

CAPÍTULO IV

ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE LA FIBRA LYOCELL FRENTE A LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA CON CELULASAS

CAPÍTULO IV. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE LA FIBRA LYOCELL FRENTE A LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA CON CELULASAS

IV.1 INTRODUCCIÓN TEÓRICA

La elevada especificidad de las reacciones enzimáticas es sensible a los cambios en las propiedades estructurales de los sustratos celulósicos. Las investigaciones realizadas en este campo^{1,2,3,4} demuestran que las diferencias en las propiedades estructurales (cristalinidad, dimensiones de poro, grado de polimerización,..), entre diversos sustratos celulósicos, influyen en el desarrollo del proceso de degradación enzimática.

La actividad catalítica de la enzima depende tanto de su capacidad de adsorción sobre el sustrato, como de la formación del complejo activo enzima-sustrato. Este último aspecto estará controlado por aquellos factores que afectan a la accesibilidad del sustrato^{5,6}(configuración física, morfología, cristalinidad⁷ y estructura química), a las características de la proteína enzimática^{8,9}, a las concentraciones relativas de sustrato y enzima, así como de los parámetros físicos de reacción como temperatura⁶ y transferencia de masa¹⁰. Además, el tipo de conformación cristalina de la celulosa (celulosa cristalizada I o celulosa cristalizada II) determinará la reactividad de la enzima seleccionada.

La mayoría de los estudios de degradación enzimática se han realizado sobre algodón^{11,12,13,14,15} y en menor proporción sobre el resto de fibras celulósicas¹⁶. Aunque todas presentan la misma composición química, sus diferencias estructurales determinan el proceso de catálisis enzimática.

Para el desarrollo y control de la cinética de hidrólisis enzimática de polímeros celulósicos se deben considerar cuatro factores relevantes: la estructura y propiedades físico-químicas del sustrato celulósico, las propiedades y modo de acción de la enzima de celulasa, el modo de interacción entre las moléculas de enzima y celulosa y las condiciones del medio del sistema reaccionante. Los aspectos particulares de cada uno de ellos se han desarrollado a continuación.

IV.1.1. Estructura del sustrato celulósico

Las fibras de celulosa están constituidas básicamente por regiones cristalinas más o menos ordenadas y regiones amorfas. Modificaciones de la estructura cristalina de estos polímeros producen cambios en la reactividad, propiedades de adsorción, y accesibilidad de la enzima^{17,18}. Por lo tanto la hidrólisis enzimática estará controlada por aquellos factores que afectan a la accesibilidad del sustrato^{5,6}: configuración física, morfología, cristalinidad⁷ y estructura química.

IV.1.2. Propiedades y modo de acción de las celulasas

Las celulasas son proteínas derivadas de los procesos naturales de fermentación, capaces de degradar la celulosa. En realidad, una enzima de celulasa es una mezcla de diversos componentes enzimáticos, formando lo que se denomina un “complejo enzimático”, que actúa de forma sinérgica en la degradación de la celulosa¹⁹. Este complejo enzimático está formado por tres tipos de enzimas: endoglucanasas (EGs) o endocelulasas (β -1,4-D-glucan 4-glucanohidrolasa), celobiohidrolasas (CBHs) o exocelulasas (1,4- β -D-glucan celobiohidrolasa) y β -glucosidasa (BGs) o celobiasa (β -D-glucósido glucohidrolasa).

Mediante un mecanismo de hidrólisis catalítica^{20,21}, todos los componentes de las celulasas producen la rotura del enlace β -1,4-glicosídico del polímero celulósico, aunque cada uno de ellos actúa de forma específica. Las investigaciones actuales proponen el mecanismo de reacción²² que se muestra en la Figura IV. 1.

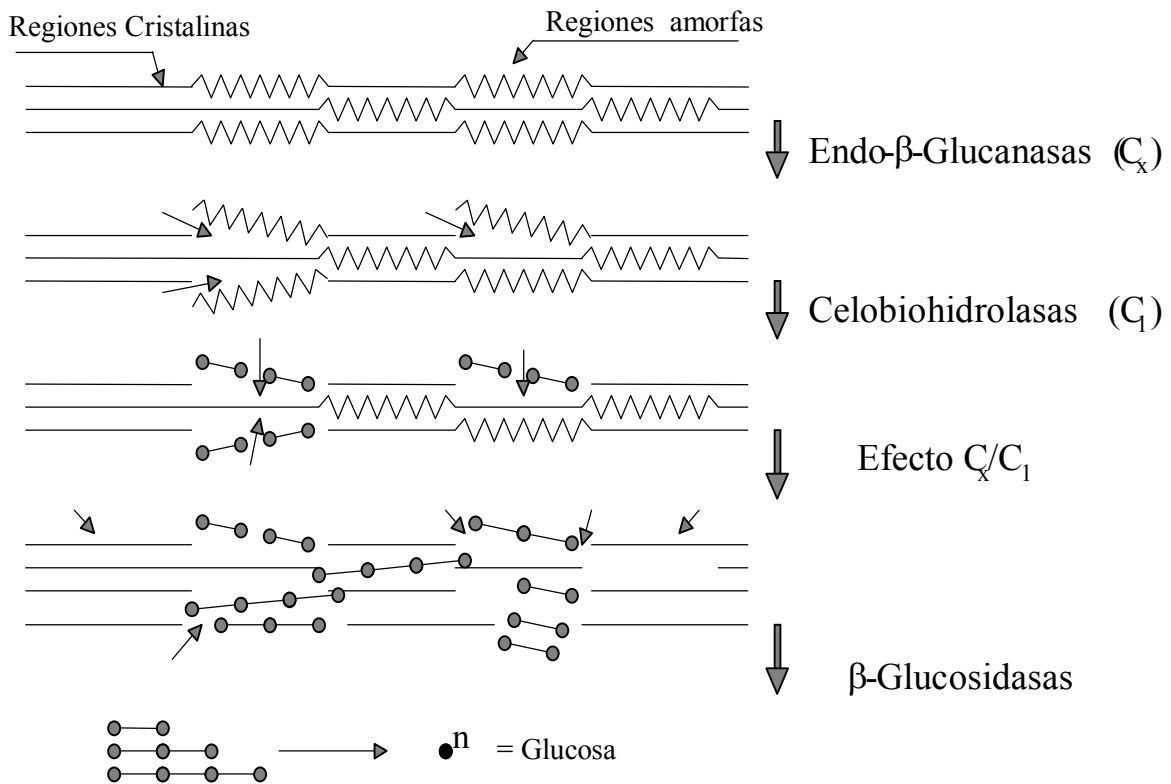


Figura IV. 1. Mecanismo de hidrólisis enzimática de la celulosa²³.

La primera etapa consiste en la degradación hidrolítica de las regiones amorfas, por medio de las endoglucanasas (EGs), que atacan de forma estadística el enlace β -1,4-glicosídico de las regiones amorfas del polímero de celulosa,

produciendo múltiples cadenas de polímeros de diversas longitudes. En la etapa siguiente actúan las celobiohidrolasas (CBs) o exoglucanasas, cuya acción se limita al extremo no reductor de la cadena, presentando una elevada actividad frente a la celulosa amorfa y dando como producto celobiosa (dímero de β -1,4-glucosa). Esta enzima presenta gran afinidad por la celulosa, por lo que también degrada lentamente las cadenas terminales no reductoras de las regiones cristalinas accesibles del polímero, produciendo celobiosa. Finalmente, las β -glucosidasas hidrolizan las cadenas de celobiosa y celooligosacáridos solubles, produciendo glucosa. Este proceso no sólo completa la degradación de la celulosa, sino que elimina la acumulación de celobiosa que actuaría como inhibidor de las celobiohidrolasas, en la segunda etapa del mecanismo de hidrólisis.

Investigaciones recientes han constatado que la hidrólisis enzimática se produce por medio de un mecanismo de catálisis ácida, que se ha esquematizado en la Figura IV. 2²². Este proceso consiste en la hidrólisis del enlace β -1,4-glicosídico. El mecanismo envuelve la donación de un protón al enlace, por medio del grupo carboxílico del ácido glutámico residual, produciendo la rotura del enlace y la estabilización del carbocatión intermedio formado por medio de un grupo nucleofílico residual (ácido aspártico). La secuencia finaliza por el ataque nucleofílico de una molécula de agua, obteniéndose los productos finales de hidrólisis. En función del carbocatión intermedio formado, la configuración del átomo de carbono en el producto puede ser retenida o invertida. El proceso normalmente se interpreta como un mecanismo catalítico de simple o doble desplazamiento, dependiendo de si la configuración es invertida o retenida, respectivamente. En el mecanismo de desplazamiento doble con retención de la configuración, el oxígeno glicosídico es protonado por el catalizador ácido (HA) bajo la asistencia nucleofílica de la base. El producto intermedio es hidrolizado por una molécula de agua. El resultado de esta segunda sustitución nucleófila

genera un producto de la misma estereoquímica que el sustrato. En el mecanismo de inversión, la protonación del oxígeno glicosídico (activado por la base) es acompañada de un ataque simultáneo de la molécula de agua. Se produce un mecanismo de desplazamiento simple que produce la inversión estereoquímica en el producto.

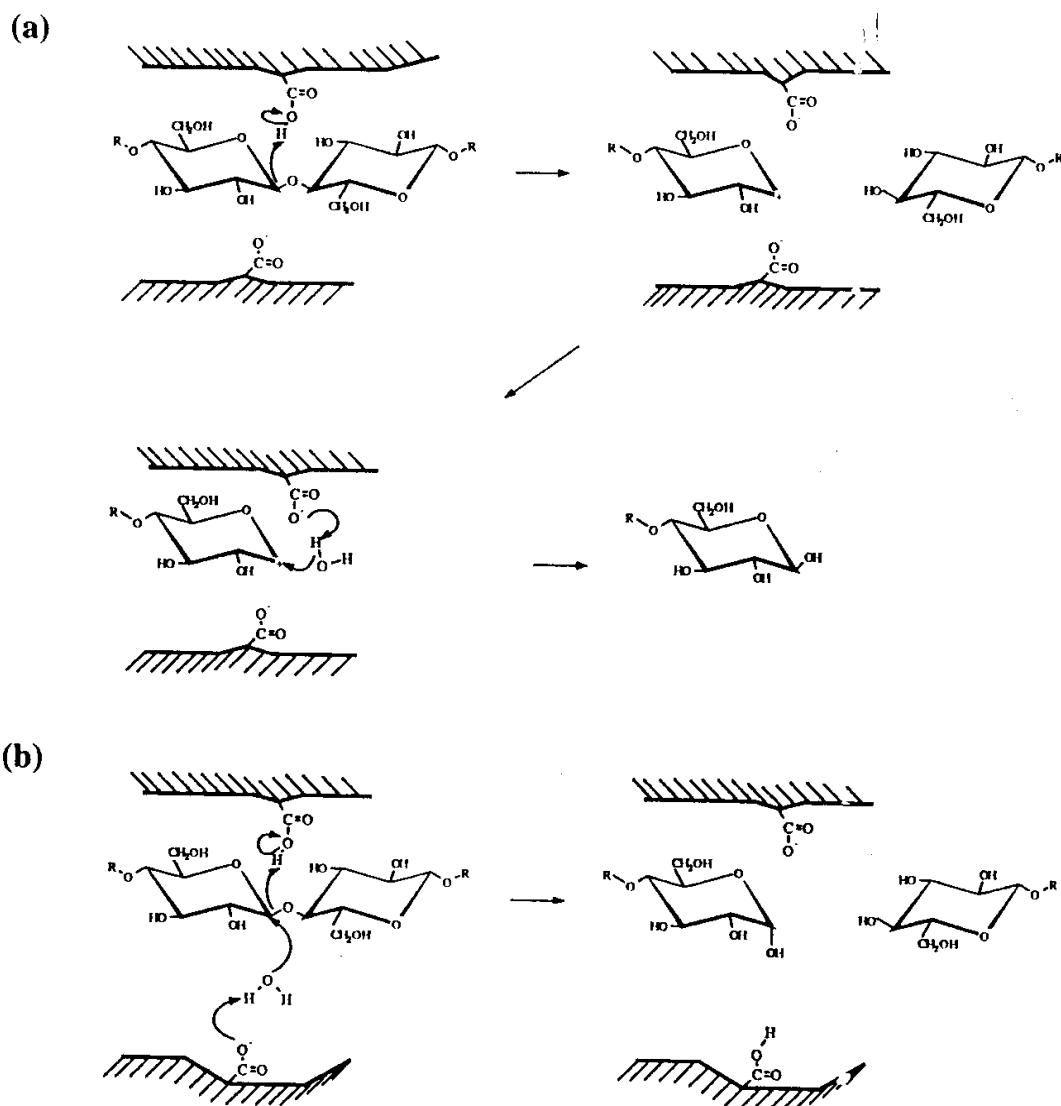


Figura IV. 2. Mecanismos de desplazamiento doble en la hidrólisis enzimática del enlace β -1,4-glicosídico: a) retención de configuración, b) inversión de configuración.

IV.1.3. Interacción enzima-sustrato

Como la celulosa es un sustrato insoluble, sus características cinéticas difieren sustancialmente de las usuales reacciones homogéneas catalizadas por enzimas. En este caso, la hidrólisis enzimática se produce en medio heterogéneo y envuelve las siguientes etapas (*Figura IV. 3*): a) transferencia de las moléculas de enzima (E) de la solución acuosa a la superficie de sustrato de celulosa (S), b) formación del complejo enzima-sustrato (ES), previa adsorción de las moléculas de enzima sobre la celulosa, c) transferencia de las moléculas de agua hacia los centros activos del complejo (ES), d) reacción en la superficie del sustrato y transferencia de los productos solubles (P), glucosa y celobiosa, desde la superficie de la celulosa hasta el baño acuoso, e) descomposición de las cadenas de celobiosa en glucosa por medio de las β -glucosidasas.

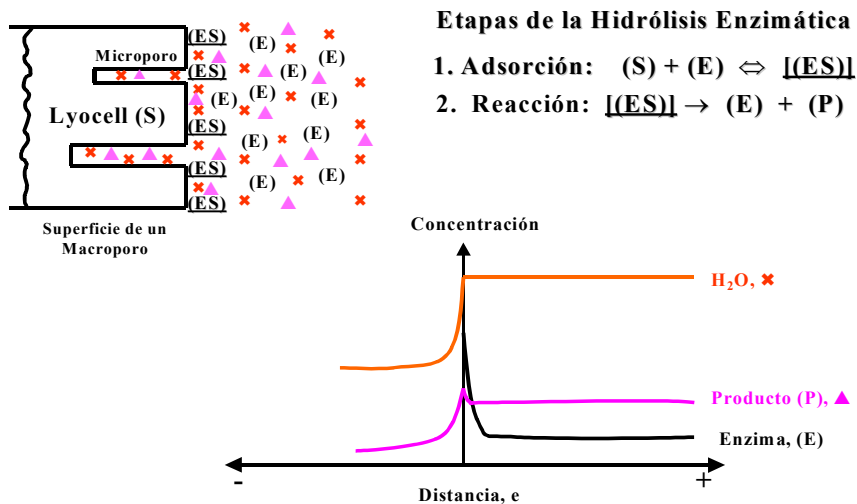


Figura IV. 3. Interacción enzima-sustrato.

IV.1.4. Influencia del medio de reacción

Esta reacción catalítica no sólo se ve afectada claramente por el pH y la temperatura, sino que debe considerarse el efecto que producen la coexistencia de productos químicos en el baño de tratamiento (tensoactivos) o aplicados sobre el sustrato (colorantes).

La especificidad de la catálisis hace que para el caso de las celulasas utilizadas para el tratamiento enzimático, las condiciones óptimas de pH y temperatura sean de 5-6 y 40-50 °C, respectivamente, variando en función del tipo de enzima comercial utilizado. Por lo tanto, la efectividad y reproducibilidad del tratamiento dependerá enormemente del control de estas dos variables. Por este motivo es recomendable el uso de soluciones tampón, que modifican la fuerza iónica del medio, produciendo diferentes efectos sobre la hidrólisis, según el tipo y cantidad de electrolito utilizado.

Estudios recientes han analizado el efecto de la fuerza iónica del medio¹¹ y la presencia de tensoactivos²⁴ sobre la hidrólisis enzimática con celulasas. Los primeros, concluyen que las enzimas son afectadas de forma similar por cada uno de los diferentes electrolitos utilizados y recomiendan el uso de soluciones tampón de aniones monovalentes, en pequeñas concentraciones, para obtener mayor actividad enzimática del complejo de celulasa. El análisis del efecto producido por la presencia de agentes tensoactivos muestra que los tensoactivos aniónicos y catiónicos (iónicos) inhiben la reacción enzimática, mientras que los tensoactivos no iónicos no lo hacen. Estas acciones pueden atribuirse a las interacciones electrostáticas entre los compuestos inhibidores iónicos y la enzima de celulasa.

IV.1.5. Cinética de hidrólisis enzimática

Como la celulosa es un sustrato insoluble, sus características cinéticas difieren sustancialmente de las usuales reacciones homogéneas catalizadas por enzimas. La hidrólisis de un sustrato insoluble de celulosa requiere la adsorción previa de la enzima sobre el mismo. El proceso de adsorción/desorción puede ser descrito según:

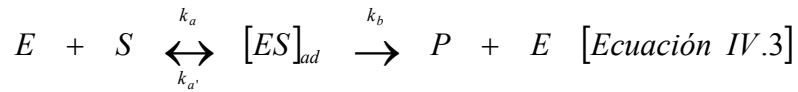


donde: E, representa la concentración de enzima, S, la del sustrato, $(ES)_{ad}$, la concentración de enzima adsorbido sobre el sustrato, y k_1 y k_2 , son las constantes para la adsorción y desorción, respectivamente. Esta etapa de adsorción ha sido modelizada, por numerosos autores, por medio de la isoterma de Langmuir o por modificaciones de ésta^{25,26,27}. Si consideramos la relación k_1/k_2 igual a la constante de adsorción K_{12} , el modelo de Langmuir puede escribirse:

$$E_{ad} = \frac{E_{sat} K_{12} E_f}{1 + K_{12} E_f} \quad [Ecuación IV.2]$$

donde: E_{ad} , representa la concentración de enzima adsorbido en el equilibrio, E_{sat} , la cantidad de enzima adsorbido a saturación y E_f , la concentración de enzima libre en disolución en el equilibrio.

La ecuación cinética de Michaelis-Menten asume que la formación del complejo enzima-sustrato (ES) es un requisito previo para la reacción enzimática:



donde: k_a y $k_{a'}$, representan las constantes directa y reversible de formación del complejo activado, respectivamente, k_b , la velocidad de reacción y P, el producto de reacción.

Si la relación enzima/sustrato es pequeña y las concentraciones de sustrato están comprendidas entre los límites de saturación, la velocidad de reacción inicial (v) puede expresarse:

$$v = \frac{V_m[S]}{K_m + [S]} \quad [\text{Ecuación IV.4}]$$

donde: V_m , representa la velocidad máxima de reacción (a saturación de enzima) y K_m , la constante media de saturación ($K_m = (k_{a'} + k_b)/k_a$)

La aplicación de la ecuación clásica de Michaelis-Menten permite calcular los parámetros de velocidad máxima de hidrólisis a saturación ($V_{m\max}$) y la constante de media saturación (K_m), que proporcionan información útil sobre el mecanismo de hidrólisis. Sin embargo, tal y como propone Bailey²⁸, si tenemos en cuenta que la reacción se produce en un sólido hidratado, en el que es prácticamente imposible cambiar la concentración de los lugares específicos del sustrato, parece más conveniente establecer la velocidad de hidrólisis en función de la concentración de enzima que en función de la concentración de sustrato, tal y como lo expresa la ecuación de Michaelis-Menten. Además, teniendo en cuenta que el efecto sinérgico del complejo enzimático desaparece a altas concentraciones de enzima²⁹, como las utilizadas normalmente en el ámbito industrial, parece apropiado expresar la velocidad de reacción en función de la concentración de enzima. De forma análoga a la ecuación propuesta por

Michaelis-Menten se puede calcular una velocidad máxima de hidrólisis a saturación ($V_{e\text{máx}}$) y una constante de media saturación (K_e), según la Ecuación IV.5.

$$v_0 = \frac{V_{e\text{máx}}[E_0]}{k_e + [E_0]} \quad [\text{Ecuación IV.5}]$$

donde:

v_0 : velocidad inicial de hidrólisis.

$V_{e\text{máx}}$: velocidad máxima de hidrólisis a saturación de enzima.

K_e : constante de media saturación.

$[E_0]$: concentración inicial de enzima.

La modelización de la cinética de hidrólisis, incluyendo la etapa adsorción de enzima, ha ocupado un gran número de trabajos entre los que podemos destacar los de: Converse y colaboradores³⁰, Lee y Fan³¹, Holtzaple y colaboradores³² y Nidetzky y Steiner²³. Todos estos modelos asumen que la velocidad inicial de hidrólisis es proporcional a la concentración del complejo enzima-sustrato formado. La teoría de la existencia de dos fases distintas en la celulosa, con diferente susceptibilidad al ataque enzimático, ha sido propuesta por Sattler³³, Wald¹⁷ y González³⁴, y proporciona modelos empíricos útiles para la predicción del comportamiento cinético.

IV.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

A continuación se describen las consideraciones, para el desarrollo del procedimiento experimental, correspondientes a los tratamientos enzimáticos realizados sobre las materias objeto de estudio.

IV.2.1. Materiales

Para el desarrollo de la parte experimental, se utilizarán fibras de lyocell, de denominación comercial Tencel[®], suministradas por Tencel Ltd (Acordis) con una densidad lineal media de 1,7 dtex (0,17g/1000m). Se dispondrá también como referencia de muestras de fibras de viscosa y modal, obtenidas por el proceso tradicional del xantato de celulosa, suministradas por Lenzing A.G., con una densidad lineal de 1,7 dtex (0,17g/1000m).

Para evitar la influencia incontrolada de posibles sustancias añadidas se procedió, como tratamiento previo, a purificar las fibras mediante un lavado en una disolución conteniendo un detergente no iónico, con objeto de no variar las características de las mismas. El lavado se realizó con 1 g/L de Sandozina NIA (Clariant), a 60 °C durante 60 minutos, con una relación de baño 1/12. Se efectuaron varios aclarados y finalmente se secaron las muestras a temperatura ambiente. Las muestras se dispusieron en una estufa a 40 °C durante 24 h y se almacenaron en un desecador hasta la pesada final.

IV.2.2. Enzima de celulasa

La enzima utilizada corresponde a un preparado comercial de celulasa ácida, suministrado por Novozymes A/S, con la denominación comercial de Cellusoft Plus L (CAS 9012-54-8 y EC 3.2.1.4). Cellusoft Plus L es un preparado de celulasa líquido producido mediante fermentación sumergida de un hongo no patógeno modificado genéticamente. La enzima fue utilizada en su forma comercial, es decir, sin purificación previa. Las especificaciones comerciales del producto enzimático son las siguientes:

- Identificación de la preparación:

IDENTIFICACIÓN	
Nombre comercial	Cellusoft Plus L
Descripción	Preparación enzimática líquida
Aspecto	Líquido marrón
Sociedad responsable	Novozymes A/S

- Información sobre los componentes:

COMPONENTES	
Naturaleza química	Proteína enzimática
Denominación	Celulasa
Componentes peligrosos	Proteína enzimática (10-40%)
Clasificación	Xn (nocivo), R-42
Límite de exposición	No establecido

- Condiciones óptimas de trabajo:

CONDICIONES ÓPTIMAS	
Rango de pH	5,5 – 6,5
Temperatura	40 – 55 °C

La densidad del preparado enzimático se determinó experimentalmente, con picnómetro, obteniendo los siguientes resultados experimentales:

Tabla IV. 1. Densidad de la enzima de celulasa.

Prueba	$m_{\text{picnóm}} \text{ (g)}$	$m_{\text{pic+agua}} \text{ (g)}$	$m_{\text{pic+enzim}} \text{ (g)}$	$m_{\text{agua}} \text{ (g)}$	$M_{\text{enzima}} \text{ (g)}$	$\rho_{\text{enzima}} \text{ (g/mL)}$	$\rho_{\text{enzima media}} \text{ (g/mL)}$
1	11,704	22,327	24,631	10,623	12,927	1,2168	1,2168
2	11,705	22,328	24,632	10,623	12,927	1,2168	
3	11,705	22,326	24,629	10,621	12,924	1,2168	

La actividad enzimática global del preparado enzimático de celulasa se determinó experimentalmente, según el método propuesto por Mandels y colaboradores³⁵, expresando el resultado en unidades de papel de filtro, F.P.U. Los resultados experimentales de absorbancia, determinados según se ha detallado en el apartado IV.2.4. Métodos analíticos de control, han sido:

Tabla IV. 2. Absorbancia corregida a 540 nm: determinación de la actividad enzimática.

Muestra	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Media
0,25 g/L	0,937	0,930	0,936	0,934

A partir de la recta de calibrado obtenida en el mismo apartado referenciado anteriormente, se determina el carácter reductor, expresándolo como concentración de glucosa ([G]), y con éste se calcula la actividad enzimática:

$$A_b = 0,7994 [G] + 0,0106$$

$$[G] = \frac{(0,934 - 0,1114)}{0,7679} = 1,361 \text{ g/L}$$

$$FP = 0,005 \text{ L} \times 1,361 \text{ g/L} = 6,807 \text{ mg}$$

$$FPU = \frac{6,807 \text{ mg}}{60 \text{ s} \times 0,18 \text{ mg/mol}} = 0,63 \text{ FPU}$$

Por lo tanto, la actividad enzimática es de 505,1 FPU/g, donde las siglas FPU representan la denominación: “Unidades de Papel de Filtro”.

IV.2.3. Hidrólisis enzimática

Los tratamientos enzimáticos sobre las fibras se han realizado en las condiciones óptimas de trabajo de la enzima utilizada, correspondientes a la temperatura de 50 °C y pH = 6 (solución reguladora de acetato sódico 0,05 M). Para ello, se utilizó un reactor, sumergido en un baño termostático, con agitación mecánica (300 rpm) y relación de baño (w/v) 1/80. En éste, 2,5 g de fibra se trataron con disoluciones de 6, 12,5, y 25 g/L del complejo enzimático de celulasa, durante 155 minutos. Finalizada la hidrólisis, se desactivó la enzima por aumento de la temperatura a 80 °C durante 15 minutos. Las experiencias se efectuaron por triplicado, siendo el resultado final la media de los resultados obtenidos.

El pH de la disolución reguladora y del baño en el reactor se ha controlado con un pHmetro electrónico CRISON, modelo micropH 2000.

La agitación del reactor se llevó a cabo con un agitador Heidolph, modelo RZR-2050 electrónico, de 80 W de potencia y con una velocidad 100 rpm.

IV.2.4. Métodos analíticos de control de la hidrólisis

Adsorción de enzima

Durante los tratamientos enzimáticos, el seguimiento de la cantidad de enzima de celulasa adsorbida sobre las fibras se ha realizado mediante la cuantificación de la cantidad de proteína libre en el baño, por aplicación del método descrito por Bradford³⁶. Este método está basado en el enlace de la enzima con el colorante Azul Brillante Coomassie G-250 que produce un incremento de la absorbancia a 595 nm.

El reactivo de análisis se preparó disolviendo 100 mg del colorante Azul Brillante Coomassie G-250 en 50 mL de etanol (95 % de pureza). A esta disolución se le añadieron 100 mL de ácido fosfórico (85 % w/v). La solución resultante se diluyó hasta un volumen final de 1 litro, con disolución tampón de acetato sódico 0,05 M (pH = 6,0), determinándose el pH con el aparato CRISON, micropH 2000.

El procedimiento experimental consistió en añadir a 0,1 mL de muestra a analizar, 5 mL del reactivo preparado. Se homogeneizó y se dejó actuar durante 15 minutos. Finalmente, se determinó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-240.

La curva de calibrado se preparó tomando como referencia el propio complejo enzimático de celulasa comercial. Para ello, se prepararon disoluciones de concentración conocida del enzima: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 g/L, utilizando como disolvente una disolución tampón de acetato sódico 0,05 M. Se aplicó el procedimiento analítico descrito anteriormente a 0,1 mL de muestra, determinando la absorbancia a 595 nm, que será corregida por el blanco. El ensayo se realizó por triplicado y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IV. 3.

Tabla IV. 3. Resultados, corregidos por el blanco, de la curva de calibrado para la determinación de proteína enzimática.

[Enzima] (g/mL)	A corregida A_b
2	0,0310
4	0,0553
6	0,0833
8	0,1095
10	0,1335
12	0,1660

En la Figura IV. 4 se ha representado gráficamente la curva de calibrado para los valores medios de los valores de absorbancia corregidos por el blanco (A_b), en función de la concentración de enzima (g/mL). Como podemos observar, la curva de calibrado tiene un comportamiento lineal, dentro de los márgenes establecidos experimentalmente, y la relación es la siguiente:

$$A_b = 0,0134 * [\text{enzima}] + 0,0028 \quad (r^2 = 0,9984)$$

donde: A_b , representa el valor de absorbancia, corregido por el blanco y determinado espectrofotométricamente a la longitud de onda de 595 nm, $[\text{enzima}]$, el valor de la concentración de enzima comercial de la disolución, expresado en g/mL y r^2 , el valor de coeficiente de correlación.

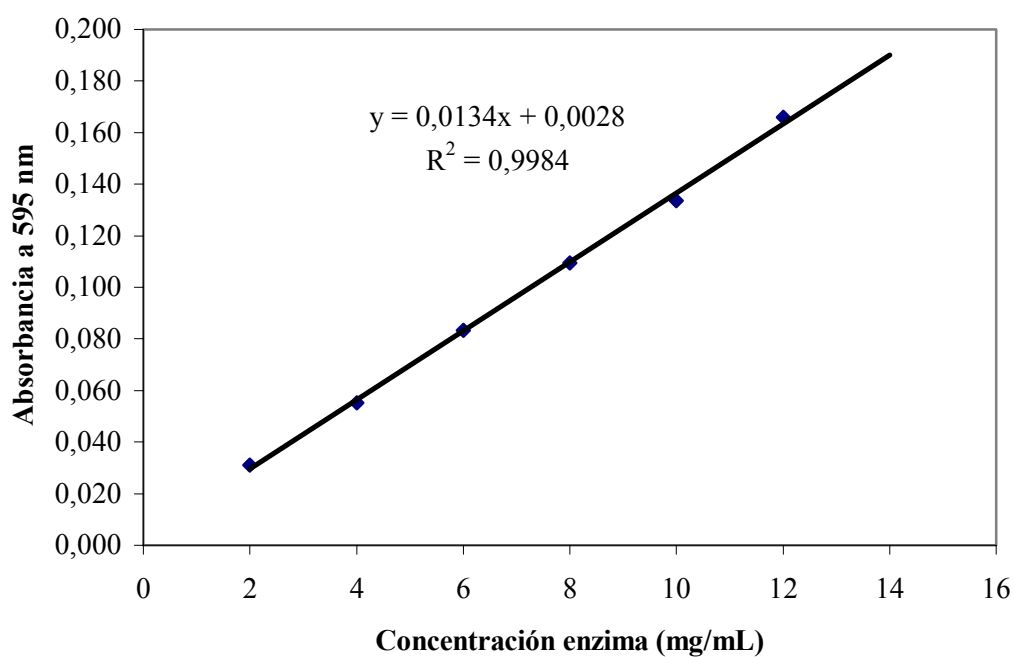


Figura IV. 4. Curva de calibrado para la determinación de proteína enzimática.

Carácter reductor

El seguimiento de la velocidad de hidrólisis enzimática se ha controlado por medio de la determinación del contenido de azúcares reductores solubles (P, g/mL), producidos en el baño residual a diferentes tiempos. Para ello, se ha utilizado ácido dinitrosalicílico (DNS)³⁷, como reactivo sensible a los productos de reacción, empleando glucosa como reactivo patrón para la obtención de la curva de calibrado del método. Este procedimiento se fundamenta en la reacción de los grupos reductores de los productos de la reacción catalítica, con el reactivo oxidante ácido dinitrosalicílico (DNS).

El reactivo consiste en una disolución formada por los siguientes compuestos: ácido dinitrosalicílico (ácido 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzónico), que actúa como oxidante; Sal de Rochelle (tartrato sódico-potásico), que impide la disolución de oxígeno en el reactivo y hidróxido sódico, que aporta el medio requerido para que se produzca la reacción redox. De esta forma, el ácido 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzónico se reduce, en presencia del grupo reductor de la glucosa, formando el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, mientras que el grupo aldehído reductor se oxida, para formar un grupo carboxílico. En este método analítico el DNS está en exceso frente a los grupos reductores y en todas las muestras se adiciona la misma cantidad, de tal forma que mayores concentraciones de azúcares reductores provocan una mayor coloración de la muestra. Estas diferencias de coloración pueden determinarse por espectrofotometría visible, a la longitud de onda de máxima absorbancia de 540 nm.

Este método analítico, para la determinación de azúcares reductores, se fundamenta en el hecho de que una unidad de celulasa (IU) genera un micromol de azúcares reductores, expresados como glucosa, en 1 minuto, bajo las condiciones del método. El procedimiento analítico experimental se describe a continuación:

a) Condiciones de trabajo:

- Temperatura: 50 °C.
- Medio: Disolución tampón de acetato sódico 0,05 M, pH = 6.

b) Reactivos:

- D(+)-Glucosa anhidra para análisis, $C_6H_{12}O_6$.
- Acetato sódico para análisis, CH_3COONa , 98% de riqueza.
- Ácido dinitrosalicílico (2-hidroxi-3,5-dinitrobenzónico) puro, $C_7H_4N_2O_7$.
- Sal de Rochelle (tartrato de sodio y potasio 4-hidrato) para análisis, $NaK(COO)_2(CHOH)_2 \cdot 4H_2O$.
- Hidróxido sódico, NaOH.

c) Materiales y equipo:

- Espectrofotómetro Shimadzu UV-240.
- pH-metro Crison micropH 2000.
- Baño termostático a 50 y 100 °C.

d) Preparación del reactivo: ácido dinitrosalicílico (DNS) al 1%:

Se disuelven en un vaso de precipitado, con ayuda de un agitador magnético, 20,0 g de ácido 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzónico en 800 mL de agua desionizada. Posteriormente, se adicionan gradualmente 300 mL de una disolución de NaOH, preparada previamente (32,0 g/ 300 mL de agua desionizada). Se calienta la

disolución obtenida, en un baño de agua termostático a 50 °C, hasta que la solución se aclare. Se añaden gradualmente 600 g de Sal de Rochelle (tartrato sódico-potásico). La disolución se enfría hasta la temperatura ambiente y se diluye con agua desionizada hasta 2 litros. La disolución se deja en reposo durante la noche, filtrando la solución a través de un crisol de placa porosa. La disolución obtenida puede utilizarse durante 2 meses si se guarda en la oscuridad y a temperatura ambiente.

e) Medida de absorbancia:

Las absorbancias se determinaron con el espectrofotómetro, de doble haz, Shimadzu UV-240, a temperatura ambiente y a la longitud de onda de 540 nm.

f) Preparación de la curva de calibrado:

La curva de calibrado se determinó tomando como referencia el reactivo anhidro-glucosa. Se prepararon disoluciones con concentraciones conocidas de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 mg de glucosa/mL, en medio tampón (acetato sódico 0,05 M), pH = 6, determinando el contenido de azúcares reductores, según el procedimiento experimental siguiente:

- Se toman 1,0 mL de cada una de las soluciones estándar preparadas, en tubos de ensayo individuales, y seguidamente se añaden 3,0 mL de la solución tampón de acetato sódico, realizando el ensayo por triplicado.

-Para el ensayo del blanco, se realiza el ensayo, por triplicado, sobre 4,0 mL de la disolución tampón de acetato 0,05 M.

- Se añaden, 6,0 mL de la disolución del reactivo DNS preparado, agitando para la homogeneización de la mezcla.

- Se mantienen los tubos en un baño de agua a ebullición durante 5 minutos exactos, enfriándolos posteriormente en un baño de hielo, durante 10 minutos.

- Finalmente, después del acondicionamiento de las mezclas a temperatura ambiente, se determina la absorbancia a 540 nm, realizando la curva de calibrado del método.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IV. 4 y la curva de calibrado se ha representado en la Figura IV. 5. La relación lineal entre la absorbancia corregida por el blanco (A_b) y la concentración de glucosa (g/mL) puede expresarse:

$$A_b = 0,7679*[Glucosa] - 0,1114 \quad (r^2 = 0,9990)$$

donde: A_b , representa el valor de absorbancia a 540 nm corregido, [Glucosa], la concentración de glucosa expresada en g/mL y r^2 , es el valor de coeficiente de correlación.

Tabla IV. 4. Resultados de la curva de calibrado para el análisis de azúcares reductores

[Glucosa] (g/mL)	Absorbancia	Valor medio	A corregida A_b
0,2	0,137, 0,146, 0,140	0,1410	0,0523
0,4	0,281, 0,273, 0,266	0,2733	0,1847
0,6	0,450, 0,424, 0,425	0,4330	0,3443
0,8	0,594, 0,596, 0,567	0,5857	0,4970
1	0,750, 0,727, 0,790	0,7557	0,6670
1,2	0,957, 0,895, 0,880	0,9107	0,8220
1,4	1,083, 1,020, 1,023	1,0420	0,9533
Blanco	0,087, 0,094, 0,085	0,0886	0

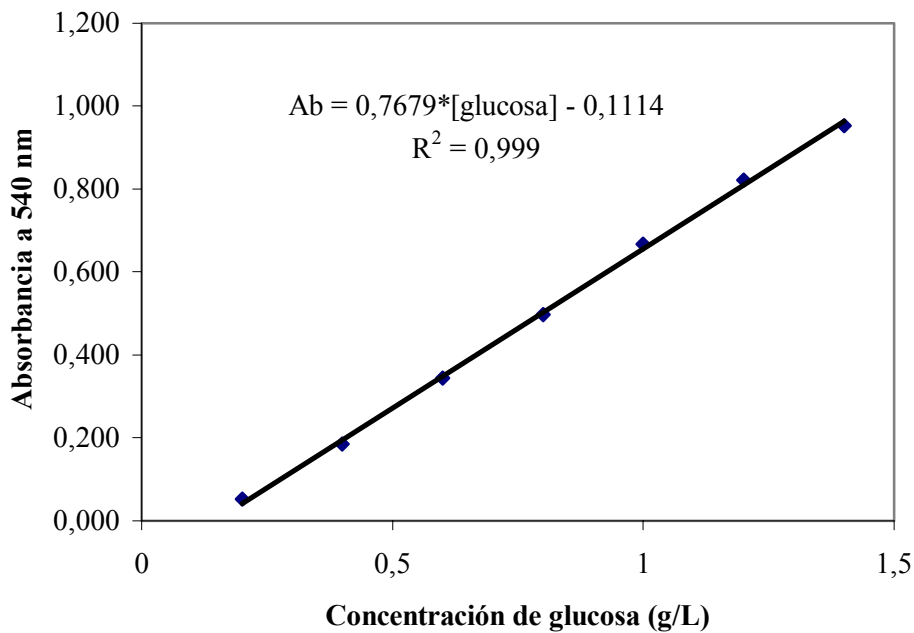


Figura IV. 5. Curva de calibrado del método analítico empleado para la determinación de azúcares reductores (P, g/mL).

g) Determinación del contenido de azúcares reductores del baño de hidrólisis y cálculo del grado de hidrólisis:

Para la determinación del carácter reductor de las muestras extraídas durante la hidrólisis enzimática, se procedió de la forma indicada en el apartado anterior, para la preparación de la recta de calibrado, aplicando el método de análisis sobre 1 mL de muestra del baño y realizando el análisis por triplicado.

El grado de hidrólisis de la fibra (%H), expresado como el porcentaje de masa masa inicial del sustrato hidrolizada a glucosa, se ha calculado según la Ecuación IV.6:

$$H(\%) = P.V.100 /m.k \quad [Ecuación IV.6]$$

Donde: P, representa la concentración de azúcares reductores como glucosa (g/L), V, el volumen del baño de tratamiento, “m”, la masa en estado seco inicial de fibra (g) y k, el factor que considera la diferencia de masa entre el anillo glucosa y el de anhidroglucosa (k = 180/162).

IV.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla IV. 5 y en la Figura IV. 6 se muestran los resultados, valor promedio de tres analíticas, de la evolución de la cantidad de enzima adsorbida sobre la fibras de lyocell, modal y viscosa, en función del tiempo.

Tabla IV. 5. Concentración de enzima adsorbido: $[E]_0=12,5$ g/L, pH 5.0, 50 °C, R/B 1/80.

	Concentración de enzima adsorbido, en g/g de fibra				
	0 min	15 min	30 min	60 min	155 min
LYOCELL	0,000	0,084 ±0,0084	0,137 ±0,0422	0,143 ±0,0338	0,131 ±0,0169
Modal	0,000	0,146 ±0,0422	0,270 ±0,0169	0,278 ±0,0169	0,266 ±0,0338
Viscosa	0,000	0,167 ±0,0169	0,305 ±0,0084	0,300 ±0,0084	0,293 ±0,0084

Durante el proceso de adsorción pueden distinguirse dos fases. Hasta aproximadamente 30 minutos, se produce una rápida adsorción inicial de enzima, mientras que posteriormente el proceso predominante corresponde a una ligera desorción progresiva (30 – 150 min), como consecuencia de que la hidrólisis del

sustrato empieza a ser predominante, modificándose consecuentemente la superficie de la fibra accesible al enzima. Aunque las dos etapas se ponen de manifiesto para todas las muestras, la capacidad adsorbente es función de la estructura fina y morfología de las fibras. La adsorción de enzima es máxima para la fibra de viscosa que es la que presenta menor grado de polimerización, cristalinidad y orientación respecto a las de modal y lyocell³⁸. Aunque la adsorción máxima de enzima disminuye en el orden: viscosa, modal y lyocell, es decir, en orden creciente de cristalinidad, el tiempo requerido para alcanzar la adsorción máxima de enzima es prácticamente similar en todos los casos.

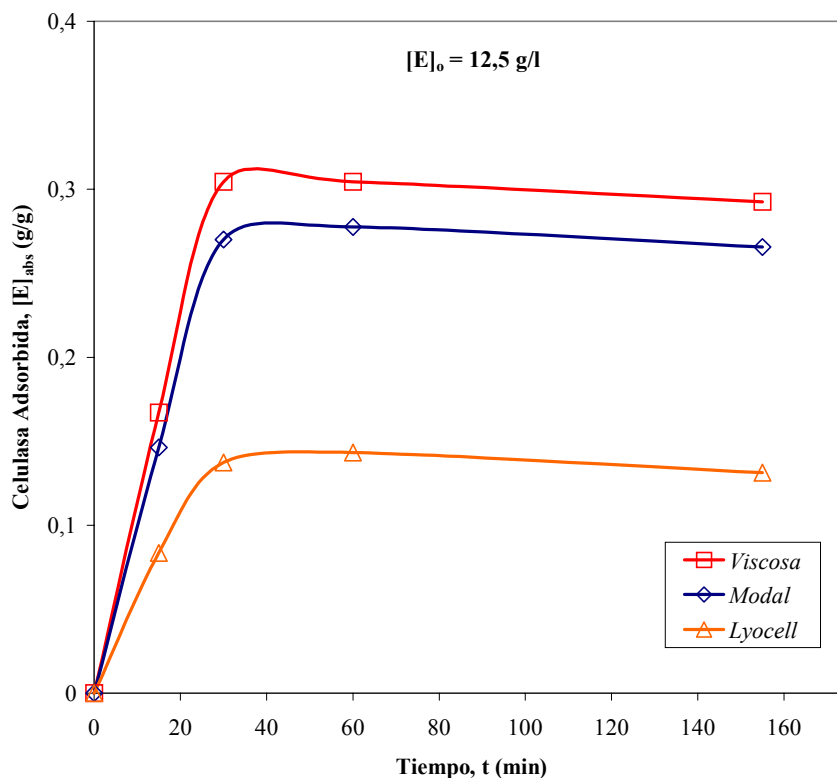


Figura IV. 6. Adsorción de enzima sobre fibras de lyocell, modal y viscosa: $[E]_0 = 12,5 \text{ g/L}$.

Por otra parte, los resultados de la cinética de hidrólisis enzimática para diferentes concentraciones enzimáticas (6, 12,5 y 25 g/L), determinados en términos de concentración de azúcares reductores (P, g/L), se muestran en la *Tabla IV. 6*, *Tabla IV. 7* y *Tabla IV. 8*, y se han representado gráficamente en la *Figura IV. 7*, *Figura IV. 8* y *Figura IV. 9*.

Tabla IV. 6. Resultados de la cinética de hidrólisis enzimática con celulasas de fibras de lyocell, modal y viscosa: $[E]_0 = 6 \text{ g/L}$, $[S]_0 = 12,5 \text{ g/L}$.

$[E]_0 = 6 \text{ g/L}$	Concentración de azúcares reductores, P (g/L)				
	0 min	15 min	30 min	60 min	155 min
LYOCELL	0,000	0,155 ±0,0000	0,164 ±0,0028	0,215 ±0,0000	0,232 ±0,0028
Modal	0,000	0,160 ±0,0014	0,167 ±0,0000	0,250 ±0,0071	0,454 ±0,0014
Viscosa	0,000	0,150 ±0,0000	0,205 ±0,0007	0,383 ±0,0000	0,923 ±0,0014

Tabla IV. 7. Resultados de la cinética de hidrólisis enzimática con celulasas de fibras de lyocell, modal y viscosa: $[E]_0 = 12,5 \text{ g/L}$, $[S]_0 = 12,5 \text{ g/L}$.

$[E]_0 = 12,5 \text{ g/L}$	Concentración de azúcares reductores, P (g/L)				
	0 min	15 min	30 min	60 min	155 min
LYOCELL	0,000	0,153 ±0,0007	0,176 ±0,0042	0,225 ±0,0141	0,372 ±0,0000
Modal	0,000	0,201 ±0,0014	0,232 ±0,0014	0,344 ±0,0014	0,644 ±0,0014
Viscosa	0,000	0,249 ±0,0014	0,365 ±0,0028	0,595 ±0,0071	1,489 ±0,0057

Tabla IV. 8. Resultados de la cinética de hidrólisis enzimática con celulasas de fibras de lyocell, modal y viscosa: $[E_0] = 25 \text{ g/L}$, $[S]_0 = 12,5 \text{ g/L}$.

$[E]_0 = 25 \text{ g/L}$	Concentración de azúcares reductores, P (g/L)				
	0 min	15 min	30 min	60 min	155 min
LYOCELL	0,000	0,243 \pm 0,0071	0,281 \pm 0,0141	0,317 \pm 0,0071	0,691 \pm 0,0071
Modal	0,000	0,240 \pm 0,0071	0,304 \pm 0,0028	0,438 \pm 0,0141	0,837 \pm 0,0042
Viscosa	0,000	0,326 \pm 0,0000	0,505 \pm 0,0071	0,789 \pm 0,0042	1,990 \pm 0,0042

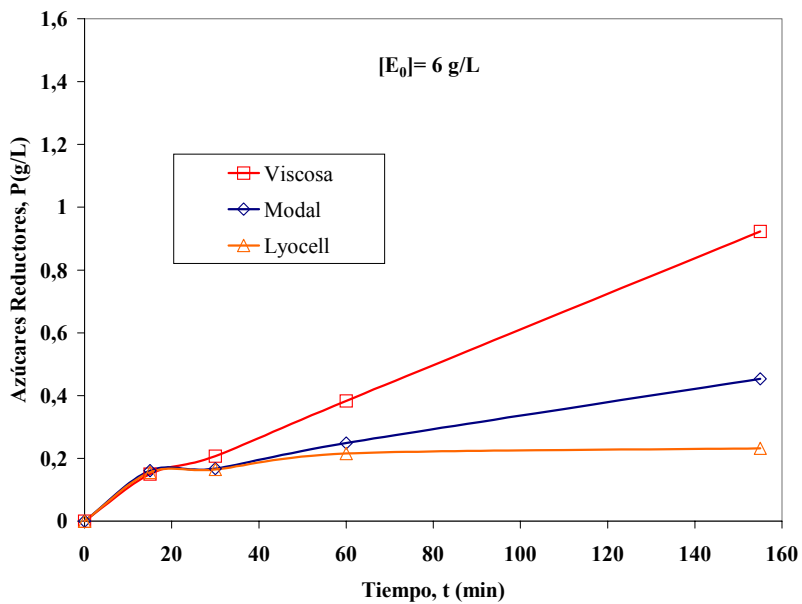


Figura IV. 7. Cinética de hidrólisis enzimática con celulasas ($[E_0] = 6 \text{ g/L}$) de fibras de lyocell, modal y viscosa ($[S]_0 = 12,5 \text{ g/L}$): $\text{pH} = 6$, $50 \text{ }^\circ\text{C}$ y $R/B=1/80$.

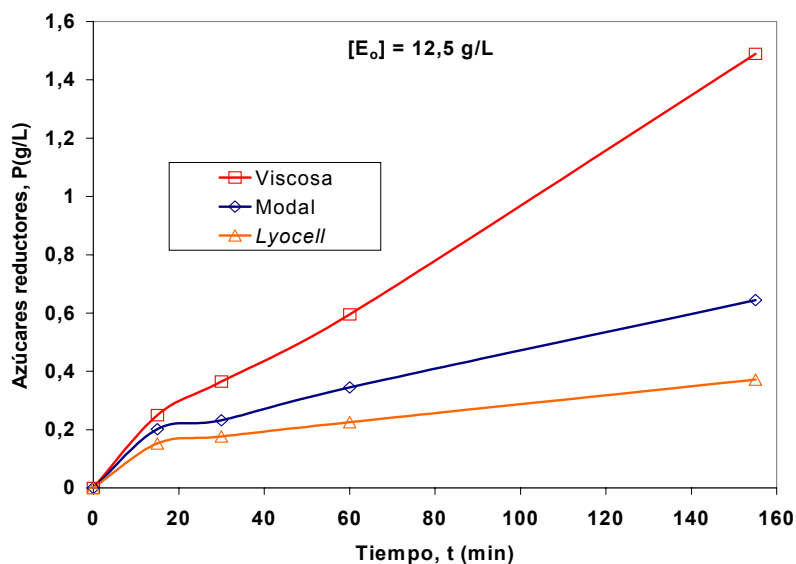


Figura IV. 8. Cinética de hidrólisis enzimática con celulasas ($[E_0] = 12,5 \text{ g/L}$) de fibras de lyocell, modal y viscosa ($[S]_0 = 12,5 \text{ g/L}$): $\text{pH} = 6$, $50 \text{ }^\circ\text{C}$ y $R/B=1/80$.

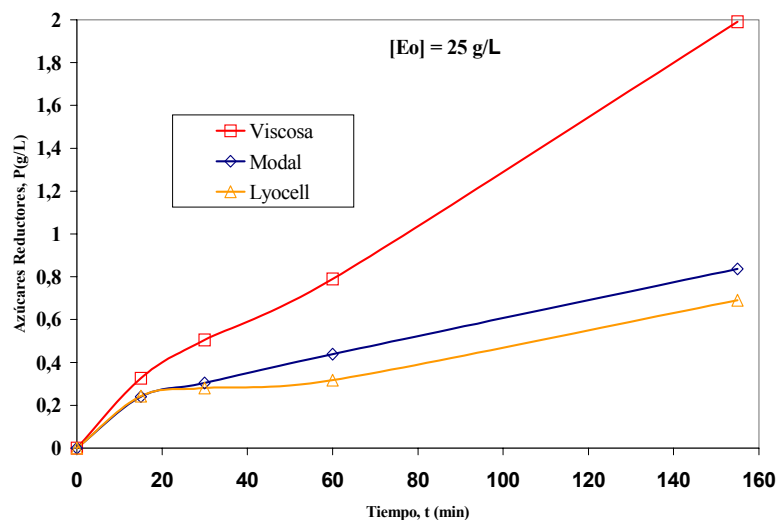


Figura IV. 9. Cinética de hidrólisis enzimática con celulasas ($[E_0] = 25,0 \text{ g/L}$) de fibras de lyocell, modal y viscosa ($[S]_0 = 12,5 \text{ g/L}$): $\text{pH} = 6$, $50 \text{ }^\circ\text{C}$ y $R/B=1/80$.

La degradación por hidrólisis enzimática es mayor para la fibra viscosa, mientras que las fibras modal, que se distinguen por una elevada orientación molecular, y las fibras de lyocell, con un alto grado de cristalinidad y orientación molecular³⁸, presentan más resistencia a la hidrólisis. Si observamos las figuras IV.7, IV.8, IV.9, podemos destacar que las diferencias de reactividad son pequeñas durante las etapas iniciales de hidrólisis, a pesar de las significativas diferencias de cristalinidad y orientación de las fibras. Mientras tanto, las diferencias se hacen mucho más significativas para tiempos más largos. También puede observarse, como el comportamiento de las cinéticas de hidrólisis de la fibra modal y lyocell, es más similar que el que presenta la fibra de viscosa. Esta aproximación de comportamiento, entre las fibras de modal y lyocell, indica que a pesar de las diferencias de cristalinidad, constatadas experimentalmente en el capítulo II, el factor de orientación molecular de las fibras es determinante en el proceso enzimático, ya que la característica común a ambas fibras es su elevada orientación molecular y las diferencia sustancialmente de las fibras de viscosa.

La reacción de hidrólisis se produce preferentemente sobre la superficie de la fibra, debido a la diferencia sustancial de tamaño entre las moléculas de enzima (diámetro medio 35-75 Å) y los poros de las fibras de celulosa regenerada (20-30 Å). De esta forma, teniendo en cuenta la estructura corteza/núcleo característica de las fibras de celulosa regenerada, parece lógico pensar que la capa cortical tendrá un papel relevante en el proceso de hidrólisis. El comportamiento de las fibras de viscosa puede explicarse por la diferencia de cristalinidad entre la zona cortical, de mayor grado de cristalinidad, y el núcleo. De esta forma, la capa cortical, más orientada, actuaría retardando la hidrólisis durante las etapas iniciales, lo que explicaría este comportamiento menos diferenciado con los otros sustratos. Durante la hidrólisis, la degradación de esta capa externa facilitaría el

acceso a las zonas internas, más accesibles, produciendo el aumento progresivo de la velocidad de hidrólisis observado experimentalmente.

En las fibras modal, el proceso de fabricación, en comparación con las fibras de viscosa, produce una fuerte orientación de las cadenas de polímero de celulosa respecto del eje de la fibra, reduciendo la porosidad y el tamaño de poro de estas fibras³⁹, por lo que se disminuye la velocidad de hidrólisis. En este caso, la cinética de hidrólisis enzimática no manifiesta unas diferencias tan ostensibles a tiempos largos, como en el caso anterior. Este hecho confirma, que las diferencias estructurales entre la zona cortical y el núcleo de las fibras modal son menos acusadas que en las de viscosa.

Para el caso de la fibra lyocell, debido fundamentalmente al alto grado de orientación de las moléculas de polímero de celulosa, la hidrólisis es aún menos efectiva que para las otras fibras. La hipótesis de una capa cortical muy fina, de ordenación amorfa, confirmaría el comportamiento similar a las otras fibras durante las etapas iniciales. A tiempos más largos, la degradación de esta corteza provocaría el ataque sobre las zonas más internas, con menor presencia de regiones amorfas entre las microfibrillas altamente orientadas y de gran cristalinidad. Esto explicaría las reducidas velocidades de hidrólisis obtenidas entre 15 y 60 minutos, prácticamente nulas para la concentración más baja (6 g/L) de enzima inicial. A tiempos más largos, y para las concentraciones mayores de enzima inicial, se observa un ligero incremento de la velocidad de hidrólisis.

El aumento de la concentración de enzima inicial, $[E_0]$ produce un incremento del grado de hidrólisis, como consecuencia del desplazamiento del equilibrio de la etapa de adsorción de enzima hacia la formación del complejo activo enzima-sustrato (ES). En la Tabla IV. 9 y Figura IV. 10, se muestra el grado de hidrólisis de la fibra (H, %) obtenido a 155 minutos, calculado según la

Ecuación IV.6, observándose una mayor degradación con el aumento de la concentración de enzima inicial para una misma fibra.

Tabla IV. 9. Grado de hidrólisis (%) de fibras de lyocell, modal y viscosa a diferentes concentraciones iniciales de enzima: 6, 12,5, y 25 g/L.

Sustratos	[E ₀] = 6 g/L	[E ₀] = 12,5 g/L	[E ₀] = 25 g/L
LYOCELL	1,67	2,68	4,98
Modal	3,27	4,64	6,03
Viscosa	6,65	10,72	14,33

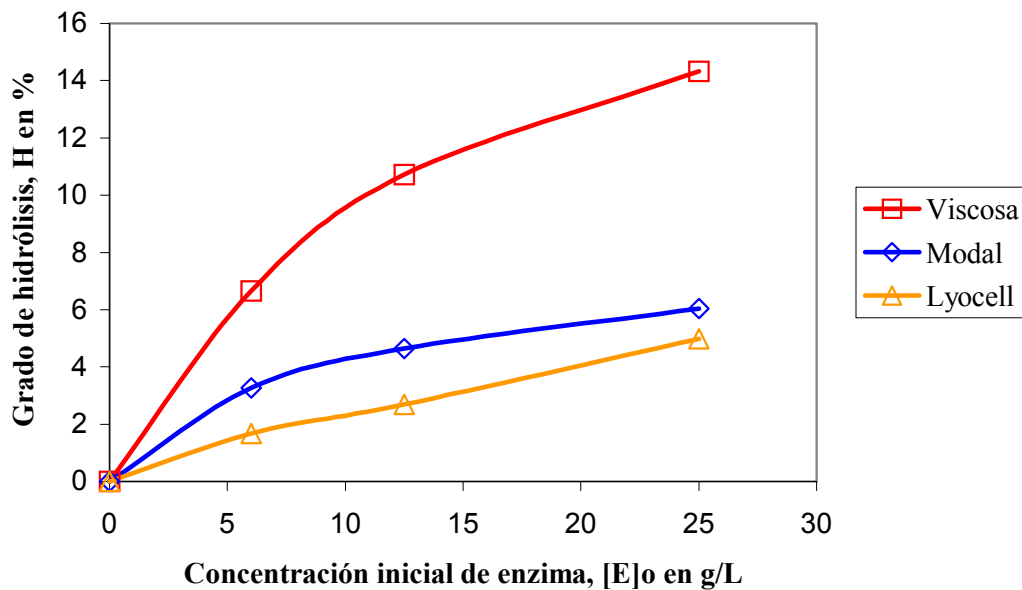


Figura IV. 10. Grado de hidrólisis (%) de fibras de lyocell, modal y viscosa a diferentes concentraciones iniciales de enzima: 6, 12,5, y 25 g/L. ([S]₀ = 12,5 g/L, pH = 6, 50 °C y R/B=1/80).

Mediante el estudio cinético y cálculo de los parámetros cinéticos de los sistemas celulosa-celulasa estudiados, se puede obtener información muy útil para la comprensión del mecanismo de reacción enzima-sustrato. Para ello, es conveniente relacionar el efecto de la concentración inicial de enzima con la velocidad inicial de hidrólisis (v_0 , g/L.h). Tal y como propone Bailey²⁸, si tenemos en cuenta que la reacción se produce en un sólido hidratado, en el que es prácticamente imposible cambiar la concentración de los lugares específicos del sustrato, parece más conveniente establecer la velocidad de hidrólisis en función de la concentración de enzima.

El cálculo de la velocidad inicial de reacción (v_0 , g/L.h) se ha realizado con el valor de la concentración de azúcares reductores determinado a 60 minutos, debido a que las diferencias durante los periodos iniciales son poco significativas. Los resultados obtenidos se muestran en Tabla IV. 10. A partir del valor de la velocidad de reacción obtenido y la concentración inicial de enzima ($[E]_0$, g/L) se han calculado los parámetros cinéticos de velocidad máxima, V_{emax} , y la constante de saturación media, K_e , mediante la linealización de la Ecuación IV.5.

Tabla IV. 10. Velocidad inicial de reacción en función de la concentración inicial de enzima ($[E]_0$) para fibras de lyocell, modal y viscosa: $pH = 6$, $T = 50$ °C, $R/B=1/80$.

	Velocidad de hidrólisis inicial, v_0 (g/L.h)		
	$[E]_0 = 6$ g/L	$[E]_0 = 12,5$ g/L	$[E]_0 = 25$ g/L
LYOCELL	0,167	0,226	0,317
Modal	0,249	0,344	0,438
Viscosa	0,383	0,596	0,789

En la Figura IV. 11 se ha representado la velocidad inicial de hidrólisis en función de la concentración inicial de enzima, para cada una de las muestras analizadas. En todos los casos, la velocidad inicial se incrementa con el aumento de la concentración inicial de enzima. Sin embargo, este incremento en la velocidad de reacción no es proporcional a la concentración de enzima. Este hecho puede explicarse teniendo en cuenta que el enzima adsorbido inicialmente sobre la superficie de la fibra, forma una monocapa de tal forma que el exceso de enzima se adsorbería formando capas adicionales. Sólo el enzima adsorbido superficialmente en la primera capa tendría un papel relevante en la hidrólisis, limitando la actividad del enzima por saturación de la superficie de reacción catalítica. Además, no debemos olvidar la influencia de las reacciones de inhibición del enzima, como consecuencia de los propios productos generados durante la reacción de hidrólisis.

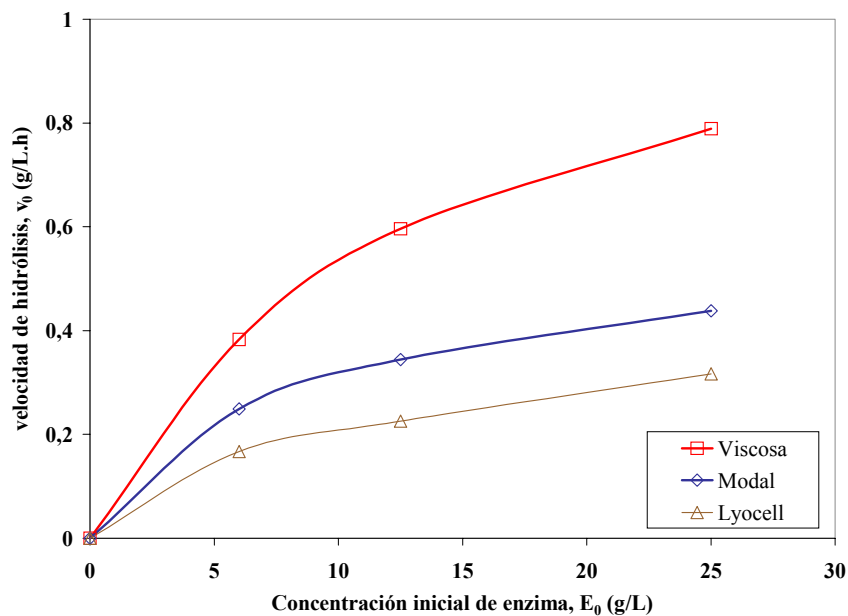


Figura IV. 11. Relación entre la velocidad de hidrólisis (v_0) y la concentración inicial de enzima ($[E_0]$) para fibras de lyocell, modal y viscosa: $pH = 6$, $T = 50$ °C, $R/B=1/80$.

A partir de estos resultados y mediante linealización de la Ecuación IV.5, se han calculado los parámetros cinéticos de velocidad máxima, $V_{em\acute{a}x}$, y la constante de media saturación K_e , que se muestran en la Tabla IV. 11.

Tabla IV. 11. Cálculo de $V_{em\acute{a}x}$ y K_e por linealización de la Ecuación IV.5.

Sustratos	$V_{em\acute{a}x}$ (g/L.h)	K_e (g/L)	$V_{em\acute{a}x}/K_e$ (L/h)
LYOCELL	0,407	8,787	0,0463
Modal	0,563	7,628	0,0738
Viscosa	1,196	12,717	0,0940

La constante de media saturación calculada, puede ser interpretada como la constante de disociación aparente de todas las especies de enzima adsorbidas que participan en la formación del complejo activado (ES). Esta constante, K_e , es mayor para los sustratos que presentan una estructura de celulosa regenerada más accesible y un menor grado de cristalinidad, como ocurre para el caso de la viscosa. Este hecho indica que posiblemente, durante el tratamiento enzimático de las estructuras más accesibles, existe una mayor proporción de enzima en la forma no asociada (ES), preparada para la catálisis posterior.

La constante $V_{em\acute{a}x}$ obtenida estima la degradación máxima inicial que podría obtenerse a elevadas concentraciones de enzima, correspondientes a las de saturación del sustrato por el enzima. En este caso, se observa como la fibra de lyocell, con mayor cristalinidad y orientación, presenta el menor valor de $V_{em\acute{a}x}$, por lo que puede considerarse la menos degradada por la hidrólisis.

Los resultados obtenidos para las fibras de modal nos indican que, a pesar de la menor cristalinidad constatada por diversos estudios respecto a las fibras lyocell, el comportamiento frente a la hidrólisis es más parecido al de las fibras de lyocell que al de las fibras de viscosa, como lo indican los valores obtenidos de $V_{em\acute{a}x}$ y K_e . Este hecho es consecuencia de la alta orientación molecular de la estructura de ambos tipos de fibras.

El cociente entre los valores $V_{em\acute{a}x}$ y K_e puede ser interpretado como la especificidad catalítica del enzima por el sustrato. Para el enzima total de celulasa utilizado las fibras de lyocell presentan una especificidad catalítica menor, respecto a la obtenida para las muestras de modal y viscosa. Por definición, la acción de las endoglucanasas produce una escisión al azar del polímero de celulosa, menos específica que la acción de las exoglucanasas, que actúan sobre el extremo de la cadena del polímero. Por lo tanto, sobre una estructura de celulosa regenerada de mayor cristalinidad, como la de lyocell, la hidrólisis se produce preferentemente al azar, mientras que para los sustratos más accesibles y con una estructura menos orientada, se potencia la hidrólisis de los extremos de las cadenas de polímero.

De los resultados obtenidos se desprende que debido a la estructura de la fibra lyocell, serán necesarias concentraciones de enzima más elevadas, enzimas de mayor actividad catalítica o nuevas formulaciones con mayor especificidad catalítica, si se desean obtener los mismos efectos, desde el punto de vista cinético, que sobre las fibras de celulosa regenerada tradicionales.

IV.4. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Focher B., Marzetti A., Beltrame P.L., Carniti P, *Structural Features of Cellulose and Cellulose Derivatives and Their Effects on Enzymatic Hydrolysis, Biosynthesis and Biodegradation of Cellulose*, C.H. Haigler, Weimer P.J., Eds, Marcel Dekker, NY, 1991, 293-310, 1991.
- ² Beltrame P.L., Carniti P., Focher B., Marzetti, Cattaneo M., *Cotton Cellulose: Enzyme Adsorption and Enzymatic Hydrolysis*, Journal of Applied Polymer Science, Vol.27, 3493-3502, 1982.
- ³ Bhatawdekar S.P., Sreenivasan S., Balasubramanya R.H., Paralikar K.M, *Effect of an Alkali Treatment on the Enzymolysis of Never-Dried Cotton Cellulose*, Textile Research Journal, 62, 290-292, 1992.
- ⁴ Puri V. P., *Effect of Crystallinity and Degree of Polymerization of Cellulose on Enzymatic Saccharification*, Biotechnology Bioengineering. 26, 1219-1222, 1984.
- ⁵ Lee S.B., Ryu D.D.Y., Mandels, M., *Effect of Physicochemical Properties of Cellulose on Adsorption and Rate of Hydrolysis*, Biotechnology Bioengineering, 24, 2137-2153, 1982.
- ⁶ Ooshima H., Sakata M., Harano Y., *Adsorption of Cellulase from Trichoderma Viride on Cellulose*, Biotechnol. Bioengineering., 25, 3103-3114, 1983.
- ⁷ Kroschwitz J., Howe-Grant M., *Encyclopedia of Chemical Technology*, Wiley-Interscience publication, 4^a Ed., 1993.
- ⁸ Klyosov, A.A., Mitkevich O.V., Sinitsyn A.P, *Role of the Activity and Adsorption of Cellulases in the Efficiency of the Enzymatic Hydrolysis of Amorphous and Crystalline Cellulose*, Biochemistry, 25 (3), 540-542, 1986.

- ⁹ Rabinovich M.L., Chernoglazov V.M., Klyosov A.A., *Isoenzymes of Endoglucanases in Cellulase Complex: Different Affinity for Cellulose and Different Role in the Hydrolysis of an Insoluble Substrate*, Biokhimiya, 48, 369-378, 1983.
- ¹⁰ Sakata M., Ooshima H., Harano Y., *Effects of Agitation on Enzymatic Saccharification of Cellulose*, Biotechnology Letter, 7689-694, 1985.
- ¹¹ Cavaco A., Almeida L., Bishop D., *Hydrolysis of Cotton Cellulose by Engineered Cellulases from Trichoderma Reesei*; Textile Research Journal 68(4),273-280 (1998).
- ¹² Michelle Hartzell M, You-Lo Hsieh, *Enzymatic Scouring to Improve Cotton Fabric Wettability*, Textile Research Journal, 68, 4, 233-241, 1998.
- ¹³ Tereschenko L.Ya, Shamolina I.I., *The Use of Cellulase to Improve the Sorption Properties of Cellulosic Wound Dressing*, Journal Textile Institute, 89, 3, 570-578, 1998.
- ¹⁴ Koo H., Ueda M., Wakida T., *Cellulase Treatment of Cotton Fabrics*, Textile Research Journal, 64, 2, 70-74, 1994.
- ¹⁵ Focher B., Marzetti A., Cattaneo M., *Effects of Structural Features of Cotton Cellulose on Enzymatic Hydrolysis*, Journal of Applied Polymer Science, Vol.26, 1989-1999, 1981.
- ¹⁶ Buschle G., Zeronian S.H., Pan N., Yoon M.Y., *Enzymatic Hydrolysis of Cotton, Linen, Ramie, and Viscose Rayon Fabrics*, Textile Research Journal, 64, 5, 270-279, 1994.
- ¹⁷ Wald S., Wilke C.R., Blanch H. W., *Kinetics of the Enzymatic Hydrolysis of Cellulose*, Biotechnology and Bioengineering, Vol XXVI, 221-230, 1984.
- ¹⁸ Eigner W. D., Huber A., Schurz J., *The Reaction System Cellulose-Cellulase*, Cellulose Chemical Technology, 19, 579-589 (1985).

- ¹⁹ Enari T, Niku-Paavola M., *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, CRC Press, Vol. 5, 3, p67, 1987.
- ²⁰ Walker L.P., Wilson D. B., *Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: an Overview*, *Bioresource Technology*, 36, 3-14, 1991.
- ²¹ Goyal A., Gosh B., Eveleigh D., *Characteristics of Fungal Cellulases*, *Bioresource Technology*, 36, 37-50, 1991.
- ²² Van Ee J. H., Misset O., Baas E. J., *Enzymes in Detergency. Surfactant*, Science Series Vol.69, p.177, 1990.
- ²³ Nidetzky B., Steiner W., *A New Approach for Modeling Cellulase-Cellulose Adsorption and the Kinetics of the Enzymatic Hydrolysis of Microcrystalline Cellulose*, *Biotechnology Bioengineering.*, Vol. 42, Pp 469-479 (1993).
- ²⁴ Ueda M., Koo H., Wakida T.; *Cellulase Treatment of Cotton Fabrics: Inhibitory Effect of Surfactants on Cellulase Catalytic Reaction*; *Textile Research Journal* 64(10), 615-618 (1994).
- ²⁵ Lee Y. H., Fan L. T., *Kinetic Studies of Enzymatic Hydrolysis of Insoluble Celulose: Analysis of the Initial rates*, *Biotechnology Bioengineering*, Vol. XXIV, 2383-2406 (1982).
- ²⁶ Steiner W., Sattler W., Esterbauer, H., *Adsorption of Trichoderma reesei Cellulases on Cellulose: Experimental Data and Their Analysis by Different Equations*, *Biotechnology Bioengineering*, 33: 1221 – 1234,1988.
- ²⁷ Stuart J.Y., Ristroph D.L., *Analysis of Cellulose- Cellulase Adsorption Data: a Fundamental Approach*, *Biotechnology Bioengineering*, 27, 1056-1059, 1985.
- ²⁸ Bailey J., *Enzyme Kinetics of Cellulose Hydrolysis*, *Biochemistry Journal.*, 262, 1001-1002, 1989.

²⁹ Woodward J., Lima M., Lee N., *The Role of Cellulase Concentration in Determining the Degree of Synergism in the Hydrolysis of Microcrystalline Cellulose*, *Biochemistry Journal.*, 255, 895-899, 1988.

³⁰ Converse, A.O., Matsumo R., Tanaka, M., Taniguchi M., *A Model for Enzyme Adsorption and Hydrolysis of Microcrystalline Cellulose with Slow Deactivation of the Adsorbed Enzyme*, *Biotechnology Bioengineering.*, 32, 38-45, 1988.

³¹ Lee Y. H., Fan L. T., *Kinetic Studies of Enzymatic Hydrolysis of Insoluble Cellulose: (II) Analysis of Extended Hydrolysis Times*, *Biotechnology Bioengineering*, Vol XXV, 939-966, 1983.

³² Holzapple M.T., Caram H. S., Humphrey A. E., *Determining the Inhibition Constants in the HCH-1 Model of Cellulose Hydrolysis*, *Biotechnology Bioengineering*, 26, 775-780, 1984.

³³ Sattler W., Esterbauer H., Glatter O., Steiner W., *The Effect of Enzyme Concentration on the Rate of Hydrolysis of Cellulose*. *Biotechnology Bioengineering*, 33, 1221-1234, 1989.

³⁴ González G., Carminal G, Desmas C., López J., *A Kinetic Model for Pretreated Wheat-Straw Saccharification by Cellulase*, *Journal Chem. Techn. Biotechnology*, 44, 275-288, 1989.

³⁵ Mandels M., Andreotti R., Roche C., *Biotechnology & Bioengineering. Symp*, 6, 21-33, 1976.

³⁶ Bradford M. M ., *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*, *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254, 1976.

³⁷ Miller, G.L., *Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar*, Analytical Chemistry, 31, 3, 1959.

³⁸ Lenz J., Schurz J., Wrentschur E., *Properties and Structure of Solvent-Spun and Viscose-Type Fibres in the Swollen State*, Colloid & Polymer Science, 271, 460-468, 1993.

³⁹ Bredereck K, Gruber M., *El Tratamiento con Celulasa del Algodón y las Fibras de Celulosa Regenerada. Variaciones en el Hinchamiento y la Estructura de los Poros*, Revista de la Industria Textil, 335, 40-47, 1996.