

ZUBÍA	12	227 - 240	Logroño	1994
-------	----	-----------	---------	------

APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS DE LA INDUSTRIA DE CONSERVAS VEGETALES. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA*

Luisa Lázaro Belanche**
Jesús Arauzo Pérez**

RESUMEN

Los residuos producidos por la industria de conservas vegetales, por su contenido en celulosa, pueden utilizarse como fuente de energía renovable, evitando así su acumulación y el deterioro del medio ambiente.

La fracción celulósica de los residuos, por hidrólisis, se transforma en glucosa, que por fermentación se convierte en combustible (etanol) o en productos químicos. La hidrólisis de la celulosa se realiza utilizando ácidos o enzimas. La hidrólisis ácida presenta un rendimiento relativamente bajo y alta formación de subproductos, necesitando un elevado consumo de energía. La hidrólisis enzimática consume menos energía y puede dar un producto puro con un rendimiento cuantitativo. Pero la enzima es una macromolécula por lo que su acceso a la celulosa está restringido por muchos factores que no afectan a la catálisis ácida. Los obstáculos principales son: la envoltura de lignina en torno a las fibras celulósicas y la resistencia estructural de la celulosa. Para romper la asociación lignina-celulosa, dejando intacta la celulosa, existen varios métodos de pretratamiento: físicos, químicos y biológicos.

*En este trabajo se presenta un estudio de la hidrólisis enzimática de residuos de alcachofa y espárrago con celulasa de *Trichoderma reesei*. Se comparan los*

* Recibido el 20 de julio de 1993. Aprobado el 21 de abril de 1994.

** Departamento de Ingeniería Química y T.M.A. Centro Politécnico Superior de Ingeniería. Universidad de Zaragoza. 50015. Zaragoza.

rendimientos de la hidrólisis, utilizando como sustrato los residuos sin tratamiento y previamente tratados con NaOH.

Palabras clave: Residuos sólidos, Residuos lignocelulósicos, Alcachofa, Espárrago, Hidrólisis enzimática, Pretratamiento alcalino.

The wastes produced by the vegetable canning industry, due to its cellulosic composition, may be used as renewable energy source, avoiding its accumulation and the environmental degradation.

The cellulosic fraction of this residues is transformed by hydrolysis, acid or enzymatic, into glucose, and by fermentation is converted to fuel (ethanol) or chemical products. The acid hydrolysis presents low yields and high subproducts formation, with an elevated consumption of energy. The enzymatic hydrolysis uses less energy and gives a pure product with quantitative yield. However the enzyme is a macromolecule and its approach to the cellulose is limited by lots of factors which do not affect the catalysis by the acid. The main obstacles are: the lignin envelope around the cellulose fibres and the structural resistance of the cellulose. To break the lignin-cellulose association, there are various pretreatment methods: physical, chemical and microbial.

This paper presents a study of the enzymatic hydrolysis of artichoke and asparagus canning wastes, using Trichoderma reesei cellulase. A comparison of hydrolysis yields datas obtained from unpretreated and pretreated residues with NaOH are presented.

Key words: Solid wastes, Lignocellulosic wastes, Artichoke, asparagus, Enzymatic hydrolysis, Alkaline pretreatment.

0. INTRODUCCIÓN

Los residuos de la industria de conservas vegetales pueden ser considerados como biomasa residual. Están constituidos por materia orgánica, formada por las plantas, mediante la fotosíntesis. Por ello, se consideran como una fuente de energía renovable. Por otra parte, puesto que la producción de este tipo de biomasa residual se localiza en puntos muy concretos, su acumulación puede dar lugar a problemas de contaminación y deterioro del medio ambiente.

Si bien estos residuos biomásicos secos, pueden utilizarse directamente como combustible, existe un interés creciente por el estudio de nuevos procesos en los que, a partir de los residuos y subproductos celulósicos, se obtienen productos de mayor valor.

En los últimos años ha recibido gran atención el estudio de procesos de transformación de materiales lignocelulósicos, dirigidos a la obtención de combustibles

y productos químicos, que actualmente se obtienen del petróleo. El aprovechamiento de los materiales lignocelulósicos se realiza por métodos físico-químicos (obtención de pastas de celulosa, gasificación, pirólisis) o por métodos bioquímicos, que incluyen el acondicionamiento del sustrato celulósico por tratamientos previos y posterior hidrólisis de la celulosa, seguida de la fermentación de los azúcares producidos en la hidrólisis.

La disponibilidad de materiales celulósicos en forma de residuos agrícolas y forestales asegura sustratos abundantes y baratos, si bien su recogida y transporte supone en muchos casos un costo adicional, que se refleja en la rentabilidad económica del proceso. En la Tabla I se presentan datos de la cantidad de residuos que se producen en las industrias de conservas vegetales de la zona del Valle del Ebro.

Tabla I. Cantidad de residuo en % producido en la elaboración de diferentes conservas vegetales

Producto	% Residuo	Producto	% Residuo
Espárrago	45	Pimiento	56
Tomate	25	Alcachofa	67
Judía verde	12	Guisante	5
Patata	10	Champiñon	43
Puerro	38	Zanahoria	30
Melocotón	33	Ciruela	17
Pera	15	Melón	31
Calabaza	35	Cereza	20

Teniendo en cuenta el % de residuo producido en la elaboración de conservas de estos productos así como la extensión de superficie dedicada a los correspondientes cultivos, se ha considerado de interés el estudio del aprovechamiento de los residuos de espárrago (pieles) y de alcachofa (brácteas). La valorización de residuos lignocelulósicos puede realizarse bien por procedimientos físico - químicos, bien por métodos bioquímicos. En este último grupo se incluyen los procesos de fermentación. Las materias lignocelulósicas no pueden fermentarse directamente, por lo que es necesario un tratamiento de hidrólisis para transformar la celulosa a glucosa, directamente asimilable por los microorganismos responsables de la fermentación.

En la actualidad, la glucosa se obtiene industrialmente a partir de maíz, siguiendo el esquema expuesto en la Figura 1.

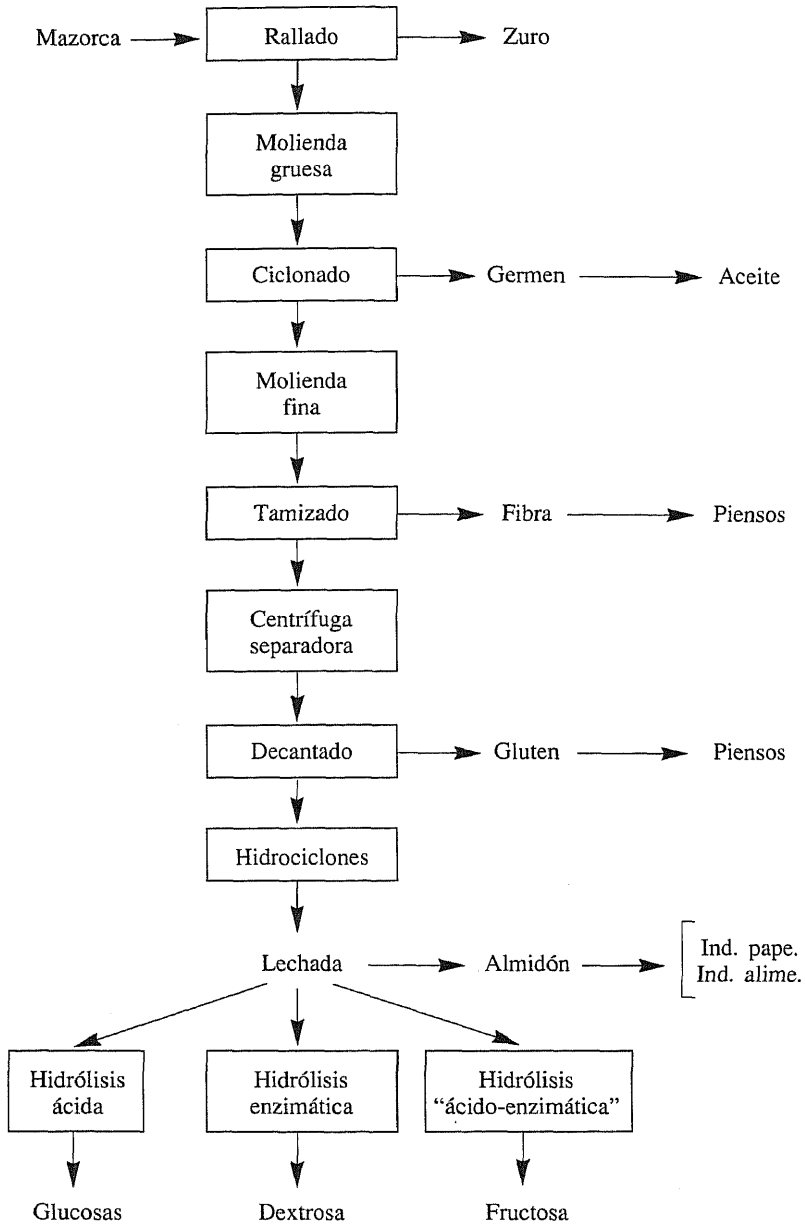


Figura 1. Esquema de la producción industrial de glucosa a partir de maíz.

Los jarabes de fructosa resultantes contienen un 71% de fructosa como materia seca. Además se utilizan otros jarabes edulcorantes denominados Iso-55, Iso-42, Iso-20, Iso-10, etc, cuyo nombre indica el contenido (%) en isoglucosa (fructosa).

Las aplicaciones de los azúcares son muy amplias. La dextrosa (sólido), se utiliza como aditivo en la industria alimentaria, en la fabricación de piensos, en las industrias de fermentación, etc. Los jarabes de glucosa tienen su principal aplicación en la industria alimentaria y farmacéutica. Los jarabes de fructosa en alimentación y en fermentaciones.

1. COMPOSICIÓN DE LOS MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS

La celulosa es el principal componente de los residuos agrícolas (paja, hojas, cáscaras, etc.), de los residuos forestales (serrín, virutas, etc.) y de los residuos de la industria conservera (pieles, brácteas, etc.). En forma de fibra es el material de soporte de los tejidos vegetales. Su utilización como material fibroso y de soporte ha sido muy amplia, aunque hoy relegada por el uso de productos derivados del petróleo y de la moderna tecnología. Sin embargo, se mantiene el interés por su utilización como fuente renovable de energía y de materias primas.

Los componentes de la materia lignocelulósica se clasifican en tres grupos principales: sustancias extrañas, polisacáridos y lignina (Janes, 1969).

Se denominan componentes extraños a los materiales que no constituyen las paredes celulares. Estos componentes consisten en una amplia variedad de productos químicos. Atendiendo a sus solubilidades en agua y en disolventes orgánicos neutros, pueden clasificarse en productos extraíbles y no extraíbles. A pesar de su presencia en pequeña cantidad, los materiales extraños son muy importantes, puesto que hacen resistente la celulosa al ataque de los microorganismos y de los productos químicos.

Los polisacáridos constan de carbohidratos de alto peso molecular, principalmente celulosa y hemicelulosa, que suponen cantidades del 60 al 80 % de la madera total.

La celulosa es el componente más importante de las paredes celulares de las fibras de la madera y es un polímero lineal de D-glucosa, con un alto peso molecular de aproximadamente 500.000. Las moléculas individuales de celulosa están unidas por enlaces β -1,4 glucosídicos, formando agregados llamados microfibrillas, que contienen zonas de celulosa amorfa, fácilmente atacables por las enzimas y otras zonas de mayor orden, la fracción cristalina, estimada entre un 50-90%, más resistente a la acción enzimática (Cowling et al., 1976) (Fan et al., 1980). La celulosa es insoluble en agua, en ácidos diluidos y en álcalis. En ácidos concentrados se hidroliza dando D-glucosa.

La hemicelulosa está compuesta por cadenas cortas de polisacáridos y es la principal fracción no celulósica de los polisacáridos. El papel de este componente

es proporcionar una unión entre la celulosa y la lignina. En su estado natural existe una forma amorfa que puede dividirse en dos categorías: poliurónidos y celulosanas. Los poliurónidos son hemicelulosas que contienen grandes cantidades de ácido hexurónico y algunos grupos metoxil, acetil y carboxílicos libres. Las celulosanas son polímeros formados por azúcares tales como hexosanas: mannano, galactano y glucosano y pentosanas tales como xilano y arabano.

La lignina es un polímero tridimensional de fenilpropano con unidades de fenilpropano que se mantienen unidas por enlaces éter y carbón-carbón. Ascende a un 20-35% de la estructura de la madera. Tiene un alto peso molecular y es amorfa en la naturaleza. La red de la lignina está concentrada en las capas exteriores de las fibras. La lignina proporciona la rigidez estructural por endurecimiento y por mantener juntas las fibras de polisacáridos (Cowling y Kirk, 1976).

2. ACONDICIONAMIENTO DEL SUSTRATO

El examen de las características estructurales de la pared celular indica dos obstáculos principales a la hidrólisis de la celulosa contenida en materiales lignocelulósicos. Estos son: la envoltura de lignina que rodea las fibras de celulosa y la resistencia estructural de la celulosa.

Puesto que la protección de lignina representa un gran impedimento a la accesibilidad de la celulosa, para desarrollar un proceso de bioconversión de materiales lignocelulósicos, es necesario aplicar algún pretratamiento que disminuya el efecto protector de la lignina. Es innecesario eliminar o alterar toda la lignina para aumentar de forma significativa la susceptibilidad de los materiales lignocelulósicos a la degradación enzimática. Dependiendo del tipo de biomasa, es suficiente eliminar del 20 al 60 % de la lignina (Fan et al., 1981).

Existen varios métodos para romper la asociación de lignina-celulosa con la ayuda de productos químicos que descomponen la lignina, dejando intacta la mayor parte de la celulosa.

La estructura de la pared celular en los materiales lignocelulósicos se asemeja a la de una columna de hormigón armado, siendo las fibras de celulosa las varillas metálicas y la lignina el cemento. La biodegradación de las biomásas lignocelulósicas no tratadas es muy lenta y la extensión de la biodegradación también es baja. Para aumentar la susceptibilidad del material celulósico, es esencial la modificación estructural por medio de pretratamientos adecuados. Se han ensayado pretratamientos muy diferentes:

- a) Pretratamientos físicos, que incluyen: molienda, vaporización a presión, irradiación y pirólisis.
- b) Pretratamientos químicos, mediante álcalis, ácidos, gases, agentes oxidantes, disolventes de la celulosa, extracción de la lignina.

c) Pretratamientos biológicos, utilizando microorganismos que atacan la madera, capaces de degradar la lignina.

El tratamiento con NaOH puede ser el más adecuado para el desarrollo de un proceso de aprovechamiento de residuos agrícolas por hidrólisis, puesto que se trata de un reactivo relativamente barato, no produce sustancias extrañas que puedan interferir en la hidrólisis enzimática y las condiciones de operación son moderadas.

3. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA CELULOSA

La hidrólisis de la celulosa puede ser catalizada eficazmente tanto por ácidos como por enzimas celulolíticas.

El ácido puede introducirse profundamente en la estructura morfológica de la celulosa, debido al pequeño tamaño molecular y llevar a cabo una reacción secuencial de pseudo primer orden. Se ha estudiado ampliamente la cinética de la reacción y se ha descrito con precisión (Grethlein, 1978). Los principales inconvenientes de este proceso son: el rendimiento relativamente bajo, la alta formación de subproductos y el elevado consumo de energía.

La hidrólisis enzimática puede dar un producto puro con un rendimiento cuantitativo, consumiendo menos energía. Pero la enzima es una macromolécula, por lo que su acceso a la celulosa, en un sustrato celulósico heterogéneo e insoluble, puede estar restringido por muchos factores que no intervienen en la catálisis ácida. En consecuencia, el mecanismo de reacción puede ser muy diferente y realmente complejo.

Las celulasas pueden aislarse a partir de numerosos microorganismos, si bien las más extensamente estudiadas son las obtenidas a partir de distintas especies de *Trichoderma* (Mandels, 1982) y en particular de *Trichoderma reesei* por lo que el conocimiento de las características generales de las celulasas, con frecuencia se basa en las investigaciones realizadas sobre las celulasas obtenidas de esta especie. El pH y la temperatura óptimos se encuentran alrededor de 4,8 y de 40 a 50 °C respectivamente, para las enzimas de *Trichoderma*.

También son interesantes las celulasas bacterianas obtenidas a partir de microorganismos mesofílicos y termofílicos, en vista de los avances en la fermentación de celulosas y residuos agrícolas para producir etanol, utilizando cultivos mixtos de levaduras con especies de *Clostridium* (Ng et al., 1981). Las celulasas secretadas por este microorganismo son endo- y exo-glucanasas, presentando un pH óptimo de 5,2 y 5,4 y la temperatura óptima es de 65 y 67 °C respectivamente. La relación de actividad de endoglucanasa a exoglucanasa es alta.

La celulasa fúngica de *Trichoderma reesei* en comparación, presenta mayor actividad de exocelulasa. La actividad de celobiasa extracelular y de β -xilosidasa es nula para *Clostridium Thermocellum* LQRI, a diferencia de las celulasas de *Trichoderma reesei* QM9414. La actividad solubilizadora de *Clostridium Thermo-*

cellum no parece estar inhibida a concentraciones que inhiben un 20 % la actividad de celulasas de *Trichoderma reesei*. Sin embargo, la velocidad de solubilización de la celulosa microcristalina por *Clostridium Thermocellum* es la mitad que para la enzima de *Trichoderma reesei*. Las especies de *Clostridium* también son interesantes por aumentar su tolerancia a etanol, mejorar la relación etanol / acetato y la capacidad de fermentar xilosa a etanol. Además se han caracterizado las actividades de celulasas y xilanasas para otras bacterias celulolíticas, la mayor parte de las cuales se encuentran en el sistema digestivo de los rumiantes.

Una breve comparación indica que las celulasas bacterianas y fúngicas son diferentes. Aparte de las diferencias de pH óptimo y de temperatura óptima en algunos casos, la diferencia principal es la alta relación de actividad extracelular endo-exo en celulasas bacterianas en comparación con la celulasa de *Trichoderma*. En ambos casos, las enzimas logran una desaparición significativa de celulosa.

El sistema enzimático celulasa consta de tres componentes principales. Existe una amplia multiplicidad de cada uno de estos tres principales componentes, estando bien definido el modo de acción de cada uno de ellos:

Endoglucanasa (Cx) 1,4-β-D glucan glucano hidrolasa (EC 3.2.1.3): produce escisión al azar de la cadena de celulosa dando glucosa, celobiosa y celotriosa. Peso molecular de 18.000 a 60.000.

Exoglucanasa (C1) 1,4-β-D glucan celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91): ataca por el extremo no reductor de la cadena de celulosa dando celobiosa como producto primario. Peso molecular de 50.000 a 71.000.

Celobiasa (β-glucosidasa) (EC 3.2.1.21) : Hidroliza la celobiosa a glucosa con una elevada actividad con respecto a las celodextrinas. Su peso molecular es de 76.000.

La acción hidrolítica de las celulasas puede describirse, de forma esquemática, como un proceso en dos etapas:

– El primer paso es la conversión de celulosa a celobiosa, por la acción sinérgica de endo- y exo-celulasas, que son fuertemente adsorbidas en la superficie de la celulosa sólida.

– La segunda etapa, es la conversión de celobiosa a glucosa por acción de la β-glucosidasa, en la fase acuosa.

Cuando la celobiohidrolasa actúa sola, puede tener lugar una fuerte competición entre la unión enzima-sustrato (celulosa) y enzima- producto (celobiosa), ya que se conoce que esta enzima sufre una fuerte inhibición competitiva por la celobiosa (Hsu et al., 1980). Por tanto, la presencia de celobiasa para hidrolizar la celobiosa a glucosa ayudaría, puesto que evitaría la inhibición de la exo-enzima.

La adición de β-glucosidasa (celobiasa) a los componentes endo- y exo- de *Trichoderma reesei*, mejora la hidrólisis de la celulosa. Por el contrario, la adición de un inhibidor potente y selectivo de β-glucosidasa, a un filtrado de *Trichoderma*

reesei, reduce la hidrólisis de la celulosa. Una disminución de la absorción de celulosa por adición de un surfactante como Tween 80, produce una mejora en la utilización de la enzima (Castanon et al., 1981). La adición de carbón activo, que absorbe los productos, celobiosa y glucosa, puede ser tan efectiva como la adición de β -glucosidasa para disminuir la inhibición (Khan et al., 1985).

Puesto que se demuestra que la celobiosa inhibe a la exocelulasa, se sugieren algunas opciones para mejorar la solubilización de la celulosa:

1. La adición de surfactant, o de carbón activo, mejora la utilización de la enzima.

2. El reactor debería "saturarse" de β glucosidasa.

3. Debería considerarse en el proceso la filtración o ultrafiltración de las corrientes a reciclar, para eliminar la glucosa, que actúa como inhibidor de las celulasas (Mandenius et al., 1988).

Otra posibilidad es llevar a cabo una prehidrólisis ácida, seguida de hidrólisis enzimática. En esta línea se han realizado estudios de hidrólisis enzimática de materiales parcialmente prehidrolizados (Knnaper et al., 1980) (Converse et al., 1990).

Puesto que *Trichoderma reesei* produce relativamente poca β -glucosidasa, deben tenerse en cuenta microorganismos tales como *Aspergillus Niger*, como fuentes de β -glucosidasa apropiadas para inmovilización (David et al., 1981) (Sundstrom et al., 1981). La utilización de enzimas inmovilizadas podría ser apropiada con un esquema de reacción de membrana o tipo filtración, lo que permitiría actividades muy altas para la celobiosa, manteniendo un costo razonable de la enzima y concentraciones de glucosa a un nivel controlado.

4. ESTUDIO EXPERIMENTAL

En primer lugar, se realizó la caracterización analítica de los materiales biomásicos: pieles de espárrago y brácteas de alcachofa. Los materiales, previamente triturados y tamizados, se sometieron a hidrólisis enzimática, utilizando celulasa de *Trichoderma reesei*. El bajo rendimiento de la hidrólisis de estos residuos, sin pretratamiento alguno, indicaba la necesidad de una etapa de acondicionamiento del sustrato, previa a la hidrólisis enzimática.

4.1. Caracterización de los sustratos

La caracterización de los materiales lignocelulósicos tratados en este trabajo, residuos de espárrago y de alcachofa, por determinación analítica de sus componentes, se ha realizado según las normas TAPPI, llevándose a cabo en primer lugar la preparación de las diferentes muestras y a continuación la determinación de humedad, cenizas, extracción con NaOH al 1%, extracción con agua y extracción

con disolventes y posteriormente, a partir de los materiales extractados, se analizó el contenido en α -celulosa, holocelulosa, pentosanas y lignina. En la Tabla 2 se presenta la composición de estos residuos.

Tabla II. Composición en % de los residuos de alcachofa y espárrago

Determinación	Alcachofa	Espárrago
Humedad	9,0	9,9
Solub. en NaOH	72,4	71,7
Solub. agua fría	29,6	43,9
Solub. agua cal.	36,7	40,2
Extrac. éter	2,3	2,1
Extrac. alcohol-benc.	5,8	8,1
Holocelulosa	59,8	54,5
Lignina	12,3	12,1
Cenizas	8,3	13,2
α -celulosa	51,0	43,6
Pentosanas	15,3	13,2

4.2. Hidrólisis enzimática de los residuos

Se ha realizado la hidrólisis enzimática utilizando como sustrato los materiales lignocelulósicos sin ningún tratamiento químico previo, únicamente triturados y tamizados, seleccionando la fracción de sólidos entre -2000+1000 mm. La concentración inicial de sustrato es de 20 g/l. La hidrólisis enzimática se ha llevado a cabo en medio de tampón citrato de pH 4,8 con celulasa de *Trichoderma reesei*, en concentración de 0,450 g/l, a una temperatura de 50 °C y con agitación constante.

La sacarificación se prolonga durante 24 h, tomando las muestras a 0, 1, 2, 6, 8 y 24 h, en las que se determina la concentración de azúcares reductores (AR), en g/l, por el método del ácido dinitrosalicílico, DNS, (Miller, 1959) para seguir el transcurso de la reacción. Los valores obtenidos se recogen en la Tabla 3.

En el caso de los residuos de alcachofa, se transformó el 10% de la celulosa, mientras que del residuo de espárrago se transformó un 24%. El aspecto y la textura de las partículas de los sustratos, no sufrieron una alteración apreciable por la acción enzimática. Del examen de los resultados mostrados en la Tabla 3, es evidente la necesidad de un tratamiento previo a la sacarificación enzimática de estos materiales, puesto que la mayor parte de la celulosa que contienen, no se ha transformado durante la hidrólisis.

Tabla III. Azúcares reductores, expresados como glucosa, en g/l, en la hidrólisis enzimática de los residuos sin pretratamiento químico

Tiempo, h	Alcachofa	Espárrago
0	0,00	0,00
1	0,34	0,37
2	0,51	0,58
6	0,75	1,02
8	0,91	1,30
24	1,07	2,12

Para mejorar el rendimiento de la sacarificación enzimática de las biomásas celulósicas, se ha realizado un tratamiento de las mismas, de solubilización con NaOH, previo a la hidrólisis. El NaOH solubiliza parcialmente la lignina y produce esponjamiento de la materia lignocelulósica, dejando más accesible la celulosa a la acción enzimática.

La temperatura de tratamiento se fijó en 125 °C, de forma que se alcanzase la ebullición rápidamente y las condiciones de operación fuesen lo más suaves posible. Con objeto de determinar el efecto del tratamiento con NaOH sobre los diferentes sustratos, se han realizado una serie de experimentos, en los que se modificaba la cantidad de sólido en la suspensión, siendo la duración de estos tratamientos alcalinos de 60 minutos. Se utilizaron biomásas de tamaño de partícula -2000+1000 mm. Se han realizado experimentos de tratamiento alcalino con suspensiones de 50, 100 y 200 g/l de sólido en NaOH 0,25 N con cada una de las dos materias lignocelulósicas. El residuo sólido resultante, una vez lavado y seco en estufa a 105 °C, se guardó en frascos cerrados. Posteriormente se utilizó como sustrato en las hidrólisis enzimáticas, llevadas a cabo en condiciones idénticas a las descritas anteriormente, lo que permite establecer comparaciones entre los resultados obtenidos en ambos casos. Las concentraciones de azúcares reductores, obtenidas por hidrólisis enzimática de estos residuos, durante 24 h, se han representado en las Figuras 2 y 3. Como puede observarse, el tratamiento con NaOH 0,25 N, mejora notablemente el rendimiento de la sacarificación.

5. CONCLUSIONES

Los residuos de la industria de conservas vegetales, por su contenido en celulosa, pueden considerarse como una fuente alternativa de energías renovables.

Existen diferentes procedimientos de transformación de este tipo de biomásas, entre los cuales cabe destacar los procesos de fermentación. De los sustratos ligno-

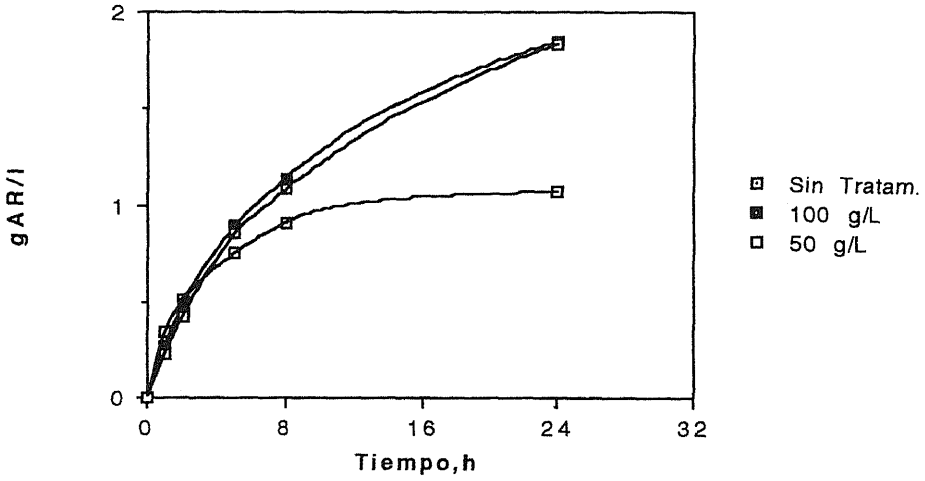


Figura 2. Azúcares reductores, como glucosa en g/l, en la hidrólisis de residuos de alcachofa.

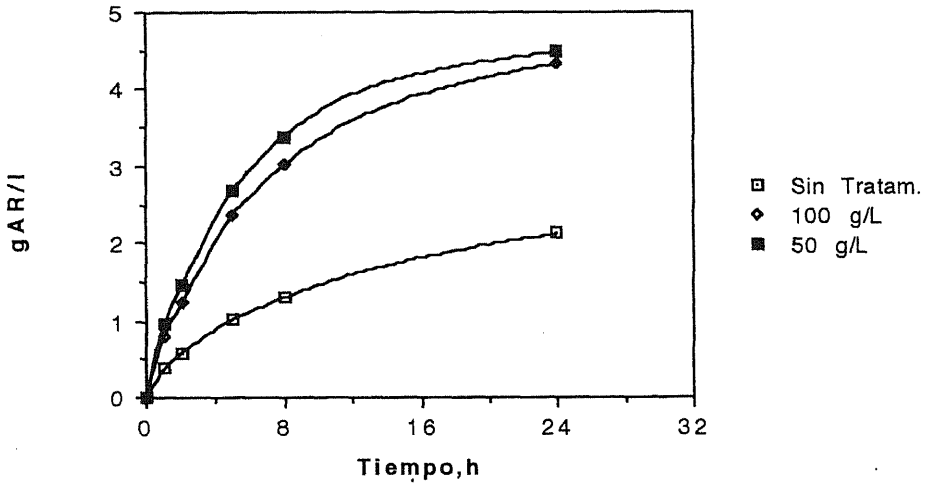


Figura 3. Azúcares reductores, como glucosa en g/l, en la hidrólisis de residuos de espárrago.

celulósicos, por hidrólisis de la celulosa, via ácida o enzimática, se obtienen azúcares fermentables que serán asimilados por el microorganismo inoculado, dependiendo del producto que se desea obtener.

Al llevar a cabo la hidrólisis con celulasa, de *Trichoderma reesei*, de las materias biomásicas, se obtuvieron bajos rendimientos, por lo que se llevó a cabo un pretratamiento con NaOH, obteniéndose un apreciable incremento en la concentración de azúcares reductores en los jarabes de hidrólisis.

6. AGRADECIMIENTO

Al Instituto de Estudios Riojanos por la concesión de una Ayuda a la Investigación, que hizo posible la realización de este estudio.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Castanon, M., Wilke, C.R., 1981. Effects of the Surfactant Twen 80 on the Enzymatic Hydrolysis of Newspaper. *Biotechnol. Bioeng.* (23), 1037-1035.
- Converse, A.O., Ooshima, H., Burns, D.S., 1990. Kinetics of Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Materials Based on Surface Area of Cellulose Accessible to Enzyme Adsorption on Lignin and Cellulose. *Appl. Biochem. and Biotech.* (25), 67-73.
- Cowling, E.B., Kirk, T.K., 1976. Properties of Cellulose and Lignocellulosic Materials as Substrates for Enzymatic Conversion Processes. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* (6), 95-123.
- David, C., Thiry, P., 1981. Utilization of waste cellulose. III. Comparative Study of the Activity of the Cellulases of the *Trichoderma viride* and *Aspergillus Niger* towards diferents Cellulosic Substrates. *Eur. Polym. J.* (17), 957-960.
- Fan, L.T., Gharpuray, M.M., Lee, Y.H., 1981. Evaluation of pretreatments for enzymic conversion of agricultural residues. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* (11), 29-45.
- Fan, L.T., Lee, Y.H., Beardmore, D.H., 1980. Mechanism of the enzymic hydrolysis of cellulose: effects of major structural features of cellulose on enzymic hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* (22), 177-199.
- Grethlein, H.E., 1978. Chemical Breakdown of Cellulosic Materials. *J. Appl. Chem. Biotechnol.* (28), 296-308.
- Hsu, T.A., Gong, C.S., Tsao, G.T., 1980. Kinetic studies of cellodextrins hydrolyses by exocellulase from *Trichoderma reesei*. *Biotechnol. Bioeng.* (22), 2305-2320.

- Janes, R.L., 1969. *The pulpig of wood*. 2.^a Ed., Mc Graw Hill, New York (1), 34.
- Khan, A.W., Chin, A., Baird, S., 1985. Use of Charcoal to minimize end Product Inhibition in Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. *Biotechnology Letters*. (7), 447-450.
- Knappert, D., Grethlein, H., Converse, A., 1980. Partial Acid Hydrolysis of Cellulosic Materials as a Pretreatment for Enzymatic Hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* (22), 1449-1463.
- Mandels, M., 1982. Cellulases. *Annu. Rep. Ferment. Processes*. (5), 35-78.
- Mandenius, R.F., Nilson, B., Persson, I., Tjerneld, F., 1988. Kinetic Models for Enzymic Cellulose Degradation in Aqueous Two-Phase Systems. *Biotechnol. Bioeng.* (31), 203-207.
- Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* (31), 426-428.
- Ng, T.K., Zeikus, J.G., 1981. Comparison of extracellular cellulase activities of *Clostridium Thermocellum* LQRI and *Trichoderma reesei* QM9414. *Appl. Environ. Microbiol.* (42), 231-240 .
- Sundstrom, D.W., Kiel, N.E., Coughlin, R.W., Biederman, G.J., Brouwer, C.A., 1981. Enzymatic Hydrolysis of Cellulose to Glucose using Immobilized b- glucosidase. *Biotechnol. Bioeng.* (23), 473-485.