

Hidrólisis enzimática de celulosa. Purificación y propiedades de enzimas celulolíticas de productos naturales y de microorganismos

Por A. Heredia Moreno y J. Fernández-Bolaños Guzmán
 Instituto de la Grasa y sus Derivados. C.S.I.C. Apartado 1078 - 41012-Sevilla

R E S U M E N

Hidrólisis enzimática de celulosa. Purificación y propiedades de enzimas celulolíticas de productos naturales y de microorganismos

PALABRAS-CLAVE: *Celulosa - Celulasa (enzima) - Producto natural - Inhibidor - Microorganismo*

Se lleva a cabo una revisión bibliográfica de la acción de enzimas celulolíticas sobre celulosa y sus derivados, aislamiento, purificación y modos de actuación. Se hace una especial referencia a la presencia de inhibidores.

S U M M A R Y

Enzymatic hydrolysis of cellulose. Purification and properties of cellulolytic enzymes from natural products and microorganisms

KEY-WORDS: *Cellulose - Cellulase (enzyme) - Natural Product - Inhibitor - Microorganism*

A review about isolation, purification and activity of cellulolytic enzymes is reported. A special reference on inhibitors has been done.

INTRODUCCION

En la Naturaleza, la celulosa se degrada por acción de microorganismos y en el hombre lo hace parcialmente por la microflora del colon (20). Es necesario aumentar su sensibilidad a los ataques químicos y enzimáticos, lo que haría posible que en un futuro no muy lejano la celulosa constituya una fuente inagotable de materias primas para la industria alimentaria y química, ya que podría degradarse a glucosa y esta, a través de procesos fermentativos y químicos, transformarse en grasas, proteínas y una gran variedad de productos (12) (14).

A diferencia de las condiciones drásticas en que es preciso realizar la hidrólisis química, la celulosa se puede degradar por acción de enzimas específicas llamados celulasas, en condiciones suaves. La hidrólisis es moderada, se origina glucosa y no se forman productos indeseables como consecuencia de la degradación de esta última (41).

De una manera sistemática, se vienen estudiando los métodos de producción de enzimas celu-

líticas, así como su bioquímica, con el fin de establecer un sistema adecuado y económico de sacarificación de celulosa (39) (40) (41) (43) (54).

En el estudio que se realiza sobre el problema que presenta el ablandamiento de aceitunas destinadas al consumo de mesa, se ha detectado la presencia de enzimas celulolíticas que actúan sobre la celulosa de la fibra, degradándola a azúcares sencillos (26), y actualmente se procede a la identificación de los mismos que, como ya se ha indicado, constituyen un complejo heterogéneo (27).

En el presente trabajo se hace una revisión bibliográfica de la acción hidrolítica de este tipo de enzimas, aislamiento, purificación y formas de actuación, tanto en productos naturales como en diferentes sustratos, que servirán de base para su estudio en aceitunas.

CELULASAS

Las celulasas pueden ser de origen vegetal, o bien estar producidas por microorganismos capaces de degradar celulosa. Constituyen un complejo enzimático cuya composición es muy variada, según su origen, llegándose a aislar hasta doce componentes del mismo (57). Esta multiplicidad se da en celulasas de varios microorganismos celulolíticos (10) (16) (21) (45) (60).

El guisante (*Pisum sativum*) sintetiza dos formas de celulasa con actividades diferentes (13) (29). En el tomate se han identificado cuatro enzimas (61) (66) y en la habichuela roja (*Phaseolus vulgaris*) se han encontrado dos carboximetilcelulasas con un nivel de actividad relativamente alto (34) (55).

En el melocotón se detecta una endo-celulasa que degrada carboximetilcelulosa, pero cuya acción «in vivo» en la celulosa natural es desconocida (28). Aparece también celulasa en dátiles, cuya actividad aumenta extraordinariamente durante el proceso de maduración y ablandamiento (25) e igualmente existe actividad celulolítica tipo «endo» en fresas sobremaduras (3).

En 1974 fue encontrada por primera vez celulasa en aguacate (35) con peso molecular comprendido

entre 50.000 y 55.000. Se aisló una forma lábil al calor con actividad endocelulasa (49). Frente a 85 unidades de actividad/gramo de peso fresco en la zona de abscisión de la habichuela y 150 unidades en el tomate, el aguacate presenta 116.000 unidades/g peso fresco (11).

En fechas muy recientes (48) se ha detectado también actividad celulolítica en la papaya (Caríca papaya).

En los últimos años se han establecido las condiciones óptimas de extracción y purificación de estas enzimas como base para posteriores estudios en la regulación de su síntesis y mecanismos de acción en la maduración del fruto (2).

Más abundantes que los enzimas producidos por el fruto son los de origen microbiano. Según los trabajos originales de Reese (51) 165 enzimas clasificados como C_x son endo- β -glucanases que atacan las formas altamente ordenadas de celulosa (celulosa cristalina), pero para ejercer su acción necesitan la colaboración de C_1 o exo- β -glucanases.

Estos últimos se han aislado de diversos microorganismos, tales como *Trichoderma viride* (38) (44), *Trichoderma koningi* (67), *Fusarium solani* (71), *Penicillium tuniculosum* (59), etc. En relación a C_x , todos los autores coinciden en que es un componente heterogéneo que contiene multiplicidad de enzimas.

Se ha aislado el componente C_1 de *T. koningi* demostrándose que tanto este como C_x son capaces de degradar derivados de celulosa pero no las formas altamente ordenadas de la misma, para lo cual se requiere el sinergismo entre ambos (70) (72).

Igualmente, se han encontrado celulasas procedentes del hongo termofílico *Thermoascus aurantiacus* (18) (56) (58) del cual se han obtenido cuatro enzimas purificados, siendo uno de ellos una β -glucosidasa. Todos son activos frente al papel de filtro pero sólo dos lo son hacia carboximetilcelulosa (63).

Muchos filtrados de cultivos contienen C_x pero no C_1 ; sin embargo, lo inverso no ocurre, es decir, siempre que existe C_1 le acompaña C_x , comprobándose su actividad sinérgica en varios sustratos (72).

Los tres componentes principales de *Trichoderma* son β -glucosidasa (celobiasa), 1,4- β -glucanohidrolasa (endoglucanasa, o C_x) y 1,4- β -glucano-celobiohidrolasa (Celobiohidrolasa, o exo-glucanasa, o C_1). Estos enzimas parecen tener entre sí una interdependencia compleja (22). Por acción de la celobiohidrolasa sobre la celulosa se produce celobiosa mediante un mecanismo end-wise y simultáneamente se origina la actuación al azar de la endo-glucanasa. Entonces interviene la celobiasa que hidroliza la celobiosa a glucosa. A veces, la

celobiosa producida actúa de inhibidor de la celobiohidrolasa; aunque este efecto desaparece por la acción de la celobiasa, no obstante ésta es inhibida por la misma glucosa.

En *T. reesei* se ha determinado la naturaleza de los componentes celulolíticos: existe una endoglucanasa y dos celobiohidrolasas, diferentes entre sí, así como una β -glucosidasa que aparece en una proporción muy baja, del orden del 1%. El esquema de actuación que se propone es el siguiente (23):



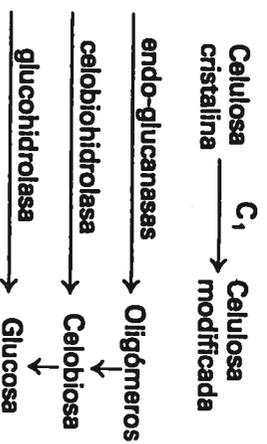
Según se deduce de un estudio detenido de la literatura científica en relación a esta materia, no existe criterio unánime respecto a la forma de actuación de los enzimas.

Berghem, investigando el mecanismo secuencial de degradación de celulosa por enzimas de *T. viride*, llega a la conclusión de que las fibras de celulosa son atacadas en las regiones menos ordenadas por endo-glucanases lo que origina un incremento de restos libres en el sustrato, susceptibles al ataque por exo-glucanases que liberan sucesivamente unidades de celobiosa y finalmente la β -glucosidasa completa el proceso de degradación hidrolizando la celobiosa o glucosa (7).

Wood (72) sugiere que C_1 es el primero de un proceso en dos pasos que comprende rotura de enlaces de hidrógeno, seguido de hidrólisis mediante C_x . Supone que C_1 es un factor prehidrolítico que produce una celulosa activada capaz de ser atacada por enzimas hidrolíticas, según el esquema:



Reese (57) no está de acuerdo con esto y presenta una nueva hipótesis modificada sobre la suya original, que responde al esquema siguiente:



INHIBIDORES

Existen inhibidores naturales y producidos por microorganismos en plantas, y concretamente inhibidores de enzimas celulolíticas, lo que ha llevado a estudiar su función en la regulación de la actividad de celulasas durante el crecimiento y desarrollo. Posiblemente son una defensa de la planta para resistir la invasión de microorganismos celulolíticos.

Estos inhibidores pueden ser un instrumento útil para investigar problemas tales como mecanismos de acción de celulasas, comparación de enzimas de diferente origen, estudio de diversos componentes de una celulasa determinada y su papel para impedir el ablandamiento de los frutos.

Hay diferentes formas de inhibición, bien de tipo físico, o debida a una acción química.

Se consideran factores físicos que conducen a la inhibición aquellos que inciden en las condiciones en que se lleva a cabo la hidrólisis enzimática, modificándola. La forma más simple es evitando que haya contacto enzima-sustrato, para lo cual un medio es retener el enzima en carbón activo o en arcilla. También puede dificultarse la acción enzimática estableciendo una barrera que obstaculice la aproximación del enzima al sustrato (37). La presencia natural de lignina en materiales celulósicos dificulta el acceso enzimático y microbiológico a la celulosa (42).

Otros factores que afectan la actividad son concentración de sustrato, temperatura, pH, etc.

Respecto a la acción química, puede producirse inhibición mediante la formación de sales de metales pesados, de amonio cuaternario, presencia de agentes oxidantes o reductores, etc., que conducen a un tipo de inhibición no específica.

Se ha comprobado que existen diferentes tipos de sustancias que pueden inhibir celulasas de hongos y de ellas se encuentran cuatro de tipo fenólico en el tomate (31) (37). Sin embargo, sólo el ácido clorogénico es inhibidor de la celulasa del tomate, añadido a una concentración de 0,02 % (29).

La celobiosa es un dímero de la glucosa que se separa como producto de la hidrólisis enzimática de la celulosa. Ensayando su acción sobre la actividad de endo-glucanasas se ha visto que presenta un gran efecto inhibidor en el tomate (46). Mandels y Reese indican que la celobiosa inhibe la acción de la mayor parte de las celulasas cuando actúan en celulosa (37). La celulasa producida por *Clostridium thermocellum* es fuertemente inhibida por celobiosa, pero su acción disminuye cuando se añade β -glucosidasa (32). También se sabe que inhibe endo-glucanasas (C_x) de hongos (15) y de otros organismos (37). Sin embargo, como contraposición, la celulasa C_x de varios hongos es fuertemente activada por la celobiosa cuando se emplea como sustrato carboximetilcelulosa. Por tanto, la inhibición de C_x por celobiosa no es un fenómeno general.

La lactosa inhibe algunas celulasas cuando se añade a concentraciones del 1%. El mayor efecto se observa para la celulasa de *Penicillium pusillum* que resulta inhibida diez veces más que con la celobiosa, pero en general es un inhibidor débil, al igual que ocurre con la maltosa.

Altas concentraciones de azúcar inhiben este tipo de enzimas (43). Y así la β -glucosidasa es inhibida competitivamente por glucosa y por glucono-lactona. Aunque Veibel afirmó que las β -glucosidasas se inhiben por acción de formaldehído y compuestos con grupos carbonilo, Reese indicó posteriormente que hay poca o ninguna inhibición por este tipo de compuestos (52) (65).

La D-glucono-lactona resulta un poderoso inhibidor competitivo de la celobiasa presente en el tomate, pero prácticamente no inhibe exo- y endo-glucanasas. Se han estudiado los efectos de diferentes concentraciones de glucono-lactona y del análisis de su cinética de inhibición se sigue que la actividad del enzima se reduce en un 50% con una concentración de inhibidor menor de 0,25 mM. Calculando la constante de inhibición resulta que la afinidad aparente del enzima del tomate por la glucono-lactona es del orden de diez a quince veces superior que por la celobiosa (46).

El ablandamiento de pepinillos aderezados es debido a la presencia de enzimas pectinolíticas y celulolíticas en la salmuera los cuales proceden de las flores que, parcialmente secas, permanecen unidas al fruto y en las cuales ha habido desarrollo de hongos superiores con actividad enzimática. Se ha encontrado que las hojas de uvas contienen una fracción, soluble en agua, inhibidora de enzimas celulolíticas. Entre las variedades estudiadas, la americana *Vitis rotundifolia* es la que presenta una mayor concentración de inhibidor, cuya naturaleza no se describe en la bibliografía (4) (17).

En bayas y otros productos naturales, los polifenoles son fuertes inhibidores (37).

PURIFICACIÓN DE ENZIMAS

Dada la naturaleza multienzimática del sistema «celulasas» se hace necesaria una separación de sus componentes para establecer una forma de actuación en el sustrato, fase de desarrollo en que aparecen en un producto natural determinado y tipos de inhibidores necesarios, en su caso, para eliminar o disminuir su acción.

En la bibliografía aparecen abundantes datos de sistemas de aislamiento y purificación de componentes de celulasas producidos por microorganismos (30) (36) (59) (63), pero son escasos los relacionados con los enzimas propios del fruto. En términos generales comprenden una precipitación fraccionada y posterior purificación de las fracciones por cromatografía de cambio iónico, cromatografía de filtración sobre gel, determinación de puntos iso-

eléctricos por isoelectroénfoque y de pesos moleculares por electroforesis en gel de poliacrilamida.

Entre los enzimas de productos naturales purificados figuran dos formas de celulasa de habichuela que presenta alta actividad celolítica. En la precipitación con sulfato amónico se obtienen cuatro fracciones, de las cuales sólo tres son activas, presentando pl de 4,5 y 4,8 dos de ellas, mientras la tercera es una mezcla de las anteriores (34). Sin embargo en un trabajo reciente Koehler realizó una purificación del extracto enzimático y sólo obtuvo una celulasa (33).

También se han purificado dos celulasas de guisantes que se separan inicialmente por su solubilidad en tampón fosfato. La fracción soluble se pasa a través de columnas rellenas de DEAE-celulosa y Sephadex G-25 y el eluato se somete a electroforesis. La fracción insoluble se solubiliza mediante la aplicación de un gradiente de cloruro sódico y se realizan varios pasos de filtración por DEAE-celulosa, Sephadex G-100, concentración, etc. Los pl son 5,2 y 6,9 y sus respectivos pesos moleculares 20.000 y 70.800. En las fracciones así purificadas no se detecta actividad de β -glucosidasa ni de β -1,3-glucanasa (11).

En el tomate, por precipitación con sulfato amónico y posterior purificación, se han separado cuatro fracciones en las que se han identificado otros tantos enzimas: una β -glucosidasa inespecífica, una α - β -1,4-glucanasa y dos endo- β -celulasas, siendo estas últimas adecuadas para hidrolizar derivados insolubles de celulosa (61). Wallner identificó también una β -1-3-glucanasa de peso molecular 12.000 (66).

Awad llevó a cabo la purificación de una celulasa de aguacate a partir de un extracto liofilizado, empleando columnas de polvo de celulosa CF-11, obteniendo por iso-electroénfoque un pl de 4,7. Su peso molecular, determinado por electroforesis es 49.000 (2).

Existen múltiples trabajos sobre identificación de enzimas celolíticos procedentes de microorganismos, entre los que cabe destacar los llevados a cabo por Wood en relación a la purificación de enzimas producidos por *Trichoderma koningii* y *Fusarium solani* y los de Berghem referidos a *Trichoderma viride*.

Para la purificación de exo- β -glucanasa (C_1) procedente de *T. koningii* se realiza la precipitación usual con sulfato amónico y se separan los componentes de bajo peso molecular mediante paso por columna rellena de Sephadex G-75, se reúnen las fracciones de alto peso molecular pasándolas seguidamente por DEAE-Sephadex en el cual queda retenido C_1 , que se eluye posteriormente mediante solución de cloruro sódico. Al someterlo a electroforesis se separan dos enzimas, ambos corresponden a dos formas de C_1 . El C_x es un enzima

múltiple y al purificarlo se obtienen tres fracciones de pesos moleculares 13.000, 31.000 y 38.000. Todos se comportan de manera similar en la degradación de carboximetilcelulosa (70).

En la celulasa producida por *F. solani* se realiza una purificación de sus componentes a partir de las fracciones recogidas por precipitación fraccionada, identificándose una β -endo-glucanasa (C_x) de peso molecular 37.000 y una β -glucosidasa de peso molecular 400.000 (69). En trabajos posteriores, Wood lleva a cabo la purificación de C_1 para lo cual hace una separación previa de la β -glucosidasa por cromatografía de tamiz molecular en Ulro-Gel Aca-54 (71).

Durante los años 1972 a 1976 se realizan en Suecia una serie de trabajos encaminados al estudio del mecanismo de degradación enzimática de celulosa. Entre ellos figura el aislamiento y purificación de los enzimas producidos por *T. viride*. C_1 quedó definido como el enzima que actúa tanto solo como en sinergismo con el C_x para solubilizar fibra de algodón o celulosa cristalina. Su aislamiento comprende paso por columna de tamiz molecular Biogel P-10, cromatografía de cambio iónico y determinación de punto isoelectrico, que resulta ser 3,79, con un peso molecular medio de 42.000. En una de las fracciones separadas de la de C_1 , se contiene β -glucosidasa, cuyo peso molecular es 47.000 y su pl 5,74. El tercer componente es C_x , necesario para el ataque a la celulosa natural. Se aislaron dos enzimas de este tipo que, purificados por las técnicas usuales, presentan pl de 4,6 y 3,39 y pesos moleculares de 12.500 y 50.000, respectivamente (6) (8) (9) (10) (50).

BIBLIOGRAFIA

- 1.—Awad, M. y Young, R. E.—«Postharvest Variation in Cellulase, Polysaccharuronase and Pectinmethylesterase in Avocado Fruits in Relation to Respiration and Ethylene Production».—Plant Physiol. 64 (1979) 306-308.
- 2.—Awad, M. y Lewis, L. N.—«Avocado Cellulase: extraction and purification».—J. Food Sci. 45 (1980) 1.625-1.628.
- 3.—Barnes, M. F. y Patchett, B. J.—«Cell walldegrading Enzymes and the softening of senescent Strawberry fruits».—J. Food Sci. 41 (1976) 1.382-1.385.
- 4.—Bell, J. D. y Northcote, D. H.—«Structure of the cell wall Polysaccharide of baker's Yeast».—J. Chem. Soc. (1950) 1.944-1.947.
- 5.—Bell, T. A., Aurand, L. y Etchells, J.—«Cellulase Inhibitor in Grapes Leaves».—Bot. Gaz. 122 (1960) 143-148.
- 6.—Berghem, L. y Pettersson, L. G.—«Purification of a Cellulolytic Enzyme from *T. viride* active on highly ordered Celluloses».—Eur. J. Biochem. 37 (1973) 21-30.
- 7.—Berghem, L.—«The mechanism of Enzymatic Cellulose degradation by *T. virides*».—Acta Universitatis Upsalienis 317 (1974) 1-17.
- 8.—Berghem, L. y Pettersson, L. G.—«elation and some properties of a β -Glucosidase from *T. virides*».—Eur. J. Biochem. 46 (1974) 296-305.

- 9.—Berghem, L., Pettersson, L. G. y Axilj-Fredriksson, U. B.—«Characterization and enzymatic properties of a β -1,4-Glucan Cellobiohydrolase from *T. virides*.—*Eur. J. Biochem.* 53 (1975) 55-62.
- 10.—Berghem, L., Pettersson, L. G. y Axilj-Fredriksson, U. B.—«Purification and some properties of two different 1,4- β -Glucan-Glucanohydrolases from *T. virides*.—*Eur. J. Biochem.* 61 (1976) 621-630.
- 11.—Byrne, H., Christou, N. V., Verma, D. P. y MacLachlan, G. A.—«Purification and Characterization of two Cellulases from auxin-treated *Pae Epilobrya*.—*J. Biol. Chem.* 250 (1975) 1,012-1,018.
- 12.—Dettov, R. W.—«Bioconversion of Wheat Straw Cellulose/Hemicellulose to Ethanol by Saccharomyces uverum and Pecthyosolen tannophilus».—*Biotechnol. Bioeng.* 24 (1982) 1,105-1,113.
- 13.—Dickinson, D. B. y McCollum, J. P.—«Cellulase in Tomato Fruits».—*Nature* (1964) 525-526.
- 14.—Dunlap, Ch. E.—«Nutrients from Cellulose».—*Food Technol.* (1975) 62-67.
- 15.—Ericsson, K. E.—«New methods for the investigation of Cellulases».—*Advan. Chem. Ser.* 95 (1969) 83-104.
- 16.—Ericsson, K. E. y Pettersson, B.—«Extracellular enzyme system utilized by the fungus *S. pulvurentum* for the breakdown of cellulose».—*Eur. J. Biochem.* 51 (1975) 183-206.
- 17.—Etchells, J. L., Bell, T. A. y Williams, C. F.—«Inhibition of Pectinolytic and Cellulolytic Enzymes in Cucumber fermentations by Suspending Grape Leaves».—*Food Technol.* (1969) 204-208.
- 18.—Fargus, C. L.—«Mycologia 61 (1969) 120-129. —Según Tong, Ch. Ch. y Cole, A. L.—«Purification and Properties of the Cellulases from *T. aurantiaca*.—*Biochem. J.* 191 (1960) 83-94.
- 19.—Ferrari, T. E.—«Extraction and partial characterization of Cellulases from expanding *Pae spicata*».—*Plant Physiol.* 54 (1974) 487-493.
- 20.—Ghose, T. K.—«Saccharification Enzymatic of Cellulose».—*Biotechnol. Bioeng.* 11 (1969) 229-261.
- 21.—Gong, C. S., Ladisch, M. R. y Tsao, G. T.—«Enzymic Microbial Enzymes and Biotechnology».—Ed. Fogarty. Applied Science Publishers LTD (1983) 183-223.
- 22.—Gong, Ch., Ladisch, M. R. y Tsao, G. T.—«Hydrolysis of Cellulose». Ed. Brown. Adv. Chem. Series 181 Washington (1979) 261-287.
- 23.—Gritzall, M. y Brown, R. D.—«Hydrolysis of Cellulose: Mechanism of Enzymatic and Acid Catalysis».—Ed. Brown. Adv. Chem. Series 181 Washington (1979) 237-280.
- 24.—Han, Y. W. y Srinivasan, V. R.—«Isolation and characterization of a Cellulose-utilizing Bacterium».—*Appl. Microbiol.* 16 (1968) 1,140-1,145.
- 25.—Hasegawa, S. y Smolensky, C. D.—«Cellulases in Dates and its role in Fruit softening».—*J. Food Sci.* 36 (1971) 988-987.
- 26.—Hernedia, A. y F. Bolaños, J.—«Cellulases en acetunas y su posible influencia en los cambios de textura. II. Actividad celololítica en la variedad Hojiblanca».—*Grasas y Aceites* 36 (1985) 130-133.
- 27.—Hernedia, A. y F. Bolaños, J.—«Cellulases en acetunas y su posible influencia en los cambios de textura. III. Estudio de algunos factores que pueden modificar su actividad».—*Grasas y Aceites* 36 (1985) 171-176.
- 28.—Hinton, D. M. y Pressery, R.—«Cellulase activity in Peaches during ripening».—*J. Food Sci.* 39 (1974) 783-785.
- 29.—Hobson, G. E.—«Cellulase Activity during the maturation and ripening of tomato fruits».—*J. Food Sci.* 33 (1968) 589-592.
- 30.—Hurst, J. N., Sullivan, P. A. y Shephard. —«Purification and Properties of a Cellulase from *A. niger*.—*Biochem. J.* 165 (1977) 33-41.
- 31.—Jamryn, M. A.—«Fungal Cellulases. I. General properties of purified enzyme preparations from *Aspergillus oryzae*.—*Austr. J. Sci. Res.* 5 (1962) 409-432.
- 32.—Johnson, E. A., Reese, E. T. y Darnin, A. L.—«Inhibition of Clostridium thermocellum Cellulase by end products of cellulolysis».—*J. Appl. Biochem.* 4 (1982) 64-71.
- 33.—Koehler, D. E.—«Purification of a Cellulase from Kidney Bean abscission zones».—*Phytochemistry* 20 (1981) 409-412.
- 34.—Lew, F. y Lewis, L. N.—«Purification and properties of Cellulase from *Phaseolus vulgaris*.—*Phytochemistry* 13 (1974) 1,359-1,366.
- 35.—Lewis, L. N.—«Two forms of cellulase in Bean Plants».—8th Int. Symp. on Plant Growth Regulators. Hirokawa Publishing Co. Inc. Tokyo (1974) 708.
- 36.—Lj, L. H., Ficus, R. M. y King, K. W.—«Purification of β -glucosidase from *A. Niger* and initial observations on the C₁ of *T. Koniginia*.—*Arch. Biochem. Biophys.* 11 (1965) 439-447.
- 37.—Mandels, M. y Reese, E. T.—«Enzymic Hydrolysis of Cellulose and related materials».—Ed. Reese. Pergamon Press (1983) 115-117.
- 38.—Mandels, M. y Reese, E. T.—«Recent Advances in Cellulase Technology».—*J. Ferment. Technol.* 54 (1976) 267-268.
- 39.—Mandels, M. y Weber, J.—«The production of Cellulases».—*Adv. Chem. Ser.* 95 (1969) 391-414.
- 40.—Mandels, M., Hertz, L. L. y Nyström, J.—«Enzymatic hydrolysis of waste Cellulose».—*Biotech. Bioeng.* 16 (1974) 1,417-1,483.
- 41.—Mandels, M. y Sternberg, D.—«Recent advances in Cellulase Technology».—*J. Ferm. Tech.* 54 (1976) 267-268.
- 42.—Miller, M. A., Effard, M. J. y Gaufield, D. F.—«Hydrolysis of Cellulose: Mechanisms of Enzymatic and Acid Catalysis».—Ed. Brown. Adv. Chem. Series 181 Washington (1979) 71-89.
- 43.—Moore, W. E., Effard, M. J. y Miller, M. A.—«Hydrolysis of Wood and Cellulose with Cellulolytic enzymes».—*J. Agr. Food Chem.* 20 (1972) 1,173-1,175.
- 44.—Ogawa, J. y Toyama, N.—*J. Ferment. Technol.* 46 (1963) 367-374.—Según Berghem, L. E. y Pettersson, L. G.—«The mechanism of Enzymatic Cellulose Degradation».—*Eur. J. Biochem.* 37 (1973) 21-30.
- 45.—Olutoko, P. G.—«Enzymic Hydrolysis of Cellulose: Mechanism of Enzymatic and Acid Catalysis».—Ed. Brown. Adv. Chem. Series 181 Washington (1979) 261-287.
- 46.—Pharr, D. M. y Dickinson, D. B.—«Partial Characterization of *Cx* Cellulase and Cellulase from Ripening Tomato Fruits».—*Plant Physiol.* 51 (1973) 577-583.
- 47.—Patel, I. B. y Vaughn, R. H.—«Cellulolytic Bacteria associated with sloughing spoilage of California Ripe Olives».—*Appl. Microbiol.* 25 (1973) 62-69.
- 48.—Pauli, R. E. y Jung, Ch. N.—«Postharvest variation in cell wall-degrading Enzymes of Papaya during Fruit ripening».—*Plant Physiol.* 72 (1983) 362-365.
- 49.—Pesis, E., Fuchs, Y. y Zauberman, G.—«Cellulase activity and Fruit Softening in Avocados».—*Plant Physiol.* 61 (1978) 416-419.
- 50.—Pettersson, L. G., Axilj-Fredriksson, U. B. y Berghem, L.—«The mechanism of enzymatic Cellulose degradation».—*Ferment. Technol.* (1972) 727-729.
- 51.—Reese, E. T., Siu, E. H. y Levinson, H. S.—«The biological degradation of soluble Cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of Cellulose Hydrolysis».—*J. Bacteriol.* 59 (1950) 465-497.
- 52.—Reese, E. T. y Mandels, M.—«Inhibition of Cellulases and β -glucosidases. Enzymic Hydrolysis of Cellulose and related materials».—Ed. Reese. Pergamon Press, Oxford (1963) 115-157.
- 53.—Reese, E. T.—«Biological Transformation of Wood by Microorganisms».—Ed. Springer Verlag, New York (1975) 165.
- 54.—Reese, E. T.—«Bution of Cellulase from Cellulose».—*Process Biochem.* (1982) 2-6.
- 55.—Riedl, P. D. y Strong, H. G.—«Cellulase and abscission in the Red Kidney Beans».—*Plant Physiol.* 53 (1974) 732-737.

- 56.—Romanelli, R. A., Houston, C. W. y Barnett, S. M.—*Appl. Microbiol.* 30 (1975) 278-281.—Según Tong, Ch., Cole, A. L. y Shepham, M. G.—«Purification and properties of the cellulases from the *T. aurantiacus*.—*Biochem. J.* 191 (1980) 83-94.
- 57.—Ryu, D. Y. y Mandels, M.—«Cellulases: bioproteasis and applications».—*Enzyme Micro Technol.* 2 (1980) 91-102.
- 58.—Seal, K. J. y Egdine, H. O. W.—«Food from Wastes».—Applied Science Publisher. London (1976) 88-78.
- 59.—Salby, K. y Mainland, C. C.—«The fractionation of *Myrothecium verrucaria* Cellulase by Gel Filtration».—*Biochem. J.* 94 (1985) 578-583.
- 60.—Shoenmaker, S. P. y Brown, R. D.—«Characterization of endo-1,4- β -D-glucanases purified from *T. virdes*.—*Biochim. Biophys. Acta* 623 (1978) 147-161.
- 61.—Sobotka, F. E. y Steitz, D. A.—«An apparent Cellulase complex in Tomato Fruits».—*Plant Physiol.* 63 (1974) 759-763.
- 62.—Stewart, B. y Leatherwood, J. M.—«Depressed synthesis of Cellulase by *Cellulomonas*.—*J. Bacteriol.* (1976) 609-615.
- 63.—Tong, Ch. Ch., Cole, A. L. y Shepham, M. G.—«Purification and properties of the Cellulases from Thermophilic fungus, *Thermosascus aurantiacus*.—*Biochem. J.* 181 (1980) 83-94.
- 64.—Toyama, N.—«Cellulose decomposition by *T. Konigii*. (VI).—*J. Fern. Technol.* 33 (1985) 274-280.
- 65.—Valiel, S.—«The Enzymes».—Ed. Sumner, Academic Press. New York (1960) 893-920.
- 66.—Walker, S. J. y Walter, J. E.—«Glycoelases in Cell wall-degrading extracts of ripening Tomato Fruits».—*Plant Physiol.* 55 (1975) 94-98.
- 67.—Wood, T. M.—«Catalytic Enzyme System of *Tichodermis konigii*. Separation of Components attacking native cotton».—*Biochem. J.* 109 (1968) 217-227.
- 68.—Wood, T. M.—«The Cellulase of *Fusarium solani*. Resolution of the enzyme complex».—*Biochem. J.* 115 (1968) 467-469.
- 69.—Wood, T. M.—«The Cellulase of *Fusarium oxysporum*.—*Biochem. J.* 121 (1971) 383-382.
- 70.—Wood, T. M. y McCrae, S.—«The purification and properties of the C₁ component of *Tichodermis konigii* Cellulases».—*Biochem. J.* 128 (1972) 1,183-1,192.
- 71.—Wood, T. M. y McCrae, S. I.—«Cellulase from *Fusarium solani*: purification and properties of the C₁ component. Carbohydrate Research».—Elsevier Publishing Company. Amsterdam 57 (1977) 117-123.
- 72.—Wood, T. M. y McCrae, S.—«Hydrolysis of Cellulose: Mechanisms of Enzyme and Acid Catalysts».—*Adv. Chem. Ser.* 181 Washington (1978) 181-209.

(Recibido: Enero 1985)

Libros

- Role of fats in food and nutrition.** — M. I. Gur. — National Institute for Research in Dairying. Shinfield. Reading.—Editado por Elsevier Applied Science Publishers. — Londres y Nueva York, 1984.—170 págs.—Precio: 24 libras.
- Este texto discute los muchos atributos de las grasas de la dieta que contribuyen a la nutrición del hombre y al placer de comer. El autor parte de la base de que ningún alimento puede considerarse como bueno o malo «per se» desde un punto de vista nutritivo, sino que hay que analizar su papel dentro de la dieta como un todo y, por ello, realiza un estudio detallado de la función de las grasas en la dieta interrelacionado con el papel nutricional de otros componentes de los alimentos.
- El libro está dividido en 2 partes que incluyen cada una de ellas cuatro interesantísimos capítulos con los siguientes títulos:
- Parte I, «Naturalidad, existencia y caracterización de grasas biológicamente importantes»:
- 1.—«¿Qué son las grasas?».
 - 2.—«Tipos de grasas en el organismo y sus funciones».
 - 3.—«Las grasas en los alimentos».
 - 4.—«Determinación de cantidades y tipos de grasas en alimentos».
- Parte II, «El papel metabólico y nutricional de las grasas».
- 65.—«El lugar de la grasa en la dieta».
- 6.—«Como se procesan las grasas en el organismo: metabolismo básico».
- 7.—«Grasas esenciales en la dieta».
- 8.—«Las grasas en la salud y en la enfermedad».
- La primera parte del libro constituye la base para discutir posteriormente en detalle los procesos más importantes que tienen lugar en el organismo, así como su papel en el mantenimiento de una buena salud y su posible contribución al desarrollo de ciertas enfermedades como aterosclerosis, cáncer y obesidad.
- Este magnífico texto, en la misma línea de claridad que el anteriormente publicado por M. I. Gur y A. T. James (*Lipid Biochemistry: An Introduction*), demuestra la capacidad de síntesis y de relación de su autor, que combina por una parte un tratamiento detallado donde es necesario, con la posibilidad de ampliar conocimientos en puntos colaterales a través de una información bibliográfica que, junto al autor y título, incluye un breve resumen del interés del trabajo citado en relación con el tema.
- En conclusión se trata, en nuestra opinión, de un excelente texto, de fácil comprensión, buena estructuración y amena lectura que será sin duda muy apreciado tanto por científicos y tecnólogos de alimentos como en los Departamentos y Centros de Nutrición y Bioquímica.—*M. C. Dobargans.*