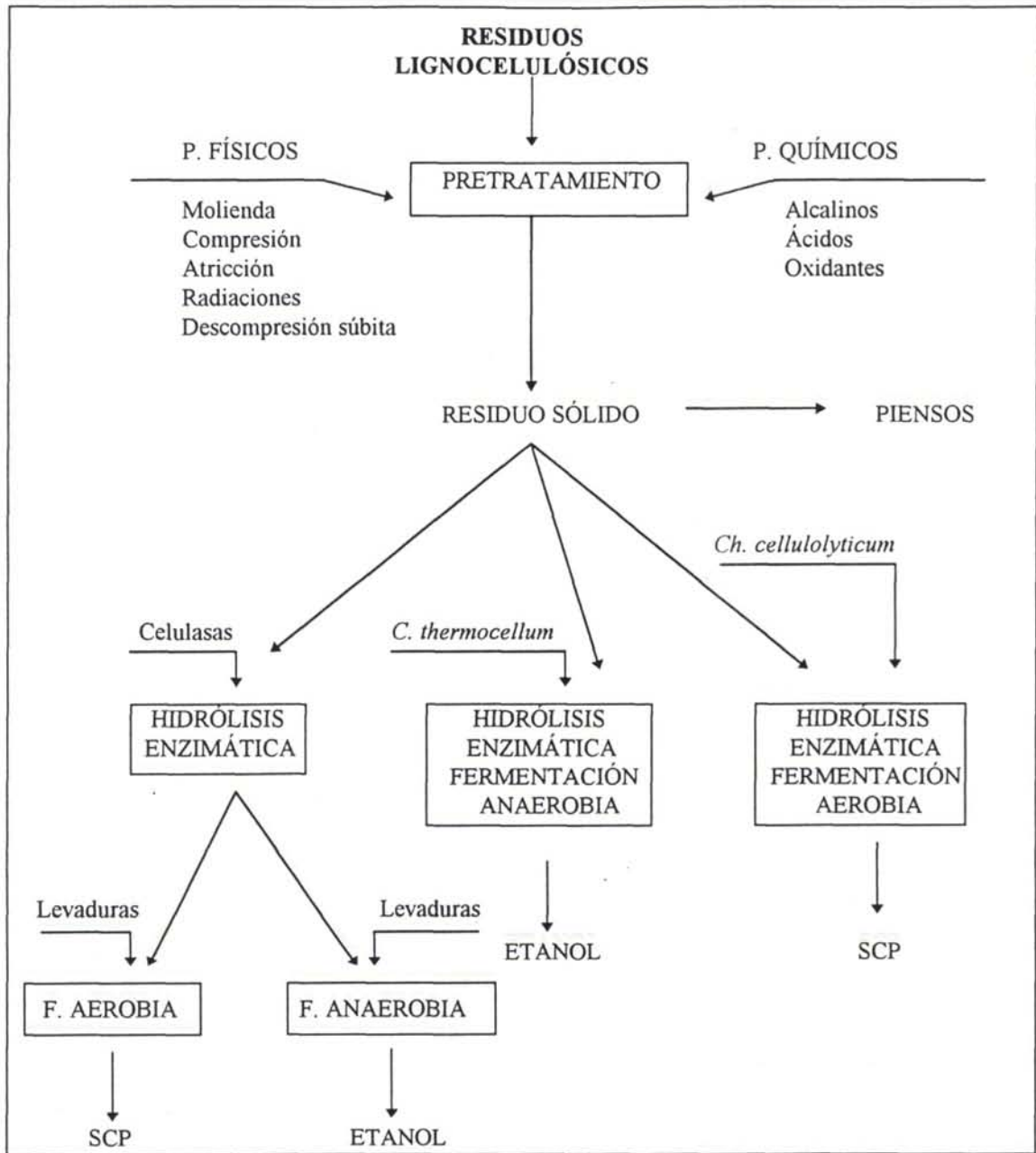


Fig. 2.6. Etapas en la obtención de etanol y SCP.

La mayor dificultad que aparece en el aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos para la producción de etanol o SCP estriba en que es necesario romper los enlaces β -1,4-glucosídicos, para así liberar las moléculas de glucosa y celobiosa que puedan posteriormente ser fermentadas a etanol o SCP (Wilke *et al.*, 1983). Aunque la velocidad de hidrólisis propiamente dicha no parece ser limitante en el proceso, las mayores dificultades residen en la accesibilidad que presenta el sustrato al agente catalítico, bien sea un

ácido o una proteína enzimática. Como la celulosa está protegida por una barrera física, formada fundamentalmente por la lignina y su propia estructura cristalina que dificulta el acceso del catalizador a los enlaces glucosídicos, se comprende que cualquier aprovechamiento racional, en el sentido de producir etanol o SCP, implica necesariamente pretratamientos que eliminen la barrera de lignina y reduzcan la cristalinidad de la celulosa. En general, los pretratamientos químicos de la paja de trigo son más efectivos que los físicos (Fan *et al.*, 1981).

Una vez realizados los pretratamientos adecuados, el paso siguiente, tanto para producir etanol como SCP, es hidrolizar la celulosa a formas que sean fácilmente aprovechables por los microorganismos; esta hidrólisis puede ser ácida o enzimática. En la actualidad la hidrólisis enzimática parece ser el camino más prometedor.

En la hidrólisis enzimática existen dos factores a considerar en cualquier estudio cinético:

- a) La naturaleza y producción de las celulasas.
- b) La naturaleza del sustrato y las interacciones enzima sustrato.

a) Naturaleza y producción de las celulasas

Las celulasas más activas son aquéllas que provienen de los hongos *Trichoderma reesei*, *T. lignorum*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii* y *T. longibrachiatum* (Mandels, 1981). Todos estos microorganismos sufren represión por parte de algunos catabolitos, y sobre todo, por parte de la glucosa. De ahí, que la producción de celulasas se realice generalmente fuera de los procesos de hidrólisis propiamente dichos (Mandels, 1981).

De los microorganismos mencionados, *T. reesei* es el más utilizado ya que produce celulasas relativamente equilibradas en cuanto a su composición y, además, su rendimiento es alto. Sin embargo, es frecuente que las celulasas sean deficientes en β -glucosidasa; por ello, se está tratando de mejorar las fuentes de celulasas. Así, se describe la utilización de mutantes o de nuevos hongos celulolíticos, tales como *Aspergillus foetidus* (Sadana *et al.*, 1979), *A. jumigatus* (Trivedi y Rao, 1980) y *A. niger* (Busto *et al.*, 1995). Los resultados obtenidos indican que las celulasas provenientes de *Aspergillus* tienen un alto contenido en β -glucosidasa, pero son deficientes en exoglucanasas.

Por otra parte, la producción de celulasas a partir de *Actomicetes thermofilicus*, como el *Thermonospora sp.*, tiene el inconveniente de dar lugar a unas endo- y exoglucanasas que parecen estar fuertemente inhibidas por la celobiosa. Adicionalmente, sus β -glucosidasas son térmicamente inestables (Mandels, 1982; Meyer y Humphrey, 1982).

En la actualidad las investigaciones se dirigen a encontrar microorganismos celolíticos, termófilos, aerobios o anaerobios, capaces de producir celulasas en cantidad suficientes y equilibradas en su composición, para realizar la hidrólisis y fermentación simultáneamente.

b) Naturaleza del sustrato e interacciones enzima-sustrato

Para evaluar la influencia de la naturaleza del sustrato y del enzima sobre la velocidad de hidrólisis se han planteado distintos modelos cinéticos. Estos se pueden clasificar en dos grandes grupos, según traten el complejo enzimático y al sustrato como sustancias únicas o bien formadas por varios componentes, que es lo más correcto, ya que se aproxima al fenómeno real.

En el primer caso lo normal es considerar una cinética enzimática simple con inhibición competitiva por producto (Koichiro *et al.*, 1982). En general este modelo ajusta los resultados experimentales a conversiones de sustrato bajas y complejos celolíticos muy deficientes en β -glucosidasa, es decir, cuando la reacción homogénea está minimizada. Por ello, es lógico que a conversiones altas, mayores del 50%, la desviación entre los resultados teóricos y los experimentales sea notable. Howell (1978) intenta explicar este hecho admitiendo una cierta desnaturalización del enzima y la formación de un complejo muerto. Sin embargo, los tiempos de reacción y las condiciones de operación, pH y temperatura, no parecen ser los suficientemente drásticas como para provocar estas diferencias. En consecuencia, parece lógico pensar que las desviaciones del modelo están provocadas por la compleja naturaleza del sustrato y del enzima.

El segundo modelo supone una aproximación teórica a la hidrólisis de la celulosa considerando que el enzima está formado por tres componentes. En cuanto al sustrato se estima que, independientemente de su naturaleza y estructura inicial, durante la hidrólisis se van a ir formando cadenas de celulosa de longitud variable. Los tres enzimas actúan

simultáneamente; E_1 forma un complejo enzima-sustrato con las moléculas de celulosa rompiéndolas al azar y liberan cadenas más cortas, celobiosa y glucosa; E_2 forma un complejo con los extremos no reductores separando celobiosa y, por último, E_3 hidroliza el disacárido a glucosa. Los tres enzimas pueden presentar inhibición competitiva o no competitiva por parte de la celobiosa y de la glucosa.

La ecuación cinética para la degradación de la celulosa, obtenida según las hipótesis anteriores, resulta extremadamente compleja por el número de parámetros y de concentraciones de productos intermedios que aparecen en la formulación. Por ello, aunque el modelo supone una aproximación teórica, razonada y fundamentada, al proceso de hidrólisis, parece inviable desde el punto de vista práctico.

Una solución intermedia, entre el primer y segundo modelo es la propuesta por Wald *et al.* (1984) que consideran al sustrato formado por una fracción amorfa y otra cristalina y no distinguen entre la acción de E_1 y E_2 . Es decir, admiten que ambos enzimas liberan la celobiosa que se hidroliza en fase homogénea a glucosa por acción de la β -glucosidasa.

A la vista de lo anteriormente expuesto se deduce que es necesario atenuar la inhibición de producto para conseguir un mayor aprovechamiento del enzima. Esto se puede conseguir mediante alguno de los siguientes procedimientos (Camacho *et al.*, 1986):

- i) La adición de β -glucosidasa al sistema, ya que de esta forma se alivia la inhibición de la celobiosa sobre la actuación de endo- y exoglucanasas. En este sentido, la obtención de β -glucosidasa a partir de *Aspergillus* es interesante, ya que este microorganismo es más económico en su producción.
- ii) Realizar la hidrólisis y fermentación simultáneamente, ya que de esta forma se retiran la glucosa y celobiosa del medio, por lo que se disminuye la inhibición por producto. Los inconvenientes de este método de operación residen en que las paredes celulares pueden ser atacadas por el enzima y en la inhibición que produce el etanol sobre la obtención de celulasas.

En la actualidad las cantidades de enzimas necesarias y su costo de producción son la mayor barrera a vencer si se pretende que la hidrólisis enzimática sea económicamente viable. En consecuencia, es necesario idear nuevos métodos para que la utilización del enzima durante el proceso de hidrólisis sea óptima. En este sentido se han propuesto, además de los ya mencionados, distintas vías de actuación (Camacho *et al.*, 1986):

- i) **Inmovilización de celulasas:** presenta dificultades, ya que se trata de un sustrato insoluble y, en consecuencia, la superficie de contacto enzima/sustrato será pequeña. No obstante, resulta viable para hidrolizar los jarabes obtenidos en la etapa heterogénea, mediante β -glucosidasas inmovilizadas (Sudstrum *et al.*, 1982; Woodward y Wiseman, 1982), ya que de esta forma se reduce la inhibición producida por la celobiosa sobre E_1 y E_2 y la de la glucosa sobre E_3 .
- ii) **Recuperación de enzimas:** La reutilización de los enzimas que permanecen en el jarabe de hidrólisis por precipitación, ultrafiltración o adsorción, presenta el inconveniente de que las celulasas se adsorben fuertemente sobre el sustrato, por lo que sólo una pequeña fracción de exo- y endoglucanasas permanece en disolución.
- iii) **Modificación de las características superficiales del sustrato mediante la adición de sustancias externas:** En este sentido, son destacables los trabajos de Castanon y Wilke (1980, 1981) con Twen 80; la adición de este agente tensoactivo incrementa la recuperación del enzima y el grado de hidrólisis.

Además del estudio cinético de la hidrólisis enzimática de los materiales lignocelulósicos, se hace necesario un estudio de los procesos de hidrólisis. De acuerdo con el esquema general, el sustrato una vez sometido al pretratamiento, seleccionado de acuerdo con sus características específicas, es hidrolizado, mediante la acción de los enzimas celulolíticos, hasta glucosa. Las condiciones del proceso, temperatura, tiempo de hidrólisis, concentración de enzimas y relación sólido-líquido dependen del sustrato utilizado y deben por tanto ser determinadas experimentalmente para cada caso.

Estos parámetros unidos a la finalidad del proceso de hidrólisis determinan el modo de operación más adecuado. Se han descrito numerosos sistemas para llevar a cabo los procesos de hidrólisis enzimática: continuos, discontinuos, con enzimas inmovilizadas, con reciclado de enzimas, con fermentación simultánea, biorreactores de membrana, cada uno de los cuales presenta ventajas e inconvenientes. Las dificultades para realizar a gran escala estos procesos no son sólo de orden técnico sino económico ya que los productos resultantes deben competir entre otros, con los derivados de la industria petroquímica cuyos precios son en la actualidad inferiores a los que alcanzaron durante la crisis energética y que generaron unas perspectivas para la transformación de celulosa muy optimistas.

Los procesos discontinuos clásicos presentan el problema de la inhibición de la actividad enzimática como consecuencia de la acumulación en el medio de los productos de hidrólisis, fundamentalmente glucosa y celobiosa.

Actualmente se están investigando diversos esquemas operativos que permiten retirar estos productos a medida que se producen. Así, por ejemplo, los reactores de membrana de ultrafiltración, que son reactores convencionales equipados con una membrana de poro adecuado para que los enzimas puedan ser retenidas en el interior del reactor junto con los sustratos macromoleculares, permiten que los productos finales sean retirados a través de dicha membrana al mismo tiempo que se sustituye con solución tampón nueva el filtrado eliminado.

Otros sistemas que permiten el reciclado de los enzimas y la separación de los productos de hidrólisis son los sistemas acuosos de doble fase. Las dos fases de estos sistemas se forman con polímeros sólidos como el dextrano y el polietilenglicol que son biocompatibles por su alto contenido en agua. Los azúcares formados durante la etapa de hidrólisis se distribuyen en la fase superior, de donde pueden ser separados mediante un sistema de ultrafiltración o ser fermentados directamente, mientras que los enzimas y el sustrato se distribuyen en la fase inferior.

Por último, la acumulación de glucosa y otros azúcares en el medio de hidrólisis también puede evitarse utilizando procesos de sacarificación y fermentación simultánea (SFS).

Aunque es evidente que en los últimos años se han realizado considerables avances en el campo de la hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos, quedan, sin embargo, aspectos importantes del proceso que requieren un estudio profundo que permita encontrar soluciones a los problemas planteados. La estrategia a utilizar debe perseguir una doble finalidad. Por un lado, es necesario aumentar el rendimiento final de transformación de celulosa a glucosa, que se puede abordar desde distintos frentes tales como selección de pretratamientos, mejora en la eficiencia de producción de celulasas y en el conocimiento de su comportamiento bioquímico, desarrollo de procesos de hidrólisis, etc. El otro objetivo es el de incrementar la viabilidad económica a las fracciones mayoritarias, que junto con la celulosa constituyen los materiales lignocelulósicos, es decir, hemicelulosa y lignina, definiendo claramente los procesos globales de transformación.

2.3. INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

2.3.1. DEFINICIÓN Y CONCEPTO DE ENZIMA INMOVILIZADO

Los enzimas son biocatalizadores biológicos, cuyo uso ha ido extendiéndose gradualmente a una gran variedad de campos, como la producción de alimentos, la industria textil, la medicina, etc. Los recientes descubrimientos de la Bioquímica han dado como resultado la clarificación del mecanismo de las reacciones enzimáticas y el descubrimiento de nuevas fuentes de enzimas, y junto con el progreso de la Microbiología aplicada, se ha extendido ampliamente el rango de aplicación de los enzimas. Sin embargo, los enzimas son generalmente inestables y no pueden utilizarse con determinados disolventes orgánicos o a elevadas temperaturas (Chibata, 1978). Convencionalmente, las reacciones enzimáticas se llevan a cabo en reactores donde se incuba la mezcla de enzima y sustrato. En esta técnica es muy difícil recuperar el enzima activo después de la reacción para una posible reutilización. En este tipo de ensayos, el enzima y otras proteínas contaminantes se eliminan mediante la aplicación desnaturalizante de valores de pH extremos o tratamiento con calor para separar el producto de la mezcla de reacción. Estas operaciones no resultan económicamente rentables ya que después de cada reacción, se pierde el enzima aplicado.

Para eliminar las desventajas inherentes a los enzimas y conseguir catalizadores de elevada actividad, estabilidad y especificidad apropiada, se han orientado las investigaciones hacia dos líneas principales: (i) síntesis de polímeros bioquímicos que posean una actividad similar a los enzimas y (ii) la modificación de los enzimas microbianos mediante procesos de inmovilización. Esta es la línea que se desarrolla en el presente trabajo de investigación. Los enzimas inmovilizados se definen como *"enzimas confinados o localizados en una región definida del espacio, con retención de su actividad catalítica, la cual puede ser utilizada repetida y continuamente"*.

2.3.2. CLASIFICACIÓN DE ENZIMAS INMOVILIZADOS

Existen diversas formas de clasificar los distintos tipos de enzimas inmovilizados, que dependen en cierta medida de la definición utilizada para describirlos. El concepto de enzima inmovilizado incluye a (Kennedy y White, 1991):

- a) Enzimas modificados mediante técnicas adecuadas hasta hacerlos insolubles en agua.
- b) Enzimas solubles utilizados en reactores equipados con membranas de ultrafiltración semipermeables, que permiten el paso de los productos de reacción resultantes de la hidrólisis de sustratos de peso molecular elevado, reteniendo las moléculas de enzima dentro del reactor.
- c) Enzimas cuya movilidad ha sido restringida al unirlos con macromoléculas, de forma que la molécula global formada sea aún soluble en agua.

La clasificación debe basarse sobre todo en el tipo de interacción responsable de la inmovilización y de la naturaleza del soporte. La Fig. 2.7 muestra el sistema de clasificación utilizado por Kennedy y White (1991), así como los métodos individuales, que serán tratados con más detalle en el apartado siguiente.

De todos estos métodos, la adsorción y la unión covalente son las técnicas más utilizadas (Trevan, 1980; Messing, 1985; Woodward, 1985). No obstante, si se pretende conseguir la estabilización enzimática, el método más eficaz suele ser la modificación de la estructura nativa del enzima por agentes químicos (como por ejemplo reactivos bifuncionales) para formar enlaces intramoleculares o la unión de la proteína enzimática a soportes sólidos (Smalla *et al.*, 1988). Hay que tener en cuenta que, con frecuencia, los enzimas se desnaturalizan como consecuencia de la pérdida de su conformación tridimensional. Por tanto, cualquier método que ayude al mantenimiento de la estructura proteica (como aquellos que fijan las moléculas enzimáticas a un soporte), incrementará su estabilidad, siempre y cuando el proceso de inmovilización no implique residuos del centro activo que inactiven la capacidad catalítica.

La importancia de la elección del soporte de inmovilización adecuado radica en que las características finales de la preparación enzimática están estrechamente relacionadas con el soporte utilizado. De hecho, el soporte ideal debería cumplir las siguientes características: (1) presentar una gran superficie específica y suficiente permeabilidad, (2) tener un alto coeficiente de difusión para el sustrato, (3) poseer grupos funcionales a los que pueda unirse el enzima, (4) ser hidrofílico, (5) ser insoluble, (6) tener estabilidad química, mecánica y térmica, (7) formar partículas rígidas, (8) ser resistente al ataque microbiano, (9) permitir su regeneración, y (10) ser un material seguro.

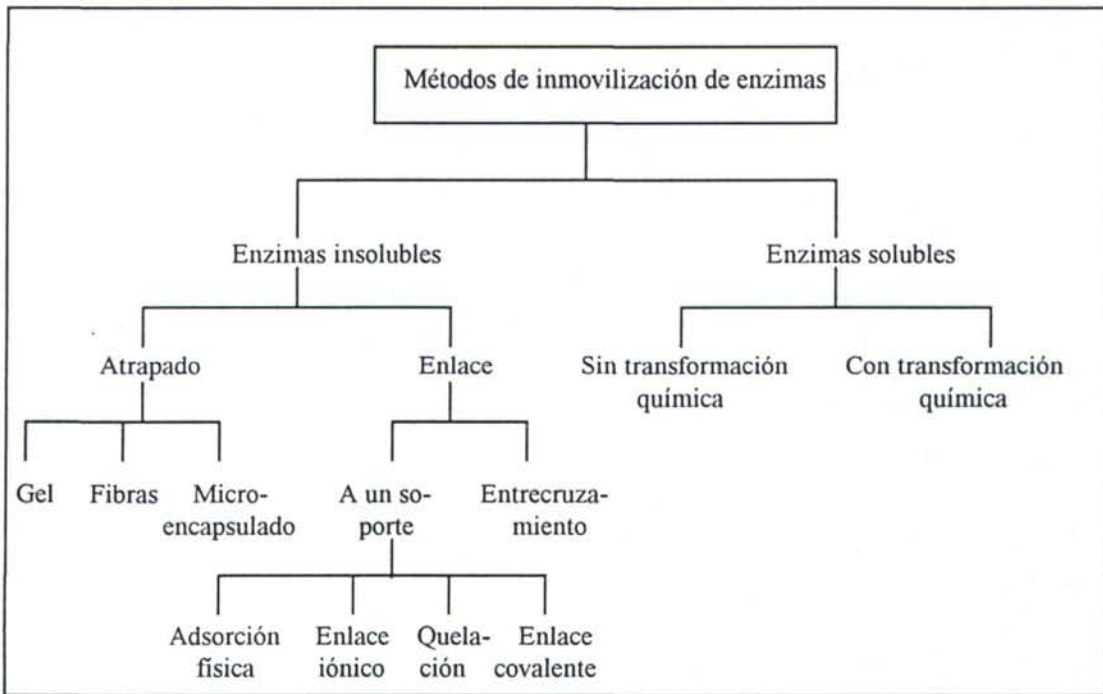


Fig. 2.7. Clasificación de los métodos de inmovilización de enzimas (Kennedy y White, 1991).

2.3.3. PRINCIPALES MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

En los últimos años el número de métodos disponibles para la inmovilización de enzimas se ha incrementado considerablemente. Los métodos generales, que se describen a continuación, son concordantes con el sistema de clasificación descrito previamente.

Tal y como ya se ha mencionado, para que un enzima inmovilizado conserve su actividad catalítica, es necesario que el procedimiento de inmovilización no altere los grupos funcionales implicados en el centro activo ni afecte su estructura espacial. Por esta razón, las técnicas de inmovilización requieren condiciones extremadamente precisas y suaves de temperatura, pH, concentración salina, etc. (Vieth y Venkatasubramanian, 1974a).

Aunque las técnicas de inmovilización han sido clasificadas en varias categorías básicas, en muchos casos el método seguido para inmovilizar un determinado enzima es una combinación de dos o más de estas categorías. En todo caso, las principales técnicas de inmovilización de enzimas insolubles podrían incluirse en alguna de estas tres categorías (Chibata, 1978):

- a) **Atrapamiento**, que supone la reclusión de los enzimas entre las láminas de un gel semipermeable o el englobamiento en una membrana polimérica semipermeable.
- b) **Enlace a un soporte**, que supone el enlace de los enzimas a soportes insolubles en agua.
- c) **Entrecruzamiento**, que supone la reticulación intermolecular de los enzimas por medio de reactivos bi- o multifuncionales.

2.3.3.1. ATRAPAMIENTO

Este método de inmovilización consiste en retener a un enzima dentro de la red espacial de una matriz polimérica o de una membrana, de forma que se evite la liberación de la proteína sin impedir la penetración del sustrato. Esto restringe inmediatamente la aplicación del proceso a aquellas reacciones en las que las moléculas del producto y del sustrato son relativamente pequeñas. Puesto que el enzima no está unido de ninguna forma al gel o a la membrana, el método puede aplicarse mas generalmente que cualquier otro para el atrapado de cualquier tipo de enzimas, células microbianas y orgánulos de diferentes tamaños independientemente de sus propiedades y con poca pérdida de la actividad biológica. Este método tiene una amplia aplicabilidad, pero sin embargo, si se utiliza una reacción que conlleve una polimerización inadecuada o incompleta del soporte puede tener lugar la pérdida de actividad enzimática. Por ello, es necesario en seleccionar las condiciones idóneas de inmovilización para cada enzima (Chibata, 1978).

En este método se incluyen el atrapado en geles y en fibras y el microencapsulado.

2.3.3.1.1. ATRAPADO EN GELES

En el método de atrapado en geles los enzimas se localizan en el interior de los espacios intersticiales de geles poliméricos entrecruzados insolubles en agua. Así por ejemplo, se han atrapado enzimas en el interior de redes de poliacrilamida o alginato de calcio llevando a cabo su polimerización y/o entrecruzamiento en presencia de la proteína enzimática (Kierstan y Coughlan, 1985). En la mayoría de los casos se requiere un alto grado de entrecruzamiento en la matriz para optimizar el atrapado y disminuir las pérdidas de proteína. Sin embargo, un entrecruzamiento demasiado apretado podría limitar la difusión del sustrato hacia el interior o del producto hacia exterior de la matriz.

- **Geles de poliacrilamida.**

La inmovilización en geles de poliacrilamida fue la primera técnica de atrapado empleada, y con ella Bernfeld y Wan (1963) inmovilizaron tripsina, papaína, β -amilasa y D-fructosa bifosfato aldolasa. En la Fig. 2.8 se esquematiza el método más usual para el

atrapado enzimático en este tipo de geles, el cual se realiza por polimerización de la solución acuosa del monómero de acrilamida y del enzima soluble en presencia del agente de entrecruzamiento, N, N'-metilénbisacrilamida (BIS).

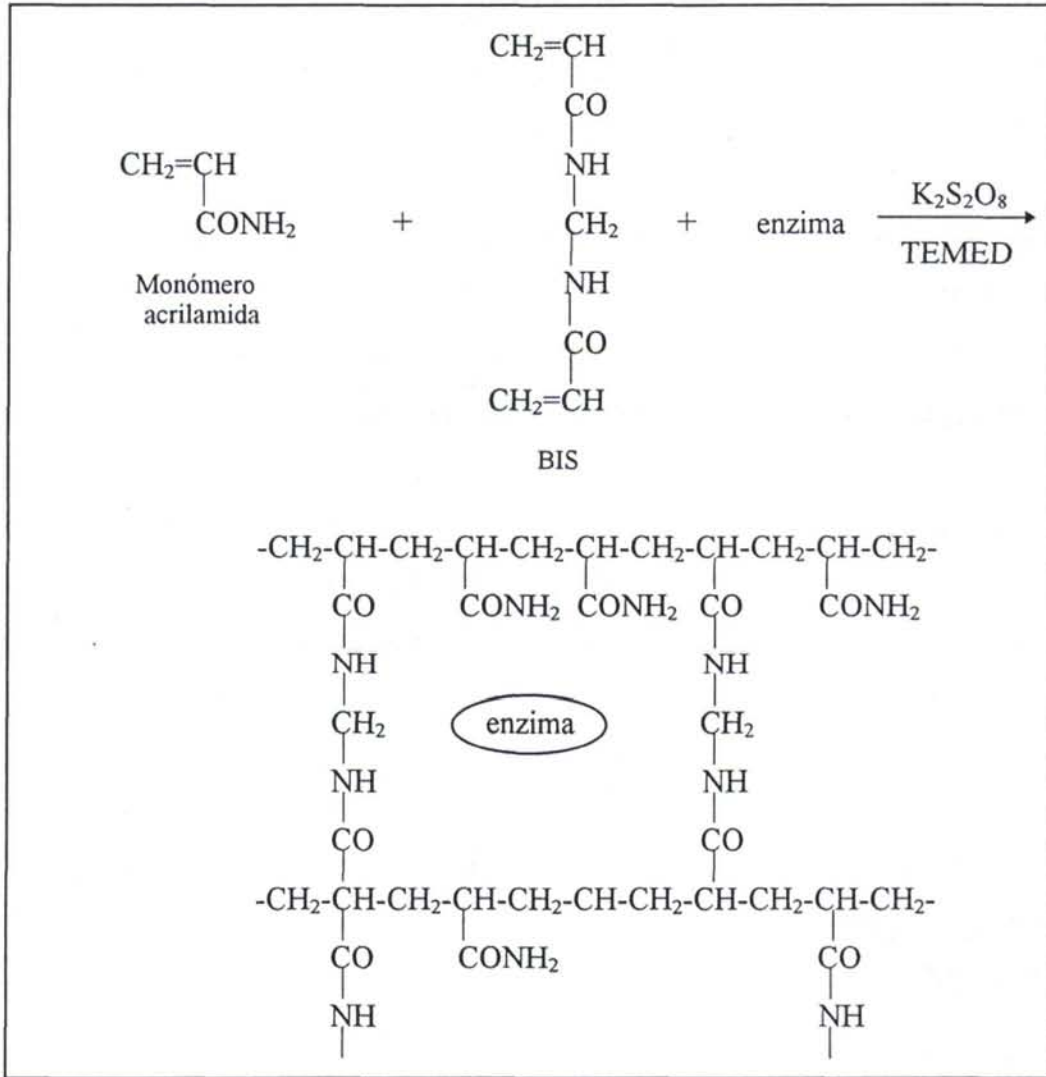


Fig. 2.8. Esquema del atrapamiento de enzimas en geles de poliacrilamida.

La polimerización de la acrilamida se inicia con la adición de persulfato amónico ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) (o riboflavina) y se acelera por la adición de N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED), o menos frecuentemente, de 3-dimetilamino-propionitrilo (DMAPN).

En el sistema persulfato amónico-TEMED, el TEMED cataliza la formación de radicales libres y el persulfato inicia la polimerización. Por lo tanto, son necesarias bases libres en el TEMED, por lo que la polimerización ha de realizarse a valores de pH bajos.

Cuando se incrementa la concentración del catalizador, la velocidad de reacción aumenta. Además, es necesario mantener la temperatura por debajo de 25°C y llevar a cabo la reacción en ausencia de oxígeno para prevenir la desnaturalización térmica de las moléculas de enzima, aunque la generación de radicales libres durante la reacción puede, en algunos casos, provocar la degradación del enzima.

En contraste con la polimerización química que tiene lugar con el persulfato, cuando se usa el sistema riboflavina-TEMED es necesaria la energía luminosa para inicial la polimerización. Esta produce la descomposición de la riboflavina y genera los radicales libres necesarios (Hames, 1981).

El gel resultante puede dispersarse mecánicamente en partículas del tamaño deseado (Kennedy, 1991), aunque en el proceso de homogeneización hay que cuidar que una distribución demasiado amplia de tamaños de poro en el gel provoque pérdidas del enzima atrapado (Bernfeld y Wan, 1983). En todo caso, como es bien sabido, el tamaño efectivo del poro está directamente relacionado con la concentración de acrilamida presente en la mezcla de reacción, disminuyendo cuando aumenta la concentración de acrilamida (Hames, 1981).

- **Geles de alginato de calcio**

El gel de alginato de calcio también es (y ha sido) ampliamente utilizado para la inmovilización de proteínas enzimáticas y células microbianas debido a la simplicidad de la técnica y las condiciones suaves de su realización (Fukushima *et al.*, 1988). En 1975 Hackel *et al.* aplicaron por primera vez alginatos de aluminio para el atrapado de células completas.

El alginato es un polisacárido estructural procedente de algas marinas (aunque también es secretado como polisacárido extracelular por algunas especies de bacterias), que contiene β -D-manopiranosil uronatos y α -L-gulopiranosil uronatos en una secuencia regular de enlaces (1→4) (Fig. 2.9). Ambas secuencias homopoliméricas se han encontrado juntas, aunque con distinta extensión en todas las moléculas de alginato. También se han encontrado secuencias donde aparece una mezcla de los dos monómeros.

Este polisacárido en presencia de soluciones de cationes monovalentes, forma soluciones viscosas incluso a concentraciones bajas. En contraste, con soluciones de cationes divalentes (especialmente calcio) tiene lugar la formación del gel.

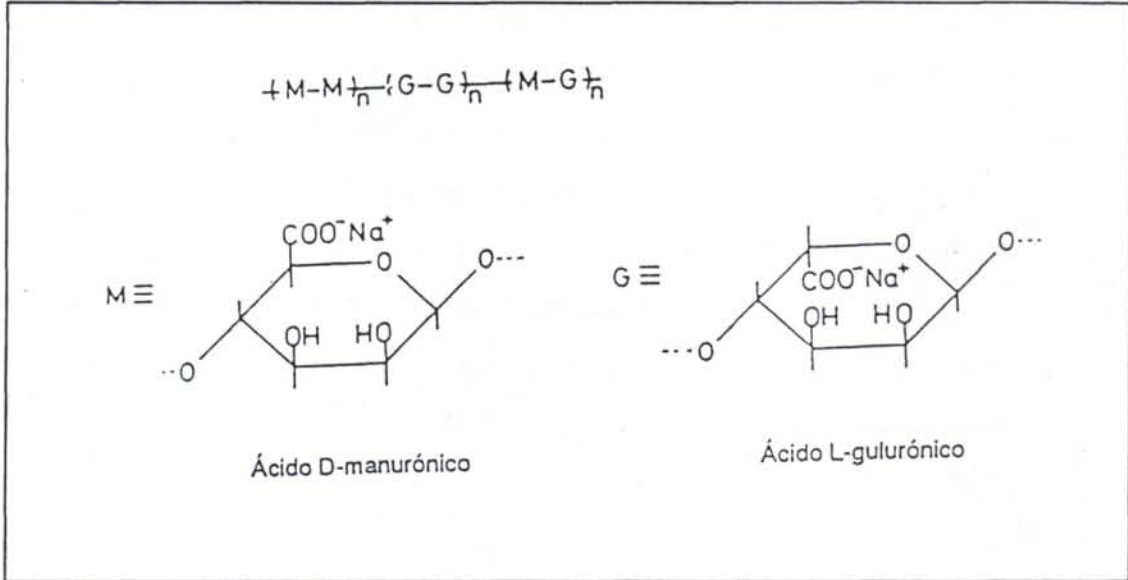


Fig. 2.9. Estructura química de alginatos.

Para la inmovilización en geles de alginato, el enzima se añade a una solución acuosa de alginato de sodio, a la que se añade, posteriormente y gota a gota, una solución de cloruro de calcio que produce la precipitación en forma de gel de enzima-alginato cálcico (Shovers y Sandine, 1973). La formación de este enrejado iónico fue desarrollada originalmente por Thiele (1954). Una desventaja de este tipo de enrejado es su reversibilidad: el gel ionotrópico no es estable en presencia de concentraciones elevadas de soluciones de electrolitos (K^+ , Na^+ ...). La tolerancia del gel al electrolito depende de los coeficientes de selectividad del alginato, especialmente de su relación M/G (ácido D-manurónico/ácido L-gulurónico). Se ha demostrado que los alginatos con mayor número de grupos de ácido manurónico son mucho más estable en soluciones de concentraciones elevadas de electrolitos (Vorlop y Klein, 1983). Otra desventaja de los geles ionotrópicos es su inestabilidad en soluciones que contengan fosfato, ya que los cationes multivalentes (Ca^{2+} , etc.) precipitan redisolviéndose la matriz (Vorlop y Klein, 1983).

2.3.3.1.2. ATRAPADO EN FIBRAS

Dinelli y colaboradores (Dinelli *et al.*, 1976) desarrollaron un método de inmovilización de enzimas por atrapado dentro de las microcavidades de fibras sintéticas, de forma que las moléculas de enzima pudieran quedar atrapadas en fibras producidas continuamente mediante técnicas convencionales de hilado en húmedo. Con esta técnica, el polímero formado de fibras se disolvía en un solvente orgánico inmiscible en agua y se formaba una emulsión con la solución acuosa del enzima. Esta emulsión se estrusionaba en un líquido de coagulación (frecuentemente tolueno o éter de petróleo), que hacía que el polímero precipitara en forma de filamentos con microgotas de la solución de enzima atrapado dentro de las microcavidades del polímero (Dinelli *et al.*, 1978). La principal causa de inactivación del enzima en esta técnica era el uso de disolventes orgánicos inmiscibles con el agua para la solubilización y dispersión del polímero.

Este método presenta varias ventajas con respecto al anterior, puesto que utilizando fibras muy finas se puede conseguir una gran área de unión para el enzima; además, las fibras soportan los medios ácidos y básicos débiles, las fuerzas iónicas altas y algunos disolventes orgánicos y dependiendo del polímero usado son resistentes a los ataques microbianos. También se puede inmovilizar más de un enzima de forma que se obtengan sistemas multienzimáticos. El polímero más usado es el acetato de celulosa.

2.3.3.1.3. MICROENCAPSULADO

El microencapsulado de enzimas consiste en atrapar al enzima en membranas poliméricas semipermeables esféricas con diámetros entre 1 y 100 nm. De esta forma, se encapsulan físicamente los enzimas dentro de la membrana de manera tal que las moléculas de producto y sustrato puedan difundir a través de ella libremente siempre que sus tamaños sean lo suficientemente pequeños para que esto sea factible. Los primeros trabajos de inmovilización de enzimas en este tipo de soportes datan de comienzos de los años 60 (Chang, 1964).

La encapsulación de enzimas en membranas esféricas de polímeros semipermeables puede llevarse a cabo mediante varios métodos (separación de fases, polimerización interfacial, membrana surfactante líquida y métodos de secado de líquidos).

2.3.3.2. UNIÓN A SOPORTES INSOLUBLES

La unión de un enzima a un soporte insoluble es el método más antiguo (Nelson y Griffin, 1916) y común para la inmovilización de enzimas. Dependiendo del tipo de unión del enzima al soporte, pueden llevarse a cabo procesos de inmovilización por adsorción física, iónica, quelación (o unión metálica) y unión a través de enlaces covalentes (Fig. 2.7). En cualquiera de estos métodos, la selección del soporte insoluble y el método de unión tienen una importancia máxima. Lógicamente, el soporte ideal para una aplicación dada sería aquél que aumentara la interacción con el sustrato, disminuyera la inhibición por el producto, cambiara el pH aparente óptimo hasta el valor deseado, frenara el crecimiento microbiano y fuera fácilmente recuperable para poder volver a utilizarlo. En el caso de que se emplee en un reactor, el soporte deberá ser estable en solución y no deteriorarse en las condiciones de reacción. Cuando se emplee en reactores de lecho fijo, deberá ser mecánicamente rígido y tener un grado de compactación bajo en operaciones continuas a velocidades de flujo altas. Cuando el enzima inmovilizado se utilice en aplicaciones médicas, el soporte no deberá provocar respuestas inmunes o reacciones de coagulación. Messing (1975) indica un método de selección de soportes apropiados para usos industriales considerando todas estas propiedades. En los apartados siguientes, se detallan los principales métodos para inmovilizar enzimas a soportes insolubles.

2.3.3.2.1. ADSORCIÓN FÍSICA

La adsorción física es, desde el punto de vista histórico, el primer método artificial de inmovilización de enzimas (Nelson y Griffin, 1916). Este método es el más simple, entre todos los destinados a la preparación de inmovilizados, y se basa en la adsorción física de las moléculas de enzima a la superficie de una matriz sólida, por contacto de una solución acuosa del enzima con el soporte mediante inmovilización estática, electrodeposición, inmovilización en reactor o baño con agitación.

Puesto que no hay especies reactivas implicadas, en este método suele producirse un ligero o incluso nulo cambio conformacional del enzima durante su inmovilización, por lo que puede obtenerse un derivado con actividad específica similar a la del enzima disuelto. La adsorción depende de variables experimentales tales como el pH, la natura-

leza del solvente, la fuerza iónica, la cantidad de enzima y de adsorbente, el tiempo y la temperatura, por lo que se necesita controlarlas estrictamente debido que las fuerzas de unión entre la proteína y el adsorbente son relativamente bajas (puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas, etc.).

Un inconveniente en esta metodología de inmovilización es la posible desorción de la proteína del soporte debido a la debilidad de las fuerzas de unión entre ellos con las consiguientes desventajas de la pérdida de actividad catalítica y de la contaminación de los productos de reacción.

Los soportes utilizados en este método suelen ser tanto compuestos inorgánicos (como carbón, cristal poroso, arcillas, kaolinita, silica gel, bentonita, hidroxiapatito y gel de fosfato cálcico, etc.) como polímeros naturales (como el almidón, gluten, etc.).

2.3.3.2.2. UNIÓN POR ENLACES IÓNICOS

La inmovilización mediante enlaces iónicos se basa, principalmente, en la unión iónica de las moléculas de enzima a soportes sólidos que contienen restos cambiadores de iones. En algunos casos, sin embargo, también se puede producir la adsorción física. La principal diferencia entre este método y el de adsorción es que la fuerza de unión entre el enzima y el soporte es mucho más alta en el enlace iónico, aunque sea menor que la existente en el método de enlace covalente. La preparación de enzimas inmovilizados por enlaces iónicos se lleva a cabo mediante los procedimientos similares a los citados en la adsorción física.

Debido a la naturaleza iónica de las fuerzas de enlace, en algunos casos puede producirse la liberación del enzima cuando se utilizan concentraciones elevadas de sustrato, soluciones con fuerzas iónicas altas o se producen variaciones en el pH. Sin embargo, dadas las condiciones suaves utilizadas para la inmovilización, los cambios conformacionales sólo se producen en pequeña extensión (si es que se producen), dando lugar a enzimas inmovilizados con actividades elevadas.

Los soportes usados en el método de enlace iónico son cambiadores de iones preparados frecuentemente a partir de soportes orgánicos, aunque también pueden usarse compuestos inorgánicos (especialmente sílice) con los mismos o similares grupos cam-

biadores de iones. Los polímeros orgánicos se derivan de polisacáridos (principalmente dextrano y celulosa) y los polímeros sintéticos de poliestireno. En función del grupo cambiador de iones, los soportes pueden ser cambiadores aniónicos o catiónicos, dependiendo de su capacidad para cambiar aniones (cloruros o hidroxilos) o cationes (iones hidrógeno y sodio) con los correspondientes residuos aniónicos o catiónicos del enzima. Los cambiadores de aniones más usados incluyen derivados de DEAE, TEAE y EC-TEOLA, mientras que los cambiadores de cationes más utilizados son derivados carboximetilos.

2.3.3.2.3. QUELACIÓN O UNIÓN METÁLICA

Es una técnica relativamente nueva que implica el uso de metales de transición como una forma de activar la superficie del soporte, permitiendo el acoplamiento directo del enzima sin transformación química previa del soporte, a través de la formación de quelatos. Entre los soportes utilizados, se encuentra el vidrio, la quitina, la celita, el ácido algínico, la gelatina, los poli- (ácidos 4 y 5-acrilaminosalicílicos) y la celulosa que se han utilizado para inmovilizar enzimas y antibióticos.

La activación de los soportes con compuestos de metales de transición, (normalmente cloruro de titanio IV), permite obtener soportes conteniendo quelatos activos de metales de transición capaces de unir moléculas de enzima por reemplazamiento de, por ejemplo, los enlaces cloruro-metal, por grupos presentes en la molécula de enzima. Se ha demostrado que las etapas de lavado implicadas en este proceso conducen a la hidrólisis del compuesto metálico para dar el correspondiente hidróxido de metal (Kennedy, 1979). La sustitución del ligando hidroxilo por los grupos amino, carboxilo, etc. del enzima provoca la inmovilización.

En este método pueden producirse también desorciones (al igual que en otros muchos métodos de inmovilización), aunque los avances más recientes en el campo de la quelación permiten conseguir un alto grado de estabilidad operacional (Kennedy y Kalo-gerakis, 1984).

2.3.3.2.4. UNIÓN POR ENLACES COVALENTES

Los métodos de inmovilización a través de enlaces covalentes consisten en unir covalentemente el enzima a matrices insolubles en agua y son uno de los métodos más utilizados e investigados para la inmovilización enzimática. La selección de las condiciones de inmovilización en este caso es más difícil, ya que con frecuencia implican condiciones más complicadas y menos suaves. Sin embargo, una vez formados los enlaces covalentes que inmovilizan al enzima, en la mayor parte de casos las preparaciones son estables y no lixivian el enzima a la solución, incluso en presencia del substrato o de soluciones de alta concentración iónica.

La inmovilización de un enzima mediante enlace covalente a un soporte debería implicar únicamente a grupos funcionales del enzima que no sean esenciales para la acción catalítica. Por tanto, no deben utilizarse reactivos que actúen sobre el centro activo del enzima. Con el fin de conseguir una mayor actividad en las preparaciones y prevenir la inactivación por reacción con los residuos de aminoácidos esenciales del centro activo, se han diseñado una serie de métodos, entre los que destacan (Zaborsky, 1973):

- Enlace del enzima en presencia de un substrato o un inhibidor competitivo.
- Enlace de un complejo enzima-inhibidor formado mediante un enlace covalente reversible.
- Uso de un enzima soluble modificado químicamente de forma que el enlace covalente a la matriz se lleve a cabo mediante los residuos nuevos incorporados.
- Uso de un zimógeno precursor.

Las reacciones que pueden darse entre los distintos tipos de soportes y grupos reactivos del enzima incluyen: reacción de diazotación, formación de enlaces amida, alquilación y arilación, formación de bases de Schiff, amidinación, intercambio tiol-disulfuro, interacciones Hg-enzima, acoplamiento inducido mediante irradiación gamma, etc., entre otros.

2.3.3.3. ENTRECruzAMIENTO

Este método se basa en la formación de enlaces covalentes entre las moléculas de enzima mediante reactivos bi- o multifuncionales, que dan lugar a la formación de agregados tridimensionales entrecruzados totalmente insolubles en agua pero que no necesitan el uso de soportes adicionales. Este método implica la adición de la cantidad apropiada de agente entrecruzante a la solución del enzima en condiciones tales que se obtengan múltiples enlaces covalentes. Desgraciadamente, las condiciones óptimas para obtener la máxima insolubilidad conservando a la vez una actividad enzimática elevada deben ser determinadas para cada sistema mediante un procedimiento de ensayo y error. Además, la utilización de agentes entrecruzantes es un método útil para la modificación química de los enzimas en un intento de incrementar su estabilidad (Kobayashi y Takatsu, 1994).

Los reactivos necesarios para el entrecruzamiento pueden tener dos grupos funcionales idénticos (homobifuncionales) o dos o más grupos funcionales diferentes (heteróbi- o heteromultifuncionales). Los principales reactivos utilizados contienen:

- (a) grupos funcionales carboxilos que reaccionan con residuos de L-lisina formando una base de Schiff,
- (b) grupos diazo que reaccionan con residuos de L-lisina, L-histidina, L-tirosina, L-arginina o L-cisteína mediante reacciones de acoplamiento diazo,
- (c) grupos isocianato que reaccionan formando enlaces amida (peptídico),
- (d) yoduros de alquilo que reaccionan con residuos nucleofílicos dando reacciones de alquilación,
- (e) yodoacetamidas que reaccionan con residuos de L-cisteína por alquilación.

2.3.3.3.1. INMOVILIZACIÓN CON GLUTARALDEHÍDO

La primera referencia sobre inmovilización por entrecruzamiento con glutaraldehído se atribuye a Quiocho y Richards (1964). Estos autores trataron carboxipeptidasa A con glutaraldehído como reactivo bifuncional y obtuvieron un enzima inmovilizado por enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y

temperatura. De hecho, el reactivo más utilizado en el entrecruzado molecular es el glutaraldehído. En relación al mecanismo de inmovilización, inicialmente se creía que tenía lugar la formación de una base de Schiff entre los grupos aldehídos del reactivo y los grupos amino de la molécula de enzima (Fig.2.10). No obstante, la estabilidad excepcional de los enlaces a pH y temperaturas extremas implicaba la adición conjugada de los grupos amino del enzima con los dobles enlaces etilénicos de los oligómeros α y β -insaturados presentes en las soluciones acuosas comerciales de glutaraldehído utilizadas frecuentemente (Fig. 2.11) (Richards y Knowles, 1968). Esta teoría se ha visto reforzada posteriormente, por el hecho de que la reactividad del glutaraldehído recién destilado frente a proteínas, es mucho menor que la del producto comercial. La formación de un complejo insoluble dependía claramente de las concentraciones relativas de enzima y reactivo así como del pH y la fuerza iónica de la solución (Brown, 1976).

Con concentraciones óptimas de proteína de 50 a 200 mg ml⁻¹ y de glutaraldehído del 0,3% al 0,6%, y con una relación de reactivo a enzima del 10% se obtenía un producto homogéneo e insoluble con una actividad enzimática óptima (Jansen *et al.*, 1971). Sin embargo, la influencia del tiempo, la temperatura y la concentración iónica sobre los rendimientos de inmovilización requerían la optimización para cada enzima concreto. Las concentración de glutaraldehído, el tiempo de entrecruzamiento y el pH son variables que afectan la actividad del enzima inmovilizado.

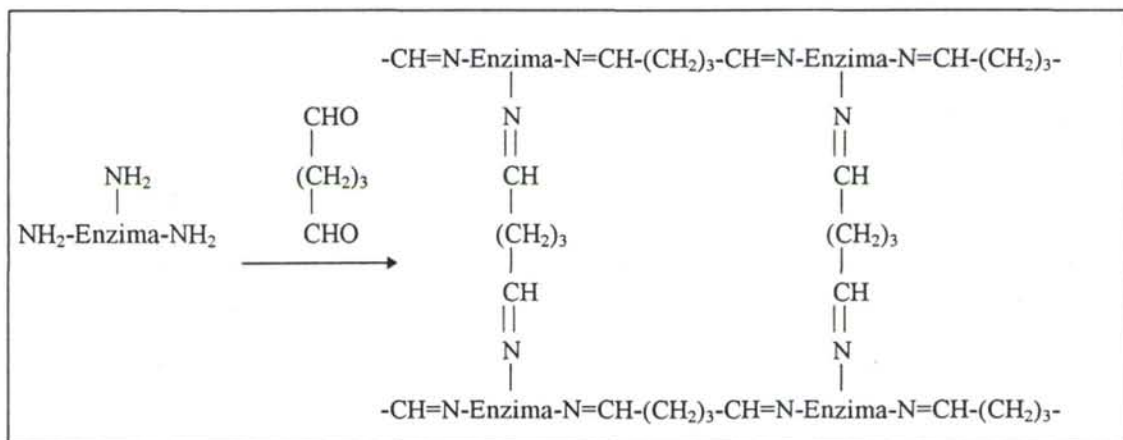


Fig. 2.10. Formación de una base de Schiff entre el glutaraldehído y los grupos amino del enzima.

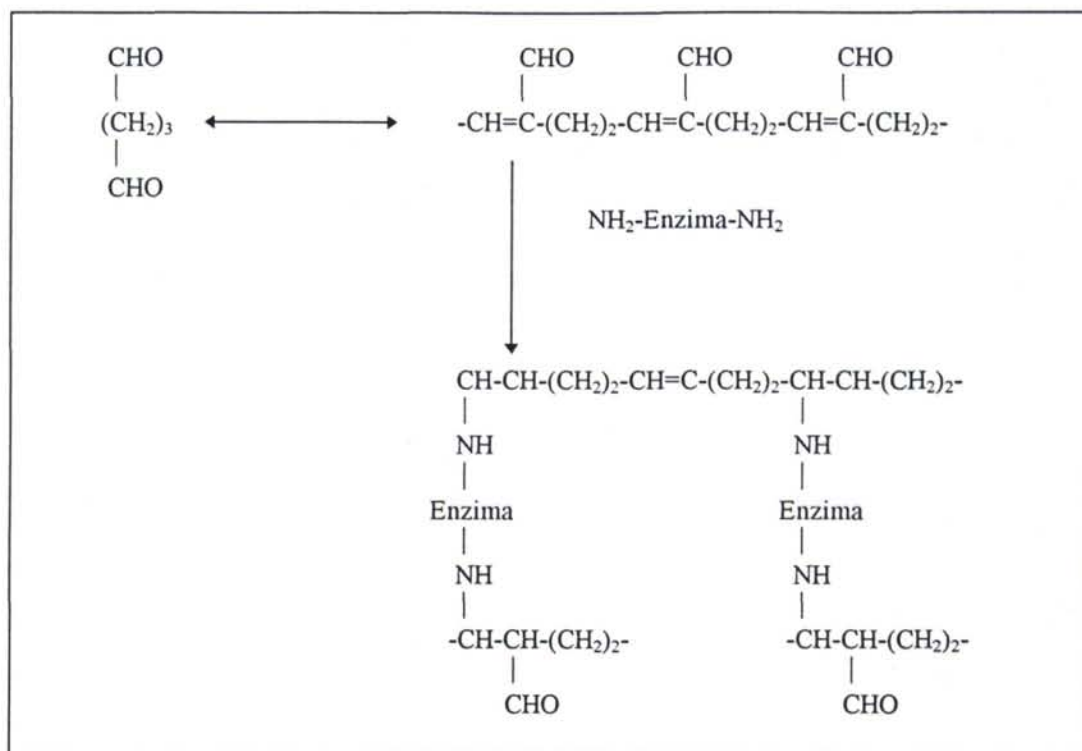


Fig. 2.11. Reacción de adición conjugada de los grupos amino del enzima a los dobles enlaces etilénicos de los oligómeros α , β -insaturados de las soluciones de glutaraldehído comercial.

Un hecho importante es que con este reactivo bifuncional normalmente se confiere mayor estabilidad al enzima inmovilizado, si bien, muchas veces este incremento se obtiene a expensas de una disminución de la actividad enzimática.

2.3.3.4. INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS SOLUBLES

Todos los métodos de inmovilización de enzimas descritos implican la modificación del enzima o de su microambiente ocasionando alteraciones de su comportamiento frente al pH y la temperatura así como en su cinética, que con frecuencia conducen a una disminución relativa de actividad frente a la del enzima libre. Para poder utilizar un enzima en estado nativo (soluble) de forma continua durante mucho tiempo, se han diseñado métodos físicos de confinado que utilizan membranas semipermeables, fibras huecas, o membranas de ultrafiltración. Los métodos utilizados pueden incluir una modificación química, aunque ésta no es esencial.

2.3.4. ENZIMAS INMOVILIZADOS EN MEDIOS EDÁFICOS

Los enzimas presentes en el suelo (implicados en importantes reacciones de los ciclos nutricionales) se encuentran bien en estado extracelular o bien asociados a células vivas proliferantes o no, a células muertas o a restos celulares. Los enzimas de la fase acuosa del suelo tienen generalmente una vida corta, porque resultan inactivados por una serie de procesos de adsorción, desnaturalización o degradación. Sin embargo, estos enzimas pueden estabilizarse y permanecer activos durante largos periodos de tiempo si se asocian a coloides húmicos (Burns, 1987a).

De hecho, enzimas extraídos del suelo se encuentran asociados a partículas húmicas (Perez Mateos *et al.*, 1987; Busto y Perez-Mateos, 1995). No obstante, y aunque se han descrito las propiedades químicas de estos complejos húmico-enzimáticos (Nannipieri *et al.*, 1988), la interacción entre los enzimas y sus soportes poliaromáticos, así como su formación y su posible función en el suelo y la rizosfera, resultan todavía desconocidos.

La materia húmica se considera un polielectrolito altamente cargado con una configuración enrollada al azar, dominado químicamente por un esqueleto fenólico muy estable (Burns, 1987b). Este polifenol puede asociarse con gran número de sustancias orgánicas naturales o xenobióticas (polisacáridos, pesticidas, enzimas), que presentan una elevada resistencia a su biodegradación a diferencia de sus contrapartidas solubles. Adicionalmente, estas sustancias húmicas pueden estabilizarse en el suelo por su fijación a arcillas.

Un análisis degradativo de los complejos húmico-enzima no ha esclarecido la naturaleza de la asociación, que no sólo preserva la estructura terciaria del enzima, sino que también la protege de agentes medioambientales (ej. temperaturas extremas, deshidratación, proteolisis). Existen dos mecanismos de actuación que permiten el estudio de la relación entre los enzimas y sus soportes poliaromáticos, y del proceso por el cual este complejo se ha originado en el suelo: (i) extraer los ácidos húmicos del suelo y estudiar

las interacciones y efectos que tienen sobre los enzimas y (ii) preparar complejos húmico-enzima sintéticos análogos a los del suelo (Sarkar y Burns, 1984).

La síntesis de estos complejos se basa en el hecho de que los compuestos fenólicos pueden servir de sustrato a enzimas como peroxidasas y lacasas para formar radicales y quinonas las cuales pueden polimerizarse a través de uniones covalentes o por adición nucleofílica (Rowell *et al.*, 1973; Ladd y Butler, 1975; Greco *et al.*, 1990). Un proceso de síntesis de estos complejos se detalla en la Fig. 2.12. Puede observarse que el método más eficaz de inmovilización es la adición del enzima cuando empiezan a condensarse las quinonas para producir el polímero polifenólico, presentándose en este punto los mejores resultados de estabilidad y actividad. Esto sugiere que el mecanismo de asociación es mediante unión covalente o por puentes de hidrógeno, más que por una simple adsorción o atrapamiento.

Adicionalmente, los copolímeros resultantes tienen propiedades físicas y químicas (análisis elemental, grupos funcionales, grado de condensación, análisis de IR, capacidad de cambio iónico, etc.) muy similares a los complejos húmico-enzimáticos que se encuentran de forma natural en el suelo (Sarkar y Burns, 1984). Además, estos complejos enzimáticos artificiales tienen una alta resistencia a la degradación proteolítica, una vez añadidos al suelo (Burns, 1987b). Por tanto, puede elevarse artificialmente una determinada actividad catalítica en el suelo, lo que permite pensar en situaciones beneficiosas para la agricultura y la descontaminación.

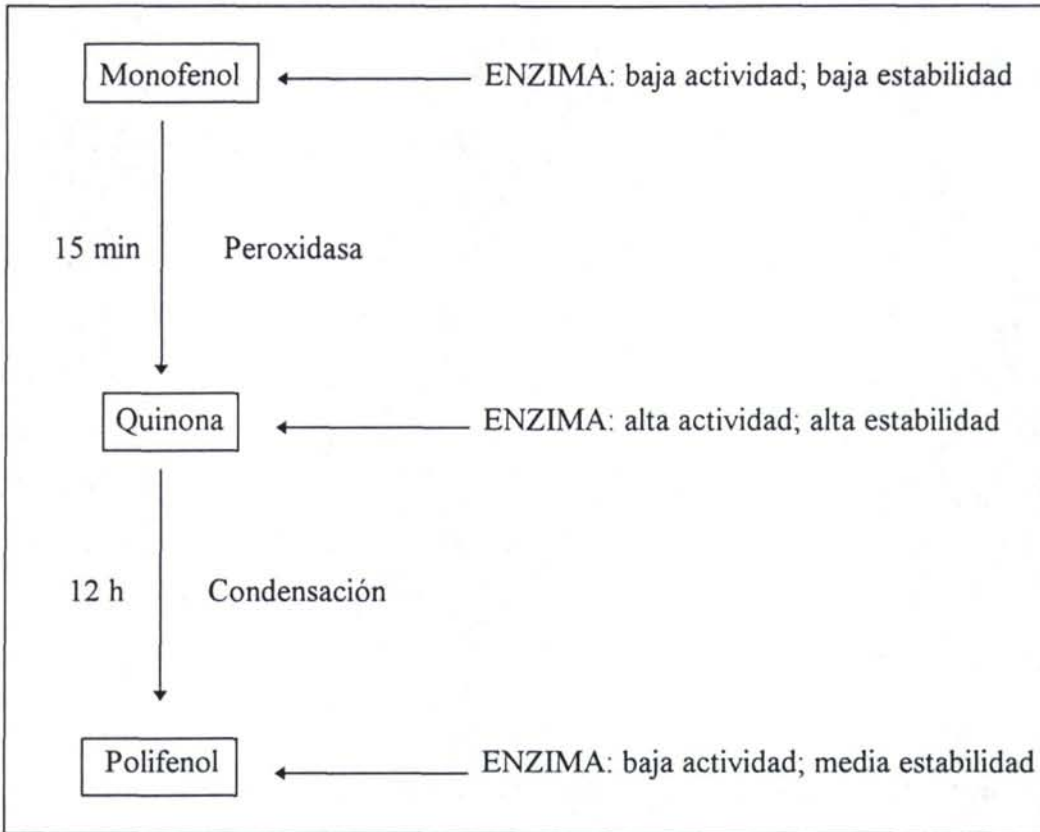


Fig. 2.12. Síntesis de complejos húmico-enzima usando monofenoles como resorcinol, tirosina y guayacol. La actividad del complejo formado es comparada con la del enzima libre y la estabilidad ensayada frente a elevadas temperaturas y proteólisis (Burns, 1987b).

2.3.5. PROPIEDADES DE LOS ENZIMAS INMOVILIZADOS

Cuando un enzima es inmovilizado en la superficie o interior de los poros de una matriz, su microambiente y por tanto sus propiedades son diferentes a las del enzima libre.

Existen dos razones por las que la inmovilización puede causar un cambio (aparente) en la características del enzima: (i) se puede modificar directamente la conformación del enzima y por tanto su función, o bien (ii) puede crearse un microambiente alrededor del enzima que sea diferente del común al resto de la fase. El microambiente facilitado por la matriz del polímero puede afectar al enzima, determinando un diferente reparto de moléculas en el microambiente del enzima y en el resto de la fase y/o restringiendo la libre difusión de moléculas hacia el interior de la matriz del polímero, o dentro ya de ella. Todos o ninguno de estos efectos (resumidos en la Fig. 2.13) pueden tener lugar en cada caso concreto.

La inmovilización puede tener efectos directos sobre las características intrínsecas de un enzima induciendo a inactivación total o parcial (causada por cambios conformacionales o reacción de algún grupo esencial en el centro activo del enzima), o a otros cambios conformacionales menores que pueden causar desestabilización, alteración de efectores alostéricos o de características cinéticas o incluso de estabilización.

El microambiente que rodea a un enzima inmovilizado (y en el que influye la matriz de polímero) puede afectar el comportamiento aparente del enzima si provoca una distribución heterogénea de solutos entre el entorno del enzima y el conjunto de la fase en la que el enzima inmovilizado se encuentra disperso. Estos efectos microambientales pueden ser fenómenos de reparto o de difusión limitada.

El **reparto desigual** de solutos es consecuencia de sus interacciones hidrofóbicas o electrostáticas con la matriz del polímero y afecta tanto a los solutos que no participan en la reacción como a los que sí lo hacen, provocando su concentración o agotamiento en las proximidades del enzima.

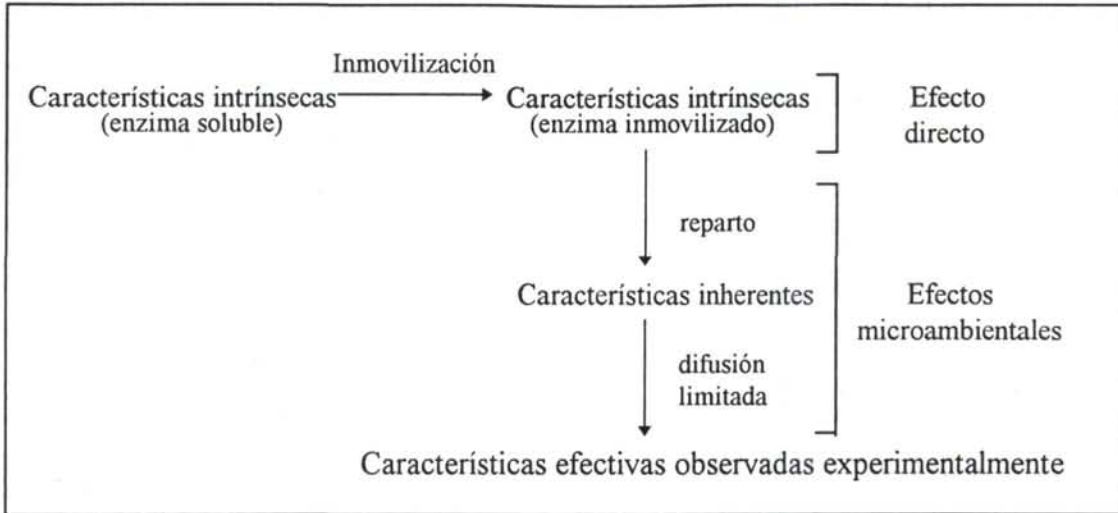


Fig. 2.13. Efecto del proceso de inmovilización sobre las características intrínsecas de los enzimas.

La **limitación de la difusión libre de moléculas de soluto**, debida a la presencia física de la matriz polimérica, determina el agotamiento de moléculas de sustrato y la acumulación de producto alrededor del enzima. La limitación impuesta a la difusión puede ser de dos tipos. Por una parte, la barrera que se opone a la difusión puede estar constituida por una capa fija de solvente (*capa de Nernst*) que rodea la partícula del enzima inmovilizado, lo que se llama limitación de la difusión externa. Alternativa o simultáneamente, la limitación a la difusión puede ocurrir dentro de la matriz del polímero - difusión interna-, y entonces, difusión y reacción concurren en la misma zona. Cuando la limitación a la difusión tiene lugar alrededor o dentro de una partícula de enzima inmovilizado que está actuando en una reacción, se llega a alcanzar un estado estacionario en el que la velocidad de la difusión de un soluto hacia dentro o hacia fuera de una determinada porción del volumen de la partícula es igual a la velocidad con la que este soluto aparece o desaparece por efecto de la reacción (Trevan, 1990).

2.3.5.1. ESTABILIDAD ENZIMÁTICA

La estabilidad de un enzima dado es una función compleja de las condiciones ambientales utilizadas. La estabilidad varía con el pH, la concentración de reactivo y la

presencia de agentes desestabilizantes. Sin embargo y de forma general la inactivación enzimática se atribuye a los efectos térmicos (Cornish-Bowden, 1979).

Es de esperar que la estabilidad de un enzima aumente debido a los efectos estabilizantes de su microambiente o disminuya cuando éste tenga efectos desnaturalizantes sobre el enzima. Para establecer, por tanto, los mecanismos que aumenten la estabilidad enzimática debe considerarse y conocerse en detalle la propia estructura conformacional de la proteína. Esta resulta de la disposición espacial tridimensional adoptada por la molécula de proteína y los resultados de las interacciones entre las cadenas de aminoácidos que se hallan alejadas unas de otras en la secuencia primaria. Cualquier compuesto cuya presencia influya en estas interacciones tendrá un efecto sobre la estabilidad.

Las principales formas de interacción comprenden puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y enlaces iónicos. Los factores que afectan a estas interacciones incluyen disolventes orgánicos, pH extremos, detergentes, y altas concentraciones de sales.

Además de los mecanismos arriba mencionados, la formación de puentes disulfuro entre dos residuos de cisteína resulta de gran importancia en muchos enzimas extracelulares. Este enlace covalente puede ser crítico para la actividad enzimática, y por consiguiente, la protección de este enlace de la reducción puede incrementar significativamente la vida media de algunos enzimas. Por lo contrario, muchos enzimas intracelulares necesitan la presencia de grupos sulfhidrilo reducidos, por lo que será necesario su protección frente a la oxidación (Gacesa y Hubble, 1990)

Se ha observado y comprobado que los procesos de inmovilización producen cambios en la estabilidad de los enzimas. Así por ejemplo, la inmovilización de enzimas proteolíticos podría reducir la capacidad del enzima para producir su propia inactivación a través de la autodigestión, ya que se aislarían las moléculas de enzima impidiendo su mutuo ataque. Se ha indicado que en un cierto número de sistemas, las proteasas inmovilizadas pueden almacenarse a 4°C durante varios meses sin pérdidas significativas de actividad (Goldman *et al.*, 1974). La estabilidad de muchos enzimas inmovilizados puede mejorarse utilizando soportes inorgánicos (como el vidrio o materiales cerámicos) en vez de polímeros orgánicos, debido a la mayor estabilidad dimensional de este tipo de sopor-

tes (Messing, 1974). La estabilidad frente a agentes desnaturizantes también puede cambiar en la inmovilización, habiéndose indicado la existencia de un cierto número de casos en los que aumenta tras el proceso inmovilizador.

2.3.5.1.1. ESTABILIDAD OPERACIONAL

La estabilidad operacional de un enzima inmovilizado depende de su naturaleza intrínseca, de las condiciones en las que se ha inmovilizado, del tipo de reactor en el que se utiliza y de las condiciones de reacción empleadas. Los factores que estabilizan o inactivan los enzimas no se conocen sistemáticamente, ya que los enzimas individuales varían mucho en su estabilidad: por ejemplo, los enzimas derivados de organismos termofílicos pueden ser excepcionalmente estables y no solamente al calor, sino también a otros agentes desnaturizantes.

La pérdida de afinidad debida a la presencia de un inhibidor debe diferenciarse de la pérdida de actividad motivada por la desnaturización del enzima, por ejemplo por calor. En la práctica, pueden existir simultáneamente distintos efectos, de forma que la importancia relativa de cada uno (como la oxidación o la degradación proteolítica) depende de cada sistema concreto.

La inmovilización de un enzima puede influir en la estabilidad operacional, observándose experimentalmente tanto incrementos como descensos de dicha estabilidad. Por ejemplo, las proteasas son más resistentes a la autodigestión cuando se usan en forma inmovilizada, puesto que el enlace covalente con el soporte puede estabilizar la estructura terciaria del enzima por las modificaciones covalentes existentes, y los enzimas se estabilizan frecuentemente por la inmovilización simplemente porque también se concentran por esta operación, ya que la mayoría de los enzimas son más estables cuando se mantienen en presencia de una concentración local de proteína elevada.

La desnaturización del enzima puede considerarse como un caso especial de inhibición enzimática, y los efectos difusionales incrementan la actividad aparente de la célula inmovilizada por un mecanismo similar al efecto descrito primeramente por Ollis (1972) para enzimas inmovilizados. La desnaturización tiene lugar en dos etapas, que consisten primeramente en un desenrollamiento reversible de la molécula seguido por

una modificación o agregación química irreversible, que da lugar a una disminución de la solubilidad de la actividad catalítica de la molécula. Se puede calcular directamente la proporción de centros activos del enzima modificados (y por tanto activos catalíticamente) mediante métodos de valoración de centros activos por fluorescencia «in situ».

Algunos informes acerca del aumento de la estabilidad operacional de los enzimas inmovilizados pueden ser, sin embargo, artefactos, debido a las restricciones difusionales, que hacen que sólo una parte de todo el enzima inmovilizado sea activo al comienzo de su uso, quedando otra parte de dicha actividad en reserva como actividad “fresca”, y que sólo se va manifestando a medida que la actividad que presenta inicialmente el enzima se desnaturaliza (Fig. 2.14). Por tanto, sólo se observa una pérdida de actividad después de un período de tiempo suficiente en el que se pierde la actividad enzimática tamponante. En ausencia de restricciones difusionales, la actividad decae exponencialmente con el tiempo, mientras que cuando existen estas limitaciones, la actividad decae linealmente.

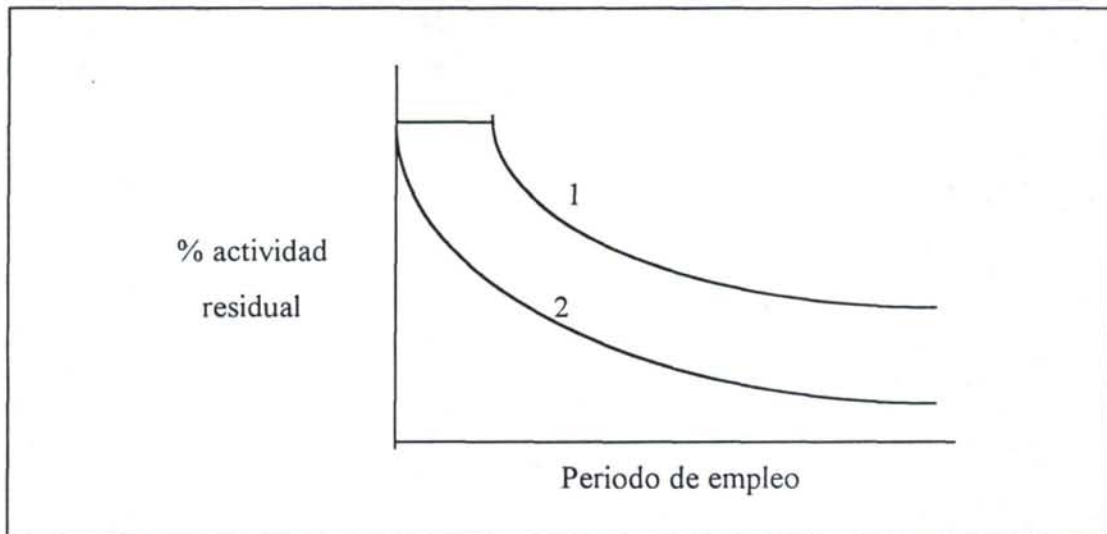


Fig. 2.14. Representación de la estabilidad operacional de preparaciones de enzima inmovilizado (1) y libre (2) (soluble) con el tiempo. La preparación inmovilizada frecuentemente más estable que la del enzima soluble y además existe un período durante el cual no parece existir pérdida de la actividad enzimática (Wiseman, 1983).

Tanto la actividad inicial del enzima inmovilizado como la estabilidad influyen directamente en el éxito final de su aplicación industrial. Preparaciones con elevada actividad y, comparativamente, baja estabilidad pueden tolerarse cuando los soportes son baratos y abundantes y, por tanto, pueden ser fácilmente descartados después de haber sido

usados durante periodos cortos de tiempo, o cuando se regeneran fácilmente. Los enzimas inmovilizados muy estables son, obviamente, el estado ideal cuando el enzima y/o soporte es caro y no se puede regenerar, de forma que el operador no está dispuesto a descartarlos después de un corto periodo de operación.

Existen buenos ejemplos que demuestran que la inmovilización incrementa la estabilidad operacional, particularmente cuando se utilizan células inmovilizadas y/o geles como soportes. Hay varios factores que influyen en la estabilidad de los enzimas y células inmovilizadas. Los desnaturalizantes obvios incluyen el calor, los metales pesados y los materiales que rompen la estructura terciaria de los enzimas. Estos factores pueden actuar directa o indirectamente. Los factores directos incluyen la modificación química del enzima, como por ejemplo las proteasas inmovilizadas que pueden estabilizarse mediante acilación (Maneepum y Klibanov, 1982). Para mantener la correcta conformación del enzima es importante la oxidación espontánea de los aminoácidos esenciales, especialmente en el caso de aquellos aminoácidos activos catalíticamente, por lo que los medios relativamente anaerobios de muchas matrices de inmovilización pueden ser beneficiosos. Un segundo efecto es el ataque por proteasas (secretadas por microorganismos contaminantes) que, en el caso de células inmovilizadas, pueden tener un origen endógeno, por lo que es importante minimizar la contaminación microbiana. Otros factores incluyen el mantenimiento de un medio ambiente con baja actividad de agua por utilización de altas concentraciones de reactantes. También hay otros ejemplos bien documentados en los que la estabilidad enzimática se ha mejorado uniendo el enzima a un soporte mediante enlaces múltiples, de forma que el grado de estabilización alcanzado en la estructura del enzima aumenta con el número de uniones de enlaces enzima-soporte (Cheethan, 1991).

Los efectos indirectos incluyen la obturación de las preparaciones inmovilizadas de forma que la actividad enzimática se pierde porque las moléculas de sustrato no pueden acceder físicamente al enzima, como por ejemplo, el bloqueo por sólidos de los poros de un enzima inmovilizado en una matriz. Algunos reactantes estabilizan el enzima, siendo bien conocido el fenómeno de la estabilización de los enzimas por sus sustratos, debido a que el complejo enzima-sustrato es más estable que el enzima libre (Cheethan, 1991).

En investigación los principales problemas que se plantean son el tiempo y los recursos necesarios para realizar los análisis de estabilidad, sobre todo cuando el enzima o las células inmovilizadas ya han demostrado tener una buena estabilidad en operaciones a gran escala. A veces, se ha recurrido a «análisis acelerado de estabilidad», que consiste en hacer operar deliberadamente al reactor a una temperatura por encima de la que se espera usar en la práctica. De esta forma, los factores que influyen en la velocidad con la que la preparación del enzima inmovilizado pierde actividad se observan con anterioridad. Otra dificultad adicional es que el límite de estabilidad posible para cualquier preparación enzimática se desconoce durante el experimento, de forma que para cualquier tiempo dado no se sabe si se ha alcanzado el 1% o el 99% de la máxima longevidad posible.

2.3.5.1.2. ESTABILIDAD TÉRMICA

La actividad catalítica de los enzimas se incrementa cuando se eleva la temperatura. Sin embargo, los enzimas son proteínas generalmente inestables al calor, de manera que habitualmente las reacciones enzimáticas no pueden llevarse a cabo a temperaturas altas. Esta estabilidad térmica puede verse incrementada mediante la inmovilización, que, de esta forma, amplía la utilización potencial de estos biocatalizadores.

Se ha estudiado la estabilidad térmica de muchos enzimas y se ha observado que la inmovilización puede producir incrementos o descensos o no influir en la estabilidad frente a la temperatura de los distintos enzimas (Chibata, 1978).

2.3.5.1.3. ESTABILIDAD AL ALMACENAMIENTO

La estabilidad de los enzimas durante el almacenamiento es otro factor importante a considerar. Un amplio estudio de diferentes enzimas inmovilizados sobre distintos soportes indicaba que este proceso puede afectar positiva o negativamente la estabilidad durante el periodo de almacenamiento (Chibata, 1978).

2.3.5.2. PROPIEDADES CINÉTICAS

En la inmovilización de un enzima, su actividad específica disminuye frecuentemente debido a la desnaturalización causada por el procedimiento de inmovilización. Sin embargo, una vez inmovilizado el enzima está bajo la influencia del microambiente del soporte que puede ser netamente distinto al existente en la solución libre. El microambiente puede ser resultado de las propiedades físicas y químicas de la matriz soporte o deberse a las interacciones de la matriz con las moléculas de sustrato o producto implicadas en la reacción enzimática.

Se ha demostrado la existencia de cambios en el pH óptimo de un enzima producidos por la inmovilización. La comparación, a varios valores de pH, de la actividad de un enzima unido a una matriz con la actividad de su contrapartida libre ha puesto en evidencia que si el enzima está unido a una matriz cargada negativamente, el pH óptimo evoluciona hacia la alcalinidad, es decir, el enzima inmovilizado alcanza la actividad máxima a un pH aparentemente más alto. Este efecto se debe a que los grupos de la matriz cargados negativamente atraen una delgada película de iones hidrógeno positivos, creando de este modo un microambiente para el enzima unido con una mayor concentración de iones hidrógeno (menor pH) que la concentración en la solución donde se está midiendo el pH (Katchalski *et al.*, 1971). De forma similar, para una matriz cargada positivamente el cambio aparente del pH óptimo es hacia el lado ácido, pero a fuerzas iónicas altas este efecto desaparece.

La constante aparente de Michaelis disminuye más de un orden de magnitud cuando se utiliza un sustrato de carga opuesta a la del soporte. Nuevamente, esto sólo sucede a fuerza iónica baja. Ambos efectos pueden estudiarse matemáticamente incluyendo la distribución de carga de Maxwell-Boltzmann en el tratamiento del potencial electrostático y de las ecuaciones de Michaelis-Menten respectivamente.

La difusión del sustrato desde el seno de la solución al microambiente de un enzima inmovilizado puede ser un factor importante en la limitación de la velocidad de reacción. Puede suponerse la existencia de una película de difusión (Lilly *et al.*, 1968) que cubre la superficie del enzima inmovilizado, dentro de la cual la concentración de sustrato es menor que en la solución. La velocidad a la que el sustrato pasa al enzima

inmovilizado está relacionada con el espesor de la película de difusión, que a su vez determina la concentración del sustrato en las proximidades del enzima y por tanto la velocidad de reacción. El efecto de este control por la difusión es que la velocidad de reacción varía con la velocidad de agitación, o la velocidad de flujo de la solución de sustrato en el caso de un lecho de relleno. El efecto del peso molecular del sustrato puede ser muy pronunciado, ya que las moléculas grandes difunden a velocidades menores y están más sujetas a interacciones estéricas con la matriz. Se ha demostrado que la actividad relativa de los enzimas inmovilizados sobre los sustratos de peso molecular elevado es menor que sobre los sustratos de peso molecular bajo. En algunos casos, este control por la difusión puede ser ventajoso frente a las moléculas grandes de inhibidor presentes en una mezcla de reacción que no podían afectar al enzima inmovilizado. Los efectos de difusión también pueden influir en el microambiente cuando se produzcan en la reacción especies cargadas, provocando un cambio en el pH del microambiente y alteración de los perfiles pH-actividad.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. INDUCCIÓN DE ENZIMAS CELULOLÍTICOS

La optimización de la producción de enzimas a partir de microorganismos depende de una serie de factores interrelacionados. Ello significa, en términos prácticos, que un enzima sólo puede sintetizarse durante parte del ciclo de crecimiento. Una complicación adicional está en el hecho de que un enzima determinado sólo se produce cuando el microorganismo está creciendo en un medio cuya composición sea adecuada.

Esencialmente existen dos clases identificables de enzimas:

- a) *Constitutivos*: en proporción minoritaria con respecto al total. Sin embargo se trata de enzimas que están implicados, en general en aspectos centrales del metabolismo. Se producen continuamente, al margen de la presencia o no de sustrato.
- b) *Inductivas*: grupo mucho más amplio que el anterior. Estos enzimas se sintetizan en proporciones muy bajas, hasta que un sustrato adecuado pasa a estar disponible por el organismo, entonces, dicho sustrato o un producto derivado de su degradación induce un gran incremento de la síntesis.

Los enzimas celulolíticos pertenecen a este último grupo de enzimas. No obstante, las características del inductor natural no se conocen en su totalidad aunque se ha demostrado que celulosa, celobiosa, sefariosa y lactosa, entre otros carbohidratos, son buenos inductores del complejo celulolítico.

3.1.1. CULTIVO DE MICROORGANISMOS CELULOLÍTICOS

Los enzimas celulolíticos utilizados en el presente trabajo de investigación, se obtuvieron a partir de inóculos de los hongos *Aspergillus niger* y *Trichoderma reesei* procedentes de la Colección Española de Cultivos Tipo. Dichos microorganismos se desarrollaron en los medios y condiciones de cultivo que se detallan a continuación.

3.1.1.1. CULTIVO DE *ASPERGILLUS NIGER*

3.1.1.1.1. CULTIVO EN MEDIO LÍQUIDO

El medio de sales utilizado para el cultivo en medio líquido de *A. niger* estaba compuesto por las siguientes sales (Wollum II, 1982):

- NaNO ₃	0,50 g l ⁻¹
- K ₂ HPO ₄	1,00 g l ⁻¹
- MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,50 g l ⁻¹
- FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g l ⁻¹

El medio de cultivo se preparaba mezclando en agua destilada los compuestos anteriores en las cantidades indicadas, ajustando el pH a 7 con HCl 0,1 M y llevando el volumen final a 1 l.

En matraces erlenmeyers de 250 ml se adicionaban 100 ml del medio de cultivo en el que se disolvían 0,2 g de peptona. Los matraces se tapaban con algodón hidrófobo y se autoclavaban durante 20 minutos a 121°C. Posteriormente, se dejaban enfriar aproximadamente a 50°C, y se añadían 0,4 g de celobiosa (Calidad Sigma) como única fuente de carbono. Disuelto el inductor, se inoculaba cada uno de los matraces, con 5 ml de suspensión de esporas de *A. niger*, y se sometían a incubación estática a 30°C durante 7 días.

3.1.1.1.2. CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO

Se utilizaron tubos de agar inclinado con un medio de agar Czapek-Dox:

- Sacarosa 30,00 g l⁻¹
- NaNO₃ 3,00 g l⁻¹
- MgSO₄ 0,50 g l⁻¹
- MgCl₂ 0,50 g l⁻¹
- FeSO₄ 0,01 g l⁻¹
- K₂HPO₄ 1,00 g l⁻¹
- Agar-agar (Calidad Sigma) 13 g l⁻¹

Se preparaba el medio mineral disolviendo los compuestos referidos (excepto el agar-agar) en 1 l de agua destilada. En cada tubo de ensayo se pesaba 0,104 g de agar-agar, donde se añadían 8 ml del medio salino. Una vez tapados los tubos con algodón hidrófobo, se disolvía el agar en un baño de agua caliente. Disuelto el agente solidificante se esterilizaban en autoclave a 121°C durante 20 minutos. A continuación, se dejaban enfriar en posición inclinada hasta que el agar Czapek-Dox estaba completamente solidificado.

Los tubos de agar inclinado se inoculaban con un asa de siembra a partir de una suspensión de esporas de *A. niger*. Una vez inoculadas las muestras se introducían en un incubador de humedad controlada a 30°C durante 7 días.

3.1.1.2. CULTIVO DE *TRICHODERMA REESEI*

3.1.1.2.1. CULTIVO EN MEDIO LÍQUIDO.

En el desarrollo del hongo celulolítico *T. reesei* se utilizó el medio auxiliar Czapek-Dox. Para ello, se disolvían los compuestos indicados a continuación en 1 l de agua destilada y se ajustaba el pH final de la solución a 5,0 con HCl 0,1 M:

- Sacarosa 30,0 g l⁻¹
- NaNO₃ 3,0 g l⁻¹
- MgSO₄ 0,5 g l⁻¹

- MgCl ₂	0,5 g l ⁻¹
- FeSO ₄	0,01 g l ⁻¹
- K ₂ HPO ₄	1,0 g l ⁻¹

A 50 ml del medio mineral, previamente esterilizado, se adicionaba un inóculo de *T. reesei*, procedente de un tubo de agar inclinado (agar-glucosa-patata). Los cultivos se desarrollaban durante 7 días a 28°C bajo agitación orbital de 150 rpm.

Para la inducción y, por consiguiente, producción masiva de los enzimas celulolíticos, se utilizaba un medio mineral diferente al anterior que constaba de las siguientes sales: 1,4 g de sulfato amónico [(NH₄)₂SO₄]; 2,0 g de dihidrogenofosfato potásico (KH₂PO₄); 0,3 g de cloruro de calcio (CaCl₂); 0,3 g de urea; 0,6 g de sulfato magnésico heptahidratado (MgSO₄·7H₂O); 0,0098 g de sulfato ferroso heptahidratado (FeSO₄·7H₂O); 1,49 g de sulfato de manganeso (MnSO₄); 0,00174 g de sulfato de cinc heptahidratado (ZnSO₄·7H₂O); y 0,75 g de peptona (Calidad Sigma) en un volumen final de 1 l.

El medio era esterilizado en autoclave (121°C) durante 20 minutos y, una vez enfriado a temperatura ambiente, se le adicionaba celulosa MN-300 (Calidad Sigma) al 0,4% como fuente de carbono e inductor de la síntesis enzimática. Posteriormente, se inoculaban 100 ml del medio de cultivo con 10 ml de caldo de *T. reesei* obtenido con el medio auxiliar Czapek-Dox. La mezcla se mantenía a 28°C, bajo agitación orbital (150 rpm), durante 7 días.

3.1.1.2.2. CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO

Se utilizaron tubos de agar inclinado, empleando agar-patata-glucosa como medio de cultivo. Este medio consistía en una mezcla de los siguientes productos y en las concentraciones indicadas:

- Infusión de patata	40 g l ⁻¹
- D-glucosa	20 g l ⁻¹
- Agar-agar	15 g l ⁻¹

Los tubos se preparaban según se indica en el aptdo. 3.1.1.1.2. Posteriormente, se inoculaban con *T. reesei* y se incubaban en estufa, con humedad controlada, a 28°C durante 14 días.

3.1.2. AISLAMIENTO ENZIMÁTICO

3.1.2.1. EXTRACCIÓN DE β -GLUCOSIDASA DE *A. NIGER*

Se utilizó β -glucosidasa exocelular procedente del hongo celulolítico *A. niger*. Para la separación del micelio del medio exocelular, se filtraban 100 ml del cultivo microbiano a través de filtros de 0,45 μ m. El extracto se purificaba parcialmente y se concentraba mediante ultrafiltración y diálisis frente a tampón fosfato a pH 5,4, a través de membranas de 100.000 NMWL y 10.000 NMWL respectivamente, utilizando un sistema de filtración tangencial Minitan® de Millipore. Las muestras obtenidas se congelaban, liofilizaban y almacenaban a -18°C hasta su utilización.

3.1.2.2. EXTRACCIÓN DE CELULASAS DE *T. REESEI*

Las celulasas utilizadas en el presente trabajo se obtuvieron a partir de cultivos de *T. reesei* utilizando como inductor de la síntesis microbiana celulosa MN-300. El proceso de aislamiento implicaba filtrar el cultivo fúngico a través de membranas de 0,45 μ m para separar el micelio del medio extracelular. El extracto enzimático filtrado se dializaba a través de membranas de 10.000 NMWL, frente a tampón acetato a pH 5, utilizando el sistema de filtración tangencial Minitan® de Millipore. Posteriormente, el extracto se congelaba, liofilizaba y almacenaba a -18°C hasta su posterior utilización.



3.2. TÉCNICAS DE INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

3.2.1. INMOVILIZACIÓN EN GELES DE ALGINATO DE CALCIO

El alginato es un polisacárido estructural muy abundante en algas marinas. Contiene unidades de β -D-manopiranosil y α -gulopiranosil uronato en una secuencia regular de enlaces (1-4). Este polisacárido en presencia de cationes monovalentes forma soluciones viscosas incluso a bajas concentraciones. Sin embargo, en presencia de cationes divalentes (generalmente calcio) da lugar a la formación de geles.

Hay que destacar que la estructura de los geles de alginato, puede destruirse por la presencia de agentes quelantes (como fosfatos y citratos), debido a la formación de complejos con el calcio. Por lo tanto, cuando se evaluaba la actividad β -glucosidasa inmovilizada en geles de alginato de calcio, era necesario cambiar el tampón fosfato a pH 5,4, empleado habitualmente como medio de incubación para este enzima, por tampón tris-maleico al mismo valor de pH.

3.2.1.1. REACTIVOS

- R.1. *Alginato de sodio al 1, 2 y 3%*: Pesar 1, 2 y 3 g, respectivamente, de alginato de sodio y adicionarlos lentamente sobre 80 ml de agua destilada. Una vez disueltos enrasar el volumen a 100 ml.
- R.2. *CaCl₂ 0,05; 0,10 y 0,20 M*: Disolver 5,55; 11,10 y 22,20 g, respectivamente, de cloruro de calcio, en 1 l de agua.
- R.3. *CaCl₂ 0,03 M*: disolver 3,33 g de cloruro de calcio en 1 l de agua destilada.

3.2.1.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

La inmovilización en alginato de calcio se realizaba mezclando 5 ml de solución enzimática con 10 ml de alginato de sodio (R.1). Esta mezcla se extruía gota a gota me-

diante una bomba peristáltica (7 ml min^{-1}) sobre 25 ml de CaCl_2 (R.2) que se encontraban bajo agitación magnética moderada. A medida que las gotas caían sobre la solución de calcio se formaban las perlas de gel que se mantenían en agitación durante diferentes tiempos (30, 60, 120 y 240 min). Las perlas obtenidas, para cada uno de los tiempos aplicados se lavaban repetidas veces con 12,5 ml de CaCl_2 0,03 M (R.3), hasta actividad enzimática nula de las aguas de lavado. Para evaluar la actividad β -glucosidasa se distribuía 1/5 del peso total de las perlas en cada bote de incubación (equivalente a 1 ml de enzima libre), y se determinaba la actividad enzimática según se indica en el aptdo. 3.3.1.

3.2.2. INMOVILIZACIÓN EN GELES DE POLIACRILAMIDA

La poliacrilamida es una de las matrices más utilizadas para el atrapamiento de enzimas, fundamentalmente por su especial característica de ser un soporte no iónico. En este proceso de inmovilización el enzima queda atrapado en el interior de los espacios intersticiales formados por el polímero insoluble en agua.

La inmovilización enzimática se lleva a cabo por copolimerización de acrilamida (en solución acuosa), en presencia del enzima, utilizando N,N-metilenbisacrilamida (BIS) como agente de unión. La reacción se iniciaba con una solución de persulfato amónico y se aplicaba como catalizador de la misma N,N,N',N'-tetraetiletilendiamina (TEMED).

3.2.2.1. REACTIVOS

- R.1. *Acrilamida al 5, 10, 15, 20 y 25% (p/v) /BIS al 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 y 2,0% (p/v)*: Se pesaban las cantidades adecuadas correspondientes a la concentración de cada uno de los monómeros, se disolvían en agua destilada y se enrasaba el volumen a 100 ml.
- R.2. *(NH₄)₂S₂O₈ al 2,5% (p/v)*: Se disolvían 0,25 g de persulfato amónico en agua destilada enrasando el volumen a 10 ml.
- R.3. *Diamina de N,N,N',N'-tetraetiletilendiamina (TEMED) al 0,5% ($\rho = 0,77 \text{ g ml}^{-1}$)*: 0,65 ml de TEMED se llevaban a un volumen final de 10 ml con agua destilada.
- R.4. *Tampón fosfato de Sorensen (Na₂HPO₄/KH₂PO₄) a pH 5,4*: Se disolvían 9,080 g de KH₂PO₄ en 1 l de agua destilada (sol. A). Por otra parte, se disolvían 9,477 g de Na₂HPO₄ en 1 l de agua destilada (sol. B). Para ajustar el pH de la solución tampón a un valor de 5,4 se mezclaban las soluciones anteriores en la siguiente proporción:

967 ml de sol. A + 33 ml de sol. B

3.2.2.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Esta técnica de inmovilización suponía mezclar 3 ml de la solución de acrilamida / BIS (R.1) con 1 ml de tampón fosfato (R.4) en el que previamente se habían disuelto 50 mg de enzima. Posteriormente se adicionaban 0,5 ml de persulfato amónico (R.2) y 0,5 ml del catalizador TEMED (R.3). Teniendo en cuenta que la reacción es exotérmica, y que temperaturas elevadas afectan a la proteína enzimática, el proceso se realizaba en baño de hielo.

Finalizada la polimerización (el tiempo variaba dependiendo de las concentraciones de monómero utilizadas) se procedía a la homogeneización del gel. Para ello se adicionaban al gel 25 ml de tampón fosfato a pH 5,4 y se sometía a la acción de un homogeneizador Ultra Turrax T25 durante 1 minuto a 9500 rpm. Durante todo el procedimiento las muestras se mantenían en un baño de hielo. La mezcla se separaba por filtración y el gel obtenido se lavaba varias veces con 10 ml de tampón fosfato hasta que en las aguas de lavado no se detectaba actividad enzimática.

Hay que señalar que es necesario tomar todo tipo de precauciones en la manipulación de las mezclas acrilamida /BIS pues los monómeros son sustancias altamente neurotóxicas.

3.2.3. INMOVILIZACIÓN POR ASOCIACIÓN A HUMATOS EDÁFICOS

La inmovilización por humatos edáficos suponía la estabilización del enzima por formación de enlaces débiles (iónicos, polares o hidrofóbicos) entre radicales aminoácido y los grupos hidroxilo y/o carbonilo abundantes en el material húmico. Además, el contacto se prolongó el tiempo suficiente para facilitar también la formación de enlaces covalentes.

3.2.3.1. REACTIVOS

R.1. $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$ 0,01 M: Se disolvían 4,461 g de pirofosfato de sodio decahidratado en 800 ml de agua, ajustando el pH a 12,5 con NaOH 0,5 M. El volumen final se llevaba a 1 l enrasando con agua destilada.

3.2.3.2. EXTRACCIÓN DE HUMATOS EDÁFICOS

Muestras de 20 g de un suelo Ocre húmifero de montaña (ver aptdo. 3.4.2.3.1) se colocaban en un bote de polietileno de 250 ml junto con 100 ml de pirofosfato tetrasódico 0,01 M a pH 12,5 (R.1). El pH final de la mezcla, pH de extracción, se ajustaba a un valor de 7,5 con HCl 0,1 M. La suspensión se sometía a agitación vertical (1,05 x g) durante 18 horas. Transcurrido este tiempo la mezcla se centrifugaba a 21.000 x g durante 20 minutos a 4°C, y se filtraba el sobrenadante a vacío a través de papel Whatman nº 6. El residuo sólido se despreciaba y el sobrenadante se congelaba y liofilizaba. El liofilizado obtenido se almacenaba a -18°C hasta su utilización para la inmovilización enzimática.

3.2.3.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

En este trabajo se estudió el efecto de la concentración de ácidos húmicos sobre el proceso de inmovilización. Para ello, se prepararon 4 disoluciones de ácidos húmicos de concentraciones 1, 2, 4 y 10 mg humatos ml⁻¹.

El protocolo de inmovilización consistía en mezclar en un bote de polietileno de 25 ml, 3 ml de solución de ácidos húmicos con 3 ml de solución enzimática (2 mg enzima ml⁻¹) y 4 ml de tampón fosfato a pH 5,4. Las proporciones humatos/enzima estudiadas fueron: 1/2; 1/1; 2/1 y 5/1 (p/p). Las mezclas se sometían a agitación orbital (150 rpm) a diferentes temperaturas (4, 30 y 45°C) y tiempos de agitación (15, 60, 120 y 240 min).

Paralelamente, y por separado se aplicaba el mismo tratamiento a una muestra de enzima libre y de extracto húmico. Para ello, se mezclaban 3 ml de solución de humatos, o de enzima, con 7 ml de tampón fosfato.

Se ensayaba la actividad β -glucosidasa del enzima inmovilizado, del enzima libre y de las soluciones de humatos para cada temperatura y tiempo de inmovilización.

3.2.4. INMOVILIZACIÓN CON HUMATOS POR ENTRECRUZAMIENTO A TRAVÉS DE GLUTARALDEHÍDO

De forma complementaria a la experiencia anterior se estudió el efecto de un agente bifuncional (glutaraldehído) en el grado de inmovilización. El glutaraldehído posibilita la formación de enlaces cruzados entre grupos amino del material húmico y de la proteína enzimática.

La inmovilización se llevaba a cabo mezclando 4 ml del reactivo bifuncional al 2,50; 6,25 ó 12,50%, con 3 ml de extracto húmico y 3 ml de solución de enzima. De esta forma, se conseguían unas concentraciones finales de glutaraldehído durante el proceso de inmovilización del 1,0; 2,5 y 5,0%, respectivamente. La mezcla se sometía a agitación orbital (150 rpm) a diferentes temperaturas (4, 30 y 45°C) y tiempos de agitación (15, 60, 120 y 240 min).

3.2.5. INMOVILIZACIÓN POR COPOLIMERIZACIÓN FENÓLICA

En este trabajo se planteó la síntesis de copolímeros de β -glucosidasa-resorcinol análogos a los complejos humato-enzima del suelo, como un método de estabilización de enzimas.

3.2.5.1. REACTIVOS

- R.1. H_2O_2 al 0,5%: 1,67 ml de peróxido de hidrógeno al 30% se llevaban a 100 ml con agua destilada.
- R.2. Resorcinol $11,2 \text{ mg ml}^{-1}$: se disolvían 1,120 g de resorcinol en 100 ml de tampón fosfato a pH 5,4.
- R.3. Peroxidasa 1 mg ml^{-1} : disolver 10 mg de peroxidasa calidad Böehringer Mannheim ($228,8 \text{ U mg}^{-1}$) en 10 ml de tampón fosfato a pH 5,4.

3.2.5.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

La técnica utilizada fue descrita por Sarkar y Burns (1984). Consistía en adicionar a la misma velocidad ($1,7 \text{ ml min}^{-1}$), con ayuda de una bomba peristáltica, las soluciones de H_2O_2 (R.1) y resorcinol (R.2) sobre la solución de peroxidasa (R.3), que se mantenía en agitación. A los 5 minutos del inicio del bombeo (momento en que comenzaban a formarse las quinonas) se adicionaba, mediante una bomba peristáltica, 10 ml de extracto enzimático (5 mg ml^{-1}) a la velocidad de 1 ml h^{-1} . En todo momento, tanto la solución de peroxidasa como las soluciones enzimáticas se mantuvieron en baño de hielo. Transcurridas las 10 h, la mezcla formada se dializaba frente a agua destilada en la proporción 1:100 (v:v).

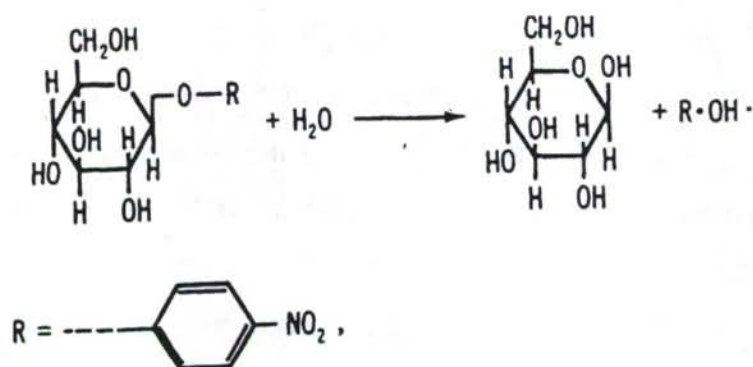
Adicionalmente, se determinó la estabilidad térmica del enzima inmovilizado (aptdo. 3.4.4.1) y la vida media del copolímero a 55 y 60°C (aptdo. 3.4.4.2).

3.3. ENSAYO DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

3.3.1. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD β -GLUCOSIDASA

El método de ensayo de la actividad β -glucosidasa ($A\beta G$) utilizado está basado en la determinación colorimétrica del p-nitrofenol (pNP) liberado por acción catalítica del enzima sobre un sustrato artificial, el p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (pNPG).

La reacción catalizada corresponde a:



3.3.1.1. REACTIVOS

R.1. *Tampón fosfato de Sorensen a pH 5,4.*

R.2. *Tampón tris-maleico a pH 5,4:* Se disolvían 24,23 g de THAM (trishidroximetilaminometano) y 23,21 g de ácido maleico en 1 l de agua destilada (sol. A). Se preparaba una solución de NaOH 0,2 N (sol. B). Para ajustar el pH de la solución tampón a pH 5,4 se mezclaban 250 ml de sol. A con 50 ml de sol. B y se diluían con agua hasta 1.

R.3. *Solución del sustrato p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (calidad Böehringer) 10 mM:* Se diluía la cantidad de sustrato necesaria en el volumen adecuado de tampón fosfato (R.1).

R.4. *CaCl₂ 0,5 M:* Se disolvían 55,495 g de CaCl₂ en 1 l de agua destilada.

R.5. *Tampón THAM 0,1 M a pH 12*: Se disolvían 12,144 g de THAM en 800 ml de agua, ajustando el pH a 12,0 con NaOH 0,5 M y enrasando el volumen a 1 l.

R.6. *Tampón THAM 0,1 M a pH 12*: Se disolvían 12,144 g de THAM en 800 ml de agua y se enrasaba a 1 l.

3.3.1.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Para el ensayo de la actividad β -glucosidasa se introdujeron algunas modificaciones al método propuesto por Hayano y Katami (1977). El procedimiento suponía mezclar 4 ml de extracto enzimático, o un volumen menor que se llevaba a 4 ml con tampón fosfato (R.1), con 1 ml de sustrato (R.3). Las muestras, preparadas por triplicado, se tapaban y agitaban para homogeneizar correctamente la distribución del sustrato, y se sometían a incubación con agitación orbital (150 rpm) a 37°C durante 1 h. Se incluían muestras control en las que el sustrato se adicionaba después de la incubación.

Transcurrido el tiempo de agitación, se añadía a cada muestra 2,5 ml de CaCl_2 (R.4) para eliminar la materia orgánica presente. Posteriormente, se adicionaban 8 ml de tampón THAM a pH 12 (R.5), para la extracción del pNP liberado y paralización de la acción del enzima, y se incluía 1 ml de sustrato en cada uno de los blancos. Se filtraba todo el conjunto para eliminar posibles sólidos que hubieran podido permanecer en suspensión. Finalmente, se medía la absorbancia directamente en el filtrado obtenido o si era necesario se realizaban diluciones de las muestras y blancos. En este último caso, se tomaban 2 ml (muestra) ó 4 ml (blancos) y se enrasaban a 50 ml con agua destilada, previa adición de 10 ml de tampón THAM a pH 10 (R.6). La absorbancia debida al color amarillo del p-nitrofenol se cuantificaba en un espectrofotómetro a 410 nm de longitud de onda. Los resultados de actividad se expresaban en μg de pNP $\text{ml}^{-1} \text{h}^{-1}$.

En el caso de inmovilización en geles de alginato de calcio no era posible la utilización de tampón fosfato debido a su interacción con el soporte de inmovilización. Por esta razón, se sustituyó por tampón tris-maleico (R.2) que no presentaba ningún problema y que además, amortiguaba en las mismas condiciones.

3.3.1.3. CURVA DE CALIBRADO

Se preparaba una solución de pNP de 50 ppm (sol. A), a partir de la cual se realizaban las siguientes diluciones:

	$\mu\text{g pNP ml}^{-1}$
0 ml de sol. A + 10 ml de THAM pH 10	0
1 ml de sol. A + 10 ml de THAM pH 10	5
2 ml de sol. A + 10 ml de THAM pH 10	10
3 ml de sol. A + 10 ml de THAM pH 10	15
4 ml de sol. A + 10 ml de THAM pH 10	20
5 ml de sol. A + 10 ml de THAM pH 10	25

Todos los matraces se enrasaban a 50 ml con agua destilada. Un ejemplo de ajuste de recta de calibrado, se detalla en la Fig. 3.1:

STD #	ABS	CONC
1	0,000	0,000
2	0,127	1,000
3	0,242	2,000
4	0,366	3,000
5	0,484	4,000
6	0,608	5,000

$$\text{CONC} = K_0 + K_1 \cdot \text{ABS}$$

$$K_0 = -0,0162$$

$$K_1 = 8,2635$$

$$r = 0,9999$$

Fig. 3.1. Curva de calibrado de pNP.

3.3.2. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD CARBOXIMETIL- CELULASA

Este enzima hidroliza las cadenas de celulosa al azar produciendo una mezcla de glucosa, celobiosa (principales productos de la reacción) y otros oligosacáridos solubles. La actividad carboximetilcelulasa (CMCasa) se determinaba a través del ensayo de azúcares reductores siguiendo el método propuesto por Somogyi-Nelson (Wood y Bhat, 1988). Tal y como se ha indicado en el apartado 3.5.3.1, la determinación de azúcares reductores producto de la hidrólisis enzimática, se realizaba en base a su capacidad para reducir el ión Cu^{2+} en medio alcalino.

3.3.2.1. REACTIVOS

Además de los reactivos R.1, R.2 y R.3 incluidos en el apartado 3.5.3.1.1 del ensayo de azúcares reductores, se utilizó:

R.4. *Carboximetilcelulosa (sal sódica) al 1%*: se disolvía 1 g de CMC en agua destilada y se diluía a 100 ml.

3.3.2.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

El procedimiento de ensayo suponía mezclar en un tubo de ensayo con tapa rosada, 1 ml de solución enzimática (o un volumen menor que se enrasaba a 1 ml con tampón acetato a pH 5) con 1 ml del sustrato (R.4). Las muestras, preparadas por triplicado, se agitaban para homogeneizar el sustrato, y se incubaban en baño de agua a 50°C durante 2 h. Se incluían 2 muestras control (blancos) en las que el sustrato se añadía después de la incubación.

Transcurrido el tiempo de incubación se determinaba la cantidad de azúcares reductores liberados según se indica en el apartado 3.5.3.1. Los resultados de actividad se expresaban en μg glucosa $\text{ml}^{-1} \text{h}^{-1}$.

3.4. CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA

3.4.1. ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS

3.4.1.1. CINÉTICA DE MICHAELIS-MENTEN

Para calcular los valores de las constantes cinéticas de Michaelis, se determinaba la velocidad de reacción enzimática a diferentes concentraciones de sustrato (pNPG): 0,5; 1; 2; 5; 8; 10 y 15 mM.

La ecuación empleada para el cálculo de las constantes cinéticas fue la de Lineweaver-Burk:

$$1/V = (K_m / V_{max}) \cdot 1/[S] + 1/V_{max} \quad 1/V = f([S])$$

en la que se relaciona la velocidad de catálisis (V) con la concentración de sustrato [S], para una concentración de enzima determinada. Las rectas obtenidas por esta representación se ajustaban mediante cálculo automático por mínimos cuadrados, permitiendo calcular las constantes K_m y V_{max} .

3.4.1.2. INFLUENCIA DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Se estudió el comportamiento del enzima β -glucosidasa libre e inmovilizado frente a variaciones del pH. Para ello, las muestras se sometían a diferentes pH del medio de incubación (2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 5,4; 6,0; 7,0 y 8,0), utilizando las siguientes soluciones tampón:

a) *Tampón citrato disódico / HCl 0,1 M:*

Solución A: citrato disódico (0,1 M) (21,01 g l⁻¹ de C₆H₈O₇·1H₂O + 200 ml de NaOH 1 N)

Solución B: HCl 0,1 N

pH = 2: 30,2 ml sol. A + 69,8 ml sol. B

pH = 3: 39,4 ml sol. A + 60,1 ml sol. B

b) *Tampón acetato 0,1 M:*

Solución A: Acetato de sodio 0,1 M (8,204 g l⁻¹ de C₃H₃O₂Na)

Solución B: Acido acético 0,1 M (6,005 g l⁻¹ de CH₃COOH)

pH = 4: 16,6 ml sol. A + 83,4 ml sol. B

pH = 5: 67,8 ml sol. A + 32,2 ml sol. B

c) *Tampón tris-maleico:*

Solución A: (24,23 g trishidroximetilaminometano + 23,21 g ácido maleico) /
litro

Solución B: NaOH 0,2 N

pH = 5,4: 25 ml sol. A + 5,0 ml sol. B + 70,0 ml H₂O

pH = 6,0: 25 ml sol. A + 12,4 ml sol. B + 62,6 ml H₂O

pH = 7,0: 25 ml sol. A + 23,7 ml sol. B + 51,3 ml H₂O

pH = 8,0: 25 ml sol. A + 33,9 ml sol. B + 41,1 ml H₂O

3.4.1.3. EFECTO DE LA TEMPERATURA DE INCUBACIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La temperatura óptima de actividad enzimática se determinó por incubación de muestras del enzima libre e inmovilizado a 30, 40, 50, 60, 70 y 90°C.

3.4.2. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD ENZIMÁTICA

3.4.2.1. ESTABILIDAD TÉRMICA DE LOS ENZIMAS

3.4.2.1.1. PRETRATAMIENTO TÉRMICO DE 1 h

En esta prueba se determinaba el comportamiento de los enzimas libre e inmovilizados, cuando se sometían a un tratamiento térmico de corta duración (1 h) con calor seco a diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60, 70 y 90°C). Finalizado el tratamiento se evaluaba en las muestras la actividad enzimática.

3.4.2.1.2. VIDA MEDIA DE LOS ENZIMAS

Para el cálculo de la vida media, enzimas libres e inmovilizados se sometían a diferentes temperaturas (55, 60 y 65°C) durante intervalos fijos de tiempo (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 h), evaluándose la actividad enzimática residual. Posteriormente, se determinaban las constantes de declive térmico para cada una de las temperaturas por medio del análisis de regresión lineal de la representación semilogarítmica del porcentaje de actividad frente al tiempo (Srivastava *et al.*, 1984).

3.4.2.2. ESTABILIDAD FRENTE A ENZIMAS PROTEOLÍTICOS

En esta experiencia se estudió la estabilidad de los enzimas frente a la acción de proteasas. Para ello, se mezclaban 0,5 ml de la solución de enzima libre con una solución tamponada (Tris-maleico pH 7,5) de pronasa liofilizada de *Streptomyces griseus* (calidad Böehringer Mannheim). La concentración final del enzima proteolítico en la mezcla correspondía a 0,5 mg ml⁻¹. Las muestras se incubaban durante distintos tiempos (0, 1, 3, 6, 8, 10 y 24 h) a 37°C. Finalmente, se evaluaba la actividad enzimática residual, habiendo ajustado previamente el pH de las muestras a 5,4 con HCl 2 M.

3.4.2.3. ESTABILIDAD DE LOS ENZIMAS ADICIONADOS AL SUELO

3.4.2.3. ESTABILIDAD OPERACIONAL EN MEDIOS EDÁFICOS

La actividad enzimática del suelo está estrechamente ligada a su fertilidad. En base a este concepto se ha tratado de controlar la actividad enzimática y microbiana del suelo, buscando aplicaciones prácticas en un mejor aprovechamiento de los fertilizantes agrícolas y la descontaminación del medio ambiente. Por consiguiente, en algunos casos sería interesante incrementar y estabilizar la actividad de algunos enzimas, cuya concentración es escasa o nula en el suelo.

3.4.2.3.1. DESCRIPCIÓN DEL SUELO

El suelo utilizado fue recogido en la provincia de Burgos y correspondía, según la clasificación francesa, a un Ocre humífero de montaña. Las muestras utilizadas pertenecían al horizonte superficial A₁₁ (0-10 cm), habiéndose tamizado a 2 mm y almacenado con humedad de campo en bolsas de plástico cerradas a 4°C.

Las características más importantes del suelo utilizado se detallan en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Características químicas y análisis textural del horizonte A₁₁ del suelo ocre humífero de montaña.

pH (agua)	C.I.C. ^a	Co (%)	C/N	CaCO ₃ (%)	Arenas (%)	Limos (%)	Arcillas (%)
4,3	16,5	5,7	14,9	0,00	17,5	48,6	13,3

^a Capacidad de intercambio catiónico en meq NH₄⁺ 100 g⁻¹ suelo

3.4.2.3.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

A muestras de 50 g de suelo se les adicionaban cantidades variables de enzima dependiendo si se aplicaba enzima en forma libre o inmovilizada. Las proporciones utilizadas fueron las siguientes:

- 0,250 ml de enzima libre / g de suelo.
- 0,840 ml de enzima inmovilizado en geles de alginato de calcio al 3% / g de suelo.
- 0,400 ml de enzima inmovilizado en geles de acrilamida/BIS (20%/1,2%) / g de suelo.
- 0,200 ml de enzima inmovilizado por ácidos húmicos a través de glutaraldehído al 1% / g de suelo. Además se incluía un control con la mezcla humatos-glutaraldehído sin enzima.
- 0,250 ml de copolímero fenólico (previamente era concentrado en rotavapor hasta reducir su volumen a la cuarta parte) / g de suelo.

Todas las muestras se realizaban por triplicado, incluyendo además muestras control con suelo sin enzima.

Tanto las muestras como los controles se incubaban en estufa con humedad controlada, a 25°C. Se tomaban muestras a intervalos de tiempo fijos (0, 1, 3, 7, 10, 16, 20, 30 y 60 días) y se determinaba la humedad y la actividad enzimática residual.

3.4.2.3.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD DE LAS MUESTRAS

Para calcular la humedad, se utilizaba el método propuesto por Nutting (1943), basado en medidas gravimétricas directas de suelo. Para ello, se pesaban 0,5 g de muestra y se introducían en estufa a 105-110°C hasta pesada constante (48 h aproximadamente). A continuación, se dejaban enfriar en un desecador y pesaban nuevamente. Por diferencia de pesos se establecía el contenido porcentual de humedad. Cada valor de humedad era el resultado promedio de tres muestras.

En cada toma de muestra se realizaba el correspondiente cálculo del contenido en humedad, ya que todos los resultados experimentales se refirieron a unidad de peso seco.

3.5. DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE LOS MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS

La biodegradación de los materiales lignocelulósicos implica dos etapas fundamentales que quedan representadas en la Fig. 3.2.

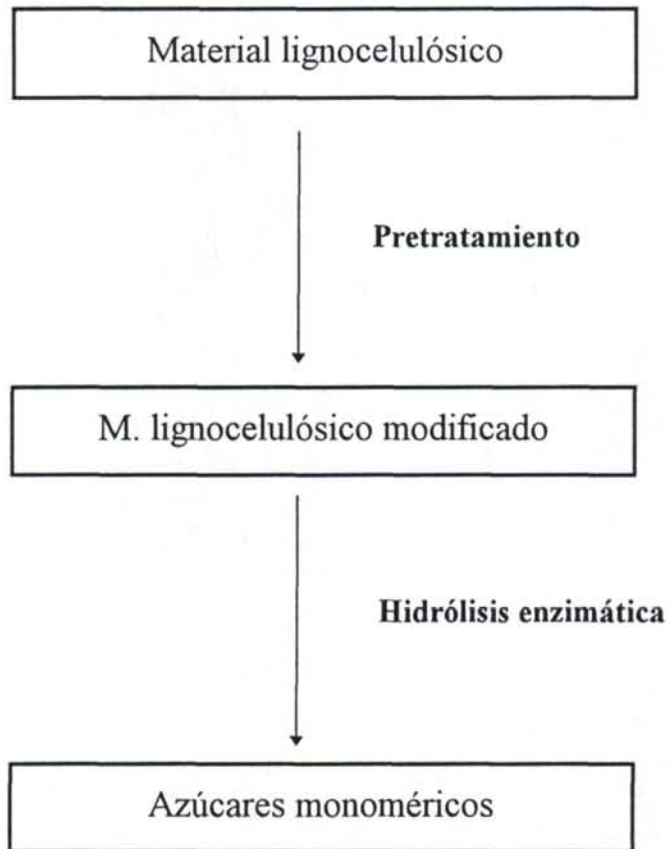


Fig. 3.2. Fases de la degradación de materiales lignocelulósicos.

3.5.1. CARACTERIZACIÓN DE LA PAJA DE CEREAL

El material lignocelulósico estudiado, fue paja de trigo de la variedad Manero, recogida en la zona de Sasamón (Burgos).

La caracterización de la paja de cereal implicaba un cálculo de la humedad, contenido en materiales solubles, lignina, hemicelulosa, celulosa y cenizas. En el análisis de los componentes químicos se siguió el método de Harper y Lynch, (1981).

Para llevar a cabo el análisis gravimétrico se troceaba la paja a un tamaño aproximado de 1 cm de longitud. Posteriormente, y con estas muestras se llevaban a cabo las siguientes experiencias:

A) Contenido de humedad: Una muestra (1 g) se secaba a 100°C durante 16 h. Por diferencia de pesada antes y después del tratamiento térmico se calculaba el % de humedad.

B) Contenido en materiales solubles en agua caliente: 1 g de paja se mezclaba con 75 ml de agua destilada y se hervía durante una hora. Tras cambiar el agua, se mantenía 1 h más en ebullición. Se secaba a 60°C durante 16 h y se pesaba. La diferencia de pesos permitía calcular el % en materiales solubles en agua caliente.

C) Contenido en lignina: El residuo anterior se mezclaba con 30 ml de H₂O destilada con 2 ml de ácido acético al 10% y 0,6 g de hipoclorito de sodio (NaClO) y se calentaba la mezcla a 75°C durante 1 h. Pasado este tiempo, se adicionaban 2 ml de ácido acético y 0,6 g de NaClO. Después de 2 h más de calentamiento las muestras se lavaban 5 veces con agua, 2 veces con acetona y 1 vez con éter. A continuación, se secaban las muestras a 105°C durante 90 min y se pesaban. La diferencia de pesos permitía calcular el % de lignina.

D) Contenido en hemicelulosa: Se añadían 20 ml de KOH (al 24 %) al residuo anterior de paja, permaneciendo la mezcla a temperatura ambiente (20°C) durante 2 h. A continuación, se lavaban las muestras sucesivamente con agua (5 veces), ácido acético al 5% (1 vez), agua (1 vez), acetona (1 vez) y éter (1 vez). Finalmente, se secaba a 105°C

durante 90 min y se pesaba. La diferencia de pesos permitía obtener el % de hemicelulosa.

E) *Contenido de celulosa*: El peso del residuo corregido por el contenido en ceniza era considerado como la cantidad de celulosa.

F) *Contenido en cenizas*: La determinación del contenido en cenizas se realizó sometiendo 1 g de paja sin tratar a una temperatura de 450°C en una estufa mufla durante 4 h. El peso del residuo permitía calcular el % de cenizas.

Todas las muestras se realizaron por triplicado, y los datos se expresaron en % con respecto a peso seco.

3.5.2. PRETRATAMIENTO DE LA PAJA DE CEREAL

La paja de trigo se sometía a 3 tratamientos previos diferentes:

- 1) Tratamiento con un peróxido alcalino (H_2O_2).
- 2) Tratamiento con butilamina.
- 3) Tratamiento con NaOH.

En todos los casos se determinaba la composición del residuo sólido resultante y se realizaba un espectro (barrido de longitudes de onda) en el U.V. de las aguas de lavado. Para realizar los espectros se diluían en cada caso las aguas de lavado en la proporción adecuada y se registraba la adsorbancia en el rango completo de longitudes de onda del ultravioleta. Además, se realizaba un espectro del reactivo utilizado en el pretratamiento.

3.5.2.1. TRATAMIENTO CON PERÓXIDO ALCALINO

3.5.2.1.1. REACTIVOS

R.1. *Agua oxigenada al 1% (v/v)*: Se diluían 3,33 ml de H_2O_2 de 110 volúmenes hasta 100 ml con agua destilada.

R.2. *NaOH 0,1 N*: Se disolvían 4 g de NaOH en 1 l de agua destilada.

3.5.2.1.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Muestras de 1 g de paja (previamente cortadas entre 1-2 cm) se mezclaban con 50 ml de H_2O_2 (R.1). A la suspensión resultante se le ajustaba el pH a 11,5 con NaOH 0,1 N (R.2) y se sometía a agitación orbital débil (100 rpm) durante 20 h (Gould, 1985).

El residuo insoluble se recogía por filtración, lavando repetidas veces con H_2O destilada hasta alcanzar un valor neutro de pH en el filtrado. Finalizada esta operación se procedía al secado de las muestras a 110°C durante 48 h hasta pesada constante (Gould,

1984). Una vez seca la paja tratada se procedía a su análisis gravimétrico para determinar su composición.

3.5.2.2. TRATAMIENTO CON BUTILAMINA

3.5.2.2.1. REACTIVOS

R.1. *Butilamina al 1% (p/p)*: 1 g de butilamina se disolvía en 100 ml de agua.

3.5.2.2.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

4 g de paja previamente cortados a 1-2 cm, se mezclaban con 80 ml de butilamina al 1% (R.1), y se sometían a autoclavado durante 1 h a 121°C. La mezcla enfriada se filtraba, y el residuo sólido se lavaba con agua destilada hasta conseguir un pH neutro de las aguas de lavado. Posteriormente, se secaba la paja a 105°C durante una noche (Tanaka *et al.*, 1988). Una vez seca, se determinaba la composición de la paja mediante análisis gravimétrico.

3.5.2.3. TRATAMIENTO CON HIDRÓXIDO DE SODIO

3.5.2.3.1. REACTIVOS

R.1. *NaOH al 1% (p/v)*: 1 g de NaOH se disolvía en agua destilada y se enrasaba el volumen a 100 ml.

3.5.2.3.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Muestras de un gramo de paja, previamente troceada a 1-2 cm, se mezclaba con 50 ml de NaOH al 1% (R.1), y se sometían a autoclavado a 121°C (2 kg/cm²) durante 1 h. La mezcla resultante se filtraba y se lavaba con agua destilada hasta conseguir un valor de pH neutro en las aguas de lavado. A continuación, se secaba la paja tratada a 120 °C

durante 12 h (Estrada *et. al.*, 1988). Adicionalmente, se realizaba un análisis de la composición del material lignocelulósico obtenido.

3.5.3. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PAJA DE CEREAL Y DE CELULOSAS COMERCIALES

Para el estudio de las condiciones de hidrólisis enzimática se seleccionaron dos grupos diferenciados de materiales lignocelulósicos: (i) sustratos celulósicos comerciales (carboximetilcelulosa (CMC) como sustrato soluble, celulosa MN-300 como celulosa amorfa y celulosa 4613 como celulosa microgranular) y (ii) paja de trigo nativa y pretrataada (ver aptdo. 3.5.2). Todas las experiencias se desarrollaron en condiciones asépticas, previo autoclavado del material (ligno)celulósico seleccionado, durante 20 min a 121°C.

Los enzimas celulolíticos empleados fueron: carboximetilcelulasa (CMCasa) extraída de *T. reesei* (actividad de 825,6 μg glucosa $\text{mg}^{-1} \text{h}^{-1}$) y β -glucosidase extraída de *A. niger* (21,08 μg pNP $\text{mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ de actividad). Las variables del proceso estudiadas fueron: la temperatura de hidrólisis, el pH, la concentración de enzimas celulolíticos, la proporción CMCasa/ β -glucosidase inoculadas y la concentración de sustrato hidrolizable.

Para llevar a cabo la hidrólisis se pesaban, en matraces de 250 ml, 2.5 g de cada uno de los sustratos (celulosas comerciales y paja de cereal) autoclavados previamente y se añadían 100 ml de tampón acetato a pH 5.0, 25 mg de CMCasa de *T. reesei* y 25 mg de β -D-glucosidasa de *A. niger*. Posteriormente se incubaban las mezclas a 50°C sometidas a agitación orbital a 150 rpm. En el transcurso del proceso se tomaron muestras puntuales de 5 ml a distintos intervalos de tiempo (2, 5, 12, 24, 36 y 48 h) y se sometían a centrifugación refrigerada (4°C) a 3.500 x g durante 30 min para eliminar los residuos sólidos, evaluando posteriormente el contenido de azúcares reductores y de glucosa en el sobrenadante. Este proceso se repetía por duplicado para cada sustrato, incluyendo un testigo o blanco (el sustrato disperso en el tampón correspondiente sin enzimas). De cada matraz de hidrólisis se sacaban 2 muestras para determinar los azúcares liberados durante la hidrólisis. Cada valor que aparece en las tablas es el resultado de sustraer a las muestras el valor de los blancos.

3.5.3.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA

Teniendo en cuenta que la temperatura de incubación afecta de forma determinante la actividad catalítica de los enzimas, se estudió el efecto, sobre la hidrólisis de los materiales celulósicos y lignocelulósicos, a cuatro temperaturas diferentes : 30, 40, 50 y 60 °C.

3.5.3.2. EFECTO DEL pH

Para evaluar el efecto producido por los cambios de pH sobre la actividad catalítica, se ensayaba la actividad hidrolítica cuando el enzima se mezclaba con cinco soluciones de tampón acetato a valores de pH diferentes: 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 y 6,0. Con los resultados de este estudio se representaban las curvas pH/actividad y se determinaba el valor de pH óptimo de operación para cada sustrato.

3.5.3.3. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ENZIMAS.

Como es lógico, la composición de la mezcla de enzimas utilizada en los procesos hidrolíticos influía, de manera importante, en los pretratamientos hidrolíticos. Por ello, se estudió el efecto producido sobre el proceso cuando se empleaban las siguientes proporciones de CMCasa/ β -glucosidasa:

- a) 25 mg CMCasa / 0 mg β -glucosidasa en 100 ml (CMCasa/ β Gasa; 1:0)
- b) 25 mg CMCasa / 25 mg β -glucosidasa en 100 ml (CMCasa/ β Gasa; 1:1)
- c) 50 mg CMCasa / 25 mg β -glucosidasa en 100 ml (CMCasa/ β Gasa; 2:1)
- d) 100 mg CMCasa / 25 mg β -glucosidasa en 100 ml (CMCasa/ β Gasa; 4:1)
- e) 25 mg CMCasa / 50 mg β -glucosidasa en 100 ml (CMCasa/ β Gasa; 1:2)

3.5.3.4. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO

La eficacia del proceso hidrolítico fue ensayada a las siguientes concentraciones de sustrato (tanto para celulosas comerciales como para paja de cereal): 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 y 10,0%. Las condiciones de ensayo fueron las indicadas en el apartado 3.5.3.

3.5.3.5. HIDRÓLISIS DE LOS MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS CON ENZIMAS INMOVILIZADOS

Una vez estudiadas las condiciones óptimas de operación para cada sustrato se ensayó un proceso de hidrólisis con enzimas inmovilizados. El estudio supuso la realización de tres pruebas paralelas donde los enzimas eran los siguientes:

- 1) CM Casa libre + β -glucosidasa libre,
- 2) CM Casa libre + β -glucosidasa inmovilizada,
- 3) CM Casa + β -glucosidasa coinmovilizadas.

Para realizar el estudio citado, se añadían las cantidades siguientes de cada enzimas libre e inmovilizado por cada 100 ml de medio de reacción:

- 1) 100 mg de CM Casa (para las celulosas comerciales) ó 50 mg de CM Casa (para la paja de cereal) con 50 mg de β -glucosidasa.
- 2) a) 100 mg de CM Casa (para las celulosas comerciales) ó 50 mg de CM Casa (para la paja de cereal) con 150 mg de β -glucosidasa inmovilizada en 50 ml de gel de alginato de calcio al 3%.
b) 100 mg de CM Casa (para las celulosas comerciales) ó 50 mg de CM Casa (para la paja de cereal) con 150 mg de β -glucosidasa inmovilizada en 50 ml de gel de poliacrilamida (acrilamida / BIS; 20/1,2%).
- 3) a) 150 mg de CM Casa (para las celulosas comerciales) ó 75 mg de CM Casa (para la paja de cereal) junto con 150 mg de β -glucosidasa, inmovilizados en 50 ml de gel de alginato de calcio al 3%.

- b) 150 mg de CMCasa (para las celulosas comerciales) ó 75 mg de CMCasa (para la paja de cereal) junto con 150 mg de β -glucosidasa, inmovilizados en 50 ml de gel de poliacrilamida (acrilamida / BIS; 20/1,2%).

3.5.3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

3.5.3.1. ENSAYO DE AZÚCARES REDUCTORES

La determinación de azúcares reductores se realizaba siguiendo el método de Somogyi-Nelson (Nelson, 1944; Somogyi, 1952), basado en una medida colorimétrica, con lo que se podía llevar a cabo el ensayo de un número elevado de muestras (a diferencia de otras metodologías que al aplicar medidas volumétricas incrementan no sólo el material utilizado sino también los tiempos de desarrollo). El método de Somogyi-Nelson permite la determinación cuantitativa de azúcares reductores basándose en la capacidad de este compuesto de reducir al ion Cu^{2+} hasta Cu^+ en medio alcalino. El Cu^+ en presencia de arsenomolibdato amónico forma un complejo estable de color azul, cuya intensidad se mide espectrofotométricamente.

3.5.3.1.1. REACTIVOS

R.1. a) *Reactivo de Somogyi I*: Se disolvían por separado 72 g de Na_2SO_4 , 6 g de tartrato sódico-potásico, 12 g de Na_2CO_3 y 6 g de NaHCO_3 . Se mezclaban y se llevaban a un volumen final de 400 ml.

b) *Reactivo de Somogyi II*: Se disolvían por separado 18 g de Na_2SO_4 , y 2 g de CuSO_4 . Se mezclaban ambas disoluciones y se llevaba el volumen final hasta 100 ml.

Estas disoluciones se almacenaban en estufa a 27°C y en el momento de utilizarse se mezclaban los reactivos Somogyi I y II en la proporción 4:1 (v:v).

R.2. *Reactivo de Nelson*: Se disolvían 12,5 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en 225 ml de agua destilada. Sobre esta disolución se vertían lentamente 10,5 ml de H_2SO_4 concentrado y se añadían 1,5 g de $\text{Na}_2\text{HAsO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ disueltos en 12,5 ml de agua. La mezcla se incubaba a 37°C durante un perio-

do de 24-28 h en botella de cristal ámbar y transcurrido este tiempo, se almacenaba a temperatura ambiente hasta su uso.

R.3. *Tampón acetato a pH 5*: Se disolvían 8,204 g de acetato de sodio en 1 l de agua (solución A). Por otra parte se pesaban 6,05 g de ácido acético glacial y se disolvían en 1 l de agua (solución B). Para ajustar el pH de la solución tampón a un valor de 5 se mezclaban las soluciones anteriores en la proporción 678 ml de solución A + 322 ml de la solución B.

3.5.3.1.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Para ensayar la cantidad de azúcares reductores se diluían 0,2 ml de muestra (o un volumen menor dependiendo de la concentración de azúcares en la muestra) con tampón acetato a pH 5 (R.3) hasta un volumen final de 2 ml en un tubo de ensayo con taparoscada. A continuación, se añadían a cada tubo 2 ml de reactivo de Somogyi (R.1) y se introducían en un baño de agua hirviendo durante 15 min. Pasado este tiempo, los tubos se enfriaban en un baño de agua fría circulante. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, se añadían 2 ml del reactivo de Nelson (R.2) y 4 ml de agua destilada. Por último, y tras agitación (y filtrado cuando era necesario), se cuantificaba la absorbancia del filtrado en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 520 nm. Todas las muestras se preparaban por triplicado.

3.5.3.1.3. CURVA DE CALIBRADO

A partir de una disolución de 250 ppm de glucosa anhidra (solución A) se preparaba una curva patrón mediante las siguientes diluciones:

				<u>µg glucosa ml⁻¹</u>
Las disoluciones anteriores se sometían al mismo tratamiento descrito	0,0 ml de sol. A	+	2,0 ml de R.3	0
	0,2 ml de sol. A	+	1,8 ml de R.3	5
	0,4 ml de sol. A	+	1,6 ml de R.3	10
	0,6 ml de sol. A	+	1,4 ml de R.3	15
	0,8 ml de sol. A	+	1,2 ml de R.3	20
	1,0 ml de sol. A	+	1,0 ml de R.3	25

to para las muestras.

Un ejemplo de ajuste de la recta de calibrado se muestra en la Fig. 3.3.

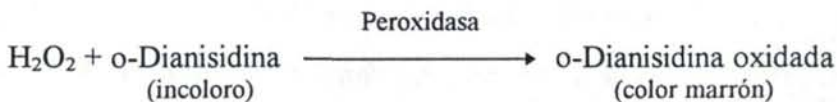
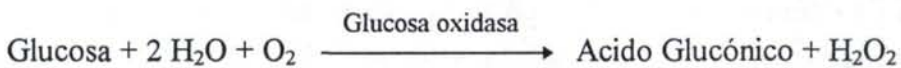
STD #	ABS	CONC
1	0,000	0,0
2	0,226	5,0
3	0,473	10,0
4	0,735	15,0
5	0,943	20,0
6	1,207	25,0

$$\begin{aligned} \text{CONC} &= K_0 + K_1 \cdot \text{ABS} \\ K_0 &= 0,1340 \\ K_1 &= 20,720 \\ r &= 0,9996 \end{aligned}$$

Fig. 3.3. Curva de calibrado de glucosa.

3.5.3.2. ENSAYO DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA

Para la determinación de glucosa se utilizó un método enzimático basado en la propuesta realizada en 1956 por Keston sobre el empleo de peroxidasa en presencia de glucosa y de un aceptor de oxígeno (p.e. o-dianisidina u o-toluidina). El procedimiento aplicado en nuestro trabajo se basaba en las siguientes reacciones enzimáticas acopladas:



La intensidad del color marrón, evaluada en espectrofotómetro a 450 nm, era proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra.

3.5.3.2.1. REACTIVOS

R.1. *Solución combinada enzima/color (calidad Sigma):*

- a) Solución enzimática: Se disolvía el contenido de una cápsula de enzimas PGO [cada cápsula contenía 100 unidades de peroxidasa (de rábano) y 500 unidades de glucosa oxidasa (de *Aspergillus niger*)] en 100 ml de agua destilada. Se almacenaba en un frasco de color topacio a una temperatura de 2-6°C.
- b) Reactivo de color: Se disolvían 50 mg de o-dianisidina en 20 ml de agua destilada. Esta solución era estable durante 3 meses si se almacenaba a 4°C.
- c) Reactivo combinado enzima/color: Se preparaba mezclando 100 ml de la solución de enzima (a) con 1,6 ml del reactivo de color (b).

R.2. $Ba(OH)_2$ 0,3N (Calidad Sigma).

R.3. $ZnSO_4$ 0,3N (Calidad Sigma).

R.4. Solución patrón de glucosa de 250 ppm: Se disolvían 12,5 mg de glucosa en 50 ml de tampón acetato a pH 5,0 para conseguir la concentración señalada.

R.5. Tampón acetato a pH 5 (ver aptdo. 3.5.3.1.1).

3.5.3.2.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Una alícuota de muestra (0,5 ml) se mezclaba con 1,5 ml de tampón acetato (pH 5,0), 1 ml de $Ba(OH)_2$ (R.2) y 1 ml de $ZnSO_4$ (R.3) y se agitaba cuidadosamente durante varios minutos. La mezcla resultante se centrifugaba a 3000 rpm durante 30 min. Un volumen de 0,5 ml del sobrenadante se mezclaba con 5 ml del reactivo de color (R.1) y se incubaba a 37°C durante 30 min. Finalmente se determinaba la absorbancia a 450 nm.

3.5.3.2.3. CURVA DE CALIBRADO

A partir de una solución de glucosa anhidra de 250 ppm (sol. A) se preparaban las siguientes diluciones:

			<u>µg glucosa ml⁻¹</u>
0,00 ml de sol. A	+	0,50 ml de R.5	0
0,11 ml de sol. A	+	0,39 ml de R.5	5
0,22 ml de sol. A	+	0,28 ml de R.5	10
0,33 ml de sol. A	+	0,17 ml de R.5	15
0,44 ml de sol. A	+	0,06 ml de R.5	20

A cada una de estas diluciones se le añadían 5 ml de reactivo de color y se incubaban durante 30 min a 37°C. Un ejemplo de la recta de calibrado obtenida se muestra en la Fig. 3.4.

STD #	ABS	CONC
1	0,000	0,0
2	0,273	5,0
3	0,545	10,0
4	0,820	15,0
5	1,110	20,0

$$\text{CONC} = K_0 + K_1 \cdot \text{ABS}$$

$$K_0 = ,0702$$

$$K_1 = 18,067$$

$$r = 0,9999$$

Fig. 3.4. Curva de calibrado de glucosa.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. INMOVILIZACIÓN DE β -D-GLUCOSIDASA

Para degradar enzimáticamente los materiales lignocelulósicos, es absolutamente necesario la acción catalítica final de la β -glucosidasa, que, al hidrolizar celobiosa y oligosacáridos de pequeños tamaño, es capaz de evitar la fuerte inhibición que sobre las endoglucanasas y exoglucanasas produciría la celobiosa si se acumulase en el medio de reacción. Sin embargo, la β -glucosidasa es inhibida a su vez por su producto, la glucosa, con lo cual, se hace necesario bien suplementar el complejo con β -glucosidasa exógena o bien retirar del medio la glucosa producida en las preparaciones celulolíticas microbianas (Stenberg *et al.*, 1977). Por tanto, la inoculación de β -glucosidasa conduce a un incremento de la velocidad y extensión de la hidrólisis celulolítica (Desrochers *et al.*, 1981; Pérez-Mateos, 1989), aunque provocando un aumento en los costos del proceso global. En este sentido, la reutilización y/o incremento en la estabilidad de los enzimas implicados en la degradación de celulosas es esencial para rebajar el costo de los productos finales de reacción.

La inmovilización de enzimas, una técnica que puede utilizarse para conseguir ambos efectos, presenta, en el caso concreto de las celulasas, muchos inconvenientes debido a la insolubilidad del sustrato que dificulta enormemente la interacción de éste con los enzimas inmovilizados. Por el contrario, la fijación de la β -glucosidasa a un soporte no sólo no plantea problemas en la difusión del sustrato, sino que podría reducir la inhibición producida por la celobiosa, mejorando así el proceso. Vallander y Eriksson (1990) han propuesto la inmovilización de β -glucosidasa, para conseguir dos objetivos: (i) mejorar su estabilidad y (ii) disminuir su consumo al posibilitar su recuperación.

En base a estas consideraciones, hemos estudiado, en la primera parte de este trabajo, las condiciones óptimas de inmovilización de β -glucosidasa exocelular, inducida en y extraída de cultivos de *A. niger*, aplicando técnicas de retención de enzimas, como paso previo al estudio de la degradación acelerada con enzimas de celulosas comerciales y residuos agrícolas.

4.1.1. INMOVILIZACIÓN DE β -GLUCOSIDASA POR ATRAPAMIENTO EN GELES

Tal y como hemos visto en el aptdo 2.3.3.1, la inmovilización por atrapamiento en geles supone la retención de los enzimas en los espacios intersticiales de una matriz polimérica, cuyo tamaño de poro puede regularse. De hecho, en esta técnica las moléculas de enzima quedan confinadas en el enrejado polimérico, impidiéndose su salida fuera de la matriz del gel. Sin embargo, los sustratos y productos de reacción de menor peso molecular, son capaces de atravesar la red asegurando una transformación continua.

La inmovilización de enzimas por atrapamiento resulta de amplia aplicación debido principalmente a que el enzima no se une de forma directa a la matriz del gel y por tanto, no suele provocar grandes cambios en las características intrínsecas de la proteína enzimática. No obstante, las condiciones exigidas durante el proceso de polimerización, necesario para preparar el gel, pueden llegar a reducir la actividad enzimática, por lo que es necesario seleccionar en cada caso, las condiciones más adecuadas de tratamiento.

Las características físico-químicas de la matriz, en estado de gel, pueden modificar la actividad del enzima atrapado en él. En este sentido, el tamaño de poro y/o su concentración, son parámetros críticos a la hora de seleccionar una matriz para una proceso determinado ya que, pueden afectar la difusión del sustrato y producto, limitando la velocidad de reacción de los enzimas atrapados. Sustratos y productos de bajo peso molecular pueden difundir fácilmente hacia dentro o fuera de una matriz con tamaños de poro grandes, aunque, en ese caso, se puede producir la liberación de los enzimas atrapados. De hecho, uno de los factores más importantes para seleccionar el sistema de inmovilización por atrapamiento es el tamaño de poro, determinado por el tamaño molecular y la estructura del compuesto utilizado como soporte (Tanaka *et al.*, 1984).

Unos polímeros de gran utilidad para el atrapamiento de enzimas son los geles de alginato de calcio (Fukushima *et al.*, 1988) y los geles de poliacrilamida (Trevan y Grove, 1979), aunque se han empleado también otros muchos polímeros naturales o sintéti-

cos tales como almidón, silicagel, silastic[®], agar, colágeno o poliestireno (Mansfeld y Schellenberger, 1987).

4.1.1.1. INMOVILIZACIÓN EN GELES DE ALGINATO

Los geles de alginato puede sintetizarse en condiciones suaves, por lo que proporcionan una matriz adecuada para la inmovilización de células microbianas enteras, orgánulos subcelulares y enzimas aislados (Kierstan y Bucke, 1977). En este trabajo preparamos geles de alginato de calcio extruyendo gota a gota una mezcla de solución de β -glucosidasa con alginato de sodio sobre una solución de CaCl_2 (ver aptdo. 3.2.1).

Los rendimientos de inmovilización de β -glucosidasa en geles de alginato cálcico cuando se estudiaba la influencia de la concentración de alginato de sodio, la de CaCl_2 y el tiempo de inmovilización pueden observarse en la Tabla 4.1. Estas variables afectaban la estabilidad y propiedades del gel (Jamuna *et al.*, 1992), por lo que incidían directamente sobre la eficacia del proceso de inmovilización (Stewart y Swaisgood, 1993). De hecho, cuando se fijaba la concentración de alginato y el tiempo de tratamiento, los incrementos de la concentración de CaCl_2 no producían grandes alteraciones del porcentaje de inmovilización. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Jain y Ghose (1984), los cuales comprobaron que un incremento en la concentración de la solución de CaCl_2 no conducía a un aumento de la inmovilización, aunque mejoraba la estabilidad del gel.

Por su parte, la concentración de alginato si influía en la cantidad de enzima inmovilizada, ya que cuando se aumentaba la concentración de alginato, se observaba mayor actividad del enzima inmovilizado, sobre todo si la concentración de iones calcio era de 0,2 M. Este resultado podría entenderse en función de que con más cantidad de alginato se podía formar una mayor cantidad de gel, y por consiguiente, se ofrecía más posibilidades de atrapamiento del enzima en la matriz del polímero. Es evidente que las concentraciones elevadas de alginato de sodio precisan a su vez de mayores cantidades de Ca^{2+} para su completa gelificación, mientras que concentraciones bajas o intermedias de alginato implicarían menor dependencia de la concentración de Ca^{2+} para completar la polimerización.

Tabla 4.1. Influencia de la concentración de alginato de sodio, CaCl₂ y del tiempo de tratamiento sobre el atrapamiento de β-glucosidasa de *A. niger* en geles de alginato de calcio.

[CaCl ₂] (M)	Tiempo (min)	Actividad β-glucosidasa inmovilizada ^a (B)			% Inmovilización (B/A ^{b,c,d})·100		
		alginato 1% ^b	alginato 2% ^c	alginato 3% ^d	alginato 1%	alginato 2%	alginato 3%
0,05	30	14,83	17,40	21,63	32,80	43,14	53,03
	60	16,29	14,64	20,25	36,03	36,30	49,64
	120	13,31	13,77	19,75	29,44	34,14	48,42
	240	9,55	11,11	13,78	21,12	27,55	33,78
0,10	30	14,84	17,16	24,18	32,82	42,55	59,28
	60	13,66	15,09	21,44	30,20	37,42	52,56
	120	10,92	13,68	17,98	24,15	33,92	44,08
	240	7,45	8,99	10,47	16,48	22,31	25,67
0,20	30	16,83	20,60	24,31	37,23	51,08	59,60
	60	16,51	16,38	26,81	36,52	40,61	65,73
	120	13,23	13,52	24,61	29,26	33,52	60,33
	240	11,32	9,13	17,44	25,04	22,64	42,76

^a En μg pNP ml⁻¹ gel h⁻¹

^{b,c,d} Actividad del enzima añadido A: b: 45,21; c: 40,33 y d: 40,79 μg pNP ml⁻¹ gel h⁻¹

En definitiva, observamos que para una concentración determinada de CaCl_2 , los mejores rendimientos se producían a concentraciones elevadas de alginato (3%), consiguiéndose porcentajes de inmovilización superiores al 65%. Estos resultados, que pueden considerarse realmente satisfactorios, contrastan con las críticas realizadas por ciertos autores a los geles de alginato de calcio sobre todo por su elevado tamaño de poro que podría permitir la liberación de la proteína enzimática (Fukushima *et al.*, 1988). Sin embargo, no sólo es el tamaño de poro sino también la estructura de las moléculas implicadas la que afecta la difusión de las sustancias hacia el interior y exterior de los geles, siendo evidente que tanto el peso molecular como la estructura de las moléculas de alginato varían en función de las fuentes de obtención (Tanaka *et al.*, 1984).

Cuando el tiempo de contacto de las perlas de alginato con la solución enzimática se incrementaba por encima de 60 min, la cantidad de enzima inmovilizado disminuía (Fig. 4.1). En concreto, a concentraciones bajas de CaCl_2 y tiempos cortos de tratamiento se alcanzaban porcentajes similares de inmovilización que a concentraciones altas de CaCl_2 y tiempos de tratamiento elevados. Sin embargo con una concentración fija de alginato y de CaCl_2 , el incremento del tiempo de agitación implicaba un cierto incremento de la estabilidad del gel (Jain y Ghose, 1984). Este aumento de estabilidad probablemente esté asociado a modificaciones de la estructura y densidad del gel, provocando una disminución de la actividad retenida. Este efecto aparecía más acusado con la concentración de alginato más elevada (3%), probablemente debido a que las modificaciones en el interior del gel implicaban mayor compactación del mismo y por lo tanto mayor alteración de la actividad retenida en su interior.

A la vista de los resultados incluidos en la Tabla 4.1 y la Fig. 4.1, se seleccionaron para el resto de pruebas de este tipo de inmovilización: alginato de sodio al 3%, CaCl_2 0,2 M y un tiempo de agitación de 1 h.

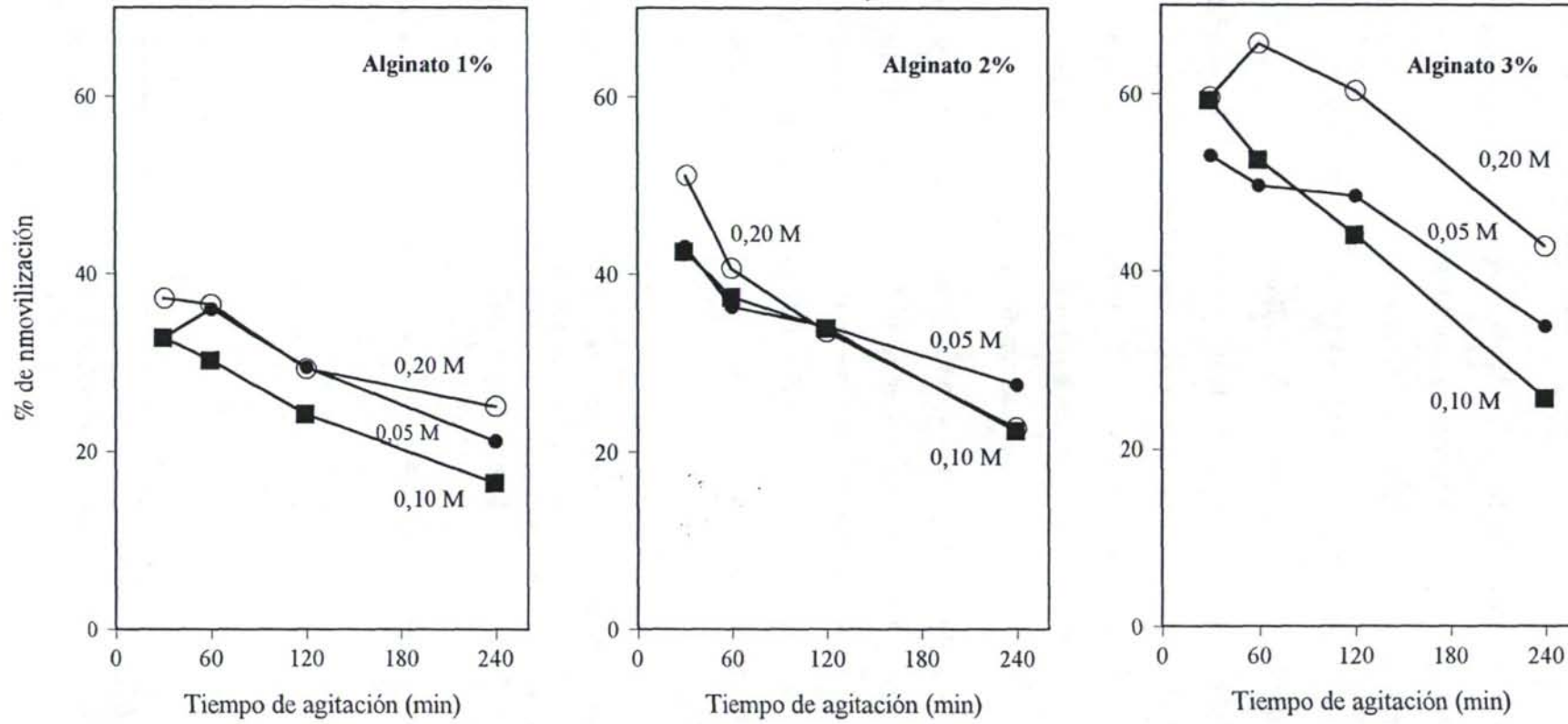


Fig. 4.1. Influencia del tiempo de tratamiento sobre la inmovilización de β -glucosidasa en geles de alginato de calcio a diferentes concentraciones de alginato.

4.1.1.2. INMOVILIZACIÓN EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Los geles de poliacrilamida han sido posiblemente los más ampliamente utilizados para la inmovilización de catalizadores enzimáticos. El proceso de inmovilización se lleva a cabo por polimerización de acrilamida utilizando como agente entrecruzante N, N'-metilbisacrilamida (BIS) en presencia de la proteína enzimática (Chibata, 1978).

Según Zaborsky (1983) la concentración total y la proporción de acrilamida y bisacrilamida utilizadas determinan el tamaño de poro de los espacios intersticiales dentro de los cuales quedan atrapadas las moléculas de enzima, así como las propiedades físicas de este polímero insoluble. Por ello, se llevó a cabo la inmovilización de β -glucosidasa de *A. niger* en geles de poliacrilamida obtenidos a partir de variaciones en la concentración del monómero (acrilamida) y del agente entrecruzante (BIS).

Inicialmente se utilizó una concentración de bisacrilamida al 0,8% fija y constante y se modificó la concentración de acrilamida entre el 5% y el 25% (Tabla 4.2). El proceso de inmovilización era claramente dependiente de la concentración de acrilamida presente en los geles, produciéndose la máxima retención de enzima (aproximadamente un 45% de la actividad inicial) cuando el gel con se preparaba a una concentración de acrilamida del 20% (Fig. 4.2).

Tabla 4.2. Influencia de la concentración de acrilamida sobre el atrapamiento de β -glucosidasa en geles de poliacrilamida ^a.

Acrilamida (%)	Actividad β -glucosidasa inmovilizada ^b (B)	% de inmovilización ^c (B/A)·100
5	14,70	6,98
10	39,81	18,88
15	74,49	35,34
20	94,17	44,67
25	75,85	35,98

^a Concentración de bisacrilamida: 0,8% (p/v)

^b En $\mu\text{g pNP ml}^{-1}\text{gel h}^{-1}$

^c Actividad del enzima añadido: A = 210,800 $\mu\text{g pNP ml}^{-1}\text{gel h}^{-1}$

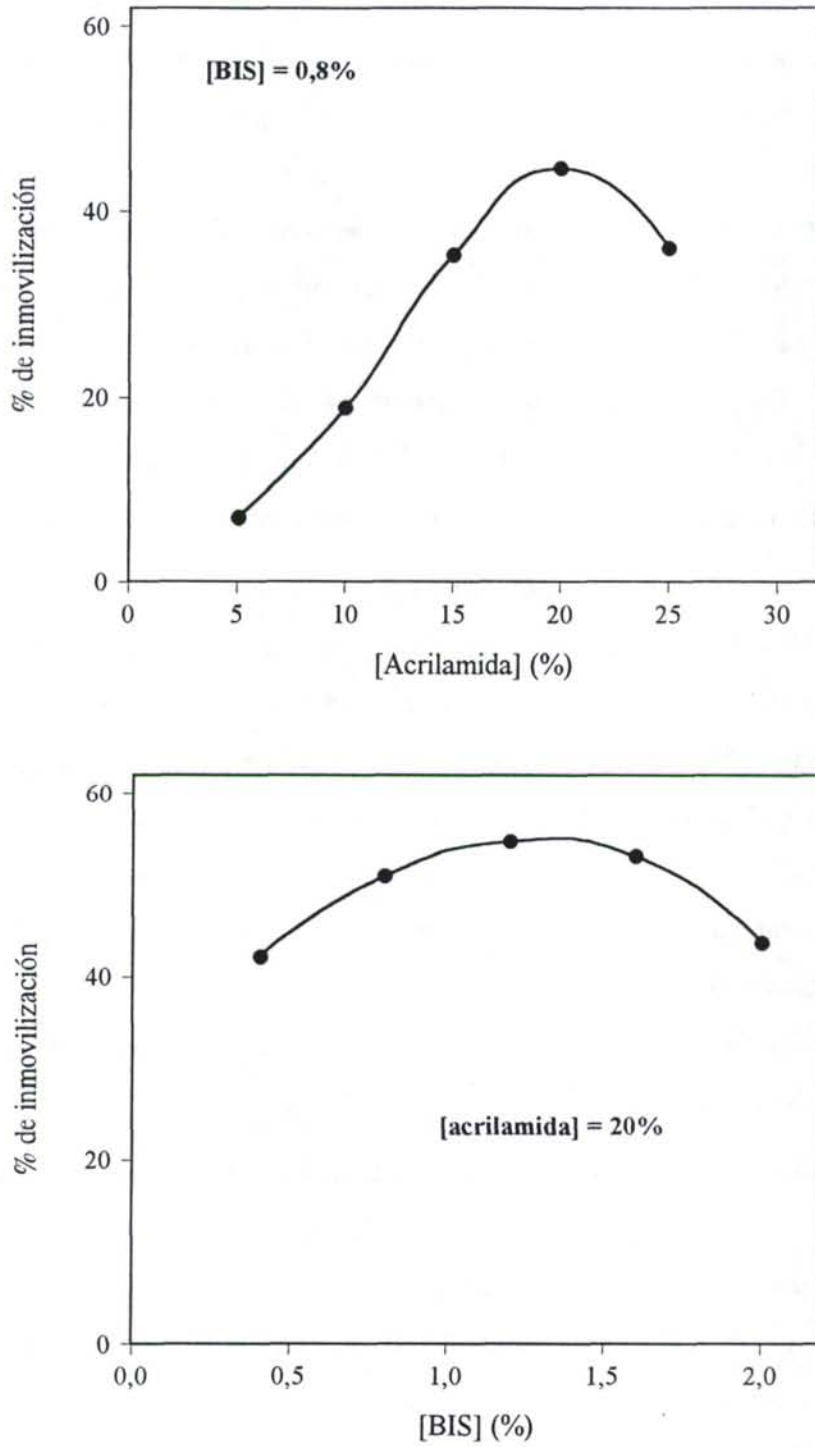


Fig. 4.2. Efecto de la concentración de acrilamida y BIS sobre la inmovilización de β -glucosidasa en geles de poliacrilamida .

Fawett y Morris (1966) comprobaron que para una concentración fija de bisacrilamida, el tamaño de poro variaba inversa y casi linealmente con la concentración total de monómero. Por tanto, cuando incrementábamos la concentración de acrilamida disminuía la porosidad del gel y consecuentemente se evitaba la difusión del enzima a la fase gruesa de la disolución. Sin embargo, y como es lógico, este efecto se producía hasta un determinado tamaño de poro, a partir del cual se impedía también el acceso del sustrato y/o la salida del producto. Por eso, cuando se utilizaban geles preparados con concentraciones de acrilamida superiores al 20%, se producía una disminución del rendimiento de la inmovilización. Esta disminución podría atribuirse también a una posible inactivación del enzima ocurrida en la mezcla de polimerización debido aparentemente a que la acrilamida actuaba como un agente desnaturizante de la β -glucosidasa (Degani y Miron, 1964).

Una vez estudiada la influencia de la concentración de acrilamida, se preparó el polímero aplicando diferentes concentraciones del agente entrecruzante bisacrilamida obteniéndose los resultados incluidos en la Tabla 4.3. Los resultados demostraban que la concentración de BIS no influía mucho en la cantidad de enzima, alcanzándose un máximo de actividad del inmovilizado para una concentración del agente entrecruzante del 1,2% (Fig. 4.2). La interpretación de los resultados podría ser la misma que en el caso anterior, es decir, que las bajas concentraciones de bisacrilamida provocaban mayor porosidad del gel (Ohmiya *et al.*, 1975) y por tanto menor actividad retenida, mientras que a concentraciones elevadas de BIS podía producirse una inactivación del enzima (Stranberg y Smiley, 1971).

La desnaturalización de la proteína enzimática y/o su liberación del interior del gel parecen ser las principales causas que ocasionan pérdidas de actividad en el proceso de inmovilización de enzimas en geles de poliacrilamida (Goldman *et al.*, 1971). Por consiguiente, y con objeto de disminuir la inactivación de la β -glucosidasa atrapada, se llevó a cabo su inmovilización en geles de poliacrilamida con las condiciones óptimas encontradas en las pruebas anteriores, pero en presencia de dos agentes protectores: (i) ditiotreitól (DTT) y (ii) celobiosa.

Tabla 4.3. Influencia de la concentración de bisacrilamida sobre la inmovilización de β -glucosidasa en geles de poliacrilamida ^a.

Bisacrilamida (%)	Actividad β -glucosidasa inmovilizada ^b (B)	% de inmovilización ^c (B/A)·100
0,4	88,87	42,16
0,8	107,36	50,93
1,2	115,27	54,68
1,6	111,91	53,09
2,0	82,14	43,71

^a Concentración de acrilamida: 20% (p/v)^b En $\mu\text{g pNP ml}^{-1}\text{gel h}^{-1}$ ^c Actividad del enzima añadido: A = 210,800 $\mu\text{g pNP ml}^{-1}\text{gel h}^{-1}$

La adición de ditioneitol (8 mg ml^{-1}) durante el proceso de inmovilización tenía por objeto proteger los grupos tiol del enzima frente a una posible oxidación producida durante el proceso de inmovilización (Ohmiya *et al.*, 1975). Desafortunadamente, la presencia de este agente protector en el medio de reacción interfería la polimerización, por lo que la prueba se hacía inviable. Por ello, y con objeto de proteger el centro activo de la proteína enzimática durante el proceso de inmovilización, se ensayó la posibilidad de añadir celobiosa (el sustrato de β -glucosidasa) a distintas concentraciones (0, 10, 20 y 40 mg ml^{-1} gel). La influencia de la celobiosa sobre los rendimientos de inmovilización se muestra en la Tabla 4.4. Las concentraciones bajas de celobiosa (10 mg ml^{-1} gel) ejercían probablemente una cierta protección sobre la proteína enzimática, ya que a esas concentraciones se obtenía un ligero incremento de los porcentajes de inmovilización (Fig. 4.3). Por el contrario, cuando la concentración del sustrato se incrementaba hasta los 20 mg ml^{-1} gel, se provocaba una disminución de la actividad del inmovilizado.

En cualquier caso, la aplicación de celobiosa no mejoraba notablemente el proceso (quizás la modificación del centro activo no era la principal responsable de la inactivación observada durante el proceso de inmovilización). Teniendo en cuenta este hecho y el relativamente elevado precio del disacárido (que influiría en un incremento de los costes del proceso global), se optó por eliminar este reactivo en las pruebas sucesivas.

Tabla 4.4. Efecto de la presencia de celobiosa sobre la inmovilización de β -glucosidasa en geles de poliacrilamida ^a.

Celobiosa ^b	Actividad β -glucosidasa inmovilizada ^c (B)	% Inmovilización ^d (B/A)·100
0	115,27	54,68
10	120,29	57,06
20	88,43	41,95
40	81,67	38,74

^a Acrilamida al 20%; BIS al 1,2%

^b En mg ml⁻¹gel

^c En μ g pNP ml⁻¹gel h⁻¹

^d Actividad del enzima añadido: A = 210,800 μ g pNP ml⁻¹gel h⁻¹

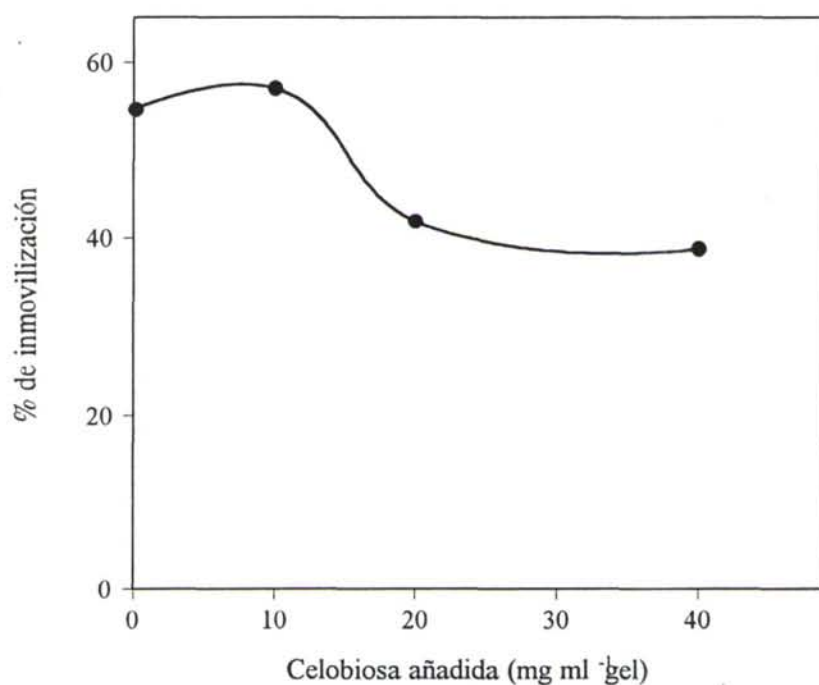


Fig. 4.3. Influencia de la presencia de celobiosa sobre el atrapamiento de β -glucosidasa en geles de poliacrilamida.

Complementariamente, se estudió la influencia en el proceso de inmovilización de la cantidad de enzima añadido (Fig. 4.4): Cuando la cantidad de enzima añadido era de 2 mg ml⁻¹ gel, el porcentaje de inmovilización se incrementaba bruscamente. De hecho, cuando se aumentaba la concentración de enzima de 1 a 2 mg ml⁻¹ gel, la inmovilización se incrementaba en un 32%, mientras que cuando la cantidad de β -glucosidasa añadido aumentaba de 2 a 50 mg ml⁻¹ gel, el porcentaje subía únicamente un 14% (Tabla 4.5). Este resultado es lógico puesto que se aumentaba la cantidad de enzima susceptible de atrapamiento, aunque a partir de una determinada concentración de enzima se alcanzaba la "saturación" de la matriz polimérica.

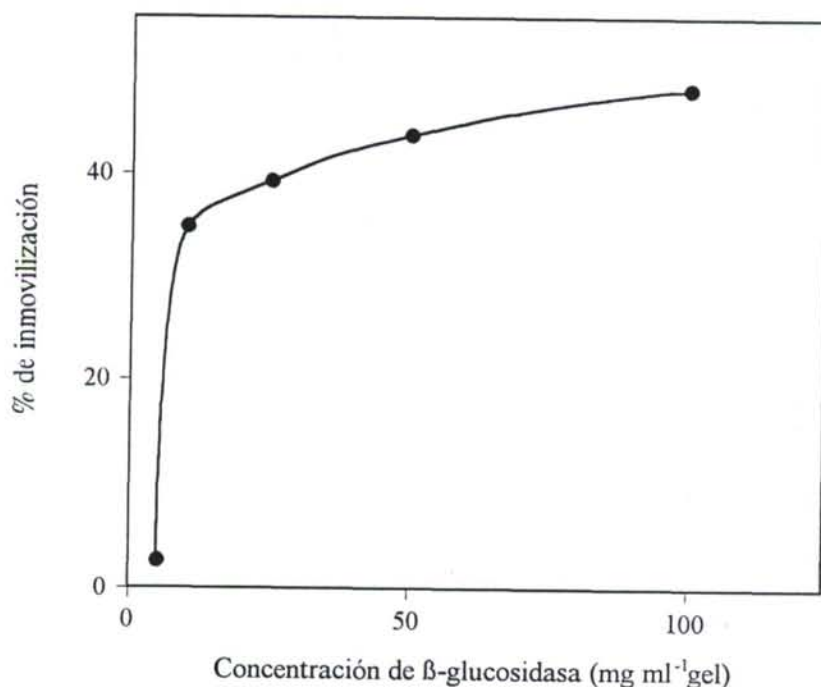


Fig. 4.4. Influencia de la concentración de enzima sobre la inmovilización de β -glucosidasa en geles de poliacrilamida.

Teniendo en cuenta tanto los resultados de inmovilización como el efecto de la cantidad de β -glucosidasa añadida, se empleó en las pruebas sucesivas una concentración de β -glucosidasa de 10 mg ml⁻¹ gel.

Tabla 4.5. Influencia de la concentración de enzima sobre la inmovilización de β -glucosidasa en geles de poliacrilamida ^a.

Concentración del enzima añadido mg ml ⁻¹ gel	Actividad β -glucosidasa ^b		
	Libre (A)	Inmovilizada (B)	% Inmovilización (B/A)·100
1	18,104	0,47	2,60
2	36,208	12,64	34,92
5	90,520	35,56	39,29
10	181,040	79,16	43,72
50	362,080	174,53	48,20

^a Acrilamida al 20%; BIS al 1,2%

^b En $\mu\text{g pNP ml}^{-1}\text{gel h}^{-1}$

4.1.2. INMOVILIZACIÓN DE β -GLUCOSIDASA POR ASOCIACIÓN A POLÍMEROS FENÓLICOS

Ciertos enzimas, entre los que se encuentra la β -glucosidasa, han sido extraídos del suelo en forma de complejos en los que se encontraban inmovilizados por asociación a coloides edáficos (p.e. Pérez-Mateos *et al.*, 1988; Busto y Pérez-Mateos, 1995). No obstante, la relación entre los enzimas y los soportes poliaromáticos a los que con frecuencia se asocian, así como su formación en el suelo y su posible función en el sistema suelo-rizosfera no se conocen todavía con detalle (Greco *et al.*, 1990).

Estas asociaciones confieren a las proteínas enzimáticas una marcada estabilidad en comparación con sus contrapartidas solubles, las cuales son rápidamente desnaturalizadas, degradadas o inactivadas en el suelo (Zantua y Bremmer, 1977). No obstante, y aunque los complejos húmico-enzimáticos han sido extraídos del suelo, purificados y analizadas las distintas fracciones, no se ha encontrado la relación que existe entre los enzimas y sus soportes poliaromáticos.

Dos mecanismos para el conocimiento de estas asociaciones son (i) la utilización de ácidos húmicos extraídos del suelo y estudiar sus interacciones y efecto sobre los enzimas (Maignan, 1982; Ruggiero y Radogna, 1988) y la síntesis de copolímeros fenólicos análogos a los del suelo (Sarkar, 1986; Greco *et al.*, 1990).

4.1.2.1. INMOVILIZACIÓN POR ASOCIACIÓN A HUMATOS EDÁFICOS

La asociación de enzimas a humatos edáficos resultaba especialmente interesante por cuanto que podría suponer una copolimerización adicional de derivados fenólicos, procedentes de la degradación de la lignina, con las estructuras enzimáticas. Esta asociación podría conferir a los enzimas una estabilidad remarcada en comparación con sus contrapartidas solubles, que normalmente resultan rápidamente desnaturalizadas, degradadas o inactivadas. Partiendo de la idea de que en el suelo los humatos han demostrado capacidad para inmovilizar y estabilizar enzimas, se procedió en este trabajo a la extrac-

ción y posterior utilización de humatos como soporte de inmovilización de β -glucosidasa extracelular aislada de *A. niger*.

Los humatos se aislaron de un suelo ocre humífero, utilizando el método de extracción descrito por Pérez-Mateos *et al.* (1988). Los complejos enzimáticos se obtuvieron mezclando los extractos húmicos junto con β -glucosidasa mediante agitación orbital variando las condiciones del tiempo (15, 60, 120 y 240 min) y la temperatura de tratamiento (4, 30 y 45°C) (ver aptdo. 3.2.3). Las concentraciones de humatos en los complejos sintetizados fueron de 0,3; 0,6; 1,2 y 3,0 mg ml⁻¹, mientras que la concentración de enzima era de 0,6 mg ml⁻¹, siendo por lo tanto la proporción humatos/enzima de 0,5/1, 1/1, 2/1 y 5/1 (en p/p), respectivamente. Los resultados de actividad del enzima inmovilizado, obtenidos cuando se mezclaban durante distintos tiempos los humatos con la β -glucosidasa en las diferentes proporciones a 4, 30 y 45°C, se muestran en las Tablas 4.6, 4.7 y 4.8 respectivamente. Estos resultados muestran que la asociación del enzima a humatos edáficos provocaba un fuerte incremento en la actividad de los inmovilizados con respecto a sus contrapartidas solubles. Los porcentajes de inmovilización enzimática (Tabla 4.9) eran función directa de la temperatura de inmovilización: a medida que aumentaba la temperatura del tratamiento se incrementaban los rendimientos del inmovilizado. Mientras que a 4°C los porcentajes oscilaban entre el 80% y el 100%, a 45°C se producían activaciones que alcanzaban porcentajes de hasta un 180% cuando el tratamiento se prolongaba durante 4 h de agitación. Aunque el tiempo de inmovilización tenía mínima influencia sobre el proceso a 4°C, tenía una influencia decisiva a temperaturas de 30 y 45°C. En concreto, la actividad de la mezcla humatos-enzima, se incrementaba sobre un 30% o incluso un 60% al aumentar el tiempo de agitación de 15 min a 4 h para 30 o 45°C respectivamente.

Por tanto, la asociación de los humatos a los extractos enzimáticos suponía una mayor o menor activación de la proteína enzimática que dependía de la temperatura y tiempo de inmovilización. Aunque los humatos extraídos presentaban ya una cierta actividad β -glucosidasa, ésta no resultaba suficiente como para explicar los incrementos apreciados. Únicamente en los complejos sintetizados a 4°C con concentraciones de humatos de 0,6 y 1,2 mg ml⁻¹ se observaba una ligera inactivación enzimática. El hecho de

Tabla 4.6. Inmovilización de β -glucosidasa a 4°C por asociación a humatos.

Tiempo (min)	Actividad β -glucosidasa ^a											
	0,5/1 ^b			1/1 ^c			2/1 ^d			5/1 ^e		
	Libre	H ^f	Inmov.	Libre	H	Inmov.	Libre	H	Inmov.	Libre	H	Inmov.
0	20,06	0,67	n.d.	25,66	1,47	n.d.	27,68	2,41	n.d.	19,47	4,19	n.d.
15	20,40	0,72	19,45	26,04	1,58	24,14	28,10	2,60	25,48	19,76	4,50	23,98
60	19,12	0,67	18,89	24,53	1,45	22,24	26,46	2,37	24,58	18,61	4,13	23,30
120	18,60	0,66	19,95	21,35	1,45	23,80	23,03	2,37	25,28	16,20	4,13	24,26
240	19,25	0,66	20,21	24,84	1,30	23,65	26,79	2,12	24,31	18,85	3,69	24,42

^a En $\mu\text{g pNP ml}^{-1} \text{h}^{-1}$

^b 0,3 mg humatos ml^{-1}

^c 0,6 mg humatos ml^{-1}

^d 1,2 mg humatos ml^{-1}

^e 3,0 mg humatos ml^{-1}

^f H: humatos

Tabla 4.7. Inmovilización de β -glucosidasa a 30°C por asociación a humatos.

Tiempo (min)	Actividad β -glucosidasa ^a											
	0,5/1 ^b			1/1 ^c			2/1 ^d			5/1 ^e		
	Libre	H ^f	Inmov.	Libre	H	Inmov.	Libre	H	Inmov.	Libre	H	Inmov.
0	20,02	0,67	n.d.	25,67	1,47	n.d.	27,68	2,41	n.d.	19,47	4,20	n.d.
15	18,78	0,71	20,03	24,31	1,57	23,68	26,21	2,57	26,48	18,44	4,48	24,14
60	18,52	0,69	21,63	23,69	1,51	25,18	25,55	2,47	27,05	17,97	4,30	26,16
120	19,18	0,73	23,73	24,95	1,61	28,58	26,90	2,64	29,68	18,92	4,61	27,86
240	21,12	0,82	27,00	27,21	1,77	29,16	29,34	2,89	29,81	20,64	5,04	29,58

^a En $\mu\text{g pNP ml}^{-1} \text{h}^{-1}$

^b 0,3 mg humatos ml^{-1}

^c 0,6 mg humatos ml^{-1}

^d 1,2 mg humatos ml^{-1}

^e 3,0 mg humatos ml^{-1}

^f H: humatos

Tabla 4.8. Inmovilización de β -glucosidasa a 45°C por asociación a humatos.

Tiempo (min)	Actividad β -glucosidasa ^a											
	0,5/1 ^b			1/1 ^c			2/1 ^d			5/1 ^e		
	Libre	H ^f	Inmov.	Libre	H	Inmov.	Libre	H	Inmov.	Libre	H	Inmov.
0	19,72	0,74	n.d.	25,67	1,47	n.d.	27,68	2,41	n.d.	19,47	4,20	n.d.
15	20,18	0,58	27,07	26,34	1,27	28,37	28,40	2,07	29,90	19,91	3,62	28,42
60	25,97	0,60	33,21	33,99	1,31	37,53	36,65	2,14	40,16	25,78	3,73	37,56
120	28,38	0,64	34,69	36,09	1,26	37,75	38,92	2,07	43,73	27,37	3,61	38,08
240	27,96	0,56	36,65	35,63	1,21	42,01	38,42	1,99	43,78	27,02	3,47	38,72

^a En $\mu\text{g pNP ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ^b 0,3 mg humatos ml^{-1} ^c 0,6 mg humatos ml^{-1} ^d 1,2 mg humatos ml^{-1} ^e 3,0 mg humatos ml^{-1} ^f H: humatos

Tabla 4.9. Porcentajes de inmovilización de β -glucosidasa por asociación a humatos a diferentes temperaturas, tiempos de tratamiento y proporciones humatos/enzima.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	% de inmovilización ^a			
		0,5/1 ^b	1/1 ^c	2/1 ^d	5/1 ^e
4	15	93,83	88,98	84,68	101,35
	60	91,12	81,98	81,69	98,48
	120	96,24	87,73	84,01	102,54
	240	97,49	87,17	80,79	103,21
30	15	96,81	87,25	88,00	101,99
	60	104,54	92,78	89,90	110,52
	120	114,69	105,31	98,64	117,70
	240	130,50	107,44	99,07	124,97
45	15	133,35	104,53	99,37	120,07
	60	163,60	138,28	133,47	158,68
	120	170,89	139,09	145,33	160,88
	240	180,54	154,79	145,50	163,58

^a En % respecto a la actividad inicial

^b 0,3 mg humatos ml⁻¹

^c 0,6 mg humatos ml⁻¹

^d 1,2 mg humatos ml⁻¹

^e 3,0 mg humatos ml⁻¹

que aparezca una activación e inhibición sobre el mismo enzima implica que el efecto de los humatos se producía principalmente sobre el enzima y no sobre el sustrato (Ladd y Butler, 1969). Podría pensarse que la proteína enzimática se asociaba a la materia húmica a través de una serie de mecanismos de intercambio iónico, atrapamiento entre micelas tridimensionales, reacciones lipofílicas, enlaces de hidrógeno o covalentes de manera tal que producían una modificación del efecto catalítico del enzima (Burns, 1984; Pérez-Mateos y Rad, 1989; Pérez-Mateos *et al.*, 1990).

Butler y Ladd (1975) supusieron que las uniones de humatos con distintos enzimas eran reversibles y seguían un mecanismo de intercambio catiónico a través de grupos

carboxilato. También sugerían la intervención de los grupos amino de las proteínas enzimáticas en su asociación con los materiales húmicos del suelo (Ladd y Butler, 1975). A pesar de ello, el tipo exacto de interacción de los polímeros aniónicos naturales con las proteínas enzimáticas no está clarificada. El estudio de su comportamiento frente al pH y de reversibilidad con varios agentes bloqueantes selectivos indicaban la existencia de al menos tres tipos de uniones: iónicas, por puentes de hidrógeno y covalentes. Estas uniones juegan un papel mayor o menor dependiendo de los polímeros implicados y de las condiciones utilizadas. Según Ladd y Butler (1975), con tiempos de inmovilización cortos, la mayor parte de las uniones suelen ser de tipo iónico. Si se utilizan reactivos de peso molecular alto a valores de pH bajos, los puentes de hidrógeno comienzan a tener mayor importancia y en experiencias con tiempos de tratamiento prolongado probablemente empiecen a tener importancia las uniones covalentes. En base a estas consideraciones, podría entenderse porqué cuando utilizábamos tiempos cortos de tratamiento (15 min), la actividad de los complejos húmico-enzimáticos era similar a la actividad enzimática inicial y porqué experimentaba un incremento considerable a las 4 h de tratamiento (Tabla 4.9). La activación de los complejos sintetizados estaría directamente relacionada con el establecimiento de enlaces covalentes entre la materia húmica y el enzima, enlaces que se verían favorecidos a temperaturas elevadas (45°C). Estas uniones podrían producir cambios en torno al centro activo del enzima provocando mayor facilidad para la acción catalítica. Adicionalmente, podría pensarse en una posible participación directa de la estructura fenólica en catálisis general del tipo ácido-base, covalente, etc.

Por otra parte, la concentración de humatos en la mezcla afectaba también a la actividad enzimática del complejo formado. De forma general, a todas las temperaturas estudiadas, cuando se incrementaba la concentración de humatos desde 0,3 hasta 1,2 mg ml⁻¹, se producía una inactivación del complejo enzimático (Fig. 4.5). No obstante, al aumentar la concentración de humatos hasta 3,0 mg ml⁻¹, se observaba un comportamiento anómalo, ya que se incrementaba la actividad de los complejos. A esta concentración de ácidos húmicos (10 veces superior a la del enzima), la concentración del enzima se convertía en limitante del proceso, con lo que podría producirse una mayor reactividad

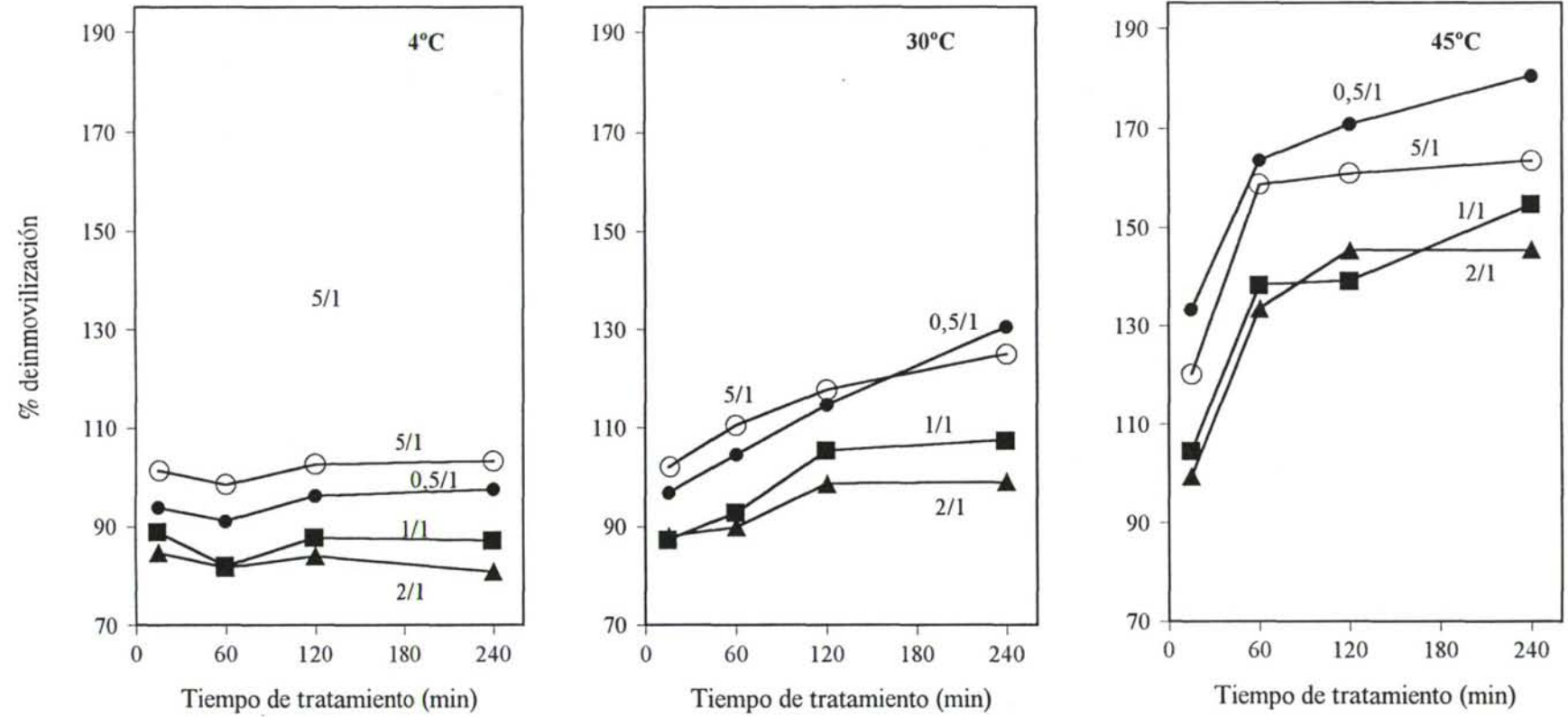


Fig. 4.5. Influencia de la proporción humatos/enzima (p/p) sobre la inmovilización de β -glucosidasa en humatos edáficos a diferentes temperaturas y tiempos de tratamiento.

de las estructuras fenólicas entre sí, dando como resultado complejos de mayor actividad enzimática a lo que era previsible.

4.1.2.2. ENTRECruzAMIENTO CON HUMATOS A TRAVÉS DE GLUTARALDEHÍDO

Para estudiar la posibilidad de incrementar los rendimientos de inmovilización por unión covalente de la molécula enzimática al polielectrolito húmico extraído del suelo, se procedió a la inclusión en la mezcla de inmovilización de un agente de entrecruzamiento homobifuncional. El entrecruzamiento mediante reacción química de enzimas puede llevarse a cabo fácilmente con reactivos bifuncionales. Estos reactivos son capaces de atacar nucleofílicamente cadenas de aminoácidos, tales como grupos sulfhidrilo de cisteína, grupos amino de lisina, grupos amino terminales, grupos carboxilato de aspartato y glutamato, grupos carboxi-terminales de aminoácidos, grupos imidazol de histidina, y grupos tioéter de metionina (Wong y Wong, 1992).

Los reactivos multifuncionales pueden utilizarse para introducir grupos funcionales reactivos en el interior de polímeros, facilitando la reacción covalente con el enzima. Un ejemplo de este método es la modificación de los humatos extraídos del suelo por acción del glutaraldehído (Busto, 1992). En este caso, una parte del reactivo bifuncional es empleado para introducir una funcionalidad apropiada a los humatos, es decir, para incrementar los grupos reactivos del esqueleto polimérico, mientras que otra parte del reactivo se utiliza para la unión del enzima (Zaborsky, 1972). El reactivo homobifuncional (dos grupos reactivos idénticos) más frecuentemente utilizado es el glutaraldehído, tanto para el entrecruzamiento de proteínas (Ottensen y Svensson, 1971; Payne, 1973), como para la preparación de derivados insolubles de enzimas (Quiocho y Richards, 1964; Jansen y Olson, 1969; Shejter y Bar-Eli, 1970).

En el apartado que nos ocupa, se llevó a cabo la inmovilización tal y como se ha indicado en el aptdo. 3.2.2 (con concentraciones de ácidos húmicos de 0,3; 0,6; 1,2 y 3,0 mg ml⁻¹, tiempos de agitación de 15, 60, 120 y 240 min y temperaturas de tratamiento de 4, 30 y 45°C), pero aplicando glutaraldehído a tres concentraciones: 1,0; 2,5 y 5,0%.

Los resultados de la inmovilización de β -glucosidasa por entrecruzamiento con glutaraldehído al 1% a 4, 30 y 45°C se detallan respectivamente en las Tablas 4.10, 4.11 y 4.12. Los resultados demuestran que la temperatura de tratamiento es un parámetro determinante en el proceso de inmovilización, observándose tanto inhibiciones como activaciones, dependiendo de las condiciones de inmovilización.

La inmovilización con glutaraldehído al 1% a una temperatura de 4°C suponía una disminución en la actividad del enzima inmovilizado con respecto a la de su contrapartida soluble. Este descenso de la actividad de los complejos húmico-enzimáticos podría deberse a una acción específica del glutaraldehído sobre la proteína enzimática, ya que no dependía ni de la concentración de ácidos húmicos ni del tiempo de tratamiento. En todos los casos estudiados se obtenía una inactivación próxima al 20% (Tabla 4.13).

En contraste con el caso anterior, cuando la temperatura de inmovilización era de 30°C, el tiempo de inmovilización sí afectaba la actividad enzimática de los complejos. Tratamientos cortos de 15 o incluso 60 min producían una inactivación parcial (en menor grado que a 4°C), mientras que tiempos de agitación superiores provocaban un incremento sustancial de la actividad del enzima inmovilizado: hasta un 30% después de 4 h de tratamiento para los inmovilizados a las menores concentraciones de humatos (Fig. 4.6). Sin embargo, cuando la concentración de humatos en los complejos era de 1,2 y 3,0 mg ml⁻¹, se observaba una pérdida de actividad β -glucosidasa en los inmovilizados con respecto a las muestras preparadas con concentraciones inferiores de polímero húmico.

Cuando la temperatura de inmovilización se incrementaba a 45°C, los complejos húmico-enzimáticos entrecruzados con glutaraldehído presentaban la mayor activación respecto a la actividad del enzima añadido inicialmente (Tabla 4.13, Fig. 4.6). A esta temperatura, tanto la concentración de humatos como el tiempo de tratamiento influían determinantemente en la actividad final de los complejos sintetizados. Cuando se usaban las concentraciones más bajas de humatos (0,3 y 0,6 mg ml⁻¹) se obtenían complejos cuya actividad era 2 veces superior a la inicial después de 2 h de tratamiento. En contraste, aunque en concordancia con los resultados previos obtenidos cuando se operaba a 30°C, el incremento de la concentración en humatos conducía a una disminución de la actividad del inmovilizado, tanto mayor cuanto más elevada era la concentración de los polímeros

Tabla 4.10. Inmovilización de β -glucosidasa a 4°C por entrecruzamiento con humatos a través de glutaraldehído al 1,0%.

Tiempo (min)	Actividad β -glucosidasa ^a											
	0,5/1 ^b			1/1 ^c			2/1 ^d			5/1 ^e		
	Libre	H ^f	Inmov.	Libre	H	Inmov.	Libre	H	Inmov.	Libre	H	Inmov.
0	14,73	0,59	n.d.	16,81	1,57	n.d.	15,31	2,86	n.d.	14,35	6,24	n.d.
15	14,98	0,63	11,71	17,10	1,69	14,96	15,57	3,07	14,60	14,59	6,71	15,94
60	14,04	0,59	11,51	16,02	1,57	15,38	14,59	2,86	14,25	13,68	6,24	15,51
120	13,65	0,58	11,69	15,58	1,55	15,62	14,19	2,82	15,03	13,30	6,15	15,59
240	14,14	0,58	11,20	16,14	1,55	14,36	14,70	2,82	14,17	13,78	6,15	15,37

^a En $\mu\text{g pNP ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ^b Con 0,3 mg humatos ml^{-1} ^c Con 0,6 mg humatos ml^{-1} ^d Con 1,2 mg humatos ml^{-1} ^e Con 3,0 mg humatos ml^{-1} ^f H: humatos

Tabla 4.11. Inmovilización de β -glucosidasa a 30°C por entrecruzamiento con humatos a través de glutaraldehído al 1,0%.

Tiempo (min)	Actividad β -glucosidasa ^a											
	0,5/1 ^b			1/1 ^c			2/1 ^d			5/1 ^e		
	Libre	H ^f	Inmov.	Libre	H	Inmov.	Libre	H	Inmov.	Libre	H	Inmov.
0	14,73	0,59	n.d.	16,81	1,57	n.d.	15,31	2,86	n.d.	14,35	6,24	n.d.
15	13,82	0,63	11,72	15,77	1,66	15,58	14,36	3,03	14,86	13,46	6,61	15,28
60	13,63	0,61	14,58	15,55	1,62	18,13	14,16	2,95	17,84	13,27	6,43	17,40
120	14,12	0,64	16,78	16,10	1,71	21,57	14,67	3,12	20,21	13,75	6,80	20,96
240	15,54	0,72	19,93	17,73	1,92	24,84	16,15	3,50	20,87	15,14	7,64	22,04

^a En $\mu\text{g pNP ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$

^b Con 0,3 mg humatos ml^{-1}

^c Con 0,6 mg humatos ml^{-1}

^d Con 1,2 mg humatos ml^{-1}

^e Con 3,0 mg humatos ml^{-1}

^f H: humatos

Tabla 4.12. Inmovilización de β -glucosidasa a 45°C por entrecruzamiento con humatos a través de glutaraldehído al 1,0%.

Tiempo (min)	Actividad β -glucosidasa ^a											
	0,5/1 ^b			1/1 ^c			2/1 ^d			5/1 ^e		
	Libre	H ^f	Inmov.	Libre	H	Inmov.	Libre	H	Inmov.	Libre	H	Inmov.
0	14,73	0,59	n.d.	16,81	1,57	n.d.	15,31	2,86	n.d.	14,35	6,24	n.d.
15	15,07	0,46	18,45	17,20	1,23	23,65	15,66	2,24	20,45	14,68	4,89	22,18
60	19,40	0,48	26,73	22,14	1,27	32,72	20,16	2,32	27,75	18,90	5,06	27,65
120	21,20	0,51	29,99	24,19	1,36	36,81	22,03	2,47	32,94	20,65	5,40	30,26
240	20,89	0,45	31,48	23,84	1,19	38,97	21,71	2,17	33,77	20,35	4,72	29,94

^a En $\mu\text{g pNP ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$

^b Con 0,3 mg humatos ml^{-1}

^c Con 0,6 mg humatos ml^{-1}

^d Con 1,2 mg humatos ml^{-1}

^e Con 3,0 mg humatos ml^{-1}

^f H: humatos

Tabla 4.13. Porcentajes de inmovilización de β -glucosidasa por entrecruzamiento con humatos a través de glutaraldehído al 1,0% a diferentes temperaturas, tiempos de tratamiento y proporciones humatos/enzima.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	% de inmovilización ^a			
		0,5/1 ^b	1/1 ^c	2/1 ^d	5/1 ^e
4	15	76,44	81,39	80,35	77,42
	60	75,13	83,68	78,43	75,33
	120	76,31	84,98	82,72	75,72
	240	73,11	78,13	77,99	74,65
30	15	76,50	84,77	81,78	74,21
	60	95,17	98,64	98,18	84,51
	120	109,53	117,36	111,23	101,80
	240	130,09	135,15	114,86	107,04
45	15	120,43	128,67	112,55	107,72
	60	174,48	178,02	172,72	134,29
	120	195,76	200,27	181,29	146,96
	240	205,48	212,02	185,86	145,41

^a En % respecto a la actividad inicial

^b Con 0,3 mg humatos ml⁻¹

^c Con 0,6 mg humatos ml⁻¹

^d Con 1,2 mg humatos ml⁻¹

^e Con 3,0 mg humatos ml⁻¹

fenólicos. Adicionalmente, se observaba que el incremento del tiempo de tratamiento provocaba un incremento del rendimiento de inmovilización, alcanzándose un máximo a los 120 min de agitación, tiempo a partir del cual la actividad de los complejos permanecía prácticamente constante. Es probable que a partir de ese momento, todos los grupos aldehído del reactivo bifuncional estuvieran interaccionando bien con el enzima o bien con el soporte polifenólico, impidiéndose, por tanto, la posibilidad de un mayor acoplamiento. Es posible que a esta temperatura y concentración de glutaraldehído (complejos de proporciones 0,5/1 y 1/1), las reacciones de entrecruzamiento, implicando al enzima y los polímeros fenólicos, mejorasen la accesibilidad del sustrato al complejo o modificasen

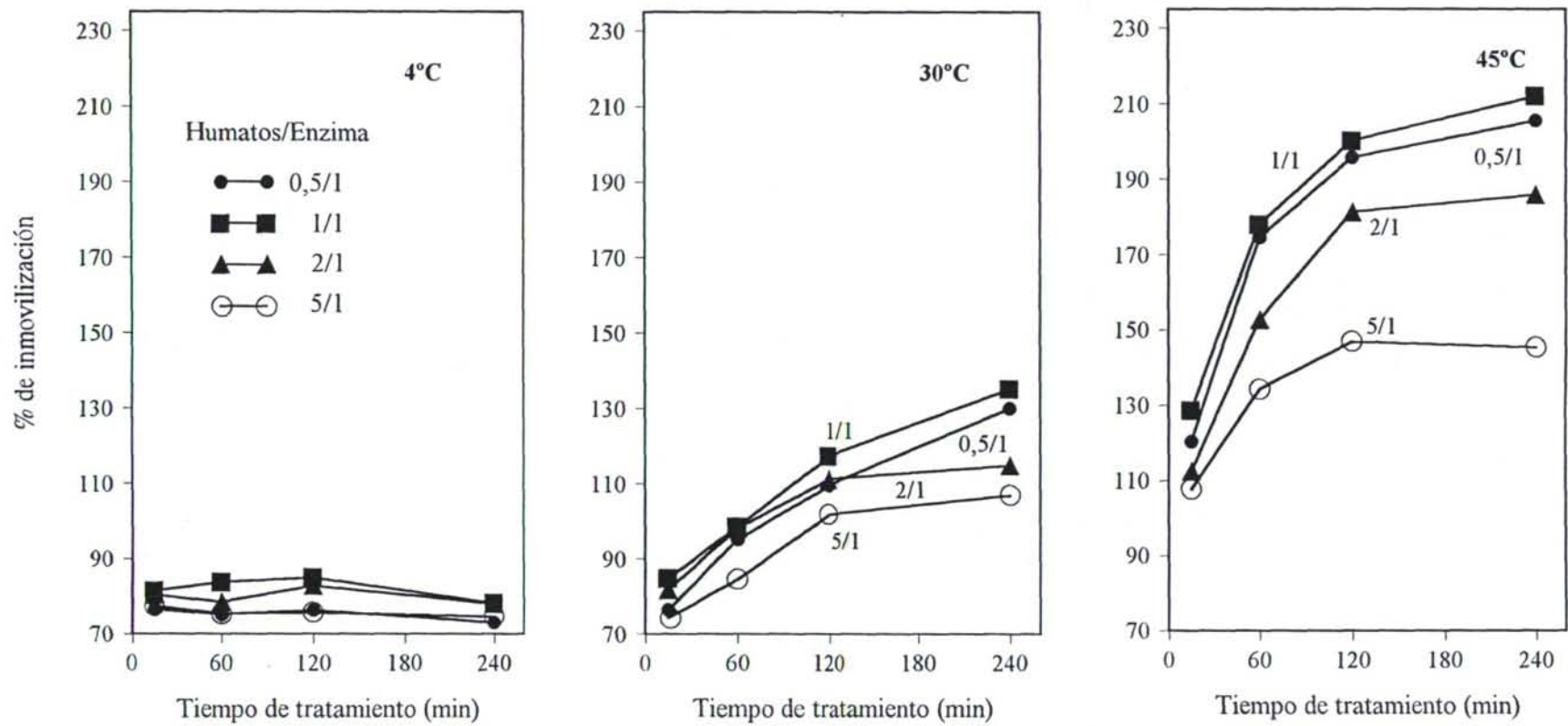


Fig. 4.6. Influencia de la temperatura sobre la inmovilización de β -glucosidasa por entrecruzamiento con humatos a través de glutaraldehído al 1,0% a diferentes proporciones humatos/enzima y tiempos de tratamiento.

favorablemente las características intrínsecas del enzima para provocar una activación del enzima inmovilizado.

Los resultados de la inmovilización de β -glucosidasa en complejos sintetizados con humatos a través de glutaraldehído al 2,5%, a 4, 30 y 45°C se detallan en las Tablas 4.14, 4.15 y 4.16 respectivamente. El incremento de la concentración del reactivo bifuncional suponía una disminución importante del rendimiento de inmovilización (Tabla 4.17). A pesar de que, en este caso, la temperatura parece tener menor influencia sobre los porcentajes de inmovilización, se seguían obteniendo los mejores resultados a la temperatura de 45°C. En la Fig. 4.7 se observa como, independientemente de la temperatura y tiempos de inmovilización, la inmovilización de β -glucosidasa en distintas concentraciones de humatos por entrecruzamiento con glutaraldehído presentaba un comportamiento específico: Para las concentraciones más bajas de humatos (0,5/1 y 1/1) los porcentajes de inmovilización oscilaban entre un 90-100% mientras que para concentraciones superiores (2/1 y 5/1) la actividad de los inmovilizados descendía apreciablemente (60-80%).

Finalmente, se ensayó puntualmente el entrecruzamiento con glutaraldehído al 5,0%, seleccionando, a partir de los resultados de las pruebas anteriores, la proporción humatos/enzima de 1/1 y la temperatura de tratamiento de 45°C. Los resultados (Tabla 4.18) confirman la importante pérdida de actividad (que en este caso era próxima al 40%) de los enzimas inmovilizados cuando se incrementaba la concentración de glutaraldehído a todos los tiempos de tratamiento estudiados.

Estos resultados podrían explicarse si se piensa que las reacciones del glutaraldehído con los grupos ϵ -amino de las proteínas enzimáticas implican tanto reacciones intramoleculares como intermoleculares. Las condiciones que favorecen uno u otro mecanismo dependen, entre otros factores, de las características de cada enzima (Jansen *et al.*, 1971). De hecho, en los resultados en los que la β -glucosidasa entrecruzada con glutaraldehído presentaba menor actividad que el enzima nativo podría pensarse en un mayor número de reacciones intramoleculares (Jansen *et al.*, 1971), mientras que un entrecruzamiento intermolecular podría explicar los resultados en los que se producía una activación de la β -glucosidasa inmovilizada (Wong y Wong, 1992).

Tabla 4.14. Inmovilización de β -glucosidasa a 4°C por entrecruzamiento con humatos a través de glutaraldehído al 2,5%.

Tiempo (min)	Actividad β -glucosidasa ^a											
	0,5/1 ^b			1/1 ^c			2/1 ^d			5/1 ^e		
	Libre	H ^f	Inmov.	Libre	H	Inmov.	Libre	H	Inmov.	Libre	H	Inmov.
0	24,71	0,70	n.d.	26,94	1,38	n.d.	28,89	3,23	n.d.	31,23	7,81	n.d.
15	25,13	0,75	21,00	27,40	1,48	22,32	29,38	3,47	20,91	31,76	8,40	25,02
60	23,55	0,70	19,96	25,67	1,38	25,33	27,53	3,23	20,95	29,76	7,81	25,12
120	22,91	0,69	21,17	24,97	1,36	25,33	26,78	3,18	21,34	28,95	7,69	25,33
240	23,72	0,69	20,28	25,86	1,36	22,63	27,83	3,18	21,16	29,98	7,69	24,14

^a En $\mu\text{g pNP ml}^{-1} \text{h}^{-1}$ ^b Con 0,3 mg humatos ml^{-1} ^c Con 0,6 mg humatos ml^{-1} ^d Con 1,2 mg humatos ml^{-1} ^e Con 3,0 mg humatos ml^{-1} ^f H: humatos

Tabla 4.15. Inmovilización de β -glucosidasa a 30°C por entrecruzamiento con humatos a través de glutaraldehído al 2,5%.

Tiempo (min)	Actividad β -glucosidasa ^a											
	0,5/1 ^b			1/1 ^c			2/1 ^d			5/1 ^e		
	Libre	H ^f	Inmov.	Libre	H	Inmov.	Libre	H	Inmov.	Libre	H	Inmov.
0	24,71	0,70	n.d.	26,94	1,38	n.d.	28,89	3,23	n.d.	31,23	7,81	n.d.
15	23,18	0,74	18,93	25,27	1,46	22,53	27,10	3,42	20,83	29,29	8,28	24,28
60	22,86	0,72	21,64	24,92	1,42	24,72	26,72	3,33	21,11	28,89	8,04	25,20
120	23,67	0,76	23,59	25,81	1,50	25,91	27,68	3,52	23,95	29,92	8,52	27,63
240	26,07	0,86	23,19	28,42	1,69	25,53	30,48	3,95	23,28	32,95	9,56	26,53

^a En $\mu\text{g pNP ml}^{-1} \text{h}^{-1}$

^b Con 0,3 mg humatos ml^{-1}

^c Con 0,6 mg humatos ml^{-1}

^d Con 1,2 mg humatos ml^{-1}

^e Con 3,0 mg humatos ml^{-1}

^f H: humatos

Tabla 4.16. Inmovilización de β -glucosidasa a 45°C por entrecruzamiento con humatos a través de glutaraldehído al 2,5%.

Tiempo (min)	Actividad β -glucosidasa ^a											
	0,5/1 ^b			1/1 ^c			2/1 ^d			5/1 ^e		
	Libre	H ^f	Inmov.	Libre	H	Inmov.	Libre	H	Inmov.	Libre	H	Inmov.
0	24,71	0,70	n.d.	26,94	1,38	n.d.	28,89	3,23	n.d.	31,23	7,81	n.d.
15	25,28	0,55	24,89	27,56	1,08	26,62	29,55	2,53	24,63	31,95	6,12	27,28
60	32,54	0,57	25,49	35,48	1,12	27,80	38,05	2,62	26,36	41,13	6,33	29,61
120	35,56	0,61	25,40	38,77	1,19	28,13	41,57	2,79	23,70	44,94	6,76	27,99
240	35,04	0,53	24,22	38,20	1,04	28,33	40,97	2,45	25,08	44,28	5,91	29,50

^a En $\mu\text{g pNP ml}^{-1} \text{h}^{-1}$

^b Con 0,3 mg humatos ml^{-1}

^c Con 0,6 mg humatos ml^{-1}

^d Con 1,2 mg humatos ml^{-1}

^e Con 3,0 mg humatos ml^{-1}

^f H: humatos

En definitiva, si considerásemos el efecto exclusivo del reactivo bifuncional y, por tanto nos abstraíramos del resto de variables implicadas en el proceso de inmovilización podríamos concluir que:

(1) A concentraciones bajas de glutaraldehído se potenciarían las interacciones de tipo intermolecular, lo que se traduciría en una ligera modificación de la actividad de la β -glucosidasa inmovilizada en relación a su contrapartida soluble, y

(2) Elevadas concentraciones de glutaraldehído implicarían una mayor grado de interacciones intramoleculares y por consiguiente una mayor alteración de la proteína enzimática (pérdida de actividad).

Tabla 4.17. Porcentajes de inmovilización de β -glucosidasa por entrecruzamiento con humatos a través de glutaraldehído al 2,5% a diferentes temperaturas, tiempos de tratamiento y proporciones humatos/enzima.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	% de inmovilización ^a			
		0,5/1 ^b	1/1 ^c	2/1 ^d	5/1 ^e
4	15	82,61	78,81	65,10	64,09
	60	78,52	89,44	65,22	64,34
	120	83,28	89,44	66,44	64,88
	240	78,79	79,91	65,88	61,83
30	15	74,50	79,56	64,85	62,19
	60	85,16	87,29	65,72	64,55
	120	92,84	91,49	74,56	70,77
	240	91,26	90,15	72,48	67,96
45	15	97,95	94,00	76,68	69,88
	60	100,31	98,16	82,07	75,85
	120	99,96	99,33	73,79	71,70
	240	95,32	100,04	78,08	75,56

^a En % respecto la actividad inicial.

^b Con 0,3 mg humatos ml⁻¹

^c Con 0,6 mg humatos ml⁻¹

^d Con 1,2 mg humatos ml⁻¹

^e Con 3,0 mg humatos ml⁻¹

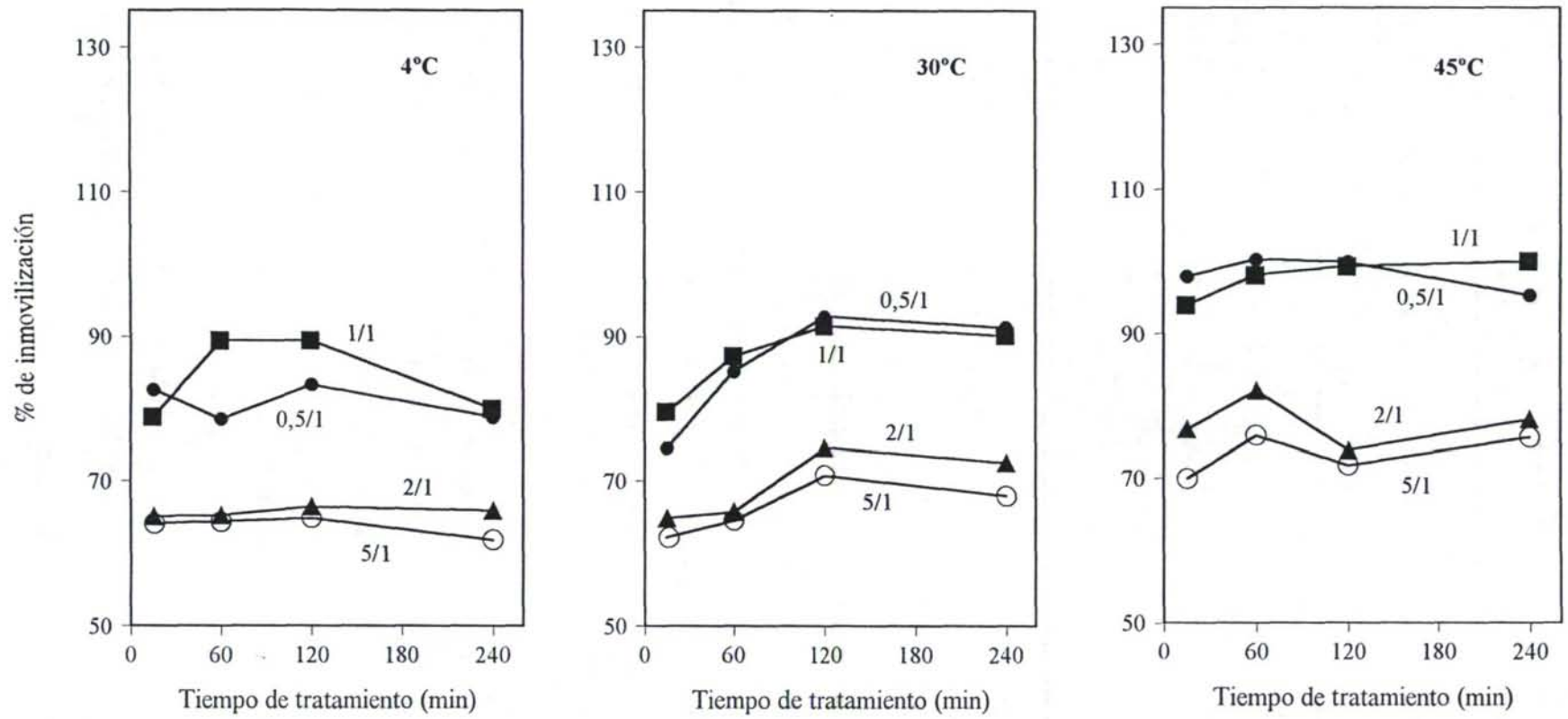


Fig. 4.7. Influencia de la temperatura sobre la inmovilización de β -glucosidasa por entrecruzamiento con humatos a través de glutaraldehído al 2,5% a diferentes proporciones humatos/enzima y tiempos de tratamiento.

Tabla 4.18. Efecto del tiempo de tratamiento sobre la inmovilización de β -glucosidasa a 45°C por entrecruzamiento con humatos edáficos (1/1) a través de glutaraldehído al 5,0%.

Tiempo (min)	Actividad β -glucosidasa ^a			% de inmovilización ^c
	Libre	H ^b	Inmovilizada	
0	51,49	1,79	n.d.	n.d.
15	52,67	1,40	32,42	60,85
60	67,81	1,45	34,68	65,09
120	74,09	1,55	32,03	60,11
240	73,01	1,36	33,50	62,88

^a En $\mu\text{g pNP ml}^{-1} \text{h}^{-1}$

^b H: humatos

^c Respecto a la actividad inicial

4.1.2.2.1. ESTABILIDAD TÉRMICA

Tal y como se ha comentado en el capítulo de antecedentes bibliográficos, la estabilidad de un enzima es una función compleja de las condiciones ambientales utilizadas. La estabilidad varía con el pH, la concentración de reactivo y la presencia de agentes estabilizantes (Zaborsky, 1973). La estabilidad de las preparaciones de enzimas o células, y los métodos capaces de aumentar dicha estabilidad, constituyen una cuestión de interés fundamentalmente en el campo de la tecnología de biocatalizadores.

Debido al elevado incremento de la actividad β -glucosidasa de los inmovilizados observado cuando se entrecruzaba con humatos a través de glutaraldehído, resultaba de interés comprobar si dichos aumentos provocaban además una estabilidad adicional de la proteína enzimática. Por ello, se utilizaron las condiciones de inmovilización óptimas obtenidas en las experiencias anteriores (concentración de glutaraldehído del 1,0%, proporción humato/enzima de 1/1 y tiempo y temperatura de tratamiento de 2 h y 45°C, respectivamente) para ensayar la estabilidad de la β -glucosidasa inmovilizada. Para el estudio de la estabilidad térmica se sometió: (i) al enzima inmovilizado con glutaraldehído al 1%, (ii) al enzima libre y (iii) a los ácidos húmicos a un pretratamiento térmico de 1 h de duración a temperaturas comprendidas entre 30 y 90°C.

Los resultados obtenidos (representados en la Fig. 4.8) muestran que a temperaturas bajas tanto el enzima libre como el inmovilizado presentaban la misma estabilidad, mientras que, tras el tratamiento a 70°C, el enzima inmovilizado permanecía un 10% más activo que el libre, siendo también ligeramente más estable para temperaturas superiores de tratamiento (Tabla 4.19).

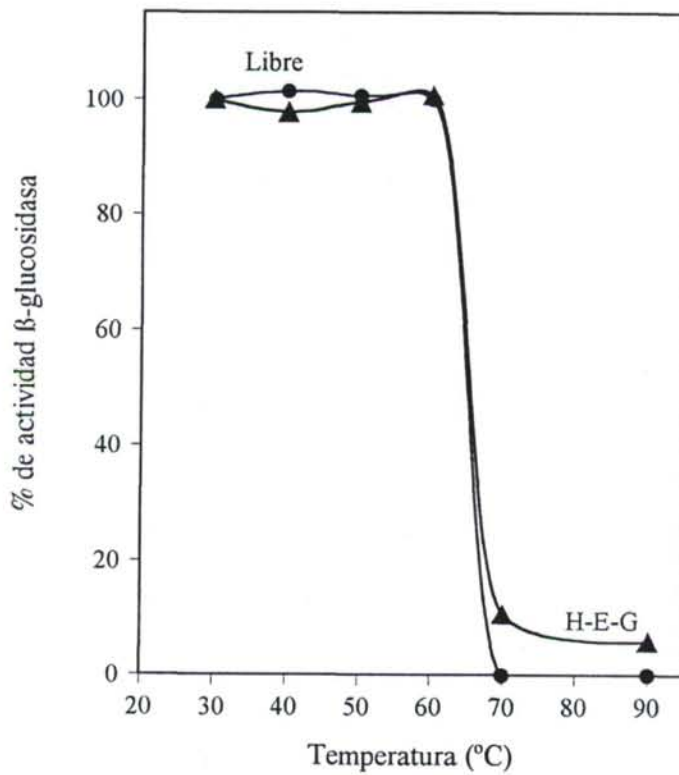


Fig. 4.8. Estabilidad térmica de β -glucosidasa entrecruzada con humatos a través de glutaraldehído al 1,0% (proporción humatos/enzima 1/1, temperatura 45°C y de 2 h de tratamiento).

Tabla 4.19. Estabilidad térmica de β -glucosidasa entrecruzada con humatos edáficos (1/1) a través de glutaraldehído al 1,0% ^a.

Temperatura (°C)	Actividad β -glucosidasa ^b		Actividad relativa (%)	
	Libre	Inmovilizada	Libre	Inmovilizada
30	15,39	35,43	100,00	100,00
40	15,62	34,67	101,49	97,86
50	15,18	35,26	100,67	99,52
60	15,49	35,71	100,04	100,80
70	0,00	3,77	0,00	10,64
90	0,00	2,12	0,00	5,97

^a Inmovilizada a 45°C durante 2 h.

^b En $\mu\text{g pNP ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$

4.1.2.2.2. ESTABILIDAD OPERACIONAL

En el suelo existe una amplia gama de organismos celulolíticos, de los cuales sólo unas pocas especies (principalmente hongos del género *Trichoderma*) producen todas las celulasas necesarias para la degradación completa de la celulosa. Es bien conocido el hecho de que muchas cepas de *Trichoderma* no producen cantidades suficientes de β -glucosidasa para que se generen los efectos cooperativos y sinérgicos de los diferentes enzimas celulolíticos necesarios para una rápida sacarificación de la celulosa (Wood *et al.*, 1980). Por consiguiente, la posibilidad de inoculación en el suelo de β -glucosidasa estabilizada podría resultar beneficioso tanto para la agricultura como para la descontaminación del medio ambiente. En este sentido, se determinó también la estabilidad operacional en muestras de suelo seleccionadas de la β -glucosidasa inmovilizada por humatos a través de glutaraldehído al 1,0% H-E-G (aptdo. 3.4.2.3). En la Tabla 4.20 se recogen los resultados de actividad obtenidos para el enzima libre y el inmovilizado. Adicionalmente, se incluyeron muestras de suelo control en las que no se había añadido el enzima.

Tabla 4.20. Estabilidad operacional de β -glucosidasa libre e inmovilizada ^a por humatos (proporción 1/1) a través de glutaraldehído al 1,0%.

Tiempo de incubación (días)	Actividad β -glucosidasa ^b		
	Control	Libre	Inmovilizada
0	221,82	351,13	257,26
1	187,65	289,24	247,30
3	248,01	338,82	436,45
7	231,53	294,49	428,18
10	250,48	360,78	499,01
16	206,16	295,78	289,58
20	206,16	295,78	302,56
30	132,14	162,88	203,65

^a Inmovilizada a 45°C durante 2 h.

^b En $\mu\text{g pNP g}^{-1}\text{suelo h}^{-1}$

Las muestras control presentaban oscilaciones de actividad β -glucosidasa mínimas durante todo el periodo de incubación. Este comportamiento podría entenderse si se considera que una fracción relativamente importante de enzimas se encontraban en el suelo estabilizados mediante asociación a soportes coloidales (Busto y Pérez-Mateos, 1995). Las oscilaciones observadas serían resultado de la actividad β -glucosidasa correspondiente a células microbianas proliferantes o a células parcialmente lisadas. Las muestras de suelo suplementadas con una cantidad adicional de enzima libre, una vez superados los tres primeros días de incubación en los que se observaba una cierta pérdida de la actividad inicial, seguían un comportamiento análogo al descrito para las muestras control (Fig. 4.9). Es decir, una cierta cantidad de enzima añadido podría degradarse de forma rápida, mientras que otra cantidad podría estabilizarse por asociación a los humatos y otros coloides edáficos. Esta última fracción se englobaría en el "nivel basal" de enzimas estabilizados que se observaba en las muestras control. No obstante, la naturaleza lábil de las interacciones entre la β -glucosidasa añadida y el material edáfico implica-

ban una pérdida importante de actividad después de un periodo prolongado de incubación (20 días).

En la Fig. 4.9 podemos observar que la adición del enzima inmovilizado (H-E-G) provocaba un aumento considerable de la actividad β -glucosidasa al cabo de 7 días de incubación (próximo al 70%). Esta activación podría entenderse si se tiene en cuenta la heterogeneidad y complejidad del medio al que se añadían las muestras: un sistema en el que coexisten gran diversidad de elementos reactivos. El propio soporte de inmovilización y el reactivo bifuncional glutaraldehído podrían llegar a establecer nuevos enlaces con material coloidal edáfico existente lo que conllevaría a una modificación del microambiente del enzima y/o a una alteración de su estructura.

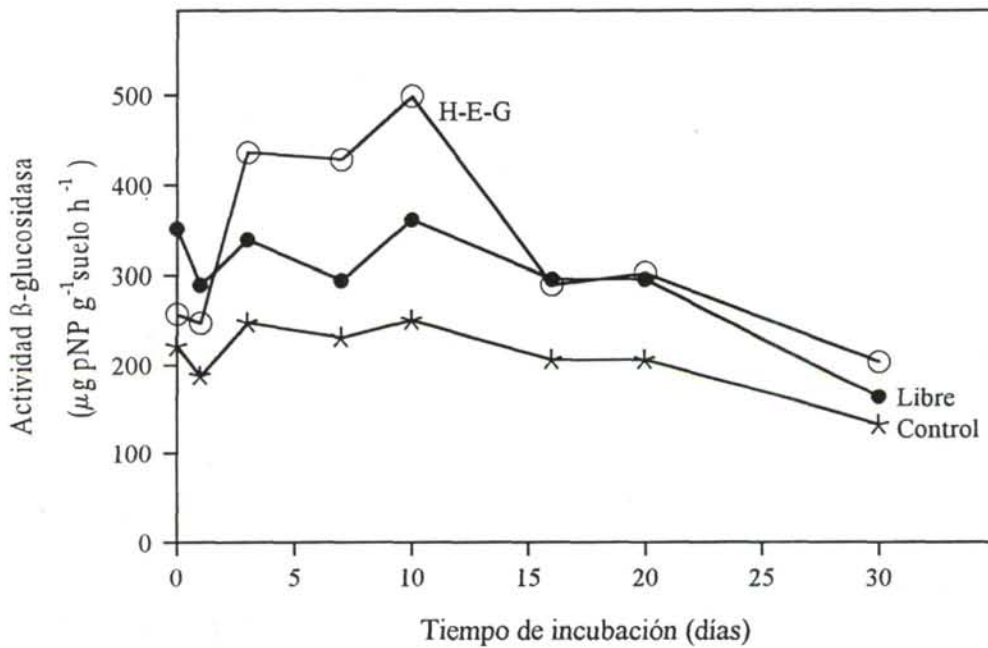


Fig. 4.9. Estabilidad operacional de β -glucosidasa libre e inmovilizada con humatos a través de glutaraldehído al 1,0% (H-E-G) (condiciones de inmovilización 2 h de tratamiento y 45°C).

4.1.2.3. INMOVILIZACIÓN POR COPOLIMERIZACIÓN FENÓLICA

Este procedimiento se basa en el hecho de que los compuestos fenólicos son sustratos de peroxidasas y lacasas que los transforman inicialmente en radicales y quinonas que pueden a su vez polimerizarse a través de uniones covalentes o por reacciones de adición nucleofílica (Rowell *et al.*, 1973; Ladd y Butler, 1975; Sarkar y Burns, 1984; Burns, 1986; Greco *et al.*, 1990). Los complejos polifenol-enzima formados se caracterizan por poseer propiedades químicas y estructurales comparables con las de complejos húmico-enzimáticos extraídos del suelo. Sarkar y Burns (1984) describieron la síntesis de diferentes copolímeros fenólicos con β -glucosidasa comercial utilizando L-tirosina, pirogalol y resorcinol, alcanzando los mejores resultados con el copolímero obtenido con resorcinol. A partir de estas experiencias, se procedió en este trabajo al estudio de la inmovilización de β -glucosidasa exocelular, aislada de *Aspergillus niger*, mediante copolimerización fenólica con resorcinol, siguiendo el método descrito por estos autores (ver aptdo. 3.2.5).

El copolímero β -glucosidasa-resorcinol sintetizado retenía un 51,1% de actividad y, por tanto, resultaba comparable con el 55% de retención obtenido por Sarkar y Burns cuando usaban enzima puro comercial. La inactivación que presentaban los copolímeros sintetizados estaba ocasionada probablemente por las propias quinonas o por los residuos de monómeros aromáticos presentes durante el proceso de copolimerización. La estructura química y el grado de polimerización podían afectar también la actividad enzimática del producto final (Sarkar y Burns, 1984). Los compuestos húmicos, las ligninas y sus derivados son conocidos por inhibir la actividad enzimática en los medios edáficos (Mato *et al.*, 1972; Vohra *et al.*, 1980).

El mecanismo por el cual el enzima se une a los polifenoles se conoce con exactitud, aunque se sabe que el enzima se asocia después de que la peroxidasa haya inducido la polimerización oxidativa de las unidades de compuesto fenólico. De hecho, si el enzima se adiciona antes de la formación de las quinonas, tiene lugar su adsorción sobre los polifenoles, dando lugar a un enzima inactivo e inestable (Maignan, 1982; Sarkar y Burns, 1984; Burns, 1987).

4.1.2.3.1. ESTABILIDAD TÉRMICA

El estudio de la estabilidad térmica de la β -glucosidasa libre e inmovilizada en el copolímero se efectuó mediante (i) pretratamiento térmico de 1 h de duración a diferentes temperaturas comprendidas entre 30 y 90°C y (ii) estudio de la vida media de ambos enzimas a 55 y 60°C.

En la Fig. 4.10 se representa el porcentaje de actividad β -glucosidasa residual a las diferentes temperaturas de pretratamiento, tanto para el enzima libre como para el inmovilizado mediante copolimerización fenólica. Los resultados confirman que el copolímero era más estable desde el punto de vista térmico que el enzima libre. Mientras que la β -glucosidasa libre no sufría variación de su actividad tras el tratamiento a 50°C, el copolímero experimentaba una activación de aproximadamente un 8% (Tabla 4.21). A 60°C la estabilidad del enzima libre e inmovilizado eran similares, mientras que, a temperaturas superiores a las señaladas (70 y 90°C) el copolímero formado entre el enzima y el resorcinol exhibía mayor estabilidad.

Adicionalmente, se determinó la vida media, tanto del enzima libre como del inmovilizado a 55 y 60°C, mediante incubación de las muestras enzimáticas durante intervalos de tiempos comprendidos entre 0 y 7 h, evaluando posteriormente la actividad enzimática residual (Tabla 4.22). A partir de los datos obtenidos se calcularon los valores de vida media (Tabla 4.23) a partir de la regresión lineal del logaritmo de la actividad relativa frente al tiempo (Fig. 4.11). A 55°C la vida media para el enzima libre era de 18 h, mientras que el copolímero alcanzaba las 22 h. En contraste, a 60°C las vidas medias respectivas eran muy similares, siendo inclusive ligeramente inferior la del enzima inmovilizado mediante copolimerización fenólica con resorcinol. Es decir, el copolímero presentaba una mayor estabilidad operacional a temperaturas inferiores a 60°C.

4.1.2.3.2. ESTABILIDAD OPERACIONAL

Un aspecto interesante a tener en cuenta, debido fundamentalmente a la propia naturaleza del inmovilizado, era el estudio de la estabilidad operacional en medios edáficos. La representación de la actividad β -glucosidasa del suelo control así como la de las muestras de suelo suplementadas con enzima libre y copolímero fenólico frente al tiempo

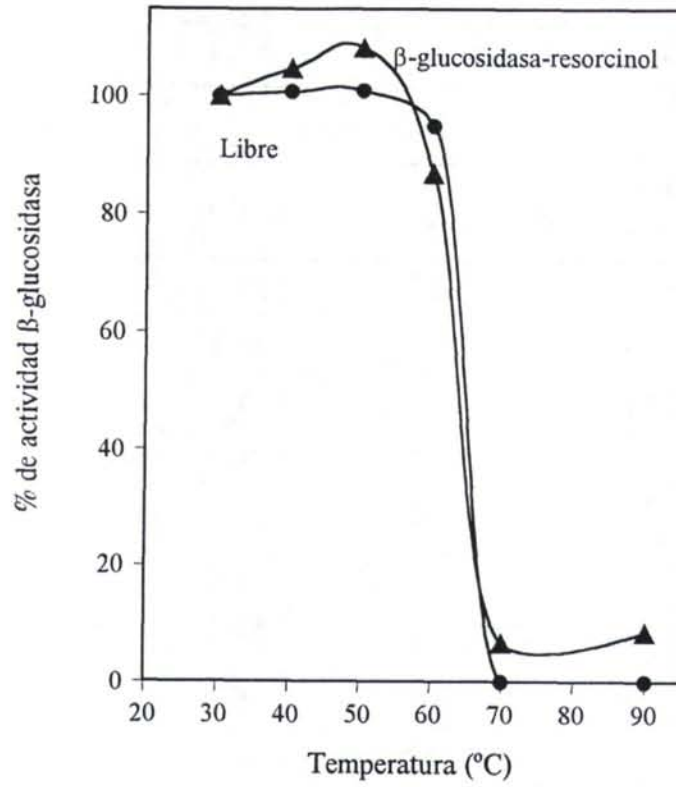


Fig. 4.10. Estabilidad térmica del copolímero β -glucosidasa-resorcinol.

Tabla 4.21. Estabilidad térmica del copolímero sintético β -glucosidasa-resorcinol.

Temperatura de pretratamiento (°C)	Actividad β -glucosidasa ^a		Actividad relativa (%)	
	Libre	Inmovilizada	Libre	Inmovilizada
30	3,79	1,22	100,00	100,00
40	3,81	1,28	100,67	104,74
50	3,83	1,32	100,91	108,34
60	3,60	1,06	94,90	86,86
70	0,00	0,08	0,00	6,73
90	0,00	0,11	0,00	8,68

^a En $\mu\text{g pNP ml}^{-1}$ copolímero h^{-1}

Tabla 4.22. Relación logarítmica entre la actividad de la β -glucosidasa libre e inmovilizada mediante copolimerización fenólica y el tiempo de incubación a distintas temperaturas.

Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Enzima libre			Enzima inmovilizada		
		A β G ^a	A β GR ^b	lg(A β GR)	A β G	A β GR	lg(A β GR)
55	0	6,88	100,00	2,00	3,83	100,00	2,00
	1	5,04	73,22	1,86	3,53	92,17	1,96
	2	4,32	62,81	1,80	3,33	86,94	1,94
	3	3,51	50,96	1,71	2,69	70,23	1,85
	4	3,51	45,77	1,66	2,74	71,54	1,85
	5	2,77	40,21	1,60	2,59	67,62	1,83
	6	2,88	41,85	1,60	2,02	52,74	1,72
	7	2,50	36,39	1,62	1,79	46,74	1,67
60	0	6,76	100,00	2,00	3,75	100,00	2,00
	1	6,55	92,54	1,98	2,75	73,33	1,87
	2	4,70	68,34	1,83	2,21	58,93	1,77
	3	3,27	47,58	1,68	2,28	60,80	1,78
	4	2,38	34,61	1,54	1,42	37,87	1,58
	5	1,76	25,60	1,41	1,06	28,27	1,45
	6	1,04	15,16	1,18	0,39	10,40	1,00
	7	1,01	14,71	1,17	0,29	7,73	0,89

^a A β G: Actividad β -glucosidasa en $\mu\text{g pNP ml}^{-1}$ copolímero h⁻¹

^b A β GR: Actividad β -glucosidasa relativa en %

Tabla 4.23. Vida media de la β -glucosidasa libre e inmovilizada mediante copolimerización fenólica.

Temperatura (°C)	Enzima libre		Enzima inmovilizada	
	Vida media (h)	r ^a	Vida media (h)	r ^a
55	17,55	0,9312	22,01	0,9750
60	7,74	0,9890	6,67	0,9551

^a Coeficiente de correlación de la recta $\lg(\text{A}\beta\text{GR}) = f(t)$

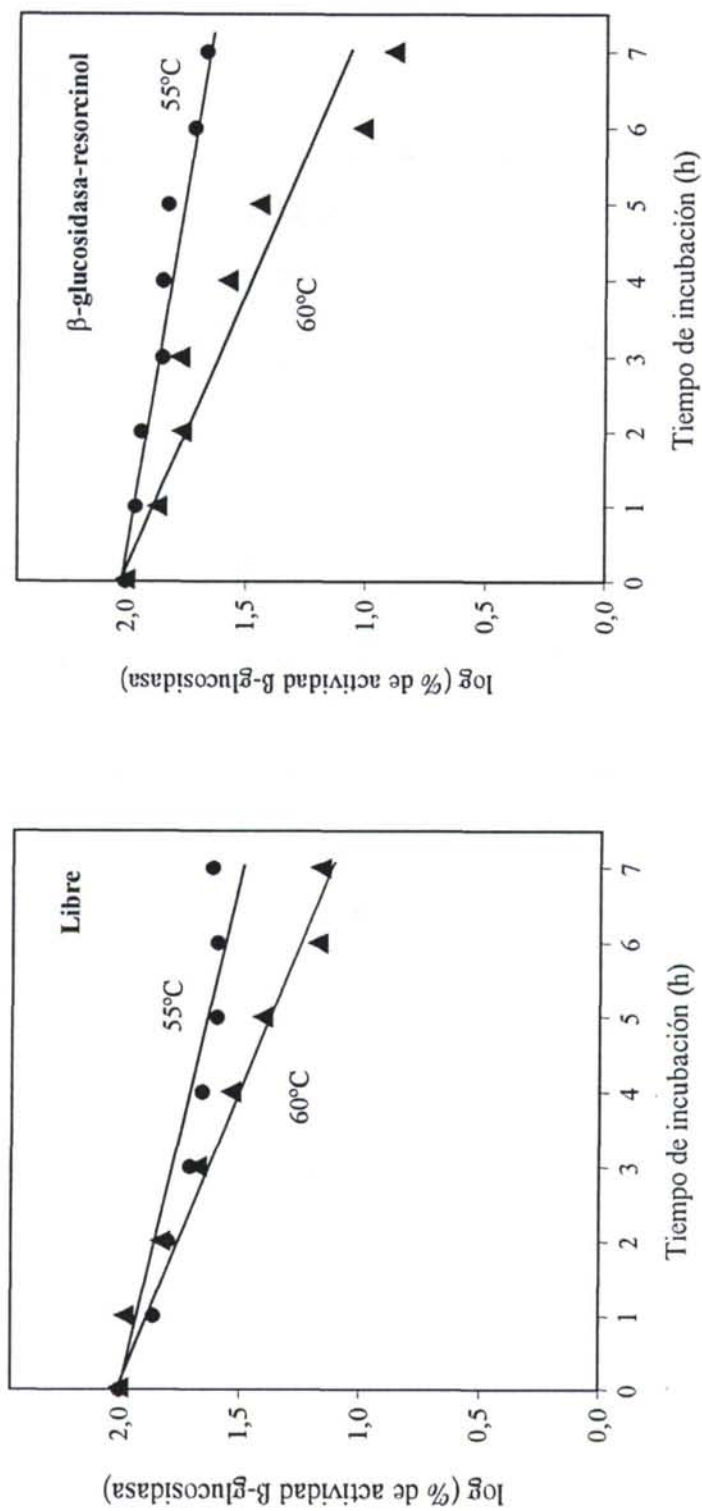


Fig. 4.11. Relación logarítmica entre la actividad β-glucosidasa libre e inmovilizada por copolimerización fenólica y el tiempo de incubación a diferentes temperaturas.

(Fig. 4.12), demostraba que mientras que el enzima libre era inactivado después de 30 días de incubación, el inmovilizado permanecía prácticamente inalterado con relación al control (Tabla 4.24).

En conclusión podemos afirmar que si bien, los copolímeros fenólicos sintetizados con β -glucosidasa exocelular de *A. niger* y resorcinol presentaban una disminución de su actividad, incrementaban en cambio su estabilidad térmica y operacional. Por tanto, parece muy probable que la copolimerización de enzimas durante la formación de la materia húmica sea uno de los factores más importantes que conducen a la estabilización de enzimas en el suelo.

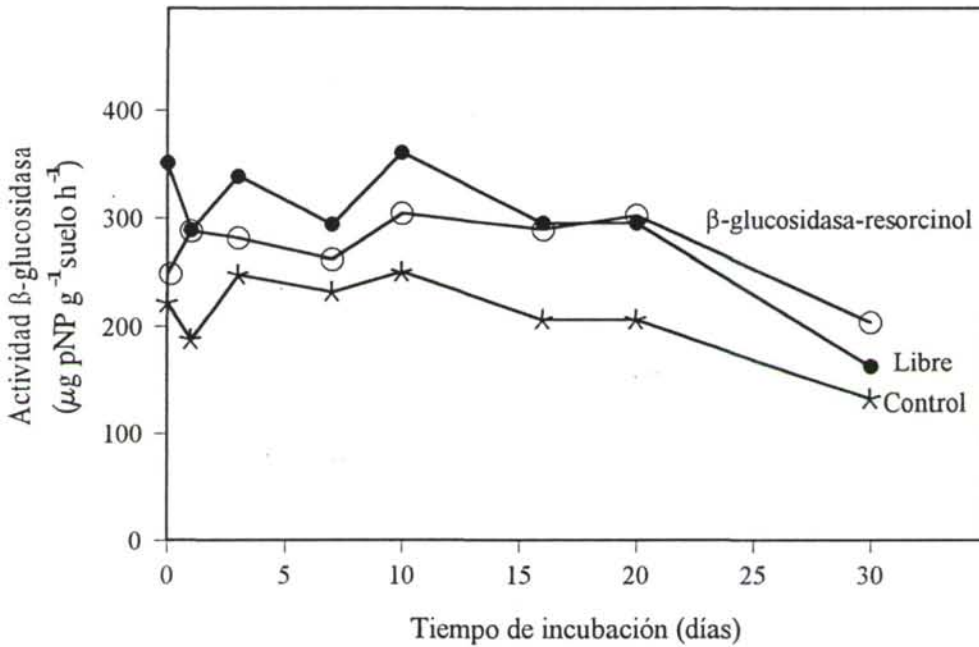


Fig. 4.12. Estabilidad operacional en medios edáficos de β -glucosidasa libre e inmovilizada por copolimerización fenólica con resorcinol.

Tabla 4.24. Estabilidad operacional de la β -glucosidasa libre e inmovilizada por copolimerización fenólica en medios edáficos.

Tiempo de incubación (días)	Actividad β -glucosidasa ^a		
	Control	Libre	Inmovilizada
0	221,82	351,13	249,09
1	187,65	289,24	288,45
3	248,01	338,82	282,05
7	231,53	294,49	262,10
10	250,48	360,78	434,63
16	206,16	295,78	289,58
20	206,16	295,78	302,56
30	132,14	162,88	203,65

^a En $\mu\text{g pNP g}^{-1}\text{suelo h}^{-1}$

**4.2. CARACTERIZACIÓN DE LA β -GLUCOSIDASA
INMOVILIZADA EN GELES DE ALGINATO Y
POLIACRILAMIDA**

Cuando un enzima se une a una matriz sólida sus propiedades pueden cambiar de forma muy significativa. Tales alteraciones son atribuibles: (i) a la naturaleza física y química del soporte (que modifica el microentorno del enzima inmovilizado); (ii) a cambios químicos y/o conformacionales de la estructura enzimática producidos durante la inmovilización y (iii) a la naturaleza heterogénea de la catálisis al emplear un enzima "estático" (Vieth y Venkatasubramanian, 1974). Para hacer el mejor uso de las técnicas de inmovilización, es esencial conocer los cambios que se producen en las propiedades físicas y químicas de un enzima durante el tratamiento de inmovilización. Por ejemplo, en la mayor parte de casos, se observan cambios en las propiedades cinéticas del enzima, debido al cambio del microambiente impuesto por la matriz del soporte y los productos de la reacción.

Los rendimientos elevados obtenidos cuando se utilizaban las técnicas de atrapamiento de enzimas en geles de alginato de calcio y poliacrilamida, así como la posibilidad de reutilización de las proteínas inmovilizadas por asociación a soportes sólidos, motivaron que se estudiara, en este trabajo, las características de los inmovilizados en relación a sus contrapartidas solubles, con objeto de obtener las condiciones catalíticas más adecuadas. En este sentido, se investigaron las características cinéticas de la β -glucosidasa libre e inmovilizada, tanto en geles de alginato de calcio como de poliacrilamida, la influencia del pH y la temperatura sobre su actividad, la estabilidad térmica, la estabilidad frente a la acción de enzimas proteolíticos y la estabilidad operacional en medios edáficos. Las condiciones de inmovilización utilizadas fueron las descritas como óptimas en los apartados anteriores.

4.2.1. CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS

Se ha demostrado que la inmovilización de un enzima puede producir cambios en los valores de sus parámetros cinéticos (K_m y V_{max}) y variaciones en los perfiles pH-actividad (Goldstein, 1976). Las cinéticas de estas reacciones son en ocasiones desconocidas y los parámetros cinéticos observados son sólo aparentes (Vieth y Venkatasubramanian, 1974). Goldstein *et al.* interpretaron en 1964 estas variaciones basándose en la teoría de Donnan y en la idea de que las concentraciones de las moléculas con carga (incluido el protón) podrían ser diferentes en la solución global con respecto a las del microentorno del enzima inmovilizado. Esta situación podría provocar variaciones en las constantes cinéticas y en el valor de las constantes aparentes de los enzimas.

4.2.1.1. CINÉTICA DE MICHAELIS-MENTEN

Cuando un enzima es inmovilizado, su comportamiento cinético se ve afectado por varios factores: (i) por cambios en la conformación de la proteína, (ii) por efectos estéricos, (iii) por efectos microambientales y (iv) por efectos difusionales externos e internos (Vieth y Venkatasubramanian, 1974).

El estudio del comportamiento cinético de β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato y de poliacrilamida se realizó mediante la determinación de la actividad enzimática a distintas concentraciones del sustrato pNPG (Tabla 4.25). La Fig. 4.13 muestra la representación de Lineweaver-Burk para los datos obtenidos, mostrándose que tanto la β -glucosidasa procedente del extracto crudo de *A. niger* como la inmovilizada en alginato de calcio seguían una cinética típica de Michaelis-Menten. Sin embargo, el enzima inmovilizado en geles de poliacrilamida presentaba cierta desviación de este modelo cinético a concentraciones de sustrato superiores a 10 mM. Este comportamiento es característico de enzimas con inhibición por exceso de sustrato (p.e. Stenberg *et al.*, 1977; Parr, 1983; Busto *et al.*, 1995). Posiblemente, la concentración de sustrato en torno al centro activo era suficiente para provocar un efecto inhibitorio, más acentuado en

Tabla 4.25. Cinética de β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato y de poliacrilamida.

Concentración de sustrato ^a (mM)	Actividad β -glucosidasa ^b		
	Libre	Inmovilizada	
		Alginato	Poliacrilamida
0,5	21,19	11,88	10,30
1,0	42,10	21,15	17,66
2,0	72,84	42,49	32,37
5,0	121,61	64,83	55,19
8,0	120,21	75,62	62,65
10,0	136,78	80,37	65,71
15,0	134,00	74,61	46,78

^a pNPG: p-nitrofenil β -D-glucopiranosido

^b En $\mu\text{g pNP ml}^{-1}\text{gel h}^{-1}$

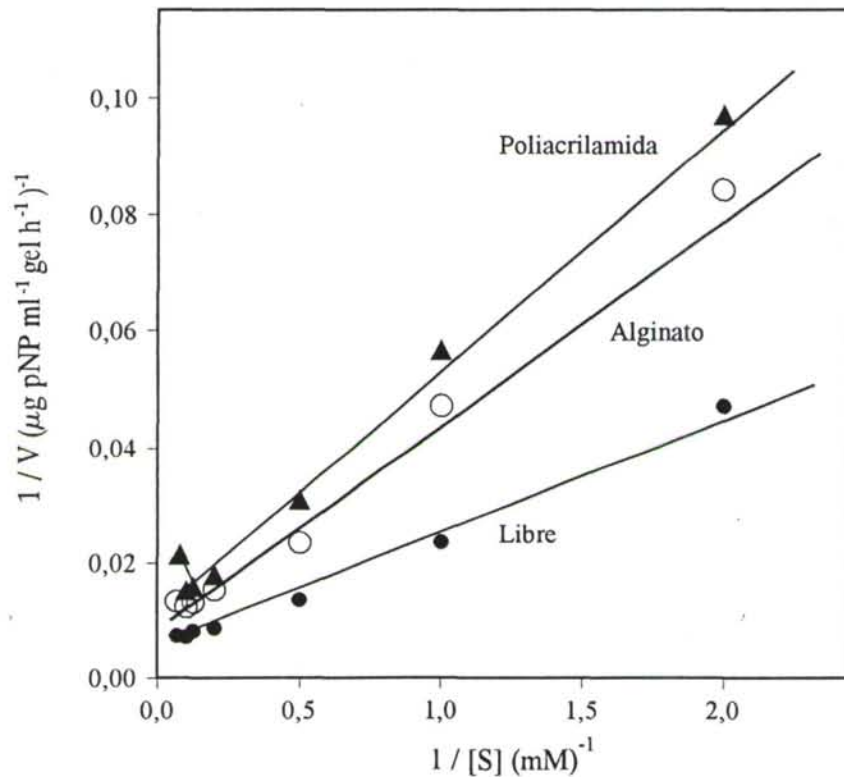


Fig. 4.13. Representación de Lineweaver-Burk para la cinética de β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato y de poliacrilamida.

el caso de inmovilización por geles de poliacrilamida. En este tipo de inhibición por exceso de sustrato se calculó las constantes cinéticas del enzima utilizando sólo los valores correspondientes al tramo recto de la gráfica para bajas concentraciones de sustrato (Parr, 1983). Las constantes cinéticas K_m y V_{max} calculadas se detallan en la Tabla 4.26.

Tabla 4.26. Constantes cinéticas de Michaelis de β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato y de poliacrilamida.

Enzima	Soporte	V_{max}^a	K_m^b	r^c
Libre	---	202,32	4,15	0,9967
Inmovilizado	Alginato	130,73	5,00	0,9982
	Poliacrilamida	97,37	4,26	0,9991

^a En $\mu\text{g pNP ml}^{-1}\text{gel h}^{-1}$

^b En mM

^c Coeficiente de correlación lineal de Lineweaver-Burk

El valor calculado para la K_m del enzima libre era de 4,15 mM, mientras que las constantes aparentes del inmovilizado en geles de alginato y de poliacrilamida sugerían que la afinidad del enzima por el sustrato era menor en la β -glucosidasa inmovilizada en alginato y similar en la retenida por geles de poliacrilamida, con respecto a la contrapartida soluble. El incremento de la K_m en un factor de 1,20, para la β -glucosidasa atrapada en la matriz de alginato, sugería que la red polimérica limitaba el acceso de sustrato y la difusión del producto a través del polímero semipermeable (Mori *et al.*, 1974). El tamaño de poro y la cantidad de enzima unida al soporte tenían gran influencia sobre la magnitud de los valores aparentes de la K_m , junto con los efectos de difusión interna, pudiendo ser los principales responsables del incremento de las constantes en los enzimas inmovilizados (Mansfeld y Schellenberg, 1987). Sin embargo, los geles de poliacrilamida son polímeros no cargados, cuyos efectos difusionales podrían resultar, por tanto, despreciables (Ohmiya *et al.*, 1975). Por consiguiente, resulta lógico que los valores de $K_{m,app}$ del enzima inmovilizado en este soporte y los del enzima libre fueran del mismo rango.

Por otra parte, la V_{max} de β -glucosidasa inmovilizada en geles de alginato y poliacrilamida eran un 35 y un 52% menor que la del enzima soluble, respectivamente. Estos

resultados estaban en concordancia con la cantidad de enzima que permanecía activo en el interior de ambos geles (Tablas 4.1 y 4.3).

4.2.1.2. INFLUENCIA DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

El efecto del pH sobre los enzimas inmovilizados es en principio impredecible, ya que en ocasiones tanto el pH óptimo como las curvas pH-actividad sufren modificaciones durante el proceso de inmovilización, aunque a veces se modifica uno de los dos o incluso permanecen inalterados (Yabushita, 1988). De hecho, se han publicado resultados según los cuales los perfiles de pH pueden verse desplazados, distorsionados, ensanchados o estrechados como consecuencia de la inmovilización (Zaborsky, 1972; Goldstein, 1972). Teniendo en cuenta que las características cinéticas pueden modificarse durante la inmovilización, se ensayó la actividad enzimática de los enzimas libre e inmovilizados a ocho valores de pH del medio de incubación comprendidos entre 2,0 y 8,0 (ver aptdo. 3.4.1.2).

Las curvas correspondientes a la representación de la actividad β -glucosidasa relativa frente a las variaciones de pH del medio de incubación se muestran en la Fig. 4.14. En ella puede observarse que el valor de pH óptimo del enzima libre y de los inmovilizados coincidía en torno a 4,0, con perfiles pH-actividad similares entre sí. Las pequeñas diferencias entre las curvas pH-actividad del enzima inmovilizado en alginato con un ligero desplazamiento de la curva a valores ácidos de pH con respecto a la del libre podrían explicarse por la presencia de cargas positivas en la matriz (Adami *et al.*, 1988), lo cual provocaría un microambiente más básico en torno al enzima inmovilizado. Esta diferencia en la concentración de protones podría explicar que el enzima inmovilizado por alginato fuera un 10% más activo que su contrapartida soluble a valores de pH muy ácidos (entre 2 y 3). De hecho, la estabilidad de los enzimas al pH parecía depender fundamentalmente de la naturaleza de la carga superficial del transportador. Estos cambios se manifiestan como alteraciones en el microentorno alrededor del enzima (Vieth y Venkatasubramanian, 1974). La carga electrostática del polímero podría tener un efecto sobre la estabilidad de los grupos ionizables del centro activo del enzima, haciendo así que suba o baje el valor del pKa. En la práctica, es imposible distinguir entre este mecanismo y el

de reparto desigual de iones hidrógeno. Un soporte cargado negativamente podría atraer protones, de forma que provocaría un desplazamiento del pH óptimo de los enzimas enlazados a dicho soporte hacia regiones alcalinas (Benesi y McLaren, 1976). De hecho, un valor de pH óptimo más elevado puede indicar mayor grado de inmovilización enzimática (Pérez-Mateos y González, 1987).

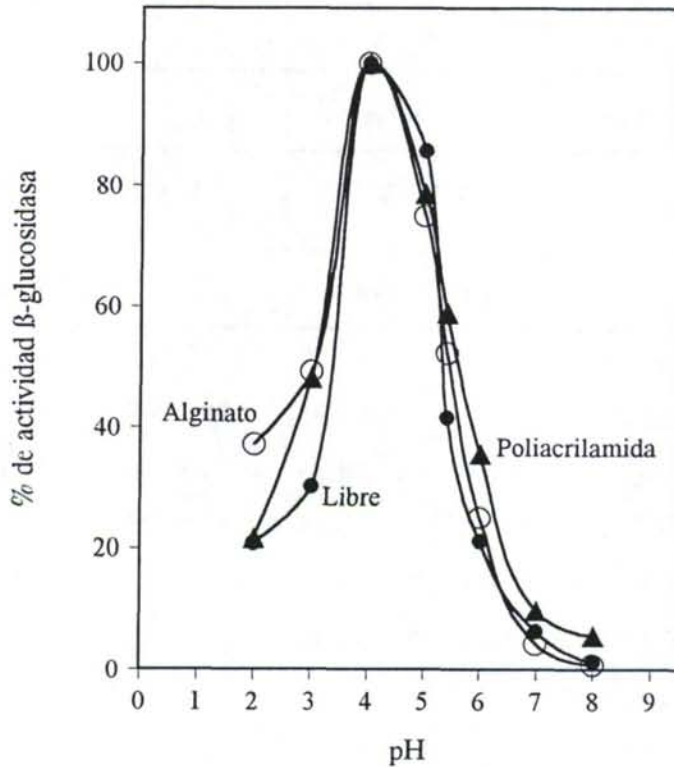


Fig. 4.14. Curvas pH-actividad para β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato y de poliacrilamida.

El perfil de pH del enzima inmovilizado por geles de poliacrilamida experimentaba un pequeño ensanchamiento en comparación con el del enzima libre. Este tipo de comportamiento es típico de enzimas que muestran una sensibilidad disminuida frente a los cambios de pH. Así, a pH 3 el enzima inmovilizado era un 18% más activo que su contrapartida soluble (Tabla 4.27). También a valores de pH superiores al de pH óptimo se apreciaba una menor inactivación del enzima insolubilizado en este soporte (Fig.

4.14). Sin embargo, la matriz de poliacrilamida no es iónica (Kierstan y Coughlan, 1985) y por tanto los perfiles de pH-actividad deberían de permanecer mínimamente alterados. En todo caso, las diferencias eran muy pequeñas y además se pueden encontrar ejemplos donde se producen modificaciones importantes de dichas curvas (Mori *et al.*, 1972; Trevan, 1990; Abdellah *et al.*, 1992).

Tabla 4.27. Efecto del pH sobre la actividad β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato y de poliacrilamida.

pH	Actividad β -glucosidasa ^a			A β G relativa (%)		
	Libre	Inmovilizada		Libre	Inmovilizada	
		Alginato	Poliacril.		Alginato	Poliacril.
2,0	60,74	51,41	51,05	20,82	37,21	21,54
3,0	88,60	68,19	113,91	30,37	49,34	48,07
4,0	291,71	138,19	236,96	100,00	100,00	100,00
5,0	250,23	103,68	186,45	85,75	75,03	78,69
5,4	121,51	72,45	139,71	41,65	52,43	58,96
6,0	61,79	38,41	84,36	21,18	25,19	35,60
7,0	18,69	6,07	23,11	6,41	4,39	9,75
8,0	3,74	1,22	13,43	1,28	0,88	5,67

^a En $\mu\text{g pNP ml}^{-1}\text{gel h}^{-1}$

Podemos concluir diciendo que el efecto del pH sobre la actividad de enzimas inmovilizados y de sus contrapartidas solubles era pequeña, aunque difícil de predecir, puesto que existen cuatro posibles causas que pueden presentarse independientemente o en combinación para explicar estos efectos: el reparto desigual de los iones hidrógeno, las cargas electrostáticas del polímero, la difusión limitada de protones producidos o consumidos en la reacción y la difusión limitada del sustrato (Trevan, 1990).

4.2.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA DE INCUBACIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Aunque los catalizadores biológicos pierden su actividad a partir de ciertas temperatura debido a fenómenos de desnaturalización proteica, la actividad catalítica de los enzimas depende (al igual que en los catalizadores químicos ordinarios) de la temperatura a la cual se lleve a cabo la reacción (Chibata, 1978). Para estudiar la influencia de la temperatura sobre la actividad enzimática de la proteína libre e inmovilizada se determinó dicha actividad en muestras incubadas a diferentes temperaturas comprendidas entre 30 y 90°C.

Los resultados obtenidos (Tabla 4.28) demostraban que la temperatura óptima de la β -glucosidasa libre e inmovilizada en alginato de calcio era de 60°C. Además en la Fig. 4.15 se muestra como la respuesta de la capacidad catalítica de ambos tipos de enzimas inmovilizados frente a la temperatura resultaba similar a la del soluble. En todo caso, la inmovilización de β -glucosidasa en poliacrilamida parecía producir la mayor modificación en el comportamiento enzimático frente a la temperatura. El perfil de temperaturas para el enzima retenido en esta matriz presentaba una mayor amplitud que para el enzima soluble, lo que se traducía en un rango óptimo de temperaturas en el que se mantenía el 95% de actividad entre 50 y 60°C. Además, mientras que a temperaturas bajas el comportamiento de ambos enzimas era similar, a temperaturas superiores al óptimo se observaba una mayor actividad en el inmovilizado. De este forma, a 90°C el enzima atrapado en geles de poliacrilamida mantenía un 57% de su actividad máxima, mientras que el soluble había perdido casi el 80%. La mayor estabilidad del enzima inmovilizado podría deberse a una alteración en la estructura del gel a temperaturas elevadas.

Tabla 4.28. Influencia de la temperatura de incubación sobre la actividad β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato y de poliacrilamida.

Temp. (°C)	Actividad β -glucosidasa ^a			A β G relativa (%)		
	Libre	Inmovilizada		Libre	Inmovilizada	
		Alginato	Poliacril.		Alginato	Poliacril.
30	91,37	49,10	55,63	26,53	22,16	25,19
40	171,16	10,16	86,29	49,71	45,20	39,08
50	248,03	154,34	220,80	72,03	69,64	100,00
60	344,33	221,61	212,94	100,00	100,00	96,44
70	215,45	142,15	161,56	52,57	64,15	73,17
90	77,43	53,68	125,30	22,49	24,22	56,75

^a En $\mu\text{g pNP ml}^{-1} \text{ gel h}^{-1}$

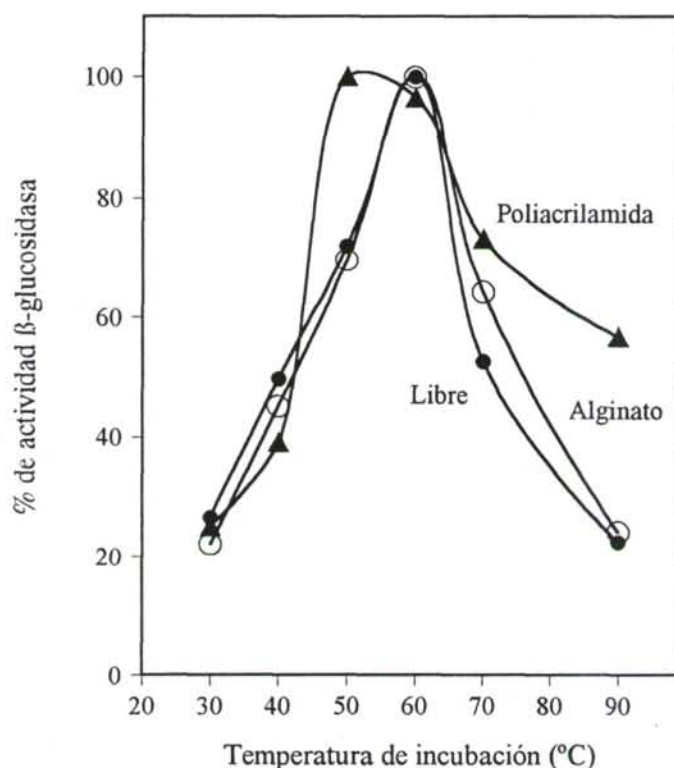


Fig. 4.15. Influencia de la temperatura de incubación sobre la actividad β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato y de poliacrilamida.

4.2.3. ESTABILIDAD TÉRMICA

Se ha estudiado la estabilidad térmica de un gran número de enzimas inmovilizados, comprobándose que no existe al igual que con el pH, un comportamiento general frente a los cambios de temperatura. Además, es difícil juzgar si las diferencias encontradas entre la estabilidad térmica de los enzimas libres e inmovilizados, son ocasionadas por el tipo de soporte, por el proceso de inmovilización o por la propia naturaleza del enzima (Vieth y Venkatasubramanian, 1974). De hecho, la estabilidad enzimática del inmovilizado puede ser mayor, menor o igual a la del enzima libre (Guisan y Ballesteros, 1979). En cualquier caso, el estudio de la estabilidad térmica de los enzimas inmovilizados puede proporcionar información interesante sobre los enzimas fijados a un soporte (Pérez-Mateos y González, 1987).

4.2.3.1. PRETRATAMIENTO TÉRMICO

En primer lugar, se determinó la estabilidad térmica de los enzimas ensayando la actividad β -glucosidasa residual de muestras enzimáticas que habían sido sometidas a un tratamiento previo durante 1 h a temperaturas comprendidas entre 30 y 90°C.

En la Fig. 4.16 se representa el porcentaje de actividad frente a la temperatura de pretratamiento, observándose la mayor estabilidad del enzima libre en el rango de temperaturas comprendido entre 30 y 60°C. A partir de esta temperatura, la actividad de la β -glucosidasa descendía bruscamente y llegaba a inactivarse totalmente cuando se pretrataba durante 1 h a 70°C (Tabla 4.29).

En cuanto al efecto de la inmovilización sobre la estabilidad térmica del enzima, podemos observar que el comportamiento era diferente para los dos soportes de inmovilización estudiados, aunque tratamientos a temperaturas superiores a 60°C inactivaban totalmente todos los enzimas (Fig. 4.16). Cuando el enzima atrapado en geles de alginato se sometía a pretratamientos de 1 h en el rango de temperaturas comprendido entre 50 y 60°C, presentaba una activación de un 13%. Podría ocurrir que la temperatura provocara

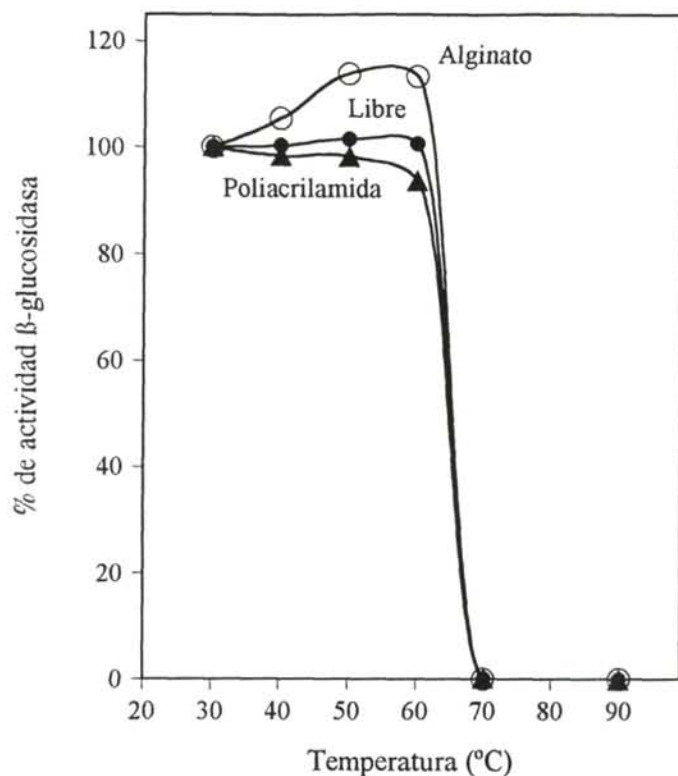


Fig. 4.16. Estabilidad térmica de β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato y de poliacrilamida (pretratamiento térmico de 1 h).

Tabla 4.29. Estabilidad térmica de β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato y de poliacrilamida (pretratamiento térmico de 1 h).

Temp. (°C)	Actividad β -glucosidasa ^a			A β G relativa (%)		
	Libre	Inmovilizada		Libre	Inmovilizada	
		Alginato	Poliacril.		Alginato	Poliacril.
30	141,31	72,22	68,24	100,00	100,00	100,00
40	141,64	76,06	67,09	100,23	105,31	98,31
50	143,42	82,17	67,01	101,49	113,78	98,20
60	142,08	81,82	63,97	100,55	113,30	93,74
70	0,00	0,00	0,09	0,00	0,00	0,14
90	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

^a En $\mu\text{g pNP ml}^{-1} \text{gel h}^{-1}$

una modificación del microambiente del enzima provocando un incremento en la actividad (Mosbach, 1976).

Por otra parte, la estabilidad térmica del enzima inmovilizado en geles de poliacrilamida era ligeramente inferior a la del enzima libre. Así, cuando el enzima se trataba a 60°C se perdía un 7% de la actividad mientras que el enzima libre permanecía inalterado. Esta disminución en la estabilidad podría estar ocasionada por una disminución de la probabilidad de recuperación de la conformación proteica inicial, tras el tratamiento térmico (Goldman *et al.*, 1971).

4.2.3.2. VIDA MEDIA

La estabilidad operacional es un parámetro importante a la hora de analizar la estabilidad de un enzima inmovilizado, pues tiempos de vida media prolongados disminuyen los costes en un proceso. La vida media de la β -glucosidasa libre e inmovilizada a diferentes temperaturas (55, 60 y 65°C) se determinó a partir de las constantes de declive térmico (Srivastava *et al.*, 1984). Para ello, se ensayó la actividad enzimática residual después de someter a las muestras de enzima a incubación, a cada temperatura, durante intervalos fijos de tiempo variables entre 0 y 7 horas. Las constantes de declive térmico a las diferentes temperaturas se calcularon a partir de un análisis de regresión lineal de la representación semilogarítmica del porcentaje de actividad remanente frente al tiempo de tratamiento (Fig. 4.17), tal y como se ha indicado en apartados precedentes. A partir de estas constantes fue posible el cálculo de la vida media de los biocatalizadores.

Las representaciones semilogarítmicas de las muestras de β -glucosidasa libre e inmovilizada (Fig. 4.17) presentaban un tramo inicial horizontal correspondiente a variaciones mínimas de la actividad enzimática para tiempos cortos de incubación (Tablas 4.30 y 4.31). En estos casos, para el cálculo de la vida media se realizó un ajuste del tramo no horizontal de la gráfica. En el caso del enzima inmovilizado por geles de poliacrilamida se observaron, desde el primer momento, disminuciones apreciables en los niveles de actividad (Tabla 4.32). La vida media del enzima inmovilizado en alginato era superior a la del enzima nativo a todas las temperaturas estudiadas (Tabla 4.33). Así, a 60°C la vida media de la β -glucosidasa atrapada en esta matriz (66,9 h) era casi 5 veces

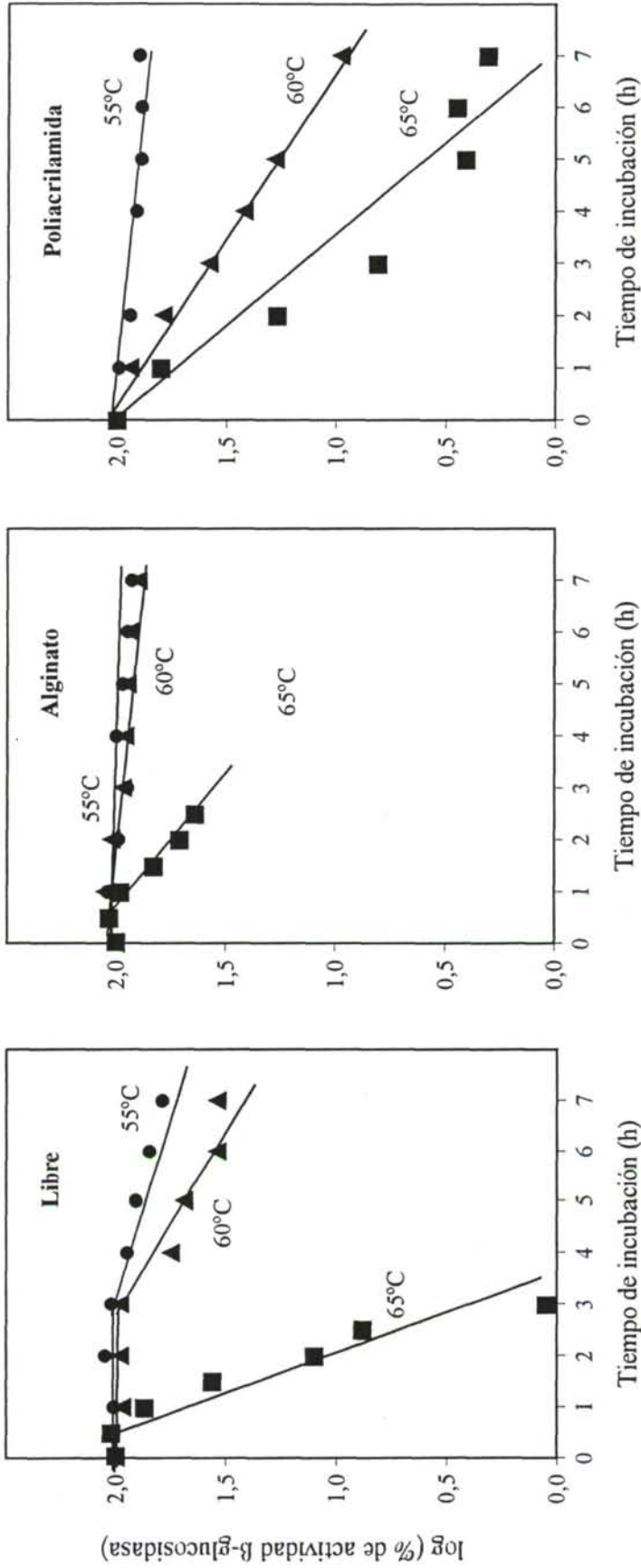


Fig. 4.17. Relación logarítmica entre la actividad β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato y de poliacrilamida.

Tabla 4.30. Relación logarítmica entre la actividad de la β -glucosidasa y el tiempo de incubación a distintas temperaturas.

Temperatura (°C)	Tiempo (h)	A β G ^a	A β GR ^b	log (A β GR)
55	0,0	142,34	100,00	2,00
	1,0	147,05	103,31	2,01
	2,0	158,20	114,14	2,05
	3,0	150,72	105,89	2,02
	4,0	126,16	88,63	1,95
	5,0	116,50	81,84	1,91
	6,0	100,76	70,79	1,85
	7,0	87,77	61,66	1,79
60	0,0	142,32	100,00	2,00
	1,0	134,29	94,36	1,97
	2,0	135,15	94,96	1,98
	3,0	108,20	76,03	1,98
	4,0	79,85	56,10	1,75
	5,0	68,95	48,45	1,69
	6,0	49,70	34,92	1,54
	7,0	49,36	34,68	1,54
65	0,0	137,68	100,00	2,00
	0,5	144,18	104,72	2,02
	1,0	101,35	73,62	1,87
	1,5	50,12	36,40	1,56
	2,0	17,27	12,54	1,10
	2,5	10,36	7,52	0,88
	3,0	1,55	1,13	0,05

^a A β G: Actividad β -glucosidasa en $\mu\text{g pNP ml}^{-1} \text{h}^{-1}$

^b A β GR: Actividad β -glucosidasa relativa en %

Tabla 4.31. Relación logarítmica entre la actividad de la β -glucosidasa inmovilizada en geles de alginato y el tiempo de incubación a distintas temperaturas.

Temperatura (°C)	Tiempo (h)	A β G ^a	A β GR ^b	log (A β GR)
55	0,0	81,92	100,00	2,00
	1,0	89,05	108,7	2,04
	2,0	80,06	97,73	1,99
	3,0	73,81	90,10	1,95
	4,0	81,48	99,47	2,00
	5,0	76,12	92,91	1,97
	6,0	73,24	1,95	1,95
	7,0	69,71	1,93	1,93
60	0,0	84,10	100,00	2,00
	1,0	94,93	112,87	2,05
	2,0	88,70	105,47	2,02
	3,0	78,79	93,69	1,97
	4,0	77,33	91,96	1,96
	5,0	74,56	88,66	1,95
	6,0	72,65	86,38	1,94
	7,0	66,17	78,68	1,90
65	0,0	80,51	100,00	2,00
	0,5	85,37	106,04	2,03
	1,0	76,38	94,88	1,98
	1,5	54,58	67,79	1,83
	2,0	41,45	51,48	1,71
	2,5	35,23	43,76	1,64
	3,0	28,18	35,01	1,54

^a A β G: Actividad β -glucosidasa en $\mu\text{g pNP ml}^{-1}\text{gel h}^{-1}$

^b A β GR: Actividad β -glucosidasa relativa en %

Tabla 4.32. Relación logarítmica entre la actividad de la β -glucosidasa inmovilizada en geles de poliacrilamida y el tiempo de incubación a distintas temperaturas.

Temperatura (°C)	Tiempo (h)	A β G ^a	A β GR ^b	log (A β GR)
55	0,0	67,29	100,00	2,00
	1,0	65,38	97,16	1,99
	2,0	58,36	86,73	1,94
	3,0	n.d.	n.d.	n.d.
	4,0	54,43	80,90	1,91
	5,0	51,75	76,90	1,89
	6,0	52,40	77,87	1,89
	7,0	53,37	79,32	1,90
60	0,0	60,79	100,00	2,00
	1,0	52,27	86,48	1,94
	2,0	37,76	62,11	1,79
	3,0	23,02	37,86	1,58
	4,0	16,11	26,51	1,42
	5,0	11,62	19,11	1,28
	6,0	n.d.	n.d.	n.d.
	7,0	5,74	9,45	0,98
65	0,0	63,94	100,00	2,00
	1,0	40,11	62,73	1,80
	2,0	11,84	18,52	1,27
	3,0	4,08	6,39	0,81
	4,0	n.d.	n.d.	n.d.
	5,0	1,63	2,55	0,41
	6,0	1,81	2,83	0,45
	7,0	1,32	2,07	0,31

^a A β G: Actividad β -glucosidasa en $\mu\text{g pNP ml}^{-1}\text{gel h}^{-1}$

^b A β GR: Actividad β -glucosidasa relativa en %

Tabla 4.33. Vida media de β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato y de poliacrilamida a diferentes temperaturas.

Enzima	Soporte	Temperatura (°C)	Vida media (h)	r^a
Libre	---	55	19,20	0,9975
		60	13,58	0,9691
		65	1,80	0,9463
Inmovilizada	Alginato	55	63,75	0,9562
		60	66,86	0,9223
		65	5,99	0,9680
	Poliacrilamida	55	60,53	0,9281
		60	6,70	0,9958
		65	3,72	0,9570

^a Coeficiente de correlación de la recta $\log(A\beta GR) = f(t)$

superior a la del enzima libre (13,6 h), lo cual presupone un cierto grado de estabilización de la proteína enzimática. Sin embargo, cuando la temperatura se incrementaba desde 55 hasta 65°C, la vida media del enzima retenido en los geles de alginato disminuía un 91%, al igual que sucedía con el enzima soluble. La β -glucosidasa inmovilizada por geles de poliacrilamida presentaba a 55 y 65°C una vida tres veces superior a la del enzima libre. Sin embargo, a temperaturas intermedias (60°C) el enzima libre era el que presentaba valores de vida media más elevados.

Si comparamos los dos tipos de inmovilización podemos comprobar que la utilización de geles de alginato de calcio da como resultado la formación de un enzima insoluble, cuya vida media llega a ser incluso diez veces mayor a la del enzima inmovilizado por geles de poliacrilamida. Este comportamiento corrobora que el enzima inmovilizado por geles de alginato presenta un mayor grado de estabilización frente a la temperatura que el atrapado por la matriz de poliacrilamida.

4.2.4. ESTABILIDAD A LA PROTEOLISIS

En reactores enzimáticos en los que se aplican enzimas libres, la inactivación enzimática suele verse acelerada por contaminación microbiana, en concreto de enzimas proteolíticas. Sin embargo, la resistencia a la acción de proteasas puede inducirse mediante inmovilización (Chibata, 1978). En el caso de enzimas inmovilizados por atrapamiento, al estar el enzima retenido en el interior de un polímero semipermeable, podría resultar menos accesible a los enzimas proteolíticos, moléculas que, por otro lado, suelen tener un peso molecular elevado. Por lo tanto, la inclusión de un enzima en el interior de una red polimérica puede protegerla considerablemente de su desactivación (Gianfreda *et al.*, 1985).

En este sentido, se estudió la estabilidad frente a enzimas proteolíticos, tanto del enzima libre como de los inmovilizados, mediante incubación de los enzimas a 37°C con pronasa de *S. griseus* (0,5 mg ml⁻¹) mezclados durante 24 h (ver aptdo. 3.4.2.2). La actividad β -glucosidasa residual se determinó en muestras puntuales a intervalos fijos de tiempo (Tabla 4.34).

Tabla 4.34. Estabilidad de β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato de calcio y de poliacrilamida a la acción de pronasa de *S. griseus*.

Tiempo (h)	Actividad β -glucosidasa ^a			A β G relativa (%)		
	Libre	Inmovilizada		Libre	Inmovilizada	
		Alginato	Poliacril.		Alginato	Poliacril.
0	63,59	34,55	33,04	100,00	100,00	100,00
1	58,55	26,58	25,46	92,08	76,94	77,06
3	39,65	21,86	29,03	62,20	63,27	87,85
6	27,58	12,68	20,54	43,37	36,71	62,16
8	23,81	9,56	22,31	37,44	27,67	67,51
24	12,20	2,11	21,09	19,19	6,10	63,85

^a En $\mu\text{g pNP ml}^{-1}\text{gel h}^{-1}$

En la Fig. 4.18, que representa el porcentaje de actividad relativa frente al tiempo de incubación, podemos comprobar que el enzima libre perdía un 80% de actividad después de 24 h de tratamiento con el enzima proteolítico, siendo durante las primeras horas cuando se observaba una mayor desnaturalización proteica. La respuesta obtenida con los enzimas retenidos en los dos soportes de inmovilización era claramente dispar. Mientras que los inmovilizados en alginato presentaban una estabilidad más próxima a la observada para el enzima libre, la correspondiente a la enzima atrapada en poliacrilamida era mucho mayor. La pérdida de estabilidad observada en la β -glucosidasa inmovilizada en alginato podría deberse a que durante el periodo de incubación, y debido al gran tamaño de poro de estos geles (Tanaka *et al.*, 1984), parte del enzima fuera liberado y desnaturalizado rápidamente. Sin embargo, la poliacrilamida no permitía el escape de la proteína de la red polimérica, lo que se traducía en un incremento de la estabilidad.

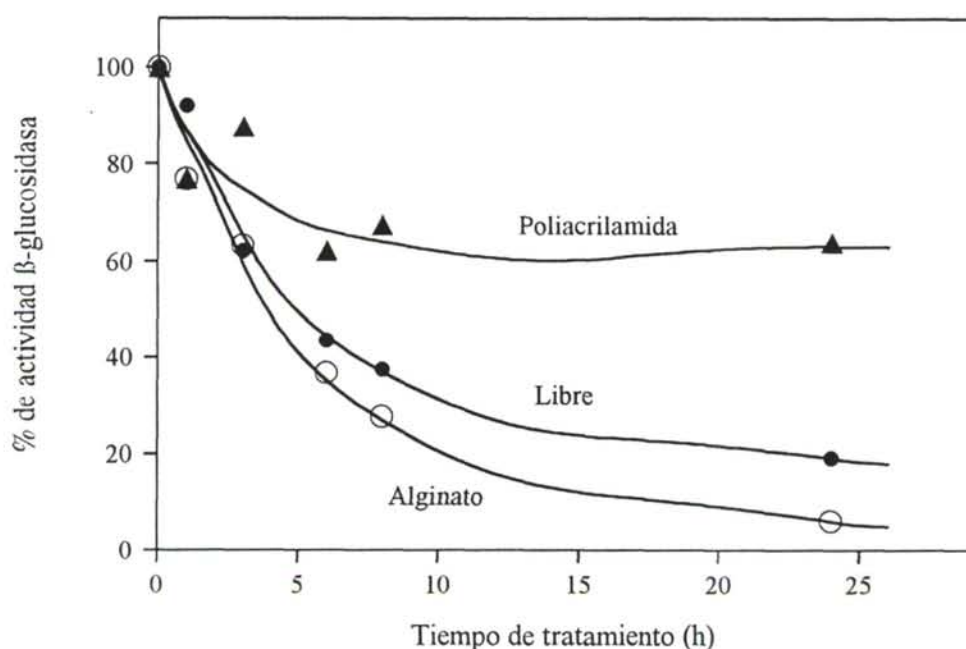


Fig. 4.18. Estabilidad de β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato y de poliacrilamida frente a pronasa.

4.2.5. ESTABILIDAD OPERACIONAL

Como ya se ha comentado anteriormente, la escasa actividad β -glucosidasa del suelo es, en ocasiones, un factor limitante del proceso hidrolítico natural de la celulosa en el medio ambiente. En este sentido, y al igual que en apartados anteriores, se llevó a cabo la inoculación en el suelo de β -glucosidasa estabilizada mediante las técnicas de atrapamiento descritas. Para ello, se suplementaron muestras de suelo con enzima libre e inmovilizado en alginato y poliacrilamida, sometiendo las muestras a incubación durante 1 mes a 25°C. Adicionalmente, se incluyeron muestras de suelo control en las que no se inoculaba enzima. Se tomaron muestra puntuales a diferentes intervalos de tiempo en los que se ensayaba la actividad β -glucosidasa, obteniéndose los resultados detallados en la Tabla 4.35.

Tabla 4.35. Estabilidad operacional de β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato y poliacrilamida en medios edáficos.

Tiempo de incubación (días)	Actividad β -glucosidasa ^a			
	Control	Libre	Inmovilizada	
			Alginato	Poliacrilamida
0	221,82	351,13	265,47	231,81
1	187,65	289,24	212,38	234,38
3	248,01	338,82	270,82	240,87
7	231,53	294,49	287,41	249,59
10	250,48	360,78	279,26	253,50
16	206,16	295,78	259,86	252,62
20	206,16	295,78	258,45	281,13
30	132,14	162,88	127,19	188,74

^a En $\mu\text{g pNP g}^{-1}\text{suelo h}^{-1}$

El suelo inoculado con enzima libre disminuyó su actividad durante el mes de incubación desde 351 hasta 162 $\mu\text{g pNP g}^{-1} \text{suelo h}^{-1}$, mientras que en el suelo control este descenso fue, tan solo, de 89 unidades. Se hacía evidente, por tanto, que aproximadamente el 70% de la capacidad catalítica del enzima libre inoculado al suelo había sido inactivada. La β -glucosidasa atrapada en geles de alginato se inactivaba completamente después de los 30 días de incubación (Fig. 4.19). Esta desnaturalización coincidía con el resultado, encontrado anteriormente, de que el enzima atrapado en alginato era más accesible a la acción de enzimas proteolíticos, que se encuentran presentes de forma natural en el suelo. En contraste, la actividad del enzima atrapado en poliacrilamida no perdía actividad al ser inoculado al suelo, permaneciendo prácticamente constante durante los 20 primeros días de incubación. Solamente se observaba disminución (un 25%) de actividad después de 1 mes de incubación a 25°C, coincidiendo con una disminución de la actividad del enzima endógeno propia del suelo.

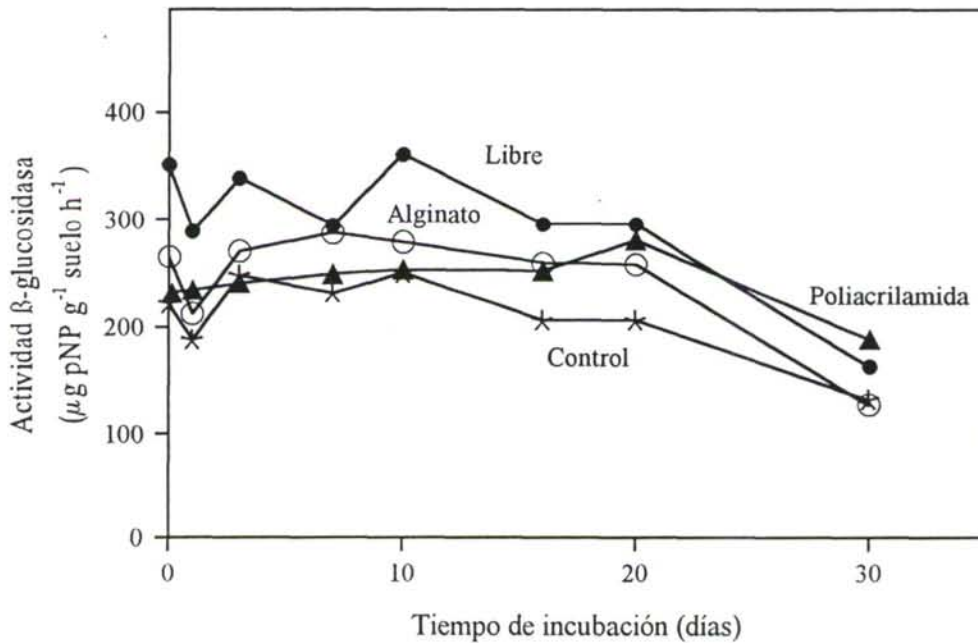


Fig. 4.19. Estabilidad operacional de β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato y de poliacrilamida.

4.3 DEGRADACIÓN ACELERADA DE MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS

4.3.1. CARACTERIZACIÓN DE LA PAJA DE CEREAL

En la región castellano-leonesa, la paja de cereal es uno de los residuos agrícolas más abundantes. Por ello, se seleccionó paja de trigo (modalidad manero) para realizar los estudios sobre la degradación enzimática acelerada de materiales lignocelulósicos. La composición de la paja utilizada se determinó mediante el análisis gravimétrico secuencial descrito por Harper y Lynch (1981) y que ha sido detallado en el aptdo 3.5.1. La composición de la paja nativa y la tratada con peróxido de hidrógeno, butilamina e hidróxido sódico (ver aptdo 4.3.2) se refleja en la Tabla 4.36. La discusión de estos resultados se incluye en el apartado siguiente, conjuntamente con el relativo al efecto de los diferentes pretratamientos.

Tabla 4.36. Composición química de la paja de trigo.

Tratamiento	Composición (%) ^a					
	Solubles H ₂ O ^b	Solubles EtOH ^c	Lignina	Hemicel.	Celulosa	Cenizas
Sin tratar	12,47	2,39	7,54	46,96	24,01	6,63
H ₂ O ₂	19,80	1,00	8,00	15,40	52,00	3,80
Butilamina	13,60	1,50	16,00	19,10	45,58	4,22
NaOH	11,90	0,40	5,80	9,60	69,11	3,19

^a En % peso seco

^b En H₂O a 100°C

^c En EtOH a 40°C

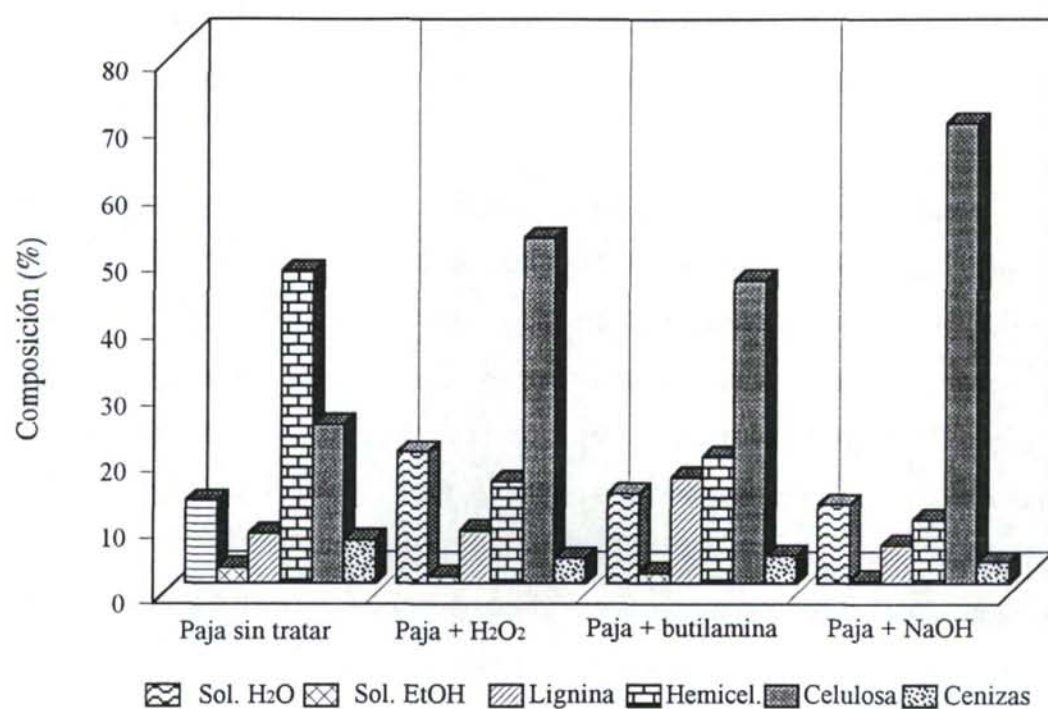


Fig. 4.20. Composición química de la paja de trigo sin tratar y sometida a distintos pretratamientos.

De hecho, y aunque el mecanismo de deslignificación que se produce en la naturaleza es desconocido, se ha comprobado que el agua oxigenada secretada por los microorganismos del suelo juega un papel importante en el proceso de (Tien y Kirk, 1983). Esta reacción dependería fuertemente del pH (Gould, 1985), siendo máxima a pH 11,5 y 11,6, correspondientes al pK_a de disociación del agua oxigenada:



Según Gould (1985) las soluciones alcalinas de peróxido de hidrógeno deslignificaban parcialmente la paja, dejando un residuo celulósico susceptible de digestión enzimática por celulasas. Las experiencias de Gould confirmaban que el mecanismo por el que los productos derivados de la descomposición del peróxido de hidrógeno, tales como $\cdot OH$ y $\cdot O_2^-$ eran especies oxidantes de la lignina más reactivas que especies del tipo

4.3.2. PRETRATAMIENTO DE LA PAJA DE CEREAL

La velocidad y extensión de la degradación enzimática de la paja viene limitada fundamentalmente por dos factores: (1) por la fuerte asociación física y química existente entre la lignina y los polisacáridos constituyentes de las paredes vegetales y (2) por el grado de cristalinidad de la celulosa (Cowling y Kirk, 1976). En un intento de mejorar la eficacia de la producción enzimática de glucosa a partir de residuos lignocelulósicos, se han utilizado distintos pretratamientos químicos, físicos y/o biológicos (Fan *et al.*, 1982) (ver aptdo. 2.1.2). Si bien una gran parte de estos pretratamientos incrementan los rendimientos globales de glucosa, sólo unos pocos permiten la conversión cuantitativa de la celulosa y suelen implicar, además, la utilización de reactivos tóxicos y/o generan productos que inhiben o interfieren el crecimiento microbiano durante la fermentación (Augerinos y Wang, 1980).

El presente estudio se centró en la aplicación de tres pretratamientos distintos con el fin de determinar el más apropiado. Para ello, se seleccionó un tratamiento químico con un peróxido alcalino (Gould, 1984) y otros dos con una combinación de vapor de agua y la acción conjunta de un agente químico, ya sea NaOH (Estrada *et al.*, 1988) o butilamina (Tanaka *et al.*, 1988) (para detalles sobre la metodología, ver el aptdo 3.5.2).

En la Fig. 4.20 se recoge el efecto de los diferentes tratamientos sobre la composición final del material lignocelulósico residual. Todos los pretratamientos estudiados provocaban un aumento del contenido celulosa/hemicelulosa, aunque eran los tratamientos con H_2O_2 , y especialmente con NaOH, los que provocaban unas diferencias más marcadas con las muestras de paja sin tratar (Tabla 4.36). No obstante, donde se conseguía los mejores resultados después del tratamiento de la paja, era en la relación celulosa/lignina. En concreto, se obtenían proporciones de 6,50 (tratamiento con H_2O_2) y de 11,11 (tratamiento con NaOH), mientras que para la paja sin tratar la relación era de 3,18 (Tabla 4.36). Estos resultados muestran la eliminación tan importante de lignina en las muestras tratadas con dichos reactivos. Por el contrario, el tratamiento con butilamina sobre la paja no mejoraba la proporción celulosa/lignina (2,35).

HOO[•]. Durante el curso de las reacciones de deslignificación, el O₂ se desprendía de la mezcla de reacción, lo que implicaba una descomposición simultánea del H₂O₂.

Adicionalmente, cuando la paja se trataba con H₂O₂ o con NaOH se observaba una modificación importante de su integridad física y micromorfológica. Estos cambios podrían deberse a modificaciones de algunas unidades de glucosa durante el tratamiento (Gould, 1985). Probablemente, un pequeño porcentaje de tales modificaciones podrían ser suficientes para romper los enlaces de hidrógeno que se presentan entre las cadenas de celulosa, consiguiéndose una estructura más abierta incluso después del secado. Esta pérdida de cristalinidad, así como el incremento observado en la proporción celulosa/hemicelulosa con respecto a las muestras de paja sin tratar, podrían implicar una mayor accesibilidad a la acción de enzimas celulolíticos. De hecho, numerosas publicaciones han confirmado la efectividad de los pretratamientos alcalinos en relación con el incremento en la biodegradación de los materiales lignocelulósicos (p.e. Dekker y Wallis, 1983; Ternrud *et al.*, 1988; Lázaro *et al.*, 1994;).

El espectro de U.V. de los compuestos liberados durante el pretratamiento presentaba un máximo de absorción (λ max) a 285 nm y un hombro a 325 nm (Fig. 4.21, Tabla 4.37). Este tipo de picos indican normalmente la presencia de ácido felúrico y p-cumárico (Hartley, 1983). Al menos algunos de estos ácidos se encuentran unidos mediante enlace éster entre sus grupos carboxilo y las pentosas que constituyen la pared de las células vegetales (Smith *et al.*, 1981; Hartley *et al.*, 1976). Las uniones covalentes entre la lignina y los carbohidratos podrían ser de tipo éster entre grupos carboxilo libres de ácidos urónicos y aromáticos o de tipo éter entre grupos hidroxilo de los azúcares (Jeffries, 1990). Watanabe *et al.* (1989) estudiaron la estabilidad de estos enlaces frente a bases fuertes. La mayoría de estos enlaces pueden romperse en condiciones básicas suaves, si bien un número significativo de estos enlaces permanecen estables. Los ácidos p-cumárico y felúrico son bifuncionales por lo que tienen capacidad para formar enlaces éster o éter por reacción de sus grupos carboxilo o fenólico, respectivamente. El ácido p-cumárico se asocia fundamentalmente a la lignina, mientras que el ácido felúrico está esterificado con hemicelulosas (Scalbert *et al.*, 1985; Atushi *et al.*, 1984). Los éteres de ácido felúrico podrían establecer uniones entre la lignina y la hemicelulosa gracias a la

esterificación simultánea de su grupo carboxilo con arabinosa y a la formación de éteres entre los grupos hidroxilos de la hemicelulosa y los fenilhidroxilos de la lignina. Algunos estudios sugieren que los ácidos difelúricos pueden formarse por polimerización con peroxidasa, uniendo cadenas de hemicelulosas (Morrison, 1974; Markwaldes y Neukom, 1976).

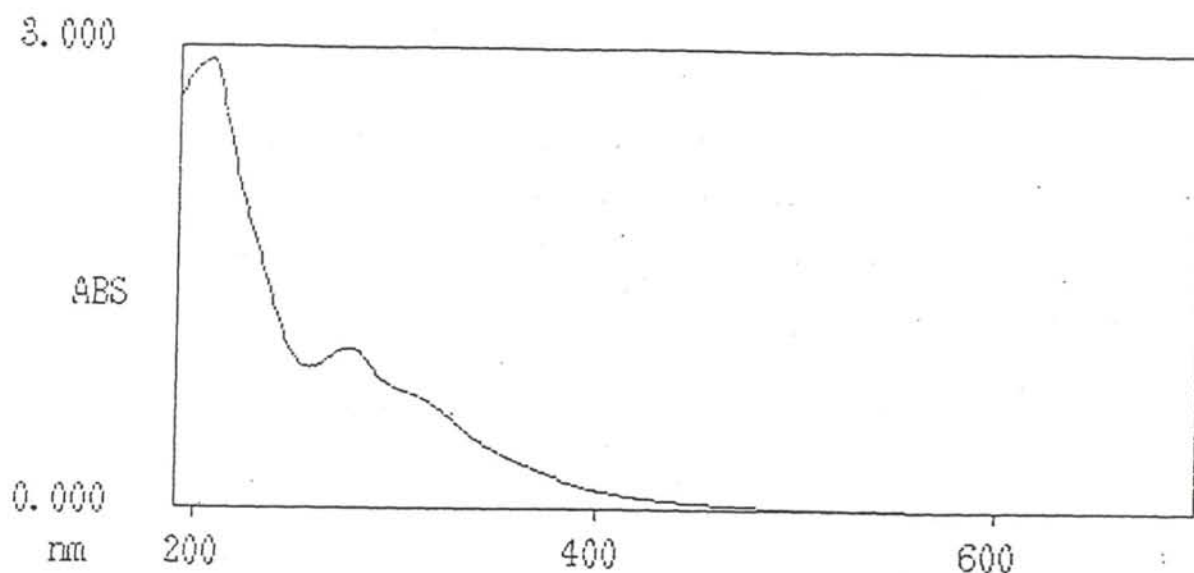


Fig. 4.21. Espectro UV-Vis de los compuestos liberados durante el pretratamiento de paja de trigo con NaOH.

Tabla 4.37. Espectro de UV de los filtrados de paja de trigo procedentes de los distintos tratamientos.

Tratamiento	λ_{\max} (nm)	Absorbancia
H ₂ O ₂ ^a	n.d.	n.d.
NaOH ^b	285	1,632
	325 (hombro)	1,400
Butilamina ^b	277	1,183

^a Dilución 1/25

^b Dilución 1/50

Es posible que los tratamientos previos utilizados en este trabajo incrementasen la digestibilidad de los polisacáridos de las paredes vegetales por ruptura de los enlaces éster y puentes de hidrógeno, afectando también a las débiles uniones básicas en la lignina. De hecho, cuando se utilizan tratamientos con soluciones de NaOH, la presencia del agua puede incrementar la difusión del álcali en la paja y translocar parte de la hemicelulosa (Ternrud *et al.*, 1988). Este efecto puede verse mejorado cuando el proceso se realiza bajo la presión del autoclave. Así, puede observarse en la Fig. 4.20 que la contribución porcentual de hemicelulosa en la paja tratada con NaOH disminuye apreciablemente con respecto a la paja nativa.

El tratamiento con butilamina combinada con la presión de vapor provocaba un descenso en el contenido en hemicelulosa aunque presentaba un ligero incremento en el contenido en lignina. El espectro de UV de los filtrados de esta paja pretratada (Fig. 4.22) presentaba un máximo de absorbancia a 277 nm, característico de compuestos fenólicos que se encuentran en ausencia de los ácidos felúrico y p-cumárico (Hartley, 1983).

El mayor contenido en lignina junto con la menor alteración física en el residuo final con el tratamiento con butilamina conducían a pensar que era el método menos apropiado para los objetivos del trabajo. Por el contrario, los pretratamientos con NaOH y H₂O₂ parecían los más adecuados para llevar a cabo el estudio posterior de la hidrólisis acelerada de paja por aplicación de enzimas celulolíticos

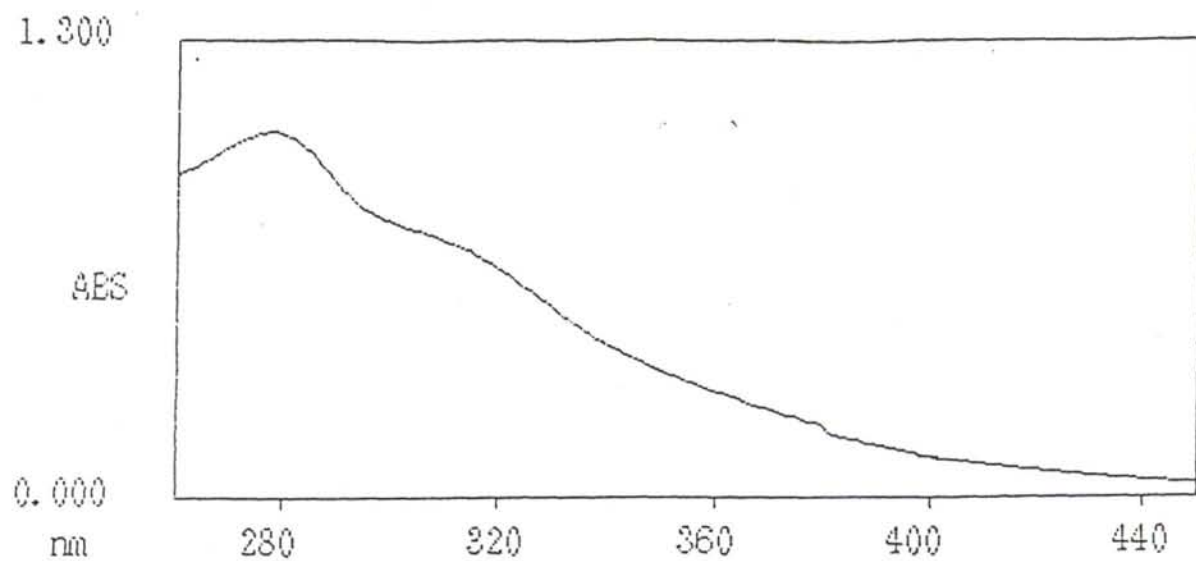


Fig. 4.22. Espectro UV-Vis de los compuestos liberados durante el pretratamiento de paja de trigo con H_2O_2 .

4.3.3. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PAJA Y CELULOSAS COMERCIALES

En el proceso de sacarificación de la celulosa es esencial obtener altos rendimientos en la cantidad de glucosa por unidad de enzima utilizada. Los factores que afectan a este rendimiento incluyen el pretratamiento del sustrato, la inhibición de los enzimas por efecto del calor o de los productos de degradación, la concentración del sustrato, la adsorción de las celulasas, el incremento de la velocidad de reacción y el posible reciclado de los enzimas empleados (Vallander y Eriksson, 1985). Por tanto, la optimización de las condiciones experimentales de hidrólisis enzimática juega un papel clave en la economía global del proceso de sacarificación (Szczo drack, 1988).

En un principio se buscaron las mejores condiciones de operación, con objeto de incrementar la efectividad de la hidrólisis enzimática de los materiales lignocelulósicos (paja), analizando los efectos producidos por el uso de pretratamientos alcalinos con H_2O_2 (aptdo. 3.5.2.1) y NaOH (aptdo. 3.5.2.3). Paralelamente, se realizó un estudio del proceso hidrolítico empleando sustratos celulósicos comerciales con distintas características: CMC (celulosa soluble), CMN-300 (celulosa no cristalina) y C₄₆₁₃ (celulosa microgranular). La degradación enzimática se realizó en distintos medios tamponados (pH 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 y 6,0), a varias temperaturas (30, 40, 50 y 60°C) y bajo agitación orbital constante (150 rpm). Se aplicaron como enzimas celulolíticos CMCasa y β -glucosidasa inducidos en cultivos de *T. reesei* y de *A. niger*, respectivamente (ver aptdo. 3.5.3). La concentración de los sustratos utilizados variaba desde 0,5 al 10 %, incluyéndose muestras testigo en las que no se habían añadido los enzimas celulolíticos. A intervalos fijos de tiempo se tomaban muestras puntuales durante todo el periodo de sacarificación (48 h) en las que se ensayaba la concentración de glucosa y azúcares reductores liberados (ver apartados 3.5.4.1 y 3.5.4.2, respectivamente). Las condiciones experimentales objeto de estudio fueron la temperatura, el pH de sacarificación, la concentración de enzima añadida y la concentración de sustrato. Finalmente, se procedió a la aplicación de los enzimas inmovilizados por atrapamiento en geles de alginato de calcio y de poli(acrilamida) en un

intento de estabilizar los biorreactores enzimáticos y de incrementar su tiempo de vida media (ver aptdo. 3.5.3.2).

El porcentaje de sacarificación logrado con los distintos tratamientos se definió según la siguiente ecuación (Szczo drak, 1988):

$$\% \text{ sacarificación} = \frac{\text{azúcares reductores (g)} \times 0,9}{\text{celulosa (g)}} \times 100$$

siendo la cantidad de celulosa la añadida en las distintas experiencias, como material celulósico, o la ensayada en la composición gravimétrica de la paja.

4.3.3.1 EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PAJA Y DE CELULOSAS

Los enzimas celulolíticos aislados de diferentes fuentes se diferencian en sus características moleculares (peso molecular, composición y secuencia de aminoácidos, punto isoeléctrico, contenido de carbohidratos, etc.), capacidad de adsorción sobre la celulosa, actividad catalítica y especificidad hacia el sustrato. El sistema enzimático de *T. reesei* ha sido ampliamente estudiado, tanto en cuanto a la inducción y regulación de producción de celulasas (Chen y Wayman, 1992; Chahal *et al.*, 1992; Kubicek *et al.*, 1993) como a la forma de actuación de los enzimas (Klyosov, 1990). Coughlan (1985) y Wood (1990) demostraron que *T. reesei* sintetizaba de cuatro a ocho endoglucanasas, dos celobiohidrolasas y de una a dos β -glucosidasas (para detalles, ver aptdo. 2.1.3.2.1). En este trabajo se aplicaron celulasas inducidas en cultivos de *T. reesei*. No obstante, y debido a la deficiencia en β -glucosidasa del sistema celulolítico de *T. reesei*, se incluyó β -glucosidasa extracelular de *A. niger* en un intento de complementar el proceso hidrolítico.

La influencia de la temperatura sobre el proceso de hidrólisis provocado por la mezcla de celulasas y β -glucosidasa sobre los diferentes materiales celulósicos (CMC, CMN-300 y C₆₄₁₃), a distintos tiempos de tratamiento, se incluye en la Fig. 4.23 y la Tabla 4.38. Claramente, la carboximetilcelulosa (CMC) era el sustrato más fácilmente

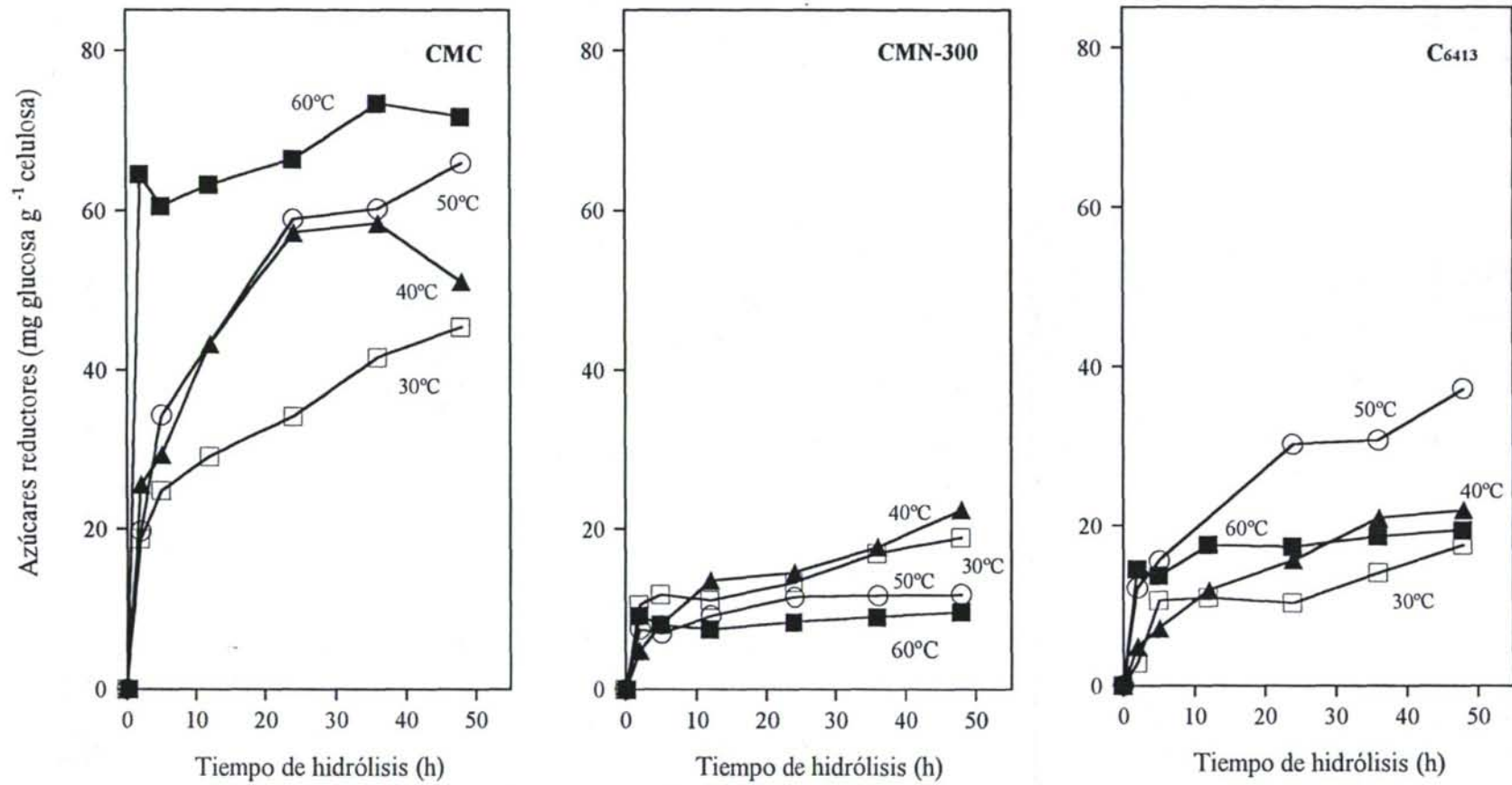


Fig. 4.23. Efecto de la temperatura sobre la degradación enzimática de celulosas comerciales.

Tabla 4.38. Efecto de la temperatura sobre la hidrólisis enzimática de celulosas comerciales.

Temperatura (°C)	Tiempo de hidrólisis (h)	Concentración de azúcares reductores ^a		
		CMC	CMN-300	C ₆₄₁₃
30	2	18,77	10,54	2,84
	5	24,85	11,82	10,60
	12	29,15	11,10	10,97
	24	34,20	13,36	10,32
	36	41,58	17,02	14,10
	48	45,38	18,95	17,57
40	2	25,58	4,78	4,82
	5	29,36	8,12	7,14
	12	43,28	13,58	11,88
	24	57,20	14,56	15,70
	36	58,36	17,78	20,98
	48	51,08	22,40	21,92
50	2	19,72	7,48	12,20
	5	34,29	6,96	15,64
	12	31,75	9,12	15,00
	24	58,89	11,48	30,28
	36	60,18	11,72	30,80
	48	65,94	11,84	37,20
60	2	64,52	9,14	14,52
	5	60,56	8,06	13,72
	12	63,20	7,44	17,60
	24	66,42	8,37	17,33
	36	73,36	9,01	18,68
	48	71,72	9,63	19,43

^a En mg glucosa g⁻¹ celulosa

hidrolizable a todas las temperaturas estudiadas. De hecho, se obtenía un máximo con CMC de 73,36 mg glucosa g⁻¹ celulosa a 60°C frente a las 22,40 unidades encontradas en el tratamiento de CMN-300 a 40°C o las 37,20 unidades en el de la C₆₄₁₃ a 50°C. Por tanto, la máxima actividad hidrolítica de CMC, CMN-300 y C₆₄₁₃ se alcanzaba a temperaturas de 60, 40 y 50°C, respectivamente. Las diferencias en las temperaturas óptimas de sacarificación estarían directamente relacionadas con la estructura del sustrato celulósico utilizado y por consiguiente, de la fracción enzimática del complejo celulolítico predominante para su degradación.

Es conocido el hecho que las endoglucanasas son enzimas capaces de hidrolizar fácilmente los derivados solubles de las celulosas (como la CMC). Sin embargo, la hidrólisis de celulosas insolubles necesita la actuación sinérgica de endoglucanasas y celobiohidrolasas. Además, las celulosas cristalinas se adsorben fácilmente, por lo que este hecho juega un papel importante en el proceso hidrolítico (Klyosov, 1988), mientras que la hidrólisis de celulosa amorfa depende únicamente de la actividad de la preparación de celulasas (Klyosov, 1990). Como era previsible, el nivel de sacarificación de la celulosa soluble era mucho más elevado que el de las celulosas amorfas CMN-300 y C₆₄₁₃ a todas las temperaturas ensayadas (Tabla 4.39).

El efecto de la temperatura sobre la hidrólisis enzimática de paja de trigo (nativa y pretratada con NaOH y H₂O₂) se detalla en la Fig. 4.24. La primera conclusión deducible del examen de estos resultados es que la inoculación de celulasas y β-glucosidasa al reactor provocaba una degradación hidrolítica efectiva de la paja (sobre todo tras 24 h de tratamiento). Como era de esperar, el proceso de hidrólisis era mucho más fácil y significativo cuando se usaba paja tratada previamente con H₂O₂ o NaOH (ver Tablas 4.40 y 4.41). La biomasa lignocelulósica no podía sacarificarse rápidamente y con rendimientos elevados sin un pretratamiento previo, debido, entre otros factores, a la pared vegetal que forma una barrera física resistente al ataque enzimático (Busto, 1992). Sin embargo, el tratamiento con oxidantes y álcalis facilitaba el acceso de los enzimas incrementando el área superficial y reduciendo el contenido en lignina y la cristalinidad de la celulosa (Estrada *et al.*, 1988).

Tabla 4.39. Efecto de la temperatura sobre la sacarificación de celulosas comerciales.

Temperatura (°C)	Tiempo de hidrólisis (h)	% de sacarificación		
		CMC	CMN-300	C ₆₄₁₃
30	2	1,69	0,95	0,26
	5	2,24	1,06	0,95
	12	2,62	1,00	0,98
	24	3,08	1,20	0,93
	36	3,74	1,53	1,27
	48	4,08	1,71	1,58
40	2	2,30	0,43	0,43
	5	2,64	0,73	0,64
	12	3,90	1,22	1,07
	24	5,15	1,31	1,41
	36	5,25	1,60	1,89
	48	1,60	2,62	1,97
50	2	1,77	0,67	1,10
	5	3,09	0,63	1,41
	12	2,86	0,82	1,35
	24	5,30	1,03	2,73
	36	5,42	1,05	2,77
	48	5,93	1,16	3,35
60	2	5,81	0,82	1,31
	5	5,45	0,73	1,23
	12	5,69	0,67	1,58
	24	5,98	0,75	1,56
	36	6,60	0,81	1,68
	48	6,45	0,87	1,75

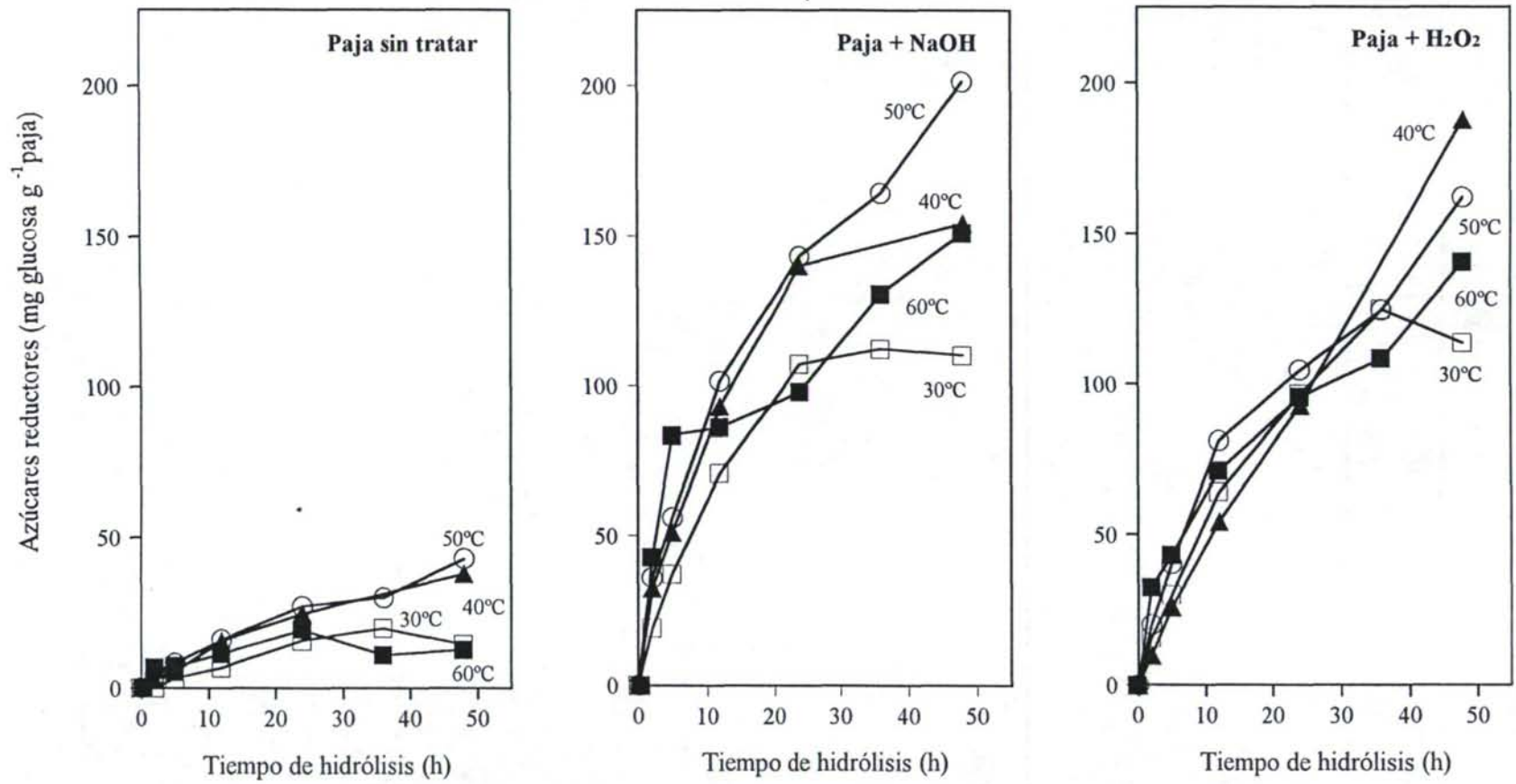


Fig. 4.24. Efecto de la temperatura sobre la hidrólisis enzimática de paja nativa y tratada con NaOH y H₂O₂.

Tabla 4.40. Efecto de la temperatura sobre la hidrólisis enzimática de paja de trigo.

Temperatura (°C)	Tiempo de hidrólisis (h)	Concentración de azúcares reductores ^a		
		Paja sin tratar	Paja tratada con NaOH	Paja tratada con H ₂ O ₂
30	2	0,06	19,14	15,59
	5	3,27	37,06	29,83
	12	6,74	70,89	64,00
	24	15,71	107,21	96,48
	36	19,82	112,27	124,88
	48	14,40	110,12	113,76
40	2	2,48	32,18	9,67
	5	5,30	50,86	25,57
	12	15,53	93,04	54,14
	24	24,60	140,04	92,71
	36	n.d.	n.d.	n.d.
	48	37,82	154,08	187,72
50	2	4,39	35,85	19,99
	5	8,19	55,94	40,07
	12	16,04	101,46	81,14
	24	27,06	143,14	104,46
	36	30,03	164,32	124,59
	48	42,96	201,30	162,22
60	2	6,65	42,70	32,36
	5	7,17	83,50	43,03
	12	11,38	86,11	71,26
	24	19,32	97,89	95,62
	36	10,95	130,66	105,54
	48	12,71	151,00	140,64

^a En mg glucosa g⁻¹ paja

Tabla 4.41. Efecto de la temperatura sobre la sacarificación de paja de trigo.

Temperatura (°C)	Tiempo de hidrólisis (h)	% de sacarificación		
		Paja sin tratar	Paja tratada con NaOH	Paja tratada con H ₂ O ₂
30	2	0,01	2,49	2,70
	5	1,23	4,85	5,16
	12	2,53	9,23	11,07
	24	5,89	13,96	16,69
	36	7,43	14,62	21,60
	48	5,40	14,34	19,68
40	2	0,93	4,19	1,67
	5	1,99	6,62	4,42
	12	5,82	12,11	9,37
	24	9,22	18,23	16,04
	36	n.d.	n.d.	n.d.
	48	14,17	20,06	32,48
50	2	1,65	4,67	3,46
	5	3,07	7,28	6,93
	12	6,01	13,21	10,04
	24	10,14	18,64	18,07
	36	11,26	21,39	21,55
	48	16,10	26,21	28,06
60	2	2,49	5,56	5,60
	5	2,69	10,87	7,44
	12	4,27	11,21	12,33
	24	7,24	12,74	16,54
	36	4,10	17,01	18,78
	48	4,76	19,66	24,33

Se podía comprobar, además, que el proceso hidrolítico de la paja nativa y tratada con NaOH se llevaba a cabo a una temperatura óptima de 50°C, mientras que la tratada con H₂O₂ se hidrolizaba mejor a 40°C, valores por otro lado, coincidentes con los obtenidos para las celulosas comerciales no solubles. Estas temperaturas óptimas relativamente bajas, resultaban una ventaja adicional cuando se trabajaba con enzimas susceptibles a la desnaturalización térmica, disminuyendo, además, los costes globales del proceso.

Por otra parte, se observaba que el aspecto y textura de las partículas de paja, mientras que se modificaban apreciablemente tras los tratamientos indicados, no se veían alterados por la acción enzimática.

La solubilización de la celulosa insoluble, presente en la paja, es uno de los pasos limitantes que requiere la formación de un complejo específico enzima-sustrato. El resultado de los cambios de actividad de los enzimas depende de la adsorción y desorción de éstos a los sustratos, viéndose reflejado en el grado de su solubilización (Tanaka *et al.*, 1988). Tal y como ya se ha mencionado, los pretratamientos incrementaban el área superficial de los poros accesibles por el enzima (Tanaka *et al.*, 1988), lo que mejoraba la hidrólisis enzimática (Tabla 4.40).

4.3.3.2. EFECTO DEL pH SOBRE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PAJA Y CELULOSAS

El estudio del pH óptimo correspondiente al proceso de hidrólisis enzimática se realizó mediante ensayo de los azúcares reductores y niveles de sacarificación obtenidos al tratar los sustratos con los inóculos enzimáticos en soluciones tamponadas con acetato a cinco valores de pH diferentes (4,0; 4,5; 5,0; 5,5 y 6,0).

En la Fig. 4.25 se representa la influencia que ejercía el pH sobre la hidrólisis enzimática de las tres celulosas puras estudiadas. En dicha figura puede comprobarse que el proceso de sacarificación más sensible a las variaciones de pH era el correspondiente a la CMC. A diferencia de las otras dos celulosas, este sustrato presentaba una carga neta negativa debida a sus grupos carboxilo, que podía modificarse según fuera el pH del

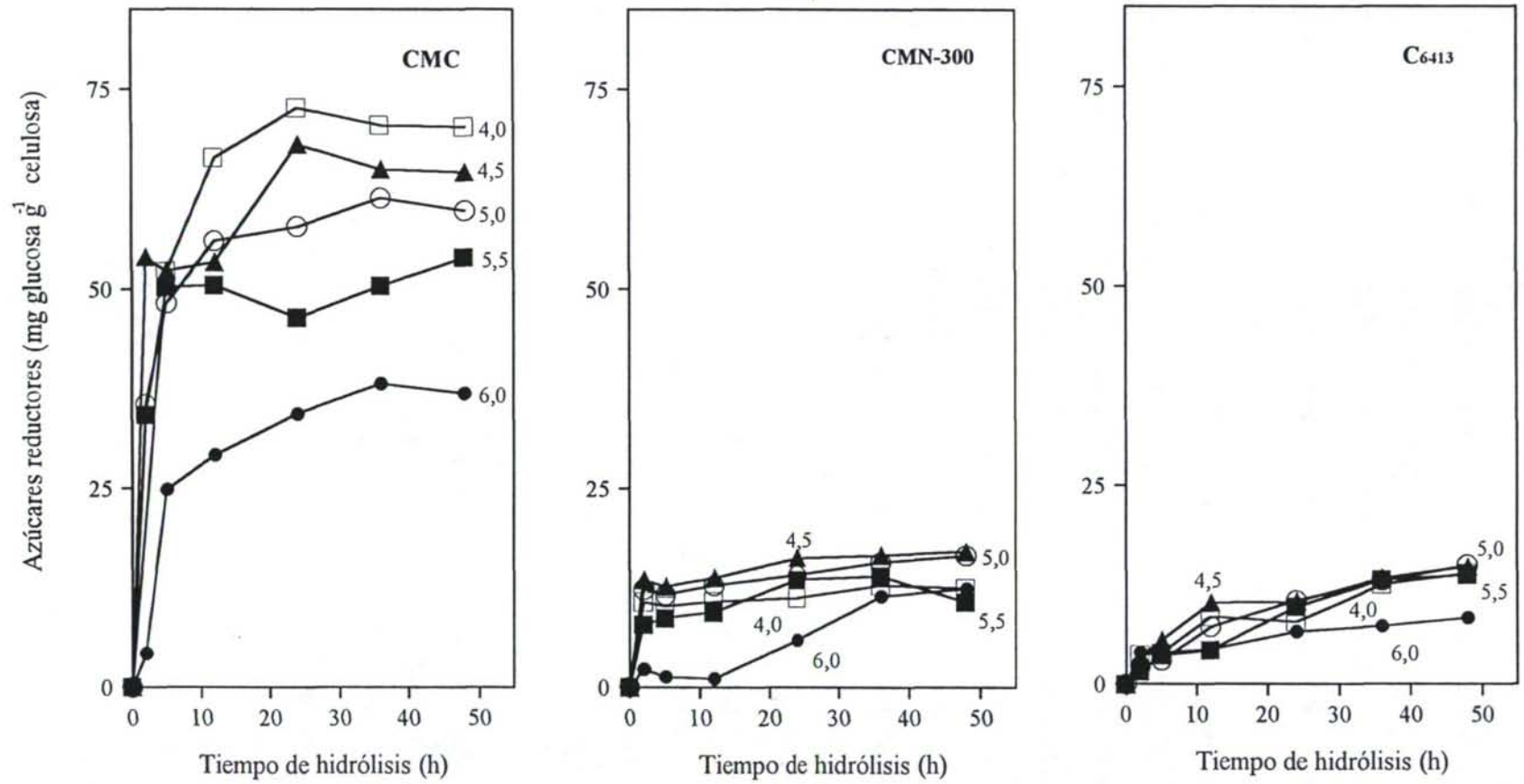


Fig. 4.25. Efecto del pH sobre la hidrólisis enzimática de celulosas comerciales.

medio. Estas variaciones de carga podían modificar la afinidad del enzima por su sustrato (dependiendo de la concentración de protones del medio) lo que influía, a su vez, sobre la hidrólisis global del sustrato. La degradación máxima de CMC se alcanzaba, en todo el abanico de pH, a tiempos cortos de hidrólisis (12 h), obteniéndose los mayores rendimientos, hasta 70 mg glucosa g⁻¹ celulosa, a pH 4,5 (Tabla 4.42). El pH afectaba claramente al proceso hidrolítico, de tal forma que cuando se trabajaba a valores de pH más ácidos (pH 4,0) se doblaba el rendimiento en azúcares reductores después de 48 h con respecto al fermentador que trabajaba a pH 6,0. En el caso de las celulosas no solubles (CMN-300 y C₄₆₁₃) los niveles de sacarificación más elevados (1,5 y 1,3% respectivamente) se alcanzaban a pH 5,0 (Tabla 4.43). Sin embargo, las variaciones en el rango de pH estudiado no afectaban, de manera significativa, la hidrólisis de estos sustratos.

Con respecto a la degradación enzimática de la paja, el pH volvía a influir de manera decisiva, tanto sobre la degradación del material pretratado como sobre la de la paja sin tratar (Tabla 4.44). La mayor degradación enzimática se presentaba a pH 5,0 (paja nativa y tratada con H₂O₂) y a 4,5 (paja tratada con NaOH). En los tres casos, los mínimos de actividad aparecían a pH 6,0. Cuando los biorreactores trabajaban con paja pretratada con H₂O₂ a pH 6,0 se observaba una disminución en la producción de azúcares reductores durante el periodo de hidrólisis de 36 a 48 h. Este descenso podría explicarse en términos de una posible contaminación microbiana producida durante la toma de muestras y el posterior consumo de los azúcares liberados al medio por los microorganismos presentes.

En la Fig. 4.26 puede observarse que independientemente del valor de pH, la velocidad inicial de hidrólisis de paja tratada con NaOH era siempre superior a la que presentaban los demás sustratos. Además, cuanto más se alejaba el valor de pH del óptimo, más rápidamente disminuía esta velocidad. Cuando el pH del medio era 6,0, el nivel de sacarificación tras 48 h se reducía a la mitad con respecto al encontrado al valor de pH óptimo (Tabla 4.45).

Tabla 4.42. Efecto del pH sobre la hidrólisis enzimática de celulosas comerciales.

pH	Tiempo de hidrólisis (h)	Concentración de azúcares reductores ^a		
		CMC	CMN-300	C ₆₄₁₃
4,0	2	67,04	10,64	3,67
	5	62,24	10,16	3,87
	12	66,48	10,70	8,43
	24	72,74	11,15	7,80
	36	70,76	12,78	12,52
	48	70,33	12,40	13,93
4,5	2	54,04	13,40	3,46
	5	52,32	12,59	5,51
	12	53,36	13,68	10,21
	24	68,11	16,20	10,37
	36	65,00	16,51	13,35
	48	64,68	17,02	14,74
5,0	2	35,50	12,26	2,23
	5	48,24	11,61	2,97
	12	56,06	12,78	7,18
	24	57,85	14,04	10,46
	36	61,44	15,68	12,96
	48	59,87	16,50	14,94
5,5	2	34,20	7,86	1,55
	5	50,28	8,68	3,60
	12	50,50	9,42	4,22
	24	46,40	13,50	9,71
	36	50,44	13,95	13,08
	48	53,96	10,69	13,70
6,0	2	4,24	2,24	3,99
	5	24,88	1,27	3,95
	12	29,20	1,10	4,29
	24	34,40	5,90	6,60
	36	38,16	11,41	7,30
	48	36,88	12,33	8,30

^a En mg glucosa g⁻¹ celulosa

Tabla 4.43. Efecto del pH sobre la sacarificación de celulosas comerciales.

pH	Tiempo de hidrólisis (h)	% de sacarificación		
		CMC	CMN-300	C ₆₄₁₃
4,0	2	3,03	0,96	0,33
	5	5,60	0,91	0,35
	12	5,98	0,96	0,76
	24	6,55	1,00	0,70
	36	6,37	1,15	1,13
	48	6,33	1,11	1,25
4,5	2	4,86	1,21	0,31
	5	4,71	1,13	0,50
	12	4,80	1,23	0,92
	24	6,13	1,46	0,93
	36	5,85	1,49	1,20
	48	5,82	1,53	1,33
5,0	2	3,20	1,10	0,20
	5	4,34	1,04	0,27
	12	5,05	1,15	0,65
	24	5,21	1,26	0,94
	36	5,53	1,41	1,17
	48	5,39	1,49	1,34
5,5	2	4,29	0,71	1,14
	5	4,53	0,78	0,32
	12	4,55	0,85	0,38
	24	4,18	1,22	0,87
	36	4,54	1,26	1,18
	48	4,86	0,96	1,23
6,0	2	4,16	0,20	0,36
	5	3,77	0,11	0,36
	12	2,63	0,10	0,39
	24	3,10	0,53	0,59
	36	3,43	1,03	0,66
	48	3,32	1,11	0,75

Tabla 4.44. Efecto del pH sobre la hidrólisis enzimática de paja de trigo.

pH	Tiempo de hidrólisis (h)	Concentración de azúcares reductores ^a		
		Paja sin tratar	Paja tratada con NaOH	Paja tratada con H ₂ O ₂
4,0	2	3,70	54,00	24,17
	5	7,38	49,52	32,83
	12	18,00	96,56	76,56
	24	23,31	131,04	106,66
	36	32,14	n.d.	137,84
	48	36,70	171,26	167,25
4,5	2	2,15	44,08	12,94
	5	8,30	68,24	29,12
	12	17,21	117,28	79,12
	24	28,16	168,56	117,77
	36	34,67	n.d.	149,57
	48	40,04	219,20	173,84
5,0	2	1,30	41,60	16,82
	5	8,71	64,40	34,20
	12	14,68	116,10	73,48
	24	26,75	172,72	112,88
	36	39,40	n.d.	144,00
	48	47,50	216,60	185,84
5,5	2	0,22	50,93	8,28
	5	3,95	31,18	27,37
	12	13,29	93,63	49,16
	24	22,16	129,16	95,24
	36	30,36	n.d.	112,72
	48	34,30	175,26	156,90
6,0	2	2,05	34,26	12,10
	5	6,44	45,72	20,60
	12	10,87	60,59	49,88
	24	17,61	95,36	83,04
	36	21,54	n.d.	96,16
	48	28,68	105,02	81,99

^a En mg de glucosa g⁻¹ paja

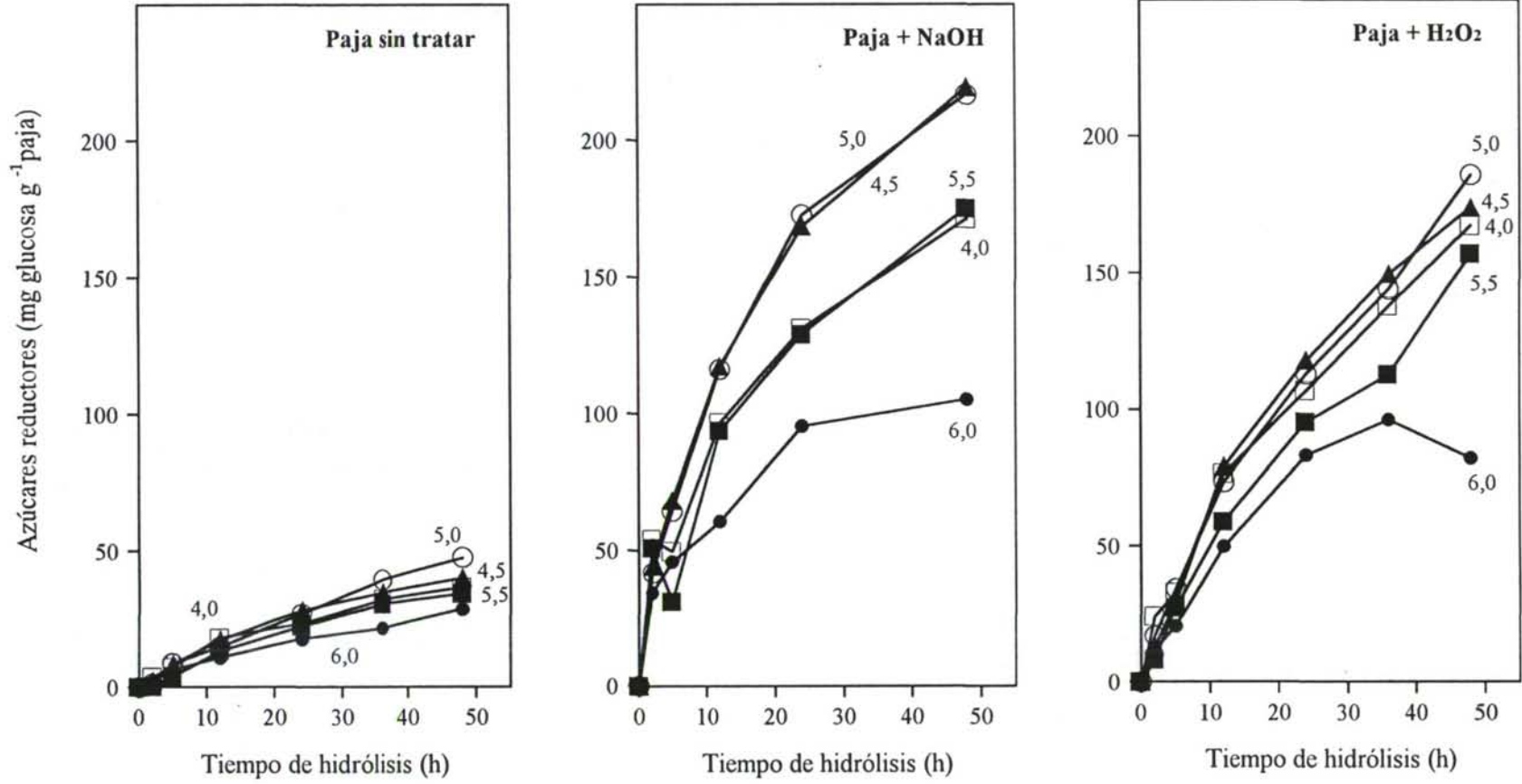


Fig. 4.26. Efecto del pH sobre la hidrólisis enzimática de paja nativa y tratada con NaOH y H₂O₂.

Tabla 4.45. Efecto del pH sobre la sacarificación de paja de trigo.

pH	Tiempo de hidrólisis (h)	% de sacarificación		
		Paja sin tratar	Paja tratada con NaOH	Paja tratada con H ₂ O ₂
4,0	2	1,39	7,03	4,18
	5	2,77	6,45	5,68
	12	6,75	12,57	13,25
	24	8,74	17,06	18,46
	36	12,05	n.d.	23,86
	48	13,76	22,30	28,95
4,5	2	0,81	5,74	2,24
	5	3,11	8,89	5,04
	12	6,45	15,27	13,69
	24	10,56	21,95	20,38
	36	13,00	n.d.	25,89
	48	15,01	28,55	30,09
5,0	2	0,49	5,42	2,91
	5	3,26	8,39	5,92
	12	5,50	15,12	12,72
	24	10,03	22,49	19,54
	36	14,77	n.d.	24,92
	48	17,81	28,21	32,16
5,5	2	0,08	6,63	1,43
	5	1,48	4,06	4,74
	12	4,98	12,19	8,51
	24	8,31	16,82	16,48
	36	11,38	n.d.	19,51
	48	12,86	22,82	27,16
6,0	2	0,77	4,46	2,09
	5	2,41	5,95	3,57
	12	4,07	7,89	8,63
	24	6,60	12,42	14,37
	36	8,07	n.d.	16,64
	48	10,75	13,68	14,19

4.3.3.3. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ENZIMA Y SUSTRATO SOBRE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PAJA Y CELULOSAS

Según Vallander y Eriksson (1990), el grado de sacarificación de los materiales celulósicos depende fuertemente de la concentración en la que se encuentren los enzimas hidrolíticos y los sustratos de reacción (los materiales celulósicos). La elección de estas variables en el proceso de hidrólisis debe basarse en consideraciones económicas, ya que los enzimas son productos caros e interesa, normalmente, utilizarlos en dosis pequeñas. Sin embargo, y como contrapartida, cuando se emplean concentraciones pequeñas de enzimas se necesitan tiempos elevados de hidrólisis y, por tanto, tratamientos más largos, lo que a su vez requiere equipos de gran volumen y por tanto inversiones iniciales muy elevadas. Por otra parte, las concentraciones pequeñas de sustrato suelen producir mayores rendimientos en la sacarificación, aunque con soluciones muy diluidas de azúcar, lo que supone incluir una operación posterior de concentrado que encarece el proceso. El coste de las materias primas, la energía, la posible recuperación de los enzimas, la producción a escala y la valía de los productos finales son otros factores económicos de importancia que deben considerarse en la planificación del proceso (Vallander y Eriksson, 1990).

En este sentido se estudió el efecto que producía la proporción de los enzimas celulolíticos ensayados sobre la velocidad de hidrólisis. Para ello, se analizaron los resultados encontrados al probar mezclas de CMCasa/ β -glucosidasa preparadas en cinco proporciones diferentes (1/0, 1/1; 2/1; 4/1 y 1/2). La proporción 1/1 se preparaba en base a disolver 25 mg de CMCasa procedente de *T. reesei* (con una actividad de 825,6 μg glucosa $\text{mg}^{-1} \text{h}^{-1}$) y 25 mg de β -glucosidasa procedente de *A. niger* (con una actividad de 21,68 μg pNP $\text{mg}^{-1} \text{h}^{-1}$) en 100 ml de tampón, preparando el resto de proporciones con relación a estas concentraciones (para detalles ver el aptdo. 3.5.3.3). Seleccionada la proporción enzimática más adecuada para el tratamiento de cada material, se estudió el proceso de sacarificación empleando cinco concentraciones diferentes de los correspondientes sustratos lignocelulósicos: 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 y 10,0% (ver aptdo 3.5.3.4).

4.3.3.3.1. EFECTO DE LA PROPORCIÓN DE LOS ENZIMAS CELULOLÍTICOS

El efecto producido cuando se modificaba la proporción entre los enzimas celulolíticos inoculados a los sustratos celulósicos (CMC, celulosa amorfa MN-300 y C₆₄₁₃) sobre la producción de azúcares reductores se detalla en la Tabla 4.46. Un examen de esta tabla sirve para comprobar que el incremento de la cantidad de los enzimas presentes en el reactor suponía un aumento en la producción de azúcares reductores, siendo la concentración de CMCasa, la principal responsable de la producción de dichos azúcares. Cuando en el reactor se incluía carboximetilcelulosa como sustrato soluble, se producía una mayor liberación de azúcares reductores en el sistema que con las otras celulosas, duplicándose prácticamente su nivel al cuatriplicar la cantidad de celulasas inoculadas (Fig. 4.27). Sin embargo, el incremento del porcentaje de sacarificación no era proporcional a la concentración del enzima añadido al reactor (Tabla 4.47). Factores tales como la accesibilidad y el producto de reacción (que ejercía retroinhibición) podrían influir en la velocidad de hidrólisis de forma tal que una dosificación doble de enzima no proporcionaba el doble de azúcares reductores en el tiempo (Vallander y Eriksson, 1990). En todo caso, estos resultados son coincidentes con las conclusiones derivadas de los trabajos de Klyosov (1990) sobre hidrólisis de celulosas amorfas.

Un aporte de β -glucosidasa de *A. niger* a los reactores que trabajaban con celulosa amorfa CMN-300 o con celulosa microgranular C₆₄₁₃ suponía un ligero incremento de la cantidad de azúcares reductores producidos, provocando un efecto similar en la generación de glucosa (Tabla 4.48). La inoculación de β -glucosidasa en la celulosa soluble CMC no afectaba la cantidad de azúcares reductores obtenidos, aunque sí a los niveles de glucosa, que se duplicaban. Sin embargo, el incremento adicional de la cantidad de β -glucosidasa añadida no suponía variaciones en la cantidad de glucosa producida. Tal y como puede deducirse de la observación de la Fig. 4.28, que refleja la influencia de la proporción de enzimas celulolíticos sobre la producción de glucosa, la inoculación de β -glucosidasa aislada de *A. niger* mejoraba sensiblemente los rendimientos del proceso hidrolítico de los distintos tipos de celulosa, resultando menos sensible a la inactivación que la β -glucosidasa procedente de *T. reesei* (Enari, 1983). Cuando las preparaciones celulásicas de *Trichoderma* se suplementaban con β -glucosidasa aislada de *A. niger*, la

Tabla 4.46. Efecto de la proporción de enzimas celulolíticos sobre la producción de azúcares reductores en la hidrólisis de celulosas comerciales.

Proporción (CMCasa/ β DG) ^b	Tiempo de hidrólisis (h)	Concentración de azúcares reductores ^a		
		CMC	CMN-300	C ₆₄₁₃
1/0	2	21,52	6,09	2,02
	5	31,82	4,12	4,52
	12	50,29	5,52	6,18
	24	50,45	6,78	8,34
	36	54,24	7,64	11,95
	48	60,00	6,70	12,35
1/1	2	30,76	4,76	2,45
	5	42,11	6,74	4,54
	12	47,49	5,87	7,90
	24	59,36	7,44	11,35
	36	58,69	7,66	16,35
	48	67,60	8,12	18,56
1/2	2	36,44	4,15	2,29
	5	50,90	5,66	4,47
	12	60,68	5,38	7,83
	24	73,72	5,86	11,80
	36	60,49	6,27	15,96
	48	70,68	8,73	17,34
2/1	2	44,85	6,43	8,32
	5	48,00	6,92	9,79
	12	60,81	9,16	12,87
	24	85,95	9,96	16,32
	36	89,93	11,74	20,09
	48	85,70	13,37	25,74
4/1	2	46,30	7,74	10,93
	5	63,00	8,74	13,41
	12	68,24	13,90	17,81
	24	100,50	17,20	21,86
	36	105,70	19,41	23,12
	48	107,20	24,08	29,51

^a En mg glucosa g⁻¹ celulosa

^b Relación CMCasa / β DG referida a 25 mg de CMCasa

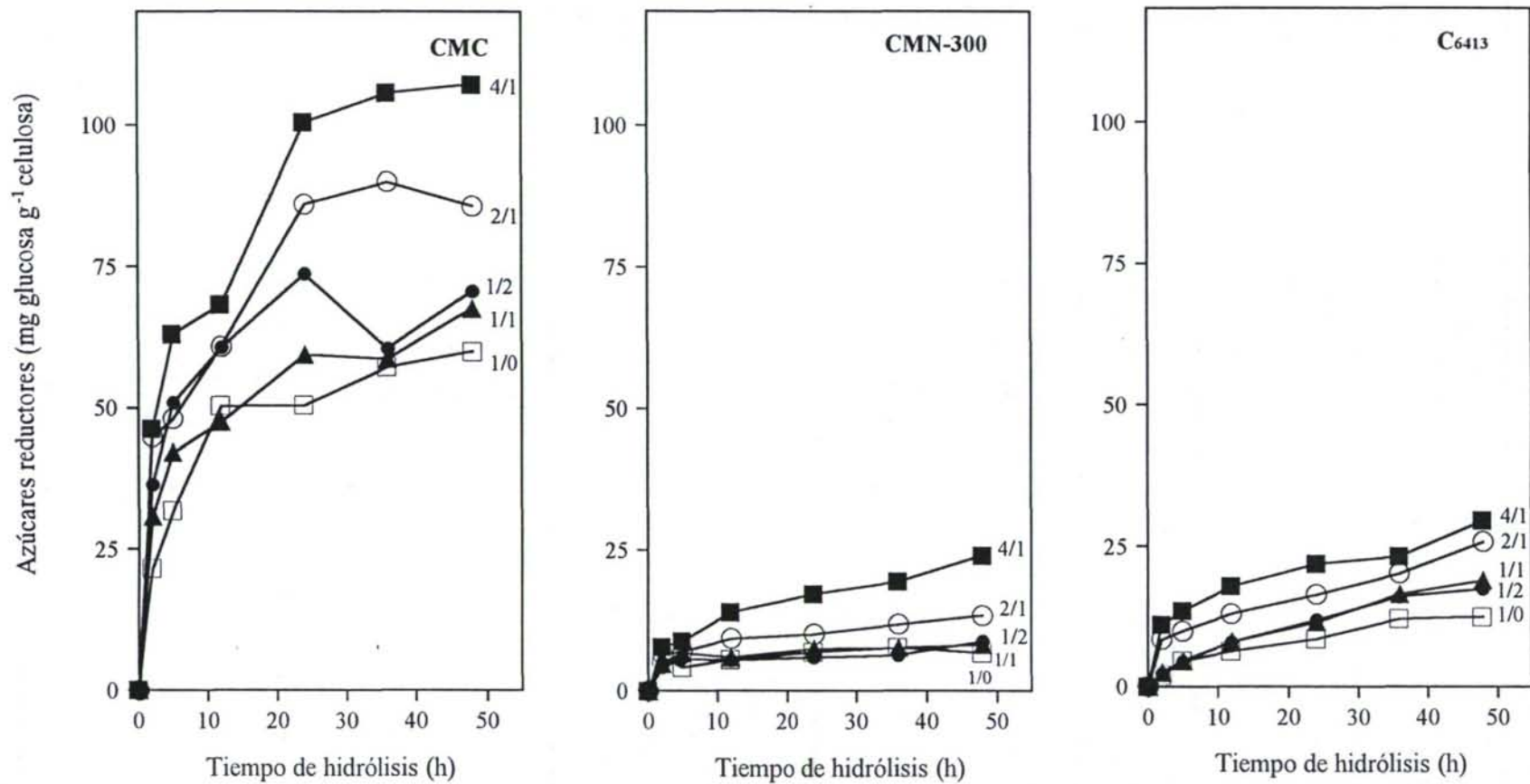


Fig. 4.27. Efecto de la proporción de enzimas celulolíticas (CMC/Casa / β -glucosidasa) añadidos sobre la producción de azúcares reductores en la hidrólisis de celulosas comerciales.

Tabla 4.47. Efecto de la proporción de enzimas celulolíticos sobre la sacarificación de celulosas comerciales.

Proporción (CMCasa/ β DG) ^a	Tiempo de hidrólisis (h)	% de sacarificación		
		CMC	CMN-300	C ₆₄₁₃
1/0	2	1,90	0,50	0,20
	5	2,90	0,40	0,40
	12	4,50	0,50	0,60
	24	4,50	0,60	0,80
	36	5,20	0,70	1,10
	48	5,40	0,60	1,10
1/1	2	2,80	0,40	0,20
	5	3,80	0,60	0,40
	12	4,30	0,50	0,70
	24	5,30	0,70	1,00
	36	5,30	0,70	1,50
	48	6,10	0,70	1,70
1/2	2	3,28	0,37	0,21
	5	4,58	0,51	0,40
	12	5,46	0,48	0,71
	24	6,63	0,53	1,06
	36	5,44	0,56	0,44
	48	6,36	0,79	1,56
2/1	2	4,00	0,60	0,70
	5	4,30	0,60	0,90
	12	5,50	0,80	1,20
	24	7,70	0,90	1,50
	36	8,10	1,10	1,80
	48	7,70	1,20	2,30
4/1	2	4,20	0,70	1,00
	5	5,70	0,80	1,20
	12	6,10	1,20	1,60
	24	9,00	1,50	2,00
	36	9,50	1,70	2,10
	48	9,60	2,20	2,70

^a Relación CMCasa / β DG referida a 25 mg de CMCasa)

Tabla 4.48. Efecto de la proporción de enzimas celulolíticos sobre la producción de glucosa en la hidrólisis de celulosas comerciales.

Proporción (CMCasa/ β DG) ^b	Tiempo de hidrólisis (h)	Concentración de glucosa ^a		
		CMC	CMN-300	C ₆₄₁₃
1/0	2	3,43	6,70	1,26
	5	2,46	6,23	1,63
	12	1,44	4,46	2,27
	24	2,55	1,84	4,49
	36	1,44	2,10	4,65
	48	3,11	3,64	3,44
1/1	2	5,44	7,30	1,65
	5	5,49	8,91	2,39
	12	2,30	8,35	3,81
	24	4,80	6,80	4,59
	36	5,57	13,62	4,56
	48	6,73	8,28	4,64
1/2	2	5,81	2,79	1,81
	5	5,54	5,90	3,28
	12	4,46	6,15	3,72
	24	5,05	1,88	4,64
	36	6,39	4,08	4,71
	48	6,81	3,95	4,46
2/1	2	3,88	6,72	2,27
	5	6,54	4,45	3,48
	12	3,72	7,88	4,57
	24	6,07	5,40	4,68
	36	4,83	6,49	4,65
	48	5,65	5,77	4,64
4/1	2	8,66	12,22	3,59
	5	8,96	8,09	4,88
	12	5,28	11,70	4,59
	24	12,72	9,83	3,75
	36	12,98	11,58	3,35
	48	14,38	11,90	4,63

^a En mg glucosa g⁻¹ celulosa

^b Relación CMCasa / β DG referida a 25 mg de CMCasa

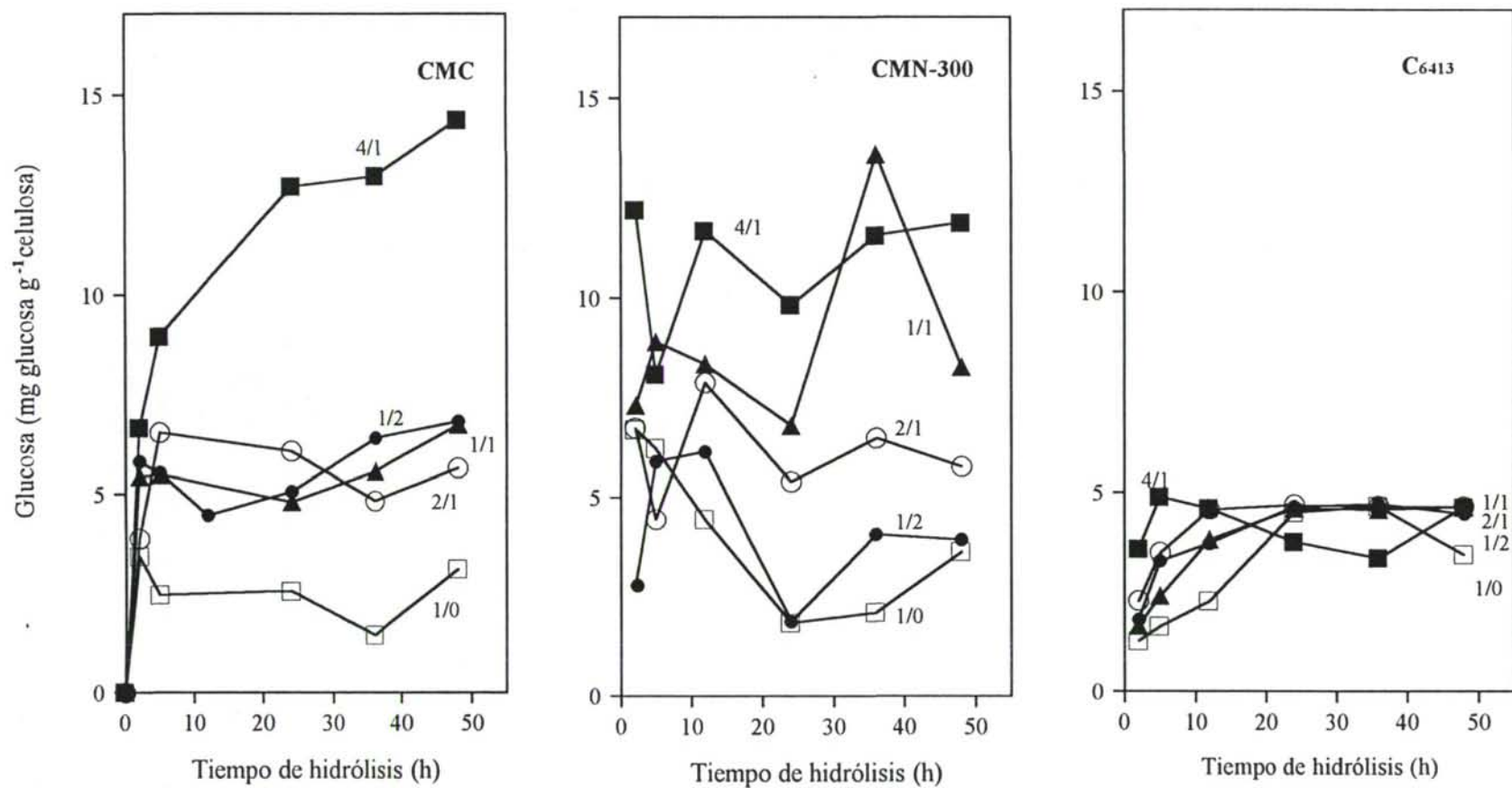


Fig. 4.28. Efecto de la proporción de enzimas celulolíticos (CMC/asa / β -glucosidasa) añadidos sobre la producción de glucosa en la hidrólisis de celulosas comerciales.

glucosa aparecía como el producto predominante, incrementándose de forma significativa los rendimientos de sacarificación. Este efecto podría explicarse por una posible reducción de la inhibición de la celobiosa, observada en algunos casos (Yamanaka *et al.*, 1976). Sin embargo, no hay que olvidar que la inoculación de β -glucosidasa a los biorreactores de sacarificación, encarece desde el punto de vista económico la producción de glucosa y azúcares (Sternberg *et al.*, 1977).

Las Tablas 4.49, 4.50 y 4.51 muestran los valores obtenidos cuando se efectuaba un estudio paralelo al expuesto, pero con paja nativa y pretratada. Del análisis de estos datos podemos deducir que la cantidad de celulosa añadida al reactor ejercía un efecto diferenciado en cada uno de los sustratos lignocelulósicos estudiados. La hidrólisis de paja nativa se incrementa en un 36% cuando se duplicaba la concentración de las celulasas añadidas. Si esa concentración era duplicada de nuevo (4/1), el aumento producido era únicamente del 16,0% (Tabla 4.49). La paja tratada previamente con NaOH resultaba ser el sustrato más afectado por la proporción de la mezcla enzimática y el que proporcionaba mayores rendimientos de azúcares reductores. En la Fig. 4.29 se observa que para producir los mismos niveles de azúcares los reactores que operaban con las proporciones más elevadas de celulasas (4/1) necesitaban la cuarta parte de tiempo que el que requería la mezcla enzimática 1/1. Así, y aunque la cantidad de enzima añadido fuera mayor, se podrían disminuir considerablemente los tiempos de hidrólisis. Este hecho, permitiría la selección de las condiciones más convenientes en cada situación en función de la economía global del proceso (disponibilidad de equipo y gasto energético frente a mayor gasto en enzimas). Cuando la paja se trataba con peróxido de hidrógeno, el efecto ejercido por la variación de la concentración enzimática era superior al experimentado por la paja nativa, pero sin alcanzar los niveles encontrados con la paja pretratada con hidróxido sódico. Cada vez que se duplicaba la cantidad de celulasas con la que se trataba la paja sometida al H_2O_2 , el porcentaje de sacarificación se incrementaba aproximadamente 10 unidades (Tabla 4.50). Con los tres sustratos lignocelulósicos estudiados, la utilización de las mayores concentraciones de enzima no suponía una producción proporcional de azúcares.

Tabla 4.49. Efecto de la proporción de enzimas celulolíticos sobre la producción de azúcares reductores en la hidrólisis enzimática de paja de trigo.

Proporción (CMCasa/ β DG) ^b	Tiempo de hidrólisis (h)	Concentración de azúcares reductores ^a		
		Paja sin tratar	Paja tratada con NaOH	Paja tratada con H ₂ O ₂
1/0	2	1,11	27,86	14,24
	5	5,59	31,91	24,52
	12	5,96	47,12	47,67
	24	17,38	88,80	93,38
	36	14,16	90,24	119,74
	48	29,97	74,12	131,44
1/1	2	1,92	26,31	20,25
	5	6,65	35,91	23,06
	12	10,61	47,76	43,45
	24	22,96	76,12	83,92
	36	27,19	124,96	115,03
	48	38,78	127,60	140,12
1/2	2	4,97	23,55	21,63
	5	9,22	28,68	23,29
	12	17,03	48,08	45,52
	24	25,33	73,56	85,05
	36	32,24	98,34	86,94
	48	37,32	110,02	113,24
2/1	2	5,93	45,84	25,22
	5	11,03	56,13	51,22
	12	25,42	80,60	69,09
	24	37,16	146,72	119,78
	36	45,65	177,28	145,20
	48	52,84	184,56	179,48
4/1	2	5,09	78,76	44,95
	5	17,81	92,45	57,60
	12	32,68	131,81	97,12
	24	43,79	160,90	136,92
	36	55,55	221,60	201,74
	48	61,32	271,36	221,27

^a En mg de glucosa g⁻¹ paja

^b Proporción referida a 25 mg de CMCasa

Tabla 4.50. Efecto de la proporción de enzimas celulolíticos sobre la sacarificación de paja de trigo.

Proporción (CMCasa/ β DG) ^a	Tiempo de hidrólisis (h)	% de sacarificación		
		Paja sin tratar	Paja tratada con NaOH	Paja tratada con H ₂ O ₂
1/0	2	0,42	6,26	3,14
	5	2,10	7,17	5,40
	12	4,33	10,58	10,50
	24	6,51	19,95	20,57
	36	5,31	20,27	26,37
	48	11,23	16,65	28,96
	1/1	2	0,72	5,91
5		2,49	8,07	5,08
12		3,98	10,73	9,57
24		8,61	17,10	18,49
36		10,19	28,07	25,34
48		14,53	28,66	30,87
1/2		2	1,86	5,29
	5	3,46	6,44	5,13
	12	6,38	10,80	10,02
	24	9,49	16,47	18,72
	36	12,83	22,08	19,14
	48	13,99	24,70	24,92
	2/1	2	2,22	10,29
5		4,47	12,60	11,35
12		9,52	18,10	15,22
24		13,93	32,95	26,39
36		17,10	39,81	31,99
48		19,80	41,45	32,18
4/1		2	1,91	17,68
	5	6,68	20,75	12,66
	12	12,25	29,59	21,35
	24	16,41	36,12	30,10
	36	20,82	49,75	44,34
	48	22,98	60,93	51,86

^a Proporción referida a 25 mg de CMCasa

Tabla 4.51. Efecto de la proporción de CMCasa / β -glucosidasa sobre la producción de glucosa en la hidrólisis enzimática de paja de trigo.

Proporción (CMCasa/ β DG) ^b	Tiempo de hidrólisis (h)	Concentración de glucosa ^a		
		Paja sin tratar	Paja tratada con NaOH	Paja tratada con H ₂ O ₂
1/0	2	0,23	1,99	1,10
	5	0,28	4,58	3,96
	12	1,03	8,56	6,14
	24	9,60	19,36	12,56
	36	12,54	23,61	17,37
	48	16,56	31,37	23,18
1/1	2	0,03	4,53	0,54
	5	0,50	6,64	3,35
	12	2,01	19,22	9,21
	24	14,99	35,16	15,52
	36	20,45	37,51	23,23
	48	26,99	34,40	17,57
1/2	2	0,30	5,68	1,74
	5	0,82	8,59	4,77
	12	1,23	22,25	7,53
	24	17,53	38,20	14,70
	36	22,38	53,26	24,82
	48	25,89	64,42	32,92
2/1	2	0,61	7,98	3,23
	5	0,93	10,64	7,21
	12	2,97	28,11	1,36
	24	26,41	51,35	25,72
	36	28,79	69,36	29,81
	48	31,84	85,26	56,06
4/1	2	0,45	16,16	8,52
	5	0,76	28,45	12,28
	12	1,95	61,05	29,08
	24	27,55	91,97	49,32
	36	29,15	86,47	73,11
	48	26,67	88,36	99,35

^a En mg de glucosa g⁻¹ paja

^b Proporción referida a 25 mg de CMCasa

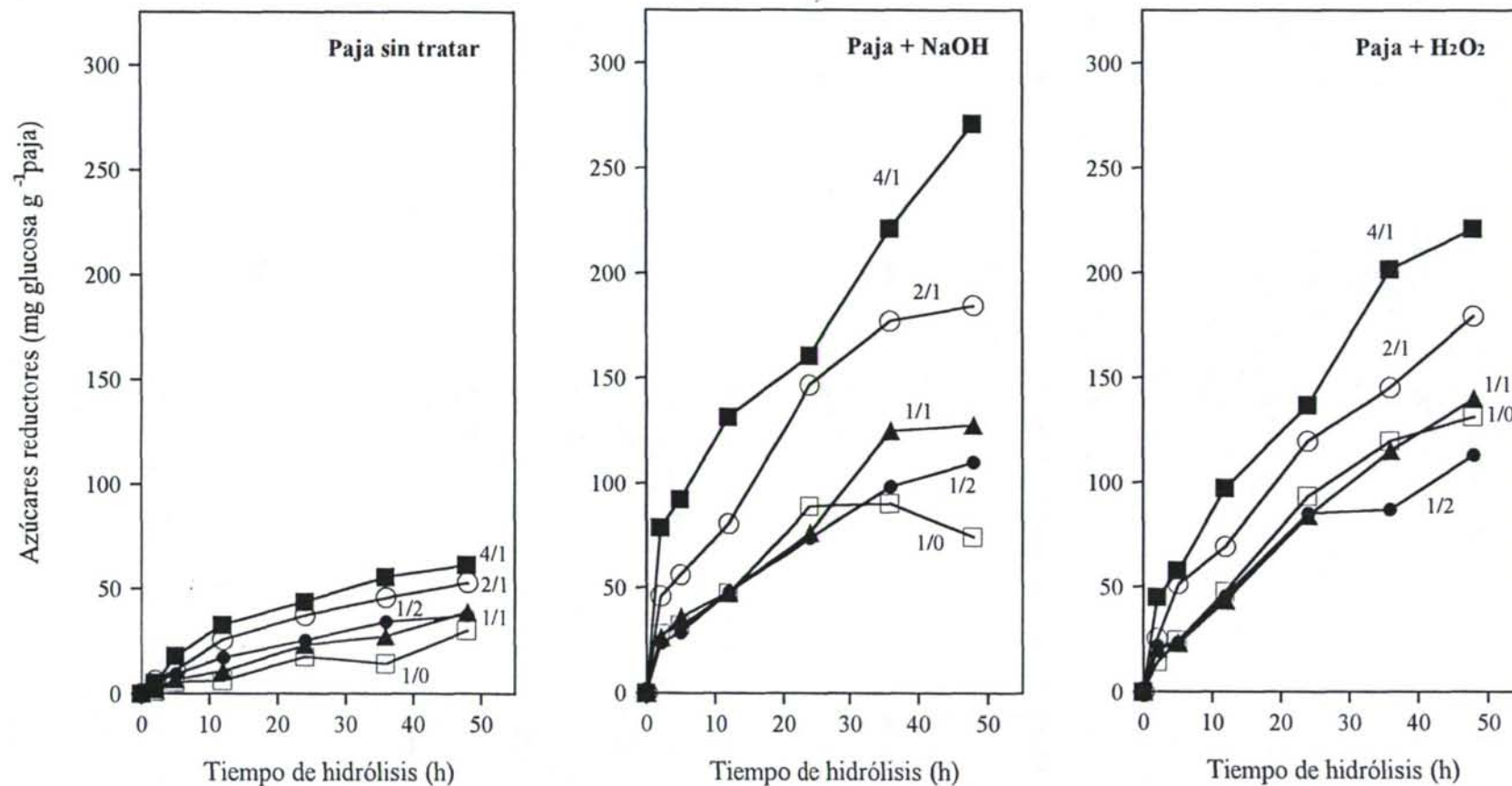


Fig. 4.29. Efecto de la proporción de enzimas celulolíticos (CMCasa / β -glucosidasa) añadidos sobre la producción de azúcares reductores en la hidrólisis de paja de trigo.

El hecho de que únicamente se obtuvieran pequeños incrementos en la velocidad de hidrólisis de los materiales lignocelulósicos, cuando se utilizaban concentraciones altas de enzimas, podría explicarse en función de una neutralización parcial de la sacarificación por incremento de la velocidad de transglucosilación (Vallander y Eriksson, 1985). Los resultados obtenidos en este sentido son concordantes con los encontrados por otros investigadores. La cantidad de enzima necesaria para obtener unos niveles determinados de sacarificación para un sustrato concreto estaban claramente ligados a la composición de la mezcla enzimática (Vallander y Eriksson, 1985; Dekker y Wallis, 1983).

Por otra parte, la cantidad de glucosa producida durante el proceso hidrolítico de paja de trigo nativa se veía incrementada cuando el medio contenía β -glucosidasa exógena, aunque era independiente de la cantidad de enzima añadido (Tabla 4.51). Una comparación de los resultados obtenidos en reactores que trabajaban con paja pretratada con NaOH, en ausencia de β -glucosidasa, con aquellos que lo hacían con 25 mg de este enzima, indicaba que apenas existían variaciones en los rendimientos de glucosa. Sin embargo, si la cantidad de β -glucosidasa inoculada se incrementaba hasta 50 mg, la cantidad de glucosa liberada era el doble (64 mg glucosa g⁻¹ paja). Esto demostraba que la concentración de β -glucosidasa es crítica en el proceso hidrolítico global. La Fig. 4.30 indica que las mayores concentraciones de glucosa se obtenían cuando se utilizaba la proporción 4/1, aunque la proporción 2/1 proporcionaba también niveles muy elevados de este monosacárido. En todo caso, la concentración más determinante en la obtención del producto final era la de la CMCasa, debido quizás a que los enzimas obtenidos de *T. reesei* no estaban totalmente purificados y/o a que la preparación de celulasas contenía cierta actividad β -glucosidasa. En cualquier caso, la inoculación de β -glucosidasa en los biorreactores que trabajaban con paja nativa y tratada con H₂O₂ provocaba prácticamente la duplicación de los niveles de sacarificación. Según Vallander y Eriksson (1990) puede alcanzarse un alto grado de sacarificación de paja de cereal con una cantidad moderada de celulasas, siempre y cuando el sustrato sea pretratado adecuadamente y la preparación de celulasas contenga suficiente cantidad de β -glucosidasa.

Del análisis de los resultados discutidos en este apartado, y teniendo en cuenta las consideraciones económicas más habituales, podría concluirse que la proporción más

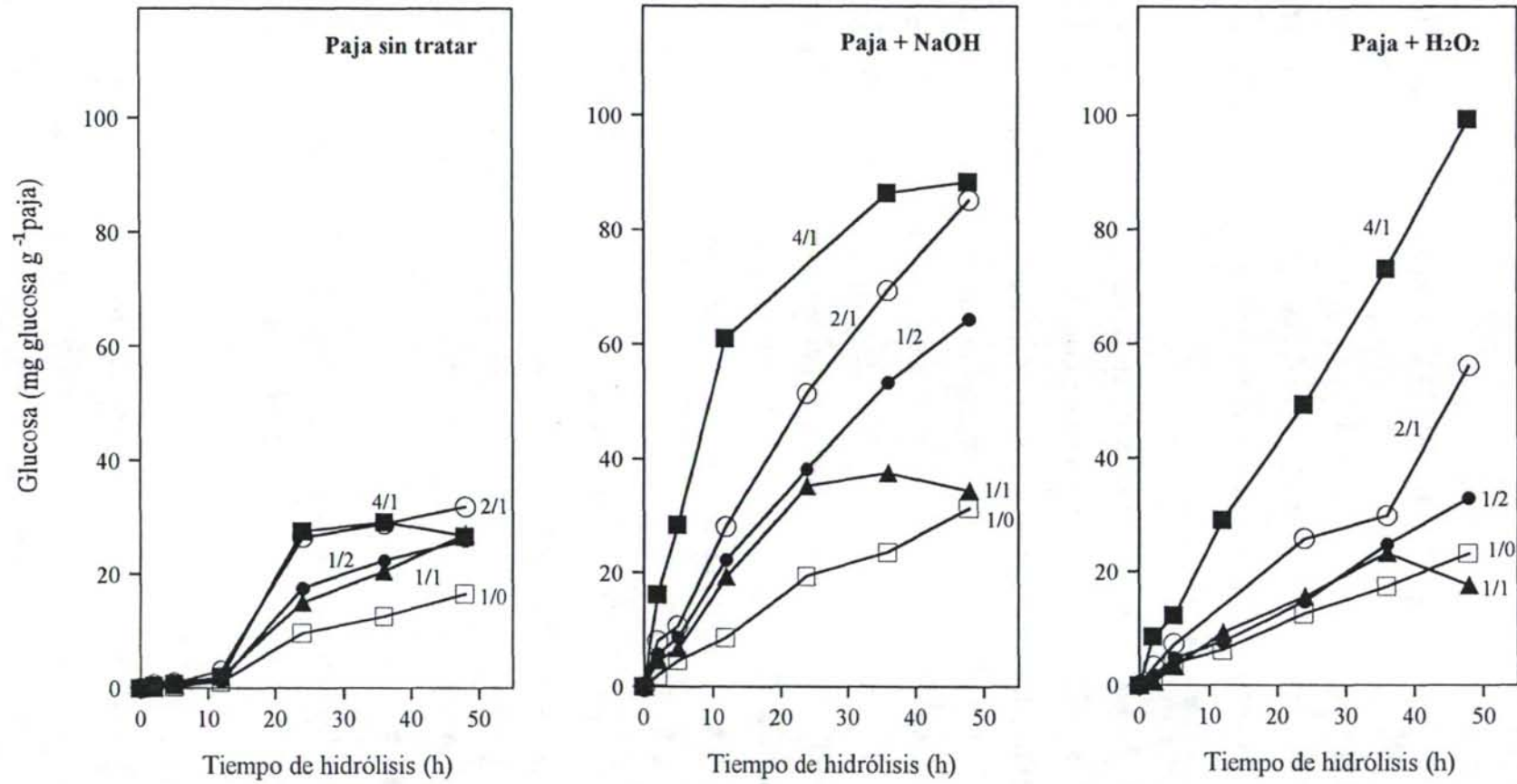


Fig. 4.30. Efecto de la proporción de enzimas celulolíticos (CMCasa / β -glucosidasa) añadidos sobre la producción de glucosa en la hidrólisis de paja de trigo.

adecuada entre las celulasas y la β -glucosidasa era de 4/1 para los sustratos celulósicos y de 2/1 para los lignocelulósicos.

4.3.3.3.2. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO.

En este apartado se refieren los resultados obtenidos al estudiar el proceso de sacarificación cuando se variaba la concentración del material lignocelulósico (0,5; 1,0; 2,5; 5,0 y 10,0%) utilizando la proporción y concentración enzimáticas encontradas como más adecuadas en el estudio anterior.

La Tabla 4.52 muestra la producción de azúcares reductores y la Tabla 4.53 el porcentaje de sacarificación cuando se hidrolizaban distintas cantidades de CMC, CMN-300 y C₆₄₁₃. En todos los casos se observaba que a medida que disminuía la concentración inicial del material celulósico se producía un mayor grado de sacarificación. Los materiales que resultaban menos afectados por la variación de la concentración de sustrato eran la celulosa microgranular C₆₄₁₃ y la CMC, y el que presentaba una mayor variación era la celulosa MN-300. En la Tabla 4.53 puede observarse que los incrementos de los niveles de sacarificación de la celulosa MN-300 eran tanto más elevados cuanto más se aproximara a la concentración utilizada en la inducción de las celulasas en los cultivos de *T. reesei* (0,4%) (aptdo 3.1.1.2).

Por otra parte, cuando se incrementaba la concentración de la CMN-300 del 0,5 al 10% se limitaba muy sustancialmente el rendimiento en azúcares reductores producidos de 120 a 4 mg g⁻¹ celulosa (Fig. 4.31), justificado quizás en parte por la menor accesibilidad enzima/sustrato (mayor dificultad de agitación) y la mayor inhibición por el producto final (Szczodrak, 1988).

Los resultados del estudio paralelo con materiales lignocelulósicos (paja de trigo nativa y tratada con hidróxido sódico y agua oxigenada) se reflejan en las Tablas 4.54 y 4.55, referidas a la producción de azúcares reductores y porcentajes de sacarificación, respectivamente. Al igual que con los sustratos celulósicos, la sacarificación y cantidad de azúcares liberados por gramo de paja disminuían muy considerablemente al aumentar la concentración inicial de sustrato. Así, los mejores rendimientos se obtenían siempre cuando se trabajaba con una concentración del 0,5 %. Los incrementos en la velocidad

Tabla 4.52. Efecto de la concentración de las celulosas comerciales sobre su velocidad de hidrólisis enzimática.

Concentración de sustrato (%)	Tiempo de hidrólisis (h)	Concentración de azúcares reductores ^a		
		CMC	CMN-300	C ₆₄₁₃
0,5	2	110,78	14,86	2,62
	5	106,80	30,45	3,54
	12	99,77	57,23	17,04
	24	113,08	82,25	28,82
	36	111,00	98,99	28,16
	48	123,96	120,83	30,56
1,0	2	93,48	8,95	3,36
	5	97,07	16,12	5,77
	12	10,01	30,83	10,87
	24	99,70	41,94	20,29
	36	97,38	47,61	25,07
	48	93,38	60,24	26,27
2,5	2	69,07	5,03	3,55
	5	60,96	6,97	5,83
	12	66,80	9,18	10,59
	24	75,90	12,89	20,09
	36	89,90	15,01	23,19
	48	80,62	18,11	22,19
5,0	2	42,57	3,70	2,65
	5	56,90	4,16	4,28
	12	50,95	5,72	6,78
	24	62,52	6,47	11,32
	36	58,16	7,03	13,01
	48	69,15	8,57	13,76
10,0	2	n.d.	2,05	2,42
	5	n.d.	2,44	2,93
	12	37,87	3,21	4,90
	24	31,49	3,50	7,43
	36	37,36	3,89	7,63
	48	51,64	4,30	9,08

^a En mg glucosa g⁻¹ celulosa

Tabla 4.53. Efecto de la concentración de las celulosas comerciales sobre los niveles de sacarificación enzimática.

Concentración de sustrato (%)	Tiempo de hidrólisis (h)	% de sacarificación		
		CMC	CMN-300	C ₆₄₁₃
0,5	2	9,07	2,67	0,47
	5	9,61	5,48	0,64
	12	8,97	10,30	3,07
	24	10,18	14,81	5,19
	36	9,99	17,82	5,07
	48	11,16	21,75	5,50
1,0	2	8,41	0,81	0,30
	5	8,74	1,45	0,52
	12	9,00	2,77	0,98
	24	8,97	3,77	1,83
	36	8,76	4,29	2,26
	48	8,44	5,42	2,36
2,5	2	6,22	0,18	0,13
	5	5,47	0,25	0,21
	12	3,31	0,33	0,38
	24	6,83	0,46	0,72
	36	7,84	0,54	0,83
	48	7,26	0,65	0,80
5,0	2	3,83	0,07	0,05
	5	5,12	0,07	0,08
	12	4,59	0,10	0,12
	24	5,63	0,12	0,20
	36	5,23	0,13	0,23
	48	6,22	0,15	0,25
10,0	2	n.d.	0,04	0,04
	5	n.d.	0,04	0,05
	12	3,41	0,06	0,09
	24	2,83	0,06	0,13
	36	3,35	0,07	0,14
	48	4,65	0,08	0,16

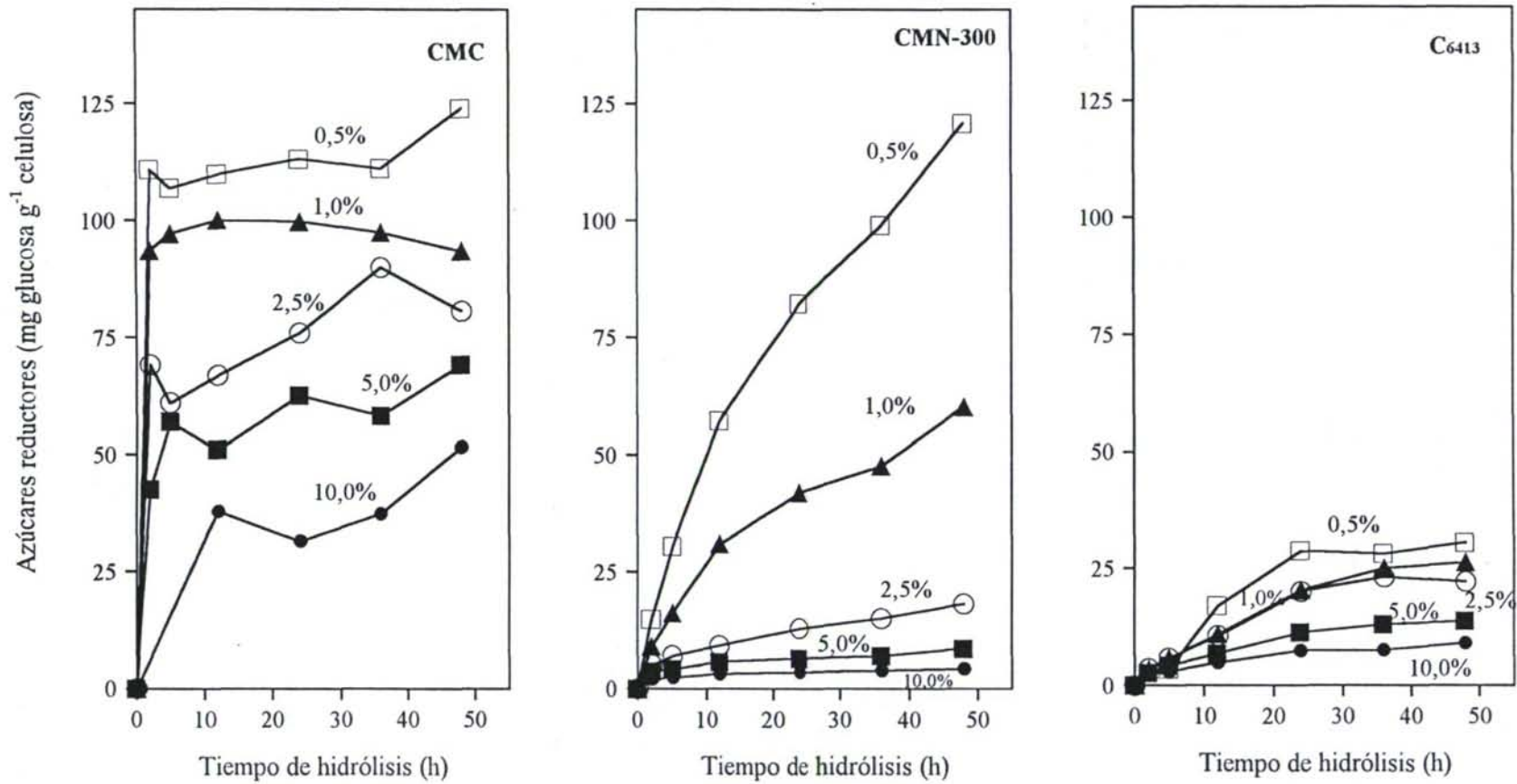


Fig. 4.31. Efecto de la concentración de sustrato sobre la hidrólisis enzimática de las celulosas comerciales.

Tabla 4.54. Efecto de la concentración de paja sobre la velocidad de hidrólisis enzimática.

Concentración de sustrato (%)	Tiempo de hidrólisis (h)	Concentración de azúcares reductores ^a		
		Paja sin tratar	Paja tratada con NaOH	Paja tratada con H ₂ O ₂
0,5	2	9,59	134,96	65,20
	5	n.d.	357,44	123,02
	12	20,18	509,88	260,60
	24	60,13	515,88	464,12
	36	68,23	822,16	554,46
	48	75,51	682,20	559,95
1,0	2	7,02	100,40	61,66
	5	16,09	163,42	76,31
	12	29,81	259,52	166,84
	24	56,10	436,60	333,41
	36	64,82	504,30	394,13
	48	73,54	610,80	455,84
2,5	2	5,10	37,74	49,82
	5	7,95	50,72	51,31
	12	19,84	131,80	102,47
	24	39,16	180,68	150,14
	36	56,08	240,76	216,89
	48	53,46	251,12	300,29
5,0	2	5,22	46,38	27,32
	5	7,24	89,36	30,70
	12	15,05	117,52	131,69
	24	28,70	113,36	135,86
	36	35,29	158,78	194,59
	48	41,87	192,38	185,81
10,0	2	3,52	37,64	16,42
	5	4,89	n.d.	19,42
	12	7,90	35,92	77,65
	24	13,48	48,69	81,30
	36	15,13	55,90	93,62
	48	17,88	63,35	n.d.

^a En mg de glucosa g⁻¹ paja

Tabla 4.55. Efecto de la concentración de paja sobre los niveles de sacarificación enzimática.

Concentración de sustrato (%)	Tiempo de hidrólisis (h)	% de sacarificación		
		Paja sin tratar	Paja tratada con NaOH	Paja tratada con H ₂ O ₂
0,5	2	3,59	17,58	11,28
	5	n.d.	46,54	21,28
	12	7,56	66,38	45,08
	24	22,54	66,92	80,29
	36	25,57	96,84	95,92
	48	28,30	88,82	96,87
1,0	2	2,63	13,08	10,67
	5	6,03	21,28	13,20
	12	11,17	33,78	28,89
	24	21,01	56,84	57,68
	36	24,09	65,64	68,19
	48	27,57	77,52	78,89
2,5	2	1,91	6,99	7,76
	5	2,98	11,81	8,88
	12	7,44	17,17	17,73
	24	14,68	23,52	25,99
	36	21,01	31,34	37,54
	48	20,04	32,70	51,97
5,0	2	1,96	6,04	4,73
	5	2,71	11,66	5,31
	12	5,64	15,30	22,78
	24	10,76	14,78	23,50
	36	13,23	20,68	33,50
	48	15,69	25,04	32,32
10,0	2	1,22	4,90	2,84
	5	1,83	n.d.	3,33
	12	2,92	9,54	13,44
	24	5,05	12,68	14,06
	36	5,67	14,56	16,20
	48	6,70	16,50	n.d.

de hidrólisis de la paja nativa (sobre todo en el rango de concentraciones entre 0,5 y 2,5%) eran muy inferiores a los experimentados por la paja pretratada, el mayor rendimiento alcanzado después de 48 h de hidrólisis de paja nativa suponía la producción de 75 mg glucosa g⁻¹, mientras que en el mismo tiempo se obtenían 682 mg por cada gramo de paja pretratada con NaOH al 0,5%. En este mismo sentido, es importante destacar los elevados niveles de sacarificación obtenidos con la paja tratada con H₂O₂: a las 24 h del inicio del proceso la sacarificación era del 89,3% y a las 36 h se alcanzaba ya un máximo del 95%. Este hecho confirmaba nuevamente la necesidad de realizar pretratamientos a los materiales lignocelulósicos con objeto de conseguir elevados rendimientos en los procesos de hidrólisis enzimática posteriores.

Del análisis de la Fig. 4.32, donde se representa la cantidad de azúcares reductores obtenidos a partir de los tres tipos de paja estudiadas a las diferentes concentraciones, podrían sacarse las siguientes conclusiones:

(1) La velocidad de hidrólisis se incrementaba rápidamente al principio de la reacción disminuyendo según se iba progresando en el proceso y en forma de respuesta hiperbólica.

(2) El incremento de la concentración del material lignocelulósico en la suspensión suponía un aumento de la velocidad inicial de la hidrólisis.

(3) En las hidrólisis realizadas a bajas concentraciones de sustrato a partir de 24 h de reacción la velocidad descendía de forma notable.

(4) La velocidad de hidrólisis de la paja tratada (tanto con NaOH como con H₂O₂) era muy superior a la de la paja nativa para todas las concentraciones de sustrato estudiadas.

Estos resultados coinciden con las experiencias llevadas a cabo por Lázaro (1991) al trabajar con diversos residuos lignocelulósicos.

De manera paralela a lo explicado con los materiales celulósicos, la disminución de la velocidad de hidrólisis podría explicarse teniendo en cuenta la heterogeneidad del sustrato y la retroinhibición por producto (David y Thiry, 1981). La heterogeneidad del sustrato (existencia de celulosas amorfa y cristalina) podría ser la responsable del rendimiento limitante observado a concentraciones iniciales de sustrato bajas (Cowling, 1975).

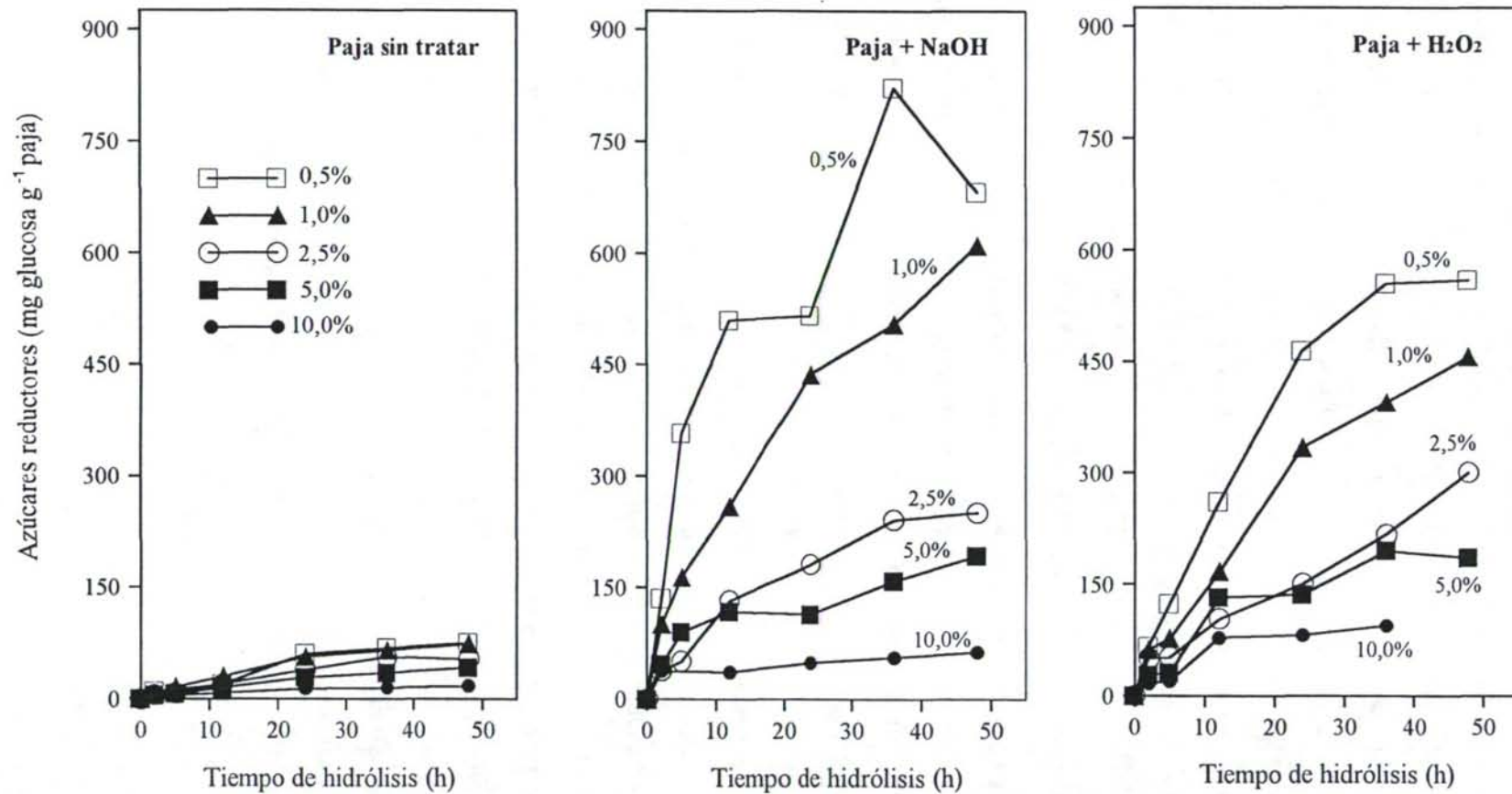


Fig. 4.32. Efecto de la concentración de sustrato sobre la hidrólisis enzimática de paja sin tratar y tratada con NaOH y con H₂O₂.

Una vez que la celulosa amorfa, fácilmente atacable, había sido degradada, la reacción transcurría a una velocidad mucho menor durante la hidrólisis de las regiones cristalinas más resistentes a la acción de los enzimas. Tanaka *et al.* (1986) encontraron que una de las causas de esta disminución de la velocidad se debía a que el tamaño de los poros de la celulosa cristalina era excesivamente pequeño. Adicionalmente, con concentraciones iniciales de sustrato elevadas podría esperarse una retroinhibición por los productos. La velocidad de reacción de las celulasas se incrementaba cuando se aumentaba el volumen de los poros accesibles a las enzimas, lo cual dependía de la intensidad del tratamiento al que había sido sometido el sustrato (Grethlein, 1985). Gharpuray *et al.* (1983) sostuvieron que la hidrólisis del sustrato podía expresarse de forma relativa como una función del área superficial, del índice de cristalinidad y del contenido en lignina.

Como ya se ha mencionado, los niveles de solubilización del sustrato eran más de tres veces superiores con paja pretratada con NaOH y con H₂O₂ que con paja nativa, cuando los reactores trabajaban durante 48 h en las condiciones óptimas de temperatura, pH, concentración de enzima y de sustrato (Tabla 4.55). Esto podría explicarse pensando que el área superficial de los poros accesibles al complejo enzimático se veía incrementada como consecuencia de los pretratamientos (Tanaka *et al.*, 1987). Es probable que la reacción de solubilización enzimática de los materiales celulósicos dependiera del área superficial correspondiente a los poros accesibles al enzima. Sólo los componentes del sistema celulolítico de menor peso molecular podrían difundirse lentamente hacia el interior de los pequeños poros que, sin embargo, resultarían inaccesibles para el conjunto del complejo enzimático. Esto produciría una disminución del movimiento molecular y de la acción sinérgica, produciendo un descenso en la velocidad de reacción. Sin embargo, cuando la velocidad de solubilización era alta como consecuencia de un incremento del tamaño de poro, la probabilidad de una acción catalítica en los poros más accesibles era mayor, siendo menos efectiva la difusión en los poros pequeños (Tanaka *et al.* 1987).

4.3.3.3. RELACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES DEL SISTEMA ENZIMÁTICO Y DE LOS SUSTRATOS

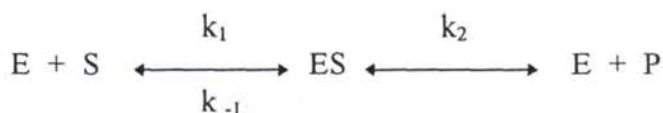
La relación entre las concentraciones del enzima y de los sustratos lignocelulósicos es una variable fundamental en los procesos hidrolíticos. En este sentido, y tras analizar los resultados obtenidos en los distintos ensayos, se eligieron como condiciones óptimas para cada sustrato las siguientes:

- Para CMC, CMN-300 y C₆₄₁₃ la concentración enzimática óptima era de 100 mg de celulasas en 100 ml (con una actividad de 82,560 μg glucosa h^{-1}). Como la concentración de sustrato óptima era del 0,5%, la relación enzima/sustrato era de 165,120 μg glucosa $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ celulosa.

- Para paja, paja pretratada con NaOH y paja pretratada con H₂O₂ la concentración del enzima más adecuada era de 50 mg celulasas en 100 ml (con una actividad de 42,280 μg glucosa h^{-1}). Como la concentración de sustrato óptima volvía a ser del 0,5%, la relación enzima/sustrato era de 82,560 μg glucosa $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ de paja.

4.3.3.4. CINÉTICA DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PAJA Y DE LAS CELULOSAS COMERCIALES

La cinética de hidrólisis enzimática de la celulosa ha sido estudiada ampliamente y teniendo en cuenta la diversidad de sistemas de reacción investigados, se han propuesto varios modelos, de los cuales el más aceptado es el de Michaelis-Menten (p.e. Roberts, 1977). Este sistema puede representarse en el siguiente esquema simplificado:



en donde: E: enzima (el sistema de celulasas)
 S: sustrato (los materiales lignocelulósicos)
 ES: complejo celulasas/celulosa
 P: producto (azúcares reductores)

Para un sistema en estado estacionario la velocidad de reacción podría expresarse como:

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Ec. 4.1})$$

Donde V_{\max} y K_m son los parámetros cinéticos, velocidad máxima y constante de Michaelis, útiles para describir las propiedades de las reacciones enzimáticas. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la hidrólisis enzimática a diferentes concentraciones de sustrato (veáanse las Tablas 4.52 y 4.54), se puede hacer un estudio cinético correspondiente a la degradación enzimática de los materiales utilizados. Para ello es necesario hacer un cambio de las unidades de la concentración de:

Sustrato [S]: Materiales lignocelulósicos de % (p/v) a g l^{-1} .

Producto: Azúcares reductores de mg glucosa g^{-1} celulosa a g glucosa l^{-1} .

4.3.3.4.1. CINÉTICA DE MICHAELIS

En las Figuras 4.33 y 4.34 (Tablas 4.56 y 4.57) se representan las cinéticas correspondientes a la hidrólisis enzimática de las celulosas y los diferentes tipos de paja, respectivamente, utilizando las unidades indicadas para 48 h de reacción. Las curvas hiperbólicas recogidas en dichas figuras indican que la hidrólisis celulásica de todos los materiales seguía una cinética de Michaelis-Menten. No obstante, y para el caso concreto de la celulosa MN-300, no fue posible el cálculo de las constantes cinéticas, debido a que incluso a la concentración del 0,5%, se obtenían ya valores de saturación. Al incrementar las concentraciones de sustrato se producía una inhibición de la acción enzimática. En cualquier caso, podía deducirse que la velocidad de hidrólisis enzimática cuando se aplicaba como sustrato celulosa MN-300 era menor (Fig. 4.33). A partir de estos datos, y tras el correspondiente cálculo automático con ordenador, se obtuvieron los valores de las constantes cinéticas de Michaelis (K_m y V_{\max}) correspondientes al conjunto de celulosas capaces de degradar las celulosas comerciales y los diferentes tipos de paja de trigo (Tablas 4.58 y 4.59 respectivamente).

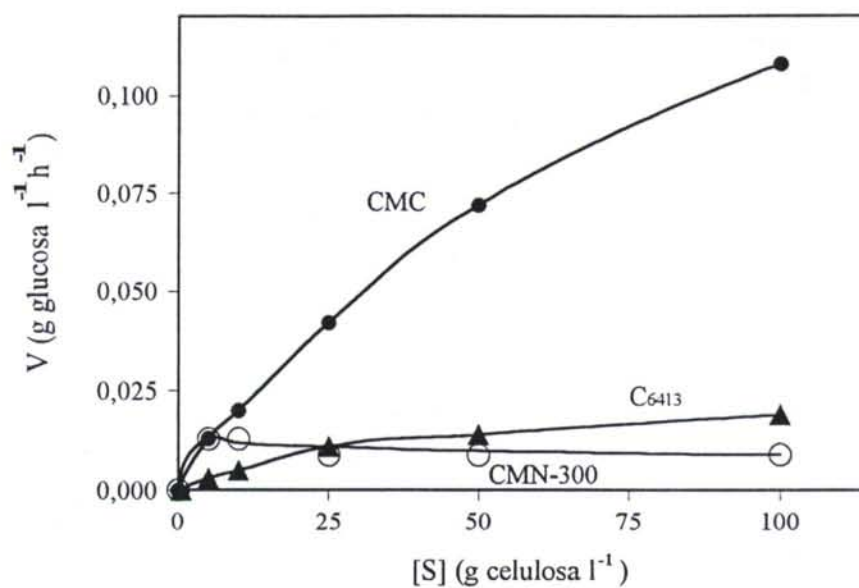


Fig. 4.33. Cinética de Michaelis-Menten para la degradación enzimática de celulosas comerciales.

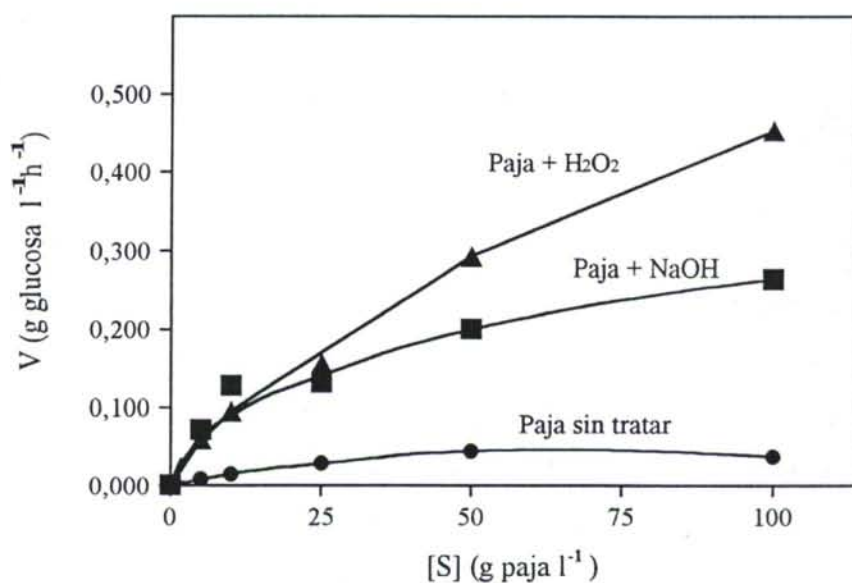


Fig. 4.34. Cinética de Michaelis-Menten para la degradación enzimática de paja sin tratar y tratada con NaOH y H₂O₂.

Tabla 4.56. Cinética de la hidrólisis enzimática de celulosas comerciales.

Sustrato	[S] ^a	V ^b
CMC	5	0,013
	10	0,020
	25	0,042
	50	0,072
	100	0,108
CMN-300	5	0,013
	10	0,013
	25	0,009
	50	0,009
	100	0,009
C ₆₄₁₃	5	0,003
	10	0,005
	25	0,011
	50	0,014
	100	0,019

^a En g celulosa l⁻¹^b En g glucosa l⁻¹ h⁻¹

Entre los sustratos celulósicos, la mayor capacidad de hidrólisis enzimática se obtenía con carboximetilcelulosa ($V_{\max} = 0,119 \text{ g glucosa h}^{-1} \text{ l}^{-1}$), mientras que la paja más susceptible a la degradación más rápida era la tratada con agua oxigenada (la velocidad máxima de la paja nativa era cuatro veces menor que la de la tratada con H_2O_2). De nuevo, se evidenciaba la utilidad de los pretratamientos del material crudo con objeto de acelerar su degradación. Resulta lógico, por otra parte, que el material celulósico más soluble aparezca como el que se degradaba a mayor velocidad.

Las constantes de Michaelis, K_m , de las celulosas comerciales CMC y C₆₄₁₃ eran relativamente similares entre sí, presentando una mayor afinidad por los enzimas la celulosa microgranular C₆₄₁₃ (Tabla 4.58). Los valores de K_m para la paja pretratada sufrían

una disminución muy importante, indicando, de nuevo, que los tratamientos con H_2O_2 y, sobre todo, con NaOH incrementaban apreciablemente la afinidad y accesibilidad del enzima hacia los sustratos. Por tanto, ambos pretratamientos parecían adecuados para la paja de trigo estudiada, ya que tanto los niveles de sacarificación como la velocidad de hidrólisis y la afinidad por los enzimas hidrolíticos se veían incrementados considerablemente con el uso de estos reactivos.

Tabla 4.57. Cinética de la hidrólisis enzimática de paja de trigo.

Sustrato	[S] ^a	V ^b
Paja sin tratar	5	0,008
	10	0,015
	25	0,028
	50	0,044
	100	0,037
Paja tratada con NaOH	5	0,071
	10	0,127
	25	0,131
	50	0,200
	100	0,264
Paja tratada con H_2O_2	5	0,059
	10	0,095
	25	0,156
	50	0,200
	100	0,264

^a En g paja l⁻¹

^b En g glucosa l⁻¹ h⁻¹

4.3.3.4.2. INHIBICIÓN COMPETITIVA

El proceso de hidrólisis enzimática de los materiales lignocelulósicos estaba determinado por un gran número de variables. Una de estas variables era la relativa a los

cambios en la actividad hidrolítica como consecuencia de la inhibición de los enzimas por distintos efectores. Esta inhibición podía ser reversible, cuando la actividad de los enzimas podía recuperarse eliminando el inhibidor por medios físicos y químicos, o irreversible, cuando se producía una pérdida de actividad después de un cierto tiempo, incluso en presencia de bajas concentraciones de enzima.

Tabla 4.58. Constantes cinéticas referidas a la hidrólisis enzimática de celulosas comerciales.

Sustrato	V_{max}^a	K_m^b	r^c
CMC	0,119	43,09	0,9990
CMN-300	n.d.	n.d.	n.d.
C ₆₄₁₃	0,026	35,78	0,9989

^a En g glucosa h⁻¹ l⁻¹

^b En g celulosa l⁻¹

^c Coeficiente de correlación lineal de Lineweaver-Burk

Tabla 4.59. Constantes cinéticas referidas a la hidrólisis enzimática de paja.

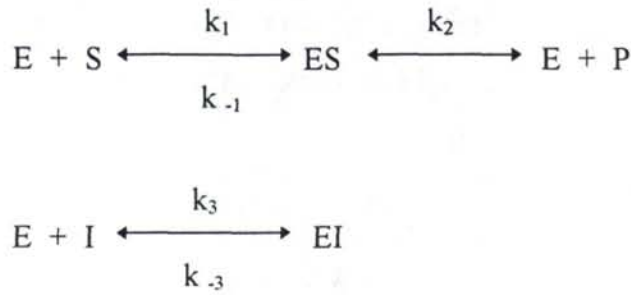
Sustrato	V_{max}^a	K_m^b	r^c
Paja nativa	0,057	30,14	0,9950
Paja tratada con NaOH	0,244	11,98	0,9690
Paja tratada con H ₂ O ₂	0,362	27,88	0,9900

^a En g glucosa h⁻¹ l⁻¹

^b En g paja l⁻¹

^c Coeficiente de correlación lineal de Lineweaver-Burk

Las celulasas presentaban inhibición competitiva (Vallander and Eriksson, 1990), conocida también como "inhibición por afinidad", puesto que el inhibidor y el sustrato competían por el mismo punto activo del enzima. La estructura del inhibidor era similar al sustrato, por lo que mostraba una afinidad parecida para unirse al enzima. El mecanismo de este tipo de inhibición puede representarse mediante las siguientes ecuaciones:



siendo:

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} = \frac{k_{-3}}{k_3}$$

con lo que se obtiene la siguiente ecuación cinética en presencia del inhibidor:

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m(1 + ([I] / k_i)) + [S]} \quad (\text{Ec. 4.2})$$

La ecuación de la velocidad correspondiente a la inhibición competitiva puede integrarse fácilmente, obteniéndose una expresión en la que pueden ajustarse directamente los resultados para el tiempo de duración del experimento.

La ecuación integrada es la siguiente:

$$\frac{[S]_o - [S]_t}{t} = V_{\max} - K_m(1 + ([I] / k_i)) \frac{1}{t} \ln([S]_o / [S]_t) \quad (\text{Ec. 4.3})$$

La representación de $([S]_o - [S]_t)$ frente a $(1/t)(\ln([S]_o / [S]_t))$, para una serie de concentraciones de inhibidor, proporcionaba una familia de líneas rectas con pendiente $K_m(1 + ([I] / k_i))$ y ordenada en el origen V_{\max} . Una representación de este tipo se conoce como gráfica de Foster-Nieman.

Si el enzima muestra gran afinidad por el producto para formar el complejo EP (siendo K_p la constante de disociación del producto) para la inhibición competitiva tenemos la siguiente ecuación (Roberts, 1977):

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m(1 + ([P] / k_p)) + [S]} \quad (\text{Ec. 4.4})$$

Y si $[P] = [S]_o - [S]$, se llega a la siguiente expresión:

$$\frac{[S]_o - [S]_t}{t} = \frac{V_{\max} k_p}{k_p - K_m} - \frac{K_m(k_p + [S]_o)}{k_p - K_m} \frac{1}{t} \ln ([S]_o/[S]_t) \quad (\text{Ec. 4.5})$$

Teniendo en cuenta que el término $k_p - K_m$ aparece en la pendiente y en la ordenada en el origen (Ec. 4.4), la posición de la línea dependerá de la relación entre k_p y K_m . Si $k_p > K_m$, entonces la pendiente de la recta es positiva y la ordenada en el origen negativa. Si $k_p < K_m$, estaremos en el caso opuesto. Si k_p es muy grande, la ecuación se reduce a la forma integrada de la ecuación de Michaelis Menten. En el caso de que sea muy pequeño (cuando el complejo está fuertemente unido, k_p tiende a 0), la ecuación se reduce a:

$$\frac{[S]_o - [S]_t}{t} = \frac{V_{\max} k_p}{K_m} - \frac{[S]_o}{t} \ln ([S]_o/[S]_t) \quad (\text{Ec. 4.6})$$

Las representaciones de Foster-Nieman aplicadas a los 6 sustratos estudiados en este trabajo, y obtenidas a través de los cálculos indicados, se muestran en las Figuras 4.35 y 4.36. Estas gráficas muestran una familia de rectas con corte en el eje de ordenadas a valores negativos y pendiente positiva. Estos resultados corresponden a una cinética enzimática donde el producto de reacción era un inhibidor competitivo con valores de $K_p < K_m$. Esta situación se presenta en sistemas enzimáticos donde la retroinhibición por producto es muy fuerte como consecuencia de la gran estabilidad del complejo EP. De

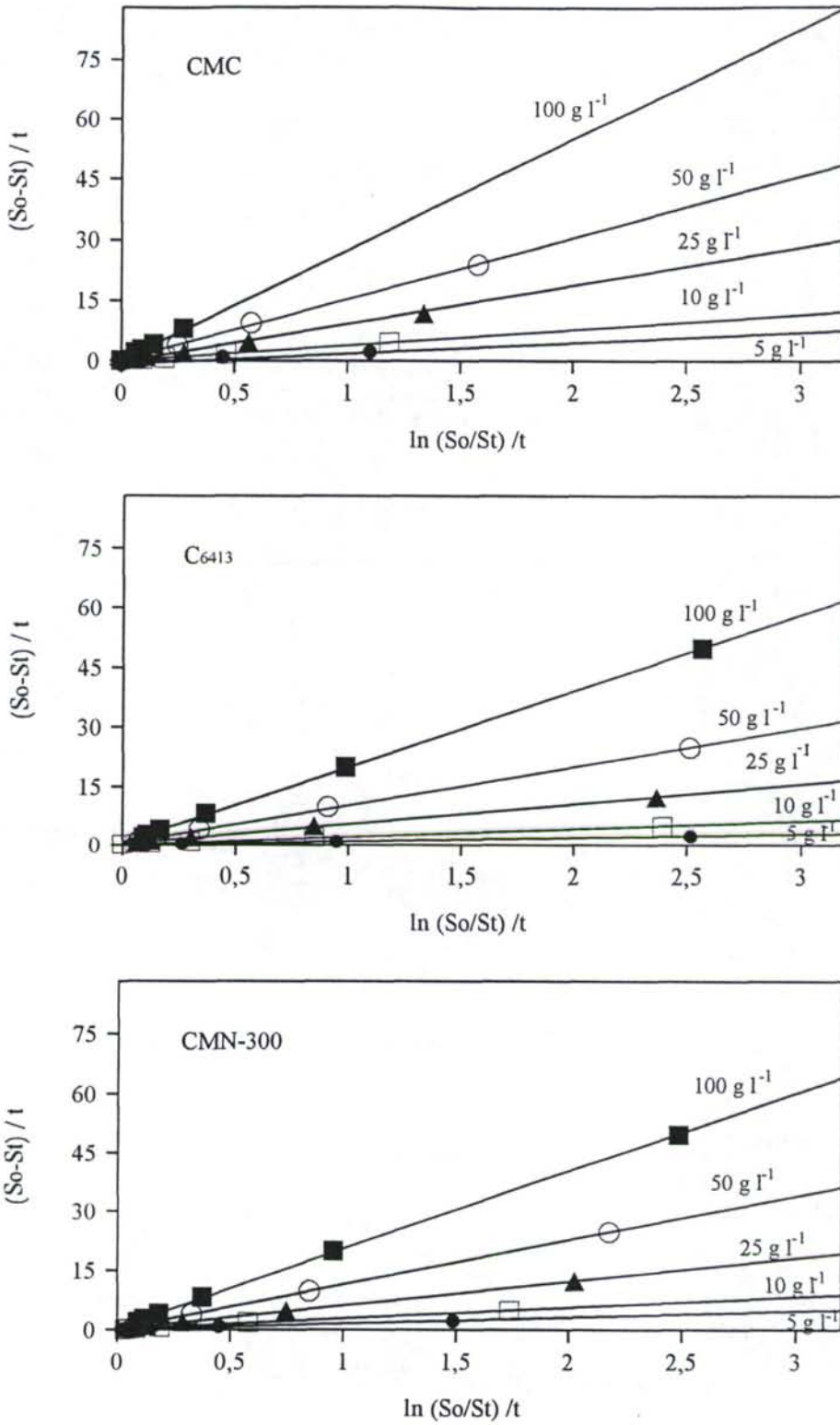


Fig. 4.35. Representaciones de Foster-Nieman para la degradación enzimática de celulosas comerciales.

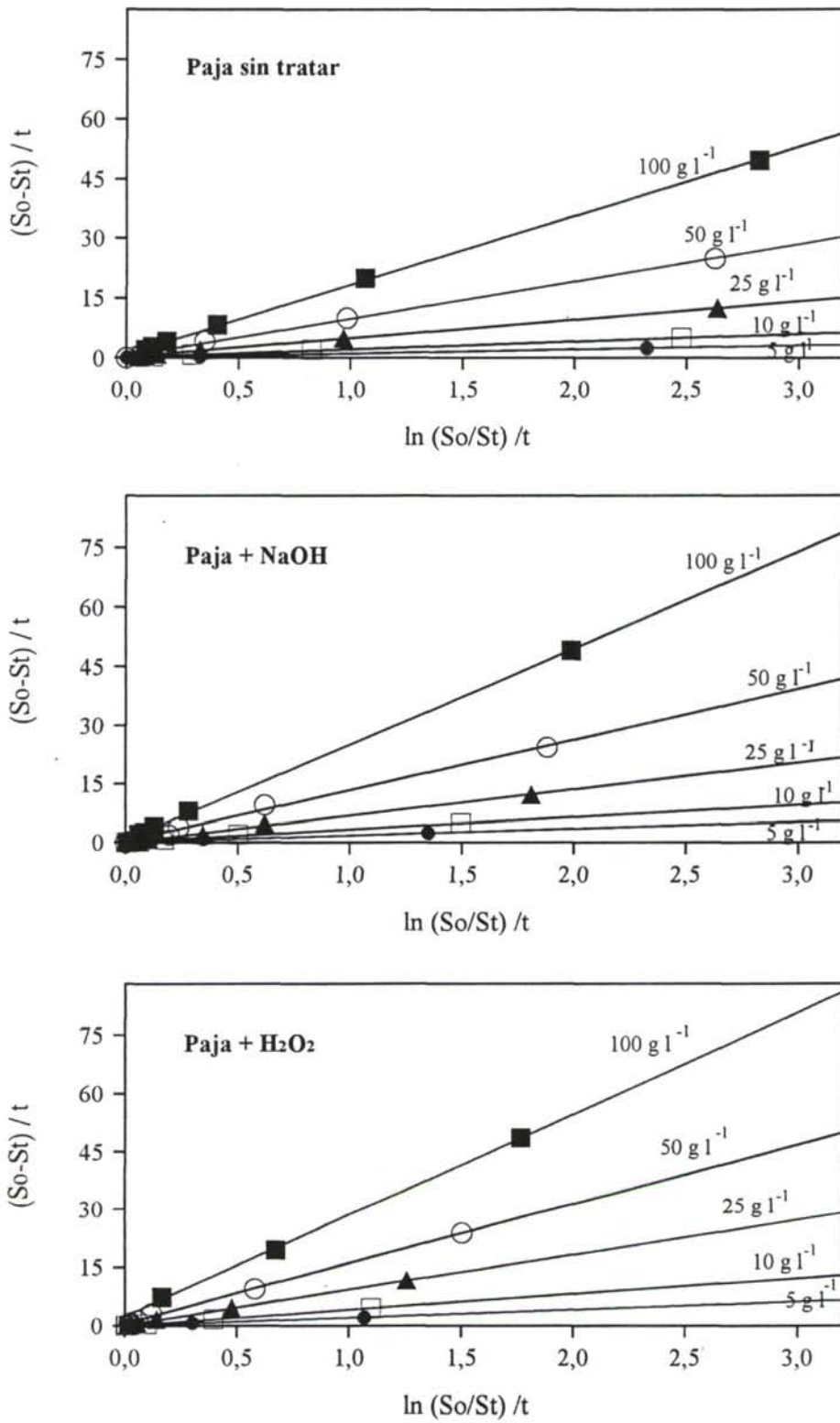


Fig. 4.36. Representaciones de Foster-Nieman para la degradación enzimática de paja sin tratar y tratada con NaOH y H₂O₂.

hecho, la celobiosa aparecía como un inhibidor fuerte de endo- y exoglucanasas, mientras que la glucosa inhibiría principalmente la actividad β -glucosidasa. Por ello, el sistema más obvio para eliminar el producto de inhibición causado por celobiosa es la inoculación con β -glucosidasa exógena (apdo.4.3.3.3.1) (Vallander and Eriksson, 1990). Otra alternativa de aplicación industrial sería la eliminación de glucosa mediante técnicas de ultrafiltración (Herr, 1979).

Incluso con concentraciones de azúcares bajas en el medio de la hidrólisis (del orden del 1-2%) se ha observado inhibición de las celulasas (Vallander and Eriksson, 1990). Pudiera ser que el azúcar adsorbido sobre los sustratos sólidos genere un microambiente inhibitorio en torno a las moléculas de enzima eliminando su actividad. De hecho, es lógico pensar que en la superficie del sustrato existía una concentración especialmente elevada de azúcares. Por tanto, el retirar el hidrolizado y resuspender el sustrato en un tampón nuevo (con sus enzimas correspondientes adsorbidos) reduciría la inhibición y mejoraría el grado de sacarificación (Vallander and Eriksson, 1985; 1987).

4.3.4. DEGRADACIÓN ACELERADA DE CELULOSAS Y PAJA CON ENZIMAS INMOVILIZADOS

Una de las aplicaciones más interesantes de los enzimas inmovilizados es la degradación de sustancias macromoleculares (proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos) tanto en alimentación como en industrias relacionadas (Guisan and Ballesteros, 1979). Tal y como se ha comentado ya en repetidas ocasiones los materiales celulósicos son sustratos insolubles de lenta degradación y en cierta medida incompatibles con las soluciones enzimáticas. Además, las celulosas presentan una parte cristalina que disminuye la eficacia de la reacción. Por ello, y tal y como hemos visto en los resultados de los apartados anteriores, parece evidente que la hidrólisis de la celulosa, de forma productiva, requiere proporciones apreciables de enzimas celulolíticos. En este sentido, el uso industrial de celulasas para la obtención de productos económicamente asequibles como fuentes energéticas es en la actualidad caro y, por tanto, poco rentable (Takeuchi and Makino, 1987).

La reutilización de los enzimas implicados en la degradación de la celulosa es esencial para disminuir el coste del proceso. Por ello, planteamos en este trabajo la utilización de técnicas de inmovilización con objeto de recuperar la proteína enzimática (una vez utilizada en el proceso) y de incrementar su estabilidad y facilidad de uso en los correspondientes biorreactores. Según Fadda *et al.* (1984) los enzimas inmovilizados son más resistentes a la inhibición por celobiosa y glucosa, más estables que los enzimas solubles y capaces de solubilizar sustratos lignocelulósicos sólidos en mayor cuantía. En este sentido, se investigó en este trabajo la hidrólisis de celulosas comerciales y paja de cereal, utilizando celulasas inmovilizadas por atrapamiento en geles de alginato de calcio y de poliacrilamida.

Para ello se realizaron diversos experimentos utilizando CMCasa libre (CL) y β -glucosidasa inmovilizada (CL + β I_{alg} y CL + β I_{poli}) o ambos enzimas coinmovilizados [(C + β)I_{alg}; (C + β)I_{poli}] en el espacio reticular de ambos geles (ver aptdo 3.5.3.5 de material

y métodos). Los resultados obtenidos en las hidrólisis correspondientes se contrastaron con la utilización de ambas enzimas solubles (CL + β L).

Los resultados de la degradación hidrolítica de los seis sustratos mediante el uso de celulasas inmovilizadas se incluyen en las Tablas 4.60 a 4.63. En general se puede comprobar como se provocaba un descenso apreciable de la actividad hidrolítica en los reactores que utilizaban los enzimas inmovilizados. Los niveles de sacarificación de las celulosas comerciales (Tabla 4.61) se redujeron con la utilización de β -glucosidasa inmovilizada. Estas pérdidas de actividad hidrolítica dependían tanto del sustrato como del método de inmovilización utilizado. Así, la producción de azúcares reductores disminuyó con el uso de β -glucosidasa inmovilizada en alginato aproximadamente hasta el 36% en los reactores que trabajaban con CMC, manteniendo el 70% de la actividad inicial los que usaban las celulosas insolubles CMN-300 y C₆₄₁₃. Sin embargo, cuando el soporte de inmovilización eran los geles de poliacrilamida se observaba la mayor disminución de la hidrólisis en los reactores que utilizaban celulosas insolubles, mientras que si el sustrato era CMC se mantenía un 63% de actividad que presentaban los reactores que trabajaban con enzimas solubles.

La utilización de reactores con CMCasa y β -glucosidasa coinmovilizadas para la degradación de celulosas comerciales, reducía la producción de azúcares al cabo de 4 h de hidrólisis con respecto a la utilización de enzimas libres entre un 65-75%, dependiendo el sustrato utilizado (Fig. 4.37). Además, podíamos comprobar como los niveles de sacarificación de estos materiales con la CMCasa y la β -glucosidasa coinmovilizada era muy similares para los dos métodos de atrapamiento utilizados. Esta disminución podría explicarse en base a que el método de inmovilización empleado implicaba la formación de un sistema reticular, por atrapamiento de enzimas, en el que quedaba restringido el acceso de sustratos de alto peso molecular.

Cuando el sustrato del proceso era paja de trigo, la pérdida de actividad hidrolítica en la producción de azúcares al utilizar β -glucosidasa inmovilizada era similar a la observada con los materiales celulósicos (Tabla 4.61). En los reactores que trabajaban con β -glucosidasa inmovilizada en geles de alginato se mantenía el 80, 73 y 63% de la actividad inicial para paja nativa, paja tratada con NaOH y paja tratada con H₂O₂,

Tabla 4.60. Hidrólisis de celulosas comerciales con enzimas inmovilizados.

Enzimas ^b	Tiempo de hidrólisis (h)	Concentración de azúcares reductores ^a		
		CMC	CMN-300	C ₆₄₁₃
CL + β L	2	90,43	19,79	1,98
	5	92,68	41,80	4,78
	12	94,73	60,25	6,20
	24	103,15	100,26	26,98
	36	104,39	119,00	27,70
	48	130,83	130,73	28,84
CL + β I _{alg}	2	30,37	13,12	7,27
	5	33,70	26,23	7,58
	12	39,35	38,36	8,81
	24	39,91	68,11	15,05
	36	39,53	83,48	20,03
	48	48,06	90,71	20,58
CL + β I _{poli}	2	41,94	6,16	4,23
	5	46,12	15,37	4,78
	12	48,55	40,49	5,21
	24	58,15	55,07	11,02
	36	70,37	60,24	11,20
	48	79,29	72,81	12,68
(C+ β)I _{alg}	2	43,61	10,94	5,45
	5	42,23	16,83	5,65
	12	42,28	34,25	4,86
	24	49,73	36,46	6,28
	36	48,24	42,78	7,23
	48	49,26	47,01	8,14
(C+ β)I _{poli}	2	46,94	15,29	6,27
	5	45,28	16,79	6,90
	12	48,80	23,15	6,42
	24	48,80	27,30	10,58
	36	45,47	28,60	7,25
	48	42,59	31,13	7,35

^a En mg glucosa g⁻¹ celulosa^b C: CMCasa; β : β -glucosidasa; L: libre; I: inmovilizada; alg: geles de alginato de calcio; poli: geles de poliacrilamida

Tabla 4.61. Sacarificación enzimática de celulosas comerciales hidrolizadas con enzimas inmovilizados.

Enzimas ^a	Tiempo de hidrólisis (h)	% de sacarificación		
		CMC	CMN-300	C ₆₄₁₃
CL + β L	2	16,28	3,56	0,36
	5	16,68	7,52	0,86
	12	17,05	10,84	1,12
	24	18,57	18,10	4,86
	36	18,79	21,42	4,99
	48	23,55	23,53	5,19
CL + β I _{alg}	2	5,47	2,36	1,31
	5	6,07	4,72	1,36
	12	7,08	6,91	1,59
	24	7,18	12,26	2,71
	36	7,12	15,03	3,60
	48	8,65	16,33	3,70
CL + β I _{poli}	2	7,55	1,11	0,76
	5	8,30	2,77	0,86
	12	8,74	7,29	0,94
	24	10,47	9,91	1,98
	36	12,67	10,84	2,02
	48	14,27	13,11	2,28
(C+ β)I _{alg}	2	7,85	1,97	0,98
	5	7,60	3,03	1,02
	12	8,15	6,16	0,88
	24	8,95	6,56	1,13
	36	8,68	7,70	1,30
	48	8,87	8,46	1,47
(C+ β)I _{poli}	2	8,45	2,75	1,13
	5	8,15	3,02	1,24
	12	8,78	4,17	1,16
	24	8,78	4,91	1,90
	36	8,18	5,15	1,31
	48	7,67	5,60	1,32

^a C: CMCasa; β : β -glucosidasa; L: libre; I: inmovilizada; alg: geles de alginato de calcio; poli: geles de poliacrilamida

Tabla 4.62. Hidrólisis de paja de trigo con enzimas inmovilizados.

Enzimas ^b	Tiempo de hidrólisis (h)	Concentración de azúcares reductores ^a		
		Paja sin tratar	Paja tratada con NaOH	Paja tratada con H ₂ O ₂
CL + β L	2	11,28	84,24	88,11
	5	17,58	237,05	117,46
	12	27,45	461,35	294,84
	24	75,10	506,19	482,68
	36	83,02	689,10	547,85
	48	90,01	712,60	540,97
CL + β I _{alg}	2	16,14	53,29	41,89
	5	19,07	117,10	58,76
	12	25,96	236,59	88,40
	24	53,86	347,39	175,01
	36	67,07	455,90	260,46
	48	72,72	522,93	342,33
CL + β I _{poli}	2	13,95	38,24	35,42
	5	19,07	77,94	47,78
	12	18,62	121,56	75,92
	24	45,91	238,05	158,20
	36	51,17	269,07	206,09
	48	60,61	287,19	238,28
(C+ β)I _{alg}	2	18,54	28,87	18,55
	5	21,90	32,64	30,23
	12	45,78	45,08	42,06
	24	51,25	140,60	98,45
	36	59,60	199,11	149,12
	48	62,40	248,95	159,64
(C+ β)I _{poli}	2	15,13	22,96	20,63
	5	16,75	38,93	22,559
	12	20,89	55,67	59,11
	24	24,73	94,53	86,96
	36	42,12	105,82	121,74
	48	41,35	114,88	158,20

^a En mg de glucosa g⁻¹ paja^b C: CMCasa; β : β -glucosidasa; L: libre; I: inmovilizada; alg: geles de alginato de calcio; poli: geles de poliácridamida

Tabla 4.63. Sacarificación enzimática de paja de trigo hidrolizada con enzimas inmovilizados.

Enzimas ^a	Tiempo de hidrólisis (h)	% de sacarificación		
		Paja sin tratar	Paja tratada con NaOH	Paja tratada con H ₂ O ₂
CL + β L	2	4,23	10,97	15,25
	5	6,59	30,87	20,33
	12	10,29	60,08	51,03
	24	28,15	65,92	83,54
	36	31,12	89,74	94,82
	48	33,74	92,80	93,63
CL + β I _{alg}	2	6,05	6,94	7,25
	5	7,15	15,25	10,17
	12	9,73	30,81	15,30
	24	20,19	45,24	30,29
	36	25,14	59,37	45,08
	48	27,09	68,10	59,25
CL + β I _{poli}	2	5,23	4,98	6,13
	5	7,15	10,15	8,27
	12	6,98	15,83	13,14
	24	17,21	31,00	27,38
	36	19,18	35,04	35,67
	48	22,72	37,40	41,24
(C+ β)I _{alg}	2	6,95	3,76	3,21
	5	8,21	4,25	5,23
	12	17,16	5,87	7,28
	24	19,21	18,31	17,04
	36	22,34	25,93	25,81
	48	23,39	32,42	27,63
(C+ β)I _{poli}	2	5,67	2,99	3,57
	5	6,28	5,07	3,91
	12	7,83	7,25	10,23
	24	9,27	12,31	15,05
	36	15,79	13,78	21,07
	48	15,50	14,96	27,38

^a C: CMCasa; β : β -glucosidasa; L: libre, I: inmovilizada; alg: geles de alginato de calcio; poli: geles de poliacrilamida

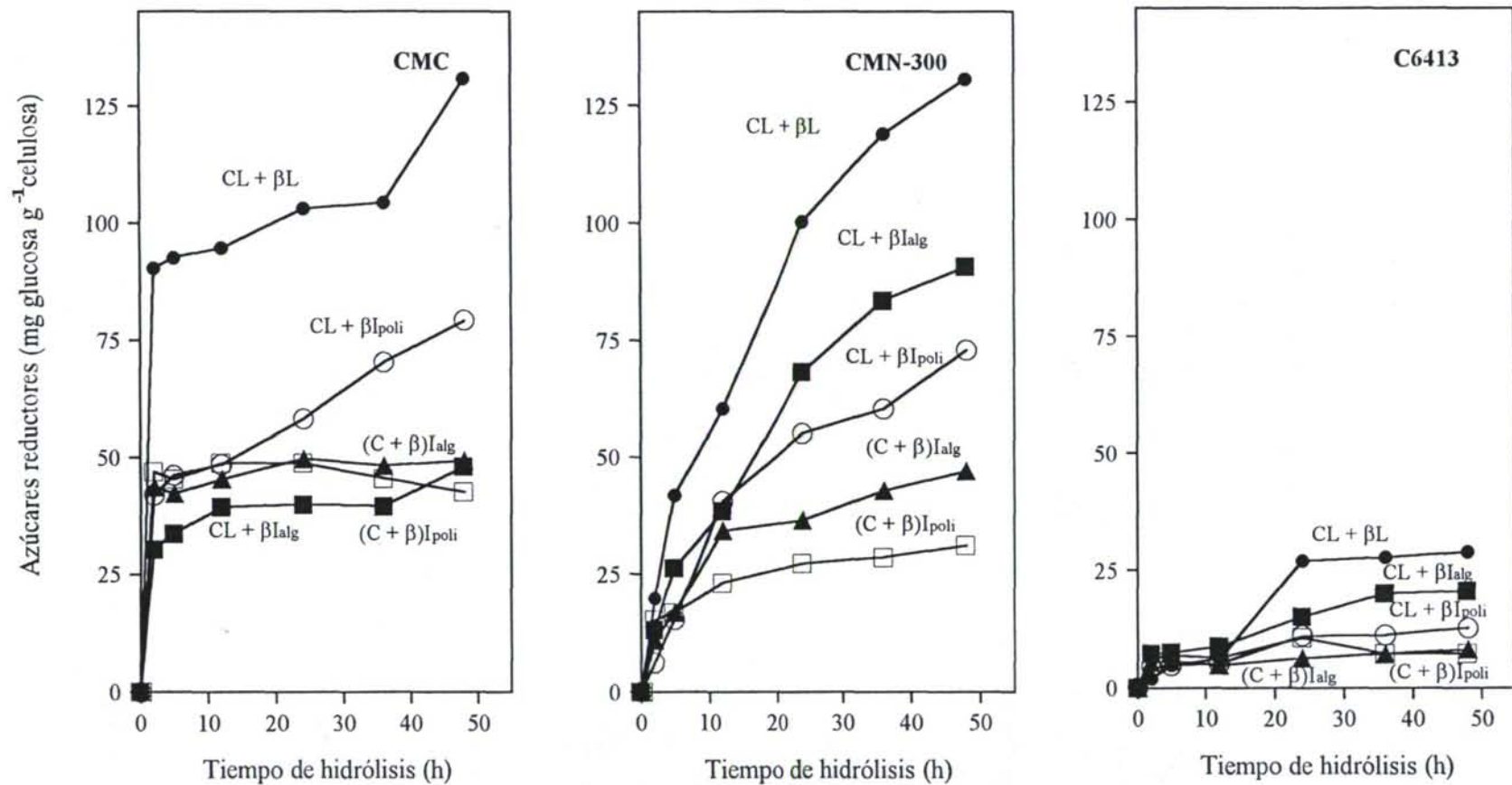


Fig. 4.37. Degradación de celulosas comerciales (0,5% en p/v) con enzimas inmovilizados (C: CMCasa; β: β-glucosidasa; L: libre; I: inmovilizada; alg: alginato de calcio; poli: geles de poliacrilamida).

respectivamente, mientras que si se utilizaban geles de poliacrilamida, las pérdidas de actividades llegaban a ser del 60% para el material lignocelulósico tratado con NaOH.

Los resultados obtenidos cuando se utilizaban CMCasa y β -glucosidasa coinmovilizadas dependían de la muestra de paja utilizada. Cuando el sustrato del proceso era paja nativa la eficacia sacarificante (Tabla 4.63) descendía desde un 33%, para enzimas solubles, hasta un 23% y un 16% cuando se utilizaban los enzimas coinmovilizados en geles de alginato y de poliacrilamida, respectivamente. Estos descensos eran ligeramente inferiores a los que se obtenían en los reactores que contenían celulasas libres y β -glucosidasa inmovilizada.

Cuando los reactores trabajaban con paja tratada con NaOH y con H_2O_2 , la utilización de CMCasa y β -glucosidasa coinmovilizadas rebajaba los niveles de sacarificación enzimática a la mitad de los que se obtenían con el uso exclusivo de β -glucosidasa inmovilizada. Era evidente que la aplicación de CMCasa inmovilizada disminuía bruscamente la capacidad hidrolítica, debido fundamentalmente a que el acceso del sustrato estaba impedido difusionalmente en relación a sus contrapartidas solubles. En la Fig. 4.38 podemos comprobar que la velocidad inicial de hidrólisis para estos sustratos disminuía con la utilización de enzimas inmovilizados, siendo necesarios tiempos mayores de reacción para conseguir los mismos rendimientos de azúcares reductores. Sin embargo, los niveles de hidrólisis seguían siendo apreciables, con la ventaja adicional de una mayor estabilidad y la posibilidad de recuperar y reutilizar posteriormente el enzima.

Aunque es obvio que el uso de enzimas inmovilizados en las redes de alginato de calcio y poliacrilamida no mantenía el nivel de eficacia hidrolítica, se mantenía una capacidad catalítica de hidrólisis de la paja considerable, sobre todo en los reactores que trabajaban con CMCasa libre y β -glucosidasa inmovilizada en geles de alginato, alcanzando porcentajes de sacarificación del 60%. Adicionalmente, y tal como hemos visto en el apartado anterior, la hidrólisis enzimática de celulosa está acompañada por una acumulación significativa de celobiosa, que inhibe la degradación de celulosa. La adición de β -glucosidasa aislada de una fuente distinta de *T. reesei* podría ser una solución. Sin embargo, el costo en el aislamiento de este enzima limita su uso en forma soluble, mientras que una técnica simple y barata de inmovilización de β -glucosidasa permitiría la

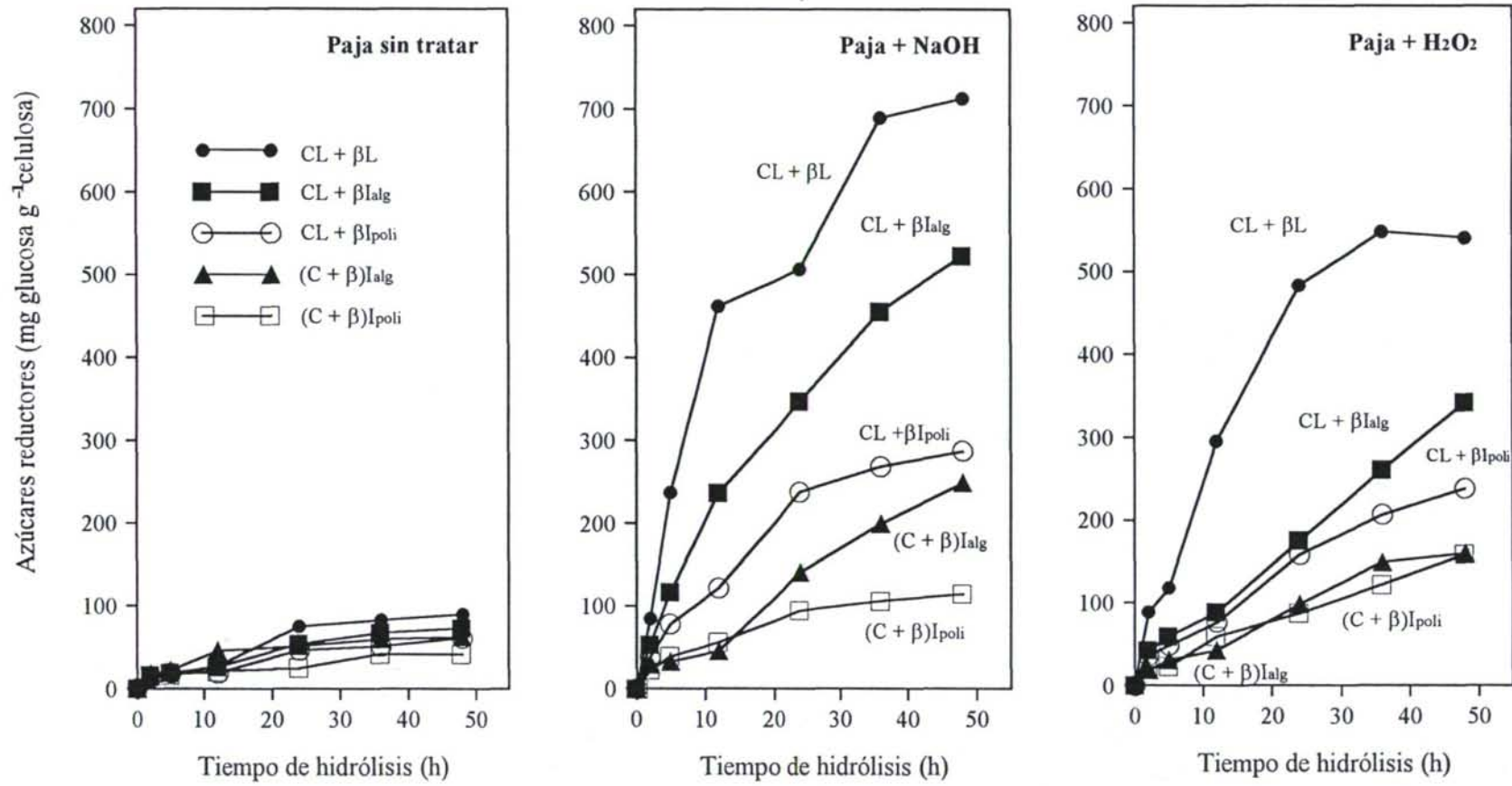


Fig. 4.38. Degradación de paja sin tratar y tratada con NaOH y H₂O₂ con enzimas inmobilizados (C: CMCasa; β: β-glucosidasa; L: libre; I: inmobilizada; alg: alginato de calcio; poli: geles de poliacrilamida).

transformación suficiente de celobiosa (eliminando la inhibición) como para justificar el coste adicional (Vernardos *et al.*, 1980). Los resultados obtenidos nos demuestran que una técnica adecuada para conseguir estos objetivos podría ser la inmovilización de β -glucosidasa en geles de alginato de calcio al 3%.

5. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se derivan del trabajo realizado, y que se detallan a continuación, se han agrupado en dos grandes apartados que se corresponden con los ejes principales de la investigación efectuada:

I.- Inmovilización de β -glucosidasa.

I.a. Con respecto a la inmovilización mediante atrapamiento en geles, se puede indicar que:

1. El proceso de atrapamiento del enzima en geles de alginato de calcio dependía fundamentalmente de la concentración de alginato y del tiempo de tratamiento, obteniéndose un rendimiento máximo de inmovilización del 65% con alginato de sodio al 3%, CaCl_2 0,2 M y 1 h de agitación.
2. La inmovilización de β -glucosidasa en geles de poliacrilamida presentaba un máximo de actividad retenida para una concentración de acrilamida y bisacrilamida del 20% y 1,2%, respectivamente. Este resultado demostraba que bajas concentraciones de los monómeros provocaban una mayor porosidad de gel y, por tanto, una menor actividad retenida, mientras que concentraciones elevadas podían provocar la inactivación del enzima.

I.b. De la inmovilización de β -glucosidasa por asociación a polímeros fenólicos se puede concluir que:

1. La asociación de β -glucosidasa con humatos edáficos provocaba un fuerte incremento de la actividad de los inmovilizados frente a sus contrapartidas solubles. Esta activación estaría directamente relacionada con el establecimiento de enlaces covalentes, los cuales se verían favorecidos a temperaturas elevadas.
2. La concentración de humatos en la mezcla afectaba también la actividad enzimática de los complejos formados, observándose, a todas las temperaturas estudiadas, que un incremento de la concentración de humatos desde 0,3 a 1,2 mg ml^{-1} producía una inactivación del complejo enzimático.

3. Del entrecruzamiento de β -glucosidasa con humatos a través de glutaraldehído, se podría concluir que las concentraciones bajas de glutaraldehído potenciaban las interacciones de tipo intermolecular, lo que se traduciría en una ligera modificación de la actividad de la β -glucosidasa inmovilizada en relación a su contrapartida soluble. Por el contrario, las concentraciones elevadas implicaban un mayor grado de interacciones intramoleculares y por consiguiente una mayor alteración de la proteína enzimática que se traducía en una pérdida de actividad.
4. El copolímero fenólico sintetizado con β -glucosidasa y resorcinol presentaba una inactivación próxima al 50% y un incremento de su estabilidad térmica y operacional. Por tanto, parece probable que la copolimerización de enzimas durante la formación de la materia húmica es uno de los factores más importantes que conducen a la estabilización de los enzimas en el suelo.

I.c. De la caracterización de β -glucosidasa inmovilizada en geles de alginato y de poliacrilamida se dedujo que:

1. La β -glucosidasa procedente del extracto crudo de *A. niger* así como la inmovilizada con alginato seguían una cinética típica de Michaelis-Menten, mientras que el enzima atrapado en geles de poliacrilamida, presentaba un comportamiento característico de enzimas que sufren inhibición por exceso de sustrato.
2. El incremento de la K_m en un factor de 1,2 para la β -glucosidasa atrapada en la matriz de alginato, sugería que la red polimérica limitaba el acceso de sustrato y la difusión del producto a través del polímero semipermeable. Sin embargo, no se apreciaban cambios significativos de los valores de K_m del enzima libre e inmovilizado en los geles de poliacrilamida.
3. El efecto del pH y la temperatura de incubación sobre el enzima libre e inmovilizado por atrapamiento en geles de alginato y de poliacrilamida era muy similar entre sí. Únicamente el perfil de temperaturas para el enzima retenido en los geles de poliacrilamida presentaba una mayor amplitud que el enzima soluble, lo que se traducía en un rango óptimo de temperaturas más amplio.

4. La utilización de geles de alginato de calcio daba como resultado la formación de un enzima más estable frente a la temperatura que el atrapado en la matriz de poliacrilamida. Por el contrario, el enzima retenido en esta matriz, era menos accesible a la acción de enzimas proteolíticos (pronasa de *S. griseus* y proteasas presentes en el suelo).

II. Degradación acelerada de materiales lignocelulósicos.

II.a. Con respecto al pretratamiento de paja de cereal podría afirmarse que:

1. Las muestras de paja tratadas con H_2O_2 y NaOH presentaban una relación celulosa/lignina superior a la de la paja nativa y una pérdida importante de su integridad física y morfológica.

II.b. Del estudio de la hidrólisis de paja y celulosas se puede concluir que:

1. La temperatura de hidrólisis enzimática afectaba de forma decisiva la velocidad degradativa tanto de celulosas comerciales como del material lignocelulósico. Sin embargo, las variaciones en el pH de hidrólisis afectaba únicamente de manera significativa los reactores que trabajaban con paja nativa y pretratada.
2. Un incremento de las concentraciones enzimáticas en el bioreactor no implicaba aumentos proporcionales de la sacarificación, tanto de celulosas comerciales como de paja sin tratar y tratada, debido a que factores como la accesibilidad y el producto de inhibición influían en la velocidad de hidrólisis.
3. La cantidad de glucosa producida durante el proceso hidrolítico de paja de trigo nativa y tratada con NaOH y H_2O_2 se veía incrementada cuando el medio contenía β -glucosidasa exógena.
4. Los niveles de sacarificación de los seis sustratos estudiados más elevados aparecían a concentraciones de sustrato del 0,5%.

5. Los pretratamientos incrementaban considerablemente la digestibilidad de la paja de trigo, consiguiendo niveles de sacarificación mucho más elevados en tiempos de hidrólisis menores.
6. Los reactores que trabajaban con CMCasa libre y β -glucosidasa inmovilizada en geles de alginato poseían una capacidad hidrolítica de la paja considerable, con la ventaja adicional de una mayor estabilidad y la posibilidad de recuperación y reutilización posterior.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdellah, H.A., Baker, T.M.A., Shekib, L.A. y El-Iraqi, S.M. (1992). Characteristics of invertase immobilized on three different types of supports. *Food Chemistry*, **43**, 369-375.
- Adami, A., Cavazzoni, V., Trezzi, M. y Craveri, R. (1988). Cellobiose hydrolysis by *Trichosporon pullulans* cells immobilized in calcium alginate. *Biotechnology and Bioengineering*, **32**, 391-395.
- Atushi, K., Azuma, J.L. y Koshijima, T. (1984). Lignin carbohydrate complexes and phenolic acids. *Bagasse Holzfor Shung*, **38**, 141-149.
- Avgerinos, G.C. y Wang, D.I.C. (1980). Direct microbiological conversion of celluloses to ethanol. *Annual Rep. Fermentation Processes*, **4**, 165-191.
- Azuma, J.-I. y Koshijima, T. (1988). Lignin-carbohydrate complexes from various sources. *Methods of Enzymology*, **161**, 12-18.
- Bartley, T., Waldron, C. y Eveleigh, D. (1984). A cellobiohydrolase from a thermophilic actinomycete, *Microbispora bispora*. *Applied Biochemistry Biotechnology*, **9**, 334-339.
- Bauchop, T. (1981). The anaerobic fungi in rumen fibre digestion. *Agricultural Environmental*, **6**, 339-348.
- Bayer, E.A., Kenig, R., y Lamed, R. (1983). Adherence of *Clostridium thermocellum* to cellulose. *Journal of Bacteriology*, **156**, 818-827.
- Béguin, P. y Eisen, H. (1978). Purification and partial characterisation of three extracellular cellulase from *Cellulomonas* spp. *European Journal of Biochemistry*, **87**, 525-531.
- Beldman, G., Searle-Van Leewen, M.F., Rombouts, F.R. y Voragen, F.G.J. (1985). The cellulase of *Trichoderma viride*. Purification, characterization and comparison of all detectable endoglucanases, exoglucanases and β -glucosidases. *European Journal of Biochemistry*, **146**, 301-308.
- Benesi, A. y McLaren, A.D. (1976). A microenvironmental redox shift at a charged surface detected by papain activity. *Journal of Solid-Phase Biochemistry*, **1**, 27-30.
- Bernfeld, P. y Wan, J. (1963). Antigens and enzymes made insoluble by entrapping them into lattice of synthetic polymers. *Science*, **142**, 678-679.
- Bisaria, V.S. (1991). Bioprocessing of agro-residues to glucose and chemicals. En: *Bioconversion of Wastes Materials to Industrial Products*. (A.M. Martin, ed.). pp. 187-224, Elsevier Applied Science, London.
- Blackwell, J. (1982). The macromolecular organization of cellulose and chitin. En: *Cellulose and Other Natural Polymer Systems: Biogenesis, Structure and Degradation*. (R.M. Brown, ed.). pp. 403-428, Plenum Press, New York.
- Brown, G.B. (1976). En: *Methods in Enzymology*. (K. Mosbach, ed.). p. 263, Academic Press, New York.
- Bruchmann, E.-E. (1980). Enzimas. En: *Bioquímica Técnica. Química Alimentaria de las Fermentaciones y Agrícola*. pp.119-121. Acribia, Zaragoza.
- Burns, R.G. (1986). Interaction of enzymes with soil mineral and organic colloids. En: *Interactions of Soil Mineral with Natural Organic and Microbes*. (P.M. Huang and M. Schnitzer, eds.). pp. 429-451, Soil Science Society American, Madison, Wis.
- Burns, R.G. (1987a). Relationship between microorganisms in the soil microenvironment. En: *Trans. XIII International. Soil Science Congress*, **5**, 175-183.

- Burns, R.G. (1987b). Interactions of humic substances with microbes and enzymes in soil and possible implications for soil fertility. *Anales de Edafología y Agrobiología* **46** (9-10), 1247-1259.
- Busto, M.D. (1992). Inducción aislamiento e inmovilización de enzimas celolíticos microbianos: Degradación acelerada de residuos lignocelulósicos. Tesis Doctoral. Universidad de Valladolid.
- Busto, M.D. y Perez-Mateos, M. (1995). Extraction of humic- β -glucosidase fractions from soil. *Biology Fertility Soils*, **20**, 77-82.
- Busto, M.D., Ortega, N. y Perez-Mateos, M. (1995). Studies on microbial β -D-glucosidase immobilized in alginato gel beads. *Process Biochemistry*, **30** (5), 421-426.
- Busto, M.D., Ortega, N. y Perez-Mateos, M. (1995). Induction of β -glucosidase in fungal and soil bacterial cultures. *Soil Biology and Biochemistry*, **27** (7), 949-954.
- Busto, M.D., Ortega, N. y Perez-Mateos, M. (1996). Location, kinetics and stability of cellulases induced in *Trichoderma reesei* cultures. *Bioresource Technology* (in press, Ref.: BITE 790)
- Calza, R.R., Irwin, D.C. y Wilson, D.B. (1988). Purification and characterization of two β -1,4-endoglucanasas from *Thermomonospora fusca*. *Biochemistry*, **24**, 7797-7804.
- Camacho, F., González, P., Jurado, E. y Paez D. (1985). Aprovechamiento de residuos lignocelulósicos. Producción de etanol. y SCP. Parte I. *Ingeniería Química*, **11**, 297-301.
- Camacho, F., Gonzalez, P., Jurado, E. y Paez, M.P. (1989). Aprovechamiento de residuos lignocelulósicos. Producción de etanol y SCP. Parte II. *Ingeniería Química*, **2**, 117-123.
- Camacho, R., Gonzalez, T., Jurada, A. y Fernandez, D. (1986). Aprovechamiento de residuos lignocelulósicos. Producción de etanol y SCP. Parte I. *Ingeniería Química*, **18**, 297-301.
- Ceccanti, B., Nannipieri, P.M, Cervelli, S. y Sequi, P. (1978). Fractionation of humus urease complex. *Soil Biology and Biochemistry*, **10**, 39-45.
- Conchie, J., Hay, A.J. y Lomax, J.A. (1988). Soluble lignin-carbohydrate complexes from sheep rumen fluid: their composition and structure features. *Carbohydrate Research*, **177**, 127-151.
- Coughlan, M.P. (1985). The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and applications. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, **3**, 39-109.
- Coughlan, M.P. y Ljungdahl, L.G. (1988). Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme systems. En: *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation* (J.-P. Aubert, P. Béguin, and J. Millett, eds.). pp. 11-30, Academic Press, New York.
- Cowling, E.B. (1975). Physical and chemical constraints in the hydrolysis of cellulose and lignocellulose materials. *Biotechnology Bioengineering Symposium* n°5, Interscience, New York, 163-181.
- Cowling, E.B. y Kirk, T.K. (1976). Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrates for enzymatic conversion processes. En: *Enzymatic Conversion of Cellulosic materials: Technology and Applications*. (E.L. Gaden, M.H. Mandels, E.T. Reese and L.A. Spano, eds.) pp. 95-123, Wiley Interscience, New York.
- Crawford, D. (1978). Lignocellulose decomposition by selected *Streptomyces* strains. *Applied of Environmental Microbiology*, **35**, 1041-1045.

- Chahal, D.S.** (1991). Lignocellulosic wastes: biological conversion. En: *Bioconversion of Wastes Materials to Industrial Products*. (A.M. Martin, ed.). pp. 373-400, Elsevier Applied Science, London.
- Chahal, P.S., Chahal, D.S. y André, G.** (1992). Cellulase Production Profile of *Thichoderma reesei* on different cellulosic sustrates at various pH levels. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **74** (2), 126-128.
- Chang, T.M.S.** (1964). Semipermeable microcapsules. *Science*, **146**, 524-525.
- Chanzy, H. y HENRISSAT, B.** (1985). Unidirectional degradation of *Valonia* cellulose microcrystals subjected to cellulose action. *FEBS Letters*, **184**, 285-288.
- Chanzy, H., Henrissat, B. y Wuong, R.** (1984). Colloidal gold labelling of 1,4- β -D-glucan adsorbed on cellulose substrates. *FEBS Letters*, **172**, 193-197.
- Chanzy, H., Henrissat, B., Wuong, R. y Schülein, M.** (1983). The action of 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase on *Valonia* cellulose microcrystals. An electron microscopy study. *FEBS Letters*, **153**, 113-118.
- Cheetham, P.S.J.** (1991). Principios de la enzimología industrial: Bases de la utilización de enzimas solubles e inmovilizados en los procesos industriales. En: *Manual de Biotecnología de los Enzimas*. (A. Wiseman, ed.). pp. 269-374, Acribia, Zaragoza.
- Chen, S. y Wayman, M.** (1992). Novel inducers derived from starch for cellulose production by *Trichoderma reesei*. *Process Biochemistry*, **27**, 327-334.
- Chibata, I.** (1978). Preparation of immobilized enzymes and microbial cells. En: *Immobilized Enzymes* (I. Chibata, ed.). pp. 11-107, John Wiley & Sons, New York.
- David, C. y Thiry, P.** (1981). *European Pollution Journal*, **17**, 957.
- Degani, Y. y Miron, T.** (1970). Immobilization of cholinesterase in cross-linked polyacrylamide. *Biochimica et Biophysica Acta*, **212**, 362-365.
- Dekker, R.F.H. y Wallis, A.F.W.** (1983). Enzymic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by authydrolysis steam explosion. *Biotechnology and Bioengineering*, **25**, 3027-3048.
- Desrochers, M., Jurasek, L. y Paice, M.G.** (1981). High production of β -glucosidase in *Schizophyllum commune*. *Applied of Environmental Microbiology*, **41**, 222-228.
- Dinelli, D., Marconi, W. y Morisi, F.** (1976). Fiber-entrapped enzymes. *Methods of enzymology*, **44**, 227-243.
- Duong, T.-V.C., Johnson, E.A. y Demain, A.L.** (1983). Thermophilic, anaerobic and cellulolytic bacteria. *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*, **7**, 156-195.
- Duran, N., Rodriguez, J., Gomez, E., Campos, V. y Baeza, J.** (1988). Biomass photochemistry: XI. Photochemical pretreatment of cellulose and its fungal degradation. *Biotechnology and Bioengineering*, **31**, 215-219.
- Enari, T.-M.** (1983). Microbial cellulases. En: *Microbial Enzymes and Biotechnology*. (W.M. Fogarty, ed.). pp. 183-223, Applied Science Publishers, London.
- Enari, T.-M.** (1985). Biotechnology, a challenge and an opportunity for the forest products industry. En: *Proceedings of the Marcus Wallenberg Foundation Symposium*. pp. 54-67, Falun, Sweden.

- Enari, T.-M. y Niku-Paavola, M.-L. (1987). Enzymatic hydrolysis of cellulose: is the current theory of the mechanisms of hydrolysis valid? *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, **5** (1), 67-87.
- Eriksson, K.-E. y Pettersson, B. (1982). Purification and partial characterization of two acidic proteases from the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *European Journal of Biochemistry*, **124**, 635-642.
- Eriksson, K.-E. y Wood, T.M. (1985). Biodegradation of cellulose. En: *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components*. (T. Higuchi, ed.). pp. 469-503, Academic Press, New York.
- Eriksson, K.-E., Grunewald, A. y Vallender, L. (1980) Studies of growth conditions in wood for three whit-rot fungi and their cellulase-less mutants. *Biotechnology and Bioengineering*, **22**, 363-376.
- Estrada, P., Acebal, C., Castillan, M.P., Matas, I. y Romero, A. (1988). Adsorption of cellulase from *Trichoderma reesei* on wheat straw. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **10**, 49-58.
- Fadda, M.B., Dessi, M.R., Maurici, R., Rinaldi, A. y Salta, G. (1984). *Applied Microbiology and Biotechnology*, **19**, 306.
- Falb, R.D., Lynn, L. y Shapiro, J. (1973). *Experientia*, **28**, 958.
- Fan, L.T., Gharpuray, M.M. y Lee, Y.H. (1981). Evaluation of pretreatments for enzymatic conversion of agricultural residues. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, **11**, 29-34.
- Fan, L.T., Lee, Y.H. y Gharpuray, M.M. (1982). The nature of lignocellulosic and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. *Advances in Biochemistry and Bioengineering*, **23**, 157-187.
- Fawcett, J.S. y Morris, C.J.O.R. (1966). *Separation Studies*, **1**, 9.
- Felix, C.R. y Ljungdahl, L.C. (1993). The cellulosome: the exocellular organelle of *Clostridium*. *Annual Review of Microbiology*, **47**, 791-819.
- Folan, M.A. y Coughlan, M.P. (1979). The cellulase complex in the culture filtrate of the thermophilic fungus, *Talaromyces emersonii*. *International Journal of Biochemistry*, **10**, 505-510.
- Freier, D., Mothershed, C.P. y Wiegel, J. (1988). Characterization of *Clostridium thermocellum* JW20. *Applied and Environmental Microbiology*, **54**, 204-211.
- Fukushima, Y., Okamura, K., Imai, K. y Motai, H. (1988). A new immobilization technique of whole cells and enzymes with colloidal silica and alginate. *Biotechnology and Bioengineering*, **32**, 584-594.
- Gacesa, P. y Hubble, J. (1990). Efectos de la inmovilización en la estabilidad enzimática y su utilidad. En: *Tecnología de Enzimas*. (P. Gacesa and J. Hubble, eds.). pp. 89-108, Acribia, Zaragoza.
- Garrett, S.D. (1963). *Soil Fungi and Soil Fertility*. Pergamon Press, Oxford.
- Gerwig, G.J., Waard, P., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G., Morgenstern, E., Lamed, R. y Bayer, E.A. (1989). Novel O-linked carbohydrate chains in the cellulase complex

- (cellulosome) of *Clostridium thermocellum*. *Journal of Biological Chemistry*, **264**, 1027-1035.
- Ghangas, G.S. y Wilson, D.B. (1987). Expression of a *Thermomonospora fusca* cellulase gene in *Streptomyces lividans* and *Bacillus subtilis*. *Applied Environmental Microbiology*, **53**, 1470-1475.
- Gianfreda, L., Modafferi, M. y Greco, G. (1985). Enzyme stabilization towards thermal, chemical and proteolytic deactivation. *Enzyme and Microbial Technology*, **7**, 78-82.
- Gilkes, N.R., Langsford, M.L., Kilburn, D.G., Miller, R.C. Jr. y Warren, R.A.J. (1984). Mode of action and substrate specificities of cellulases from cloned bacterial genes. *Journal of Biological Chemistry*, **259**, 10455-10459.
- Goldman, R., Goldstein, L.M. y Katchalski, T. (1974). En: Biochemical Aspects of Reactions on Solid Supports. (G. Stark, ed.), pp. 1-78, Academic Press, New York.
- Goldstein, J. (1976). Kinetic behaviour of immobilized enzyme systems. En: Methods in Enzymology. Vol. 44 (S.P. Colowick and N.O. Kaplan, eds.). pp. 397-526, Academic Press, New York.
- Goldstein, L., Levin, Y. y Katchalsky, E. (1964). A water insoluble polyanionic derivative of trypsin II. Effect of the polyelectrolyte carrier on the behavior of the bound trypsin. *Biochemistry*, **3**, 1913-1919.
- Gould, M.S. (1985). Studies on the mechanism of alkaline peroxide delignification of agricultural residues. *Biotechnology and Bioengineering*, **27**, 225-231.
- Gould, S.M. (1984). Alkaline peroxide delignification of agricultural residues to enhance enzymatic saccharification. *Biotechnology and Bioengineering*, **26**, 46-52.
- Grarpuray, M.M., Lee, Y.H. y Fan, L.T. (1983). *Biotechnology and Bioengineering*, **25**, 157.
- Greco, S., D'Annibale, A., Luna, M., Badalucco, L. y Nannipieri, P. (1990). Multiple forms of synthetic pronase-phenolic copolymers. *Soil Biology and Biochemistry*, **22** (5), 721-724.
- Grethlein, H.E. (1985). The effect of pore distribution on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates. *Bio / Technology*, **3**, 155-160.
- Griffin, H., Dintzis, F.R., Krull, L. y Baker, F.L. (1984). A microfibril generating factor from the enzyme complex of *Trichoderma reesei*. *Biotechnology and Bioengineering*, **26**, 296-300.
- Gritzali, M.K. y Brown, R.D. (1979). The cellulase system of *Trichoderma*. Relationship between purified extracellular enzymes from induced or cellulose-grown cells. *Advances in Chemistry Series*, **181**, 237-260.
- Guisan, M.J. y Ballesteros, A. (1979). Preparation of immobilized sepharose micrococcal nuclease derivatives: Activity and stability. *Journal of Solid-Phase Biochemistry*, **4** (4), 245-252.
- Gum, E.K. y Brown, R.D. (1977). Comparison of four purified extracellular 1,4- β -glucan cellobiohydrolase enzymes from *Trichoderma viride*. *Biochimie et Biophysic Acta*, **492**, 225-231.
- Hackel, V., Klein, J., Mesnet, T. y Wagner, F. (1975). Immobilization of microbial cells in polymeric matrices. *European Journal of Applied Microbiology*, **1**, 291-293.

- Hägerdal, B.G.R., Ferchak, J.D. y Pye, E.K. (1978). Cellulolytic enzyme system of *Thermomonospora* spp. I. Stability of cellulolytic activities with respect to time, temperature and pH. *Biotechnology and Bioengineering*, **22**, 1515-1526.
- Hägerdal, B.G.R., Ferchak, J.D. y Pye, E.K. (1980). Cellulolytic enzyme system of *Thermoactinomyces* spp. grown on microcrystalline cellulose. *Applied Environmental Microbiology*, **36**, 606-612.
- Hagget, K.D., Gray, P.P. y Dunn, N.W. (1979). Crystalline cellulose degradation by a strain of *Cellulomonas* and its mutant derivatives. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, **8**, 183-190.
- Halliwell, G. (1975). Action of the components of the cellulase complex. En: Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. (M. Bailey, T.-M. Enari, and M. Linke, eds.). pp. 139-336, SITRA, Aulanko, Finland.
- Hames, B.D. (1981). An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. En: Gel Electrophoresis of Proteins. (B.D. Hames and D. Rickwood, eds.). pp. 1-91, IRL-PRESS, Oxford.
- Harper, S.H.T. y Lynch, S.M. (1981). The Chemical components and decomposition of wheat straw leaves. Internodes and nodes. *Journal of Science Food Agricultural*, **32**, 1057-1062.
- Hartley, R.D. (1981). Chemical constitution, properties and processing of lignocellulosic waste in relation to nutritional quality for animals. *Agricultural Environmental*, **6**, 91-113.
- Hartley, R.D., Jones, E.C. y Wood, T.M. (1976). Carbohydrates and carbohydrates esters of ferulic acid released from cell walls of *Lolium multiflorum* by treatment with cellulolytic enzymes. *Phytochemistry*, **15**, 305-307.
- Hayano, K. y Katami, A. (1977). Extraction of β -glucosidase from field soil. *Soil Biology and Biochemistry*, **9**, 349-351.
- Hayashida, S. y Mo, K. (1986). Production and characteristics of avicel disintegrating endoglucanase from a protease-negative *Humicola grisea* var. *thermoidea* mutant. *Applied Environmental Microbiology*, **51**, 1041-1046.
- Hazleqood, G.P., Romaniec, M.P.M., Davidson, K., Grepinet, O., Béguin, P.L., Millett, J., Raynaud, O. y Aubert, J.-P. (1988). A catalogue of *Clostridium thermocellum* endoglucanase, β -glucosidase and xylanase genes cloned in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, **51**, 231-236.
- Henrissat, B., Rodriguez, H., Viet, C. y Schülein, M. (1985). Synergism of cellulase from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. *Biotechnology*, **3**, 722-726.
- Herr, D. (1979). Secretation of cellulases and β -glucosidases by *Trichoderma viride* ITCC 1433 in submerged cultures on different substrates. *Biotechnology and Bioengineering*, **21**, 1361-1370.
- Hon-Nami, K., Coughlan, M.P., Hon-Nami, H. y Ljungdahl, L.G. (1986). Separation and characterization of the complexes constituting the cellulolytic enzyme system of *Clostridium thermoaceticum*. *Archives of Microbiology*, **145**, 13.
- Howell, J.A. (1978). *Biotechnology and Bioengineering*, **20**, 847.

- Huang, L. y Forsberg, C.W. (1988). Purification and comparison of the periplasmic and extracellular forms of the cellodextrinase from *Bacteroides succinogenes*. *Applied Environmental Microbiology*, **54**, 1488-1493.
- Humphrey, A.E., Moreira, A., Armiger, W. y Zabriskie, D. (1977). Production single cell protein from cellulose wastes. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, **7**, 45-64.
- Jain, D. y Ghose, T.K. (1984). Cellobiose hydrolysis using *Pichia etchellsii* cells immobilized in calcium alginate. *Biotechnology and Bioengineering*, **26**, 340-346.
- Jamuna, R., Sai, P.S.T., Vora, E. y Ramakrishna, S.V. (1992). Optimization of critical parameters for immobilization of yeast cells to alginate gel matrix. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **73** (4), 319-322.
- Jansen, E.F. y Olson, A.C. (1969). Cross-linking of a chymotrypsin insolubilized with glutaraldehyde. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **129**, 221-227.
- Jansen, E.F., Tomimatsu, Y. y Olson, A.C. (1971). Cross-linking of a chymotrypsin and other proteins by reaction with glutaraldehyde. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **144**, 394-400.
- Jeffries, T.W. (1990). Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. *Biodegradation*, **1**, 163-176.
- Johnson, E.A., Sakajoh, M., Halliwell, G., Madia, A. y Demain, A.L. (1982). Saccharification of complex cellulosic substrates by the cellulase system of *Clostridium thermocellum*. *Applied Environmental Microbiology*, **43**, 1125-1132.
- Kaarik, A.A. (1974). Succession of microorganisms during wood decay. En: *Biological Transformation of Wood By Microorganisms*. (W. Liede, ed.). pp. 39-51, Springer-Verlag, New York.
- Katchalski, E., Silman, I. y Goldman, R. (1971). Effect of the microenvironment on the mode of action of immobilized enzymes. *Advances in Enzymology*, **34**, 445-536.
- Kennedy, J.F. (1979). *Chemical Society Reviews*, **8**, 221.
- Kennedy, J.F. y Kalogerakis, B. (1984). Immobilization of enzymes on crosslinked gelatin particles activated with various forms and complexes of titanium (IV) species. *Enzyme Microbial Technology*, **6**, 68-76.
- Kennedy, J.F. y White, C.A. (1991). Principios de la inmovilización de enzimas. En: *Manual de Biotecnología de los Enzimas*. (A. Wiseman, ed.). pp. 139-199, Acribia, Zaragoza.
- Keston, A.S. (1956). Specific colorimetric enzymatic analytical reagents for glucose. Abstract of Papers, 129th Meeting, ACS, Dallas [TX], **3**, 31.
- Kierstan, M. y Bucke, C. (1977). The immobilization of microbial cells, subcellular organelles, and enzymes in calcium alginate gels. *Biotechnology and Bioengineering*, **19**, 387-397.
- Kierstan, M.P. y Coughlan, P. (1985). Immobilization of cells and enzymes by gel entrapment. En: *Immobilised cells and Enzymes*. (J. Woodward, ed.). pp. 39-48, I.R.S. PRESS, Oxford.
- Kirk, T.K. (1988). Biochemistry of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. In *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation* (J.-P. Aubert, P. Béguin and J. Millett, eds.). pp. 315-332, Academic Press, New York.

- Kivaisi, A.K., Op den Camp, H.S.M., Lubbenig, H.J., Boron, J.J. y Vogels, G.D. (1990). Generation of soluble lignin-derived compound during degradation of barley straw in an artificial rumen reactor. *Applied Microbial Biotechnology*, **33**, 93-98.
- Klyosov, A.A. (1988). Cellulases of the third generation. En: *Biochemistry and Genetics of Cellulose* (J.-P. Aubert, P. Béguin and J. Millett, eds.). pp. 87-99, Academic Press, London.
- Klyosov, A.A. (1990). Trends in biochemistry and enzymology of cellulase degradation. *Biochemistry*, **29**, 10577-10585.
- Knowles, J., Teeri, T.T., Lehtovaara, P., Penttila, M. y Saloheimo, M. (1988). The use of gene technology to investigate fungal cellulolytic enzymes. En: *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation*, (J.-P. Aubert, P. Béguin and J. Millett, eds.), pp. 393-396, Academic Press, London.
- Kobayashi, M. y Takatsu, K. (1994). Cross-linked stabilization of trypsin with dextranialdehyde. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **58** (2), 275.
- Koenigs, J.W. (1975). Hydrogen peroxide and iron: A microbial cellulolytic system. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, **5**, 151-159.
- Koichiro, L., Koes, K.A., Fumihide, S., Keiichi, K. y Mayumi, K. (1982). *Biotechnology and Bioengineering*, **24**, 347.
- Koshijima, T., Watanabe, T. y Yaku, T. (1989). Structure and properties of the lignin-carbohydrate polymer as an amphipathic substance. En: *Lignin Properties and Materials*. (W.G. Glasser and S. Sarkanen, eds.). pp. 11-28, American Chemical Society, Washington, D.C.
- Kubicek, C.P., Messner, R., Cruber, F., Mach, R.L. y Kubicek-Pranz, E.M. (1993). The *Trichoderma* cellulase regulatory puzzle: From interior life of a secretory fungus. *Enzyme and Microbial Technology Review*, **15**, 90-99.
- Kyriacou, A.K., MacKenzie, C.R. y Neufield, R.J. (1987). Detection and characterization of specific and non-specific endoglucanases of *Trichoderma reesei*. Evidence demonstrating endoglucanase activity by cellobiohydrolase II. *Enzyme and Microbial Technology*, **9**, 25-92.
- Lachke, A.H. y Deshpande, M.V. (1988). *Sclerotium rolfsii*: Status in cellulase research. *FEMS Microbiology Reviews*, **54**, 177-194.
- Ladd, J.N. y Butler, J.H.A. (1969). Inhibition and stimulation of proteolytic enzyme activities by soil humic acids. *Australian Journal of Soil Research*, **7**, 253-261.
- Ladd, J.N. y Butler, J.H.A. (1975). Humics-enzyme systems and synthetic organic polymer-enzyme analogues. En: *Soil Biochemistry*. (E.A. Paul and A.D. Mc Laren, eds.). pp. 149-194, Marcel Dekker, New York.
- Ladisch, M.R., Lin, K.W., Voloch, M. y Tsao, G.T. (1983). Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme and Microbial Technology*, **5**, 82-102.
- Lamed, R. y Bayer, E.A. (1988). Cellulosomes from *Clostridium thermocellum*. *Method in Enzymology*, **160**, 472-482.
- Lamed, R., Kenig, R. Setter, E. y Bayer, E.A. (1985). Major characteristics of the cellulolytic system of *Clostridium thermocellum* coincide with those of the purified cellulosome. *Enzyme and Microbial Technology*, **7**, 37-41.

- Lamed, R., Setter, E., Kenig, R. y Bayer, E.A. (1983a). Characterization of a cellulose-binding, cellulase-containing complex in *Clostridium thermocellum*. *Journal of Bacteriology*, **156**, 828-836.
- Lamed, R., Setter, E., Kenig, R. y Bayer, E.A. (1983b). The cellulosome: A discrete cell surface organelle of *Clostridium thermocellum* which exhibits separate antigenic, cellulose-binding and various cellulolytic activities. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, **13**, 163-181.
- Lázaro, L., Mastral, J., and Arauzo, J. (1994). Pretratamiento con NaOH de paja de cereal para su transformación por hidrólisis enzimática. *Química e Industria*, **3**, 13-18.
- Lázaro, M.L. (1991). Hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos modificados por tratamiento alcalino. Tesis Doctoral. Universidad Zaragoza.
- Lee, D., Yu, A.H., Wong, K.K.Y. y Sadlers, S.N. (1994). Evaluation of the enzymatic susceptibility of cellulolytic substrates using specific hydrolysis rates and enzymes adsorption. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **45/46**, 407-415.
- Lilly, M.D., Kay, G., Sharp, A.K. y Wilson, R.J.H. (1968). The operation of biochemical reactors using fixed enzymes. *Biochemistry Journal*, **107**, 5.
- Ljungdahl, L.G. (1989). Mechanisms of cellulose hydrolysis by enzymes from aerobic and anaerobic bacteria. En: *Enzyme Systems for Lignocellulose Degradation* (M.P. Coughlan, ed.). pp. 5-16, Elsevier Applied Science, London.
- Ljungdahl, L.G. y Eriksson, K.-E. (1985). Ecology of microbial cellulose degradation. *Advances in Microbial Ecology*, **8**, 237-299.
- Ljungdahl, L.G., Coughlan, M.P., Mayer, F., Mori, Y. y Hon-Nami, K. (1988). Macrocellulase complexes and yellow affinity substance from *Clostridium thermocellum*. *Methods in Enzymology*, **160**, 483-500.
- Ljungdahl, L.G., Petterson, B., Eriksson, K.-E. y Wiegel, J. (1983). A yellow affinity substance involved in the cellulolytic system of *Clostridium thermocellum*. *Current Microbiology*, **9**, 195-200.
- Maignan, C. (1982). Activité des complexes acides humiques-invertase: influence du mode de preparation. *Soil Biology and Biochemistry*, **14**, 439-445.
- Mandels, M. (1981). Cellulases. *Annual Reports on Fermentation Processes*, **5**, 35-49.
- Mandels, M. y Reese, E.T. (1964). Fungal cellulases and the microbial decomposition of cellulosic fibres. *Developments in Industrial Microbiology*, **5**, 5-12.
- Mandels, M., Hontz, L. y Nystrom, J. (1974). Enzymatic hydrolysis of waste cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, **16**, 1471-1493.
- Mansfeld, J. y Schellenberger, A. (1987). Invertase immobilized as macroporus polystyrene: Properties and kinetic characterization. *Biotechnology and Bioengineering*, **29**, 72-78.
- March, P.B., Merola, G.V. y Simpson, M.E. (1953). Experiments with an alkali swelling-centrifuge test applied to cotton fibre. *Textile Research Journal*, **23**, 831-838.
- Markwaldes, H.U. y Neukom, H. (1976). Diferulic acid as a possible croslink in hemicellulases from wheat germ. *Phytochemistry*, **15**, 836-837.

- Mato, M.C., Gonzalez-Alonso, L.M. y Méndez, Z.J. (1972). Inhibition of enzymatic indoleacetic acid-oxidase by soil humic acids fractionated on Sephadex. *Soil Biology and Biochemistry*, **4**, 469-473.
- Mayaudon, J. y Sarkar, J.M. (1974). Chromatographic et purification des diphenol oxydase du sol. *Soil Biology and Biochemistry*, **6**, 275-309.
- Mayer, F., Coughlan, M.P., Mori, Y., and Ljungdahl, L.G. (1987). Macromolecular organization of the cellulolytic enzyme complex of *Clostridium thermocellum* as revealed by electron microscopy. *Applied Environmental Microbiology*, **53**, 2785-2792.
- Messing, R.A. (1985). Immobilization techniques-enzymes. En: *Comprehensive Biotechnology*. (M. Moo-Young, ed.), vol. 2, p. 191, Oxford, Pergamon.
- Meyer, H.P. y Humphrey, A.E. (1982). Cellulase production by a wild and a new mutant strains of *Thermomonospora* sp. *Biotechnology and Bioengineering*, **24**, 1901-1904.
- Miller, T.L. y Wolin, M.J. (1974). A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Applied of Microbiology*, **27**, 985-987.
- Millet, B.A., Baker, A.S. y Satter, L.D. (1975). Pre-treatment to enhance chemical enzymic and microbiological attack on cellulosic materials. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, **5**, 193-201.
- Millett, M.A., Baker, A.J. y Satter, L.D. (1976). Physical and chemical pretreatment for enhancing cellulose saccharification. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, **6**, 125-153.
- Moloney, A.P., McCrae, S.I., Wood, T.M. y Coughlan, M.P. (1985). Isolation and characterization of the 1,4- β -D-glucan glucanohydrolases of *Talaromyces emersonii*. *Biochemistry Journal*, **225**, 365-374.
- Morgan, C.R., Warner, J.P. y Yrchak, S. (1981). *Industrial Engineering Chemistry Products Research Development*, **20**, 185.
- Mori, T., Sato, T., Tosa, T. y Chibata I. (1972). Studies on immobilized enzymes. Preparation and properties of aminoacylase entrapped into acrylamide gel-lattice. *Enzymology*, **43**, 213-218.
- Mori, T., Tosa, T., and Chibata, I. (1974). Preparation and properties of asparaginase entrapped in the lattice of polyacrylamide gel. *Cancer Research*, **34**, 3066-3068.
- Mori, Y., Sekozawa, A., Fumane, K. y Kiuchi, K. (1987). Screening of termophilic anaerobic bacteria capable of converting cellulose into ethanol. *Representative National Food Research Institute*, **51**, 66-70.
- Morrison, I.M. (1974). Structural investigation on the lignin-carbohydrate complexes of folium peremne. *Biochemistry Journal*, **139**, 197-204.
- Mosbach, K. (1976). Introduction. En: *Methods in Enzymology*. Vol. 44. (Mosbach, K., ed.), pp. 3-8, Academic Press, New York.
- Mountford, D.O. y Asher, R.A. (1985). Production and regulation of cellulase by two strains of the rumen anaerobic fungi, *Neocallimastix frontalis*. *Applied Environmental Microbiology*, **49**, 1314-1322.
- Nakamura, K. y Kitamura, K. (1988). Cellulases of *Cellulomonas uda*. *Methods in Enzymology*, **160**, 211-216.

- Nakayama, M., Tomita, Y., Suzuki, H. y Nisizawa, K. (1976). Partial proteolysis of some cellulase components and the substrate specificity of the modified products. *Journal of Biochemistry*, **79**, 955-966.
- Nannipieri, P., Ceccanti, B. y Bianchi, D. (1988). Characterization of humus-phosphatase complexes extracted from soil. *Soil Biology and Biochemistry*, **20**, 683-691.
- Nannipieri, P., Ceccanti, B., Bianchi, D. y Bonmati, F. (1985). Fractionation of hydrolase-humus complex by gel chromatography. *Biology and Fertility of Soils*, **1**, 25-29.
- Nannipieri, P., Ceccanti, B., Cervelli, S. y Sequi, P. (1974). Use of 0.1 M pyrophosphate to extract urease from a podzol. *Soil Biology and Biochemistry*, **6**, 359-362.
- Nannipieri, P., Ceccanti, B., Conti, C. y Bianchi, D. (1982). Hydrolases extracted from soil: Their properties and activities. *Soil Biology and Biochemistry*, **14**, 257-263.
- Nelson, J.M. y Griffin, E.G. (1916). Adsorption of invertase. *Journal Chemistry Society*, **38**, 1109-1115.
- Nelson, N. (1944). A photometric adaption of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*, **153**, 375-378.
- Nummi, M., Niku-Paavola, M.-L., Enari, T.M. y Ronnio, V. (1983). Cellobiohydrolase from *Trichoderma reesei*. *Biochemistry Journal*, **215**, 677-683.
- Ohmiya, K., Terao, C., Shimizu, S. y Kobayashi, T. (1975). Immobilization of β -glucosidase by polyacrylamide in the presence of protective agents. *Agricultural Biology and Chemistry*, **39** (2), 491-498.
- Orpin, C.G. (1984). The role of ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell walls. *Animal Feed Science Technology*, **10**, 121-143.
- Ottesen, M. y Svensson, B. (1971). Modification of papain by treatment with glutaraldehyde under reducing and non-reducing conditions. *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg.*, **38** (11), 171-185.
- Parr, S.R. (1983). Some kinetic properties of the β -D-glucosidase (cellobiase) in a commercial cellulase product from *Penicillium funiculosum* relevance in the hydrolysis of cellulose. *Enzyme and Microbial Technology*, **5**, 448-462.
- Payne, J.W. (1973). Polymerization of proteins with glutaraldehyde. Soluble molecular-weight markers. *Biochemistry Journal*, **135**, 867-873.
- Perez-Mateos, M. (1989). Interacción entre componentes agroquímicos y enzimas del suelo. Aplicaciones de la biotecnología de los enzimas inmovilizados. *Biotechnología*, **5**, 8-15.
- Perez-Mateos, M. y Gonzalez, S. (1987). Effect of fractionation on the enzymatic state and behaviour of enzyme activities in different structural soil units. *Biology and Fertility of Soils*, **4**, 151-154.
- Perez-Mateos, M. y Rad, J.C. (1989). Immobilization of alkaline phosphatase by soil structural units. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **11**, 371-378.
- Perez-Mateos, M., Gonzalez, S. y Busto, M.D. (1988). Extraction of catalase from soil. *Soil Science Society of American Journal*, **52**, 408-411.
- Perez-Mateos, M., Rad, J.C. y Busto, M.D. (1990). Stability and properties of alkaline phosphatase immobilized by a Rendzine soil. *Journal of Science Food Agricultural*, **55** (2), 229-240.

- Preston, R.D. y Cronshaw, J. (1958). *Nature*, **181**, 248.
- Quiócho, F.A. y Richards, F.M. (1964). The enzymatic behaviour of carboxypeptidase-A in the solid state. *Biochemistry*, 4062-4076
- Reese, E.T. (1977). Degradation of polymeric carbohydrates by microbial enzymes. *Recent Advances in Phytochemistry*, **11**, 311-367
- Reese, E.T., Siu, R.G.H. y Levinson, H.S. (1950). Biological degradation of soluble cellulose derivatives. *Journal of Bacteriology*, **9**, 485-497
- Richards, F.M. y Knowles, J.R. (1968). *Journal of Molecular Biology*, **37**, 231-233.
- Roberts, D.V. (1977). *Enzyme kinetics*. University Press, Cambridge.
- Roberts, J.C., McCarthy, A.S., Flynn, N.J. y Brode, P. (1990). Modification of paper properties by the pretreatment of pulp with *Saccharomonospora viridis* xylanase. *Enzyme Microbial Technology*, **12**, 210-213.
- Rowell, M.J., Ladd, J.N. y Paul, E.A. (1973). Enzymically active complexes of proteases and humic enzyme complexes. *Soil Biology and Biochemistry*, **5**, 699-703.
- Ruggiero, P. y Radogna, V.M. (1988). Humic acids-tyrosine interactions as a model of soil humic-enzyme complexes. *Soil Biology and Biochemistry*, **20** (3), 353-359.
- Ryu, D.D.Y., Kim, C. y Mandels, M. (1984). Competitive adsorption of cellulase components and its significance in a synergistic mechanisms. *Biotechnology and Bioengineering*, **26**, 488-496.
- Sadana, J.C., Lachke, A.H. y Schewale, J.C. (1979). *Science and Industrial Research*, **38**, 442.
- Saddler, J.N. y Kitamura, K. (1980). Cellulase production by *Acetivibrio cellulolyticus*. *Canadian Journal of Microbiology*, **26**, 760-765.
- Sagar, B.F. (1985). Mechanism of cellulase action. En: *Procc. Cellucon'84*. (J.F. Kennedy, G.D. Phillips, D.J. Wedlock, and P.A. Willians, eds.). pp. 199-207, Ellis Horwood, Chichester.
- Sarkar, J.M. (1986). Formation of [¹⁴C]cellulase-humic complexes and their stability in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, **18**, 251-254.
- Sarkar, J.M. y Burns, R.G. (1984). Synthesis and properties of β -D-glucosidase-phenolic copolymers as analogues of soil humic-enzyme complexes. *Soil Biology and Biochemistry*, **16** (6), 619-625.
- Sarkarsen, K.V. (1980). En: *Progress in Biomass Conversion*, Vol. 2, (K.V. Sarkarsen and D.A. Tillman, eds.). pp. 127-207, Academic Press, New York.
- Sarkarsen, K.V. y Ludwig, C.H. (1971). *Lignins. Occurrence, Formation, Structure and Reactions*. Wiley-Interscience, New York.
- Sarkarsen, K.V. y Tillman, D.A. (1980). *Progress in Biomass Conversion*. Academic Press, New York.
- Sarkov, V.I. y Dobush, O.A. (1956). *Zh.Prihl. Khim*, **29** (9), 1411.
- Scalbert, A., Monties, B., Lallemand, J.Y., Guiltet, D. y Rolando, C. (1985). Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from Wheat Straw. *Phytochemistry*, **24**, 1359-1362.

- Schejter, A. y Bar-Eli, A. (1970). Preparation and properties of crosslinked water-insoluble catalase. *Archives of Biochemistry and Biophysic*, **136**, 325-330.
- Shovers, J. y Sandine, W.E. (1973). US Patent, 3,733,205.
- Sloneker, J.H. (1976). Agriculture residues, including feedlot wastes. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, **6**, 235-250.
- Smalla, K., Turkova, J., Goupek, J. y Hermann, P. (1988) Influence of salts in the covalent immobilization of protein to modified copolymers of 2-hydroxyethyl methacrylate with ethylene dimethacrylate. *Biothecnology and Applied Biochemistry*, **10**, 21-31.
- Smith, M.M., Hartley, R.D. y Galliard, T. (1981). Feluric acid substitution of cell wall polysaccharides of cheat bran. *Biochemical Society Transactions*, **9**, 165-173.
- Somogyi, M. (1952). Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry*, **5**, 19.
- Sprey, B. y Lambert, C. (1983). Titration curves of cellulases from *Trichoderma reesei*: demonstration of a cellulase-xylanase- β -glucosidase-containing complex. *FEMS Microbiology Letters*, **18**, 217-222.
- Srivastava, S.K., Gopalkrishnan, K.S. y Ramachandran, K.B. (1984). Kinetic characterization of a crude β -glucosidase from *Aspergillus wentii* Pt 2804. *Enzyme and Microbial Technology*, **6**, 508-512.
- Stahlberg, J., Johansson, L. y Pettersson, G. (1988). A binding site-deficient catalytically-active core protein of endoglucanase III from the culture filtrate of *Trichoderma reesei*. *European Journal of Biochemistry*, **173**, 179-183.
- Sternberg, D., Vijayakumar, P. y Reese, G.P. (1977). β -glucosidase: Microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. *Canadian Journal of Microbiology*, **23**, 139-147.
- Stewart, B.J. y Leatherwood, J.M. (1976). Derepressed synthesis of cellulase by *Cellulomonas*. *Journal of Bacteriology*, **128**, 609-615.
- Stewart, W.W. y Swaisgood, H.E. (1993). Characterization of calcium alginate pore diameter by size-exclusion chromatography using protein standards. *Enzyme and Microbial Technology*, **15** (11), 922-927.
- Stradberg, G.W. y Smiley, K.L. (1971). Free and immobilized glucose isomerase from *Streptomyces phaeochromogenes*. *Applied Microbiology*, **21**, 588-.
- Sundstrum, D.W., Klei, H.E., Coughlin, G.J., Biederman, G.J. y Bronwes, C.A. (1982). *Biotechnology and Bioengineering*, **23**, 473.
- Szczodrack, J. (1988). The enzymatic hydrolysis and fermentation of pretrated wheat straw to etanol. *Biotechnology and Bioengineering*, **32**, 771-776.
- Takeuchi, T. y Makino, K. (1987). Cellulase immobilized on poly-l-glutamic acid. *Biotechnology and Bioengineering*, **29**, 160-167.
- Tanaka, H., Matsumura, M. y Veliky, A. (1984). diffusion characteristics of substrates in calcium alginate gel beads. *Biotechnology and Bioengineering*, **26**, 53-58.
- Tanaka, M., Ikesaka, M., Matsuno, R. y Converse, O. (1988). Effects of pore size in sustrato and diffusion of enzyme on hydrolysis of cellulosic materials with cellulases. *Biotechnology and Bioengineering*, **32**, 698-706.

- Tanaka, M., Nakamura, M., Taniguchi, M., Morita, T., Matsuno, R. y Kamikubo, K. (1986). *Applied of Microbiology and Biotechnology*, **23**, 263-268.
- Tarkow, H. y Feist, W.D. (1969). A mechanism for improving the digestibility of lignocellulose materials with dilute alkali and liquid ammonia. *Advances in Chemical Series*, **95**, 197-201.
- Ternrud, I.E., Lindberg, J.E., Magnusson, A.T. y Thandes, O. (1988). Rumen degradation of cell wall polysaccharides in untreated and alkali-treated straws and cereal brooms. *Journal of Science Food Agricultural*, **42**, 9-18.
- Thiele, H. (1954). Ordered coagulation and gel formation. *Discuss Faraday Society*, **18**, 294-301.
- Tien, M. y Kirk, T.K. (1983). Lignin-degradin enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds. *Science*, **221**, 661-663.
- Timell, T.E. (1967). Recent progress in the chemistry of wood hemicellulose. *Wood Science Technology*, **1**, 45-70.
- Tomme, P., Van Tilbeurgh, H., Pettersson, G., Van Damme, J., Vandekerckhove, J., Knowles, J., Teeri, T. y Claeysens, M. (1988). Studies of the cellulolytic system of *Trichoderma reesei* QM 9414. Analysis of domain function in two cellobiohydrolases by limited proteolysis. *European Journal of Biochemistry*, **170**, 575-581.
- Torgonski, Z. y Pielecki, I. (1993). Bio-conversion of wheat straw into ethanol. *Przemysl Fermentacyjny i Owocono-warzywny*, **37** (3), 10-12.
- Treva, M.D. (1980). Immobilized Enzymes. En: Introduction and Application in Biotechnology. (M.D. Treva, ed.). John Wiley, Chichester.
- Treva, M.D. (1990). Tecnología enzimática. En: Biotecnología. Principios biológicos. (M.D. Treva, S. Boffey, K.H. Goulding and P. Stanbury, eds.). p. 169, Acribia, Zaragoza.
- Treva, S., Goulding, K.H. y Stanbury, P. (1990). ¿Qué es la Biotecnología?. En: Biotecnología: Principios Biológicos. (M.D. Treva, S. Boffey, K.H. Goulding and P. Stanbury, eds.). pp.1-13, Acribia, Zaragoza.
- Trivedi, L.S. y Rao, K.K. (1980). Factor influencing cellulase induction in *Fusarium* sp. *Current Microbiology*, **3**, 219-224.
- Vaheri, M.P. (1982). Oxidation as a part of delignification of crystalline cellulose by *Trichoderma reesei*. *Journal of Applied Biochemistry*, **4**, 356-363.
- Vallander, L. y Eriksson, K.E. (1985). Enzymatic saccharification of pretreated wheat straw. *Biotechnology and Bioengineering*, **27**, 650.
- Vallander, L. y Eriksson, K.E. (1990). Production of Ethanol from lignocellulosic Materials: State of the Art. En: Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology. Vol. 42, (A. Fiechter, ed.). pp. 63-95, Springer-Verlag, New York.
- Van Tilbeurgh, H., Bhikhabhai, R., Pettersson, L.G. y Claeysens, M. (1984). Separation of endo- and exo-type cellulases using a new affinity chromatography method. *FEBS Letters*, **169**, 215-218.
- Van Tilbeurgh, H., Tomme, P., Claeysens, M., Bhikhabhai, R. y Pettersson, L.G. (1986). Limited proteolysis of the cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *FEBS Letters*, **204**, 223-227.

- Vazquez, D., Lago, M.A., Paraje, J.C. y Alonso, J.L. (1993). Production of single cell protein from lignocellulosic wastes and by products. *Cerevisae and Biotechnology*, **18** (1), 42-54.
- Vernardos, D., Klei, H.E. y Sundstrom, D. (1980). Conversion of cellobiose to glucose using immobilized β -glucosidase reactors. *Enzyme and Microbial Technology*, **2**, 112-116.
- Viljoen, J.A., Fred, E.B. y Peterson, W.H. (1926). The fermentation of cellulose by thermophilic bacteria. *Journal of Agricultural Science*, **16**, 1-17.
- Vohra, R.M., Shirkot, C.K., Dhawan, S. y Gupta, K.G. (1980). Effect of lignin and some of its components on the production and activity of cellulase(s) by *Trichoderma reesei*. *Biotechnology. Bioengineering*, **22**, 1497-1501.
- Vorlop, K.-D and Klein, J. (1983). Enzyme Technology III Rotenburg Fermentation Symposium, (R.M. Lafferty, ed.), pp. 219-235.
- Wald, S., Wilke, C.R. y Blanch, H.W. (1984). *Biotechnology and Bioengineering*, **26**, 221-230.
- Watanabe, T.S., Ohnishi, Y., Kaizu, Y.S. y Koshijima, T. (1989). Binding site analysis of the ether linkages between lignin and hemicellulases in lignin- carbohydrate complexes by DDQ oxidating. *Agricultural Chemistry*, **53**, 2233-2252.
- Wenzel, H.F.J. (1970). *The Chemical Technology of Wood*. Academic Press, New York.
- White, A.R. (1982). En: Cellulose and Other Natural Polymer Systems: Biogenesis, Structure and Degradation. (R.M. Brown Jr., ed.), p. 489-509, Plenum Press, New York.
- White, A.R. y Brown, R.M. (1981). Enzymatic hydrolysis of cellulose: Visual characterization of the process. *Proceeding National Academy Science of United States*, **78**, 1047-1051.
- Wieth, W.R. y Venkatasubramania, K. (1974). Enzyme Engineering. Part III. Materials for immobilized enzyme reactors. *Chemtech*, 47-55.
- Wilke, C.R., Maiorella, B., Sciamannan, A., Tangu, R., Wiley, D. y Wong, H. (1983). *Enzymatic hydrolysis of cellulose*. Noyes Date Corporation, N. Jersey.
- Wilson, D.B. (1988). Cellulases of *Thermomonospora fusca*. *Methods in Enzymology*, **160**, 314-323.
- Wong, S.S. y Wong, L.-J.C. (1992). Chemical crosslinking and the stabilization of proteins and enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, **14**, 866-870.
- Wood, T.M. (1968). Cellulolytic enzyme system of *Trichoderma koningii*. Separations of components attacking native cotton. *Biochemistry Journal*, **109**, 217-229.
- Wood, T.M. (1969). The cellulase of *Fusarium solani*. Resolution of the enzyme complex. *Biochemistry Journal*, **115**, 457-464.
- Wood, T.M. (1975). Properties and mode of action of cellulases. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, **5**, 111-137.
- Wood, T.M. (1985). Properties of cellulolytic enzyme systems. *Biochemical Society Transaction*, **13**, 407-410.
- Wood, T.M. (1989). Mechanisms of cellulose hydrolysis by enzymes from anaerobic and aerobic fungi. En: Enzyme systems for lignocellulose degradation. (M.P. Coughlan, ed.), pp. 17-36, Elsevier Applied Science New York.

- Wood, T.M. (1990). Fungal cellulases. En: Biosynthesis and Biodegradation of Cellulose and Cellulosic Materials. (P.J. Weimer and C.A. Hagler, eds.) p. 17, Marcel Dekker, New York.
- Wood, T.M. (1981). Enzyme interactions involved in fungal degradation of cellulosic materials. En: The Ekman Days International Symposium on Wood Pulping Chemistry. Vol. 3, pp. 31-38, SPCI, Stockholm.
- Wood, T.M. y Bhat, K.M. (1988). Methods for measuring cellulases activities. *Methods in Enzymology*, **160**, 87-112.
- Wood, T.M. y McCrae, S.I. (1972). The purification and properties of the C1 component of *Trichoderma koningii* cellulase. *Biochemistry Journal*, **128**, 1183-1192.
- Wood, T.M. y McCrae, S.I. (1978). The mechanism of cellulase action with particular references to the C1 component. En: Proc. Symp. Bioconversion of Cellulosic Substances into Energy, Chemicals and Microbial Protein. (T.K. Ghose, ed.) pp. 114-141, IIT, New Delhi.
- Wood, T.M. y McCrae, S.I. (1979). Synergism between involve in the solubilization of native cellulose. *Advances in Chemical Series*, **181**, 181-209.
- Wood, T.M. y McCrae, S.I. (1986a). The cellulase of *Penicillium pinophilum*. Synergism between enzyme components in solubilizing cellulose with special reference to the involvement of two immunologically-distinct cellobiohydrolases. *Biochemistry Journal*, **234**, 93-96.
- Wood, T.M. y McCrae, S.I. (1986b). Purification and properties of a cellobiohydrolase from *Penicillium pinophilum*. *Carbohydrates Research*, **148**, 331-334.
- Wood, T.M., McCrae, S.I. y Bhat, K.M. (1989). The mechanism of fungal cellulase action. Synergism between enzyme components of *Penicillium pinophilum* cellulase in solubilizing hydrogen bond-ordered cellulose. *Biochemistry Journal*, **260**, 37-43.
- Wood, T.M., McCrae, S.I. y MacFarlane, C.C. (1980). The isolation, purification, and properties of the cellobiohydrolase component of *Penicillium funiculosum* cellulase. *Biochemistry Journal*, **189**, 51-65.
- Wood, T.M., McCrae, S.I., Wilson, C.A., Bhat, K.M. y Gow, L.A. (1988). Aerobic and anaerobic fungal cellulases, with special reference to their mode of attack on crystalline cellulose. En: Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation (J.-P. Aubert, P. Béguin, and J. Millett, eds.) pp. 31-52, Academic Press, New York.
- Wood, T.M., Wilson, C.A., McCrae, S.I. y Joblin, K.N. (1986). A highly active extracellular cellulase from the anaerobic *Neocallimastix frontalis*. *FEMS Letters*, **34**, 37-40.
- Woodward, J. (1985). Immobilized Enzymes: Adsorption and covalent coupling. En: Immobilised Cells and Enzymes: A Practical Approach. (J. Woodward, ed.), pp. 3-17, I.R.S. PRESS, Oxford.
- Woodward, J. y Wiseman, A. (1982). *Enzyme and Microbial Technology*, **4**, 73.
- Woodward, J., Lima, M. y Lee, N.L. (1988). The rôle of cellulase concentration in determining the degree of synergism in the hydrolysis of microcrystalline cellulose. *Biochemistry Journal*, **255**, 895-899.
- Woolum II, A.G. (1982). Cultural Methods of Soil Microorganism. En: Methods of Soil Analysis Part. 2. (A. L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney, eds.) pp. 781-801, Soil Science Society of America, Madison.

- Wu, J.H.D., Orme-Johnson, W.H. y Demain, A.L. (1988). Two components of an extracellular protein aggregate of *Clostridium thermocellum* together degrade crystalline cellulose. *Biochemistry*, **27**, 1703-1709.
- Yamanaka, Y. y Wilke, C.R. (1976). Cellulose hydrolysis with a mixed enzyme system. AIChE 81st. Annual Meeting Abstract Kansas City, MO., **4**, 11-14.
- Zaborsky, O.R. (1973). *Immobilized Enzymes*. CRC Press, Cleveland.
- Zantua, M.I. y Bremner, J.M. (1976). Production and persistence of urease activity in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, **8**, 369-374.
- Zeikus, J.G. (1980). Fate of lignin and related aromatic substrates in anaerobic environment. En: *Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry and Potencial Application*. (T.K. Kirk, T. Higuchi, and H.M. Chang, eds.). pp. 101-109, CRC Press, Fla.

7. ANEXO

7.1. CONTROL ESTADÍSTICO DE LA VARIANZA

Con el fin de conocer la precisión y exactitud de los resultados experimentales se ha calculado, a partir de los valores correspondientes a una misma muestra, el valor medio (\bar{x}) y la desviación estandar muestral (s) de los resultados obtenidos en cada experiencia, de acuerdo con las siguientes expresiones:

$$\text{Valor medio: } \bar{x} = \sum x_i / n$$

$$\text{Desviación estandar muestral: } s = \left[\sum (x_i - \bar{x})^2 / (1/n) \right]$$

Para la calificación estadística de los resultados se realizaron cálculos del coeficiente de variación (CV) mediante la siguiente expresión:

$$CV (\bar{x}) = 100 s / \bar{x}$$

Este coeficiente es adimensional e independiente de la unidad de medida por lo que resultaba suficientemente adecuado para conocer semicuantitativamente la dispersión de los valores de medida de la misma magnitud, cuando las medidas se refieran al mismo origen de medida.

Tabla 1. Influencia de la concentración de alginato de sodio, CaCl_2 y tiempo de tratamiento en la inmovilización de β -glucosidasa en geles de alginato de calcio.

		valor 1	Media	Actividad β -glucosidasa en geles de alginato de calcio															
		valor 2	s																
		valor 3	CV(%)	Alginato 1%						Alginato 2%						Alginato 3%			
Tiempo (min)		[CaCl ₂] (M)						[CaCl ₂] (M)						[CaCl ₂] (M)					
		0,05		0,10		0,20		0,05		0,10		0,20		0,05		0,10		0,20	
30		n.d.	14,83	14,25	14,84	16,37	16,83	n.d.	17,40	17,41	17,16	21,05	20,60	20,55	21,63	23,40	24,18	23,81	24,31
		14,38	0,64	15,39	0,57	16,93	0,23	18,50	1,56	17,70	0,70	20,45	0,40	22,53	1,00	25,08	0,85	24,39	0,46
		15,28	4,29	14,88	3,85	17,20	2,50	16,30	8,94	16,37	3,39	20,30	1,92	21,79	4,63	24,07	3,50	24,72	1,91
60		16,61	16,29	14,57	13,66	16,63	16,51	14,97	14,64	15,60	15,09	16,87	16,38	20,76	20,25	21,08	21,44	26,12	26,81
		16,46	0,43	13,23	0,79	16,35	0,15	14,25	0,36	14,21	0,77	16,04	0,44	20,01	0,44	22,21	0,67	27,27	0,61
		15,80	2,65	13,18	5,79	16,56	0,88	14,70	2,48	15,47	5,09	16,23	2,66	19,98	2,17	21,02	3,12	27,04	2,26
120		13,63	13,31	11,43	10,92	13,08	13,23	14,09	13,77	13,20	13,68	13,78	13,52	20,12	19,75	18,43	17,98	23,54	24,61
		13,30	0,32	10,43	0,50	13,57	0,30	13,48	0,30	14,03	0,43	13,71	0,38	19,46	0,34	18,05	0,49	25,28	0,94
		13,00	2,37	10,90	4,57	13,04	2,23	13,75	2,20	13,82	3,14	13,09	2,80	19,68	1,71	17,46	2,71	25,01	3,81
240		9,84	9,55	7,33	7,45	11,59	11,32	10,70	11,11	8,66	8,99	9,65	9,13	13,09	13,78	10,16	10,47	18,14	17,44
		9,51	0,27	7,31	0,22	11,21	0,23	11,44	0,38	9,26	0,30	9,20	0,57	14,07	0,59	10,30	0,42	16,67	0,74
		9,30	2,83	7,70	2,95	11,17	2,04	11,19	3,39	9,05	3,37	8,53	6,21	14,17	4,32	10,94	3,97	17,53	4,24

Tabla 2. Influencia de las distintas variables en la inmovilización de β -glucosidasa en geles de poli(acrilamida).

		valor 1	Media	Actividad β -glucosidasa en geles de poli(acrilamida)											
		valor 2	s												
		valor 3	CV (%)												
[acrilamida]	[BIS]	[BIS]		[acrilamida]		Celobiososa añadida	[acril]= 20%		Enzima añadido	[acril]= 20%					
		0,8%	[BIS]	20%	añadida		[BIS]= 1,2%	[BIS]= 1,2%							
5%		15,02	14,70		n.d.	88,87		112,97	115,27		0,45	0,47			
		15,30	0,80	0,4%	88,45	0,60	0 mg	115,63	2,15	1 mg	0,39	0,09			
		13,80	5,44		89,30	0,67		117,22	1,86		0,57	20,14			
10%		39,84	39,81		104,62	107,36		120,51	120,29		13,21	12,64			
		38,98	0,81	0,8%	109,67	2,55	10 mg	123,15	2,98	2 mg	12,34	0,49			
		40,61	2,04		107,80	2,38		117,21	2,48		12,38	3,86			
15%		73,90	74,49		112,97	115,27		93,07	88,43		35,14	35,56			
		78,10	3,36	1,2%	115,63	2,15	20 mg	82,92	5,13	5 mg	35,87	0,38			
		71,46	4,51		117,22	1,86		89,30	5,80		35,68	1,06			
20%		92,49	94,17		109,58	111,91		82,17	81,67		74,66	79,16			
		94,05	1,75	1,6%	112,40	2,13	40 mg	82,97	1,62	10 mg	79,25	4,45			
		95,98	1,85		113,76	1,91		79,86	1,98		83,56	5,62			
25%		73,22	75,85		91,61	92,14					172,98	174,53			
		73,86	4,02	20,0%	89,38	3,05				50 mg	171,12	4,40			
		80,48	5,30		95,41	3,31					179,49	2,52			

Tabla 3. Efecto de la proporción humatos:enzima, temperatura y tiempo de tratamiento en la inmovilización de β -glucosidasa por asociación a humatos edáficos.

Tiempo (min)	valor 1 Media		Actividad β -glucosidasa									
	valor 2	s	A.H.		Inmov. 0,5:1		Inmov. 1:1		Inmov. 2:1		Inmov. 5:1	
	valor 3	CV(%)										
4°C												
0	20,11	20,06	n.d.	0,67	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	20,08	0,06	0,66	0,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	19,99	0,32	0,67	0,67	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
15	19,97	20,40	0,72	0,72	19,73	19,45	24,77	24,14	25,05	25,48	24,12	23,98
	20,99	0,53	0,71	0,00	19,20	0,26	24,23	0,67	25,34	0,52	23,25	0,68
	20,24	2,59	0,72	0,59	19,42	1,36	23,44	2,78	26,06	2,03	24,58	2,82
60	19,04	19,12	0,67	0,67	18,89	18,89	21,89	22,24	24,51	24,58	23,56	23,30
	20,07	0,91	0,68	0,01	19,31	0,43	21,96	0,55	25,37	0,76	22,86	0,38
	18,25	4,76	0,66	1,54	18,46	2,26	22,88	2,48	23,85	3,10	23,47	1,63
120	19,42	18,60	0,68	0,66	19,14	19,95	23,39	23,80	25,53	25,28	24,97	24,26
	18,19	0,71	0,66	0,02	19,89	0,85	24,51	0,61	24,60	0,59	25,06	1,31
	18,18	3,81	0,65	2,32	20,83	4,24	23,51	2,57	25,70	2,34	22,75	5,39
240	20,22	19,25	0,68	0,66	19,03	20,21	24,94	23,65	24,30	24,31	23,48	24,42
	18,39	0,92	0,65	0,02	21,30	1,13	22,92	1,12	24,44	0,12	23,68	1,45
	19,14	4,79	n.d.	2,77	20,29	5,61	23,10	4,72	24,20	0,51	26,09	5,93
30°C												
0	20,07	20,02	n.d.	0,67	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	20,04	0,06	0,67	0,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	19,95	0,32	0,67	0,67	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
15	18,22	18,78	0,72	0,71	19,78	20,03	23,48	23,68	25,75	26,48	24,82	24,14
	18,42	0,80	0,70	0,01	19,78	0,44	23,89	0,20	24,77	2,17	23,67	0,60
	19,69	4,25	0,70	1,87	20,54	2,19	23,68	0,85	28,92	8,20	23,95	2,48
60	17,55	18,52	0,70	0,69	21,55	21,63	25,03	25,18	27,13	27,05	26,13	26,16
	n.d.	1,37	0,69	0,01	21,81	0,15	24,61	0,66	27,02	0,07	26,16	0,02
	19,49	7,40	0,69	1,07	21,55	0,70	25,90	2,60	27,00	0,25	26,18	0,09
120	19,53	19,18	0,74	0,73	24,63	23,73	28,60	28,58	30,29	29,68	27,33	27,86
	18,78	0,37	0,72	0,01	22,91	0,86	29,37	0,80	28,18	1,31	27,50	0,78
	19,23	1,95	0,72	1,32	23,65	3,64	27,78	2,79	30,58	4,41	28,75	2,80
240	20,42	21,12	0,80	0,82	25,87	27,00	28,41	29,16	29,57	29,81	29,67	29,58
	21,43	0,61	0,83	0,02	28,35	1,26	29,37	0,66	30,10	0,27	29,73	0,20
	21,51	2,89	0,82	1,95	26,77	4,65	29,68	2,27	29,76	0,90	29,36	0,67
45°C												
0	19,77	19,72	0,88	0,74	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	19,65	0,06	0,66	0,12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	19,74	0,32	0,67	16,70	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
15	20,14	20,18	0,55	0,58	26,86	27,07	28,57	28,37	30,13	29,90	29,03	28,42
	19,88	0,32	0,61	0,03	26,94	0,29	28,81	0,58	29,67	0,33	28,19	0,54
	20,52	1,58	0,57	5,52	27,40	1,08	27,71	2,04	n.d.	1,10	28,02	1,90
60	25,80	25,97	0,59	0,60	31,87	33,21	39,09	37,53	41,62	40,16	34,44	37,56
	26,07	0,15	0,59	0,01	32,77	1,61	35,63	1,75	38,16	1,79	38,49	2,78
	26,03	0,57	0,61	1,39	35,00	4,85	37,87	4,67	40,70	4,46	39,76	7,39
120	29,50	28,38	0,56	0,64	33,98	34,69	36,74	37,75	43,38	43,73	38,56	38,08
	27,21	1,15	0,60	0,10	34,75	0,68	38,32	0,88	43,71	0,35	37,88	0,42
	28,43	4,05	0,75	15,69	35,34	1,97	38,21	2,34	44,08	0,80	37,80	1,10
240	28,72	27,96	0,55	0,56	36,18	36,65	41,80	42,01	43,66	43,78	39,17	38,72
	27,61	0,66	0,57	0,01	36,95	0,42	41,37	0,77	44,50	0,67	38,69	0,43
	27,54	2,35	0,56	2,27	36,83	1,14	42,86	1,82	43,17	1,54	38,32	1,10

Tabla 4. Efecto de la proporción humatos:enzima, temperatura y tiempo de tratamiento en la inmovilización de β -glucosidasa por asociación a humatos edáficos a través de glutaraldehído al 1%.

		valor 1		Media		valor 2		s		valor 3		CV(%)		Actividad β -glucosidasa											
Tiempo (min)		4°C				30°C				45°C				Inmov. 1:2		Inmov. 1:1		Inmov. 2:1		Inmov. 5:1					
		Inmov. 1:2	Inmov. 1:1	Inmov. 2:1	Inmov. 5:1	Inmov. 1:2	Inmov. 1:1	Inmov. 2:1	Inmov. 5:1	Inmov. 1:2	Inmov. 1:1	Inmov. 2:1	Inmov. 5:1	Inmov. 1:2	Inmov. 1:1	Inmov. 2:1	Inmov. 5:1								
15		11,76	11,71	13,90	14,96	14,11	14,60	16,32	15,94	12,23	11,72	15,39	15,58	15,14	14,86	15,42	15,28	18,52	18,45	23,48	23,65	20,17	20,45	22,54	22,18
		11,42	0,27	14,99	1,04	14,55	0,52	15,69	0,34	11,92	0,63	14,90	0,79	14,69	0,24	15,33	0,17	18,80	0,39	23,34	0,41	20,97	0,45	20,86	1,18
		11,95	2,28	15,98	6,95	15,14	3,56	15,81	2,11	11,02	5,36	16,45	5,08	14,76	1,64	15,08	1,14	18,03	2,13	24,12	1,75	20,23	2,19	23,14	5,32
60		12,37	11,51	15,17	15,38	14,46	14,25	15,73	15,51	14,97	14,58	18,72	18,13	17,96	17,84	18,48	17,40	26,41	26,73	34,88	32,72	26,30	27,75	27,20	27,65
		11,11	0,75	15,36	0,21	14,11	0,18	15,76	0,41	14,31	0,35	18,23	0,65	17,52	0,28	16,46	1,01	27,16	0,38	32,26	1,96	n.d.	2,04	27,36	0,64
		11,04	6,50	15,59	1,36	14,20	1,30	15,04	2,66	14,45	2,41	17,44	3,58	18,04	1,59	17,27	5,83	26,63	1,43	31,03	6,00	29,19	7,35	28,38	2,32
120		11,98	11,69	16,14	15,62	15,14	15,03	15,75	15,59	16,35	16,78	21,75	21,57	19,51	20,21	19,17	20,96	31,29	29,99	35,73	36,81	31,06	32,94	29,95	30,26
		11,32	0,34	15,83	0,65	14,37	0,61	15,98	0,49	17,62	0,73	20,66	0,83	19,87	0,91	21,86	1,55	29,00	1,18	39,04	1,94	30,67	3,60	30,35	0,28
		11,76	2,91	14,90	4,13	15,58	4,07	15,04	3,16	16,35	4,37	22,29	3,84	21,24	4,49	21,86	7,39	29,68	3,93	35,65	5,26	37,09	10,92	30,47	0,91
240		11,50	11,20	13,90	14,36	14,71	14,17	15,05	15,37	19,82	19,93	25,17	24,84	24,34	20,87	21,31	22,04	31,03	31,48	39,59	38,97	34,61	33,77	31,98	29,94
		11,01	0,26	14,91	0,51	13,80	0,48	15,45	0,28	19,65	0,34	24,18	0,57	23,72	5,47	22,07	0,71	32,75	1,12	38,39	0,60	34,86	1,68	33,14	4,57
		11,10	2,35	14,26	3,56	14,01	3,37	15,59	1,83	20,31	1,69	25,16	2,29	14,57	26,19	22,72	3,20	30,66	3,55	38,94	1,53	31,84	4,97	24,71	15,26

Tabla 5. Efecto de la proporción humatos:enzima, temperatura y tiempo de tratamiento en la inmovilización de β -glucosidasa por asociación a humatos edáficos a través de glutaraldehído al 2,5%.

		valor 1		Media		valor 2		s		valor 3		CV(%)		Actividad β -glucosidasa											
Tiempo (min)		4°C				30°C				45°C															
		Inmov. 1:2	Inmov. 1:1	Inmov. 2:1	Inmov. 5:1	Inmov. 1:2	Inmov. 1:1	Inmov. 2:1	Inmov. 5:1	Inmov. 1:2	Inmov. 1:1	Inmov. 2:1	Inmov. 5:1	Inmov. 1:2	Inmov. 1:1	Inmov. 2:1	Inmov. 5:1								
15		n.d.	21,00	23,02	22,32	20,93	20,91	n.d.	25,02	19,27	18,93	22,85	22,53	21,87	20,83	24,51	24,28	24,11	24,89	26,78	26,62	25,08	24,63	n.d.	27,28
		20,99	0,02	21,92	0,61	20,44	0,47	25,16	0,20	18,27	0,57	22,17	0,34	20,89	1,08	23,98	0,27	25,62	0,75	26,63	0,16	23,93	0,61	27,56	0,40
		21,02	0,10	22,03	2,72	21,37	2,22	24,88	0,79	19,25	3,00	22,57	1,52	19,72	5,18	24,37	1,12	24,92	3,03	26,46	0,61	24,88	2,49	27,00	1,46
60		20,58	19,96	24,16	25,33	21,28	20,95	26,24	25,12	23,37	21,64	25,30	24,72	19,00	21,11	24,66	25,20	25,95	25,49	27,30	27,80	27,61	26,36	27,71	29,61
		19,89	0,59	29,20	3,44	20,94	0,33	24,46	0,98	20,99	1,51	24,27	0,52	21,87	1,85	24,51	1,07	25,89	0,74	28,46	0,60	26,38	1,26	29,03	2,24
		19,41	2,97	22,61	13,60	20,63	1,55	24,65	3,90	20,57	6,99	24,60	2,11	22,46	8,76	26,43	4,24	24,63	2,92	27,65	2,14	25,08	4,79	32,09	7,57
120		20,66	21,17	25,34	25,35	21,48	21,34	25,50	25,33	25,05	23,59	26,64	25,91	24,54	23,95	27,06	27,63	24,96	25,40	29,11	28,13	24,89	23,70	28,63	27,99
		21,68	0,51	26,35	0,99	21,68	0,44	25,50	0,30	22,86	1,26	24,97	0,86	23,51	0,53	28,78	1,00	25,95	0,50	28,04	0,93	21,41	1,99	27,79	0,57
		21,16	2,42	24,37	3,91	20,85	2,05	24,99	1,17	22,86	5,35	26,12	3,30	23,79	2,21	27,03	3,63	25,31	1,98	27,25	3,32	24,80	8,39	27,54	2,03
240		19,84	20,28	21,81	22,63	20,15	21,16	25,00	24,14	23,50	23,19	25,53	25,53	23,42	23,28	26,69	26,53	23,30	24,22	27,31	28,33	24,55	25,08	28,49	29,50
		19,58	1,01	21,86	1,38	20,29	1,63	23,05	1,00	23,05	0,26	25,53	0,00	23,16	0,13	26,41	0,14	24,77	0,81	28,33	1,02	25,00	0,57	30,72	1,13
		21,44	4,96	24,23	6,11	23,05	7,72	24,37	4,13	23,03	1,14	25,53	0,00	23,27	0,57	26,49	0,54	24,60	3,33	29,34	3,58	25,68	2,27	29,30	3,83

Tabla 6. Efecto del tiempo de tratamiento en la inmovilización de β -glucosidasa por humatos edáficos (1/1) a través de glutaraldehído al 5% a 45°C.

Tiempo (min)	valor 1	media	Actividad β -glucosidasa
	valor 2	s	
	valor 3	CV(%)	
	Inmovilizado 1:1		
15	31,02		31,42
	31,84		0,41
	31,40		1,31
60	34,58		34,68
	35,48		0,75
	33,99		2,16
120	31,84		32,03
	33,02		0,90
	31,25		2,81
240	32,92		33,50
	33,98		0,53
	33,60		1,60

Tabla 7. Estabilidad térmica de β -glucosidasa libre e inmovilizada con humatos edáficos (1:1) a través de glutaraldehído al 1% (2h, 45°C).

Enzima	valor 1	Media	Actividad β -glucosidasa											
	valor 2	s	30°C		40°C		50°C		60°C		70°C		90°C	
	valor 3	CV(%)												
Libre	16,21	15,39	15,36	15,62	15,59	15,18	8,75	8,77	0,24	0,26	0,25	0,36		
	15,81	1,10	14,80	0,97	14,51	0,59	8,75	0,03	0,28	0,02	0,37	0,10		
	14,14	7,16	16,69	6,22	15,45	3,87	8,81	0,39	0,25	8,27	0,45	28,46		
H	0,96	0,99	1,00	0,89	0,83	0,86	0,58	0,62	0,30	0,32	0,12	0,14		
	1,01	0,04	0,78	0,11	0,88	0,03	0,65	0,05	0,34	0,02	0,13	0,02		
	n.d.	3,73	0,90	12,18	0,87	3,09	n.d.	8,05	0,32	7,23	0,16	15,72		
H + E + G	35,99	35,43	35,67	34,67	35,85	35,26	22,66	24,02	3,41	3,31	1,77	2,11		
	35,71	0,75	33,86	0,92	34,94	0,51	25,74	1,57	3,21	0,14	2,36	0,31		
	34,58	2,10	34,49	2,65	34,99	1,45	23,66	6,55	n.d.	4,27	2,22	14,59		

Tabla 8. Estabilidad operacional en medios edáficos suplementados

Enzima	valor 1		Media		Actividad β -glucosidasa en el suelo															
	valor 2	valor 3	s	CV(%)	0 días		1 día		3 días		7 días		10 días		16 días		20 días		30 días	
Control	217,66	221,82	201,54	187,65	266,45	248,01	221,72	231,53	245,58	250,48	214,30	206,16	182,85	199,48	139,57	132,14				
	233,99	10,71	173,85	13,85	248,39	18,64	242,83	10,63	262,72	10,67	189,51	14,42	n.d.	23,51	124,71	10,51				
	213,82	4,83	187,55	7,38	229,18	7,52	230,05	4,59	243,13	4,26	214,67	6,99	216,10	11,79	n.d.	7,95				
Libre	359,26	351,03	267,07	289,24	322,25	338,82	305,69	360,78	347,17	360,78	238,97	280,79	298,33	301,74	159,86	162,88				
	332,29	16,27	284,90	24,63	331,99	20,84	269,43	44,43	324,75	44,43	303,30	36,25	298,41	5,84	158,54	6,41				
	361,54	4,63	315,76	8,52	362,21	6,15	308,34	12,31	410,42	12,31	300,09	12,91	308,48	1,93	170,25	3,94				
AH+G	220,36	210,26	180,75	188,27	358,89	398,67	392,16	372,80	493,18	495,85	407,24	372,68	356,78	350,03	198,99	178,27				
	208,90	9,49	186,53	8,53	410,61	35,35	373,36	19,64	462,85	34,41	347,89	30,86	305,08	41,99	166,64	17,99				
	201,53	4,51	197,54	4,53	426,50	8,87	352,89	5,27	531,51	6,94	362,92	8,28	388,24	12,00	169,17	10,09				
AH+G+E	258,05	257,26	228,64	247,30	411,55	432,31	401,79	428,18	476,61	499,01	423,82	404,44	396,91	411,46	187,74	203,56				
	253,86	3,08	242,89	21,21	448,94	19,04	408,88	39,73	490,99	27,30	397,41	16,99	388,08	33,15	210,31	13,75				
	259,87	1,20	270,36	8,58	436,45	4,40	473,87	9,28	529,42	5,47	392,09	4,20	449,40	8,06	212,63	6,75				

Tabla 9. Estabilidad térmica del copolímero sintético β -glucosidasa-resorcinol.

Enzima	valor 1 Media		Actividad β -glucosidasa											
	valor 2 s	valor 3 CV(%)	30°C		40°C		50°C		60°C		70°C		90°C	
Libre	3,81	3,79	3,86	3,97	4,23	4,11	3,35	3,29	0,28	0,26	0,35	0,33		
	3,73	0,05	3,87	0,18	4,10	0,12	3,27	0,05	0,25	0,02	0,31	0,02		
	3,83	1,40	4,18	4,58	4,00	2,81	3,25	1,61	0,25	6,66	0,33	6,06		
Copolímero	1,15	1,22	1,33	1,28	1,36	1,32	0,99	1,06	0,08	0,08	0,12	0,11		
	1,22	0,06	1,33	0,09	1,30	0,03	1,13	0,10	0,07	0,02	0,10	0,01		
	1,28	5,20	1,17	7,18	1,30	2,54	n.d.	9,14	0,10	20,84	0,10	10,83		

Tabla 10. Actividad β -glucosidasa libre y del copolímero β -glucosidasa-resorcinol a distintas temperaturas y tiempos de incubación.

Enzima	valor 1 Media		Actividad β -glucosidasa																					
	valor 2 s	valor 3 CV(%)	55°C																					
			0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h														
Libre	6,51	6,88	4,01	5,04	4,13	4,32	3,61	3,51	3,54	3,15	2,75	2,76	2,98	2,88	2,30	2,50								
	7,15	0,33	5,82	0,93	4,47	0,17	3,44	0,09	3,12	0,38	2,37	0,40	2,74	0,12	2,36	0,30								
	6,97	4,80	5,28	18,45	4,37	4,04	3,47	2,59	2,78	12,10	3,17	14,48	2,92	4,34	2,85	12,05								
Copolímero	5,65	5,92	5,46	5,45	4,45	5,14	4,05	4,16	4,52	4,24	3,98	4,01	3,38	3,12	2,62	2,77								
	5,87	0,30	5,18	0,26	5,52	0,60	4,26	0,15	3,89	0,32	4,09	0,07	3,09	0,25	2,92	0,15								
	6,25	5,12	5,70	4,78	5,45	11,65	n.d.	3,57	4,31	7,57	3,95	1,84	2,88	8,06	2,77	5,42								
			60°C																					
			0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h														
Libre	7,49	6,76	6,60	6,55	4,40	4,70	3,22	3,27	2,33	2,38	1,65	1,76	1,06	1,04	1,04	1,01								
	6,38	0,63	6,50	0,07	4,95	0,28	3,54	0,24	2,44	0,06	1,85	0,10	1,02	0,02	0,84	0,16								
	6,41	9,35	n.d.	1,08	4,76	5,94	3,06	7,47	2,37	2,34	1,78	5,77	1,05	2,00	1,16	15,95								
Copolímero	5,74	6,11	4,47	4,48	3,74	3,60	n.d.	3,71	2,18	2,30	1,80	1,73	0,61	0,63	0,31	0,48								
	6,22	0,33	4,38	0,10	3,72	0,22	3,49	0,31	2,55	0,21	1,87	0,19	0,81	0,17	0,77	0,25								
	6,36	5,32	4,58	2,24	3,35	6,09	3,93	8,39	2,18	9,27	1,52	10,71	0,47	27,12	0,37	51,74								

Tabla 12. Cinética de Michaelis-Menten de β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato de calcio y de poliacrilamida.

Enzima	valor 1 Media		Actividad β -glucosidasa													
	valor 2 s	valor 3 CV(%)	0,5 M		1,0 M		2,0 M		5,0 M		8,0 M		10,0 M		15,0 M	
Libre	n.d.	21,19	41,42	42,10	72,51	72,84	113,71	112,62	120,22	120,21	132,22	136,79	133,52	134,00		
	22,01	1,16	43,03	0,83	73,59	0,65	112,69	1,13	113,74	6,47	137,49	4,26	132,37	1,92		
	20,37	5,47	41,85	1,98	72,42	0,89	111,45	1,00	126,67	5,38	140,65	3,11	136,12	1,43		
Inmov. alg.	12,04	11,88	20,62	21,15	42,63	42,49	67,53	64,60	77,35	75,62	82,10	80,37	73,47	74,61		
	11,52	0,32	21,30	0,47	41,59	0,84	59,22	4,66	76,74	2,49	78,75	1,68	75,75	1,61		
	12,09	2,66	21,52	2,22	43,26	1,98	67,04	7,22	72,76	3,30	80,26	2,09	n.d.	2,16		
Inmov. poliacril	10,15	10,30	18,25	17,66	33,44	32,37	57,00	55,49	61,19	62,64	65,98	65,71	45,96	46,78		
	9,96	0,43	18,01	0,82	30,41	1,70	57,18	2,77	64,42	1,64	65,12	0,51	47,23	0,71		
	10,79	4,22	16,72	4,66	33,26	5,25	52,29	5,00	62,32	2,62	66,04	0,78	47,15	1,52		

Tabla 13. Efecto del pH sobre la actividad β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato de calcio y de poliacri-amida.

Enzima	valor 1 Media		Actividad β -glucosidasa														
	valor 2 s	valor 3 CV(%)	pH 2,0		pH 3,0		pH 4,0		pH 5,0		pH 5,4		pH 6,0		pH 7,0		pH 8,0
Libre	n.d.	60,75	88,51	88,60	293,97	#####	250,82	250,23	118,58	121,51	61,35	61,79	16,74	18,69	3,66	3,74	
	60,82	0,11	95,17	6,53	#####	#####	250,17	0,56	127,69	5,35	60,54	1,52	20,00	1,72	3,60	0,20	
	60,67	0,17	82,12	7,37	294,84	167,97	249,71	0,22	118,27	4,40	63,49	2,47	19,34	9,22	3,97	5,30	
Inmov. alg.	54,16	51,41	62,55	68,19	140,14	138,19	102,15	103,68	71,92	72,45	32,86	34,81	6,18	6,07	1,16	1,22	
	48,66	2,75	70,61	4,90	138,44	2,08	99,76	4,87	71,65	1,16	34,85	1,94	6,13	0,14	1,21	0,07	
	51,42	5,35	71,41	7,19	136,00	1,51	109,13	4,70	73,78	1,60	36,73	5,56	5,91	2,37	1,29	5,37	
Inmov. poliacril	49,55	51,05	109,62	113,91	241,80	236,96	198,28	186,46	141,86	139,71	87,05	84,36	55,57	34,11	12,90	13,44	
	51,96	1,31	124,12	8,88	236,96	4,84	178,93	10,37	132,18	6,71	83,82	2,46	22,57	18,61	12,90	0,93	
	51,63	2,56	108,00	7,79	232,13	2,04	182,16	5,56	145,08	4,81	82,21	2,92	24,18	54,55	14,51	6,92	

Tabla 14. Influencia de la temperatura de incubación sobre la actividad β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato de calcio y de poli-acrilamida.

Enzima	valor 1 Media		Actividad β -glucosidasa											
	valor 2 s	valor 3 CV(%)	30°C		40°C		50°C		60°C		70°C		90°C	
Libre	98,49	91,37	168,05	171,16	244,81	248,03	356,31	344,32	204,94	215,45	76,01	77,43		
	87,27	6,19	172,11	2,76	251,63	3,43	350,73	16,17	223,79	9,61	75,24	3,14		
	88,35	6,77	173,32	1,61	247,66	1,38	325,93	4,70	217,62	4,46	81,03	4,06		
Inmov. alg	49,46	49,10	98,48	100,16	150,67	154,33	223,97	221,61	135,62	142,16	54,46	53,68		
	48,81	0,33	99,61	2,02	154,90	3,42	219,36	2,31	141,93	6,65	53,06	0,71		
	49,04	0,67	102,40	2,01	157,43	2,21	221,50	1,04	148,92	4,68	53,51	1,33		
Inmov. poliacril	55,06	55,63	85,20	86,29	233,63	220,80	232,18	212,94	154,18	161,56	115,39	125,30		
	56,70	0,93	88,77	2,15	214,93	11,12	211,12	18,40	164,04	6,50	129,19	8,64		
	55,13	1,67	84,90	2,50	213,84	5,04	195,51	8,64	166,46	4,03	131,31	6,90		

Tabla 15. Estabilidad térmica de β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato y de poli-acrilamida.

Enzima	valor 1 Media		Actividad β -glucosidasa											
	valor 2 s	valor 3 CV(%)	30°C		40°C		50°C		60°C		70°C		90°C	
Libre	141,05	141,31	144,99	231,64	149,82	143,42	145,30	142,09	0,00	0,00	0,00	0,00		
	142,97	1,55	412,10	156,32	143,44	6,42	141,27	2,89	0,00	0,00	0,00	0,00		
	139,90	1,10	137,83	67,49	136,99	4,47	139,69	2,04	0,00	0,00	0,00	0,00		
Inmov. alg	72,28	73,22	77,48	76,05	n.d.	82,17	81,71	81,82	0,00	0,00	0,00	0,00		
	71,52	2,31	73,14	2,52	81,59	0,82	81,53	0,36	0,00	0,00	0,00	0,00		
	75,85	3,16	77,54	3,32	82,75	1,00	82,23	0,44	0,00	0,00	0,00	0,00		
Inmov. poliacril	69,03	68,24	69,21	67,09	66,28	67,01	65,21	64,93	0,08	0,09	0,00	0,00		
	67,45	0,79	65,44	1,93	69,96	2,66	64,37	0,48	0,09	0,01	0,00	0,00		
	68,24	1,16	66,61	2,88	64,79	3,97	65,21	0,75	0,10	11,11	0,00	0,00		

Tabla 16. Actividad β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato de calcio y de poliacrilamida a 55, 60 y 65°C, a distintos intervalos de tiempo.

Enzima	valor 1 Media		Actividad β -glucosidasa															
	valor 2 s	valor 3 CV(%)																
	55°C																	
	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h										
Libre	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####	86,15	87,77
	#####	4,73	#####	2,29	#####	0,85	#####	5,69	#####	2,11	n.d.	6,31	#####	0,50	#####	88,67	1,41	
	#####	3,32	#####	1,56	#####	0,54	#####	3,77	#####	1,67	#####	5,42	#####	0,49	#####	88,49	1,60	
I. alg.	83,93	81,92	78,12	80,63	81,12	80,05	73,70	73,81	81,01	81,48	73,33	76,12	70,93	73,24	62,54	63,59		
	77,07	4,22	80,33	2,67	77,50	2,22	73,39	0,48	80,48	1,31	75,31	3,27	75,37	2,23	64,58	1,02		
	84,77	5,16	83,43	3,31	81,54	2,77	74,34	0,66	82,96	1,60	79,71	4,29	73,43	3,04	63,65	1,61		
I. poliacr.	67,16	67,07	63,80	65,38	60,29	58,36	n.d.	n.d.	57,88	54,43	51,96	51,75	52,94	52,40	54,50	53,37		
	64,38	2,64	66,21	1,37	59,44	2,65	n.d.	n.d.	55,02	3,77	51,38	0,32	52,81	0,83	50,86	2,18		
	69,66	3,94	66,14	2,10	55,34	4,54	n.d.	n.d.	50,40	6,93	51,90	0,62	51,44	1,59	54,76	4,09		
	60°C																	
	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h										
Libre	#####	#####	#####	#####	#####	#####	80,57	79,85	71,52	68,96	50,53	49,70	50,34	49,36				
	#####	11,60	#####	7,42	#####	1,63	#####	2,05	74,18	5,34	67,86	2,23	50,25	1,20	49,17	0,90		
	#####	8,15	#####	5,52	#####	1,21	#####	1,89	84,79	6,69	67,49	3,23	48,33	2,41	48,58	1,81		
I. ag.	86,23	84,10	93,25	94,93	88,66	88,70	77,95	78,79	77,52	77,33	n.d.	74,57	71,25	72,65	67,33	66,17		
	84,34	2,26	94,68	1,82	88,76	0,05	79,14	0,73	78,49	1,26	75,57	1,42	74,13	1,44	65,67	1,01		
	81,72	2,69	96,86	1,92	88,68	0,06	79,29	0,93	75,99	1,63	73,56	1,91	72,56	1,98	65,50	1,53		
I. poliacr.	61,84	60,79	48,61	52,57	37,18	37,76	24,60	23,01	17,40	16,12	11,16	11,62	n.d.	n.d.	4,01	5,74		
	59,62	1,12	54,90	3,45	37,50	0,74	21,57	1,52	16,37	1,43	10,57	1,33	n.d.	n.d.	7,15	1,60		
	60,92	1,83	54,20	6,56	38,59	1,96	22,87	6,61	14,58	8,85	13,12	11,49	n.d.	n.d.	6,07	27,78		
	65°C																	
	0,0 h	0,5 h	1,0 h	1,5 h	2,0 h	2,5 h	3,0 h											
Libre	#####	#####	#####	#####	n.d.	50,12	16,82	17,27	10,09	10,36	1,35	1,55						
	#####	4,95	#####	3,94	#####	2,06	51,80	2,38	18,84	1,40	11,30	0,84	2,02	0,41				
	#####	3,60	#####	2,73	99,56	2,03	48,43	4,75	16,14	8,13	9,69	8,09	1,29	26,09				
I. alg.	86,86	80,51	86,83	85,37	79,17	76,38	49,10	54,58	41,54	41,45	31,75	35,23	25,40	28,18				
	78,43	5,61	83,48	1,72	80,63	6,13	57,60	4,75	37,36	4,05	35,31	3,44	28,25	2,75				
	76,23	6,97	85,81	2,01	69,35	8,03	57,04	8,71	45,45	9,76	38,63	9,77	30,90	9,76				
	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h										
	62,83	63,94	37,50	40,11	n.d.	11,84	3,96	5,08	n.d.	n.d.	1,57	1,63	1,93	1,81	1,28	1,32		
I. poliacr.	61,45	3,19	43,67	3,19	11,61	0,33	7,33	1,95	n.d.	n.d.	1,38	0,28	2,12	0,38	1,42	0,09		
	67,53	4,99	39,16	7,96	12,07	2,75	3,96	38,28	n.d.	n.d.	1,93	17,17	1,38	21,23	1,26	6,60		

Tabla 17. Estabilidad de β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato de calcio y de poliacrilamida a la acción de pronasa de *S. griseus*.

Enzima	valor 1		Media		Actividad β -glucosidasa																																
	valor 2		s		0 h		1 h		3 h		6 h		8 h		24 h																						
	valor 3		CV(%)																																		
Libre	64,50	63,58	59,74	58,55	39,73	39,56	27,23	27,58	26,04	23,81	12,05	12,20	60,41	2,83	54,61	3,50	40,10	0,65	27,23	0,60	23,06	1,97	12,35	0,15	65,84	4,45	61,31	5,98	38,84	1,64	28,27	2,18	22,32	8,27	12,20	1,23	
	I. alg.	34,78	34,55	28,38	26,58	20,42	21,86	13,45	12,68	10,61	9,56	2,00	2,11	32,90	1,54	25,25	1,62	22,32	1,27	11,51	1,03	8,97	0,91	1,98	0,20	35,96	4,47	26,12	6,08	22,84	5,83	13,08	8,12	9,10	9,54	2,34	9,60
		I. poliacr.	32,17	33,04	26,28	25,59	20,39	25,69	20,97	20,54	22,87	22,30	21,87	21,09	33,43	0,75	25,72	0,76	28,40	4,59	20,22	0,39	22,20	0,52	20,69	0,67	33,51	2,28	24,78	2,96	28,29	17,88	20,42	1,89	21,84	2,34	20,72

Tabla 18. Estabilidad operacional de β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato de calcio y de poliacrilamida en medios edáficos.

Enzima	valor 1		Media		Actividad β -glucosidasa en el suelo																																												
	valor 2		s		0 días		1 día		3 días		7 días		10 días		16 días		20 días		30 días																														
	valor 3		CV(%)																																														
Control	217,66	221,82	201,54	187,65	266,45	248,01	221,72	231,53	245,58	250,48	214,30	206,16	182,85	199,48	139,57	132,14	233,99	10,71	173,85	13,85	248,39	18,64	242,83	10,63	262,72	10,67	189,51	14,42	n.d.	23,51	124,71	10,51	213,82	4,83	187,55	7,38	229,18	7,52	230,05	4,59	243,13	4,26	214,67	6,99	216,10	11,79	n.d.	7,95	
	Libre	359,26	351,03	267,07	289,24	322,25	338,82	305,69	360,78	347,17	360,78	238,97	280,79	298,33	301,74	159,86	162,88	332,29	16,27	284,90	24,63	331,99	20,84	269,43	44,43	324,75	44,43	303,30	36,25	298,41	5,84	158,54	6,41	361,54	4,63	315,76	8,52	362,21	6,15	308,34	12,31	410,42	12,31	300,09	12,91	308,48	1,93	170,25	3,94
		I. alg.	275,57	265,47	213,13	217,92	268,29	270,82	283,91	287,41	282,72	279,26	223,11	259,86	268,11	258,45	120,63	127,19	259,82	8,77	228,26	8,96	260,87	11,43	290,91	4,95	275,07	3,87	278,27	31,83	246,27	11,14	133,75	9,28	261,02	3,30	212,38	4,11	283,30	4,22	n.d.	1,72	279,99	1,39	278,20	12,25	260,98	4,31	n.d.
I. poliacr.			217,22	226,80	249,36	234,38	238,38	240,87	263,47	249,59	253,11	253,50	259,83	252,62	282,86	281,13	194,75	188,74	231,36	8,30	247,63	24,47	231,16	11,16	253,79	16,39	235,24	18,46	253,28	7,56	284,39	4,39	174,09	12,76	231,81	3,66	206,14	10,44	253,06	4,63	231,50	6,57	272,15	7,28	244,74	2,99	276,13	1,56	197,39

Tabla 19. Composición de paja de trigo sin tratar y sometida a diferentes tratamientos.

Paja	valor 1		Media		Composición (%)																																
	valor 2		s		Solubles H ₂ O		Solubles EtOH		Lignina		Hemicelulosa		Celulosa		Cenizas																						
	valor 3		CV(%)																																		
Sin tratar	12,50	12,47	2,29	2,39	7,60	7,54	47,23	46,96	23,68	24,01	6,70	6,63	12,46	0,03	2,40	0,10	7,52	0,05	46,85	0,24	24,18	0,29	6,59	0,06	12,45	0,21	2,48	3,99	7,50	0,70	46,80	0,50	24,17	1,19	6,60	0,92	
	Con H ₂ O ₂	19,65	19,80	1,03	1,00	7,56	8,00	15,63	15,40	52,57	52,00	3,56	3,80	15,69	4,19	0,96	0,04	8,23	0,38	15,23	0,21	55,96	4,27	3,93	0,21	24,06	21,15	1,01	3,61	8,21	4,76	15,34	1,34	47,47	8,22	3,91	5,48
		Con butilamina	13,80	13,60	1,60	1,50	16,40	16,00	19,40	19,10	44,59	45,58	4,21	4,22	13,60	0,20	1,40	0,14	15,60	0,57	18,80	0,42	46,57	1,40	4,36	0,11	13,40	1,47	n.d.	9,43	n.d.	3,54	n.d.	2,22	n.d.	3,07	n.d.
Con NaOH			11,60	11,90	0,40	0,40	5,80	5,80	9,20	9,60	70,02	69,18	2,98	3,19	12,20	0,42	0,40	0,00	5,80	0,00	10,00	0,57	68,34	1,19	3,26	0,19	n.d.	3,57	n.d.	0,00	n.d.	0,00	n.d.	5,89	n.d.	1,72	3,33

Tabla 20. Efecto de la temperatura sobre la hidrólisis enzimática de sustratos celulósicos comerciales.

		Valor 1	Valor 2	Media	Azúcares reductores							
		Valor 3	s	CV(%)	CMC							
Temp. (°C)	CMC											
	2 h	5 h		12 h		24 h		36 h		48 h		
30	18,96	24,96		28,14		34,65		24,96		24,96		
	18,69	18,77	24,03	24,85	29,32	29,15	33,57	34,20	24,03	41,58	24,03	24,85
	18,56	0,18	25,12	0,56	28,76	0,95	35,20	0,87	25,12	33,76	25,12	0,56
	18,87	0,96	25,29	2,27	30,38	3,26	33,38	2,54	92,21	81,19	25,29	2,27
40	n.d.	28,56		44,65		60,36		62,36		52,36		
	25,63	25,58	30,59	29,36	44,23	43,28	56,36	57,20	61,23	58,36	53,21	51,08
	26,35	0,80	29,31	0,88	43,01	1,53	55,23	2,21	57,63	4,56	51,23	2,51
	24,76	3,11	28,98	2,98	41,23	3,54	56,85	3,87	52,22	7,82	47,52	4,91
50	18,63	n.d.		32,69		58,69		63,25		65,96		
	19,65	19,72	n.d.	34,29	33,54	31,75	59,75	58,89	62,19	60,18	65,12	65,94
	20,39	0,79	36,23	2,74	31,25	1,76	57,24	1,22	59,63	3,38	67,53	1,13
	20,21	4,02	32,35	8,00	29,52	5,55	59,88	2,08	55,65	5,62	65,15	1,71
60	63,23	58,75		60,97		67,23		76,96		75,36		
	63,21	64,52	57,96	60,56	63,29	63,20	68,69	66,42	76,58	73,36	71,00	71,72
	66,54	1,61	61,26	2,85	65,29	1,77	64,12	1,98	72,15	4,33	69,57	2,52
	65,10	2,50	64,27	4,70	63,25	2,79	65,64	2,97	67,75	5,90	70,95	3,51
CMN-300												
	2 h	5 h		12 h		24 h		36 h		48 h		
30	11,56	11,53		10,96		13,65		17,56		19,63		
	n.d.	10,54	11,69	11,82	10,69	11,10	14,63	13,36	16,49	17,02	18,75	18,95
	10,23	0,91	12,31	0,34	11,98	0,60	12,36	1,00	17,56	0,62	17,69	0,95
	9,83	8,59	11,75	2,87	10,77	5,38	12,80	7,50	16,47	3,66	19,73	5,00
40	4,36	8,20		13,59		14,69		17,86		21,85		
	5,03	4,78	8,63	8,12	14,05	13,58	14,36	14,56	17,25	17,78	22,36	22,40
	5,00	0,31	7,59	0,43	13,21	0,35	13,25	1,11	17,96	0,36	22,69	0,40
	4,73	6,50	8,06	5,28	13,47	2,59	15,94	7,60	18,05	2,03	22,70	1,78
50	7,69	6,56		9,08		11,36		11,96		11,95		
	7,04	7,48	7,34	6,96	8,95	9,12	12,08	11,48	11,54	11,72	11,63	11,84
	6,95	0,60	6,95	0,32	9,35	0,17	11,69	0,55	10,95	0,63	11,25	0,54
	8,24	8,08	6,99	4,58	9,10	1,83	10,79	4,76	12,43	5,37	12,53	4,58
60	9,26	8,06		7,62		8,21		9,76		9,63		
	9,35	9,14	8,26	8,06	7,69	7,44	8,34	8,37	9,21	9,01	9,52	9,63
	8,86	0,22	8,21	0,25	7,21	0,25	8,69	0,22	8,56	0,59	9,21	0,40
	9,09	2,36	7,71	3,08	7,24	3,36	8,24	2,63	8,51	6,58	10,16	4,11
C ₆₄₁₃												
	2 h	5 h		12 h		24 h		36 h		48 h		
30	2,63	10,36		10,39		10,65		14,23		17,36		
	2,86	2,84	10,56	10,60	11,23	10,97	10,11	10,32	14,69	14,10	17,95	17,57
	2,78	0,19	10,97	0,26	10,58	0,59	10,42	0,27	13,98	0,50	16,86	0,57
	3,09	6,76	10,51	2,46	11,68	5,42	10,10	2,57	13,50	3,52	18,11	3,26
40	4,65	7,16		11,96		15,69		21,36		22,63		
	5,03	4,82	n.d.	7,14	11,23	11,88	15,23	15,70	20,67	20,98	21,54	21,92
	4,98	0,21	7,15	0,03	11,56	0,66	15,78	0,36	21,36	0,44	22,05	0,54
	4,62	4,46	7,11	0,37	12,77	5,59	16,10	2,29	20,53	2,11	21,46	2,47
50	12,89	15,54		15,23		30,29		31,58		36,00		
	12,54	12,20	15,23	15,64	14,95	15,00	30,56	30,28	30,26	30,80	37,59	37,20
	11,97	0,65	15,64	0,38	15,19	0,28	29,67	0,43	31,02	0,62	37,22	0,86
	11,40	5,36	16,15	2,44	14,63	1,84	30,60	1,42	30,34	2,02	37,99	2,31
60	14,23	13,69		16,98		17,05		18,69		19,00		
	14,63	14,52	13,25	13,72	17,53	17,60	16,98	17,33	18,99	18,68	18,63	19,43
	14,50	0,21	14,06	0,35	17,94	0,46	17,63	0,37	17,83	0,61	19,65	0,79
	14,72	1,47	13,88	2,54	17,95	2,60	17,66	2,11	19,21	3,24	20,44	4,09

Tabla 21. Efecto de la temperatura sobre la hidrólisis enzimática de paja de trigo sin tratar y tratada con NaOH y H₂O₂.

Temp. (°C)	Valor 1 Valor 2 Valor 3 Valor 4		Media s		CV(%)		Azúcares reductores					
	Paja sin tratar											
	2 h		5 h		12 h		24 h		36 h		48 h	
30	0,05		3,26		6,75		15,96		19,83		14,40	
	0,06	0,06	3,12	3,27	6,63	6,74	15,36	15,71	19,63	19,82	14,23	14,40
	0,05	0,01	3,33	0,11	6,79	0,08	14,65	0,94	20,31	0,35	14,25	0,23
	0,08	23,57	3,37	3,36	6,79	1,12	16,87	5,99	19,51	1,78	14,72	1,57
40	2,56		5,62		15,69		24,98		n.d.	n.d.	38,21	
	2,45	2,48	5,21	5,30	15,21	15,53	24,87	24,60	n.d.	n.d.	37,56	37,82
	2,36	0,09	5,24	0,22	15,37	0,29	23,89	0,49	n.d.	n.d.	37,89	0,30
	2,55	3,80	5,13	4,12	15,85	1,88	24,66	2,00	n.d.	n.d.	37,62	0,79
50	4,69		8,06		16,17		27,56		30,08		42,51	
	4,21	4,39	8,25	8,19	16,03	16,04	27,18	27,06	31,26	30,03	42,68	42,96
	4,56	0,28	7,96	0,23	15,98	0,09	26,96	0,43	29,56	0,89	43,26	0,43
	4,10	6,38	8,49	2,85	15,98	0,56	26,54	1,57	29,22	2,97	43,39	1,00
60	6,89		7,56		11,59		19,65		10,26		12,96	
	6,21	6,65	7,21	7,17	11,42	11,38	19,45	19,32	11,25	10,95	12,86	12,71
	6,54	0,35	7,08	0,30	11,25	0,16	18,57	0,51	11,07	0,47	11,03	1,23
	6,96	5,20	6,83	4,24	11,26	1,41	19,61	2,63	11,22	4,26	13,99	9,68
	Paja tratada con NaOH											
	2 h		5 h		12 h		24 h		36 h		48 h	
30	19,25		37,56		70,36		107,26		113,25		112,26	
	19,68	19,14	36,85	37,06	71,54	70,89	106,54	107,21	113,26	112,27	112,56	110,12
	18,00	0,78	37,25	0,43	70,28	0,66	108,23	0,74	111,23	1,14	111,06	3,74
	19,63	4,10	36,58	1,17	71,38	0,93	106,81	0,69	111,34	1,01	104,60	3,39
40	31,56		50,59		93,26		140,04		n.d.	n.d.	145,00	
	31,98	32,18	50,23	50,86	93,98	93,04	142,36	140,04	n.d.	n.d.	146,36	154,08
	32,56	0,50	n.d.	0,80	92,01	0,82	139,58	1,74	n.d.	n.d.	161,23	9,77
	32,62	1,57	51,76	1,57	92,91	0,88	138,18	1,24	n.d.	n.d.	163,73	6,34
50	36,85		55,78		103,25		143,56		165,96		210,36	
	36,24	35,83	55,69	55,94	106,25	101,46	146,23	143,14	168,23	164,32	205,36	201,30
	35,16	0,86	54,23	1,58	100,54	4,44	140,23	2,49	163,57	3,72	199,26	8,67
	35,07	2,41	58,06	2,83	95,80	4,37	142,54	1,74	159,52	2,27	190,22	4,31
60	45,23		85,23		82,36		99,65		135,64		153,23	
	44,36	42,70	85,36	83,50	84,53	86,11	95,24	97,89	134,25	130,66	155,24	151,00
	41,26	2,50	81,23	2,11	88,36	3,22	98,65	1,89	129,54	5,61	149,26	4,01
	39,95	5,86	82,18	2,53	89,19	3,74	98,02	1,93	123,21	4,29	146,27	2,66
	Paja tratada con H ₂ O ₂											
	2 h		5 h		12 h		24 h		36 h		48 h	
30	15,23		29,63		65,03		101,23		126,35		115,26	
	14,65	15,59	28,54	29,83	66,25	64,00	99,51	96,48	124,27	124,88	111,25	113,76
	15,36	1,07	30,26	1,00	63,21	2,08	95,63	5,18	125,41	1,26	111,26	3,01
	17,12	6,84	30,89	3,36	61,51	3,25	89,55	5,37	123,49	1,01	117,27	2,64
40	9,58		25,65		55,21		93,56		n.d.	n.d.	191,23	
	9,65	9,67	24,65	25,57	56,24	54,14	92,14	92,71	n.d.	n.d.	190,25	187,72
	9,65	0,09	25,61	0,71	53,62	2,07	91,57	1,01	n.d.	n.d.	186,54	3,82
	9,80	0,96	26,37	2,76	51,49	3,82	93,57	1,09	n.d.	n.d.	182,86	2,03
50	21,56		41,24		83,54		106,00		125,23		167,26	
	22,47	19,99	40,23	40,07	81,69	81,14	105,24	104,46	123,36	124,59	169,58	162,22
	18,97	2,51	39,57	0,88	80,23	1,92	103,26	1,38	121,36	3,00	160,23	8,00
	16,96	12,54	39,24	2,20	79,10	2,37	103,34	1,32	128,41	2,41	151,81	4,93
60	33,36		43,26		75,69		96,54		108,23		142,63	
	31,26	32,36	42,15	43,03	74,36	71,26	95,84	95,63	110,25	108,54	135,87	140,64
	32,59	0,87	41,69	1,48	70,54	5,04	96,23	1,18	107,54	1,18	140,36	3,47
	32,23	2,69	45,02	3,44	64,45	7,07	93,91	1,24	108,14	1,09	143,70	2,47

Tabla 22. Efecto del pH sobre la hidrólisis enzimática de sustratos celulósicos comerciales.

		Valor 1	Valor 2	Media	Azúcares reductores							
		Valor 3	Valor 4	s	CV(%)							
pH	CMC											
	2 h		5 h		12 h		24 h		36 h		48 h	
4,0	66,53		62,00		69,58		72,36		70,23		72,53	
	67,89	67,04	62,53	62,24	70,23	68,48	74,56	72,74	72,53	70,76	71,64	70,33
	65,23	1,46	63,26	0,88	67,56	1,72	71,23	1,38	71,26	1,49	70,69	2,69
4,5	68,51	2,18	61,17	1,42	66,55	2,51	72,81	1,90	69,02	2,11	66,46	3,82
	54,23		52,31		65,23		65,87		65,98		65,23	
	56,00	54,04	54,21	52,32	64,28	63,36	65,00	68,11	67,35	65,00	65,32	64,68
5,0	55,21	2,33	53,14	1,96	61,97	1,66	69,25	3,35	64,35	2,17	63,21	0,99
	50,72	4,31	49,62	3,75	61,96	2,61	72,32	4,92	62,32	3,33	64,96	1,53
	36,54		49,65		55,69		58,69		62,44		60,54	
5,5	35,21	35,50	50,21	48,24	54,23	56,06	54,36	57,85	61,58	61,44	59,68	59,87
	34,69	0,78	47,67	2,17	57,68	1,47	59,87	2,41	61,78	1,05	61,47	1,57
	35,56	2,20	45,43	4,49	56,64	2,61	58,48	4,16	59,96	1,71	57,79	2,62
6,0	34,21		50,29		51,63		45,23		51,39		55,85	
	35,69	34,20	51,68	50,28	50,21	50,50	46,00	46,40	52,63	50,44	54,63	53,96
	35,24	1,80	48,97	1,11	48,96	1,19	48,00	1,23	50,42	2,27	52,91	1,57
6,0	31,66	5,27	50,18	2,20	51,20	2,35	47,21	2,66	47,32	4,50	52,45	2,91
	4,29		25,98		28,36		35,67		39,21		37,69	
	4,25	4,24	24,56	24,88	29,54	29,20	35,04	34,40	40,00	38,16	36,21	36,88
6,0	4,46	0,21	24,13	0,79	30,64	1,12	33,98	1,21	37,38	1,78	35,88	0,97
	3,96	4,90	24,85	3,18	28,26	3,84	32,91	3,53	36,05	4,68	37,74	2,64
	CMN-300											
	2 h		5 h		12 h		24 h		36 h		48 h	
	11,52		9,69		10,63		11,69		12,31		12,46	
4,0	10,63	10,64	10,23	10,16	10,53	10,70	10,87	11,15	13,26	12,78	13,24	12,40
	10,23	0,62	10,54	0,35	10,70	0,17	11,23	0,40	12,98	0,42	12,54	0,78
	10,18	5,83	10,18	3,46	10,94	1,63	10,81	3,63	12,57	3,31	11,36	6,26
4,5	13,56		13,05		13,38		15,94		15,63		17,33	
	14,21	13,40	12,96	12,59	14,21	13,68	16,96	16,20	16,52	16,51	16,96	17,02
	13,21	0,66	12,05	0,49	13,06	0,55	16,54	0,70	16,95	0,62	17,06	0,41
5,0	12,62	4,96	12,30	3,90	14,07	4,02	15,36	4,32	16,94	3,75	16,53	2,41
	12,69		11,71		12,95		14,05		15,23		16,25	
	11,89	12,26	11,23	11,61	11,87	12,78	14,69	14,04	15,69	15,68	16,98	16,50
5,5	12,16	0,33	11,36	0,41	12,56	0,78	14,23	0,63	15,24	0,62	15,36	0,90
	12,30	2,72	12,14	3,51	13,74	6,11	13,19	4,47	16,56	3,98	17,41	5,44
	7,69		8,53		9,52		12,96		14,53		10,56	
6,0	7,85	7,86	8,52	8,68	9,63	9,42	13,65	13,50	13,26	13,95	10,23	10,69
	7,96	0,12	8,64	0,24	8,97	0,30	13,26	0,51	14,21	0,55	11,35	0,47
	7,94	1,57	9,03	2,76	9,56	3,22	14,13	3,75	13,80	3,93	10,62	4,42
6,0	2,21		1,20		1,11		5,96		11,62		12,36	
	2,31	2,24	1,26	1,27	1,13	1,10	5,87	5,90	11,36	11,41	13,05	12,33
	2,25	0,05	1,25	0,07	1,15	0,06	5,67	0,18	11,59	0,25	12,34	0,60
6,0	2,19	2,36	1,37	5,64	1,01	5,65	6,10	3,05	11,07	2,23	11,57	4,90
	C ₆₄₁₃											
		2 h		5 h		12 h		24 h		36 h		48 h
3,57			3,87		8,53		7,69		13,24		13,96	
4,0	3,65	3,67	3,65	3,87	8,42	8,43	7,92	7,80	12,68	12,52	13,65	13,93
	3,62	0,12	3,97	0,16	8,62	0,20	7,65	0,15	12,65	0,73	14,52	0,43
	3,84	3,22	3,99	4,03	8,15	2,42	7,94	1,94	11,51	5,80	13,59	3,05
4,5	3,42		5,25		10,63		10,69		13,69		14,25	
	3,51	3,46	5,53	5,51	10,32	10,21	10,35	10,37	13,54	13,35	14,36	14,74
	3,46	0,04	5,42	0,25	10,03	0,34	10,45	0,29	13,25	0,34	15,24	0,51
5,0	3,45	1,08	5,84	4,51	9,86	3,31	9,99	2,80	12,92	2,55	15,11	3,44
	2,21		2,87		7,15		10,53		13,65		15,36	
	2,23	2,23	2,95	2,97	7,15	7,18	10,26	10,46	12,65	12,96	14,65	14,94
5,5	2,21	0,03	2,96	0,10	7,26	0,05	10,96	0,38	12,54	0,50	14,98	0,31
	2,27	1,27	3,10	3,22	7,16	0,75	10,09	3,63	13,00	3,86	14,77	2,08
	1,52		3,61		4,23		9,72		13,56		14,23	
6,0	1,43	1,55	3,59	3,60	4,32	4,22	10,23	9,71	13,24	13,08	13,62	13,70
	1,56	0,11	3,62	0,02	4,21	0,08	9,65	0,41	12,96	0,42	13,54	0,36
	1,69	6,97	3,58	0,51	4,12	1,94	9,24	4,18	12,56	3,25	13,41	2,66
6,0	4,23		4,21		4,35		6,56		7,40		8,35	
	3,89	3,99	3,96	3,95	4,21	4,29	6,68	6,60	7,45	7,30	8,24	8,30
	3,97	0,17	3,87	0,19	4,32	0,06	6,54	0,06	7,26	0,16	8,34	0,05
6,0	3,87	4,15	3,76	4,85	4,28	1,41	6,62	0,96	7,09	2,21	8,27	0,65

Tabla 23. Efecto del pH sobre la hidrólisis enzimática de paja de trigo sin tratar y tratada con NaOH y H₂O₂.

pH	Valor 1		Media		Azúcares reductores											
	Valor 2	Valor 3	Valor 4	CV(%)												
Paja sin tratar																
	2 h		5 h		12 h		24 h		36 h		48 h					
4,0	3,75		7,36		18,24		23,54		33,26		35,98					
	3,69	3,70	7,42	7,38	18,52	18,00	23,54	23,31	32,54	32,14	36,24	36,70				
	3,54	0,12	7,56	0,16	17,24	0,55	22,96	0,28	31,25	0,93	35,68	1,48				
	3,82	3,22	7,18	2,13	18,00	3,05	23,20	1,21	31,51	2,90	38,90	4,04				
4,5	2,14		8,36		17,54		29,00		35,21		29,52					
	2,16	2,15	8,25	8,30	17,26	17,21	28,12	28,16	34,65	34,67	29,32	30,04				
	2,14	0,01	8,45	0,13	17,35	0,37	27,45	0,64	33,97	0,52	31,26	0,87				
	2,16	0,54	8,14	1,62	16,69	2,13	28,07	2,26	34,85	1,50	30,06	2,90				
5,0	1,29		8,52		14,36		27,65		40,21		46,52					
	1,28	1,30	8,62	8,71	14,98	14,68	26,35	26,75	39,65	39,40	45,23	47,50				
	1,32	0,02	8,75	0,18	14,25	0,44	25,21	1,21	40,32	1,35	46,23	3,06				
	1,31	1,40	8,95	2,12	15,13	2,99	27,79	4,54	37,42	3,43	52,02	6,45				
5,5	0,22		3,85		13,63		22,98		30,25		35,63					
	0,21	0,22	4,10	3,95	13,25	13,29	23,01	22,16	30,69	30,36	35,21	34,30				
	0,20	0,02	3,95	0,11	12,95	0,28	22,03	1,12	31,25	0,85	34,02	1,47				
	0,25	9,82	3,90	2,73	13,33	2,10	20,62	5,07	29,25	2,79	32,34	4,30				
6,0	2,03		6,52		11,23		18,62		21,36		28,21					
	2,04	2,05	6,43	6,44	10,85	10,87	17,52	17,61	22,69	21,54	29,63	28,68				
	2,05	0,02	6,53	0,12	10,69	0,25	17,23	0,70	21,51	0,86	29,21	0,90				
	2,08	1,05	6,28	1,80	10,71	2,30	17,07	3,97	20,60	4,01	27,67	3,13				
Paja tratada con NaOH																
	2 h		5 h		12 h		24 h		36 h		48 h					
4,0	53,26		51,23		98,25		133,25		n.d.	n.d.	173,26					
	54,26	54,00	49,63	49,52	98,26	96,56	131,26	131,04	n.d.	n.d.	172,54	171,26				
	54,36	0,50	49,21	1,33	95,36	2,00	129,25	1,69	n.d.	n.d.	170,69	2,11				
	54,12	0,93	48,01	2,69	94,37	2,07	130,40	1,29	n.d.	n.d.	168,55	1,23				
4,5	45,02		70,21		120,36		170,62		n.d.	n.d.	220,54					
	44,63	44,08	69,23	68,24	116,52	117,28	165,23	168,56	n.d.	n.d.	219,87	216,60				
	45,68	2,11	68,52	2,27	117,25	2,26	166,95	2,96	n.d.	n.d.	215,23	4,55				
	40,99	4,78	65,00	3,32	114,99	1,93	171,44	1,75	n.d.	n.d.	210,76	2,10				
5,0	42,62		66,52		118,26		180,26		n.d.	n.d.	173,84					
	41,53	41,60	n.d.	64,40	115,24	116,10	175,23	172,72	n.d.	n.d.	172,54	175,26				
	41,98	0,99	65,23	2,63	115,69	1,46	170,23	6,49	n.d.	n.d.	178,25	2,56				
	40,27	2,39	61,45	4,09	115,21	1,25	165,16	3,76	n.d.	n.d.	176,41	1,46				
5,5	51,23		32,65		94,65		132,65		n.d.	n.d.	178,65					
	50,62	50,93	31,23	31,18	94,71	93,63	130,28	129,16	n.d.	n.d.	176,25	175,26				
	50,97	0,25	30,25	1,06	92,56	1,21	128,64	3,19	n.d.	n.d.	174,20	2,86				
	50,90	0,49	30,59	3,40	92,60	1,30	125,07	2,47	n.d.	n.d.	171,94	1,63				
6,0	n.d.		46,25		62,59		98,36		n.d.	n.d.	105,36					
	n.d.	34,18	45,26	45,72	59,28	60,59	95,26	95,36	n.d.	n.d.	106,24	105,02				
	34,25	0,10	46,03	0,49	61,23	1,62	95,41	2,43	n.d.	n.d.	104,86	1,09				
	34,11	0,29	45,34	1,08	59,26	2,68	92,41	2,55	n.d.	n.d.	103,62	1,04				
Paja tratada con H₂O₂																
	2 h		5 h		12 h		24 h		36 h		48 h					
4,0	23,98		32,56		77,52		108,69		140,25		170,54					
	24,16	24,17	31,26	32,83	74,00	76,56	107,52	106,66	138,52	137,84	169,52	167,25				
	23,54	0,61	33,98	1,20	75,23	2,44	104,23	1,91	136,54	1,93	166,29	3,56				
	25,00	2,53	33,52	3,66	79,49	3,18	106,20	1,79	136,05	1,40	162,65	2,13				
4,5	13,62		28,65		80,21		121,54		151,42		172,54					
	12,58	12,94	29,34	29,12	80,54	79,12	117,00	117,77	150,24	149,57	171,86	173,84				
	13,54	0,77	29,61	0,43	78,65	1,59	115,36	2,64	148,78	1,58	174,08	2,23				
	12,02	5,98	28,88	1,49	77,08	2,01	117,18	2,24	147,84	1,06	176,88	1,28				
5,0	17,52		34,26		74,62		113,57		145,26		190,26					
	16,84	16,82	34,15	34,20	73,25	73,48	112,65	112,88	144,69	144,00	185,00	185,84				
	15,32	1,06	34,15	0,06	71,54	1,43	111,63	0,95	142,57	1,21	193,52	4,42				
	17,60	6,28	34,24	0,17	74,51	1,95	113,67	0,84	143,48	0,84	184,23	2,38				
5,5	8,69		27,21		60,60		97,56		115,69		157,60					
	8,25	8,28	27,54	27,37	58,67	59,16	96,52	95,24	114,26	112,72	158,00	156,90				
	8,34	0,35	26,52	2,09	60,54	1,79	96,03	3,00	111,58	2,82	153,42	2,35				
	7,84	4,22	23,00	7,63	56,83	3,03	90,85	3,15	109,35	2,50	158,58	1,50				
6,0	12,65		20,54		51,23		81,54		101,52		82,96					
	11,94	12,10	21,52	20,60	50,69	49,88	83,24	83,04	99,68	96,16	82,56	81,99				
	12,65	0,71	19,54	0,82	47,63	1,59	85,50	1,80	95,73	6,13	82,15	1,18				
	11,16	5,87	20,80	3,98	49,97	3,18	81,88	2,16	87,71	6,37	80,29	1,44				

Tabla 24. Efecto de la proporción CMCasa : β -glucosidasa sobre la producción de azúcares reductores en la hidrólisis de celulosas comerciales.

CMC	Valor 1		Valor 2		Media		Valor 3		s		Valor 4		CV(%)	
	Azúcares reductores													
CMC	CMC													
	2 h		5 h		12 h		24 h		36 h		48 h			
1:0	21,56		31,25		51,69		51,23		56,23		60,23			
	22,96	21,52	30,69	31,82	n.d.	50,29	52,69	50,45	55,42	57,24	61,53	60,00		
	20,36	1,08	32,56	1,01	50,62	1,59	50,03	1,36	57,69	1,33	60,03	1,37		
	21,20	5,04	32,78	3,18	48,56	3,16	49,68	2,70	58,32	2,32	58,21	2,28		
1:1	n.d.		40,36		44,69		60,23		54,63		68,52			
	29,87	30,76	42,38	42,11	45,69	47,49	59,62	59,36	55,63	58,69	69,23	67,60		
	28,96	1,15	41,74	1,49	48,69	2,83	58,23	0,84	61,23	4,21	67,52	1,25		
	31,25	3,75	43,96	3,55	50,89	5,97	59,36	1,41	63,27	7,18	66,36	1,85		
1:2	35,26		49,52		60,23		74,56		58,69		70,54			
	36,41	36,44	50,21	50,90	59,84	60,68	73,52	73,72	57,23	60,49	71,00	70,68		
	37,85	1,07	51,23	1,36	62,35	1,13	70,02	2,82	65,23	3,49	69,52	0,90		
	36,24	2,93	52,64	2,66	60,30	1,86	76,78	3,82	60,81	5,76	71,66	1,27		
2:1	45,93		47,23		59,63		87,53		95,21		86,25			
	43,25	44,85	46,93	48,00	59,52	60,81	86,12	85,95	94,23	89,93	85,62	85,70		
	45,87	1,29	48,65	1,09	62,36	1,45	84,21	1,36	88,26	6,10	84,36	0,98		
	44,35	2,88	49,19	2,27	61,73	2,38	85,94	1,58	82,02	6,79	86,57	1,14		
4:1	46,23		62,01		67,58		100,58		106,23		110,23			
	45,98	46,30	61,54	63,00	66,53	68,24	104,69	100,50	107,45	105,70	109,56	107,20		
	47,86	1,14	64,25	1,43	67,52	2,12	98,65	2,99	105,21	1,50	107,24	3,84		
	45,13	2,47	64,20	2,27	71,33	3,10	98,08	2,98	103,91	1,42	101,77	3,58		
	CMN-300													
	2 h		5 h		12 h		24 h		36 h		48 h			
1:0	5,98		4,25		5,24		6,59		7,69		6,52			
	5,63	6,09	3,95	4,12	5,42	5,52	6,45	6,78	7,51	7,64	6,98	6,70		
	6,02	0,46	4,15	0,12	5,98	0,32	6,95	0,31	7,71	0,09	6,32	0,33		
	6,73	7,57	4,13	3,03	5,44	5,79	7,13	4,64	7,65	1,18	6,98	4,98		
1:1	4,62		6,52		5,96		7,21		7,62		8,12			
	4,53	4,76	6,81	6,74	5,96	5,87	7,63	7,44	7,54	7,66	7,96	8,12		
	4,86	0,23	6,53	0,28	5,65	0,15	7,54	0,18	7,85	0,13	8,54	0,30		
	5,03	4,78	7,10	4,08	5,91	2,53	7,38	2,49	7,63	1,74	7,86	3,69		
1:2	4,21		5,64		5,24		5,79		6,57		8,63			
	4,06	4,15	5,74	5,66	5,31	5,38	5,63	5,86	6,56	6,27	8,59	8,73		
	4,11	0,08	5,36	0,23	5,48	0,12	n.d.	0,27	5,94	0,34	8,98	0,18		
	4,22	1,88	5,90	4,01	5,49	2,32	6,16	4,64	6,01	5,45	8,72	2,01		
2:1	6,52		7,24		9,23		9,56		11,59		12,95			
	6,21	6,43	7,23	6,92	9,25	9,16	9,65	9,96	11,69	11,74	13,21	13,37		
	6,59	0,17	6,52	0,37	8,67	0,35	10,25	0,41	11,87	0,12	13,65	0,35		
	6,40	2,59	6,69	5,35	9,49	3,79	10,38	4,17	11,81	1,06	13,67	2,63		
4:1	25,09		18,87		17,25		14,52		8,95		8,02			
	24,81	24,08	19,25	19,41	17,35	17,20	14,02	13,90	8,76	8,74	8,03	7,74		
	22,36	1,23	19,54	0,47	18,26	0,96	13,65	0,48	8,52	0,18	7,25	0,37		
	24,06	5,09	19,98	2,41	15,94	5,55	13,41	3,48	8,73	2,01	7,66	4,77		
	C ₆₄₁₃													
	2 h		5 h		12 h		24 h		36 h		48 h			
1:0	2,05		4,65		6,25		8,23		12,43		12,54			
	2,06	2,02	4,75	4,52	6,48	6,18	8,09	8,34	12,51	11,95	12,63	12,35		
	1,98	0,04	4,23	0,23	5,93	0,24	8,56	0,22	11,34	0,61	12,05	0,28		
	1,99	2,02	4,45	5,09	6,06	3,87	8,48	2,61	11,52	5,07	12,18	2,26		
1:1	2,47		n.d.		8,10		11,69		16,09		19,84			
	2,53	2,45	4,65	4,54	8,06	7,90	11,85	11,35	16,00	16,35	19,63	18,86		
	2,39	0,06	4,36	0,16	7,52	0,26	11,00	0,49	17,11	0,51	18,23	1,03		
	2,41	2,58	4,61	3,46	7,92	3,35	10,86	4,34	16,20	3,14	17,74	5,48		
1:2	2,32		4,56		7,96		11,52		15,62		18,24			
	2,21	2,29	4,52	4,47	7,82	7,83	11,54	11,80	15,24	15,96	17,96	17,34		
	2,14	0,15	4,36	0,09	7,63	0,15	12,61	0,54	16,52	0,63	17,25	1,04		
	2,49	6,66	4,44	1,98	7,91	1,86	11,53	4,58	16,46	3,96	15,91	6,00		
2:1	8,25		10,02		12,87		15,86		20,86		25,63			
	8,36	8,32	10,27	9,76	12,74	12,87	16,03	16,32	21,00	20,09	25,41	25,74		
	8,24	0,09	9,23	0,47	13,26	0,28	16,95	0,49	19,52	1,00	25,32	0,59		
	8,43	1,10	9,52	4,83	12,61	2,18	16,44	2,97	18,98	4,96	26,60	2,28		
4:1	10,43		13,51		18,25		21,00		23,54		30,21			
	10,49	10,93	13,62	13,41	18,79	17,81	21,06	21,86	23,16	23,12	29,58	29,51		
	11,65	0,58	13,42	0,23	17,16	0,85	22,51	0,97	24,27	1,17	28,21	0,91		
	11,15	5,31	13,09	1,70	17,04	4,77	22,87	4,44	21,51	5,05	30,04	3,07		

Tabla 25. Efecto de la proporción CMCasa : β -glucosidasa sobre la producción de glucosa en la hidrólisis de celulosas comerciales.

CMC	Valor 1		Media		Glucosa											
	Valor 2	Valor 3	s	CV(%)	2 h		5 h		12 h		24 h		36 h		48 h	
CMC					2 h		5 h		12 h		24 h		36 h		48 h	
	1:0	3,42 3,31 3,35 3,64	3,43 0,15 0,15 4,29	2,53 2,48 2,35 2,48	2,46 0,08 0,08 3,13	1,58 1,52 1,36 1,30	1,44 1,44 0,13 9,14	2,54 2,56 2,45 2,65	2,55 2,55 0,08 3,22	1,36 1,33 1,54 1,53	1,44 1,44 0,11 7,67	3,10 3,12 3,21 3,01	3,11 3,11 0,08 2,64			
	1:1	5,52 5,61 5,40 5,23	5,44 5,44 0,16 3,02	5,56 5,69 5,54 5,17	5,49 0,22 4,07	2,36 2,21 2,54 2,09	2,30 2,30 0,19 8,45	4,52 4,82 4,97 4,89	4,80 4,80 0,20 4,09	5,52 5,68 5,42 5,66	5,57 5,57 0,12 2,20	7,00 6,52 6,61 6,79	7,00 6,73 0,21 3,15			
	1:2	6,21 6,08 5,63 5,32	5,81 5,81 0,41 7,06	5,32 5,23 n.d. 6,07	5,54 0,46 8,32	4,52 4,26 4,36 4,70	4,46 0,19 5,98	5,01 5,23 4,65 5,31	5,05 5,05 0,30 5,85	6,35 6,49 6,25 6,47	6,39 6,39 0,11 1,75	6,45 6,89 6,78 7,12	6,81 6,81 0,28 4,09			
	2:1	3,84 3,75 3,96 3,97	3,88 3,88 0,10 2,70	6,52 6,21 6,35 7,08	6,54 0,38 5,84	3,85 3,65 3,94 3,44	3,72 0,22 5,98	6,05 6,12 5,62 6,49	6,07 6,07 0,36 5,88	5,04 5,13 4,71 4,44	4,83 4,83 0,32 6,55	5,65 5,32 5,79 5,84	5,65 0,23 4,15			
4:1	8,65 8,54 8,23 9,22	8,66 8,66 0,41 4,78	9,63 8,52 8,64 9,05	8,96 0,50 5,59	5,36 5,21 5,21 5,34	5,28 0,08 1,54	12,56 12,34 13,98 12,00	12,72 12,72 0,87 6,85	13,65 13,54 12,21 12,52	12,98 12,98 0,72 5,57	14,36 14,25 14,63 14,28	14,38 0,17 1,20				
CMN-300					2 h		5 h		12 h		24 h		36 h		48 h	
	1:0	6,52 6,36 6,98 6,94	6,70 0,31 0,31 4,59	6,25 6,39 6,57 5,71	6,23 0,37 0,37 5,95	4,61 4,54 4,21 4,48	4,46 0,17 0,17 3,92	1,85 1,95 1,74 1,82	1,84 0,09 0,09 4,72	2,12 2,13 1,96 2,19	2,10 2,10 0,10 4,68	3,54 3,52 3,70 3,80	3,64 0,13 0,13 3,67			
	1:1	7,54 7,62 7,12 6,92	7,30 7,30 0,34 4,59	9,12 9,37 8,51 8,64	8,91 0,40 4,53	8,65 8,23 8,54 7,98	8,35 0,30 3,64	6,52 6,97 7,02 6,69	6,80 6,80 0,24 3,48	13,69 13,54 12,97 14,28	13,62 13,62 0,54 3,95	8,26 8,24 8,52 8,10	8,28 8,28 0,18 2,11			
	1:2	2,64 2,87 2,89 2,76	2,79 2,79 0,12 4,13	6,03 6,11 5,84 5,62	5,90 0,22 3,70	6,54 6,32 6,15 5,59	6,15 0,41 6,60	n.d. n.d. 1,94 1,82	1,88 1,88 0,08 4,51	4,06 3,95 4,13 4,18	4,08 4,08 0,10 2,44	4,06 4,06 3,99 3,69	3,95 0,18 4,47			
	2:1	6,52 6,63 6,74 6,99	6,72 6,72 0,20 2,99	4,52 4,51 3,98 4,79	4,45 0,34 7,62	8,32 7,96 7,95 7,29	7,88 0,43 5,45	5,23 5,36 5,47 5,54	5,40 0,14 2,51	6,37 6,59 6,51 6,29	6,49 6,49 0,14 2,12	5,71 5,62 5,62 6,13	5,77 0,24 4,22			
4:1	12,25 12,32 12,41 11,90	12,22 12,22 0,22 1,83	8,54 8,21 7,95 7,66	8,09 0,37 4,63	12,06 12,07 11,23 11,44	11,70 0,43 3,68	9,82 9,62 9,54 10,34	9,83 0,36 3,66	11,26 11,54 11,36 12,16	11,58 11,58 0,40 3,49	11,51 11,51 12,03 12,55	11,90 0,50 4,18				
C ₆₄₁₃					2 h		5 h		12 h		24 h		36 h		48 h	
	1:0	1,21 1,22 1,36 1,25	1,26 0,07 0,07 5,46	1,52 1,65 1,51 1,84	1,63 0,15 0,15 9,44	2,36 2,35 2,20 2,17	2,27 0,10 0,10 4,36	4,58 4,21 4,57 4,60	4,49 4,49 0,19 4,17	4,52 4,58 4,69 4,81	4,65 4,65 0,13 2,75	3,45 3,45 3,44 3,42	3,44 0,01 0,41			
	1:1	1,60 1,58 1,58 1,84	1,65 1,65 0,13 7,70	2,45 2,23 2,36 2,52	2,39 0,13 5,24	3,52 3,98 4,05 3,69	3,81 0,25 6,52	4,96 4,52 4,36 4,52	4,59 4,59 0,26 5,62	4,52 4,63 4,54 4,55	4,56 4,56 0,05 1,06	4,85 4,75 4,60 4,36	4,64 0,21 4,59			
	1:2	2,00 1,94 1,87 1,43	1,81 0,26 14,30	3,26 3,27 3,33 3,26	3,28 0,03 1,03	3,85 3,64 3,51 3,88	3,72 0,18 4,73	4,89 5,01 4,51 4,15	4,89 4,64 0,39 8,41	4,85 4,75 4,85 4,39	4,74 4,71 0,22 4,64	4,56 4,52 4,36 4,40	4,46 0,10 2,13			
	2:1	2,15 2,19 2,35 2,39	2,27 0,12 5,19	3,54 3,56 3,47 3,35	3,48 0,09 2,73	4,85 4,65 4,50 4,28	4,57 0,24 5,27	4,37 4,52 4,92 4,91	4,68 0,28 5,96	4,74 4,65 4,68 4,53	4,65 4,65 0,09 1,90	4,75 4,52 4,65 4,64	2,03			
4:1	4,58 4,69 4,57 4,68	4,63 0,06 1,38	3,30 3,28 3,48 3,34	3,35 0,09 2,69	3,74 3,69 3,85 3,72	3,75 0,07 1,86	4,71 4,52 4,38 4,75	4,59 0,17 3,75	4,96 4,98 4,65 4,93	4,88 4,88 0,15 3,17	3,65 3,68 3,41 3,62	3,59 0,12 3,41				

Tabla 26. Efecto de la proporción CMCasa : β -glucosidasa sobre la producción de azúcares reductores en la hidrólisis de paja sin tratar y tratada con NaOH y H₂O₂.

CMCasa:βDG	Valor 1		Media		Azúcares reductores											
	Valor 2	Valor 3	Valor 4	CV(%)												
Paja sin tratar																
	2 h		5 h		12 h		24 h		36 h		48 h					
1:0	1,09		5,36		6,23		17,65		14,63		31,06					
	1,08	1,11	5,45	5,59	6,10	5,96	17,00	17,38	14,21	14,16	30,56	29,97				
	1,12	0,03	5,74	0,12	5,54	0,30	17,23	0,32	13,52	0,46	29,52	1,04				
	1,15	2,85	5,61	2,15	5,97	5,02	17,64	1,84	14,28	3,28	28,74	3,47				
1:1	2,06		6,69		10,25		22,63		27,85		39,65					
	2,03	1,92	6,53	6,65	10,26	10,61	23,62	22,96	27,63	27,19	38,52	38,78				
	1,91	0,17	6,39	0,26	11,52	0,61	22,63	0,47	27,26	0,82	37,02	1,32				
	1,68	8,99	6,99	3,87	10,41	5,76	22,96	2,03	26,02	3,01	39,93	3,40				
1:2	5,12		9,23		17,30		25,63		33,26		37,91					
	5,03	4,97	9,24	9,22	16,95	17,03	25,74	25,33	33,51	32,24	37,56	37,32				
	4,96	0,15	9,51	0,25	16,52	0,38	25,36	0,52	31,97	1,51	36,52	0,59				
	4,77	2,99	8,90	2,71	17,35	2,25	24,59	2,05	30,22	4,67	37,29	1,58				
2:1	6,21		11,02		25,45		38,56		46,25		53,26					
	6,21	5,93	11,36	11,03	25,36	25,42	37,98	37,16	45,58	45,65	53,14	52,84				
	5,64	0,32	10,95	0,24	25,21	0,19	38,06	2,10	44,21	1,04	52,65	0,44				
	5,66	5,45	10,79	2,18	25,66	0,74	34,04	5,64	46,56	2,29	52,31	0,83				
4:1	4,90		18,65		33,63		44,58		55,23		60,25					
	4,96	5,09	18,25	17,81	33,31	32,68	45,21	43,79	55,21	55,55	61,85	61,32				
	5,03	0,26	17,52	0,81	31,25	1,06	41,00	1,89	55,21	0,67	62,14	0,85				
	5,47	5,09	16,82	4,54	32,53	3,24	44,37	4,33	56,55	1,20	61,04	1,39				
Paja tratada con NaOH																
	2 h		5 h		12 h		24 h		36 h		48 h					
1:0	28,52		32,62		48,21		90,05		94,23		75,21					
	28,45	27,86	31,25	31,91	49,63	47,12	89,64	88,80	93,63	90,24	75,63	74,12				
	27,21	0,72	30,65	1,15	46,25	2,29	87,21	1,30	85,63	4,33	74,96	2,31				
	27,26	2,59	33,12	3,61	44,39	4,85	88,30	1,46	87,47	4,80	70,68	3,12				
1:1	27,31		36,52		49,65		76,53		125,95		132,65					
	27,53	26,31	36,96	35,91	50,00	47,76	76,51	76,12	125,64	124,96	130,26	127,60				
	25,13	1,29	35,21	0,98	46,29	2,44	76,45	0,75	124,87	1,15	125,85	4,87				
	25,27	4,89	34,95	2,73	45,10	5,10	74,99	0,99	123,38	0,92	121,64	3,82				
1:2	24,63		28,12		49,25		73,25		99,21		112,52					
	23,96	23,55	27,12	28,68	49,80	48,08	73,65	73,56	101,26	98,34	111,26	110,02				
	22,10	1,07	30,21	1,35	48,57	2,31	72,96	0,62	95,00	2,62	110,36	2,86				
	23,51	4,55	29,27	4,69	44,70	4,80	74,38	0,84	97,89	2,67	105,94	2,60				
2:1	46,32		58,62		80,52		146,23		177,25		185,96					
	45,21	45,84	58,41	56,13	80,12	80,60	145,25	146,72	179,63	177,28	184,23	184,56				
	44,89	0,96	53,21	2,79	80,96	0,37	145,98	1,85	174,25	2,25	181,52	2,25				
	46,94	2,08	54,28	4,97	80,80	0,46	149,42	1,26	177,99	1,27	186,53	1,22				
4:1	80,04		95,21		131,69		162,36		220,96		281,20					
	79,52	78,76	94,63	92,45	132,41	131,81	163,52	160,90	223,00	221,60	283,42	271,36				
	77,51	1,21	91,26	3,05	130,24	1,16	158,47	2,42	221,63	1,00	265,32	13,30				
	77,97	1,54	88,70	3,30	132,90	0,88	159,25	1,51	220,81	0,45	255,50	4,90				
Paja tratada con H₂O₂																
	2 h		5 h		12 h		24 h		36 h		48 h					
1:0	14,26		25,63		46,95		n.d.		120,63		125,63					
	14,59	14,24	24,94	24,52	46,23	47,67	n.d.	93,38	121,32	119,74	127,53	131,44				
	13,95	0,27	23,32	0,99	47,59	1,59	94,23	1,20	118,57	1,45	135,49	5,70				
	14,16	1,87	24,19	4,05	49,91	3,34	92,53	1,29	118,44	1,21	137,11	4,34				
1:1	20,10		23,56		44,21		84,52		117,52		140,26					
	19,63	20,25	23,94	23,06	43,25	43,45	83,62	83,92	118,63	115,03	140,23	140,12				
	21,52	0,87	22,86	0,90	43,65	0,64	83,21	0,61	117,25	5,57	140,98	0,82				
	19,75	4,30	21,88	3,92	42,69	1,48	84,33	0,73	106,72	4,84	139,01	0,58				
1:2	21,54		22,95		45,23		84,53		85,63		115,23					
	21,63	21,63	23,54	23,29	n.d.	45,52	85,00	85,05	86,52	86,94	116,54	113,24				
	21,97	0,25	21,84	1,25	44,97	0,74	86,09	0,72	87,14	1,19	114,23	4,29				
	21,38	1,15	24,83	5,35	46,36	1,62	84,58	0,85	88,47	1,37	106,96	3,79				
2:1	26,04		52,06		71,04		180,54		150,04		183,23					
	25,95	25,22	51,23	51,22	69,68	69,09	179,64	179,48	148,63	145,20	181,52	179,48				
	24,68	0,92	53,26	2,10	67,52	1,59	178,25	0,94	141,36	4,82	178,95	3,92				
	24,21	3,63	48,33	4,10	68,12	2,30	179,49	0,52	140,77	3,32	174,22	2,19				
4:1	46,32		57,24		98,56		139,63		202,63		231,51					
	46,58	44,95	57,62	57,60	97,54	97,12	135,62	136,92	201,54	201,74	224,32	221,27				
	43,21	1,85	57,98	0,30	98,62	2,29	137,00	1,94	201,94	0,74	220,14	9,37				
	43,49	4,12	57,56	0,53	93,76	2,36	135,43	1,41	200,85	0,37	209,11	4,23				

Tabla 27. Efecto de la proporción CM Casa : β -glucosidasa sobre la producción de glucosa en la hidrólisis de paja sin tratar y tratada con NaOH y H_2O_2 .

CM Casa: β DG	Valor 1		Media		Azúcares reductores																					
	Valor 2	Valor 3	Valor 4	CV(%)	2 h		5 h		12 h		24 h		36 h		48 h											
Paja sin tratar																										
1:0	0,21	0,23	0,22	0,26	0,30	0,29	0,27	0,26	1,02	0,95	1,03	0,95	0,99	12,62	12,54	12,66	16,84	16,71	16,52	16,17	16,56	0,29	1,76			
1:1	0,02	0,03	0,02	0,05	0,49	0,51	0,52	0,48	2,06	2,05	2,01	1,95	1,98	15,63	14,62	15,50	20,26	19,53	20,65	27,54	27,13	26,78	26,99	0,45	1,65	
1:2	0,31	0,30	0,28	0,32	0,82	0,79	0,81	0,86	1,26	1,32	1,23	1,24	1,10	17,12	16,59	17,46	22,79	22,65	21,77	26,48	25,97	25,80	25,89	0,48	1,86	
2:1	0,63	0,61	0,60	0,59	0,87	0,96	1,03	0,86	2,97	2,79	2,97	3,10	3,02	26,52	26,32	27,59	29,54	29,13	28,35	32,52	32,12	31,69	31,84	0,64	2,00	
4:1	0,42	0,45	0,41	0,54	0,79	0,74	0,75	0,76	2,06	1,96	1,95	1,89	1,89	27,98	27,41	27,18	29,03	28,51	29,28	27,54	27,12	26,67	26,30	0,82	3,06	
Paja tratada con NaOH																										
1:0	2,01	1,99	1,89	2,01	4,62	4,25	4,51	4,94	8,62	8,52	8,56	8,49	8,61	19,24	19,36	19,55	22,81	23,61	24,71	32,06	31,95	31,25	31,87	0,85	2,70	
1:1	4,62	4,53	4,78	4,36	6,52	6,36	6,54	7,14	20,11	18,54	19,22	19,63	18,60	36,02	35,21	34,41	38,69	37,54	36,60	35,23	34,21	36,21	31,95	34,40	1,83	5,31
1:2	5,69	5,68	5,78	5,68	8,52	8,36	9,21	8,27	22,36	23,31	22,25	21,54	21,79	38,62	39,14	36,50	51,02	52,06	55,27	64,23	65,32	63,21	64,92	0,92	1,43	
2:1	8,13	7,98	7,53	8,30	11,00	10,93	10,26	10,37	28,10	28,13	28,11	27,82	28,39	51,69	51,35	51,13	71,06	69,36	67,33	86,00	85,63	84,67	84,74	85,26	0,66	0,77
4:1	16,52	16,16	16,24	15,53	27,52	27,96	28,76	29,56	62,47	62,98	61,05	60,45	58,30	92,65	92,63	91,97	86,26	86,53	88,84	90,56	90,21	88,36	87,23	2,45	2,78	
Paja tratada con H_2O_2																										
1:0	1,05	1,10	1,16	1,13	4,12	4,36	3,56	3,80	6,25	6,36	6,14	6,05	5,90	12,69	13,06	11,95	17,69	17,37	16,97	23,96	24,03	22,85	21,88	23,18	1,02	4,41
1:1	0,53	0,54	0,52	0,50	3,29	3,30	3,39	3,42	9,65	9,21	9,21	9,45	8,53	16,05	16,21	14,95	23,69	23,54	22,10	17,65	17,94	16,52	18,17	17,57	0,73	4,16
1:2	1,75	1,74	1,71	1,70	4,89	4,96	4,67	4,56	7,63	7,52	7,53	7,45	7,52	15,23	15,31	13,57	25,36	25,04	23,92	33,96	33,54	32,65	31,53	32,92	1,08	3,27
2:1	3,12	3,23	3,21	3,33	7,23	7,32	7,15	7,14	1,28	1,29	1,36	1,36	1,51	25,85	25,63	26,09	29,63	29,81	29,77	56,54	56,32	55,94	55,44	56,06	0,48	0,86
4:1	8,62	8,52	8,36	8,69	12,63	12,54	12,36	11,59	30,21	30,06	29,08	29,31	26,74	50,23	49,36	48,04	74,26	74,51	70,41	102,36	101,56	98,63	94,85	99,35	3,40	3,42

Tabla 28. Efecto de concentración de sustrato sobre la hidrólisis de celulosas comerciales

[sustrato]	Valor 1		Media		Azúcares reductores											
	Valor 2	Valor 3	Valor 4	CV(%)	CMC											
	2 h		5 h		12 h		24 h		36 h		48 h					
0,5	112,36		105,63		103,36		112,36		114,25		124,65					
	111,54	110,78	104,84	106,80	102,54	99,77	112,36	113,08	114,97	111,00	125,47	123,96				
	109,00	1,48	107,86	1,88	98,52	4,01	116,36	2,25	110,63	4,95	121,61	1,66				
	110,22	1,33	108,87	1,76	94,66	4,02	111,24	1,99	104,15	4,46	124,11	1,34				
1,0	94,36		96,36		99,63		105,26		95,36		94,27					
	95,63	93,48	94,25	97,07	98,52	100,01	103,21	99,70	94,21	97,38	95,36	93,38				
	91,84	1,83	100,36	2,54	102,36	1,64	96,84	5,48	98,36	3,31	91,25	1,81				
	92,09	1,95	97,31	2,62	99,53	1,64	93,49	5,49	101,59	3,40	92,64	1,94				
2,5	71,23		61,32		35,69		75,69		91,52		81,25					
	70,52	69,07	60,95	60,96	35,21	36,80	76,84	75,90	89,52	89,90	82,00	80,62				
	68,54	2,35	60,39	0,41	37,41	1,68	74,21	1,25	89,74	1,15	80,24	1,30				
	65,99	3,40	61,18	0,67	38,89	4,57	76,86	1,65	88,82	1,28	78,99	1,62				
5,0	43,69		57,69		51,24		61,23		57,41		71,23					
	42,15	42,57	57,21	56,90	50,36	50,92	65,35	62,52	57,62	58,16	70,52	69,15				
	41,36	1,03	55,64	0,88	52,68	1,39	60,24	2,27	59,64	1,01	68,54	2,21				
	43,08	2,41	57,06	1,55	49,40	2,74	63,26	3,63	57,97	1,74	66,31	3,19				
10,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	38,52		32,36		n.d.		52,14					
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	37,96	37,87	31,42	31,49	n.d.	37,36	51,00	51,64				
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	36,54	0,92	30,97	0,61	37,94	0,82	50,23	1,30				
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	38,46	2,43	31,21	1,93	36,78	2,20	53,19	2,51				
	CMN-300															
	2 h		5 h		12 h		24 h		36 h		48 h					
0,5	50,41		104,23		200,36		285,62		342,63		421,95					
	50,96	51,31	105,63	105,13	201,63	197,60	289,47	284,00	345,26	341,80	420,63	417,20				
	52,01	0,76	103,25	1,81	196,00	4,22	280,06	4,40	341,26	3,00	415,98	5,30				
	51,86	1,48	107,41	1,72	192,41	2,13	280,85	1,55	338,05	0,88	410,24	1,27				
1,0	31,25		54,63		108,36		145,26		165,26		210,36					
	30,26	30,90	55,21	55,65	107,96	106,45	144,63	144,80	167,85	164,40	211,54	208,00				
	30,54	0,60	54,63	1,68	106,85	2,63	140,23	3,63	155,63	6,04	207,54	4,00				
	31,55	1,95	58,13	3,01	102,63	2,47	149,08	2,50	168,86	3,67	202,56	1,92				
2,5	63,54		52,12		44,21		31,52		24,52		16,24					
	63,05	62,56	51,74	51,84	44,63	44,52	31,88	31,70	24,63	24,08	17,52	17,37				
	61,00	1,10	52,63	0,74	43,96	0,58	n.d.	0,25	23,52	0,58	17,41	0,85				
	62,65	1,76	50,87	1,43	45,28	1,30	n.d.	0,80	23,65	2,39	18,31	4,91				
5,0	12,98		14,63		20,69		22,65		24,63		30,12					
	12,63	12,78	14,21	14,35	20,15	19,73	22,12	22,32	24,01	24,28	31,20	29,58				
	11,98	0,65	14,85	0,50	19,53	0,92	23,54	1,07	24,36	0,28	28,54	1,32				
	13,53	5,08	13,71	3,50	18,55	4,65	20,97	4,81	24,12	1,13	28,46	4,47				
10,0	7,02		8,12		11,03		12,56		13,25		15,21					
	7,53	7,08	8,36	8,41	11,25	11,10	12,36	12,09	13,24	13,43	15,63	14,85				
	7,01	0,32	8,54	0,22	11,40	0,30	11,54	0,46	14,00	0,38	14,25	0,68				
	6,76	4,58	8,62	2,64	10,72	2,66	11,90	3,80	13,23	2,83	14,31	4,58				
	C6413															
	2 h		5 h		12 h		24 h		36 h		48 h					
0,5	6,48		8,96		42,36		72,20		71,02		75,25					
	6,35	6,51	8,54	8,78	42,51	42,27	72,15	71,48	70,69	69,84	75,42	75,80				
	6,25	0,31	8,32	0,44	42,00	0,22	69,54	1,30	68,54	1,20	76,85	0,72				
	6,96	4,83	9,30	4,97	42,21	0,52	72,03	1,81	69,11	1,72	75,68	0,95				
1,0	8,23		14,26		26,98		49,65		63,21		66,98					
	8,34	8,34	14,65	14,31	26,25	26,95	49,26	50,31	63,52	62,18	66,52	65,15				
	8,52	0,13	14,52	0,37	27,04	0,53	51,63	1,07	61,17	1,38	61,24	2,65				
	8,27	1,54	13,81	2,59	27,53	1,96	50,70	2,13	60,82	2,22	65,86	4,06				
2,5	8,78		14,63		25,36		51,23		59,36		54,26					
	8,89	8,81	14,52	14,47	25,74	26,26	52,36	49,84	58,35	57,52	53,26	55,04				
	8,52	0,22	14,69	0,30	27,98	1,17	48,57	2,37	55,21	1,78	54,21	2,31				
	9,05	2,53	14,04	2,04	25,96	4,47	47,20	4,76	57,16	3,10	58,43	4,19				
5,0	6,26		10,52		16,52		29,63		32,63		35,21					
	6,32	6,56	10,36	10,62	16,32	16,80	28,65	28,08	32,15	32,26	35,26	34,12				
	6,10	0,67	11,52	0,63	16,54	0,69	27,34	1,31	31,94	0,29	33,62	1,38				
	7,56	10,26	10,08	5,90	17,82	4,09	26,70	4,68	32,32	0,90	32,39	4,05				
10,0	5,87		7,25		11,96		19,63		18,92		22,15					
	5,10	6,00	7,63	7,26	11,87	12,15	19,21	18,43	19,63	18,92	22,52	22,53				
	6,35	0,69	7,41	0,37	12,64	0,34	17,21	1,17	17,94	0,72	22,97	0,34				
	6,68	11,48	6,75	5,15	12,13	2,83	17,67	6,35	19,19	3,78	22,48	1,50				

Tabla 29. Efecto de concentración de sustrato sobre la hidrólisis de paja sin tratar y tratada con NaOH y H₂O₂.

[sustrato]	Valor 1		Medias		Azúcares reductores															
	Valor 2	Valor 3	Valor 4	CV(%)	2 h		5 h		12 h		24 h		36 h		48 h					
Paja sin tratar																				
0,5	9,97	9,63	9,59	0,30	n.d.	n.d.	21,05	20,98	60,23	60,52	60,13	68,52	68,54	68,23	75,21	75,03	75,51			
	9,52	9,24	3,15		n.d.	n.d.	19,87	1,06	61,34	1,23	58,43	2,04	68,94	0,89	76,21	0,52	75,59	0,69		
	7,14	7,15	7,02		16,07	15,84	16,09	29,63	29,63	29,81	56,41	56,02	56,10	65,23	65,94	64,82	73,21	73,03	73,54	
	6,95	6,84	2,15		16,95	0,62	30,01	0,21	57,98	1,64	53,99	2,93	64,10	0,93	74,62	0,73	73,30	0,99		
	5,21	5,32	5,10		7,85	7,98	7,95	20,15	20,63	19,84	40,34	40,96	39,16	57,21	56,08	53,87	53,21	53,46		
	4,96	4,91	3,86		7,64	0,29	8,33	3,64	18,64	0,85	38,56	1,88	55,63	1,56	53,20	0,32	53,56	0,60		
	4,91	4,91	3,86		8,33	3,64	19,94	4,29	19,94	4,29	36,78	4,81	54,07	2,78	53,56	0,60				
5,0	5,23	5,32	5,22		7,26	7,12	7,24	15,06	15,74	15,05	29,65	29,54	28,70	35,96	35,42	35,29	40,84	40,63	41,87	
	5,10	5,23	1,70		6,91	0,32	7,67	4,43	14,63	0,49	27,14	1,17	35,41	0,66	43,25	1,33	42,76	3,17		
	5,23	3,51	3,52		4,90	4,91	4,89	7,95	7,84	7,90	13,54	13,26	13,48	15,21	15,41	15,13	16,52	17,25	17,88	
	3,62	3,47	0,07		4,75	0,10	5,00	2,12	8,06	0,13	13,25	0,29	15,25	0,33	18,94	1,19	18,81	6,65		
	3,48	3,48	1,95		5,00	2,12	7,75	1,70	13,87	2,17	13,87	2,17	14,65	2,19	18,81	6,65				
Paja tratada con NaOH																				
0,5	135,29	136,25	134,96		350,45	351,26	357,44	509,63	509,84	509,88	520,36	519,63	515,88	820,63	821,53	822,16	683,52	684,52	682,20	
	133,41	134,89	0,87		355,23	10,46	372,82	2,93	509,74	0,30	515,23	5,54	508,30	1,07	823,63	1,34	681,53	2,34	679,23	0,34
	95,63	98,54	100,40		164,06	164,21	163,42	251,63	251,41	259,52	436,21	436,87	436,60	504,63	505,21	504,30	603,23	609,32	610,80	
	102,63	104,80	4,09		163,21	0,92	162,20	0,57	260,36	10,93	430,26	5,23	443,06	1,20	504,94	1,28	611,54	4,95	617,11	0,81
	104,80	36,21	37,74		50,24	51,68	50,72	129,63	128,52	131,80	180,63	179,54	180,68	240,65	240,96	240,76	250,63	251,69	251,12	
	37,21	41,02	2,23		49,87	0,82	51,09	1,61	132,54	3,57	181,62	0,87	180,93	0,48	240,20	0,44	253,62	2,12	248,54	0,84
	41,02	47,52	46,38		90,63	90,04	89,36	116,21	117,36	117,52	112,65	114,37	113,36	160,23	161,36	158,78	193,36	194,21	192,38	
	45,30	45,01	1,42		88,56	1,16	88,56	1,30	115,20	2,68	111,69	1,44	114,74	1,27	154,23	3,15	190,65	2,87	189,30	1,49
	45,30	38,36	37,64		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	36,21	36,21	49,64	48,52	48,69	55,63	55,24	55,90	64,25	62,36	63,35	
	36,51	36,51	0,85		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	34,25	1,16	47,36	1,00	47,36	1,00	56,74	0,64	63,97	0,90	63,97	0,90
	37,48	37,48	2,25		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	36,26	3,24	49,24	2,05	49,24	2,05	55,99	1,14	62,82	1,43	62,82	1,43
Paja tratada con H₂O₂																				
0,5	64,21	65,36	65,20		124,32	123,62	123,02	261,36	265,36	260,60	462,36	461,23	464,12	554,21	556,36	554,46	562,94	561,36	559,95	
	64,92	66,31	1,35		121,36	1,27	122,78	1,03	255,41	4,09	468,36	3,14	464,53	0,68	552,36	1,66	558,63	2,72	556,87	0,49
	62,63	62,31	61,66		75,63	75,21	76,31	164,25	165,36	166,94	332,63	331,25	333,41	394,12	395,36	394,13	459,23	458,00	455,84	
	62,45	59,25	2,61		79,00	1,80	75,40	2,36	167,95	2,67	334,63	1,80	335,13	0,54	392,13	1,43	452,14	3,33	452,14	3,33
	59,25	49,25	49,82		52,63	51,65	51,31	103,26	103,21	102,47	150,23	154,23	150,14	220,36	219,52	216,89	300,25	300,21	300,29	
	48,62	51,20	2,26		50,23	1,06	50,73	2,06	101,95	0,91	150,63	3,60	145,47	2,39	215,24	3,72	312,62	10,02	312,62	10,02
	51,20	27,56	27,41		30,75	30,24	30,70	130,32	132,63	131,69	135,62	136,54	135,69	201,36	200,69	194,59	187,94	188,41	185,81	
	27,41	27,98	0,70		30,14	0,70	31,67	2,28	129,84	1,83	135,87	0,75	134,73	0,55	192,36	8,19	180,36	3,72	180,36	3,72
	26,33	16,05	16,42		19,52	19,62	19,42	77,21	77,21	77,65	82,36	81,25	81,30	92,21	92,53	93,62	n.d.	n.d.	n.d.	
	16,31	16,31	0,37		18,95	0,32	18,95	0,32	76,95	1,06	83,26	2,14	83,26	2,14	93,84	1,68	n.d.	n.d.	n.d.	
	16,39	16,39	2,25		19,59	1,63	19,59	1,63	79,23	1,37	78,33	2,64	78,33	2,64	95,90	1,79	n.d.	n.d.	n.d.	

Tabla 30 Utilización de enzimas inmovilizados en la hidrólisis de celulosas comerciales.

Enzimas	Valor 1	Media	Azúcares reductores										
	Valor 2	s	2 h		5 h		12 h		24 h		36 h		48 h
CMC													
C(L)+β(L)	91,23		93,23		95,63		105,63		105,96		132,63		
	90,63	90,43	94,63	92,68	94,87	94,73	106,00	103,15	106,87	104,39	135,26	130,83	
	89,63	0,67	92,01	1,62	92,31	1,69	101,36	3,16	104,00	3,99	128,45	3,80	
	90,23	0,75	90,85	1,75	96,11	1,79	99,61	3,07	98,00	3,82	126,98	2,91	
C(L)+β(I _{alg})	30,65		32,63		38,63		40,23		38,56		49,63		
	30,23	30,37	32,94	33,70	38,51	39,35	41,56	39,91	39,63	39,53	49,52	48,06	
	30,12	0,24	35,26	1,19	39,64	0,99	39,00	1,26	38,51	1,36	47,81	2,03	
	30,48	0,79	33,97	3,52	40,62	2,51	38,85	3,16	41,42	3,44	45,28	4,23	
C(L)+β(I _{poliacril})	41,26		47,51		49,51		59,68		69,21		80,26		
	41,23	41,94	47,65	46,12	48,75	48,55	59,12	58,15	68,51	70,37	81,52	79,29	
	42,62	0,80	47,10	2,61	48,21	0,76	57,00	1,46	72,80	1,92	78,14	1,95	
	42,65	1,91	42,22	5,66	47,73	1,57	56,80	2,52	70,96	2,73	77,24	2,46	
(C + β)(I _{alg})	42,61		42,36		43,68		50,23		49,21		50,23		
	42,51	43,61	41,96	42,23	43,21	42,28	50,41	49,73	49,63	48,24	51,24	49,29	
	40,95	3,26	41,32	0,82	42,06	1,56	49,32	0,70	48,21	1,66	47,07	1,83	
	48,37	7,48	43,28	1,94	40,17	3,70	48,96	1,41	45,91	3,45	48,62	3,72	
(C+ β)(I _{poliacril})	45,21		45,21		49,65		48,69		45,27		41,23		
	44,36	46,94	47,62	45,28	50,21	48,80	48,74	48,80	45,87	45,57	42,38	42,59	
	47,96	2,68	43,62	1,69	48,09	1,37	49,52	0,53	45,30	0,33	43,17	1,03	
	50,23	5,70	44,67	3,74	47,25	2,80	48,25	1,08	45,84	0,72	43,58	2,43	
CMN-300													
C(L)+β(L)	20,36		40,25		60,96		100,23		121,65		131,57		
	19,52	19,79	40,36	41,85	60,23	60,25	102,36	100,26	121,41	119,00	132,57	130,73	
	18,94	0,69	42,94	1,82	60,24	0,57	105,36	5,22	118,47	3,35	129,61	1,61	
	20,34	3,48	43,85	4,36	59,57	0,94	93,09	5,21	114,47	2,81	129,17	1,23	
C(L)+β(I _{alg})	13,65		27,53		39,65		69,25		85,64		91,57		
	13,21	13,12	24,36	26,23	39,21	38,36	68,96	68,11	84,21	83,48	92,65	90,71	
	12,54	0,46	26,89	1,37	37,65	1,28	67,12	1,16	81,24	1,88	89,52	1,68	
	13,08	3,48	26,14	5,22	36,93	3,34	67,11	1,70	82,83	2,26	89,10	1,86	
C(L)+β(I _{poliacril})	6,23		15,24		41,26		55,87		60,58		73,62		
	6,35	6,16	15,03	15,37	40,98	40,49	56,36	55,07	61,41	60,24	74,51	72,81	
	6,01	0,16	16,04	0,46	39,61	0,76	54,21	1,23	58,94	1,04	70,12	1,90	
	6,05	2,58	15,17	2,96	40,11	1,89	53,84	2,24	60,03	1,72	72,99	2,61	
(C + β)(I _{alg})	11,64		16,25		35,23		37,65		43,28		47,42		
	11,23	10,94	16,36	16,83	35,12	34,25	36,95	36,46	43,69	42,78	46,00	47,01	
	10,25	0,62	16,54	0,90	34,06	1,23	36,08	1,08	43,74	1,59	46,21	1,12	
	10,64	5,64	18,17	5,36	32,59	3,58	35,16	2,96	40,41	3,72	48,41	2,39	
(C+ β)(I _{poliacril})	15,36		16,95		22,63		26,35		29,65		30,27		
	15,98	15,29	16,84	16,79	23,54	23,15	26,98	27,30	29,68	28,60	30,95	31,13	
	14,94	0,51	16,32	0,32	23,01	0,41	27,68	0,80	27,10	1,28	31,57	0,66	
	14,88	3,32	17,05	1,93	23,42	1,79	28,19	2,95	27,97	4,48	31,73	2,14	
C6413													
C(L)+β(L)	2,03		4,58		6,18		27,96		28,51		28,74		
	1,95	1,98	4,69	4,78	6,13	6,20	27,85	26,98	27,63	27,70	29,61	28,84	
	1,97	0,03	4,95	0,17	6,29	0,07	26,31	1,09	26,51	0,87	27,95	0,69	
	1,97	1,75	4,90	3,65	6,20	1,08	25,80	4,04	28,15	3,15	29,06	2,41	
C(L)+β(I _{alg})	7,12		7,62		8,92		14,85		19,23		19,65		
	7,25	7,27	7,24	7,58	8,64	8,81	15,23	15,05	19,68	20,03	19,68	20,58	
	7,23	0,15	7,32	0,41	8,57	0,25	15,02	0,16	20,47	0,70	21,05	1,12	
	7,48	2,08	8,14	5,38	9,11	2,85	15,10	1,06	20,74	3,48	21,94	5,43	
C(L)+β(I _{poliacril})	4,03		4,68		5,32		10,63		11,31		12,52		
	4,16	4,23	4,95	4,78	5,49	5,21	11,06	11,02	11,23	11,20	12,54	12,68	
	4,13	0,25	4,57	0,18	5,14	0,26	11,75	0,53	10,96	0,16	12,36	0,42	
	4,60	5,98	4,92	3,87	4,89	4,93	10,64	4,78	11,30	1,46	13,30	3,32	
(C + β)(I _{alg})	5,56		5,62		4,87		6,23		7,25		8,42		
	5,23	5,45	5,34	5,65	4,79	4,86	6,12	6,28	7,12	7,23	8,53	8,41	
	5,32	0,21	5,95	0,25	5,06	0,15	6,54	0,18	7,32	0,08	8,69	0,29	
	5,69	3,87	5,69	4,44	4,72	3,02	6,23	2,88	7,23	1,15	8,00	3,51	
(C+ β)(I _{poliacril})	6,27		6,95		6,32		10,36		7,14		7,21		
	6,23	6,27	6,57	6,90	6,25	6,42	10,24	10,58	7,26	7,25	7,13	7,35	
	6,03	0,21	7,43	0,39	6,52	0,16	10,97	0,34	7,00	0,26	7,32	0,27	
	6,55	3,42	6,65	5,64	6,59	2,51	10,75	3,21	7,60	3,54	7,74	3,69	

Tabla 31. Utilización de enzimas inmovilizados en la hidrólisis de paja sin tratar y tratada con NaOH y H₂O₂.

Enzimas	Valor 1		Media		Azúcares reductores						
	Valor 2	Valor 3	Valor 4	CV(%)							
Paja sin tratar											
	2 h		5 h		12 h		24 h		36 h		48 h
C(L)+β(L)	11,20		17,52		26,32		75,23		84,21		92,36
	11,23	11,28	17,53	17,58	26,51	27,45	75,24	75,10	84,21	83,02	92,41
	11,52	0,16	17,21	0,35	28,54	1,20	75,68	0,60	82,63	1,52	90,25
C(L)+β(I _{alg})	15,96		19,52		26,54		53,21		66,52		70,21
	16,21	16,14	19,63	19,07	26,03	25,96	53,69	53,86	67,54	67,07	70,98
	16,32	0,16	19,73	1,12	25,64	0,43	53,68	0,70	68,52	1,23	74,51
C(L)+β(I _{potiacril})	16,07	0,98	17,40	5,86	25,63	1,65	54,86	1,31	65,70	1,83	75,18
	14,23		19,02		18,52		45,21		51,24		60,21
	14,63	13,95	19,65	19,07	18,63	18,62	45,63	45,91	52,36	51,17	60,32
(C + β)(I _{alg})	13,20	0,62	18,52	0,46	18,94	0,23	45,80	0,77	50,23	0,90	60,97
	13,74	4,43	19,09	2,43	18,39	1,26	47,00	1,67	50,85	1,75	60,94
	18,12		20,63		44,92		n.d.		60,21		63,21
(C + β)(I _{potiacril})	18,54	18,54	21,56	21,90	44,82	45,78	n.d.	51,25	60,30	59,60	63,03
	18,96	0,34	22,96	1,03	46,20	1,13	50,96	0,41	58,41	0,87	61,54
	18,54	1,85	22,45	4,68	47,18	2,46	51,54	0,80	59,48	1,47	61,82
(C + β)(I _{potiacril})	14,84		17,23		21,51		23,25		41,23		40,23
	15,00	15,13	17,14	16,75	21,32	20,89	24,62	24,73	41,15	42,12	40,59
	15,69	0,38	17,25	0,91	20,24	0,62	24,54	1,34	44,32	1,49	41,97
	14,99	2,51	15,38	5,46	20,49	2,97	26,51	5,43	41,78	3,55	42,61
Paja tratada con NaOH											
	2 h		5 h		12 h		24 h		36 h		48 h
C(L)+β(L)	84,36		235,26		462,36		507,83		688,25		715,24
	84,52	84,24	236,21	237,05	460,23	461,35	507,41	506,19	687,36	689,10	715,26
	84,25	0,29	238,94	1,64	459,00	2,15	504,36	1,69	689,64	1,66	710,23
C(L)+β(I _{alg})	83,83	0,35	237,79	0,69	463,81	0,47	505,16	0,33	691,15	0,24	709,67
	54,26		115,23		236,52		350,04		452,36		522,63
	54,36	53,29	116,96	117,10	236,41	236,59	349,68	347,39	451,69	455,90	522,68
C(L)+β(I _{potiacril})	54,51	2,18	119,47	1,76	237,21	0,43	345,21	2,87	459,67	4,48	522,41
	50,03	4,08	116,74	1,50	236,22	0,18	344,63	0,82	459,88	0,98	524,00
	38,25		78,96		121,63		237,12		271,63		289,53
(C + β)(I _{alg})	37,41	38,24	77,52	77,94	121,54	121,56	236,52	238,05	272,63	269,07	287,53
	36,52	1,83	76,52	1,14	122,36	0,68	236,32	2,81	269,31	4,46	284,12
	40,78	4,80	78,76	1,46	120,71	0,56	242,24	1,18	262,71	1,66	287,58
(C + β)(I _{potiacril})	28,62		33,62		45,21		142,53		199,32		247,21
	27,92	28,87	32,52	32,64	45,63	45,08	143,65	140,60	201,63	199,11	246,36
	28,63	1,02	31,45	0,91	45,13	0,53	142,36	4,53	205,63	6,69	248,25
(C + β)(I _{potiacril})	30,31	3,52	32,97	2,80	44,35	1,18	133,86	3,22	189,86	3,36	253,98
	23,63		38,95		55,62		95,63		106,32		113,62
	22,63	22,96	38,41	38,93	55,21	55,67	96,32	94,53	105,00	105,82	113,25
(C + β)(I _{potiacril})	23,14	0,54	38,25	0,84	55,41	0,54	94,15	1,90	105,43	0,73	112,21
	22,44	2,33	40,11	2,16	56,44	0,97	92,02	2,01	106,53	0,69	120,44
Paja tratada con H₂O₂											
	2 h		5 h		12 h		24 h		36 h		48 h
C(L)+β(L)	89,25		116,23		301,23		482,36		549,63		536,24
	88,51	88,11	112,35	117,46	301,25	294,84	485,00	482,68	547,23	547,85	539,65
	88,25	1,20	n.d.	5,82	293,14	8,33	486,32	4,10	542,10	4,38	549,00
C(L)+β(I _{alg})	86,43	1,36	123,80	4,96	283,74	2,82	477,04	0,85	552,44	0,80	538,99
	42,65		59,62		88,63		175,23		261,36		346,25
	42,15	41,89	59,20	58,76	88,25	88,40	175,62	175,01	261,54	260,46	341,25
C(L)+β(I _{potiacril})	41,63	0,66	57,41	0,96	89,61	1,03	175,41	0,84	263,78	3,70	336,50
	41,13	1,57	58,81	1,63	87,11	1,17	173,78	0,48	255,16	1,42	345,32
	35,21		48,69		76,32		158,64		205,95		240,36
(C + β)(I _{alg})	35,63	35,42	48,23	47,78	76,25	75,92	158,06	158,20	210,47	206,09	239,36
	35,24	0,23	46,21	1,09	75,24	0,49	159,14	0,94	205,98	3,48	237,41
	35,60	0,64	47,99	2,27	75,87	0,65	156,96	0,59	201,96	1,69	235,99
(C + β)(I _{potiacril})	161,25		150,23		98,65		41,54		30,25		18,52
	162,32	159,64	151,64	149,12	98,21	98,45	41,25	42,06	30,63	30,23	18,63
	159,62	3,06	148,75	2,47	99,21	0,63	42,96	0,80	30,54	0,51	18,97
(C + β)(I _{potiacril})	155,37	1,91	145,86	1,66	97,73	0,64	42,49	1,90	29,50	1,70	18,08
	20,36		22,51		59,15		87,52		121,65		159,52
	21,30	20,63	22,01	22,56	59,21	59,11	88,14	86,96	120,52	121,74	160,36
(C + β)(I _{potiacril})	20,51	0,45	22,35	0,58	58,41	0,52	85,21	1,26	125,31	2,54	155,48
	20,35	2,19	23,37	2,55	59,67	0,88	86,97	1,45	119,48	2,09	157,44

Tabla 12. Cinética de Michaelis-Menten de β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato de calcio y de poliacrilamida.

Enzima	valor 1		Media		Actividad β -glucosidasa													
	valor 2	valor 3	s	CV(%)	0,5 M		1,0 M		2,0 M		5,0 M		8,0 M		10,0 M		15,0 M	
Libre	n.d.	21,19	41,42	42,10	72,51	72,84	113,71	112,62	120,22	120,21	132,22	136,79	133,52	134,00				
	22,01	1,16	43,03	0,83	73,59	0,65	112,69	1,13	113,74	6,47	137,49	4,26	132,37	1,92				
	20,37	5,47	41,85	1,98	72,42	0,89	111,45	1,00	126,67	5,38	140,65	3,11	136,12	1,43				
Inmov. alg.	12,04	11,88	20,62	21,15	42,63	42,49	67,53	64,60	77,35	75,62	82,10	80,37	73,47	74,61				
	11,52	0,32	21,30	0,47	41,59	0,84	59,22	4,66	76,74	2,49	78,75	1,68	75,75	1,61				
	12,09	2,66	21,52	2,22	43,26	1,98	67,04	7,22	72,76	3,30	80,26	2,09	n.d.	2,16				
Inmov. poliacril	10,15	10,30	18,25	17,66	33,44	32,37	57,00	55,49	61,19	62,64	65,98	65,71	45,96	46,78				
	9,96	0,43	18,01	0,82	30,41	1,70	57,18	2,77	64,42	1,64	65,12	0,51	47,23	0,71				
	10,79	4,22	16,72	4,66	33,26	5,25	52,29	5,00	62,32	2,62	66,04	0,78	47,15	1,52				

Tabla 13. Efecto del pH sobre la actividad β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato de calcio y de poliacri-amida.

Enzima	valor 1		Media		Actividad β -glucosidasa															
	valor 2	valor 3	s	CV(%)	pH 2,0		pH 3,0		pH 4,0		pH 5,0		pH 5,4		pH 6,0		pH 7,0		pH 8,0	
Libre	n.d.	60,75	88,51	88,60	293,97	#####	250,82	250,23	118,58	121,51	61,35	61,79	16,74	18,69	3,66	3,74				
	60,82	0,11	95,17	6,53	#####	#####	250,17	0,56	127,69	5,35	60,54	1,52	20,00	1,72	3,60	0,20				
	60,67	0,17	82,12	7,37	294,84	167,97	249,71	0,22	118,27	4,40	63,49	2,47	19,34	9,22	3,97	5,30				
Inmov. alg.	54,16	51,41	62,55	68,19	140,14	138,19	102,15	103,68	71,92	72,45	32,86	34,81	6,18	6,07	1,16	1,22				
	48,66	2,75	70,61	4,90	138,44	2,08	99,76	4,87	71,65	1,16	34,85	1,94	6,13	0,14	1,21	0,07				
	51,42	5,35	71,41	7,19	136,00	1,51	109,13	4,70	73,78	1,60	36,73	5,56	5,91	2,37	1,29	5,37				
Inmov. poliacril	49,55	51,05	109,62	113,91	241,80	236,96	198,28	186,46	141,86	139,71	87,05	84,36	55,57	34,11	12,90	13,44				
	51,96	1,31	124,12	8,88	236,96	4,84	178,93	10,37	132,18	6,71	83,82	2,46	22,57	18,61	12,90	0,93				
	51,63	2,56	108,00	7,79	232,13	2,04	182,16	5,56	145,08	4,81	82,21	2,92	24,18	54,55	14,51	6,92				

7.2. SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AFEX	“Ammonia-freeze-explosion”
Alg	Geles de alginato
β	β -glucosidasa
β DG	Actividad β -D-glucosidasa
β DGR	Actividad β -D-glucosidasa relativa
BIS	N, N’-metilenbisacrilamida
CMC	Carboximetilcelulosa
C o CMCasa	Carboximetilcelulosa
CV	Coefficiente de variación
D.P.	Grado de polimerización
DNSO	Dimetilsulfóxido
E	Enzima
EP	Complejo enzima-producto en una reacción enzimática
Fig.	Figura
H	Humatos
Inmov o I	Enzima inmovilizado
K_i	Constante de inhibición
K_m	Constante de Michaelis
K_{map}	Constante de Michaelis aparente
K_p	Constante de disociación del complejo EP
L	Enzima libre
Mr	Masa molecular
n.d.	no determinado
NMWL	Límite de exclusión molecular
P	Producto de una reacción enzimática
p.e.	por ejemplo
pNP	p-nitrofenilfosfato
pNPG	p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido
Poliacril. o Poli	Geles de poliacrilamida
RASH	“Rapid Steam Hydrolysis”
S	Sustrato de una reacción enzimática

SD	Desviación estandar
V	Velocidad de catálisis enzimática
V _{max}	Velocidad máxima

7.3. LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1. Composición química de los materiales lignocelulósicos (% peso).	27
Tabla 2.2. Acción de distintas celulasas sobre diferentes sustratos.	46
Tabla 3.1. Características químicas y análisis textural del horizonte A ₁₁ del suelo ocre húmico de montaña.	148
Tabla 4.1. Influencia de la concentración de alginato de sodio, CaCl ₂ y del tiempo de tratamiento sobre el atrapamiento de β-glucosidasa de <i>A. niger</i> en geles de alginato de calcio.	179
Tabla 4.2. Influencia de la concentración de acrilamida sobre el atrapamiento de β-glucosidasa en geles de poliacrilamida.	182
Tabla 4.3. Influencia de la concentración de bisacrilamida sobre la inmovilización de β-glucosidasa en geles de poliacrilamida.	185
Tabla 4.4. Efecto de la presencia de celobiosa sobre la inmovilización de β-glucosidasa en geles de poliacrilamida.	186
Tabla 4.5. Influencia de la concentración de enzima sobre la inmovilización de β-glucosidasa en geles de poliacrilamida.	188
Tabla 4.6. Inmovilización de β-glucosidasa a 4°C por asociación a humatos.	191
Tabla 4.7. Inmovilización de β-glucosidasa a 30°C por asociación a humatos.	192
Tabla 4.8. Inmovilización de β-glucosidasa a 45°C por asociación a humatos.	193
Tabla 4.9. Porcentajes de inmovilización de β-glucosidasa por asociación a humatos a diferentes temperaturas, tiempos de tratamiento y proporción humatos/enzima.	194
Tabla 4.10. Inmovilización de β-glucosidasa a 4°C por entrecruzamiento con humatos a través de glutaraldehído al 1,0%.	199
Tabla 4.11. Inmovilización de β-glucosidasa a 30°C por entrecruzamiento con humatos a través de glutaraldehído al 1,0%.	200
Tabla 4.12. Inmovilización de β-glucosidasa a 45°C por entrecruzamiento con humatos a través de glutaraldehído al 1,0%.	201
Tabla 4.13. Porcentaje de inmovilización de β-glucosidasa por entrecruzamiento con humatos a través de glutaraldehído al 1,0% a diferentes temperaturas, tiempos de tratamiento y proporciones humatos/enzima.	202
Tabla 4.14. Inmovilización de β-glucosidasa a 4°C por entrecruzamiento con humatos a través de glutaraldehído al 2,5%.	205
Tabla 4.15. Inmovilización de β-glucosidasa a 30°C por entrecruzamiento con humatos a través de glutaraldehído al 2,5%.	206
Tabla 4.16. Inmovilización de β-glucosidasa a 45°C por entrecruzamiento con humatos a través de glutaraldehído al 2,5%.	207
Tabla 4.17. Porcentaje de inmovilización de β-glucosidasa por entrecruzamiento con humatos a través de glutaraldehído al 2,5% a diferentes temperaturas, tiempos de tratamiento y proporciones humatos/enzima.	208
Tabla 4.18. Efecto del tiempo de tratamiento sobre la inmovilización de β-glucosidasa a 45°C por entrecruzamiento con humatos edáficos (1/1) a través de glutaraldehído al 5,0%.	210
Tabla 4.19. Estabilidad térmica de β-glucosidasa entrecruzada con humatos edáficos (1/1) a través de glutaraldehído al 1,0%.	212

Tabla 4.20.	Estabilidad operacional de β -glucosidasa libre e inmovilizada por humatos (proporción 1/1) a través de glutaraldehído al 1,0%.	213
Tabla 4.21.	Estabilidad térmica del copolímero sintético β -glucosidasa-resorcinol.	217
Tabla 4.22.	Relación logarítmica entre la actividad de la β -glucosidasa libre e inmovilizada por copolimerización fenólica y el tiempo de incubación a distintas temperaturas.	218
Tabla 4.23.	Vida media de la β -glucosidasa libre e inmovilizada por copolimerización fenólica.	218
Tabla 4.24.	Estabilidad operacional de la β -glucosidasa libre e inmovilizada por copolimerización fenólica en medios edáficos.	221
Tabla 4.25.	Cinética de β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato y de poliacrilamida.	228
Tabla 4.26.	Constantes cinéticas de Michaelis de β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato y poliacrilamida.	229
Tabla 4.27.	Efecto del pH sobre la actividad β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato y de poliacrilamida.	232
Tabla 4.28.	Influencia de la temperatura de incubación sobre la actividad β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato y poliacrilamida.	234
Tabla 4.29.	Estabilidad térmica de β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato y de poliacrilamida (pretratamiento térmico de 1 h).	236
Tabla 4.30.	Relación logarítmica entre la actividad de la β -glucosidasa y el tiempo de incubación a distintas temperaturas.	239
Tabla 4.31.	Relación logarítmica entre la actividad de la β -glucosidasa inmovilizada en geles de alginato y el tiempo de incubación a distintas temperaturas.	240
Tabla 4.32.	Relación logarítmica entre la actividad de la β -glucosidasa inmovilizada en geles de poliacrilamida y el tiempo de incubación a distintas temperaturas.	241
Tabla 4.33.	Vida media de β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato y de poliacrilamida a diferentes temperaturas.	242
Tabla 4.34.	Estabilidad frente a pronasa de la β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato y de poliacrilamida.	243
Tabla 4.35.	Estabilidad operacional de β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato y de poliacrilamida.	245
Tabla 4.36.	Composición química de la paja de trigo.	249
Tabla 4.37.	Espectro de UV de los filtrados de paja de trigo procedentes de los distintos pretratamientos.	254
Tabla 4.38.	Efecto de la temperatura sobre la hidrólisis enzimática de celulosas comerciales.	260
Tabla 4.39.	Efecto de la temperatura sobre la sacarificación de celulosas comerciales.	262
Tabla 4.40.	Efecto de la temperatura sobre la hidrólisis enzimática de paja de trigo.	264
Tabla 4.41.	Efecto de la temperatura sobre la sacarificación de paja de trigo.	265
Tabla 4.42.	Efecto del pH sobre la hidrólisis de celulosas comerciales.	269
Tabla 4.43.	Efecto del pH sobre la sacarificación de celulosas comerciales.	270

Tabla 4.44. Efecto del pH sobre la hidrólisis de paja de trigo.	271
Tabla 4.45. Efecto del pH sobre la sacarificación de paja de trigo.	273
Tabla 4.46. Efecto de la proporción de enzimas celulolíticos sobre la producción de azúcares reductores en la hidrólisis de celulosas comerciales.	276
Tabla 4.47. Efecto de la proporción de enzimas celulolíticos sobre la sacarificación de celulosas comerciales.	278
Tabla 4.48. Efecto de la proporción de enzimas celulolíticos sobre la producción de glucosa en la hidrólisis de celulosas comerciales.	279
Tabla 4.49. Efecto de la proporción de enzimas celulolíticos sobre la producción de azúcares reductores en la hidrólisis de paja de trigo.	282
Tabla 4.50. Efecto de la proporción de enzimas celulolíticos sobre la sacarificación de paja de trigo.	283
Tabla 4.51. Efecto de la proporción de enzimas celulolíticos sobre la producción de glucosa en la hidrólisis enzimática de paja de trigo.	284
Tabla 4.52. Efecto de la concentración de las celulosas comerciales sobre su velocidad de hidrólisis enzimática.	289
Tabla 4.53. Efecto de la concentración de las celulosas comerciales sobre los niveles de sacarificación enzimática.	290
Tabla 4.54. Efecto de la concentración de paja sobre la velocidad de hidrólisis enzimática.	292
Tabla 4.55. Efecto de la concentración de paja sobre los niveles de sacarificación enzimática.	293
Tabla 4.56. Cinética de la hidrólisis enzimática de celulosas comerciales.	300
Tabla 4.57. Cinética de la hidrólisis enzimática de paja de trigo.	301
Tabla 4.58. Constantes cinéticas referidas a la hidrólisis enzimática de celulosas comerciales.	302
Tabla 4.59. Constantes cinéticas referidas a la hidrólisis enzimática de paja de trigo.	302
Tabla 4.60. Hidrólisis de celulosas comerciales con enzimas inmovilizados.	311
Tabla 4.61. Sacarificación enzimática de celulosas comerciales hidrolizadas con enzimas inmovilizados.	312
Tabla 4.62. Hidrólisis de paja de trigo con enzimas inmovilizados.	313
Tabla 4.63. Sacarificación enzimática de paja de trigo hidrolizada con enzimas inmovilizados.	314

7.4. LISTADO DE FIGURAS

Fig. 2.1. Ilustración esquemática de la estructura de tejidos leñosos.	32
Fig. 2.2. Mecanismos de degradación de celulosa por hongos.	47
Fig. 2.3. Mecanismo de acción sinérgica de celulasa de <i>P. pinophilum</i> .	58
Fig. 2.4. Esquema de los principales aspectos estructurales del celulosoma de las cepas JW20 e YM4 de <i>C. thermocellum</i> y de las relaciones estructura inherente-función.	64
Fig. 2.5. Procesos fisico-químicos para el aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos.	71
Fig. 2.6. Etapas en la obtención de etanol y SCP.	72
Fig. 2.7. Clasificación de los métodos de inmovilización de enzimas.	83
Fig. 2.8. Esquema del atrapamiento de enzimas en geles de poliacrilamida.	87
Fig. 2.9. Estructura química de alginatos.	89
Fig. 2.10. Formación de una base de Schiff entre el glutaraldehído y los grupos amino del enzima.	96
Fig. 2.11. Reacción de adición conjugada de grupos amino del enzima a los dobles enlaces etilénicos de los oligómeros α,β -insaturados de las soluciones de glutaraldehído comercial.	97
Fig. 2.12. Síntesis de complejos hímico-enzima usando monofenoles como resorcinol, tirosina y guayacol. La actividad del complejo formado es comparada con la del enzima libre y la estabilidad ensayada frente a elevadas temperaturas y proteolisis.	101
Fig. 2.13. Efecto del proceso de inmovilización sobre las características intrínsecas de los enzimas.	104
Fig. 2.14. Representación de la estabilidad de preparaciones de enzima inmovilizado (1) y libre (2) (soluble) con el tiempo. La preparación inmovilizada es frecuentemente más estable que la del enzima libre y además existe un periodo durante el cual no parece existir pérdida de actividad enzimática.	107
Fig. 3.1. Curva de calibrado de pNP.	141
Fig. 3.2. Fases de la degradación de materiales lignocelulósicos.	153
Fig. 3.3. Curva de calibrado de glucosa (determinación de azúcares reductores).	167
Fig. 3.4. Curva de calibrado de glucosa (determinación de glucosa).	169
Fig. 4.1. Influencia del tiempo de tratamiento sobre la inmovilización de β -glucosidasa en geles de alginato de calcio de diferentes concentraciones de alginato.	181
Fig. 4.2. Efecto de la concentración de acrilamida y BIS sobre la inmovilización de β -glucosidasa en geles de poliacrilamida.	183
Fig. 4.3. Influencia de la presencia de celobiosa sobre el atrapamiento de β -glucosidasa en geles de poliacrilamida.	186
Fig. 4.4. Influencia de la concentración de enzima sobre la inmovilización de β -glucosidasa en geles de poliacrilamida.	187
Fig. 4.5. Influencia de la proporción humatos/enzima (p/p) sobre la inmovilización de β -glucosidasa en humatos edáficos a diferentes temperaturas y tiempos de tratamiento.	196
Fig. 4.6. Influencia de la temperatura sobre la inmovilización de β -glucosidasa por entrecruzamiento con humatos a través de glutaraldehído al 1,0% a diferentes proporciones humatos/enzima.	203
Fig. 4.7. Influencia de la temperatura sobre la inmovilización de β -glucosidasa por entrecruzamiento con humatos a través de glutaraldehído al 2,5% a diferentes proporciones humatos/enzima.	209
Fig. 4.8. Estabilidad térmica de β -glucosidasa entrecruzada con humatos a través de	211

glutaraldehído al 1,0% (proporción humatos/enzima de 1/1, temperatura 45°C y 2 h de tratamiento).	
Fig. 4.9. Estabilidad operacional de β -glucosidasa libre e inmovilizada con humatos a través de glutaraldehído al 1,0% (H-E-G) (condiciones de inmovilización 2 h de tratamiento y 45°C).	214
Fig. 4.10. Estabilidad térmica del copolímero β -glucosidasa-resorcinol.	217
Fig. 4.11. Relación logarítmica entre la actividad β -glucosidasa libre e inmovilizada por copolimerización fenólica y el tiempo de incubación a diferentes temperaturas.	219
Fig. 4.12. Estabilidad operacional en medios edáficos de β -glucosidasa libre e inmovilizada por copolimerización fenólica con resorcinol.	220
Fig. 4.13. Representación de Lineweaver-Burk para la cinética de β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato y de poliacrilamida.	228
Fig. 4.14. Curvas pH-actividad para β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato y de poliacrilamida.	231
Fig. 4.15. Influencia de la temperatura de incubación sobre la actividad β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato y de poliacrilamida.	234
Fig. 4.16. Estabilidad térmica de β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato y de poliacrilamida (pretratamiento térmico de 1 h).	236
Fig. 4.17. Relación logarítmica entre la actividad β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato y de poliacrilamida.	238
Fig. 4.18. Estabilidad de β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato y poliacrilamida frente a pronasa.	244
Fig. 4.19. Estabilidad operacional de β -glucosidasa libre e inmovilizada en geles de alginato y de poliacrilamida.	246
Fig. 4.20. Composición química de la paja de trigo sin tratar y sometida a distintos pretratamientos.	252
Fig. 4.21. Espectro UV-Vis de los compuestos liberados durante el pretratamiento de paja con NaOH.	254
Fig. 4.22. Espectro UV-Vis de los compuestos liberados durante el pretratamiento de paja con butilamina.	256
Fig. 4.23. Efecto de la temperatura sobre la degradación enzimática de celulosas comerciales.	259
Fig. 4.24. Efecto de la temperatura sobre la hidrólisis enzimática de paja de trigo nativa y tratada con NaOH y H ₂ O ₂ .	263
Fig. 4.25. Efecto del pH sobre la hidrólisis enzimática de celulosas comerciales.	267
Fig. 4.26. Efecto del pH sobre la hidrólisis enzimática de paja de trigo nativa y tratada con NaOH y H ₂ O ₂ .	272
Fig. 4.27. Efecto de la proporción de enzimas celulolíticos (CMCasa / β -glucosidasa) añadidos sobre la producción de azúcares reductores en la hidrólisis de celulosas comerciales.	277
Fig. 4.28. Efecto de la proporción de enzimas celulolíticos (CMCasa / β -glucosidasa) añadidos sobre la producción de glucosa en la hidrólisis de celulosa comerciales.	280
Fig. 4.29. Efecto de la proporción de enzimas celulolíticos (CMCasa / β -glucosidasa) añadidos sobre la producción de azúcares reductores en la hidrólisis de paja de trigo.	285
Fig. 4.30. Efecto de la proporción de enzimas celulolíticos (CMCasa / β -glucosidasa) añadidos sobre la producción de glucosa en la hidrólisis de paja de trigo.	287

Fig. 4.31. Efecto de la concentración de sustrato sobre la hidrólisis de las celulosas comerciales.	291
Fig. 4.32. Efecto de la concentración de sustrato sobre la hidrólisis de paja de trigo.	295
Fig. 4.33. Cinética de Michaelis-Menten para la degradación enzimática de celulosas comerciales.	299
Fig. 4.34. Cinética de Michaelis-Menten para la degradación enzimática de paja de trigo sin tratar y tratada con NaOH y H ₂ O ₂ .	299
Fig. 4.35. Representaciones de Foster-Nieman para la hidrólisis enzimática de celulosas comerciales.	305
Fig. 4.36. Representaciones de Foster-Nieman para la hidrólisis enzimática de paja sin tratar y tratada con NaOH y H ₂ O ₂ .	306
Fig. 4.37. Degradación de celulosas comerciales (0,5% en p/v) con enzimas inmovilizados.	315
Fig. 4.38. Degradación de paja sin tratar y tratada con NaOH y H ₂ O ₂ con enzimas inmovilizados.	317