



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**"Producción de Enzimas Celulolíticas para la
Obtención de Protoplastos de Células Vegetales"**

T E S I S

Que para Obtener el Título de:

B I O L O G O

Presenta.

Carlos Alberto Castillo Pompeyo



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN

Se aisló una cepa del hongo Aspergillus fumigatus, que es capaz de crecer sobre desechos lignocelulósicos de henequén en un medio sencillo. Cuando se utiliza fibra corta de henequén como sustrato este hongo produce una actividad celulolítica muy superior a la que se obtiene sobre otros sustratos como celulosa microcristalina, bagazo de caña y cascarilla de arroz. Se evaluó la producción enzimática durante la fermentación y se comparó con la de una cepa de colección de Trichoderma viride reportada como un hongo celulolítico verdadero. Los filtrados enzimáticos obtenidos se caracterizaron midiendo las actividades de endoglucanasas, exoglucanasas, pectinasas y xilanasas. Las celulasas de los filtrados fueron semipurificadas y se evaluó su capacidad para liberar protoplastos de células vegetales de hojas de Nicotiana sp. y cultivo de células in vitro de Agave fourcroydes. Al compararlas con preparaciones comerciales de celulasas se encontró una eficiencia similar y en el caso de Agave una eficiencia superior. La viabilidad medida con diacetato de fluoresceína fue de 90 % y los protoplastos no mostraron restos de pared al ser observados con blanco de calcofluor.

CONTENIDO

INTRODUCCION

Importancia y objetivo

Química y estructura molecular de la celulosa

ENZIMAS CELULOLITICAS

Sistema enzimático

Mecanismo de acción

PROPIEDADES DE LAS CELULASAS

Peso molecular

pH

Termoestabilidad

Inducción y represión

PRODUCCION DE CELULASAS

Microorganismos celulolíticos

Métodos de fermentación

Condiciones de fermentación

Usos y aplicaciones de las celulasas

TECNOLOGIA DE LOS PROTOPLASTOS

PARED CELULAR

OBJETIVO

METODOS

Aislamiento y selección del microorganismo

Medición de la actividad celulolítica por el cambio de fluidez relativa de la carboximetilcelulosa

Determinación de proteína por el método de Lowry modificado

Fraccionado de proteína por precipitación con sulfato de amonio

Actividad pectinolítica

Actividad xilanolítica

Medición de la actividad celulolítica sobre papel filtro

(Mandels, 1976)

Actividad proteolítica

Concentrado por ultrafiltración

Concentrado en rotavapor

Fermentación

Procesado de filtrados enzimáticos

Aislamiento de protoplastos

Determinación de viabilidad

RESULTADOS Y DISCUSION

Caracterización del filtrado

Procesado de los filtrados enzimáticos

Resultados obtenidos en la obtención de protoplastos

CONCLUSIONES

INTRODUCCION

Importancia y objetivo

La radiación solar que incide sobre la superficie de la tierra constituye la fuente primaria de energía en los sistemas vivientes. Aunque solamente el 0.1% la milésima parte de dicha energía, es captada por las plantas a través de la fotosíntesis, se ha calculado que el rendimiento anual neto de este proceso es de 1.8×10 toneladas de compuestos biodegradables de los cuales el 40% es celulosa. Este compuesto es, por lo tanto, el material orgánico renovable más abundante que existe en la biosfera y su potencial como sustrato de procesos biotecnológicos basados en degradaciones enzimáticas es enormemente prometedor.

Bassham (1975), estima que la producción neta de las plantas fotosintéticas de la tierra es de 155.2 billones de toneladas de biomasa seca por año; aproximadamente 24 billones de toneladas de esta biomasa es generada sobre tierras cultivables y praderas; McHale (1970) estima que tres cuartas partes de la masa son desechos y residuos no utilizables. Solamente 360 millones de toneladas (1.25%) del total de la masa productiva de la tierra es eventualmente usada para la alimentación humana. Sin embargo el 9% o cerca de 13.5 billones de toneladas se pierde como desecho de cosecha o en proceso de operación. En muchos casos estos desechos aparecen en formas y cantidades adecuadas para considerarlos como otras fuentes de materia prima en procesos de recuperación, particularmente la celulosa (Schuler, 1979).

La utilización de la celulosa para la obtención de alimentos, energía u otros productos, representa un problema básico, pues

este compuesto no es un carbohidrato de reserva como el almidón, que puede ser utilizado directamente, sino por el contrario, su función consiste en darle fuerza y resistencia a los tejidos de las plantas y debe por lo tanto ser transformada antes de poder ser utilizada.

La principal transformación consiste en la degradación hidrolítica del polímero a sus unidades monoméricas de glucosa. La hidrólisis puede realizarse por dos procesos diferentes, uno químico, hidrólisis ácida, y otro enzimático. La hidrólisis enzimática es más adecuada debido a que utiliza temperatura y presión bajas, pH casi neutro y pone más especificidad de reacción, por lo que no ocurre la descomposición de los azúcares producidos durante la hidrólisis. Además, no existe corrosión de equipo debido a las severas condiciones imperantes durante la hidrólisis ácida. La hidrólisis enzimática presenta, sin embargo ciertas desventajas importantes que encarecen y hacen difícil su operación, tales como su baja velocidad de hidrólisis, que impide alcanzar una hidrólisis completa del material celulósico y generalmente se requiere de pretratamientos a fin de incrementar una mejor utilización del sustrato por las enzimas (Linko, 1977).

Por lo anterior, la utilización de microorganismos y/o de sus enzimas es de gran importancia en la hidrólisis de materiales celulósicos, para la producción de azúcares y su posterior utilización como combustibles, alimentos, disolventes, vitaminas, proteína unicelular y otros productos químicos.

En el Estado de Yucatán la industria henequenera es una actividad económica muy importante, no solo por la ocupación directa que genera sino también por la derrama económica que significa (López, 1983). La industria henequenera genera una gran cantidad de desechos agroindustriales. La fibra es de material industrializable pero representa únicamente el 5% de la biomasa disponible y de esto hay que descontar un 10% que es fibra corta con un bajo o nulo valor comercial. En 1982 se obtuvieron 60,000 toneladas de fibras de las cuales aproximadamente 6,000 toneladas, son de fibra corta y 1,140,000 toneladas de desechos entre pulpa y jugos.

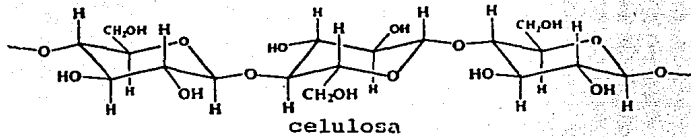
La producción de enzimas celolíticas aprovechando algunos de estos desechos es una alternativa mas para lograr una utilización integral del henequén.

Química y estructura molecular de la celulosa

La celulosa es el esqueleto del polisacárido mas ampliamente distribuido en la naturaleza, constituyendo aproximadamente el 50% del material de la pared celular de las plantas. Es uno de los tres principales, los otros dos son la hemicelulosa y la lignina. La celulosa es un polímero lineal de elevado peso molecular compuesto de unidades de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos β -1,4. La hidrólisis de estos enlaces produce principalmente D-(+)-glucosa y celobiosa, formada por dos unidades de glucosa. La celulosa nativa contiene más de 10,000 unidades de β -glucosa anhidra unidas formando una molécula de cadena larga. El peso molecular medio de la celulosa nativa es superior a 1.5 millones de daltones. Como la longitud de una unidad de glucosa anhidra es 0.515 nm (=5.15 Å), la

longitud total de una molécula de celulosa nativa es aproximadamente de 5 u. La pulpa de celulosa y el papel filtro por lo general tienen un grado de polimerización de entre 500 a 2100.

En una molécula de celulosa, las unidades de glucosa anhidra adoptan la configuración de silla, con los grupos hidróxilo en posición ecuatorial y los átomos de hidrógeno en posición axial.



Las uniones glucosídicas actúan como grupo funcional y éste, con los grupos hidróxilo, es lo que determina las propiedades químicas de la celulosa. Todas las reacciones químicas significativas ocurren en este sitio. Las moléculas de celulosa forman una fibrilla o un haz de moléculas en forma de fibra alargada, la cual es estabilizada lateralmente por puentes de hidrógeno entre los grupos hidróxilo de las moléculas adyacentes. El arreglo molecular de estos haces fibrilares es bastante regular según se observa en los patrones de difracción de rayos X en la celulosa cristalina.

La naturaleza química de la celulosa, sus propiedades físicas y mecánicas y su estructura fibrilar son deducibles de su estructura molecular. Como todos los polímeros lineales hidrofílicos, las moléculas de celulosa individuales están enlazadas juntas formando fibrillas elementales o protofibrillas de alrededor de 40 Å de ancho, 30 Å de grueso y 100 Å de longitud, en los que las cadenas de polímeros están orientadas paralela y firmemente unidas por

actuando como una barrera a la degradación enzimática de la pared celular. La lignina es una malla polimérica tridimensional formada por unidades de fenilpropano que tienen un crecimiento azaroso en una molécula grande y complicada con muchos diferentes tipos de uniones entre sus monómeros.

ENZIMAS CELULOLITICAS

Sistema enzimático

La degradación de la celulosa cristalina es un proceso complejo, que requiere de la participación de muchas enzimas. Está bien establecido que son necesarios por lo menos, tres diferentes actividades celulóliticas: exo- β 1,4 glucanasa (E.C.3.2.1.-) endo- β -1,4 glucanasa (E.C.3.2.1.4.), y β -glucosidasa (E.C.3.2.1.21.). Otra nomenclatura empleada para estos tres componentes básicos de las celulasas es la siguiente: la exo- β -1,4 glucanasa es también conocida como actividad, C₁, celobiosilhidrolasa; avicelasa; la endo- β -1,4 glucanasa, con actividad C₂, endoglucanasa carboximetilcelulasa y la β -glucosidasa como celobiasa (Enari, 1977; Chang, 1981; Argyrios, 1983; Sakamoto, 1984).

Exo β -1,4 glucanasa, C₁, son enzimas que tienen actividad sobre sustancias celulóliticas altamente ordenadas como el algodón y la celulosa microcristalina (Avicel), liberando unidades de celobiosa de las terminales no reductoras (Wood, 1977).

Las endo β -1,4 glucanasas son enzimas que tienen actividad sobre las regiones amorfas (para-cristalinas) de la celulosa o sobre los derivados solubles como la carboximetilcelulosa, en donde rompen al azar las cadenas de celulosa causando un rápido decremento de la

viscosidad, pero un incremento relativamente lento en azúcares reductores. La velocidad de hidrólisis se incrementa en el grado de polimerización dentro de los límites de la solubilidad del sustrato (Reese, 1971; Ghose, 1977; Lee, 1980).

La β -glucosidasa actúa sobre la celobiosa y los oligosacáridos pequeños hasta convertirlos en glucosa, su velocidad de ataque decrece marcadamente con el incremento en el grado de polimerización del sustrato (Lee, 1980).

En algunos hongos se han encontrado varias isoenzimas de las tres actividades celulolíticas, como por ejemplo en Sporotrichum pulverulentum que al hidrolizar celulosa produce cinco diferentes endo- β 1,4 glucanasas, una exo β -1,4 glucanasa y dos β 1,4 -glucosidasas (Ericksson, 1978).

En Trichoderma reesei se han encontrado tres endoglucanasas (Shoemaker, 1978) y dos celobiohidrolasas que son inmunológicamente distintas (Fagerstam, 1979; Montencourt, 1983). Estas múltiples formas de celobiohidrolasas, endoglucanasas y β -glucosidasas han complicado la interpretación de las respectivas funciones catalíticas y la biosíntesis de estas proteínas (Gritzali and Ross, 1979).

Mecanismo de acción

La hidrólisis de la celulosa cristalina requiere de la acción sinérgica entre endo y exo-glucanasas y es acelerada por la β -glucosidasa y posiblemente por otros componentes celulolíticos (Mandels and Andreotti, 1978). La hipótesis más comúnmente aceptada de su mecanismo de acción es que el sustrato es

inicialmente hidrolizado por las endo-glucanasas produciéndose intermediarios oligoméricos que son inmediatamente atacados por las exo-glucanasas (glucohidrolasas o celobiohidrolasas), que producen glucosa o celobiosa a partir de las terminales no reductoras. Ambos tipos de glucanasas continúan la hidrólisis de los oligómeros residuales hasta que finalmente la celobiasa corta las cadenas cortas de oligómeros y celobiosa para producir glucosa (Montenecourt, 1979).

El primer mecanismo enzimático, que involucra el componente C_1 en la hidrólisis de la celulosa, fue propuesto en 1950 por Reese y Siu. Estos autores sugirieron que el componente C_1 era el primero en un proceso de dos pasos, involucrando una ruptura de puentes de hidrógeno seguida por la hidrólisis de la celulosa distendida (dilatada) por la endoglucanasa (C_M). La existencia de C_1 fue postulada basándose únicamente en evidencias indirectas, a pesar de que ningún componente de este tipo fue aislado en ese tiempo. Algunos organismos son capaces de degradar la celulosa amorfa pero incapaces de degradar la celulosa cristalina. Otros degradan la celulosa altamente ordenada produciendo filtrados que son incapaces de degradar material ordenado, pero los mismos filtrados pueden degradar celulosa que ya ha sido hecha accesible por derivaciones es (CM-celulosa), hinchamiento en ácido fosfórico o molida.

Se argumentaba que cualquiera de estos tratamientos simula la acción del componente C_1 , por lo que se le consideró como un factor prehidrolítico que produce una celulosa "activada" la cual puede ser atacada por el complejo de enzimas hidrolíticas.

Esquema 1

Hipótesis original: $C_1 \text{ ----} \rightarrow C_{\alpha}$

Celulosa cristalina $\xrightarrow{C_1}$ celulosa reactiva $\xrightarrow{C_{\alpha}}$ β -glucosidasa

Actualmente se ha establecido que ésta no es la hipótesis más adecuada. El componente C_1 ha sido aislado de filtrados libres de células de varios hongos. Estudios detallados de la enzima indican que el componente C_1 corresponde a una exoglucanasa, (Ericksson, 1975), y en algunos casos es específicamente una celobiohidrolasa (Berghem, 1973), que actúa en sinergismo con el componente C_{α} y solubiliza la celulosa cristalina. Esto permite distinguir al componente C_1 de otras exoglucanasas.

En un sistema enzimático que contenga endo y exo-glucanasas y el cual deba ser presentado en el orden de su efecto degradativo sobre la celulosa cristalina, es lógico asumir que la enzima C_{α} de actividad aleatoria iniciará el ataque.

Esquema 2

Hipótesis $C_{\alpha} \text{ ----} \rightarrow C_1$

Celulosa $\xrightarrow{\beta\text{-glucosidasa}}$ celulosa $\xrightarrow{C_1}$ celobiosa $\xrightarrow{\beta\text{-glucosidasa}}$ glucosa
 cristalina reactiva

El sinergismo mostrado por mezclas de C_1 y C_{α} que solubiliza celulosa altamente ordenada puede ser explicado en los siguientes términos: el componente C_{α} genera nuevas terminales no reductoras en las cadenas que seguidamente son hidrolizadas por C_1 para producir celobiosa (Berghem, 1976).

Reese (1975) no está convencido de esto y argumenta que el primer paso en la hidrólisis enzimática, al igual que en otras estructuras altamente ordenadas como el DNA y la colágena, requieren de enzimas cuya función es producir algún desorden en las estructuras como un paso preliminar a su hidrólisis por otras enzimas. Con base en esto Reese (1977) propone una modificación a la hipótesis $C_1 \rightarrow C_w$, este nuevo concepto, retiene la idea que el componente C_1 causa un "hinchamiento" en la celulosa cristalina, pero sugiere que esto es precedido por la escisión de algunas uniones covalentes de la superficie cristalina. La celobiohidrolasa que es identificada como el componente C_1 en la hidrólisis $C_w \rightarrow C_1$ es relegada a un papel de hidrolizar celulosa activada junto con endoglucanasas y glucohidrolasas.

Hipótesis $C_1 \rightarrow C_w$ modificada

endoglucanasas \rightarrow oligómeros

Celulosa cristalina \rightarrow celulosa modificada

celobiohidrolasas \rightarrow celobiosa

glucohidrolasa \rightarrow glucosa

El mecanismo por el cual la celulosa cristalina es convertida en fragmentos solubles es aún un punto muy controvertido (Wood and McCrae, 1979).

PROPIEDADES DE LAS CELULASAS

Peso molecular

Los componentes enzimáticos del sistema celulolítico de varios hongos han sido purificados y caracterizados, el componente C_1 no

muestra mucha variación permaneciendo en un rango de entre 43,000 y 62,000 daltones, la endo β -1,4 glucanasa del componente C. muestra una considerable variación con un rango de peso molecular que fluctúa entre 5,300 y 55,000 daltones, aunque es posible que las pequeñas partículas sean subunidades de enzima multimérica. Exceptuando las partículas pequeñas, la mayoría de las enzimas se encuentran en un rango de 40,000 a 50,000 daltones. Se han reportado pesos moleculares de 50,000 a 76,000 en el caso de las exo-glucanasas y β -glucosidasas (Macris, 1984).

pH

Todos los sistemas celulolíticos conocidos hasta el momento han mostrado un óptimo de actividad en pHs ligeramente ácidos en un rango entre 4.0 y 5.0 dependiendo del componente del complejo celulolítico de que se trate y del microorganismo usado. Las enzimas se mantienen estables en un rango un poco más amplio, entre 3.5 y 6.0 (Mandels and Weber, 1969; Mandels and Andreotti, 1978; Kanda and Nahakubo, 1979; Macris, 1984).

Termoestabilidad

La termoestabilidad es una de las propiedades físicas más importantes de las celulasas debido a que la hidrólisis de la celulasa se produce más rápidamente a temperaturas elevadas. Las endoglucanasas son más estables que las exoglucanasas (Enari and Markkanen, 1977), y en muchos casos las β -glucosidasas exhiben una termoestabilidad considerablemente alta (Macris, 1984).

Los sistemas celulolíticos son termoestables entre los 50 y 60°C durante varias horas dependiendo del sistema (Wood and Mc Crae, 1977), (Fahnrich and Irrgang, 1982).

Inducción y represión

Las celulasas son un complejo enzimático inducible en Trichoderma viride, aunque también pueden ser constitutivas como en el caso de Pseudomonas fluorescens var celulosa, (Ghose, 1977). La biosíntesis de celulasas ocurre cuando T. viride es crecido en celulosa, lactosa, celobiosa y otros glucanos que presentan enlaces glucosídicos β -1,4 (Enari and Markkanen, 1977), (Mandels and Andreotti, 1978).

El ligero efecto inductor que se ha observado con la glucosa industrial es probablemente causado por la presencia de la soforosa que se forma durante la hidrólisis ácida de almidón. Mandels (1982) encontró que la soforosa (2-O-D-glucopiranosil-D-glucosa, es un potente inductor con una concentración óptima de 1×10^{-4} M que al aumentar a 1×10^{-3} M reprime la formación de celulasas (Buart and Markkanen, 1977).

La celobiosa es considerada como el inductor natural de la síntesis de celulasas ya que es el producto de la exo- β -1,4 glucanasas. Su acumulación, sin embargo, inhibe tanto en la exo- β -1,4 glucanasa y las endo- β -1,4 glucanasas, lo que se comprueba al crecer T. viride en un medio con celobiosa en donde produce menos del 5% de lo que produce al crecer sobre celulosa (Mandels and Reese, 1960), (Enari and Markkanen, 1977).

Se ha observado también que la presencia de azúcares fácilmente metabolizables y azúcares solubles reprime la producción de celulasas (Mandels and Andreotti, 1978). La adición de glucosa a cultivos con celulosa de Fusarium solani en un estado de rápida producción de enzimas, reprime la síntesis de enzimas y el grado de represión disminuye con el consumo de la glucosa, esto sugiere que la inducción por celulosa y la represión por glucosa están involucradas en la regulación de la síntesis de las celulasas (Bisen and Ghosh, 1982).

Cada enzima del complejo celulolítico es inducible y sensible tanto a represión catabólica como a inhibición por producto final, por lo que los mecanismos que controlan la síntesis y la actividad del complejo celulolítico total es intrincado (Montenecourt and Schamhart, 1979).

Algunos investigadores reportan que los inhibidores de las celulasas actúan sobre los grupos SH-libres de las enzimas. Las celulasas son inhibidas por celobiosa y metocel, inactivadas por proteasas, alógenos, metales pesados y detergentes. Los iones inorgánicos también inhiben las celulasas de I. viride como: Ag, Mn, Cu, Hg, borato de sodio y tiosulfato de sodio (Mandels, 1979). Otros inhibidores naturales de las celulasas de I. viride y Myrothecium virrucaria son los fenoles, los taninos y las leucoantocianinas, se presume que estos inhibidores naturales son los que proporcionan la resistencia de las plantas al ataque de las celulasas (Mandels and Reese, 1965; Bisen et al., 1982).

PRODUCCION DE CELULASAS

Microorganismos celulolíticos

La habilidad para producir enzimas celulolíticas está ampliamente distribuida entre los microorganismos y de manera muy rara en algunos insectos y moluscos.

La selección de organismos productores de celulastas depende de los propósitos a los cuales serán destinadas las enzimas. Las bacterias celulolíticas y los protozoarios son frecuentemente anaerobios y difíciles de crecer, cultivar además de que las celulastas están asociadas a la célula bacteriana y deben ser extraídas.

Los hongos celulolíticos y los actinomicetos por lo general crecen rápidamente en medios simples y secretan sus celulastas al medio por lo que las enzimas pueden ser obtenidas por centrifugación o filtración. Se han reportado una gran cantidad de hongos capaces de producir celulastas extracelulares; entre los que tenemos los siguientes:

Trichoderma viride (Mandels, Weber and Pariles, 1971)

Trichoderma koningii

Fusarium solani (Wood and Mc Crae, 1977)

Aspergillus niger (Boretta et al, 1973; Vidmar et al, 1984)

Penicillium funiculosum (Deshpande et al, 1983; Lanchke, 1983)

Aspergillus fumigatus (Trivedi and Rao, 1979; Stewart and Parry, 1981)

Chaetomium celluloliticum (Fahnrich and Irrgang, 1982)

Polyporus versicolor y Polyporus tilipiferae (Kanda et al, 1976)

Sporotrichum termophile (Coutts and Smith, 1976; Argirios Margaritis, 1983)

Trichoderma harzianum (Maninder et al, 1984)

Seytalidium lignicola (Desai et al, 1982)

Sporotrichum pulverulentum (Eriksson and Petterson, 1974)

Trichoderma longibrachiatum (Trivedi, 1984)

Fusarium lini (Vaidya, 1983)

Estos hongos producen celulasas cuando son cultivadas en celulosa, sin embargo algunos producen filtrados que pueden degradar totalmente la celulosa sólida (Mandels and Webber, 1969).

Algunos microorganismos excretan solamente endoglucanasas o -glucosidasas, y por lo tanto son incapaces de hidrolizar la celulosa cristalina nativa. Solamente los microorganismos celulolíticos verdaderos poseen esta actividad y pueden hidrolizar la celulosa insoluble a azúcares solubles.

Se ha puesto especial énfases en la obtención de cepas con una alta producción de celulasas. Trichoderma viride ha sido reportado como uno de los mejores productores de enzimas y se han seleccionado algunas mutantes hiperproductoras: I. viride, RM.9414 (Mandels and Weber, 1971; Mandels et al, 1979, Warzywoda et al, 1983) y el Trichoderma reesei R.U.T.-C30 (Sheldon, 1985).

Otras especies de hongos han sido mutagenizadas para obtener variedades hiperproductoras o desreguladas como en el caso de Aspergillus fumigatus (Wase and Vaid, 1983).

Métodos de fermentación

Existen tres técnicas básicas por las cuales se puede producir celulasas:

i) Cultivo semisólido: en el cual el sustrato insoluble es depositado en capas delgadas de 2 a 4 cm de profundidad y se humedece con una solución de nutrientes.

ii) Cultivo sumergido: en el cual el sustrato ya sea soluble o insoluble se encuentra suspendido en el medio de cultivo líquido (Faith, 1971).

iii) Cultivo sumergido continuo o semicontinuo.

La mayoría de los reportes sobre la producción de celulasas son realizadas a pequeña escala en cultivo en lote y por fermentación sumergido (Trivedi and Rao, 1979; Desai, et al, 1982; Lachke, et al, 1983; Watson, et al, 1984).

Las técnicas más comúnmente usadas son las siguientes:

1.- Cultivo estacionario en medio líquido.- Los cultivos se llevan a cabo en recipientes que varían en diseño según el tipo de microorganismos y fermentación (aerobia o anaerobia). Para el crecimiento aeróbico los microorganismos son generalmente incubados en paneles poco profundos y se inoculan con una suspensión de esporas.

2.- Cultivo sumergido se realiza en un líquido agitado para mantener homogéneos el pH, la temperatura, el PO_2 y la concentración de nutrientes y productos. Los gradientes son indeseables por lo que este método los reduce al mínimo.

3.- Proceso de "Carrousel de Kornuta" (Nystrom and Kornuta, 1975; Enari and Markkanen, 1977). Este sistema de operación semicontinuo consiste en cuatro líneas, cada una de ellas con cuatro fermentadores. Cuando el primer fermentador alcanza 25 h de fermentación, 10% de este sirve de inóculo para el siguiente y así a los siguientes fermentadores hasta alcanzar la actividad deseada. Cada fermentador es cosechado, esterilizado y vuelto a llenar. Este sistema fue experimentado por Nystrom y Kornuta, reduciendo el tiempo máximo de producción de enzimas de 3 a 4 d.

4.- Fermentación sólida o proceso Koji.- Este proceso es empleado en Japón para la producción de celulasas del *T. viride*. El sustrato insoluble suficientemente húmedo pero sin agua libre es apilado en bandejas e inoculado con una suspensión de esporas. Durante el crecimiento se atomiza una neblina de agua y el aire es forzado a circular entre el sustrato para asegurar una buena aereación. Este proceso es bastante efectivo para la producción de celulasas, sin embargo, presenta algunas desventajas ya que no se pueden obtener grandes volúmenes de producción y se requiere de considerable mano de obra lo que incrementa los costos y limita su empleo (Mandels and Weber, 1969; Chahal, 1985).

Condiciones de fermentación

Durante el proceso de fermentación para la obtención de celulasas hay que tener en cuenta varios factores como: el pH, la temperatura, la aereación, el inóculo, la composición del medio, la adición de surfactantes y los mecanismos de regulación.

La producción de celulasas está fuertemente influenciada por la naturaleza de la fuente de carbono (Enari and Markkanen, 1977), por

los fenómenos de inducción y represión y la accesibilidad del sistema enzimático al material celulósico (Lee, 1980) y por el aspecto económico, sobre todo cuando se piensa en una producción en gran escala.

La fuente de nitrógeno en el medio es una variable muy importante ya que puede influir en el pH y esto a su vez en la producción de enzimas. Debido a esto la elección y la concentración de la fuente de nitrógeno es de interés para los rendimientos de las celulasas. Se puede utilizar nitrógeno inorgánico u orgánico dependiendo de las necesidades de la cepa o de los costos del proceso.

El control de pH es crítico estableciéndose un compromiso entre el rango de actividad de las celulasas y el pH óptimo de crecimiento de la cepa sin permitir que este baje más de 3.5 ó 3.0 para prevenir la inactividad enzimática (Mandels and Andreotti, 1978). Los procesos de biosíntesis de celulasas y hemicelulasas en biorreactores son usualmente corridos en el rango de pH 4 a 5. En sistemas por lote el pH puede dejarse a su caída natural durante la fermentación, iniciándose esta a un pH 6.6 ó 6.0 y detenerse o controlarse al alcanzar pH 3.5 (Mandels, 1978).

Debido a las bajas velocidades de crecimiento obtenidos sobre materiales celulósicos, los requerimientos de oxígeno raramente llegan a ser un limitante. Experimentalmente los niveles de actividad obtenidos en fermentadores con diferentes velocidades de aereación y en distintos tipos de agitadores, no exceden los niveles alcanzados en cultivos en matraces agitados.

Se puede aumentar la producción de celulasas, por la adición de surfactantes como el tween 80 (polioxi-etileno sorbitan monooleato), que es el más utilizado, aprovechando la acción sobre la permeabilidad de la pared celular que propicia una mayor liberación de enzima (Mandels and Weber, 1967; Mandels and Stenber, 1976; Desai et al, 1982).

El tipo y tamaño de inóculo tiene un marcado efecto en la producción de muchas sustancias con actividad biológica (Desai et al 1982). El inóculo puede ser preparado como una suspensión de esporas (Maninder et al, 1984) o como micelio crecido en medio líquido (Cauchon, 1984), o micelio en cubos de agar (Fahnrich, 1984). La elección de la temperatura de fermentación se realiza en función de la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo y de la producción de las enzimas.

Usos y aplicaciones de las celulasas

Una de las aplicaciones más importantes de las celulasas es la sacarificación de los materiales celulósicos para la obtención de azúcares fermentables que se emplean en la producción de etanol, levaduras, proteína unicelular, disolventes, antibióticos y otros productos químicos (Spano, 1977). La sacarificación es la aplicación más estudiada tanto desde el punto de vista técnico como económico (Klesov, 1985). Otras aplicaciones de las celulasas son las siguientes:

- Incrementar los rendimientos de diosgenina en un 30 a 40% (Skladnev, 1982).

- La pared celular de las levaduras Saccharomyces cerevisiae y Candida utilis no es digerible en el tracto intestinal. El tratamiento con celulasas mejora la digestibilidad de las levaduras e incrementa la asimilación de aminoácidos y vitaminas (Ghose, 1973).
- Incrementa en un 30 a 50% los rendimientos en la extracción de aceites de los pétalos de rosa (Skladnev, 1982).
- Las enzimas celulolíticas son muy efectivas en el ensilaje de pajas. De acuerdo a un método propuesto en 1973, preparaciones (Celloviridin G3X) que contiene complejos enzimáticos de celulasas, hemicelulasas y pectinasas, hidrolizan de manera parcial la celulosa y hemicelulosa en la paja liberando azúcares que son transformados produciendo ácido láctico y ácido acético, las pectinasas producen ácido galacturónico. Estos ácidos obtenidos actúan como preservativos de la paja y mejoran su digestibilidad en animales (Skadnev, 1982).
- Grandes cantidades de preparaciones celulolíticas son utilizadas en la industria alcoholica. Las enzimas amilolíticas presentes en la malta son activadas con el uso del complejo enzimático que rompe las paredes celulares. Los rendimientos de alcohol por unidad de material crudo se incrementan entre un 2.8 y 3.2% (Skladnev, 1982).
- En la elaboración de vino se rocían las uvas con celulasas al mismo tiempo que se prolonga la maceración obteniéndose de esta forma un aumento del 10% en el rendimiento (Malmos, 1976).

- En el Japón las celulasas son empleadas en el tratamiento de los granos de arroz para la preparación del Saké (Ghose, 1973).
- Los alimentos de pollo y cerdos suplementados con preparaciones enzimáticas mejoran su digestibilidad.
- Incrementa los rendimientos en la producción de vinagre de frutas (Ghose, 1973).
- Durante la obtención de aceite de oliva puro, el rompimiento enzimático de las paredes celulares y una parcial descomposición de fibras y pectinas incrementa el rendimiento. A nivel de planta piloto se han mejorado los rendimientos entre un 8 y 12% y a nivel industrial en un 17 a 27% (Malmos, 1976).
- En la obtención de protoplastos de células vegetales (Cocking, 1960).

En general se puede afirmar que las celulasas son aplicables en cualquier proceso en el que se desee hidrolizar fibras de celulosa.

TECNOLOGIA DE LOS PROTOPLASTOS

El término protoplasto fue introducido por Hanstein en 1880 para designar la materia viva dentro de la pared celular de la planta. El primero en aislar protoplastos fue Klercker en 1892 por medio de microcirugía de células plasmolizadas. Sin embargo, la producción de protoplastos por este y otro método es limitada. En Inglaterra Cocking (1960) demostró la posibilidad del aislamiento enzimático de un gran número de protoplastos de células de plantas superiores. No fue sin embargo sino hasta 1968 cuando aparecieron en el mercado enzimas comerciales, que fue posible

llevar a cabo gran número de investigaciones relacionadas con el aislamiento de protoplastos de células vegetales.

Las preparaciones de celulasas y hemicelulasas disponibles para la liberación de los protoplastos son las siguientes: las celulasas R-10 (Onozuka) son parcialmente purificadas de filtrados del hongo Trichoderma reesei, y comercializada por Kinki Yakult Co. (Japdn); ésta preparación al igual que la de Calbiochem (U. S.), contiene actividades celulolíticas y hemicelulolíticas. Estas enzimas han sido las más frecuentemente usadas para aislamiento de protoplastos (Ruesink, 1980). La adición de otras hemicelulasas puede ser necesaria para la lisis de tejidos recalcitrantes, la hemicelulasa más frecuentemente utilizada ha sido la Rhozyme HP150. Las pectinasas también han sido utilizadas en la mayoría de los procedimientos de aislamiento de protoplastos. La preparación de pectinasas más frecuentemente utilizadas es la Macerozoma (Maserasa), obtenida del hongo Rhizopus. El uso de pectinasas solas también ha sido efectivo en la separación de células de explante de hojas.

Otras enzimas han sido usadas para aislar protoplastos de tejidos que no liberan protoplastos fácilmente. Enzimas como la Helicasa, del veneno de serpientes, ha sido usada en combinación con macerasa y celulasa para liberar protoplastos de tubérculo de papa. La colonasa, una fuerte pectinasa ha sido usada en combinación con la cellulysina para liberar protoplastos de callo de arroz. Estas enzimas son empleadas con poca frecuencia y no son necesarias para la liberación de protoplastos cuando se usa mesófilo de hojas o cultivo de células en suspensión.

Muchas preparaciones enzimáticas comerciales contienen sustancias tóxicas e impurezas. En muchos casos esto incluye ribonucleasas, proteasas, lipasas y otras enzimas, fenoles y sales.

Se ha observado inconsistencia de las impurezas entre cada lote de enzimas, por lo cual algunos investigadores purifican las preparaciones comerciales, sin embargo las preparaciones de celulasas altamente purificadas son menos efectivas en la liberación de protoplastos que las preparaciones parcialmente purificadas, lo que sugiere que algunas enzimas contaminantes son necesarias para la digestión eficiente de la pared celular. No obstante existe un compromiso entre el grado de pureza y la viabilidad de los protoplastos (Evans, 1983).

Los protoplastos son células "desnudas" susceptibles de una variedad de modificaciones que no serían posibles con la presencia de la pared celular, esto hace de los protoplastos una herramienta o modelo muy útil para estudios de fisiología vegetal, radiobiología, virología y patología, citogenética, bioquímica, biología molecular, genética y transformación (Loyola, 1985).

Entre las aplicaciones más importantes de los protoplastos se encuentran:

a) La fusión de protoplastos para la producción de "híbridos somáticos" lo que permite que superar la incompatibilidad física o sexual de los progenitores. La fusión no está limitada a individuos de una misma especie, también es posible entre grupos tan diversos como son monocotiledones y dicotiledones (Bajaj, 1977).

ENZIMA	FUENTE COMERCIAL	ORGANISMO
Celulasa Driselasa	Kyowa Hakko Kogyo Co. (Japan) Plenum Scientific, Hackensack, NJ.	<u>A. basidiomycete</u>
Cellulysin (Onozuka) R-10)	Calbiochem, San Diego CA.	<u>Trichoderma</u> <u>reesei</u> (formerly <u>T. viride</u>)
Celulasa	Sigma Chemical, St. Louis, MO.	<u>Aspergillus</u> <u>niger</u>
Hemicelulasas Rhozyme HP150	Corning Glass, Corning, NY.	<u>A. niger</u>
Hemicelulasa	Sigma Chemical, St. Louis, MO.	<u>A. niger</u>
Pectinasas Macerase (Macerozyme)	Calbiochem, San Diego, CA.	<u>Rhizopus</u> spp.
Pectinol AC	Corning Glass, Corning, NY.	<u>A. niger</u>
Pectolyase Y23	Kikkoman Shoyu Co., Ltd. (Japan).	<u>A. japonicus</u>
Pectinasa	Sigma Chemical, St. Louis, MO.	<u>A. niger</u>
PATE (Acido p�ctico acetil transferasa)	Hoechst (Alemania).	

embargo, estos términos nunca se refieren a sustancias específicas, prestándose en algunos casos a cierta confusión por lo que Hall (1976) los divide en sólo dos grupos:

- celulosa
- polisacáridos no celulósicos

La pared celular se divide en pared primaria con una composición aproximada de 90% de polisacáridos y 10% de glicoproteínas. La celulosa constituye entre el 20 - 30% de la pared celular primaria, los polisacáridos remanentes de la pared son moléculas extremadamente complejas conformando una matriz entre estos se incluyen el homogalacturonano, ramnogalacturonano, ramnogalacturonano II, xiloglucano, arabinogalactano y glucoarabinoxilano. La pared primaria rodea al protoplasma durante la elongación celular, mientras que en las células maduras existe la pared secundaria que recubre a la células dándole la forma característica de un tipo celular particular. La gran variabilidad de tipos celulares y sus funciones indican la existencia de grandes diferencias en la estructura y composición de la pared secundaria. En esta etapa de crecimiento de pared celular se produce una síntesis masiva de celulosa y cantidades relativamente pequeñas de matriz polisacárida, dejando de incorporarse el arabinogalactano y el ramnogalacturonano. Los cambios en el contenido de hidroxiprolina, indican que la cantidad de proteína aumenta y se sugiere que este es un paso importante en el control de la elongación.

Mientras que en la pared primaria las microfibrillas pueden estar colocadas al azar o transversales al eje de elongación y su orientación puede ser alterada por el crecimiento, en la pared

secundaria las microfibrillas son depositadas en la superficie interna con una orientación específica que permanece mas o menos fija. Existe cierta evidencia que sugiere la intervención de los microtúbulos en la orientación de las microfibrillas. Un componente que adquiere gran importancia en muchas paredes secundarias y que no se presenta en la pared primaria, es la lignina (Brechu *et al*, 1982).

OBJETIVO

El cultivo de protoplastos ha adquirido en los últimos años una gran importancia dentro de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, sin embargo el elevado costo de las enzimas y en el caso de nuestro país que tiene que importarlas ha hecho que su aplicación haya sido muy restringida. De esto surge la oportunidad de poder obtener una preparación enzimática de celulasas de bajo costo pero de una calidad que le permita degradar la pared celular vegetal para liberar protoplastos.

Para la realización de este objetivo se requiere que la preparación enzimática posea ciertas características como son:

- Bajo costo de producción: esto con el fin de disminuir el costo de la preparación final y hacer mas accesible su uso en investigación y docencia.
- Medio de cultivo sencillo: para simplificar su preparación y su posterior escalamiento.
- Tiempos cortos de fermentación: para reducir el costo de producción y evitar la autólisis.

- Bajo contenido de proteasas: porque la presencia de estas enzimas puede dañar los protoplastos una vez obtenidos.
- Rango de pH amplio: dado que las celulasas tienen su óptimo de actividad entre pH 4.5 y 5.0 y que este pH puede aceptar a los protoplastos, se requiere de una preparación enzimática que pueda actuar con eficacia hasta un pH de 5.8 a 6.0.
- Que no afecte la viabilidad de los protoplastos: se requiere que la preparación enzimática este libre de sustancias que puedan afectar de algún modo la viabilidad de los protoplastos para que estos puedan ser cultivados después de su obtención.

METODOS

Aislamiento y selección del microorganismo

Con el objeto de producir proteína unicelular a partir de los desechos agroindustriales del henequén, un proyecto realizado en el laboratorio de biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, se aislaron algunos hongos de estos mismos desechos y fueron evaluados por su actividad celulolítica usando como sustrato los mismos desechos (Santoyo, 1985). Se observó que uno de estos hongos, aparentemente del género *Aspergillus*, era capaz de hidrolizar fuertemente la pulpa de henequén sin incrementar de manera notoria la proteína unicelular (Ruz, 1985). Esta cepa fue crecida en varios desechos de lignocelulósicos para evaluar su productividad con respecto a otros hongos. Se observó que producía una buena actividad celulolítica en tiempos cortos de fermentación por lo cual se procedió a optimizar las condiciones de cultivo.

Medición de la actividad celolítica por el cambio de fluidez relativa de la carboximetilcelulosa

El ensayo desarrollado por Canevascini (1981), está basado en la disminución de la viscosidad de una solución que contiene un derivado celulósico soluble (carboximetilcelulosa o hidroxietilcelulosa) durante la reacción enzimática. Este método es muy sensitivo y específico para las enzimas de actividad "endo" en este caso para C_w.

El procedimiento es el siguiente:

Se prepara una solución de carboximetilcelulosa (sal de sodio de viscosidad media, Sigma No. C-4888) al 1% peso/volumen en un buffer de citratos 0.50 M de pH 5 (Desai, 1982). La carboximetilcelulosa debe agregarse lentamente al buffer y agitarse durante 24 h a 40°C hasta quedar completamente disuelta (Vaidya, 1984).

El viscosímetro calibrado tipo Cannon-Fenske (Kimax No. 200) se coloca en un baño de agua a temperatura constante a 40°C. El viscosímetro debe estar perfectamente seco y limpio. Se ponen 10 ml de sustrato en un tubo de ensaye de 25 ml (por duplicado) y se equilibran a 40°C en un baño durante 10 min.

A tiempo cero se añaden 0.5 ml del filtrado enzimático al sustrato y se mezcla vigorosamente. La mezcla de reacción se pone de inmediato en el tubo ancho del viscosímetro y se succiona por el tubo angosto hasta que la solución quede arriba del menisco superior. Se mide el tiempo de flujo de la solución al atravesar los meniscos. La mezcla de reacción se hace subir nuevamente hasta arriba del menisco superior y se mide otra vez el tiempo que tarda la solución en atravesar los meniscos.

La operación se repite 4 ó 5 veces durante 10 min de tiempo total de reacción.

El blanco de sustrato se prepara añadiendo 0.5 ml de agua destilada a un tubo con 10 ml de sustrato y se mide el tiempo de flujo entre los meniscos.

El blanco de agua consiste en 10.5 ml de agua destilada equilibrada a 40°C, y se mide el tiempo de flujo entre los meniscos.

Los cálculos se realizan de la siguiente manera:

$$Fr = (Ts - Tw) / (Tt - Tw)$$

$$Tn = 1/2 (Tt/60 \text{ seg.min}) + Tr = (Tt/120) + Tr$$

Donde:

Fr = Fluidez relativa de cada tiempo de reacción.

Ts = Tiempo de eflujo promedio del blanco del sustrato en segundos.

Tw = Tiempo de eflujo promedio del blanco de agua en segundos.

Tt = Tiempo de eflujo de la mezcla de reacción en segundos.

Tr = Tiempo de reacción desde la adición de la enzima al sustrato hasta cada inicio de la medición del tiempo de eflujo en minutos.

Tn = Tiempo de reacción en minutos, más un medio del tiempo de eflujo en minutos.

Se grafican los valores de Fr en las ordenadas y los valores de Tn en las abscisas y se obtiene una línea recta. La pendiente de esta línea corresponde al cambio de fluidez relativa por minuto que puede ser calculada por regresión lineal para obtener el coeficiente de relación y el error estándar de estimación.

Determinación de proteína por el método de Lowry modificado

El método utilizado para determinar proteína es una modificación al reportado por Tan (1984) y colaboradores, para medios que contienen sustratos lignocelulósicos.

El método más ampliamente utilizado para la determinación de proteínas es el de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), sin embargo se sabe que muchos componentes de los medios de cultivo interfieren con este método de análisis (Geiger and Bessman, 1972; Dully and Grieve, 1975). Se conoce poco sobre el efecto de los residuos lignocelulósicos, como madera y desechos agrícolas, en el método de Lowry cuando son usados sustratos celulósicos.

El procedimiento es el siguiente:

En un tubo Eppendorf de 1.5 ml se coloca 1 ml de la muestra, se colocan en un baño de hielo y se agrega 0.5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 50% previamente enfriado, las muestras se incuban en un baño con hielo durante 2 h y se centrifugan a 9,000 rpm durante 8 min en una microfuga Beckman modelo 152).

El sobrenadante se desecha y la proteína precipitada se resuspende con 1 ml de una solución de Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1 N. De esta suspensión se toman alícuotas y se determina el contenido de proteína de la siguiente manera:

Reactivos:

- A) Sulfato de cobre $5\text{H}_2\text{O}$ 1.0% en agua
- B) Tartrato doble de sodio y potasio 2.0% en agua
- C) Carbonato de sodio 2.0% en NaOH 0.1 N
- D) Una parte de A + una parte de B
- E) Una parte de D + 50 partes de C = 1 parte de E

Una alícuota de la suspensión de proteína se coloca en un filtro y se afora a 1 ml con agua destilada. Se agregan 5 ml del reactivo E, se agita vigorosamente con un vórtex y se deja reposar a temperatura ambiente durante 10 min.

Se adicionan 0.5 ml del reactivo de Folin diluido 1:2 en agua, se agita y se deja reposar a temperatura ambiente durante 30 min antes de medir la absorbancia a 590 nm en un espectrómetro Spectronic 2000 Bausch and Lomb.

La cantidad de proteína se calcula con referencia a una curva estándar de Albúmina Sérica Bovina (ABS).

Fraccionamiento de proteína por precipitación con sulfato de amonio

Este método basado en la solubilidad diferencial de las proteínas de una mezcla cuando son sometidas a una fuerza iónica elevada, permite purificar de manera parcial las proteínas, lo que nos permite fraccionar o separar en grupos de proteínas, cuando incrementamos de manera gradual la concentración de sulfato de amonio (Dixon and Webb, 1961).

El procedimiento es el siguiente:

El filtrado enzimático se coloca en un vaso de precipitado con agitación continua y se incuba en un baño de hielo. El sulfato de amonio sólido G.P. se agrega lentamente (Dixon and Webb, 1979) hasta alcanzar 40% de saturación (243 g/l) (Green and Hughes, 1955); después de 24 h en el baño de hielo se centrifuga a 39,000 g en una centrifuga Beckman modelo J2-21 con un rotor JA-20 durante 25 min.

El sobrenadante se lleva hasta 80% de saturación (285 g/l de filtrado enzimático inicial) y se deja otras 24 h en el baño de hielo antes de centrifugar. El sobrenadante se descarta y el pellet se resuspende en buffer citratos de pH 4.8 y 0.05 M.

Actividad pectinolítica

La actividad pectinolítica se mide por el método de determinación de azúcares reductores con el reactivo DNA (Ácido 2,5-dinitrosalil-silico) (Miller, 1959). Como sustrato se emplea una solución al 1.0% de pectina disuelta en buffer de acetatos 0.05 M y pH 5 (Mill, 1966).

El procedimiento es el siguiente:

En un tubo de ensayo se coloca 1.0 ml de la solución de pectina y se preincuba a 40°C durante 5 min antes de agregar 0.5 ml de filtrado enzimático. El tubo se agita y se incuba durante 1 h. La reacción es detenida con la adición de 3 ml del reactivo de DNS. Los blancos se preparan añadiendo primero el DNS y luego 0.5 ml del filtrado correspondiente. El color se desarrolla incubando los tubos en agua hirviendo durante 5 min, después de los cuales se adiciona agua destilada hasta completar 20 ml. Los tubos se centrifugan y se leen a 550 nm en un colorímetro Spectronic 20 Bausch and Lomb.

La cantidad de azúcares reductores se calcula con referencia a una curva estándar de Ácido galacturónico.

Actividad xilanolítica

La actividad xilanolítica se mide de manera similar a la pectinolítica, por determinación de azúcares reductores con

reactivo de DNS (Miller, 1959), pero usando como sustrato una suspensión de xilano al 2% en buffer de acetatos 0.05 M y pH 4.8. Los tubos se incuban a 40°C durante 20 min (Conrad, 1981) y la cantidad de azúcares reductores se calcula con referencia a una curva estándar de xilosa.

Medición de la actividad celulolítica sobre papel filtro (Mandels, 1976)

Este método permite evaluar la actividad global de todo el complejo de enzimas celulolíticas y consiste en la determinación de los azúcares reductores producidos por la acción de las celulasas sobre 50 mg de papel filtro Whatman No. 1.

El procedimiento es el siguiente:

En un tubo de ensayo de 18 mm se colocan 1.0 ml de buffer citratos 0.05 M pH 4.8, 50 mg de papel Whatman No. 1 y 0.5 ml de la solución enzimática; se agita en un vórtex y se incuba 1 h a 50°C. La reacción es detenida con la adición de 3 ml de reactivo de DNS (Miller, 1959). Los blancos se preparan añadiendo primero el DNS y luego 0.5 ml del filtrado correspondiente. Los tubos se incuban 5 min en agua hirviendo, se deja enfriar a temperatura ambiente y en un colorímetro Spectronic 20.

La cantidad de azúcares reductores se calcula con referencia a una curva estándar de D-glucosa.

• Preparación del reactivo Ácido 3-5 dinitrosalisílico (DNS). Los reactivos se añaden en el siguiente orden en agua destilada:

Hidróxido de sodio	1.4 %
Acido 305 dinitrosalisílico	0.75 %

Tartrato de sodio y potasio	21.60 %
Fenol	0.54 %
Metabisulfito de sodio	0.59 %

Actividad proteolítica

La actividad proteolítica se mide usando como sustrato una solución de albúmina sérica bovina al 1% disuelta en buffer citratos 0.05 M y pH 5.

La mezcla de reacción se prepara de la siguiente manera:

En un tubo de ensayo se coloca 1 ml del sustrato, se preincuba a 30°C durante 5 min y se le agregan 0.5 ml de filtrado enzimático, se deja que la reacción transcurra durante 30 min y se detiene con 0.5 ml de una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 35% (previamente enfriado).

Los tubos se dejan durante 15 min en baño de hielo y luego se centrifugan a 3,500 rpm durante 15 min. Posteriormente se toman alícuotas del sobrenadante y por el método de Lowry se desarrolla color. La absorbancia se mide a 590 nm en un Spectronic 2000 Bausch and Lomb.

La actividad se refiere a una curva estándar de tirosina y se define como una unidad la cantidad de enzima que libera una micromol de tirosina por minuto bajo las condiciones anteriormente descritas (Kling, 1982).

Concentrado por ultrafiltración

Para esto se empleó una columna de ultrafiltración Amicon modelo H1P10-20 con capacidad para excluir moléculas menores de 10,000

daltones de peso molecular. El proceso de concentrado se realiza de la siguiente manera: primero se centrifugan los filtrados enzimáticos a 12,000 rpm en rotor JA-14 en una centrifuga Beckman J2-21 a 4°C durante 30 minutos, el sobrenadante se pasa por un filtro Millipor de 0.45 μ y luego a través de la columna de ultrafiltración con ayuda de una bomba peristáltica marca Cole-Parmer.

Durante todo el tiempo de concentrado el filtrado se mantiene en baño de hielo hasta alcanzar la concentración deseada. El filtrado que atraviesa la membrana de la columna se desecha después de verificar la ausencia de actividad celulolítica.

Concentrado en rotavapor

Se realizaron algunas pruebas de concentración por destilación a presión reducida con los filtrados enzimáticos utilizando un rotavapor R-110 Brinkmann con una bomba de vacío marca Sargent-Welch modelo 1397.

Los filtrados enzimáticos se pusieron a 40°C en el rotavapor y se aplicó el vacío adecuado para destilar el agua del filtrado, de esta manera se puede alcanzar la concentración requerida.

Fermentación

Todas las fermentaciones se realizaron en cultivo sumergido utilizando matraces Fernbach de 2,800 ml con un litro de medio agitados a 200 rpm en una incubadora New Brunswick Scientific modelo G-25 a una temperatura de 36°C.

Los medios de cultivo empleados fueron los siguientes:

Medio Conrad modificado (se suprimió el extracto de levadura y los elementos traza) (Conrad, 1981).

KH_2PO_4	1.5 g/l
NH_2Cl	1.5 g/l
NaNO_3	0.5 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g/l
CaCl_2	0.3 g/l
Tween 80	0.5 ml/l

Medio de Mandels (Mandels, 1976).

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.4 g/l
KH_2SO_4	2.0 g/l
Urea	0.3 g/l
CaCl_2	0.3 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.3 g/l
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 mg/l
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.6 mg/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.4 mg/l
CoCl_2	2.0 mg/l
Tween 80	2.0 ml/l

Medio de Trivedi (Trivedi, 1979).

KH_2PO_4	2.4 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.3 g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.3 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.5 g/l
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.0 mg/l
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.6 mg/l

ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.4 mg/l
CuSO ₄ ·5H ₂ O	2.0 mg/l

Como fuente de carbono se usarón los siguientes sustratos: Avicel (celulosa microcristalina), fibra corta de henequén, bagazo de caña y cascarilla de arroz, todos estos sustratos, excepto Avicel, fueron molidos en un molino Wiley de cuchillas marca Brabender con tamiz de 0.78 mm y agregados al medio en base seca. Los medios de cultivo se esterilizarón durante 20 minutos a 15 libras de presión a 121°C. El pH de la fermentación se dejó a su calda natural, iniciándose a un pH de 6.5 (Mandels, 1978), el pH inicial se ajusta con solución de H₂SO₄ o NaOH 0.1 M estériles.

El inóculo de la fermentación consiste en una suspensión de esporas producidas por crecimiento del hongo en cajas de Petri con medio de papa dextrosa agar (PDA) durante 120 h a 36°C, utilizando 2 cajas de PDA por cada litro de medio (Stewart, 1981). El muestreo de la fermentación se realizó en condiciones estériles cada 24 h, tomando una muestra de aproximadamente 30 ml en la que se median el pH y las actividades enzimáticas.

Procesado de filtrados enzimáticos

Los cultivos de fermentación se cosechan a las 120 h y se centrifugan a 12,000 rpm en una centrifuga Beckman modelo J2-21 en un rotor JA-14 durante 40 min, el sobrenadante se concentra por ultrafiltración o por destilación a presión reducida y el concentrado se precipita con sulfato de amonio, el precipitado que se obtiene de la fracción 40 a 80% de saturación se resuspende en buffer de citratos 0.05 M pH 4.8 y se mide la actividad celololítica (FPA) y la proteína.

Haciendo una dilución en proporción al número de veces que se concentró. Para eliminar el exceso de sulfato de amonio, el precipitado resuspendido en buffer se dializa en la columna de ultrafiltración, posteriormente se liofiliza utilizando manitol como soporte. A los liofilizados se les mide la actividad enzimática y la proteína.

Aislamiento de protoplastos

Los protoplastos se obtuvieron a partir de hojas de Nicotiana glauca, de Catharanthus roseus y de Agave fourcroydes (cultivo de células "in vitro").

En el caso de las hojas, se les quitó la cutícula y se cortaron fragmentos de aproximadamente 1 cm de ancho por 2 cm de largo. En el caso de las células "in vitro", se les aplicó una relación de + 0.5 g de tejido por cada 5 ml de solución. Se pusieron en cajas de Petri de 6 cm de diámetro con 5 ml de solución de manitol al 12% para hacer la preplasmólisis, después de 60 min se quita la solución de preplasmólisis y se aplican las enzimas disueltas en buffer citratos 0.05 M y pH 5.8 en manitol al 12%. Se hicieron varias condiciones de concentración de celulasas con mazerocima (pectinasas) y sin mazerocima. Para cada condición se hicieron controles con celulasas comerciales R-10 de Onozuka, las condiciones experimentales y los controles con enzima comercial se igualaban en actividad (FPA) o en contenido de proteína. Se agitaron a 30 rpm en un agitador orbital New Brunswick modelo G-10 a una temperatura de 30°C, se hicieron observaciones al microscopio cada 30 min durante 4 h.

Determinación de viabilidad

La viabilidad se determinó utilizando los colorantes azul de tripano (100 mg/25 ml de H₂O) y diacetato de fluoroceína (FDA), (5 mg/ml de acetona). Se tomaron 50 ul de solución del colorante y se mezclaron con 100 ul del medio con protoplastos. Posteriormente se observaron al microscopio y se contaron los protoplastos totales y los protoplastos vivos por campo.

También se utilizó blanco de calcofluor para observar si los protoplastos no tenían restos de pared celular (Evans, 1983).

RESULTADOS Y DISCUSION

Para la producción de las celulasas se escogió una cepa del género de Aspergillus que fue aislada de desechos de lignocelulósicos de henequén. Esta cepa tiene además la capacidad de producir enzimas celolíticas cuando es crecida sobre fibra corta de henequén en un medio de cultivo de composición sencilla.

Se evaluaron tres medios de cultivo reportados para la producción de celulasas: el de Mandels (1976) para Trichoderma viride, un medio de Aspergillus fumigatus (Trivedi, 1979), y el medio de Conrad (1981) modificado, suplementados con fibra corta de henequén al 2% en base seca como sustrato. El pH inicial de cada fermentación fue fijado en 6.5. Los resultados se ilustran en la figura 1. Se observa que los medios reportados para Aspergillus (Conrad, 1981; Triverdi, 1979) dan resultados similares mientras que la actividad en el medio de Mandels (1976) reportado para T. viride es muy baja. El medio de cultivo de Conrad fue modificado eliminando los

elementos traza y el extracto de levadura pues se observó que no se modificaba la producción de enzimas al suprimir estos componentes. Los cambios del pH durante las fermentaciones se observan en la figura 2. El pH durante la fermentación es grandemente influenciado por la naturaleza de las fuentes de carbono y de nitrógeno, en este caso es probable que la urea presente en el medio de Mandels sea lo que contribuya a alcalinizar el medio, mientras que la caída del pH en el medio de Conrad podría deberse a un consumo mayor de sustrato. Es posible que la baja actividad celulolítica en el medio de Mandels se debe al aumento en el pH del medio durante la fermentación. Aunque se observa una correlación inversa entre la caída del pH que ocurre en el medio de Conrad y la disminución del incremento de la actividad celulolítica a las 48 h, no parece que la actividad se modifique drásticamente por la acidificación ya que la actividad celulolítica también decrece después de 48 h en el medio de Trivedi en el que el pH se ha mantenido muy estable alrededor de 6. Además la actividad en el medio de Conrad es la más elevada pese a la acidificación.

Al observar que en el medio de Conrad fue donde se obtuvo la mayor actividad celulolítica se procedió a optimizar la concentración del sustrato; para esto se probaron las siguientes concentraciones: 1.5%, 2.5% y 3.5%. Se observó que no existe una diferencia significativa entre 2.5% y 3.5% y que a 1.5% la actividad es menor, por lo que se optó por utilizar una concentración de 2.5%. Los resultados se muestran en la figura 3. Es notable la baja actividad enzimática cuando se emplea celulosa microcristalina como sustrato. Esto sugiere que el hongo podría estar requiriendo algún nutriente que el desecho lignocelulósico contiene o que la susceptibilidad al

Actividad celulolítica en diferentes medios Sustrato fibra corta

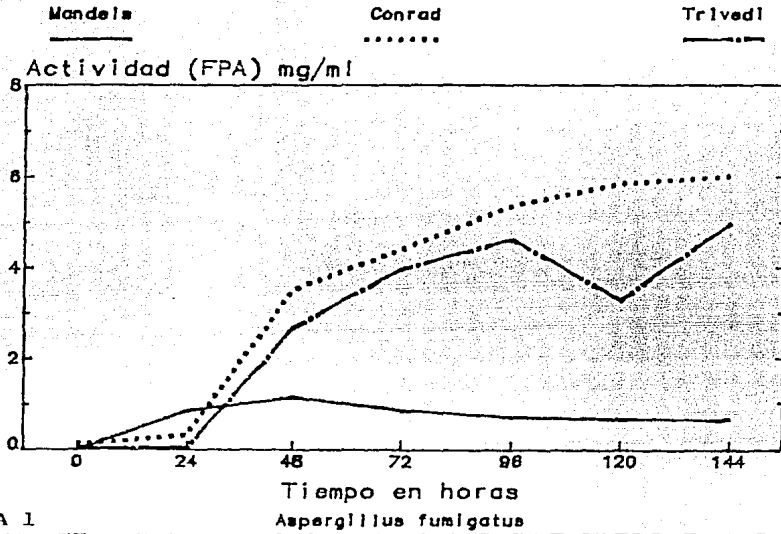


FIGURA 1

Variación del pH durante la fermentación Sustrato Fibra corta

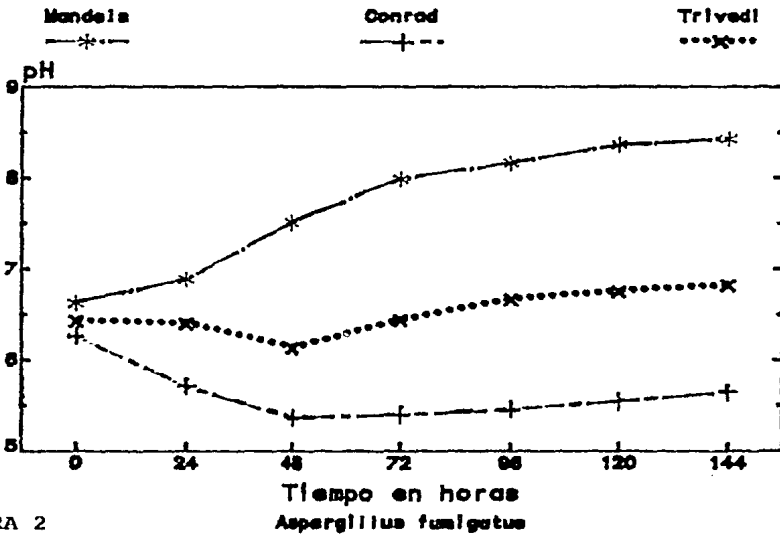


FIGURA 2

ataque enzimático es más alta en la fibra corta que en la celulosa microcristalina.

La actividad celololítica de este hongo fué estudiada también creciéndolo sobre otros desechos lignocelulósicos que son accesibles en la región, como el bagazo de caña y la cascarilla de arroz que es un desecho agroindustrial muy abundante en el estado de Campeche. Para esto se empleó el medio de Conrad modificado y los tres sustratos al 2% en base seca. En la figura 4 se observan los resultados.

En fibra corta de henequén el incremento de la actividad celololítica fué más rápido y se alcanzó una actividad mayor que con los otros sustratos; esto puede deberse a que la fibra corta tiene un menor contenido de lignina (Villalvazo, 1985), como se vé en la Tabla 1. En la cascarilla de arroz se produjo la menor actividad, esto puede deberse a que presenta un menor acceso a las enzimas del hongo.

TABLA 1

Contenido de lignina en desechos agrícolas	
Fibra corta de henequén	11% (Villalvazo, 1985)
Bagazo de caña	20.8% (Villalvazo, 1985)
Cascarilla de arroz	14.1-21.4% (Pomeranz, 1982)

Comparación de la producción de celulasas

Habiendo optimizado el medio de cultivo y la concentración de sustrato para la cepa de Aspergillus, se comparó su producción de

Efecto de la concentración de sustrato

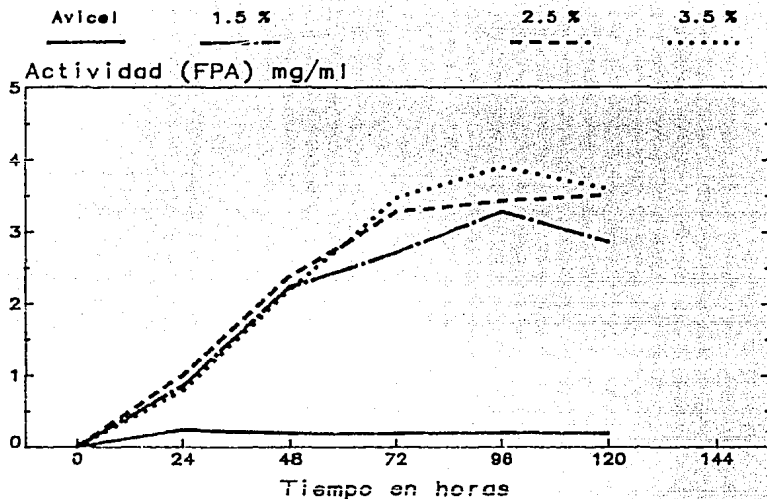


FIGURA 3

Actividad celulolítica en desechos agroindustriales

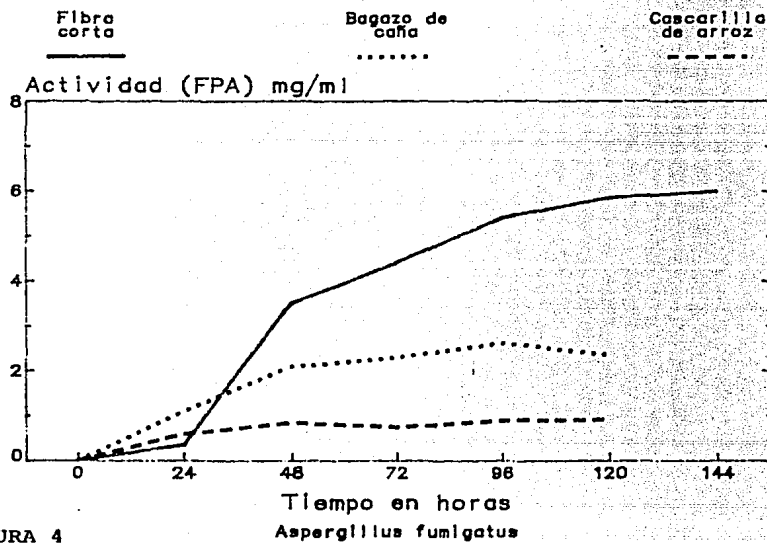


FIGURA 4

ticas con respecto a una cepa celulolítica de a esto se empleó Trichoderma reesei 192652 del cepario del Commonwealth Mycological Institute. La fermentación se realizó en medio de Mandels (que es el reportado para este hongo) y se utilizaron como sustratos avicel y fibra corta. Los resultados se muestran en la figura 5.

Los resultados muestran muy poca actividad celulolítica en la cepa de T. reesei crecida en el desecho lignocelulósico pero muy alta en celulosa microcristalina, alcanzando una actividad de 60 mg de azúcares reductores por mililitro. Esto coincide con lo reportado por T. reesei, lo cual es similar con la actividad alcanzada por nuestra cepa cuando es crecida en fibra corta y medio de Conrad modificado, lo que confirma la eficacia de este hongo para la degradación de desechos lignocelulósicos de henequén.

Caracterización del filtrado

Una vez establecidas las condiciones para Aspergillus se procedió a caracterizar la producción de enzimas y las características del filtrado enzimático. Lo primero que se evaluó fue la proteína extracelular a lo largo de la fermentación y su correlación con las actividades celulolíticas. Los resultados se muestran en la figura 6.

Con los datos de proteína extracelular y actividad para cada tiempo se pueden calcular los cambios en la actividad específica durante la fermentación. Los resultados se muestran en la figura 7.

Para caracterizar con más detalle los filtrados, se midió la actividad endo o Cx a lo largo de la fermentación por el método

enzimas celolíticas con respecto a una cepa celolítica de colección. Para ésto se empleó Trichoderma reesei 192652 del cepario del Commonwealth Mycological Institute. La fermentación se realizó en medio de Mandels (que es el reportado para este hongo) y se utilizarón como sustratos avicel y fibra corta. Los resultados se muestran en la figura 5.

Los resultados muestran muy poca actividad celolítica en la cepa de T. reesei crecida en el desecho lignocelulósico pero muy alta en celulosa microcristalina, alcanzando una actividad de 60 mg de azúcares reductores por mililitro. Esto coincide con lo reportado por T. reesei, lo cual es similar con la actividad alcanzada por nuestra cepa cuando es crecida en fibra corta y medio de Conrad modificado, lo que confirma la eficacia de éste hongo para la degradación de desechos lignocelulósicos de henequén.

Caracterización del filtrado

Una vez establecidas las condiciones para Aspergillus se procedió a caracterizar la producción de enzimas y las características del filtrado enzimático. Lo primero que se evaluó fue la proteína extracelular a lo largo de la fermentación y su correlación con las actividades celolíticas. Los resultados se muestran en la figura 6.

Con los datos de proteína extracelular y actividad para cada tiempo se pueden calcular los cambios en la actividad específica durante la fermentación. Los resultados se muestran en la figura 7.

Para caracterizar con más detalle los filtrados, se midió la actividad endo o Cx a lo largo de la fermentación por el método

Fermentación con *Trichoderma reesei* Comparación de sustratos

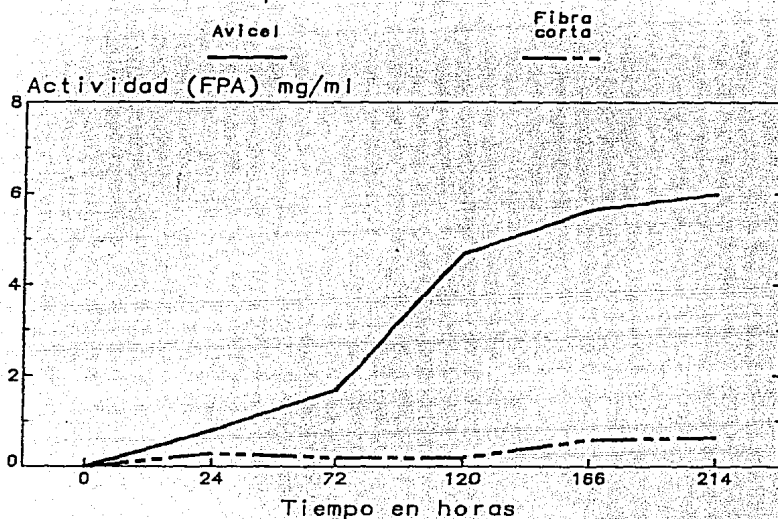


FIGURA 5

Proteína extracelular durante la fermentación *Aspergillus fumigatus* en fibra corta

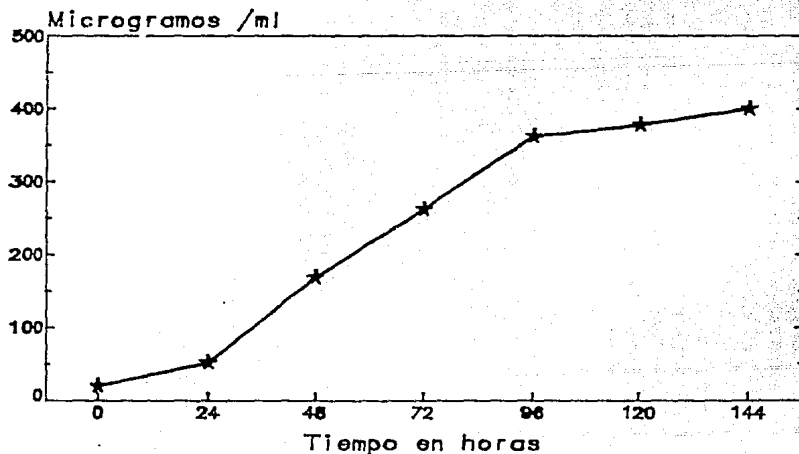


FIGURA 6

Actividad específica durante la fermentación
Aspergillus fumigatus en fibra corta

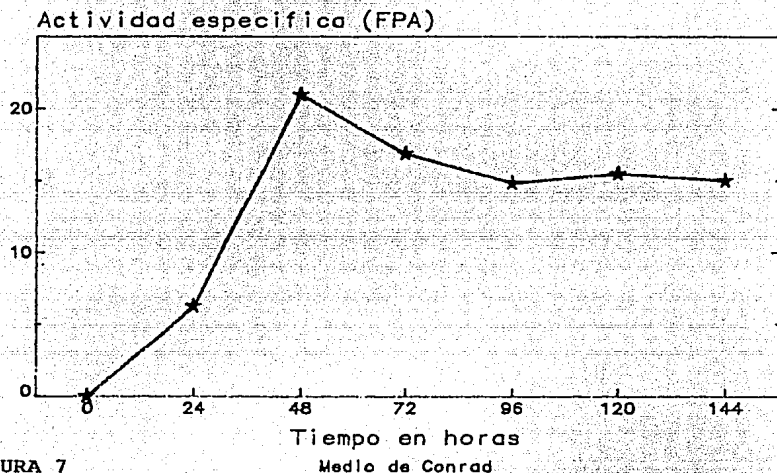


FIGURA 7

Actividad de endo- β -1,4 glucanasa
Aspergillus fumigatus en fibra corta

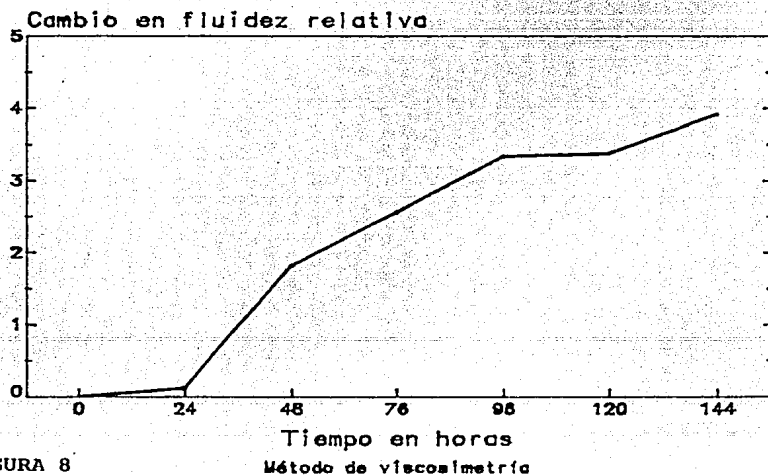


FIGURA 8

de cambio de fluidez relativa. En la figura 8 se observa un incremento a partir de las 24 h lo que coincide muy bien con la fase lag que se observa en la actividad total (FPA). Esto sugiere que para poder hidrolizar la fibra corta se requiere desde el inicio de la fermentación de las actividades Ci y Cx. La actividad Cx en nuestros filtrados es de gran importancia ya que se ha reportado que es necesaria para la obtención de protoplastos (Ishi y Mogi, 1983).

Dada su importancia en la obtención de protoplastos se evaluó también la actividad pectinolítica (figura 9). Esta actividad es significativa (entre 4 y 5 mg/ml de azúcares reductores) a pesar de que el contenido de pectina en la fibra corta es de únicamente 2.75% (Santoyo, 1983).

La actividad xilanolítica también fue evaluada a lo largo de la fermentación (figura 10) esta actividad es muy elevada, lo que puede deberse a que la fibra corta contiene altos niveles de xilosa, alrededor de un 15%, cuando es hidrolizada químicamente (Villalvazo, 1985).

La presencia de estas actividades (pectinolítica y xilanolítica) en los filtrados enzimáticos, puede ser un factor muy importante durante la degradación de la pared celular porque facilitaría la disgregación de las células permitiendo un mayor acceso a la celulosa al degradar a los polisacáridos acompañantes (Ishii y Mogi, 1983).

Una característica importante de la preparación enzimática para la producción de protoplastos es su actividad con respecto al pH, pues la obtención de protoplastos no debe realizarse a pHs menores de 5. Es por lo tanto, necesario establecer un compromiso entre un

Actividad pectinolítica durante la fermentación
Aspergillus fumigatus en fibra corta

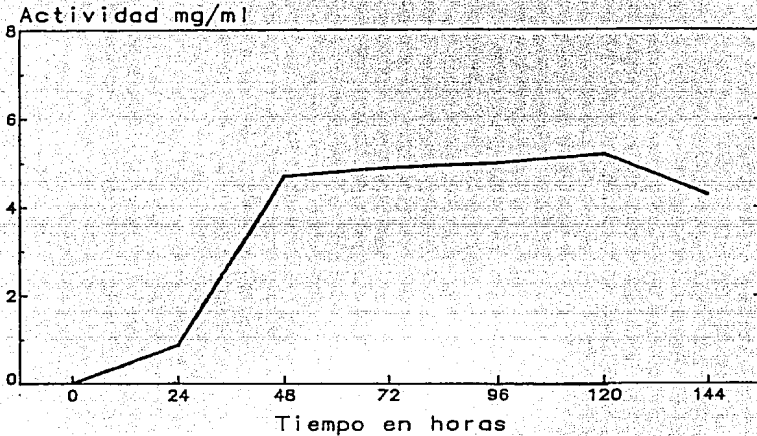


FIGURA 9

Método de azúcares reductores

Actividad xilanolítica durante la fermentación
Aspergillus fumigatus en fibra corta

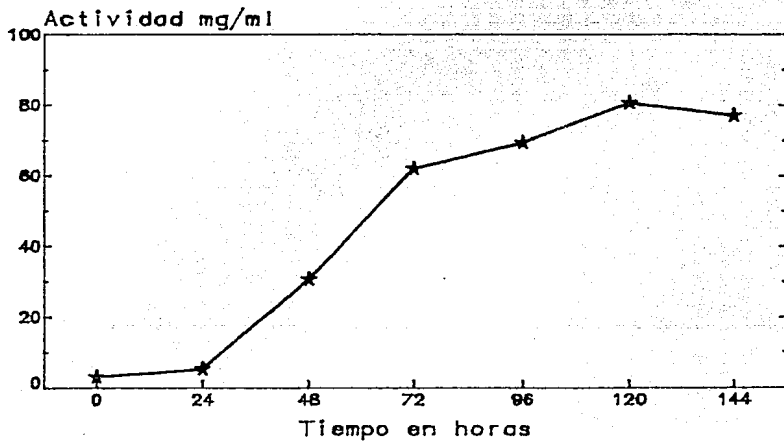


FIGURA 10

Método de azúcares reductores

pH adecuado (generalmente entre pH 5.0 y 5.8) para mantener la viabilidad de los protoplastos (Evans y Bravo, 1983). Por ello, se midió la actividad FPA en función del pH. Como se observa en la figura 11, el pH óptimo de la preparación es de 5; la actividad se mantiene de manera satisfactoria hasta un pH de 5.8 a partir del cual decae rápidamente. Será muy importante estudiar los cambios de pH en el medio de producción de protoplastos y asegurarse de que éste se mantenga lo más cercano al pH=5.8 para evitar una pérdida de viabilidad.

Al evaluar la actividad enzimática en los filtrados se observó un efecto de dilución, esto es, que no hay linealidad en las curvas de dilución de la enzima, lo cual puede causar serias discrepancias en el valor numérico de las actividades enzimáticas en términos de unidades (Cauchon, 1983). Para resolver este problema usamos un criterio, reportar en términos de azúcares reductores y utilizar siempre la mínima dilución que nos permita estar dentro de las curvas estándar de azúcares reductores. En la figura 12 se observa el efecto de dilución.

Procesado de los filtrados enzimáticos

Como primer paso se compararon varios métodos de concentrado como destilación a presión reducida, liofilización y ultrafiltración, encontrándose los siguientes resultados: en la destilación a presión reducida, la actividad por FPA se mantenía en un 94% con respecto a la actividad inicial, pero con la desventaja de concentrarse también algunos pigmentos y fenoles que acompañan al filtrado. En el método por liofilización se observó que los filtrados crudos formaban una capa pegajosa e insoluble al final del proceso con la pérdida del 80% de la actividad (FPA) por lo cual se

Actividad celulolítica en función del pH

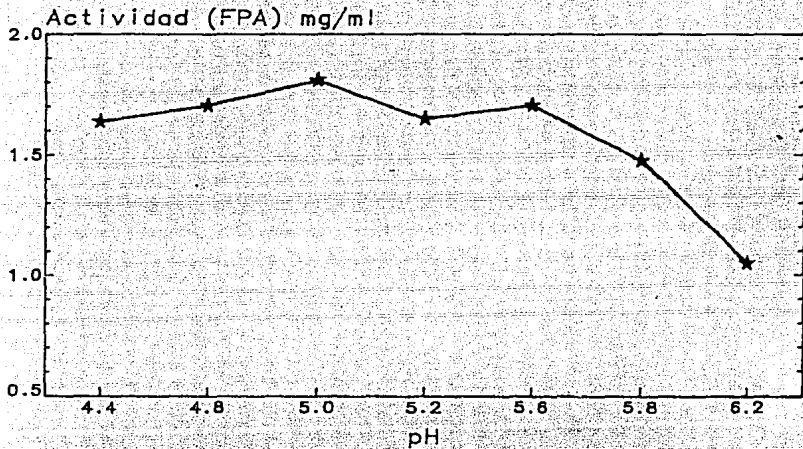


FIGURA 11

Efecto de dilución en la actividad celulolítica

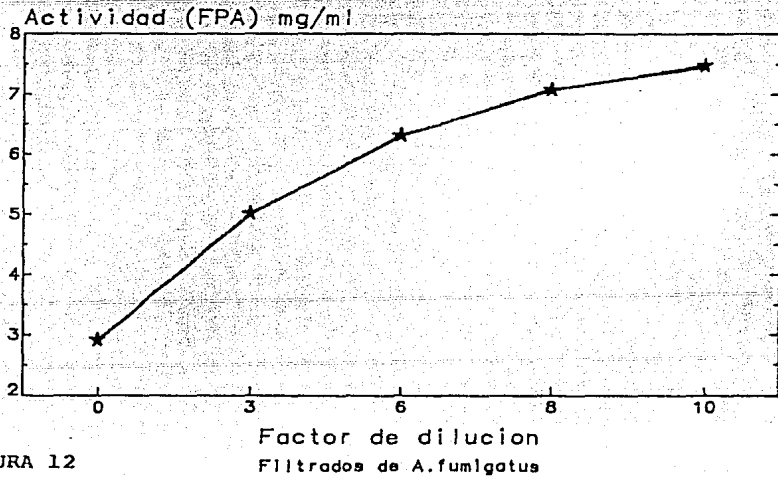


FIGURA 12

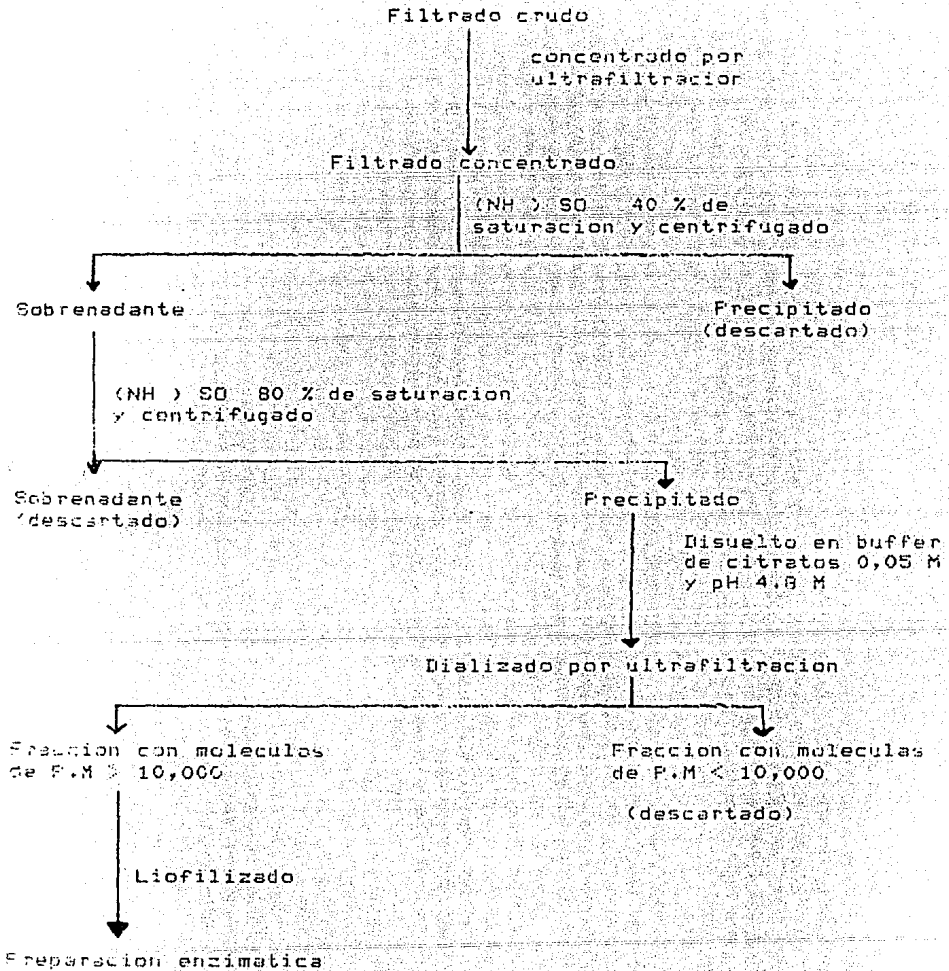


Diagrama de procesamiento de los filtrados

FALLAS DE ORIGEN

PROCEDIMIENTO	RENDIMIENTO (% de actividad)
Filtrado crudo	100
Concentrado por ultrafiltración	96
Concentrado por destilación a presión reducida	94
Concentrado por liofilización	20
Precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄	
Fracción 40-80 % saturación	85
Dializado por ultrafiltración	80
Liofilizado (manitol como soporte)	78

Tabla 2

Se midió la actividad celulolítica (FPA), pectinolítica y xilanolítica y la proteína a las preparaciones liofilizadas y se obtuvieron las actividades específicas y se compararon con las obtenidas en el filtrado crudo. Ver tabla 1

	celulolítica	pectinolítica	xilanolítica
Filtrado crudo	25 mg/ml	11 mg/ml	187.5 mg/ml
Liofilizado	162 mg/ml	62 mg/ml	352.6 mg/ml

Tabla 3

descartó este método. El procedimiento con mejores resultados fue el de ultrafiltración, con lo que se eliminan los pigmentos y fenoles de bajo peso molecular y se mantiene un 96% de la actividad (FPA). El filtrado ya concentrado por ultrafiltración se fraccionó precipitando a 20%, 40%, 60% y 80% de saturación con sulfato de amonio, a cada fracción se le midió la actividad celulolítica (FPA) encontrándose la actividad entre las fracciones 40 y 80% de saturación. La proteína precipitada en esta fracción fue resuspendida en buffer de citratos 0.05 M y pH 4.8. Con el fin de eliminar el sulfato de amonio remanente, el precipitado resuspendido se dializó en la columna de ultrafiltración. Los filtrados ya dializados se liofilizaron utilizando como soporte manitol que a su vez sirve como osmótico en la obtención de protoplastos.

El procesamiento de los filtrados enzimáticos está ilustrado en el diagrama 1. La tabla 2 muestra los rendimientos para cada paso del proceso y la tabla 3 las actividades específicas del filtrado crudo y de la preparación final.

Resultados obtenidos en la obtención de protoplastos

La evaluación de la eficiencia de las preparaciones enzimáticas para la obtención de protoplastos se hizo de manera cualitativa y no cuantitativa, debido a que las técnicas de purificación y manipulación de los protoplastos son muy laboriosas y con la necesidad de optimizar para cada especie y parte de la planta de la que se trate. Se evaluaron tres especies, los resultados se muestran en la tabla 4. En los resultados se observa una diferente sensibilidad de las especies a las preparaciones enzimáticas, esto puede atribuirse a la diferente composición de la pared celular.

La adición de pectinasas permite una mayor liberación de los protoplastos, en particular esto fue más notorio en el caso de Nicotiana sp. En el caso de callos de Agave, la preparación comercial no produjo protoplastos, pero nuestras preparaciones liberaron un número abundante, esto podría explicarse considerando que nuestras preparaciones enzimáticas son obtenidas a partir de fibra de la misma especie por lo que podemos esperar que

TABLA 4

	Preparación CICY sin pectinasas	Preparación CICY con pectinasas	Onozuka sin pec- tinasas	Onozuka con pec- tinasas
<u>Nicotiana</u> sp.	+ (90)	+++	+ (91)	+++
<u>Catharanthus</u> <u>roseus</u>	+	++	+	++
<u>Agave</u> <u>fourcroydes</u> (callo)	++	+++	--	--

Una + representa una pequeña liberación de protoplastos pero con un predominio de células intactas, ++ cuando se observaron numerosos protoplastos con algunas células intactas y +++ cuando los protoplastos eran muy abundantes y con muy pocos restos celulares. Entre paréntesis se indica el porcentaje de viabilidad.

las enzimas tengan una alta afinidad por la celulosa y por tanto de la pared celular de células de Agave.

Las determinaciones de viabilidad únicamente se realizaron con Nicotiana sp. en las que se observó un 95% de viabilidad con el azul de tripano y 90% de viabilidad con el diacetato de fluoreceína.

Cuando se observaron los protoplastos en presencia de blanco de calcofluor no se encontraron restos de pared adheridos a éstos, lo cual nos indica una degradación total de la pared.

CONCLUSIONES

Podemos concluir que nuestra preparación posee una potente actividad celololítica comparable a varios sistemas reportados en la bibliografía y comparable a las enzimas comerciales comunmente empleadas para la producción de protoplastos. Su costo de producción es relativamente bajo debido a la composición simple del medio de cultivo y a que el sustrato es un desecho agroindustrial y que los tiempos de fermentación son cortos.

La preparación es capaz de liberar protoplastos y su eficacia depende de la especie y de la parte de la planta de que provenga el tejido. Sin embargo, la presencia de una fuerte actividad Cx y las actividades xilanolítica y pectinolítica hacen que ésta preparación sea eficiente en un amplio rango de especies. Aunque sin embargo, faltan aún estudios para evaluar su actividad sobre otras especies, analizar la viabilidad de los protoplastos y su capacidad de regeneración de la pared y su división.

Será importante en un estudio posterior evaluar con más detalle los costos de producción y las posibilidades de escalamiento.

Otra alternativa a ser estudiada es la capacidad de los filtrados crudos para sacarificar desechos de henequén u otros desechos agrícolas, esto último tendría gran importancia si se logran reducir aún más los costos utilizando sales grado industrial y poder prescindir de la esterilización utilizando inóculos más grandes y temperaturas más altas de incubación ya que el organismo es termofílico.

BIBLIOGRAFIA

- Almin, K.E. and Eriksson K.E., Enzymic degradation of Polymers. Biochem. Biophys. Acta.139,(1967) pp 238-247.
- Bajaj, Y.P.S. Protoplasts Isolation, culture and somatic Hybridization. In: Plant cell, tissue and organ culture.Ed.Reinert, J. Bajaj, Y.P.S. Springer-Verlag. (1977) pp 467-496.
- Bassham, J.A. General considerations in cellulose as a chemical and energy resource, Biotech. and Bioengr. Symp. No.5, Wilke,C.R.,Ed.,Interscience, New York.(1975) pp 9.
- Berghem Lars,E.R. and Pettersson, L.G.. The mechanism of enzymatic cellulose degradation. Eur. J. Biochem.37.(1973) pp 21-30.
- Berghem Lars,E.R., Pettersson,L.G. and Axio-Fredriksson. The mechanism of enzymatic cellulose degradation. Eur. J. Biochem.61 (1976) pp 621-630.
- Bisen P.S., Ghosh, K. and Agarwal, G.P.. Induction and inhibition of cellulase complex in *Fusarium solani*. Biochem. Physiol.177, (1982) pp 593-599.
- Boretti, G. Archive Mikrobiology.URRS.Vol.29,(1972) pp 92-977.
- Brechu, F.E.A., Marquez, G.J., Laguna, H.G., Ortiz, R.M.A. y Aguilar, O.C. Pared Celular. Ed. Lab. Citologia. Facultad de Ciencias.U.N.A.M. (1982).
- Canevascini, G. and Gattlen, C. A comparative investigation of various cellulase assay procedures. Biotech. and Bioeng.23 (1981) pp 1573-1590.
- Cauchon, N. and LeDuyt. Novel process for the production of cellulolytic enzymes. Biotech. and Bioeng.27, (1985) pp 456-462.
- Cauchon, N. and LeDuy, A. Effect of dilution on carboxymethyl-cellulase and xylanase assay. Biotech. and Bioeng. 26 (1984), pp 988-991.
- Chahal, D.S. Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. Appl. Environ. Microbiol.
- Chang, M.M.,Chou, T.Y.C.and Tsao,G.T. Structure pretreatment and hydrolysis of cellulose. Advances in Biochemical Engineering. Vol.20. Ed. Fiechter, A..Springer-Verlag.(1981) pp 15-42.
- Chu-yun H., Teh-yi C., Kuei-chen Y. and Wen-an L. The preparation and properties of cellulase EA3-867. Proceedings of symposium on plant tissue culture. The sino-Australian symposium on plant. Plant Tissue Culture xxxx (1978) pp 285-292.
- Cocking, E.C. A method of isolation of plant protoplasts and vacuoles. Nature,187,(1960) pp 962-963.

Cockig, E.C. Uptake of foreign genetic material by plant protoplasts. *Int. Rev. Cytol.* 48, (1977) pp 323-341.

Conrad, D. Enzymatic hydrolysis of xylans. 1. A high xylanase and -xylosidase producing strains of Aspergillus niger. *Biotech. Lett.* 3, (1981) pp 345-350.

Coutts, A.D. and Smith, R.E. Factors influencing the production of cellulase by Sporotrichum thermophile. *Appl. Envir. Microbiol.* 31, (1976) pp 819-825.

Desai, J.D., Desai, A.J. and Patel, N.P. Production of cellulases and -glucosidase by shake culture of Scytalidium lignicola. *J. Ferment. Technol.* 60, (1982), pp 117-124.

Deshpande, V., Mishra, C., Ghadge, G.D., Seeta, R. and Rao M. Separation and recovery of Penicillium funiculosum cellulase and glucose from cellulosic hydrolysates using polyacrylate gel. *Biothec. Lett.* 5 (1983), pp 391-394.

Dixon M. and Webb E.C. Enzyme fractionation by salting out: a theoretical note. *Adv. Protein Chem.* 16, (1961), pp 197-219.

Duff Sheldon, J.B. Cellulase and beta-glucosidase production by mixed culture of Trichoderma reesei rut c30 and Aspergillus phoenicis. *Biotech. Lett.* 7, (1985), pp 185-190.

Enari, T.M. and Markkanen, P. Production of cellulolytic enzymes by fungi. *Advances in Biochemistry Engineering*. Vol.5 (1977) pp 3-22.

Eriksson, K.E. Enzyme mechanism involved in cellulose hydrolysis by the rot fungus Sporotrichum pulverulentum. *Biotech. Bioeng.* 20, (1978), pp 317-332.

Eriksson, K.E. Cellulases of fungi. *Trends in the Biology of Fermentation for Fuels and Chemicals*. Ed. Hollander, A. Plenum Press. (1981) pp 19-32.

Eriksson K.E. and Pettersson B. Extracellular enzyme system utilized by the fungus Sporotrichum pulvurentum (Chrysosporium lignorum) for the breakdown of cellulose. *Eur. J. Biochem.* 51, (1975), pp 193-206.

Evans D.A. and Bravo J.E. in *Plant protoplast isolation and culture*. International review of Cytology. Supplement 16. Plant protoplasts, Ed. Giles K.L., Academic Press (1983).

Fagerstam, L. and Petterson, LG. *FEBS Lett.* 119, (1980) pp 97-100.

Fahnrich P. and Irrgang K. Affinity chromatography of extracellular cellulase from Chaetomium cellulolyticum. *Biotech. Lett.* 6, (1984), pp 251-256.

- Fahrnich P. and Irrgang K. Cellulase and protein by Chaetomium cellulolyticum strains grown on cellulosic substrates. Biotech. Lett. 3, (1981), pp 201-206.
- Fahrnich P. and Irrgang K. Some characteristics of the cellulolytic enzyme system of Chaetomium cellulolyticum. Biotech. Lett. 4, (1982), pp 519-524.
- Faith, W.T., Neubeck, C.E. and Reese, E.T. Production and applications of enzymes. Advances in Biochemical Engineering. Vol.1. (1971) pp 77-111.
- Fan L.T., Lee Y.H., Beardmore D.H. Major chemical and Physical features of cellulosic materials as substrates for enzymatic hydrolysis. Adv. in Biochem. Eng. 14, (1980), pp 101-117.
- Fisher E.H. and Stein E.A. Alpha-amylase from human saliva. Biotechnological preparations, Vol. 8, Ed. Meister A.S., John Wiley and Sons, Inc., New York, (1961), 27-31.
- Galas E., Pyc R., Pyc K. and Siwinska K. Universal method for expressing activity of cellulolytic enzymes. Eur. J. Microbiol. Biotech. 11, (1981), pp 229-233.
- Ghose, T.K and Pathak, A.N. Cellulases 2: Applications. Process biochemistry. May. (1973) pp 20-21.
- Ghose, T.K. Cellulase biosynthesis and hydrolysis of cellulosic substances. Advances in Biochemistry Engineering. Vol.6. (1977) pp 39-74.
- Goel Subhash C. and Ramachandran K.B. Studies on the adsorption of cellulase on lignocellulosics. J. Ferment. Tech. 51, (1983), pp 281-286.
- Golstein, I.S. Organic Chemicals from Biomass. Ed. CRC Press. Boca raton florida. (1981) pp 10-14.
- Gritzali, M. Adv. Chem. Ser. 181, (1979) pp 237.
- Grous, W., Converse, A., Grethlein, H. and Lynd, L. Kinetics of cellobiose hydrolysis using cellobiase composites from Trichoderma reesei and Aspergillus niger. Biotech. Bioeng. 27, (1985) pp 463-470.
- Henrissat, B., Driiguez, H., Viet, C. and Schulein. Synergism of cellulases from Trichoderma reesei in the degradation of cellulose. Biotechnology. 3, (1985) pp 722-726.
- Herr, D. Baumer, F. and Dellweg H. Purification and Properties of an extracellular -glucosidase from Lenzites trabea. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 5, (1975) pp 270-278.

- Ishii, S. and Mogi, Y. Identification of enzymes that are effective for isolating protoplasts from grass leaves. *Plant Physiol.* 72, (1983) pp 641-644.
- Ivanova, G.S. Beletskaya, O.P. Okunev, O.N. Golovlev, E.L. and Kulaev, I.S. Fractionation of cellulase complex of the fungus Aspergillus terreus. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya*. 19, (1983) pp 362-368.
- Kanda, T. J. *Biochem.* 79, (1976) pp 977-988.
- Kanda, T.J., Nakakubo, S., Kazumasa, W., Nisizawa, K. The mode of enzymatic degradation of cellulose based on the properties of cellulase components. in: *Hydrolysis of cellulose: Mechanism of enzymatic and acid catalysis*. Ed. American Chemical Society. (1979) pp 211-236.
- Kassim, E.A. Cellulase production by strain of Mycrothecium sp. J. *Ferment. Technol.* 60, (1982) pp 381-383.
- Khan A.W. and Lamb K.A. Use of pretreated lignocellulose for the production of cellulases. *Biotech. Lett.* 6 (1984) pp 663-666.
- Klesov, A.A. Enzymatic conversion of cellulose to sugars and alcohol abroad: Present state of the art (review). *Appl. Biochem. Microbiol.* 21, (1983) pp 219-230.
- Kling, S.H., Araujo, J.S. and Perrone, J.C. Proteases from by products of Agave fibre production: Its quantitative evaluation, concentration and purification. *Process Biochem. Jan.* (1982) pp 29-31.
- Lachke, A.H., Bastawde K.B., Powar, V.K. and Srinivasan, M.C. Enhanced production of extracellular α -glucosidase by Penicillium funiculosum in submerged culture. *Biotech. Lett.* 5, (1983) pp 649-652.
- Lampert, D.T.A. Cell Wall Metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 21, (1970) pp 235-270.
- Lee, Y.H., Fan, L.T. and Fan, L.S. Kinetics of hydrolysis of insoluble cellulose. *Advances in Biochemical Engineering*. Vol. 11, (1980) pp 300-325.
- Leisola, M.S.A. Ulmer, D.C. Pitkanen, K. and Fiechter, A. Induction of cellulases in Chaetomium cellulolyticum by cellobiose. *Biotech. Bioeng.* 27, (1985) pp 1389-1391.
- Linder, W.A., Dennison C. and Quicke G.V. Pitfalls in the assay of carboxymethylcellulase activity. *Biotech. Bioeng.* 25, (1983) pp 377-385.
- Linko, M. An evaluation of enzymatic hydrolysis of cellulosic materials. *Advances in Biochemical Engineering*. Vol. 5, (1977) pp 24-48.

Lopez, H.R. La productividad agricola en el ejido henequenero. Ed. Centro de Investigacion Cientifica de Yucatan. (1983). Merida Yucatan.

Loyola, V.V.M. Obtencion de Protoplastos. Fundamentos Teorico Practicos de Cultivo de Tejidos Vegetales. Ed. Villalobos, A.V.M. Laboratorio de biotecnologia, centro de genetica, colegio de posgraduados, Chapingo. Mexico. (1985).

Lowry, O.H., Rosebroug, N.J., Farr, L.A. and Randal, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193. (1951) pp 265-275.

Macris, B.J. Production and characterization of cellulase and -glucosidase from mutant of Alternaria Alternata. Appl. Envir. Microbiol. 47, (1984) pp 560-565.

Malmos, H. Enzyme applications in food, pharmaceuticals and other industries. Industrial applications of cellulase. Food, Pharmaceutical and Bioengineering. Vol. 74 No. 172, (1976/1977) pp 93-99.

Mandels, M. and Sternberg, D. Recent advances in cellulase technology. J. Ferment. Technol. 54, (1976) pp 267-286.

Mandels, M. and Weber, J. The production of cellulases. American Chemical Society. Washinton D.C. (1969) pp 391-414.

Mandels, M., Weber, J. and Parizek, R. Enhanced cellulase production by a mutant of Trichoderma viride. Appl. Microbiol. 21, (1971) pp 152-154.

Mandels, M., Parrish, F.W. and Reese, E.T. J. Bacteriol. 83, (1962) pp 400.

Mandels, M. and Reese E.T. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. J. Bacteriol. 79, (1960) pp 816-826.

Mandels, M., Andreotti, R.E. Problems and challenges in the cellulose to cellulase fermentation. Process Biochem. May. (1978) pp 6-13.

Maninder, K.K. Mohinderjit, S.S. Dhanwant K.S. and Rajindar, S.S. Production and regulation of cellulases in Trichoderma harzianum Appl. Microbiol. Biotechnol. 20, (1984) pp 427-429.

Margaritis, A. and Merchant, R. Xylanase, CM-cellulase and avicelase production by the thermophilic fungus Sporotrichum thermophile. Biotech. Lett. 5, (1983) pp 265-270.

McHale, J. Ecological context, Braziller, New York, (1970).

Mill, P.J. The pectic enzymes of Aspergillus niger. Biochem. J. 99. (1966) pp 557-561.

- Miller, G.L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, (1959) pp 426-428.
- Montenecourt, B.S., Schamhart, D.H.J. and Eveleigh D.E. Mechanisms controlling the synthesis of the Trichoderma reesei cellulase system. Microbial polysaccharides and polysaccharases. Ed. Gooday, E. Academic Press. (1979) pp 327-337.
- Montenecourt, B.S. Trichoderma reesei cellulases. Trends in Biotechnology. 1, (1983) 156-160.
- Nystrom, J. and Kornuta, K.A. Symposium on enzymatic hydrolysis of cellulose. Helsinki, Mach. (1975) pp 181-197.
- Park, W.S. and Ryu, D.D.Y. Cellulolytic activities of Clostridium thermocellum and its carbohydrate metabolism. *J. Ferment.* 61, (1983) pp 563-571.
- Pomeranz, Y. and Ory, R.L. Rice processing and utilization. CRC Handbook of Processing and Utilization in agriculture. Vol. 2 : Plant products. Ed. Wolff, I.A. CRC Press. (1982) pp 164-165.
- Reese, E.T. Recent Adv. Phytochem. 7, (1977) pp 311.
- Reese, E.T. Biological Transformation of Wood by Microorganism. Ed. Leise, W. Springer-Verlag. New York. (1975) pp 165.
- Reese, E.T. and Mandels, M. Enzymatic degradation :in: Series on high polymers. vol. 5. Ed. Bikales, N.M. Jhon Wiley. (1971) pp 1079-1094.
- Reese, E.T., Siu, R.G.H. and Levinson, H.S. *J. Bacteriol.* 59 (1950) pp 485.
- Rivers, D.B., Gracheck, S., Woodford, L.C. and Emert, G.H. Limitations of the DNS assay for reducing sugars from saccharified lignocellulosics. *Biotech. Bioeng.* 26, (1984) pp 800-802.
- Ruesink, A. Protoplasts of plant cells. *Methods in enzymology.* Vol. 69. Academic Press. (1980) pp 69-84.
- Ruz, A.G.E. Incremento del contenido proteico de la pulpa de henequen por fermentacion sumergida con microorganismos termofilicos en cultivos mixtos. Tesis profesional. Escuela de quimica. Universidad Autonoma de Yucatan. Mexico. (1985).
- Sakamoto, R., Arai, M. and Murao S. Enzymatic properties of hydrocellulase from Aspergillus aculeatus. *J. Ferment. Technol.* 62, (1984), pp 561-567.
- Santoyo, M. Aislamiento de microorganismos celuloliticos a partir de deshechos de henequen. Tesis profesional. Escuela de quimica. Universidad Autonoma de Yucatan. (1984)

- Shaker Hossam M., Farid Mohamen A. and El-Diwanly Ahmed I. Optimization of the composition of the nutrient medium for cellulase and protein biosynthesis by thermophilic Aspergillus fumigatus NCR 272. *Enzyme Microb. Technol.* 6, (1984), pp 212-216.
- Shoemaker S.P. and Brown R.D. Jr. Enzymic activities of endo-1,4-D-glucanases purified from Trichoderma viride. *Bioch. Biophys. Acta* 523, (1978), pp 133-146.
- Shuler, M.L. Utilization and recycle of agricultural wastes and residues. Ed. CRC. Press.(1980) pp 98-130.
- Skladnev A.A. and Kalunyants. Cellulolytic enzyme preparations and their use in various branches of the national economy. *Appl. Biochem. Microbiol.* 18:6 (1983) pp 661-664.
- Spano, L.A. Enzymatic hidrolysis of cellulosic materials. *Microbial Energy Convecrion*. New York. (1977).
- Stewart J.C. and Parry Jocelyn B. Factor influencing the production of cellulase by Aspergillus fumigatus (Fresenius). *J. Gen. Microbiol.* 125, (1981), pp 33-39.
- Stewart J.C., Lester A., Milburn B. and Heptinstall J. Xylanase enzyme of Aspergillus fumigatus (Fresenius). *Biotechnol. Lett.* 7, (1985), pp 581-584.
- Tan L.U.L., Chan M.K.H. and Saddler J.N. A modification of the lowry method for detecting protein in media containing lignocellulosic substrates. *Biotechnol. Lett.* 6, (1984), pp 199-204.
- Trivedi Leena S. Production of cellulolytic enzymes by Aspergillus fumigatus. *Indian J. Exp. Biol.* 17, (1970), pp 671-674.
- Trivedi Leena S. and Rao K.K. Production of cellulolytic enzymes by Fusarium species. *Biotechnol. Lett.* 3, (1981), pp 281-284.
- Trivedi Shefali M. and Desai Jitendra D. Cellulases and beta-glucosidases by mix shake cultivation of Scytalidium lignicola and Trichoderma gibrachiatum. *J. Ferment.* 62, (1984), 211-215.
- Vaidya M., Seeta R., Mishra C., Deshpande V. and Rao M. A rapid and simplified procedure for purification of a cellulase from Fusarium lini. *Biotechnol. and Bioeng.* 26, (1984), pp 41-45.
- Van Zyl W. A study of the cellulases produced by three mesophilic actinomycetes grown on bagasse as substrate. *Biotechnol. and Bioeng.* 27, (1985), pp 1367-1373.
- Vidmar S., Turk V. and Kregar I. Cellulolytic complex of Aspergillus niger under conditions for citric acid production. Isolation and characterization of two beta-(1,4)-glucan hydrolases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20, (1984), pp 326-330.

Villalvazo, N., Ramirez, C., Agustin, G. Estudios tecnicos para la instalacion de una planta de celulosa y papel a partir del Henequen, en el estado de Yucatan. En: Biologia y aprovechamiento integral de Henequen y otros Agaves. Ed. Centro de Investigacion Cientifica de Yucatan. (1985) pp 213-222.

Wald S., Wlke C.R. and Blanch H.W. Kinetics of the enzymatic hydrolysis of cellulose. Biotechnol. and Bioeng. 26, (1984), pp 221-230.

Wase, D.A.J. and Vaid, A.K. Isolation and mutation of a highly cellulolytic strain of Aspergillus fumigatus. Process Biochem. December. (1983) pp 35-37.

Wase D.A.J., MacManamey W.J. Raymahasay and Vais A.K. Comparisons between cellulase production by Aspergillus fumigatus in agitated vessels and in an air-lift fermentor. Biotechnol. and Bioeng. 27. (1985), pp 1166-1172.

Warzywoda M., Vandecasteele J.P., Pourquie J. A comparison of genetically improved strains of the cellulolytic fungus Trichoderma reesei. Biotechnol. Lett. 5, (1983), pp 243-246.

Watson, T.G., Nelligan, I. and Lessing, L. Cellulase production by Trichoderma reesei (RUT-C30) in fedbatch culture. Biotechnol. Lett. 6, (1984), pp 667-672.

Weimer P.J. and Weston W. Relationship between the fine structure of native cellulose and cellulose-degradability by the cellulase complexes of Trichoderma reesei and Clostridium thermocellum. Biotechnol and Bioeng. 27, (1985), pp 1540-1547.

Wilkie, K.C.B. Hemicellulose. Chemtech. May. (1983) pp 306-319.

Wood T.M. and McCrae, S.I. Cellulase from Fusarium solani: purification and properties of the c1 component. Carbohydrate Res. 57, (1977), pp 117-133.

Wood, T.M. and McCrae, S.I. Sinergism between enzymes involved in the solubilization of native cellulose. Hydrolysis of cellulose: Mechanism of Enzymatic and Acid Catalysis. Ed. American Chemical Society. (1979).

Wood T. M. and Phillips D.R. Another source of cellulase. Nature 222, (1969), pp xxx-xxx.

Yakult Kimnki MFG. Co., LTD. Enzymatic isolation of living cells and their protoplasts from higher plants. Applications of cellulase "Onozuka" and "Macerozyme".

Zamost B.L. and MacClary D.O. The effects of plant growth regulators on cellulase production by Trichoderma reesei. Biotechnol. Lett. 3, (1983), pp 179-184.