

2ij. 117



# Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

TRABAJO MONOGRAFICO

"Xilanasas Microbianas"

S U S T E N T A N T E  
NORBERTA SANTILLAN CHAVEZ



CARRERA: QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1987



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.

# I N D I C E

Página

## INTRODUCCION

### CAPITULO I.-

#### (1,3)-B-D-XILANASAS

- 1.1.- Definición..... 1
- 1.2.- Fuentes productoras.... 1
- 1.3.- Purificación..... 3
- 1.4.- Propiedades fisicoquímicas..... 3
- 1.5.- Modos de acción..... 4

### CAPITULO II.-

#### (1,4)-B-D-XILANASAS

- 2.1.- Definición..... 5
- 2.2.- Fuentes productoras.... 5

### CAPITULO III.-

#### DIFERENTES METODOS DE ESTUDIO DE LAS (1,4)-B-D-XILANASAS.

- 3.1.- Sustratos..... 20
- 3.2.- Inducción e inductores de Endo-1,4-beta-xilanasas 24
- 3.2.1.- Inducción de Xilanasas en Streptomyces sp..... 30
- 3.3.- Determinación del grado de polimerización de Xilanas..... 31
- 3.4.- Definición de la unidad de Actividad de B-D-Xilanasas..... 33

3.5.- Purificación	
3.5.1.- Extracción de B-D-xi- lanasas extracelulares.	33
3.5.2.- Extracción de B-D-Xi- lanasas intracelulares.	34
3.5.3.- Separación y purifica- ción de B-D-xilanasas..	36
3.5.4.- Criterio de pureza.....	38

#### CAPITULO IV.-

#### PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LAS

##### (1,4)-B-D-XILANASAS.

4.1.- pH Óptimo.....	39
4.2.- pH estable.....	42
4.3.- Temperatura Óptima y -- estable.....	43
4.4.- Pesos moleculares, punto isoeléctrico y Km.....	52
4.5.- Inhibición de la activi- dad de las endo-(1,4)- Beta-D-xilanasas por - iones metálicos y otros compuestos.....	55
4.6.- Composición de aminoáci- dos y Carbohidratos.....	58

**CAPITULO V.-**

**MODO DE ACCION DE LAS (1,4)-B-D-XILANASAS.**

5.1.- B-D-Xilanasas Bacterianas.	60
5.2.- B-D-Xilanasas de Hongos..	60
5.3.- Hemicelulasas de Bacterias del Rumén.....	80
5.4.- Endo (1,4)-B-D-Xilanasas - de Cryptococcus Albidus...	82
5.5.- Sitio de enlace enzima-sustrato.....	87
5.6.- Síntesis e Hidrólisis.....	97
5.7.- Otras endo (1,4)-Beta-D-xilanasas.....	107
<b>USOS</b> .....	109
Tabla 1 .....	2
Tabla 2 .....	8
Tabla 3 .....	32
Tabla 4 .....	49
Tabla 5 .....	52
Tabla 6 .....	57
Tabla 7 .....	69
Tabla 8 .....	72
Tabla 9 .....	77
Tabla 10 .....	79
<b>CONCLUSIONES</b> .....	112
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	114

## INTRODUCCION

El interés en la utilización en los materiales de desecho de las plantas han dado considerable atención - a estudios acerca de las enzimas que degradan fracciones de hemicelulosa de las paredes celulares de las plantas. La determinación de los tipos principales y características estructurales básicas de los polisacáridos que forman la hemicelulosa; entre las que la xilana tiene una posición importante; han contribuido sustancialmente a la intensificación de los estudios de la enzima que degrada a la xilana: las XILANASAS.

En este contexto se han recopilado la mayor parte - de la literatura sobre estas enzimas, los sustratos degradable o no degradables dándole mayor importancia a la xilana por su amplia distribución; y a los microorganismos que las producen aunque se dará una lista de ellos se mencionaran en detalle sólo los más estudiados, los diferentes métodos de estudio, sus propiedades fisicoquímicas y catalíticas, sus usos y aplicaciones.

Se han llevado a cabo muchos estudios sobre los usos industriales de amilasas y celulasas. Sin embargo sólo - se han publicado reportes acerca de las xilanasas, pero no por ello menos importantes.

Los estudios realizados hasta 1985 han intentado - producir a estas enzimas, purificarlas, caracterizarlas, estudiar su estructura y modos de acción. Esto es muy - importante ya que a partir de ello podemos elucidar la estructura de muchos polisacáridos entre otras de sus - aplicaciones.

## CAPITULO I

### LAS XILANASAS

Estas enzimas pueden ser: (1,3)-B-D-xilanasas y/o (1,4)-B-D-xilanasas.

#### 1.- (1,3)-B-D-XILANASAS.

##### 1.1.- Definición.

Son enzimas hidrolíticas (1,3)-B-D-xiloxilanhidro-lasas capaces de hidrolizar (1,3)-B-D-xilanos, EC 3.2.1.74 o D-xilosa y D-xilooligosacáridos; endo-(1,3)-B-D-xilanasas, EC 3.2.1.32.

##### 1.2.- Fuentes Productoras.

Las (1,3)-B-D-xilanasas son producidas por varias cepas de bacterias de ambiente marino; algas marinas verdes, pardas y rojas, hongos terrestres, por ejemplo: --- Aspergillus batatae, Chaetomium globosum e Irpex lacteus.

En un estudio realizado se encontró que algunas bacterias y hongos producen las (1,3)-B-D-xilanasas y las -- (1,4)-B-D-xilanasas que son secretadas extracelularmente.

De 64 cepas de microorganismos se encontró que un mínimo de 40 poseían actividad (1,3)-B-D-xilanasas y 36 cepas fueron capaces de hidrolizar (1,4)-B-D-xilanas, como se muestra en la siguiente tabla;

Tabla 1

Tipos de microorganismos	número de cepas de microorganismos que descomponen (1,3)-B-D-xilanas	número de cepas de microorganismos que degradan (1,3)-B-D-xilanas con potente actividad:	
		(1,3)-B-D-xilanasas	(1,4)-B-D-xilanasas
algas rojas y pardas	30	18	18
bacterias de sedimento marino	27	17	15
bacterias de agua de mar	7	5	3
Total	64	40	36

Algunos hongos producen (1,3)-B-D-xilanasas constitutivamente, además de (1,4)-B-D-xilanasas, cuando se cultivaron en un medio compuesto de salvado de trigo, -- glucosa y celulosa. Un estudio comparativo de la producción de xilanasas por Chatomium globosum mostró actividad máxima de (1,4)-B-D-xilanasas después de 3 días de crecimiento, mientras que la producción óptima de (1,3)-B-D-xilanasas fue después de 5 días.

Para la investigación de la actividad de (1,3)-B-D-xilanasas han sido normalmente usados como sustrato ---- (1,3)-B-D-xilanas aisladas de algas marinas como Halimeda cuneata, Cauperpa cuneata y Cauperpa brachypus.

### 1.3.- Purificación.

La purificación de las (1,3)-B-D-xilanasas se ha hecho mediante precipitación con sulfato de amonio y/e --- acetona, con electroforesis y utilizando almidón como medio transportador a un pH 8.7.

### 1.4.- Propiedades fisicoquímicas.

Se han realizado pocos estudios sobre las (1,3)-B-D-xilanasas, por ello el peso molecular, punto isoelectrico, Km, pH, temperatura óptima y estable, de esta composición de aminoácidos no han sido reportadas, ya que se le ha dado mayor importancia a las (1,4)-B-D-xilanasas.

1.5.- Modo de acción.

El modo de acción de la (1,3)-B-D-xilanasa fue estudiado por los investigadores S.Fukui, T.Suzuki, K.K. Kitahara y T.Miwa, utilizando como microorganismos productor de la enzima al hongo Chaetomium globosum y empleando una preparación purificada libre de actividad - alfa amilasa, celulasa y (1,4)-B-D-xilanasa. (18)

Esta preparación degradó (1,3)-B-D-xilana proveniente del alga Cauperpa cuneata, cuyas características son: d.p (grado de polimerización) 40-50, peso molecular= --- ( $5 \times 10^3$  a  $6 \times 10^3$ ) produciendo sólo D-xilosa. La ausencia de algún D-xilooligosacárido en los productos de hidrólisis enzimática sugiere que la enzima puede ser de tipo exoenzima.

Al actuar la (1,3)-B-D-xilanasa sobre los (1,3)-B-D-xilooligosacáridos de d.p. 3-6 fueron degradados principalmente a xilosa y algo de xilobiosa ( $X_2$ ) la que fue degradada lentamente a xilosa. El ataque de (1,3)-B-D-xilanasa sobre estos xilooligosacáridos fue en el siguiente orden: xilohexosa > xilopentosa > xilotetraosa > xilo---triosa, llevando a cabo la hidrólisis durante una hora. Las (1,3)-B-D-xilanasas de el tipo endo, no han sido detectadas. (18)

## CAPITULO II

### (1,4)-B-D-XILANASAS.

#### 2.1.- Definición.

Son aquéllas enzimas capaces de hidrólizar enlaces (1,4)-B-D-xilopiranosil de las (1,4)-B-D-xilanas, especialmente arabinoxilana, arabinoglucuronoxilana, arabino-4-O-metil-D-glucuronoxilana y glucuronoxilana. Las enzimas de éste tipo han sido designadas por la comisión de enzimas con los números E.C 3.2.1.8 a las (1,4)-B-D-xilaxilanolidasas, endo xilanasas y 3.2.1.37 a las (1,4)-B-D-xilaxilanolidasas, exo xilanasas.

#### 2.2.- Fuentes Productoras.

Estas xilanasas se han encontrado en bacterias de ambiente marino y terrestre; en hongos sáprofitos, fitopatógenos y formadores de micorriza, bacterias del rumen, protozoarios, insectos, caracoles de tierra, crustáceos; algas marinas y semillas de plantas terrestres en germinación (ver tabla 2). Sin embargo su presencia no ha sido demostrada en tejidos de animales vertebrados (tracto del tracto gastrointestinal), en tales animales incluyendo el hombre la actividad de la B-D-xilanasas se debe a la flora microbiana.

En los crustáceos invertebrados; Astacus fluviatilis y Homarus vulgaris, la glándula hepatopáncreas contiene, B-D-xilanasas en sus jugos digestivos.

También se han encontrado insectos xilofágicos que contienen D-xilanasas; sin embargo el origen de estas enzimas no ha sido determinado; y éstas pueden ser obtenidas de el tracto digestivo o de protozoos simbióticos -- habitantes del tracto digestivo.

En semillas en germinación, también se encuentran B-D-xilanasas; aquí se presume que se encuentran en la capa de aleurona de donde son secretadas. La semilla de la leguminosa tropical Stylosanthes humilis no almacena a los característicos polisacáridos de reserva tales como el almidón y galactamanana, común de otras semillas de leguminosa, pero se ha mostrado que contiene una gran proporción de una arabinoxilana la cual es probablemente metabolizada y constituye la de energía durante la germinación. En tales semillas por lo tanto, el sistema B-D-xilanasas debe jugar un papel fisiológico importante, y ha sido demostrado que, durante la germinación, la actividad B-D-xilanasas es más grande que cualquiera de los otros componentes de la carbohidrasa.

Las bacterias y hongos enlistados en la tabla número 2 secretan B-D-xilanasas extracelularmente. Sin embargo algunas bacterias del rumen, protozoarios, Sporocytophaga myxococcoides y Aspergillus niger; también producen B-D-xilanasas intracelularmente.

Tabla 2

III.- FUENTES DE D-XILANASAS

---

Bacterias

a).- ambientes terrestre

Actinomycetes

Bacillus sp

Bacillus polymyxa

Bacillus subtilis

Cellvibrio fulvus

Clostridium sp

Microbiospora rosea

Micromonospora chalcea

Nocardia corallina

Sporocytophaga myxococcoides

Streptomyces sp

Streptomyces (QMB-314)

Streptomyces albogriseolus

Streptomyces albus

Streptomyces olivaceus

Streptomyces xylophagus.

b).- ambiente marino

bacterias de especies aún no identificadas

Hongos

Agaricus bisporus  
Alternaria acremonium  
Aspergillus batatae  
Aspergillus niger  
Aspergillus niger van Tieghem  
Aspergillus oryzae  
Aspergillus sojae  
Aspergillus terreus  
Aspergillus wentii  
Botryosphaeria ribis  
Cephalosporium acremonium  
Cephalosporium sacchari  
Ceratocystis paradoxa  
Cercospora melonis  
Chaetomium sp  
Chaetomium globosum  
Chaetomium globosum var. affine  
Chaetomium trilaterale  
Chrysosporium lignorum  
Colletotrichum trifolii  
Collybia velutipes  
Coniophora cerebella  
Coniophora puteana  
Cytospora sp  
Diplodia viticola

Echinodentium tsugicola  
Fomes annosus  
Fomes igiarius  
Fomes marginatus  
Fusarium sp  
Fusarium roseum  
Gibberella sabinetti  
Gloeophyllum saepiarium  
Glomerella cingulata  
Helminthosporium sp  
Irpex lacteus  
Lenzites saepiaria  
Macrosporium bataticola  
Marasmius sacchari  
Merulius lacrymans  
Merulius silvester  
Myrothecium verrucaria  
Neurospora sp  
Oxiporus sp  
Penicillium sp  
Penicillium cyclopium  
Penicillium digitatum  
Penicillium funiculosum  
Penicillium janthinellum  
Penicillium janthinellum (Blourge)  
Penicillium pinophilum  
Penicillium rugulosum

Penicillium verruculosum

Penicillium viridicatum

Pericularia oryzae

Phellinus igniarius

Polyporus betulinus

Polyporus schweinitzii

Poria sp

Rhizoctonia solanii

Rhizopus sp

Rhizopus niveus

Rhizopus tritici

Schizophyllum commune

Sclerotinia sclerotiorum

Sclerotium rolfsii

Stereum sanguinolentum

Trametes gibbosa

Trametes pini

Trametes versicolor

Trichoderma sp

Trichoderma koningi

Trichoderma viride

Trichoderma lignorum

Verticillium dahliae

Verticillium lateritium

Hongos formadores de micorriza

Amanita muscaria  
Laccinum scabrum  
Paxillus involutus  
Suillus aeroginascens  
Suillus bovinus  
Suillus luteus  
Suillus tridentinus  
Suillus variegatus  
Xerocomus badius.

Hongos mesófilos y termófilos  
aislados de semillas de cebada

Hongos Basidiomycetes como:

Trametes suaveolens  
Trametes quercina  
Trametes hirsuta  
Poria medula panis

Bacterias del rumen

Bacillus firmus  
Bacteroides  
Bacteroides amylogenes  
Bacteroides ruminicola  
Bacteroides succinogenes  
Butyrivibrio sp

Butyrivibrio fibrisolvens

Clostridium sp

Ruminococcus albus

Ruminococcus flavefaciens

Mezcla de Bacterias del caecum  
y del rumen

Protozoarios ciliados del rumen

Epidinium ecaudatum (Crawley)

Entodinium sp

Eremoplastron bovis

Polyplastron multivesiculatum

(Dogiel y Fedorowa)

Eudiplodinium medium

Animales invertebrados

Anthaxia corinthia

Astacus fluviatilis

Gyssonoma aceriana

Helix aspera

Helix pomatia

Homarus vulgaris M-E

Ipstyroglyphus L

Melanophila picta

Melanoplus bivittatus

Polyphylla fulle

Rhagium inquisitor L  
Sciapteron tabaniformis

Semillas de plantas terrestres.

Trifolium subterrenum (Daliak)  
Stylosanthes humilis (townsville Stylo)  
cebada, maíz, arroz, trigo, avena.

Algas marinas

Cladophora rupestris  
Laminaria digitata  
Rhodymenia palmata  
Ulva lactuca.

---

Esta tabla nos muestra casi de una manera muy completa las bacterias, hongos, algas, semillas, etc., productores de (1,4)-B-D-xilanasas.

De acuerdo a la literatura de las (1,3)-B-D-xilanasas y las (1,4)-B-D-xilanasas; las segundas han sido las más estudiadas y por ello este trabajo se enfocará más a éstas, principalmente a las endo-(1,4)-B-D-xilanasas.

Aunque la tabla anterior nos indica de una manera casi completa las fuentes de B-D-xilanasas; se mencionan de manera especial a aquellas hongos y bacterias más ---

estudiados ya que éstos han permitido caracterizar a las B-D-xilanasas. Dentro de éstos microorganismos se tiene a: Bacillus sp, Bacillus circulans, Bacillus subtilis, - Streptomyces sp, Streptomyces albus, Streptomyces xilo- phagus, Aspergillus niger van Tieghem, Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Ceratocystis paradoxa, Cryptococcus albidus, Fusarium roseum, Irpex lacteus, Schizophyllum - commune, Trichoderma viride, Frametes hirsuta.

El Bacillus circulans WL-12 cultivado en medio líquido con xilano como única fuente de carbono secreta dos - endo B-D-xilanasas A y B respectivamente y una B-D-xilodasa.

Las xilanasas A y B han sido caracterizadas con respecto a su principal parámetro fisicoquímico y la B-D-xilodasa por su baja estabilidad. (22)

El Bacillus sp degradó xilano aislado de Picea ---- sitchensis, encontrándose la máxima actividad de la xilasa al quinto día de crecimiento y libre de actividad - amilasa y proteasa. (23)

De 101 muestras de estiércol de aves colectadas en Hokkaido, se aislaron 64 cepas de Streptomyces en las - que se determino su capacidad para producir la B-D-xilasa, y se encontró que tenían una baja capacidad para -

producir la B-D-xilanasa; excepto Streptomyces albobri-  
seolus cepa 1AM0031 y Streptomyces olivaceus 1 AM 0025.  
Sin embargo teniendo como antecedente éste trabajo y ---  
con base en el conocimiento de la capacidad que tiene ---  
Streptomyces xilophagus en degradar la madera, se reali-  
zó una investigación de esta cepa, la cual mostró una ---  
extraordinaria capacidad de producción de B-D-xilanasa;  
dicha capacidad estuvo influenciada por las condiciones  
de cultivo, principalmente su pH y su fuente de carbono.  
(30) (31) y (34)

Conociendo que la mayoría de los Basidiomycetes ---  
utilizan como fuente de carbono a la madera, se hizo un -  
estudio con estos hongos encontrándose que, Trametes hip-  
guta, Trametes suaveolens, Trametes versicolor, Trametes  
quercina y Feria medula panis; producen bastante cantida-  
de B-D-xilanasa extracelular mostrándose su actividad --  
máxima entre los 12 a 20 días de incubación. La fuente -  
de carbono utilizada fue el aserrín de sauce. Además de  
la actividad B-D-xilanasa se detectó actividad B-D-xilo-  
sidadasa, B-D-glucosidasa, B-D-galactosidasa, celulasa y  
amilasa. (50) (51)

Cryptococcus albidus.- Esta levadura ha sido muy ---  
estudiada y se ha observado que durante su crecimiento -  
en B-(1,4)-xilanas de madera, produce al menos dos enzi-  
mas que convierten el polisacárido a xilosa catabolizada

por las células. Las enzimas secretadas en gran cantidad en el cultivo líquido fueron identificadas como una endo-(1,4)-B-D-xilanasa y una segunda enzima unida a la célula, como una B-xilosidasa (xilobiasa). (6)

Fusarium roseum.-- Cuando crece sobre un medio que - contiene xilana produce un sistema D-xilanasa extracelular acompañada por la actividad de celulasa. (25)

I.V. Gorbacheva y N.A.Rodionova (27) realizarón un estudio sobre la purificación y caracterización de una endo-(1,4)-B-D-xilanasa producida por Aspergillus niger crecido sobre xilana y xilooligosacáridos. Esta enzima - resulto tener cierta similitud en propiedades con la endo (1,4)-B-D-xilanasa producida por Coniophora cerebella. -- utilizada por King (37) para estudiar el mecanismo de la hidrólisis enzimática del (4-O-metilglucurono-D-xilano) del álamo; y de igual peso molecular que la endo-(1,4)--B-D-xilanasa de Stereum sanguinolentum aislada por ---- Erikson y Peterson. Varadí y colaboradores aislaron a - la enzima de Schizophyllum commune al crecer en cultivos estacionarios y sumergidos (58), usando como fuente de - carbono principal, aserrín de haya y separándola de la - celulasa.

Aspergillus niger van Tieghem.-- En cultivos de trigo Koji produce tres tipos de xilanasas denominadas I, - II, III, las que fueron diferentes entre sí. (72)

Otra cepa de Aspergillus niger, aislada en un bosque tropical de Africa, mostró ser una fuente rica de -- enzimas que degradan xilano, produciendo cinco xilanasas extracelulares y una B-xilosidasa; con sistemas similares a las reportadas para la cepa de Aspergillus niger de I.V.Gorbacheva; Chaetomium globosum, Chaetomium trilaterale, Coniophora cerebella y Trametes hirsuta, éstas -- aparte de producir actividad xilanasa, producen actividad B-xilosidasa; aisladas del mismo sitio.

Trichoderma viride.- También ha sido ampliamente -- estudiado en la obtención, aislamiento y purificación de su B-D-xilanasas por S.Hashimoto, I.Muramatsu y M.Funatsu, estos investigadores encontraron que cuando crecía sobre salvado de trigo produce dos tipos de xilanasas, de las cuales una se logró aislar. (28)

Estudios previos en las enzimas hemicelulosicas -- producidas por Trichoderma Reesei CM-9414 señalan que -- cinco diferentes exoenzimas de xilanasas de tipos endoenzimas están presentes en el líquido extracelular producido por el hongo cuando creció en xilana. (19)

La endo-(1,4)-B-D-xilanasas producida por el hongo - Irpex lacteus (Poliporus tulipiferae), es la más recientemente estudiada por C.Hoebler y J.M Brillonet (29), se observó que tiene ciertas características similares a la

xilanasas de Trametes hirsuta. La producción de xilanasas junto con celulasa se reporta en las levaduras del género Trichosporon. (67)

### CAPITULO III

#### 3.- Diferentes métodos de estudio.

##### 3.1.- SUSTRATOS.

Diferentes fuentes de Hemicelulosa de plantas terrestres y marinas han sido generalmente usados en la investigación para la obtención de las D-xilanasas. Los sustratos más comúnmente usados son: arabinoxilana, arabinoxilana, glucuronoxilana y xilanas. Siendo los dos últimos sustratos poco solubles en agua. Los derivados solubles de xilana que han sido empleados incluyen a O-(carboximetil)-D-xilana y O-(2-hidroxi-etil)-D-xilana.

Otros sustratos usados son: sal sódica de carboximetil celulosa, avicel, celulosa, arabinan, arabinogalactano, ácido polialacturónico, manan de levadura, dextranas, laminarina; aislada de la alga Laminaria saccharina y Laminaria digitata principalmente; p-nitrofenil alfa-D-glucopiranosido, alfa-D-galactopiranosido, B-D-galactopiranosido, alfa-L-fucopiranosido, O-nitrofenil-B-D-xilopiranosido, sal de carboximetilxilana, galactomanosa, 4-O-metilglucuronoxilana, ácido pectico, metil-B-D-xilopiranosido, pectina, I-arabino-D-glucurono-D-xilanas y xilooligosacáridos.

Las estructuras químicas de éstos compuestos es --- muy amplia y compleja pudiendo ser tema de otro trabajo. Por lo tanto se describe sólo lo más importante de las xilanas; sustratos de mayor importancia en la obtención de las xilanasas.

LAS XILANAS.— Son las hemicelulosas dominantes en plantas en todas las especies de gramíneas. Hirst y sus colaboradores, en los primeros y ahora clásicos estudios de las xilanas de la hierba de esparto, dieron por establecido que las xilanas tienen residuos B-D-piranosil -- unidos por enlaces (1,4). Esta es la característica que se encuentra en todas las xilanas, y es definitiva en -- xilanas de plantas terrestres. Las heteroxilanas no endo-permicos, aislados de plantas por Hirst y Cols., tienen grupos L-arabinofuranosil terminales no reductores, unidos a pocos residuos de xilosa en las posiciones C-3, y los residuos de ácido D-glucopiranosilurónico, a los derivados 4-O-metil, en pocas posiciones C-2; otras características estructurales, algunas de las cuales serán -- comentadas durante el desarrollo del tema, se han descubierto en xilanas de diferentes especies.

La pureza de éstos compuestos es un prerequisite de la seguridad de los estudios estructurales de xilanas; -- por otro lado, es difícil decidir cuales características estructurales están en las xilanas y cuales en otras hemicelulosas. Las xilanas puras son obtenidas por fraccio-namientos de los materiales hemicelulósicos, pero tales

fraccionamientos tienen un aspecto subjetivo, ya que el investigador debe establecer o aceptar criterios de pureza que, en parte, reflejan especulaciones producidas a partir de lo que se ha descubierto y, en parte puede ser intuitiva. Los primeros criterios de pureza estuvieron influenciados por la hipótesis atractiva de que la celulosa debió ser biosintéticamente convertida a xilana sin la alteración de la cadena unida por enlaces (1,4). Una homoxilana fué aislada de esparto, pero Hirst señaló que la transformación de glucosa a residuos xilosa no podría llevarse a cabo a el nivel del polisacárido. Los fraccionamientos diseñados para aislar homoxilanas a partir de materiales hemicelulósicos no endospermica de muchas hierbas condujeron al aislamiento de xilanas que tienen bajas proporciones de arabinosa y residuos de ácido urónico.

Los residuos no xilosídicos en las hemicelulosas de plantas herbáceas fueron, y otros aún lo son, supuestamente considerados como arabinosa o galactanos.

La literatura acerca de las hemicelulosas es engañosa y confusa por la aceptación nada crítica y el uso repetido de éstos términos. Se ha establecido que, en varias plantas herbáceas, casi todo el material hemicelulósico es heteroxilana, y que parte de él está compuesto de xilanas complejas y altamente sustituidas en la mayoría por residuos de arabinosa, y muchos de galactosa.

Es evidente que las xilanas de diferentes hierbas tienen muchas características estructurales en común. El descubrimiento poco frecuente de ciertas de éstas - características, y el descubrimiento normal de otras, son debidas a la tendencia de concentrarse en el estudio de las xilanas puras de estructuras ya conocidas. Actualmente dos puntos de éstos estudios están claros. Primeramente cuando una xilana que tiene ciertas características estructurales esta presente en una hierba, y esta es conocida, puede ser más fácilmente identificada en y aislada de, otras especies de hierbas. Segundo, las comparaciones de las diferencias cuantitativas entre las xilanas puras de diferentes especies de hierbas, o de diferentes partes de una planta, son de importancia limitada, debido a la influencia de la maduración de la planta sobre la composición de hemicelulosas. Las xilanas complejas y altamente sustituidas son probablemente muy comunes pero no tan abundantes en -- hierbas, como son las menos sustituidas y más frecuentemente aisladas y estudiadas. (35)

Una manera que nos permite la elucidación de la - estructura de éstas xilanas, es por el estudio del modo de acción de la hidrólisis enzimática de las endo-(1,4).

B-D-xilanasas de microorganismos, por ejemplo; Con base a la hidrólisis de las arabinoxilanas, por una xilanasas de Streptomyces, se propuso una probable estructura de - la arabinoxilana; especialmente en sus puntos de ramificación, relacionados a las unidades de arabinosil, sugiriendo que la arabinoxilana esta compuesta de una cadena principal de residuos B-D-xilopiranosos unidos de manera (1,4), los que están presentes como una sola unidad de - residuos L-arabinofuranosa de extremo no reductor y como unidades 2-O-B-D-xilopiranosil-L-arabinofuranosa a través de las posiciones 3 de xilosa a la cadena principal. (35)

El análisis de los productos de la acción de una -- endo-(1,4)-B-D-xilanasas de Trametes hirsuta sobre el --- 4-O-metil-D-glucurono-D-xilana de sauce blanco ha revelado una distribución regular de los grupos de ácidos urónico a el esqueleto de la xilana. (51)

### 3.2.- Inducción e Inductores de Endo-1,4-beta-xilanasas.

Existe considerable confusión de si las beta-D-xilanasas de hongos filamentosos y bacterias son producidas constitutivamente o inductivamente. Las beta-D-xilanasas bacterianas usualmente parecen ser enzimas inducibles. - Se investigaron los inductores de beta-D-xilanasas en especies de Streptomyces por Nakanishi y cols. (47)

Los estudios sobre la regulación de xilanasas en hongos son, sin embargo, complicados por el hecho de que en la mayoría de las especies la producción de xilanasas está acompañada por la producción de enzimas celulolíticas independientemente de la fuente de carbón utilizada como soporte del crecimiento. Además, las numerosas xilanasas y celulasas de los hongos poseen cierta especificidad cruzada por sustratos.

El hongo Cryptococcus albidus parece ser el modelo de organismo adecuado para la investigación de la producción de beta-D-xilanasas extracelular. La cepa es incapaz de crecer sobre celulosa y su beta-D-xilanasas presenta una actividad despreciable hacia la celulosa. La beta-D-xilanasas de C. albidus, conocida como enzima extracelular, es típicamente inducible.

La síntesis extracelular de endo-1,4-beta-xilanasas en el hongo Cryptococcus albidus es de tipo inducible. Durante el crecimiento en xilanas de madera el hongo produce a la enzima en cantidades de dos órdenes de magnitud más grande que otras fuentes de carbono, incluyendo la xilosa. La enzima puede ser inducida en células lavadas que crecen en glucosa por el xilano y beta-1,4-xilooligosacáridos. Entre los oligosacáridos solamente la xilobiosa no fue degradada extracelularmente, por lo

tanto parece ser el inductor natural de la enzima. La xilobiosa como inductor metabolizable es efectivo a bajas concentraciones y constante disponibilidad para las células. A elevada concentración de xilobiosa el efecto inductivo es menos pronunciado debido a la represión catabólica por los productos de degradación. Se encontró que el metil beta-D-xilopiranosido servía como inductor no utilizable de beta-D-xilanasa. La enzima inducida por el glicosido parece ser idéntica a la que se produce por las células durante su crecimiento en xilano.

Para establecer el tipo de regulación de beta-D-xilanasa en Cryptococcus albidus las células se desarrollaron en medios que contenían varias fuentes de carbono. La velocidad de utilización del carbono se evaluó indirectamente midiendo el crecimiento. Después de cuatro días de cultivo se determinó la actividad de la beta-D-xilanasa secretada y la concentración de células (mg. de peso seco/ml). La actividad baja de la beta-D-xilanasa se detectó bajo todas las condiciones de crecimiento. El nivel más alto de xilanasa se determinó en el medio que contiene xilano como la fuente de carbono. Cuando se utilizaron carbohidratos como (galactosa, lactosa, D-arabinosa) y en el medio basal (condiciones de cosecha) la cantidad de beta-D-xilanasa producida por 1 mg de células secas excedió de tres a cinco veces a la producida en

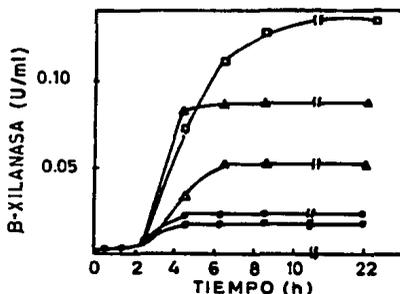
presencia de otras fuentes de carbono. El nivel más bajo de beta-D-xilanasa se encontró en el medio de glucosa.

La beta-D-xilanasa extracelular puede ser inducida en las células que crecen en glucosa después de su transferencia al medio basal suplementado con una baja concentración de xilana. La inducción de la enzima es inhibida por la cicloheximida que actúa como inhibidor de la síntesis de proteínas citoplasmáticas. El proceso de inducción de beta-D-xilanasa es considerado, como una síntesis de novo de la enzima y no como su formación a partir de una proenzima.

Ya que la xilana es un polímero grande, que no puede penetrar la membrana plasmática, debe anticiparse la actividad de la xilanasa que es inducida por algunos fragmentos de xilana formados por la acción de los bajos niveles de beta-D-xilanasa extracelular. Para encontrar el compuesto relacionado a la estructura de la xilana y que sea responsable de la inducción, las células que presentan síntesis de xilanasa reprimida, y que crecen en glucosa, se incubaron en el medio basal suplementado, con una concentración baja de xilosa, y oligosacáridos de xilosa. La glucosa y galactosa se incluyeron en los experimentos de como carbohidratos control, los que de acuerdo a los experimentos de crecimiento no fueron considerados inductores potenciales de la beta-D-xilanasa.

Se encontró que la beta-D-xilanasasa era inducida por todos los oligosacáridos de xilosa probados presentando aproximadamente el mismo período log.. La producción de la enzima se detiene después de 5-6 h debido probablemente al agotamiento de los inductores.

De acuerdo a las observaciones de la inducción de beta-D-xilanasasa por diferentes concentraciones de xilobiosa. Se puede concluir que la xilobiosa es el inductor natural de la enzima o su precursor inmediato, ver figura



EFFECTO DE VARIAS CONCENTRACIONES DE XILOBIOSA SOBRE LA SÍNTESIS DE  $\beta$ -XILANASASA. 0.005 mg/ml (○), 0.025 mg/ml (●), 0.125 mg/ml (△), 0.25 mg/ml (▲) y 0.5 mg/ml (□).

La pregunta de que si los xilooligosacáridos más grandes que la xilobiosa funcionarían como inductores directos se trató de responder basándose en su susceptibilidad a la hidrólisis extracelular. La xilobiosa, xilotriosa, xilotetraosa y xilopentaosa se trataron con el

filtrado del cultivo dializado obtenido después del crecimiento de las células en xilana. La actividad de la -- beta-D-xilanasa en las mezclas de incubación fue de 0.5 unidades/ml, que es mucho más alta que la de la inducción media en el período que precede a la aparición de la enz ma inducida. No ocurrió destrucción de xilobiosa durante la incubación durante varias horas. La xilotriosa se hidrolizó principalmente a xilobiosa y trazas de xilosa, - muy lentamente. La xilotetraosa se hidrolizó a xilobiosa y xilotriosa rápidamente. La xilopentaosa fue transformada a xilobiosa, xilotriosa y pequeñas cantidades de xilo tetraosa y xilosa. Es interesante hacer notar que la xilo sa se encontraba en gran cantidad entre los productos de la hidrólisis inicial de todos los oligosacáridos probados.

En otro experimento se encontró que la beta-xilana- sa puede ser inducida en células lavadas que crecen en - glucosa por el glicosido sintético, metil beta-D-xilopi- ranosido. La producción de la enzima comienza tardíamen- te, procede más lentamente y continúa por un período más largo que en el caso de la inducción con oligosacáridos de xilosa, ya que la inducción de la endoenzima extrace- lular por el metil beta-D-xilosido fué inesperada, se -- considera necesario obtener alguna evidencia que indique que la beta-D-xilanasa inducida por la metil beta-D-xilo side corresponde la misma enzima que es secretada por -- las células durante el crecimiento en xilano. (7)

### 3.2.1.- Inducción de Xilanasa en Streptomyces sp.

En estudios cinéticos sobre la inducción de xilanasasa por beta-xilosido en Actinomicetos se reportó que la producción de xilanasasa por Streptomyces sp. No. 3137 es inducida por una variedad de beta-xilosidos no metabolizables, los que mostraron una marcada capacidad de inducción en comparación con los inductores metabolizables tales como la xilana y sustancias relacionadas. Los beta-xilosidos difieren considerablemente uno del otro en la capacidad de inducción. La entrada de los beta-xilosidos inducidos en los micelios se realizó por un proceso de difusión, utilizando como inductores, metil-beta-D-xilosido, isopropil-beta-D-xilosido, butil-beta-D-xilosido y etilencianohidrin-beta-D-xilosido e inhibidores, metil-alfa-D-xilosido, etil-alfa-D-xilosido e isopropil-alfa-D-xilosido.

El sistema de regulación de la síntesis de xilanasasa en Streptomyces sp es similar al de la síntesis de beta-galactosidasa en Escherichia coli (46), el beta-xilosido que actúa como inductor se une reversiblemente al represor de xilanasasa.

Algunos alfa-xilosidos inhibieron no competitivamente la inducción por el beta-xilosido. El grado de inhibición fue del orden de alfa-metil-D-xilosido, alfa-etil-D-xilosido, alfa-isopropil-D-xilosido.

Es interesante comparar estos resultados con la capacidad de inducción de beta-xilosidos la cual aumenta - al incrementar su longitud en la cadena alquilíca (de metil a butil).

Se ha encontrado que los alfa-xilosidos ne inacti-- van a la xilanasa producida. Además, un experimento pre- eliminar mostró que los alfa-xilosidos entran a los micelios por difusión como lo hacen los beta-xilosidos. No - se ha estudiado en detalle el mecanismo de la represión por los alfa-xilosidos.

### 3.3.- Determinación del grado de polimerización de xilanos

Los métodos químicos para la determinación del grado de polimerización (d.p.<sub>n</sub>) de oligo y polisácaridos están basados en la medición de la proporción relativa de los grupos reductores terminales. Esto se ha realizado - por la conversión de los grupos reductores terminales al correspondiente alditol con borohidruro de sodio, y determinando el promedio de alditol a azúcar reductor después de la hidrólisis ácida del polímero o por la liberación de formaldehído a partir de los residuos terminales por oxidación con periodato. Cuando se aplica esto a las xilanas se requiere del conocimiento de enlace ya que reducidas las xilanas unidas por enlaces (1,3) y (1,4), liberan dos y una molécula de formaldehído respectivamente.

Un método enzimático para la determinación del grado de polimerización (d.p) para las xilanas involucra a la sorbitol deshidrogenasa que oxida al xilitol en una proporción de aproximadamente 70%.



Tabla 3

Valores de grado de polimerización (d.p<sub>n</sub>) de algunos oligosacáridos y xilanas.

Sustancia.	d.p <sub>n</sub> enzimático	d.p <sub>n</sub> químico
xilana de Rhodymenia		
palmata	94	86
xilana de Caulerpa		
filiformis	42	42
xilobiosa	1.9	2
xilotriosa	2.9	3
xilotetraosa	4.2	4

La determinación de d.p<sub>n</sub> de xilanas por el método enzimático se encuentra descrito en detalle en la referencia. (69)

### 3.4.- Definición de la unidad de actividad de B-D-xilanasas:

Es generalmente definida como la cantidad de enzima que causa la liberación de grupos finales reductores correspondientes a la formación de un micromol de D-xilosa por minuto bajo condiciones definidas de pH, fuerza iónica y de temperatura.

Cuando el peso molecular del sustrato polímero es conocido, la unidad de actividad puede ser expresada como el número de enlace rotos por molécula por unidad de tiempo en el estado inicial del proceso de degradación.  
(18)

### 3.5.- Purificación.

#### 3.5.1.- Extracción de B-D-xilanasas extracelulares.

Las D-xilanasas microbianas secretadas extracelularmente presentes en el medio de cultivo han sido concentradas por el empleo de uno o por combinación de los siguientes precipitantes:

Precipitantes	referencias
(i) .- etanol	37, 58, 62
(ii) .- acetona	
(iii).- rivanol e adsorción por intercambio iónico tal como DEAE-sefadex	58
(iv) .- afinidad de enlace de la D-xilana insoluble a 5°C	
(v) .- sulfato de amonio (el más comunmente usado)	15, 16, 28, 32, 52

### 3.5.2.- Extracción de B-D-xilanasas intracelulares.

Las D-xilanasas intracelulares, de bacterias, micelio de hongos, de bacterias del rumen y protozoarios han sido extraídas empleando las siguientes técnicas:

Todas las referencias se localizan en la cita número (18

---

técnicas	referencias
(i) .- homogenización en agua o amortiguador seguida de extracción con amortiguador o I-butanol.	162, 44, 215, 38
(ii) .- rompimiento de la pared celular microbiana por pulverización en amortiguador con perlas de vidrio empleando un desintegrador celular Nossal.	47, 226, 39, 40, 42, 44
(iii).- lisis de la pared celular microbiana usando detergente (por ejemplo triton X-100).	94
(iv) .- en una prensa francesa.	42
(v) .- preparación en acetona con polvos de mezcla de microorganismos (por ejemplo bacterias del rumen y protozoo) y extracciones con agua.	232
(vi) .- sonicación.	217

---

### 3.5.3.- Separación y purificación de B-D-xilanasas.

Para ello se han empleado las siguientes técnicas por --  
convención usando técnicas de purificación de proteínas.  
Estas incluyen.

Técnicas	referencias
A.- cromatografía de intercambio iónico.	
(i) .- intercambio aniónico	
DEAE-celulosa	6, 30, 37
DEAE-sefadex	15, 16, 28, 29, 52, 62
Duolite A-2	
(ii) .- intercambio catiónico	4
resinas de amberlite	
CG-50	
resinas IRC-50 (XE-64)	18
CM-sefadex	6, 22, 28, 29
CM-celulosa	23, 26, 52, 62
celulosa fosfato	32
Cellex-CM	15, 16
SE-sefadex	62
Duolite C-10	
hidroxilapatita	26, 32, 62

B.- cromatografía por permeabilidad en gel.

(i) .- sefadex G-75	18
sefadex G-100	18
sefadex G-150	8
sefadex G-50	24, 26, 23, 58
(ii) .- bio gel P-100	6, 37, 57
bio gel P-150	6, 32
bio gel P-200	15

C.- enfoque isoelectrico usando estabilizadores como:

(i) .- etanodiol 75% v/v	18
(ii) .- sacarosa 50% w/v	15, 16, 62
(iii).- glicerol	22

D.- zona de electroferesis usando los siguientes medios.

(i) .- sefadex G-25	4
(ii) .- papel	18
(iii).- gel de poliactilamida	4, 6, 22, 26, 28, 29, 32, 37 52, 62

E.- afinidad por los enlaces de D-xilana.

18

F.- cristalización.

(i) .- acetona	18
(ii) .- sulfato de amonio	18

---

**3.5.4.- Criterio de pureza.**

Todas las preparaciones enzimáticas después del --- último paso de separación y purificación, deben de eluir se como un sólo punto simétrico de actividad y proteína, lo que indica que se ha obtenido una preparación enzimática homogénea. La pureza, se vuelve a evaluar por electroforesis en papel, en gel de poliacrilamida o por ---- electroforesis en movimiento limitado.

CAPITULO IV

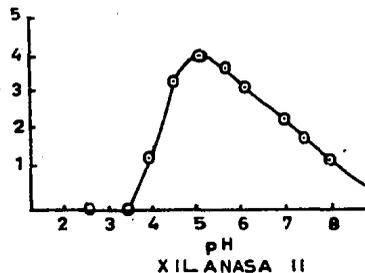
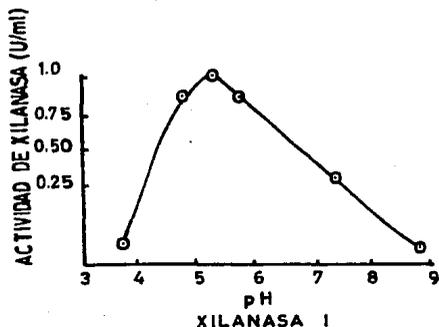
4.- Propiedades Fisicoquímicas de las (1,4)-B-D-Xilanasas.

4.1.- pH Óptimo.

Las D-xilanasas de hongos son más activas a pH de 3.5 a 5.5, y son estables en un rango muy amplio, que comprende valores entre 3 a 10.

El sistema D-xilanasas de Ceratocystis paradoxa -- tiene un pH óptimo para la xilanasas I de 5.5, éste se determinó en una solución de enzima (0.02ml) y la solución de la hemicelulosa al 1%, (0.5 ml), incubándose en amortiguador universal (citrato-fosfato-borato-barbiturato) (0.5 ml) de varios valores de pH durante 30 min. a 37°C, seguida por el análisis de la fuerza reductora (16).

El pH óptimo para la xilanasas II del sistema de -- Ceratocystis paradoxa, se determinó por incubación de -- la solución enzimática (0.01) y solución de la hemicelulosa (1%, 0.5 ml) en solución de amortiguador universal (0.5 ml) a varios pH durante 30 min. a 45°C, seguida -- del análisis de la fuerza reductora (15) vease figuras y fue de 5.1.



La endo (1,4)-B-D-xilanasa del hongo ligniperdoso - Trametes hirsuta mostró un pH óptimo de 5.0 a 5.5 cuando se estudio a diferentes valores de pH (3.5 -8.0) en solución de amortiguador de acetato (0.1 M) después de un tiempo de incubación de 10 min. con el sustrato (1% de xilano, p/v a 30°C). (51)

El complejo enzimático D-xilanasa de Schizophyllum commune presentó un pH óptimo de 5; Trichoderma viride - produce dos tipos de D-xilanasas. Una con pH óptimo de 3.5 y la otra de 4.5 (28). La xilanasa de Trichoderma pseudokoningii presentó un pH óptimo de 5. (4) Cuando creció sobre xilano y se determinó en amortiguador de citrato de sodio (pH 3), acetato de sodio (pH 4-6), y fosfato de sodio (pH 6-8) (200mM) (4). La D-xilanasa de

Irpex lacteus presentó un pH óptimo de 4.2, cuando se suspendió la xilana en amortiguador de citrato-fosfat: (29)

Una cepa de Aspergillus niger que contiene 5 diferentes endo-(1,4)-B-D-xilanasas se le estudiaron los perfiles de pH óptimo y mostraron, diferentes actividades máximas entre pH 3 y 7. La xilanasa 1-A fue más activa a pH 5.5 a 6.0, la xilanasas 1-B tuvo actividad máxima a pH 4.0 a 4.5. El pH óptimo de la xilanasa 11-A fue de 4. Las curvas de las actividades de pH de las xilanasas 11-B y 11-C fueron idénticas, con un pH óptimo de 4.0. El pH óptimo de la xilanasa 11-B estuvo en el rango de 6.0 a 6.5 con una cantidad de actividad sustancial a pH 8.0. Esta enzima es la primera de las xilanasas reportadas con actividad en un pH alto (32). Otra xilanasa de una preparación comercial de Aspergillus niger mostró una actividad más alta a un pH de 5.0.

Las D-xilanasas bacterianas (por ejemplo de Bacillus subtilis, Streptomyces xylophagus y Bacillus circulans) tienen un pH más alto que las xilanasas fungicas y son estables a pH de 5.0 a 7.3.

El Bacillus circulans WL-12 secreta dos endo-B-D-xilanasas; las A y la B muestran un rango de actividad ---

óptima a pH óptimo de 5.5 a 7.0. Un Bacillus sp secreta una endo-xilanasa que purificada presentó un pH óptimo de 6.1 a 6.7.

#### 4.2.- pH estable.

Como antes mencionamos las D-xilanasa de hongos --- presentan un amplio rango de pH estable, de aproximadamente de 3- a 10. En hongo Trametes hirsuta, se investigó a la enzima dentro de un rango de pH de 2.0 a 5.5 durante 6 horas a 25°C, se pudo mostrar que la enzima es estable a un pH de 4.0 a 8.0 bajo éstas condiciones dadas. La xilanasa de Schizophyllum commune fue estable --- dentro de un pH de 6 a 8, con actividad remanente después de 65 horas a 30°C.

Irpex lacteus secreta una xilanasa la cual se incubo en amortiguador universal de varios valores de pH a - 30°C. Después de 17 horas, las muestras de la enzima se dializaron contra amortiguador de fosfato mM (pH 7.0) y la actividad residual de la xilanasa se midió bajo condiciones standar, fue estable en el rango de pH de 6.5 a 9.0 la estabilidad disminuye gradualmente de pH 6.0 a 3. y fue rápidamente inactivada a pH menor de 3.0 y mayor de 10.5. La xilanasa de Trichoderma viride a una concentración de 9.7 ug/ml fue demasiada inestable en valores

de pH entre 2 y 7, sin embargo a una concentración de -- 970 ug/ml fue estable hasta 40°C durante 30 minutos.

El pH estable de la xilanasa II del hongo Ceratomyces paradoxa se determinó por incubación de la solución enzimática (0.1 ml) en una solución de amortiguador universal (0.5 ml) de varios valores de pH durante 1 hora a 24°C. El valor de pH de cada solución fue consiguientemente ajustado a pH 5.0 por adición de NaOH (0.2 M), y el volumen final ajustado a 2 ml con agua. Se removió -- entonces una alícuota (0.5 ml) de cada solución, se agregó a la solución de hemicelulosa al 1%, (0.5 ml), incubando a 45°C durante 30 min., el pH estable se manifestó entre 5.0 a 10. (15)

La xilanasa de Streptomyces xylophagus mostró una -- estabilidad en el rango de pH de 5.3 a 7.3, pero fue --- inactivada en valores de pH de 2.4 a 9.4. El pH de estabilidad se determinó en 0.25 ml de solución de enzima -- diluida adecuadamente, 0.25 ml de amortiguador y se mantuvo a 20°C durante 2.5 horas. Después del ajuste de pH a 6.2, se midieron las actividades residuales de la enzima.

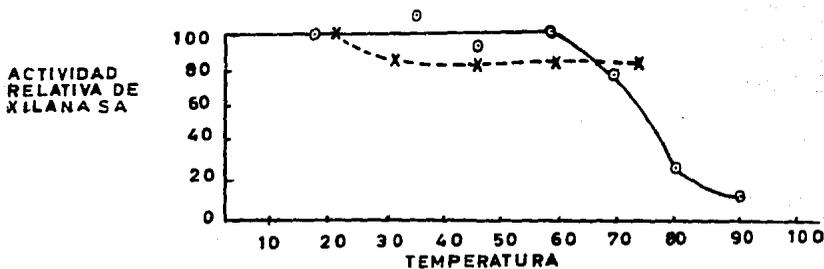
#### 4.3.- Temperatura óptima y estable.

Las D-xilanasas de los hongos por lo general muestran

actividad óptima a una temperatura de aproximadamente a 50°C y tienden a ser termoestables. Frecuentemente son totalmente inactivadas a temperaturas mayores de 65°C -- (ver tabla). El sistema D-xilanasa II de Ceratocystis -- paradoxa es bastante raro ya que es altamente estable a una temperatura óptima de 80°C. Esta temperatura óptima se obtuvo por incubación de la solución de la enzima --- (0.1 ml), amortiguador de acetato (0.1 M, pH 5.5, 0.5ml y la solución de hemicelulosa (1%, 0.5 ml) durante 30 -- minutos a varias temperaturas seguidas del análisis de -- la fuerza reductora. La temperatura de estabilidad se de terminó por incubación de la solución enzimática (0.01ml y amortiguador de acetato (0.1 ml, pH 5.5, 0.5 ml) duran te 1 hora a varias temperaturas, agregando hemicelulosa (1%, 0.5 ml) a 45°C durante 30 min. la temperatura se -- mantuvo de los 0°C a 60°C ya que la estabilidad de la -- enzima también se examinó a temperaturas bajas y en pe-- ríodos largos o prolongados. La enzima, cuando se incubo durante 4.5h a 35 y 45°C perdió aproximadamente del 56% y 80%, respectivamente, de su actividad inicial. La es-- tabilidad térmica de la xilanasa II en presencia de EDTA (2 mM) en amortiguador Tris-HCl (0.05 M, pH 8.4) se man- tuvo, sugiriendo esto que los metales polivalentes, no -- implican, ni comprometen la termoestabilidad como lo --- muestra la siguiente gráfica. Esta enzima, es completa-- mente inactivada sólo después de una hora a 100°C a un -- pH de 5.5. Es bastante raro encontrar tal estabilidad --

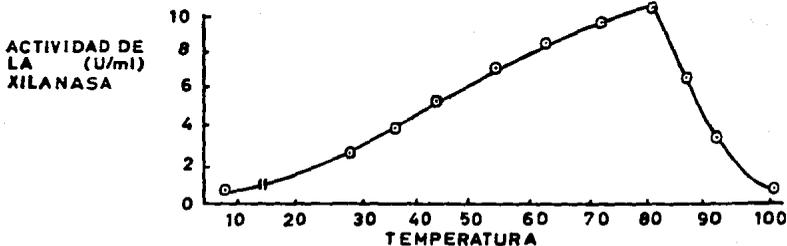
térmica en una enzima de un organismo mesofílico, es por ello que se mencionará más detalladamente. (15)

TEMPERATURA ESTABLE

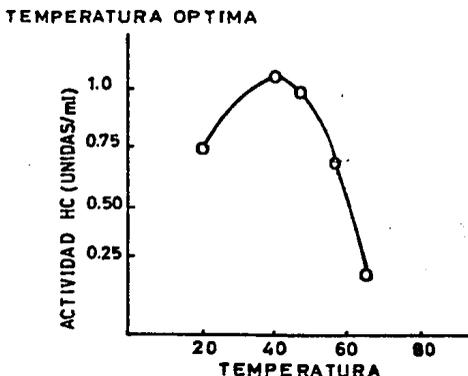


ESTABILIDAD TERMICA (1h) O—O EDTA (pH 5.5) (2 mM) X---X

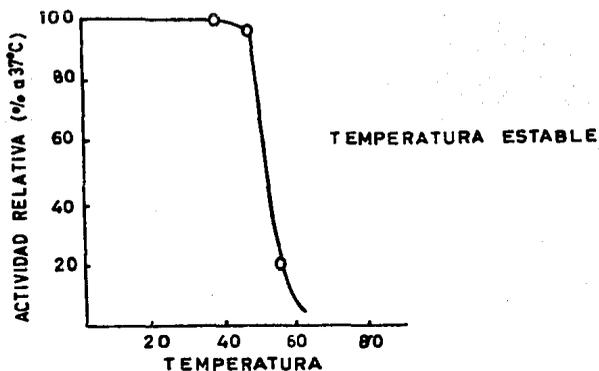
TEMPERATURA OPTIMA



En la xilanasa I de Ceratocystis paradoxa, la temperatura óptima fue de 40°C, la cual se obtuvo incubando la solución de la enzima (0.02 ml), amortiguador de acetato (pH 5.5, 0.10 M, 0.5ml) y la solución de la enzima (1%, 0.5 ml) durante 30 minutos a varias temperaturas, seguida por el análisis de la fuerza reductora. (16) Como se muestra en la siguiente gráfica:



La temperatura de estabilidad se determinó en una solución de enzima (0.2 ml) incubándose en amortiguador de acetato durante 1 hora a varias temperaturas, entonces a 37°C se agrega la solución de la hemicelulosa (1%, 0.5 ml) durante 1 hora, seguida por el análisis de la fuerza reductora; la temperatura de estabilidad fue de 0°C a aproximadamente 55°C como lo muestra la siguiente gráfica. (16)



Una xilanasa aislada de Trichoderma pseudokoningii, se purificó y almacenó hasta 9 meses en amortiguador de acetato de sodio 50mM (pH 5.0) que contiene 100 mM de NaCl a  $-20^{\circ}\text{C}$ , sin pérdida significativa de la actividad (4). La endo-(1,4)-beta-D-xilanasa de Irpex lacteus, -- presentó una temperatura óptima aproximadamente de  $62^{\circ}\text{C}$  bajo condiciones standard y una temperatura de estabilidad de los  $0^{\circ}\text{C}$  a los  $50^{\circ}\text{C}$ ; ésta se midió en una solución purificada de la enzima en amortiguador de acetato --- 0.1 M (pH 4.2), se mantuvo a varias temperaturas (4-80) durante 30 minutos midiéndose bajo condiciones standard (29). La endo-xilanasa de Schizophyllum commune, presentó una temperatura óptima entre  $45$  y  $50^{\circ}\text{C}$ ; cuando se -- analizó con xilana soluble durante 10 minutos (58). La endo-(1,4)-Beta-D-xilanasa del hongo de Trametes hirsuta, se encontró que su temperatura óptima fue de  $50^{\circ}\text{C}$  y

su estabilidad térmica a 45°C durante 30 minutos, sin embargo se desnaturizó a temperaturas más altas (51). La xilanasa homogénea de una preparación comercial de Aspergillus niger, aislado de un bosque tropical de --- Africa al estudiar el efecto de la temperatura en su -- actividad se encontró; que la xilanasa I-A y la xilanasa I-B presentaban actividad máxima desde 65°C, hasta - los 80°C. Todas las xilanasas II, o sea II-A, II-B, II-C fueron muy activas a 50°C y su actividad disminuyó rápidamente por arriba de los 60°C y se perdió casi completamente a los 80°C. (32)

Las endo-(1,4)-Beta-D-xilanasas bacterianas de --- Bacillus subtilis y Streptomyces xylophagus, presentan una temperatura óptima y de estabilidad más baja. ---- Streptomyces xilophagus secreta una endo-D-xilanasa que presenta más actividad en un rango de temperatura de -- 55°C a 60°C; cuando la enzima se incubó con solución de xilana, a pH 6.2, y a varias temperaturas. La estabilidad térmica a pH 6.2 fue de 40°C pero perdió sus actividades casi completamente a 70°C durante 10 minutos. La endo-D-xilanasa de Bacillus subtilis, presentó una temperatura óptima en el rango de 37°C a 45°C y una completa inactivación a los 70°C (34). La siguiente tabla nos resume los pH y temperaturas de algunas endo-(1,4)-Beta-D-xilanasas.

Tabla 4  
pH y temperaturas de algunas endo-(1,4)- $\beta$ -D-xilanasas

Fuente de enzima	pH óptimo	pH estable	T°C óptima	T°C de completa inactivación
<u>Bacillus subtilis</u>	6.0-6.2	5.0-7.0	37-45	70
<u>Bacillus circulans VI-12</u>	5.5	—	—	—
<u>Streptomyces xylohaeae</u>	6.2	5.3-7.3	55-60	70
<u>Aspergillus bisporus A</u>	5.4	4.5-6.5	45-50	65
<u>Aspergillus niger (24)</u>	5	4.5-6.0	55	—
<u>Aspergillus niger str 14</u>	4.0	3-8	50	—
<u>Aspergillus bisporus B</u>	5.0	3.5-6.0	50	70
<u>Aspergillus niger I</u>	4.5	—	50	60
<u>Aspergillus niger II</u>	5.5	—	50	60
<u>Aspergillus niger III</u>	4.5-5.0	2.0-9.0	50	80
<u>Aspiger van Tieghem I</u>	5.5	3.5-10	—	60
<u>Aspiger van Tieghem II</u>	5.0	4.0-10	—	mayor 75
<u>Aspiger van Tieghem III</u>	3.5	3.0-8.0	—	mayor 75
<u>Aspergillus niger I-A</u>	5.5-6.0	—	65-80	mayor 80
<u>Aspergillus niger I-B</u>	4.0-4.5	—	65-80	mayor 80
<u>Aspergillus niger II-A</u>	4.0	—	50	80
<u>Aspergillus niger II-B</u>	6.0-6.5	8.0	50	80
<u>Aspergillus niger II-C</u>	6.0-6.5	—	50	80
<u>Ceratocytis pardozzi I</u>	5.5	—	40	65
<u>Ceratocytis pardozzi II</u>	5.1	5.0-10	80	100
<u>Haliotia viticola</u>	3.8	—	—	—
<u>Penicillium lanthiellum I</u>	5.3	5.0-8.0	—	70

Continuación de la tabla 4

Fuente de enzima	pH óptimo	pH estable	T °C óptima	T °C de completa inactivación
<u>Pa. lanthinellus II</u>	4.7	8.0-9.0	44	80
<u>Pa. lanthinellus III</u>	4.7	5.0-9.0	—	80
<u>Mucicola lanurinosae</u>	5.0-6.0	4.0-12.0	65	—
<u>Irrex lacteus</u>	4.6-5.2	6.5-9.0	62	70
<u>Trametes hirsuta</u>	5.0-5.5	4.0-8.0	53	mayor 50
<u>Schizophyllum commune</u>	4.8-5.4	6.0-8.0	45	65
<u>Trichoderma viride</u>	5.5-6.0	3.0-7.0	—	90
<u>Trichoderma viride</u>	3.5	2.0-7.0	50	65
<u>Trichoderma pseudokoningii</u>	—	—	—	—
<u>Trich</u>	5.0	—	—	—
<u>Celulosa comercial</u>	4.5	4.0-11.0	—	80
<u>Trichoderma reesei QM9414</u>	5	2-10	56-60	55°C al 50%

Como se puede ver en la tabla anterior las endo--  
(1,4)-B-D-xilanasas de hongos son más activas a pH de --  
3.5 a 5.5 y son estables en un rango muy amplio de pH,  
generalmente de 3 a 10. Estas por lo general muestran -  
actividad óptima a una temperatura de 50°C y tienden --  
ser termoestables, frecuentemente son totalmente inacti  
vadas a temperaturas mayores de 65°C; solamente Trametes  
hirsuta es inactivada a temperaturas mayores de 50°C. -  
En la tabla también se puede observar que el sistema --  
xilanasas II de Ceratocystis paradoxa, es estable a tem-  
peraturas bastante altas; su temperatura óptima es de -  
80°C, siendo completamente inactivada solo después de -  
una hora a 100°C a un pH de 5.5; manteniendo su termoes-  
tabilidad en presencia de EDTA. Es bastante raro encon-  
trar tales extremos de estabilidad térmica en una enzi-  
ma de un organismo mesofilico. Las D-xilanasas de bacte-  
rias (Bacillus subtilis y Streptomyces xilophagus) ----  
tienen un pH más alto que aquéllos de origen fungico, y  
son estables a pH de 5.0 a 7.3; sus temperaturas óptimas  
van de 37°C a 60°C, con una completa inactivación a ---  
temperaturas de 70°C.

4.4.- Pesos moleculares, punto isoelectrico, Km.

Tabla 5

Pesos moleculares, punto isoelectrico, Km; de endo-(1,4)-  
B-D-xilanasas de diferentes origenes.

<u>fuelle de enzima</u>	<u>peso moleculer x 10<sup>3</sup></u>	<u>pI</u>	<u>Km (mg/ml)</u>
<u>Aspergillus niger I-A</u>	50	--	--
<u>Aspergillus niger I-B</u>	50	--	--
<u>Aspergillus niger II-A</u>	31	--	--
<u>Aspergillus niger II-B</u>	31	--	--
<u>Aspergillus niger II-C</u>	31	--	--
<u>Aspergillus niger (24)</u>	20.8	--	--
<u>Aspergillus niger</u>	--	3.9-4.5	--
<u>Aspergillus wentii</u>	25-28	--	--
<u>Aspergillus niger str 14</u>	24, 33, 24, 27	4.2	3
<u>Ceratocystis paradoxa I</u>	--	9.17	4.24
<u>Ceratocystis paradoxa II</u>	--	4.50	0.27
<u>Coniophora cerebella</u>	34-38	--	--
<u>Chrysosporium lignorum</u>	--	4.44-6.0	--
<u>Fomes annosus</u>	--	4.1-4.6, 7.0	--
<u>Poliysporus schweinitzii</u>	35	--	--
<u>Schizophyllum commune</u>	--	--	14
<u>Schizophyllum commune</u>	31-33	--	8.37
<u>Stereum sanguinolentum</u>	--	3.62-4.30	--
<u>Stereum sanguinolentum</u>	21.6	--	--
<u>Trichoderma viride</u>	16	--	2.5

Continuación de la tabla 5

fuente de enzima	peso molecular x 10 <sup>3</sup>	pI	Km (mg/ml)
<u>Celulosa comercial</u>	--	4.5	1.0
<u>Irpex lacteus</u>	38	7.6-8.0	2.8
<u>Trametes hirsuta</u>	22-24	--	6.36
<u>Trametes hirsuta</u>	22-24	--	1.14
<u>T. pseudokoningui</u>	20.3-22.3	9.6	--
<u>T. reesei QM9414</u>	--	--	9.85
<u>Bacillus circulans WL-12-A</u>	85	4.5	8
<u>Bacillus circulans WL-12-B</u>	15	9.1	4
<u>Streptomyces xylophagus</u>	20.8	--	--

Los pesos moleculares de las preparaciones de las endo-(1,4)-Beta-D-xilanasas de hongos, son parecidas a las de otras hemicelulosas y éstas fluctúan entre los 16,000 a 38,000 y fueron determinados por diferentes métodos: Aspergillus niger I-A, I-B, II-A, II-B, II-C. Fue calculado su peso molecular por cromatografía sobre una columna calibrada de Bio-gel P-150, con la suposición de que las enzimas purificadas son proteínas globulares. Aspergillus niger str 14, las endo-(1,4)-Beta-D-xilanasas de ésta cepa fue calculada por diferentes métodos por ello se dan en la tabla los cuatro valores --

obtenidos; 24,000 por filtración en gel sephadex G-200, 33,000 por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de sulfato de dodecil de sodio, 24,700 obtenido por sedimentación por ultracentrifugación y por último 27,000 obtenido por análisis en composición de aminoácidos y carbohidratos. Aquí se observó que la endo-xilanasas de Stereum sanguinolentum y Aspergillus niger str 14 fueron similares en cuanto a contenido de aminoácidos. El peso molecular de la endo-(1,4)-Beta-D-xilanasas de Irpex lacteus fue determinado por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida por filtración en ultrogel -- Aca 54. El peso molecular de endo-xilanasas de Trametes hirsuta fue determinado por cromatografía en gel en una columna sephadex G-100, otros se calcularon por movilidad electroforética, ultracentrifugación en base a composición de aminoácidos, por adsorción en DEAE-Biogel A, etc.. El peso molecular de la endo-(1,4)-Beta-D-xilanasas de bacterias fluctua entre 15,000 a 85,000; éste -- valor de 85,000 en el Bacillus circulans WL-12 fue determinado por adsorción en DEAE-Biogel A y es notablemente diferente a las otras endo-(1,4)-Beta-D-xilanasas y muy parecida a los pesos moleculares de las Beta-D-xilosidasas por ejemplo la reportada por Deyne y Co. (1972) aislada de Penicillium wortmanni.

Los valores de pI no han sido reportados en todas

las endo-(1,4)-Beta-D-xilanasas hasta ahora estudiadas, pero es igualmente posible encontrar pI neutro; por ejemplo *Fomes annosus*, pI 7.0; pI alcalino, en *Ceratocystis paradoxa*, endo-(1,4)-Beta-D-xilanasas de la hemicelulosa I presenta un pI de 9.17; también en las endo-(1,4)-Beta-D-xilanasas bacterianas encontramos pI alcalino por ejemplo el pI de *Bacillus circulans WL-12-B* es de 9.1; también existen en estado ácido, en hongos y bacterias, las endo-(1,4)-Beta-D-xilanasas de *Aspergillus niger* 3.9, 4.5 y en Bacterias la endo-(1,4)-B-D-xilanasas de *Bacillus circulans WL-12-A*, su pI es de 4.5. Los valores de Km - que hasta ahora se han reportado van del rango de 0.27 a 14 mg de hemicelulosa/ml; obviamente estos valores -- son dependientes de el detalle de la estructura de la - hemicelulosa usada.

#### 4.5.- Inhibición de la actividad de las endo-(1,4)-Beta-D-xilanasas por iones metálicos y otros compuestos

Las endo-(1,4)-B-D-xilanasas pueden ser inhibidas por sustancias como: sulfhidrilo, p-cloromercuribenzoato, iodo, iodo acético, metales iónicos, glicerol, 1,2-atanodiol y varios azucars. El glicerol y el 1,2-etano diol a concentraciones mayores de 60% v/v inhiben la -- acción de la endo-(1,4)-Beta-D-xilanasas de *Aspergillus niger*, aunque la inhibición causada por el 1,2 etanodiol se encontró que era reversible. Los metales iónicos --- inhibidores de las endo-(1,4)-Beta-D-xilanasas de *Bacillus subtilis*, *Agaricus bisporus*, *Ceratocystis paradoxa*,

Trichoderma viride, Irpex lacteus, Trametes hirsuta, -- Aspergillus niger son indicados en la siguiente tabla, así como la inhibición por algunos compuestos químicos como el sulfhidrilo, el yodo, iodoacético, muestran --- que las endo-(1,4)-Beta-D-xilanasas de Bacillus subtilis, requieren de éstos grupos para su actividad.

La inhibición de la endo-(1,4)-Beta-D-xilanasas de Aspergillus niger por iodoacetamida fue parcialmente revertida por el ditiotriol a 2.5 mM.

El ión  $Hg^{2+}$  se encontró que es el más potente inhibidor y sus efectos sobre la actividad enzimática sugiere que reacciona con grupos tiol. Sin embargo, el ión  $Hg^{2+}$  es también conocido que reacciona con los grupos amina e imidazol de histidina y con enlaces péptidos que pueden ser capaces de coordinarse con los grupos carboxil y amino. El EDTA y el KCN; fuertes inhibidores de metales enzimas; no presentan ningún efecto inhibitorio en las endo-(1,4)-B-D-xilanasas, de acuerdo con los datos obtenidos por Hashimoto y Sorensen. De los iones metálicos probados, solamente el  $Ca^{2+}$  aumentó significativamente la actividad de la xilanasas en aproximadamente un 30%. Las B-D-xilanasas de Bacillus subtilis y Agaricus bisporus han sido reportados ser activadas por cloruro de calcio y cloruro de sodio, respectivamente. Sin embargo la activación de la B-D-xilanasas de Bacillus subtilis por cloruro de calcio no incrementa la estabilidad de la enzima.

Tabla 6

Inhibidores de endo-(1,4)-Beta-D-xilanasas.

inhibidor	fuentes de enzima	referencia
reactivos sulfhidrilo -	<u>Trametes hirsuta</u>	51
(p-cloromercuribenzoato, iodo, ácido iodoacético)	<u>Bacillus subtilis</u>	--
p-cloromercuribenzoato y acetamida	<u>Aspergillus niger</u>	--
etanodiol, glicerol	<u>Aspergillus niger</u>	--
bromuro-2-hidroxi-5 nitró bencil	<u>Irpex lacteus</u>	29
iones metálicos		
Hg <sup>2+</sup> , Ag <sup>+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup>	<u>Trametes hirsuta</u>	51
	<u>Bacillus subtilis</u>	
Hg <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup>	<u>Aspergillus niger</u>	24
Hg <sup>2+</sup> , Ag <sup>+</sup>	<u>Irpex lacteus</u>	29
Hg <sup>2+</sup> , Ag <sup>+</sup>	<u>Trametes hirsuta</u>	51
Hg <sup>2+</sup> , Ag <sup>2</sup>	<u>Cryptococcus albidus</u>	
	<u>var. aurius</u>	56
Mn <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	<u>Agaricus bisporus</u>	--
Hg <sup>2+</sup>	<u>Trichoderma viride</u> y	
	<u>Ceratocystis paradoxa</u>	15, 16 28
Azúcares		
L-arabinosa, D-xilosa y xiletriosa	<u>Ceratocystis paradoxa</u>	16
D-xilosa	<u>Ceratocystis paradoxa</u>	15 y 19
xilopentosa	<u>Trichoderma viride</u>	--
xilobiosa	<u>Trametes hirsuta</u>	14

#### 4.6.- Composición de aminoácidos; y carbohidratos.

Uno de los primeros sistemas B-D-xilanasas en el que se estudió la composición de aminoácidos fue el sistema xilanasas de Stereum sanguinolentum determinando en éste su peso molecular. El perfil de aminoácidos de esta xilanasas homogénea está mostrado en la siguiente tabla, y ésta comparada con los perfiles de xilanasas homogéneas reportadas por otros investigadores. La B-D-xilanasas de Irpez lacteus, es muy rica en aminoácidos hidrofóbicos y ácidos, carece de cisteína, lo que se refleja por la falta de inhibición por la N-etilmaleimida. El contenido de aminoácidos del sistema B-D-xilanasas de Aspergillus niger str 14 y el sistema B-D-xilanasas de Stereum sanguinolentum, son casi similares en cuanto al contenido de número de residuos de aminoácidos.

El contenido de carbohidratos varía en la literatura de acuerdo al método utilizado para su investigación pero sin embargo éste varía en un rango de 20% a 35% en las xilanasas hasta ahora investigadas.

Otros parámetros físicos que han sido determinados en sistemas B-D-xilanasas, incluyen el coeficiente de sedimentación (Stereum sanguinolentum 2.8 S, el cual es similar al que se reportó para Trichoderma viride).

Composición de aminoácidos de *B.D-xilanasas* homogéneas

aminoácidos	<i>Aspergillus</i> <i>niger</i> (a)		<i>Aspergillus</i> <i>niger</i> str. 14 (b)		<i>Schizosphyllum</i> <i>commune</i> (c)		<i>Stromosus unguis</i> -(d) <i>molentus</i>		<i>Impex lacteus</i> (e)		<i>Streptomyces</i> (f)	
	Res	%	Res	%	Res	%	Res	%	Res	%	Res	%
ácido aspártico	13,8	10,3	30	14,6	31,58	10,7	18,6	8,6	10,8	10,8	12,4	12,4
treonina	9,3	7,0	32	15,1	29,68	10,1	26,8	12,3	5,9	5,9	7,8	7,8
serina	12,8	9,2	28	13,2	37,52	12,7	34,4	15,7	13,5	13,5	8,2	8,2
ácido glutámico	14,1	10,6	17	8,0	19,0	6,4	15,1	6,9	12,3	12,3	8,1	8,1
prolina	8,2	6,2	5	2,4	13,7	4,6	11,4	5,2	4,0	4,0	4,2	4,2
glicina	17,3	13,0	36	17,0	47,0	15,9	26,4	12,1	13,0	13,0	11,7	11,7
alunina	12,8	9,6	13	6,1	20,9	7,1	17,9	8,2	11,2	11,2	9,4	9,4
valina	6,8	5,1	1	0,5	14,4	4,9	13,2	6,1	5,9	5,9	5,4	5,4
metionina	0,0	0,0	2	0,9	1,4	0,5	2,2	1,0	-	-	1,5	1,5
isoleucina	6,7	5,0	5	2,4	11,7	4,0	6,6	3,0	2,7	2,7	4,0	4,0
leucina	7,5	5,6	5	2,4	11,0	3,7	7,6	3,5	7,6	7,6	5,6	5,6
tirocina	4,0	3,0	16	7,5	23,0	7,8	10,7	4,9	1,3	1,3	3,9	3,9
fenilalanina	3,6	2,7	5	2,4	4,96	1,7	6,8	3,1	4,1	4,1	4,1	4,1
lisina	7,3	5,5	6	2,8	7,12	2,4	3,6	1,7	4,0	4,0	3,8	3,8
histidina	3,7	2,8	2	0,9	4,14	1,4	2,4	1,1	2,5	2,5	2,2	2,2
arginina	3,7	2,8	6	2,8	5,8	2,0	2,0	0,9	1,2	1,2	5,8	5,8
metil cisteína	2,1	1,6	2	1,0	3,95	1,3	3,3	1,5	-	-	1,9	1,9
triptófano	-	-	3	1,4	8,5	2,9	8,6	4,0	-	-	-	-
residuos totales	133		212		295		218		188		213	
peso molecular	20.800		22.000		32.000		22.800		18.000		40.000	

Referencias: (a).-24; (b).-26; (c).-58; (d).- ; (e).- ; (f).-

-- no determinado, X-trazas.

R= Residuos

M= % Molar

## CAPITULO V

### 5.- Modo de acción de las (1,4)-B-D-xilanasas.

#### 5.1.- B-D-xilanasas Bacterianas.

Las B-D-xilanasas producidas por Bacillus subtilis y Streptomyces xilophagus, muestran ser principalmente -- del tipo de las endo enzimas. La B-D-xilanasas de Bacillus subtilis degrada D-xilana, liberando inicialmente arabino xilooligosacáridos y xilooligosacárido de d.p. mayor o -- igual a 2 por hidrólisis prolongada de 24 horas. Estos -- producen D-xilosa además de los productos antes mencionados. La xilobiosa no es nuevamente degradada. La B-D-xilanasas de Streptomyces xilophagus degradó D-xilana en pasos similares, pero no liberó L-arabinosa. La D-xilosa fue -- producida por incubación prolongada de 5 horas, y simultáneamente con la xilobiosa constituyen los mayores productos de hidrólisis; el disacárido xilobiosa no fue nuevamente degradado por ésta enzima.

#### 5.2.- B-D-xilanasas de Hongos.

Las B-D-xilanasas de hongos son potencialmente exo y endo enzimas. La literatura en el aislamiento de las --

exo enzimas de hongos nos menciona que tales enzimas son difíciles de aislar y diferenciar de la B-D-xilosidasas, ambas son capaces de degradar D-xilooligosácaridos de -- d.p. mayor o igual que 2; pero por definición sólo las - exo xilanasas atacan a las D-xilanas. Las dos tipos de - enzimas pueden ser claramente diferenciadas una de la -- otra por análisis espectroscópico de resonancia magnética nuclear. Las B-D-xilanasas que muestran ser del tipo exo han sido producidas extracelularmente por Aspergillus -- batatae, Aspergillus niger, Coniophora cerebella; éstas no han sido tan extensivamente purificadas como las preparaciones de las endo-xilanasas.

Los hongos han sido la fuente más común de endo-xi lanasas y estas preparaciones son y han sido más extensa mente estudiadas. Las endo-D-xilanasas pueden ser dividi das dentro de dos grupos principalmente de acuerdo a su modo de acción:

- I.- endo-D-xilanasas liberadoras de arabinosa.
  - II.- endo-D-xilanasas no liberadoras de arabinosa.
- I.- endo-D-xilanasas liberadoras de L-arabinosa.

Las D-xilanasas, por definición, son glican hidrolasas capaces de hidrólizar enlaces (1,4)-B-D-xilopirano sil de D-xilanas. Sin embargo, algunas preparaciones ---

altamente purificadas de xilanasas muestran tener capacidad de hidrolizar puntos ramificados (1,3)-alfa-L-arabinofuranosil de arabinoxilanas. Estas enzimas han sido -- aisladas de Agaricus bisporus, Aspergillus niger, Ceratocystis paradoxa y Diplodia viticola. La preparación enzimática cruda de Diplodia viticola fue capaz de liberar - L-arabinosa de arabinoxilana de rastrojo de maíz y uva, pero cuando se purifico, degradó xilooligosacáridos d.p. 2.5, no produciendo arabinosa; este tipo de enzima se -- encontro ser producido por varios hongos fitopatógenos, y muestran ser capaces de hidrolizar la alfa L-arabinosurranosidasa en puntos ramales de arabinoxilanas.

El sistema D-xilanasas de Aspergillus niger se encontró que consistía en dos diferentes xilanasas; I y II. La D-xilanasas I degradó arabinoxilana de paja de arroz a D-xilosa, L-arabinosa y una mezcla de xilooligosacáridos d.p. 2-5; los disacáridos (xilobiosa) y trisacárido (xilotriosa) no fueron atacados, pero los arabinoxilooligosacáridos fueron hidrolizados a xilotriosa y L-arabinosa. La multiplicidad de éstas enzimas D-xilanasas producidas por Aspergillus niger fue más ampliamente investigadas - por Iwamoto y cols; ellos examinaron el efecto de la --- fuente de carbono (D-xilana, D-xilosa, L-arabinosa, O--- (carboximetil)-celulosa y D-glucosa), en diferentes tiempos de cultivo y cepas específicas y encontraron que, en cada caso, ambos tipos de D-xilanasas I y II fueron producidas intra y extracelularmente.

El sistema D-xilanasas de Aspergillus niger van Tieghem productores de D-xilanasas I, II, III; dos de las cuales (la II y la III) degradan arabinoxilosa de paja - de maíz a D-xilosa, L-arabinosa y una mezcla de arabinoxilo y xilooligosacáridos es como sigue:

<u>enzima</u>	<u>productos de degradación</u>	<u>grado de hidrólisis.</u>
xilanasas I	xilooligosacáridos, arabinosa, xilobiosa, xilotriosa, arabinoxilo pentosa.	48
xilanasas II	xilooligosacáridos, arabinosa, xilobiosa, arabinoxilotriosa, arabinoxilotetraosa, arabinoxilopentaosa.	34

Las D-xilanasas no atacan a la xilobiosa, pero liberan L-arabinosa de arabinoxilobiosa; la arabinoxilobiosa fue hidrolizada a L-arabinosa y xilotriosa, y ésta fue nuevamente degradada a xilosa y xilobiosa. La D-xilanasas II también atacó fenil alfa-L-arabinofuranosido, liberando L-arabinosa. Los anómeros B no son atacados.

El sistema B-D-xilanasas de cinco endo-xilanasas de A. niger reportadas por John y colaboradores desdoblaron L-arabinosa a partir de xilano. (32)

Ceratocystis paradoxa mostró que produce varias ---

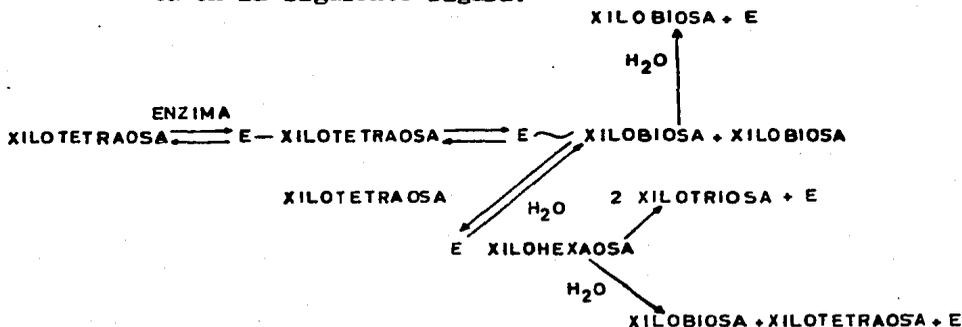
D-xilanasas, una de las cuales la HC I se encontró que libera L-arabinosa de hierba de prado (*Heteropogon contortus*) y de bagazo de caña de azúcar (C B). Estos sustratos mostraron estar compuestos predominantemente de arabino-4-O-metilglucuronoxilana. Este polisacárido según mostró Perlin contenía a los residuos de arabinosa unidos tanto por alfa (1,3) como por alfa (1,2) unidos al mismo residuo de D-xilosa, también como residuos de L-arabinosa unidos solo por alfa (1,3) en el esqueleto de xilana. El arabinoxilana tiene una estructura altamente ramificada por cada 25 residuos de xilosa-arabinosa ocurre un segmento de 5 residuos de xilosa sin ramificación. El ataque inicial de la enzima sobre el arabinoxilana y la HC B<sup>+</sup> liberó una mezcla de arabinoxilo y xilooligosacáridos. La arabinosa apareció en un tiempo de 2 horas y en tiempo de incubación más prolongado apareció la D-xilosa y una hemicelulosa degradada insoluble. Esta última puede haber sido el resultado de la remoción de los residuos de arabinosa, que produce una xilana de bajo contenido de arabinosa la cual precipita en la solución.

Los productos de degradación de arabinosa-xilosa y xilosa oligosacárido puros de d.p. 3-6 y 2-5, respectivamente, se muestran como sigue:

oligosacáridos	productos de degradación
arabinoxilobiosa	arabinosa, xilobiosa
arabinoxilotriosa	arabinosa, xilotriosa
arabinoxilotetraosa	xilotetraosa, arabinosa, xilobiosa
arabinoxilopentosa	xilobiosa, arabinosa, arabinoxi- lotriosa, xilotriosa, xilopentosa
xilobiosa	no se degrado
xilotriosa	no se degrado
xilotetraosa	xilobiosa, xilotriosa
xilopentosa	xilobiosa, xilotriosa

hidrólisis a 37°C después de 4 horas.

Como se puede notar el xilooligosacárido más pequeño atacado es la xilotetraosa, y tanto él como la xilopentosa produjeron xilobiosa y xilotriosa. El mecanismo propuesto para la hidrólisis de la xilotetraosa se representa en la siguiente figura:



El mecanismo propuesto para explicar la hidrólisis de la xilotetraosa por la enzima HC I; indica que la -- xilotetraosa se combina primero con la enzima para formar el complejo enzima-sustrato, el cual establece un equilibrio reversible con la enzima y la xilobiosa. En la inversa de esta reacción, se concibe entonces que la xilotetraosa reemplaza la xilobiosa con la formación resultante del complejo xilohexaosa, el cual se degrada rápidamente a xilobiosa, xilotriosa y xilotetraosa. La HC I degradó a los arabinosa-xilosa oligosacáridos a arabinosa como se mostró anteriormente en los productos de degradación; y éstos fueron subsiguientemente hidrolizados. El arabinoxilopentosa produjo algo de arabinoxilotriosa el cual -- fue objeto de otra degradación para dar arabinosa y xilotriosa. Esto fue sorprendente, ya que la velocidad y características del producto sugieren que el sitio de enlace de la hemicelulosa I "llena" a una cadena de 5 residuos D-xilosa, y el sitio de enlace activo está evidentemente situado dentro de los subsitios de enlace. El ataque relativamente rápido sobre el arabinoxilopentosa para producir arabinoxilotriosa, xilobiosa sugiere, por lo tanto, que la presencia de arabinosa como sustituyente -- no puede interferir con el llenado de la cadena (1,4)-B-D-xilosa en el sitio de enlace. La arabinosa sustituyente en el, arabinoxilopentosa esta probablemente presente sobre el residuo xilosa en el extremo no reductor, pero el argumento anterior es válido si la arabinosa es colocada sobre la cadena de xilosa.

La actividad de la arabinosidasa de la xilanasasa de HC I fue detenida cuando la enzima fue preincubada con xilotriosa antes del ataque sobre la hemicelulosa B, la hidrólisis de la hemicelulosa B continuó, y esto sugiere que los dos tipos de hidrólisis son probablemente catalizados en diferentes sitios catalíticos ya que la presencia de la xilotriosa no previene nuevamente la división de las cadenas de D-xilosa. La hidrólisis enzimática de la hemicelulosa B por la hemicelulosa I está suprimida a concentraciones elevadas de L-arabinosa y D-xilosa. Es probablemente, que la inhibición del producto sea un factor importante en la limitación de la acción de hemicelulosa I sobre las hemicelulosas. (16)

Una comparación de las propiedades y modo de acción de algunas "xilanasas liberadoras de arabinosa" es resumido en la siguiente tabla; la cual nos muestra que cada enzima es diferente una de la otra.

Las endo D-xilanasas II y III de Aspergillus niger van Tieghe degradó L-arabinano de remolacha, mientras que la xilanasasa de HC I de Ceratocystis paradoxa ataco lentamente a los enlaces alfa (1,3) de las uniones de arabinofuranosil de L-arabinan de remolacha, liberando L-arabinosa.

La tabla también nos muestra que ambas xilanasas; la

D-xilanasa I de Aspergillus niger y la HC I de Ceratocystis paradoxa degradan xilotriosa, pero liberando L-arabinosa de Arabinoxilotriosa, mientras la D-xilanasa II de Aspergillus niger van Tieghem fue capaz de atacar xilotriosa y, en consecuencia después de eliminar o remover la L-arabinosa de arabinoxilotriosa, subsecuentemente -- produce D-xilosa y xilobiosa.

Tabla 7  
Comparación de las propiedades y modos de acción de xilanasas purificadas que liberan L-arabinosa de hemicelulosas.

Origen microbiano	pH óptimo	temperatura estable (°C)	fuente de hemicelulosa	Productos de hidrólisis	Productos de ataque	
					sobre AX <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>
<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem sp. enzima II	5.0	0-60	arabinoxilana de paja de arroz	A, X <sub>1</sub> , X <sub>2</sub> , X <sub>3</sub> , AX <sub>5</sub>	A, X <sub>1</sub> , X <sub>2</sub> , X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub> , X <sub>2</sub>
Enzima III	3.5	0-50	arabinoxilana de paja de arroz	A, X <sub>1</sub> , X <sub>2</sub> , AX <sub>3</sub> , X <sub>3</sub> , AX <sub>4</sub> , AX <sub>5</sub>	n.s.	n.s.
<i>Aspergillus niger</i>	4.5	0-60	xilana	A, X <sub>2</sub> , AX <sub>3</sub> , X <sub>3</sub> , X <sub>4</sub>	A, X <sub>3</sub>	no
<i>Ceratocystis paradoxa</i>	5.5	0-46	hemicelulosa E de hierba de prados	A, X <sub>1</sub> , X <sub>2</sub> , X <sub>3</sub> , AX <sub>4</sub> , X <sub>4</sub> , AX <sub>5</sub> , X <sub>5</sub>	A, X <sub>3</sub>	no
<i>Agaricus bisporus</i>	5.4	0-45	hemicelulosa de paja de arroz	A, X <sub>1</sub> , X <sub>2</sub> , X <sub>3</sub> , X <sub>4</sub> -X <sub>5</sub>	n.d.	n.d.

n.s. = no especificado

n.d. = no determinado

II.- "Las endo-xilanasas no liberadoras de arabinosa".

Este grupo de D-xilanasas, constituyen la mayoría de las endo D-xilanasas de hongos conocidas, generalmente - degradan arabinoxilana y otras D-xilanas a D-xilosa, D-xilooligosacáridos, y en algunos casos, oligosacáridos --- conteniendo tanto L-arabinosa y D-xilosa. Estas enzimas han sido aisladas y altamente purificadas de varias cepas de Aspergillus niger, Ceratocystis paradoxa, Diplodia -- Viticola, Stereum sanguinolentum, Trichoderma viride, -- Trametes hirsuta (14). La degradación originadas por sus ataques sobre D-xilanas son resumidos en la siguiente -- tabla.

La mayoría de estas preparaciones de D-xilanasas, con excepción de la Diplodia viticola, degrada al azar D-xilana, liberando xilosa así como oligosacáridos.

Las D-xilanasas parcialmente purificadas de Coniophora cerebella degradación 4-O-metilglucuronoxilana de alamo a D-xilosa, una mezcla de D-xilooligosacáridos de d.p. 2-5 y un complejo de enzima resistente que no ha sido -- investigado. La D-xilana de Rhodymenia palmata esta compuesta de enlaces B-D-(1,3) y B-D-(1,4)-D-xilosa residual en una sola cadena de D-xilosa, y es susceptible de ser atacada por D-xilanasas de Hongos.

La preparación purificada de D-xilanas de Stereum sanguinolentum degradó D-xilana de Rhodymenia palmata a xilobiosa, xilotriosa y, una serie de grandes oligosacáridos ( $X_4$  -  $X_{10}$ ) que contienen una mezcla de enlaces --- B-D-(1,3) y (1,4), generalmente en la relación 1:2. El ataque se cree que ocurre en los enlaces B-D-(1,4) solamente cuando esta flanqueada de ambos lados por otros -- enlaces B-D-(1,4).

Bjorndal y colaboradores sugieren que la disminución del campo  $X_6$  a  $X_4$  indican que los enlaces B-D-(1,3) no solamente inhiben el desdoblamiento de un enlace adyacente, sino también deja el desdoblamiento de los enlaces -- residuales liberados o removidos.

Tabla 8

Productos de degradación de la hidrólisis de D-xilanas por --  
endo-D-xilanasas de hongos.

<u>fuelle de enzima</u>	<u>fuelle de D-xilana</u>	<u>productos de - degradación</u>
<u>Aspergillus niger van</u>		
<u>Tieghem</u>		
D-xilanasas I	paja de arroz	X, AX <sub>2</sub> , X <sub>2</sub> , AX <sub>3</sub> , AX <sub>4</sub>
D-xilanasas II	paja de arroz	X, X <sub>2</sub> , X <sub>3</sub> , (A-X), X <sub>4</sub>
<u>Aspergillus niger</u>		
D-xilanasas B	rastrojo de maiz	X, X <sub>2</sub> , X <sub>3</sub> , (A-X), X <sub>4</sub>
D-xilanasas II	paja de arroz	X, X <sub>2</sub> , (A-X), X <sub>3</sub> , X <sub>4</sub>
<u>Ceratocystis paradoxa</u>		
D-xilanasas HC II	hierba de prado, endosperma de - trigo	X, AX <sub>2</sub> , X <sub>2</sub> , AX <sub>3</sub> , X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> , AX <sub>4</sub> , AX <sub>5</sub> , X <sub>5</sub>
<u>Diplodia viticola</u>	hierba de prados paja de trigo, uva	X <sub>2</sub> -X <sub>5</sub>
<u>Stereum sanguinolentum</u>		
	Rhodymenia palmata	X <sub>2</sub> , X <sub>3</sub> , (X-X <sub>10</sub> )
<u>Trichoderma viride</u>	xilana comercial	X, X <sub>2</sub> -X <sub>5</sub>
<u>Trametes hirsuta</u>	secoya	AX <sub>2</sub> , AX <sub>3</sub>
Celulosa comercial	paja de trigo	X, X <sub>2</sub> -X <sub>5</sub>

referencia (18).

X= xilosa,  $X_2$ = xilobiosa,  $X_3$ = xilotriosa,  $X_4$ = xilo-tetraosa,  $X_5$ = xilopentosa,  $AX_2$ = arabinoxilobiosa,  $AX_3$ = arabinoxilotriosa,  $AX_4$ = arabinoxilotetraosa,  $AX_5$ = arabinoxilopentosa, (A-X)= arabinoxilo-oligosacáridos de d.p. no determinado, ( $X_4$ -  $X_{10}$ )= mezcla de xilooligosacáridos de d.p. entre 4 a 10 que contienen enlaces B-D-(1,3) y (1,4) D-xilopiranosil como residuos en una proporción de 1:2.

Esta enzima no hidroliza xilobiosa y xilotriosa, pero degrada grandes cantidades de oligosacáridos dando -- mezclas de di y tri-sacáridos.

A. altas concentraciones de sustrato, esta enzima -- fue capaz de sintetizar grandes cantidades de oligosacáridos de d.p.  $X_4$  y  $X_5$  (transglicosilación), aunque este efecto puede ser prevenido por el uso de concentraciones bajas de sustrato por ejemplo 0.01%. Posteriormente ---- Erikson y Pettersson reportan que una preparación de D-- xilanasa aislada de Stereum sanguinolentum hidrolizo una serie de xilooligosacáridos de d.p. mayor o igual a 3, -- principalmente a D-xilosa y xilobiosa.

Las D-xilanasas aisladas de Trichoderma viride parecen ser similar en su modo de acción al atacar el D-xilana, a las D-xilanasas de Stereum sanguinolentum. Esta -- enzima degrada xilooligosacáridos d.p. 2-5 a una mezcla de D-xilosa y xilobiosa, con trazas de xilotriosa. En --

ambos casos, la xilobiosa permanece sin ser atacada. Otra enzima con casi similar modo de acción es la aislada de Aspergillus niger. Esta enzima degrada xilotriosa y xilitol a D-xilosa y xilobiosa, ya xilitol a xilobiosa -- respectivamente. La liberación de xilitol sugiere que el ataque ocurre principalmente a los grupos reductores finales de la molécula. La misma D-xilanasa no ataca una arabinoxilotriosa ( $AX_3$ ) o xilobiosa.

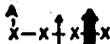
La D-xilanasa de xilanasa II (ref. 15) de Ceratocystis paradoxa degradan hemicelulosa B de arabinoxilano aislado de endosperma de trigo y de hierba de prado, este -- arabinoxilano está altamente ramificado (xilosa/arabinosa= 1.77) (estructura descrita por Perlin). Los productos de degradación de esta enzima muestra claramente que actúa -- como una endoenzima ya que degrada inicialmente a la xilobiosa y a una serie de mezclas de arabinoxilo y xilooligosacáridos de d.p. mayor o igual a 3 (25 minutos de hidrólisis).

Los productos que contienen grupos de ácidos urónico no se toman en cuenta, ya que estos son removidos en el -- tratamiento de desionización.

La glucosa también apareció en los productos de hidrólisis de las hemicelulosas, lo que indica la degradación de un componente glucano menor, el cual puede ser --

degradado a celulosa u otro tipo de glucano (15). Un disacárido de glucosa, el que se cromatografió junto con celobiosa, también se liberó. La D-xilosa y una arabinosa xilosa trisacárido (xilosa: arabinosa 2:1; arabinoxilobiosa) apareció después de 4 horas. No se detecto arabinosa, pero después de 24 horas en el hidrolizado apareció un precipitado que se le llamo "hemicelulosa degradada insoluble". La incubación prolongada disminuyo progresivamente el promedio de d.p. de los oligosacáridos liberados después de 5-6 días, los productos principales de la hidrólisis fueron D-xilosa, un trisacárido (arabinoxilobiosa), D-glucosa y xilobiosa. La ausencia de cualquier producto oligosacárido que contiene más de un residuo de arabinosa es significativa, y concluimos que, en las porciones de las moléculas de hemicelulosas atacadas por la enzima, no hubo casos donde los sustituyentes L-arabinofuranosa ocurrieron sobre residuos contiguos de xilosa - de la cadena principal o esqueleto de hemicelulosa.

El modo de acción más probable de la xilanasa II sobre estos oligosacáridos se muestra de la siguiente manera:



ENLACES ATACADOS EN VELOCIDADES BAJAS



ENLACES FACILMENTE ATACABLES POR HC II (XILANASA)

Donde; X= Beta-(1,4) que enlazan a D-xilopiranosil,  
 A= L-arabino-furanosa unida por alfa-(1,3), = enlaces -  
 fácilmente atacables por xilanasasa II y = enlaces ataca-  
 dos en velocidades más bajas.

Los mecanismos alternativos de ataque sobre los ---  
 oligosacáridos de xilosa podrían, por supuesto, dar los  
 mismos productos, pero la analogía con las reactividades  
 de los arabinosa-xilosa oligosacáridos sugieren el ata-  
 que preferencial indicado cercano al extremo reductor. -  
 La arabinosa en el punto de ramificación de arabinoxilo-  
 biosa y arabinoxilotriosa se ha mostrado por estudios de  
 metilación estar unidos a la unidad xilosil terminal no  
 reductora.

Las velocidades relativas de hidrólisis de los oligosacáridos de xilosa por la xilanasa II como se muestra en la tabla, sugieren que el sitio de enlace de la enzima es efectivamente llenado por una cadena de 4 residuos de xilosa. Aparentemente, el mismo llenado puede ser producido por arabinoxilotetraosa, ya que este último es hidrolizado aún más rápidamente que xilotetraosa.

Tabla 9

Productos de degradación de la hidrólisis enzimática de arabinosa-xilosa y xilosa oligosacáridos por la xilanasa II a 35°C por 4 hr.

OLIGOSACARIDO	incremento en la fuerza reductora	productos de hidrólisis						
		X	AX <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	AX <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>	AX <sub>4</sub>	X <sub>4</sub>
AX <sub>2</sub>	0	-	-	-	-	-	-	-
AX <sub>3</sub>	10	1	1	-	-	-	-	-
AX <sub>4</sub>	83	5	2	4	5	--	-	-
AX <sub>5</sub>	66	2	2	7	6	3	2	-
X <sub>2</sub>	0	-	-	-	-	-	-	-
X <sub>3</sub>	18	1		1				-
X <sub>4</sub>	50	1		7		2		-
X <sub>5</sub>	57	3		8		1		1

X= xilosa, X<sub>2</sub>= xilobiosa, X<sub>3</sub>= xilotriosa, X<sub>4</sub>= xilotetraosa, X<sub>5</sub>= xilopentosa, AX<sub>2</sub>= arabinoxilobiosa, AX<sub>3</sub>= arabinoxilotriosa, AX<sub>4</sub>= arabinoxilotetraosa, AX<sub>5</sub>= arabinoxilopentosa.

Parece, por lo tanto, que la presencia de los sustituyentes no impiden el enlace de la enzima a la hemicelulosa en la vecindad del sustituyente a pesar de, que por supuesto, el enlace xilosido a la "derecha" del sustituyente es resistente a la hidrólisis y no al sitio activo. Estas conclusiones son compatibles con la sugerencia inusual de que las regiones más altamente sustituidas de la hemicelulosa pueden ser preferencialmente atacadas por xilanasa II (15).

La hemicelulosa degradada xilanasa I la cual precipito de la solución durante el curso de la hidrólisis enzimática de la hemicelulosa B de pasto tuvo una viscosidad intrínseca, y de aquí probablemente un peso molecular, - considerablemente bajo con respecto al original de la hemicelulosa B. Su análisis indicó cantidades pequeñas de arabinosa, glucosa, galactosa y ácido urónico, del material original. El bajo contenido de L-arabinosa resulta de la formación de arabinosa-xilosa oligosacáridos, ya - que la L-arabinosa libre no fue liberada durante la hidrólisis. Cuando la xilanasa I se redisolvió en alcali y la solución se neutralizó, fue atacada por xilanasa II, liberando los mismos oligosacáridos que los que se producen a partir del ataque sobre la hemicelulosa B original. Durante la segunda hidrólisis, nuevamente se formó un precipitado de hemicelulosa; este precipitado pudo ser redicuelto e hidrolizado por la xilanasa II, produciendo productos similares, que incluyen al precipitado.

La separación del precipitado de H I, durante la -- hidrólisis enzimática es evidentemente dependiente del - tiempo. La separación de la xilanasas I precipitada duran te la hidrólisis enzimática es un fenómeno de retrodegra dación dependiente del tiempo, el cual parece estar favo recido por la reducción en la proporción de constituyentes no xilosa. No es sorprendente encontrar que las cade nas de xilana menos sustituidas se invierten más rápida mente. Sin embargo, la necesidad para explicar estas ob servaciones, fueron dirigidas a la conclusión sorprenden te de que las enzimas tienden preferentemente a atacar a las moléculas de hemicelulosa (o porciones de molécula) las que están más sustituidas con residuos de arabinosa y ácido urónico, dejando una xilana menos sustituido y - de peso molecular más bajo el cual se invierte y se vuel ve resistente a otro ataque enzimático.

Tabla 10

El efecto de la concentración elevada de xilosa sobre la actividad de xilanasas II se muestra en la siguiente tabla.

xilosa	0	5	10
actividad relativa	100	81.4	63.7
<u>incubado a 35°C por 24 hr.</u>			

La actividad enzimática es inhibida a concentraciones más altas de xilosa.

### 5.3.- Hemicelulasas de Bacterias del rumen.

Las hemicelulasas de microorganismos del rumen incluyen la alfa-L-arabinofuranisidasa, xilobiosa, xilooligosacáridos, y sistemas D-xilanasas. Este grupo probablemente también incluye las alfa D-glucosiduronasas (alfa-D-glucosidunato glucuronohidrolasas), las cuales son capaces de hidrolizar enlaces alfa-D-(1,2) de grupos D-glucopyranosilurenico (frecuentemente contienen un grupo metil en el carbono 4) de glucuronoxilanas. Sin embargo las enzimas que tienen esta especificidad no ha sido debidamente detectadas en los sistemas rumen, y por ello son poco discutidas.

Las hemicelulosas de los microorganismos del rumen han sido aisladas de cultivos puros de a).- bacterias -- como: Bacillus firmus, Bacteroides amylogenes Butyvirbio fibrosolvens, y Ruminococcus flavefaciens, y b).- Protozoarios como: Epidinium ecaudatum, Entodinium sp, Eudiplodinium medium, Eremoplastron bovis y Poliplastron multivesiculatum. Estos han sido encontrados en preparaciones libre de mezclas de bacterias, protozoarios y/o ambos. Los extractos libres de células contiene los siguientes tipos de enzimas: xilobiosa, xilodextrinasa, arabinofuranosidasa y xilanasas. Las xilanasas degradan xilano, arabinoxilano y D-xilosa oligosacáridos principalmente a -- xilobiosa y D-xilosa por un mecanismo de tipo endoenzima. La xilobiosa no es atacada, y la xilanasas ataca a la xilana lineal más rápidamente que a las hemicelulosas ----

ramificadas, por ejemplo, arabinoxilano de harina de trigo y una fracción libre ramificada de trifolium pratense. La presencia de arabinosa, galactosa y ácidos urónicos - como punto de ramificación lateral en el esqueleto de la xilana parecen inhibir la acción de las xilanasas. También ha sido demostrado que cuando una preparación comercial de hemicelulosa se utilizó para degradar a la xilana altamente ramificada de la goma de zapote (Sapota achras) con el sistema microbiano del rumen, la cadena de xilana no fue hidrolizada efectivamente por la xilanasas hasta que la arabinofuranosidasa ha removido los residuos arabinosa de los arabinoxilanos. Los diferentes tipos de hemicelulasas del rumen por lo tanto parecen trabajar de manera sinérgica en la degradación de arabinoxilanos a D-xilosa y L-arabinosa. La acción de alfa-L-arabinofuranosidasa fue mostrada por Bailey y Gaillard a preceder la acción de las xilosidasas y xilanasas. En esta forma la D-xilana es degradada a D-xilosa y L-arabinosa la cual puede ser utilizada en la fermentación de los microorganismos del rumen.

Este tipo de sistema hemicelulasas es, por eso, muy diferente del ya descrito del hongo patógeno Ceratocystis paradoxa, en el cual la D-xilanasas acepta preferentemente a las ramas de hemicelulasas.

5.4.- Endo (1,4)-B-D-xilanasas de Cryptococcus Albidus.

Aunque la beta-xilanasas extracelular producida por el hongo Cryptococcus albidus durante el crecimiento en xilanas de madera, cumple con todos los requisitos o criterios básicos de el modo de acción de una endo-xilanasas; cabe mencionarse de una manera especial debido a los continuos estudios que se han realizado con respecto a esta endo-beta-D-xilanasas:

La endo-(1,4)-beta-D-xilanasas de Cryptococcus albidus hidroliza a las xilanas hasta una serie de xilooligosacáridos, sin embargo, la enzima, aún después de una purificación intensiva, presenta baja afinidad para el p-nitrofenil beta xilosido, sustrato típico de las beta xilosidasas. En un análisis detallado de la catalisis de la enzima de aril-beta-xilosidos utilizando fenil-beta (U-C<sup>14</sup>) sintetizado de (U-C<sup>14</sup>) xilosa se obtuvo evidencia clara de que la liberación del fenol y sus nitroderivados de los correspondientes beta-xilosidos no fue debido a un simple desdoblamiento hidrolítico del sustrato, como sucedería al ser catalizado por una beta-xilosidasas, sino por una reacción compleja que involucra reacciones de transglicosilación múltiple, formación de intermediarios grandes como fenil glicosidos de xilooligosacáridos, los que subsiguientemente son hidrólizados principalmente a xilobiosa y xilotriosa.

A concentraciones menores de 100 mM de fenil beta--xilosido la reacción presentó una fase logarítmica significativa, que fue seguida por un período durante el cual la velocidad de degradación del sustrato podía determi--narse. La velocidad siguió una fuerte dependencia sigmoidal de la concentración de fenil-beta-xilosido. Se propo--ne que la endo-(1,4)-beta-D-xilanasa utiliza para la de--gradación de fenil-beta-xilosido dos rutas de reacción -- que difieren en la naturaleza de los donadores glicosil.

Cuando la reacción de p-nitrofenil, O-nitrofenil o fenil beta-xilosido a una concentración de 20mM se llevo a cabo con la beta xilanasa, se observó que la xilosa -- fue solamente un componente menor entre los productos de reacción formados. La descomposición de los aril xilosidos estuvo acompañada principalmente por la formación de xilobiosa y, en menor proporción, por la formación de xilotriosa y xilosa. La formación de xilooligosacáridos de p-nitrofenil beta-xilosido durante la incubación con be--ta-xilanasa fue más aparente a una concentración de sus--trato más elevada (100mM). Ninguno de los procedimientos químicos de detención nos permitió establecer la presen--cia de aril glicosidos de oligosacáridos de xilosa en -- las mezclas de incubación; se esperaba que estos se for--maran al menos en la etapa inicial de la reacción. Esto fue una consecuencia de la baja concentración de tales --

compuestos y a la baja sensibilidad de los procedimientos de detección. Los fenil oligosacáridos podrían haberse identificado fácilmente en las mezclas que contienen fenil beta ( $U-C^{14}$ ) xilosido como sustrato, después de tiempos cortos de incubación tales muestras contuvieron, además del sustrato pequeñas cantidades de xilobiosa y xilotriosa, dos productos radioactivos, los que acuerdo a la movilidad cromatográfica parecen ser fenil beta xilobiosido (compuesto 1) y fenil beta-xilotriosido (compuesto 11). La xilosa y xilotetraosa estuvieron presentes solamente en trazas en esta etapa temprana de la reacción. Se puede observar que la reacción siguió un patrón complejo de digestión de fenil beta-xilosido y aparecen varios productos que varían marcadamente con el tiempo. Los primeros que se formaron fueron fenil glicósidos de xilobiosa y xilotriosa, alcanzando su máxima concentración después de aproximadamente 30 minutos; disminuyendo después de este tiempo continuamente. La xilobiosa, xilotriosa y xilotetraosa se formaron después de un período logaritmico corto. De estos oligosacáridos, la xilotetraosa y xilotriosa se consumieron en otro curso de reacción, produciendo un equilibrio en el que la xilobiosa y xilosa fueron los productos principales de la descomposición de fenil beta xilosido. Es de interés por lo tanto, encontrar como procede la reacción de la endo-beta-D-xilanasas

con fenil beta xilosido a baja concentración del sustrato. A una concentración de 5 mM la velocidad de degradación de fenil beta xilosido fue extremadamente baja y no se encontraron en la mezcla fenil glicosidos de xilobiosa y xilotriosa. Un hallazgo importante fue el que la xilobiosa, fue nuevamente el producto de reacción que prevalecía. Esto fue evidencia clara de que la beta xilanasa es incapaz de catalizar la hidrólisis simple de aril xilosidos y que cualquier mecanismo posible de degradación involucra las reacciones de transglicosilación. En otras palabras, los aril xilosidos son mejores sustratos para la transferencia glicosil que para la hidrólisis. (8)

Un punto importante; ha de ser que se postule un mecanismo posible de reacción de la degradación de fenil beta xilosido por la beta xilanasa, es decidir si los productos intermediarios de ambas vías propuestas sirven como donadores xilosil para el fenil beta xilosido o receptores de los residuos xilosil que se originan de la molécula del sustrato. La evidencia obvia de los antes mencionado en un trabajo que realizó Biely (7) es suficiente solo para excluir la posibilidad de que los intermediarios sirven exclusivamente como aceptores glicosil, y sugiere fuertemente que funcionan principalmente como donadores glicosil debido a que son lo suficientemente grandes para ser hidrolizados por la beta xilanasa.

La cinética de la reacción de la beta-xilanasa con fenil beta-xilosido es análoga a lo que se ha observado durante la degradación de p-nitrofenil 2 acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopiranosido en presencia de oligosacáridos de quitina por la lisosima o para la degradación de fenil alfa-D-glucopiranosido en presencia de maltosa por alfa amilasa de Bacillus subtilis. Una característica común de todas estas reacciones es que se efectúan bien a concentración extremadamente alta de los sustratos. En contraste a la reacción de la beta-xilanasa; ya mencionada con anterioridad la degradación de los aril-glicosidos ocurre sin la adición de los oligosacáridos donadores -- glicosil. La fase logaritmica pudo ser eliminada agregando una pequeña cantidad de maltotriosa a la mezcla de -- reacción; y no se registro, la reducción adicional de la velocidad de la reacción, como la que se observó durante la degradación de los fenil-beta-xilosido por la beta-xilanasa en presencia de oligosacáridos agregados, Fujimori y colaboradores fueron capaces de interpretar las características principales de la degradación de maltosa por la alfa amilasa en términos del mecanismo de reacción. -- No consideraron los cambios conformacionales inducidos -- por el sustrato sobre la enzima que es la responsable de la fase logaritmica de la reacción y de la dependencia -- sigmoideal de la concentración. Estas dos características de la cinética enzimática son consistentes con el concepto de enzimas histeréticas que funcionan a diferentes --

conformaciones dependiendo de sus sustratos. La beta-xilanaasa de C. albidus puede ser dicha enzima, debido a que parece presentar diferente reactividad como una función del sustrato donador.

#### 5.5.- Sitio de enlace enzima-sustrato.

El sitio de enlace para el sustrato de endo-(1,4)-beta-D-xilanasasa de la levadura Cryptococcus albidus se investigó utilizando; (1,4)-beta-oligosacáridos (I-H<sup>3</sup>) - marcados en el extremo que reduce. La evaluación de afinidades de diez subsitios imaginarios por el método de Suganuma y colaboradores señalo que el sitio de enlace-sustrato de la enzima está compuesto por cuatro subsitios y que los grupos catalíticos están localizados en el centro. Los subsitios imaginarios al lado izquierdo del sitio de enlace (lado "terminal no reductor") mostraron poca o ninguna afinidad para unir a los residuos xilosil. Para los subsitios del lado derecho del sitio de enlace (lado "terminal reductor") se obtuvieron valores negativos de afinidad, lo que significa que esta región de la enzima es desfavorable para atrapar a los residuos xilosil. Como consecuencia de la distribución asimétrica de los valores negativos de la afinidad alrededor del sitio de enlace, la enzima despliega una fuerte preferencia para atacar cerca del extremo reductor del sustrato. Considerando la longitud de (I-H<sup>3</sup>) xilooligosacáridos, la ---

(I-H<sup>3</sup>) xilobiosa fue el producto de reacción que prevaleció en la etapa temprana de la hidrólisis y la frecuencia de distribución de enlace desdoblado disminuyó a partir del segundo enlace glucosídico hacia el extremo no reductor. También fue importante evaluar la eficiencia de la xilosa, xilobiosa, metil beta-D-xilosido y fenil beta-D-xilosido por servir como aceptores glicosil en las reacciones transglicolíticas que se producen a elevadas concentraciones de xilotriosa.

El estudio del modo de acción de las polisacárido - hidrolasas utilizando los oligosacáridos correspondientes llevan el concepto de que la enzima ataca a una cadena - polisacárida que interactúa con el sustrato a través de varias unidades glicosil al mismo tiempo y que la interacción de una parte dada de la enzima con una sola unidad glicosil es más o menos independiente del resto de - la molécula del sustrato. El sitio de enlace de una enzima es por esto considerada como una serie de subsitios, cada uno de los cuales es capaz de unirse con una unidad de carbohidrato. Los grupos catalíticos están localizados entre dos subsitios, y su localización y el número de subsitios es una característica del comportamiento de la - enzima. Para la determinación y localización de estos - subsitios catalíticos se han desarrollado dos métodos; - ambos están basados en el análisis del producto de los - oligosacáridos marcados terminalmente bajo condiciones -

de hidrólisis unimolecular con el conocimiento cinético del oligosacárido: aunque la endo-(1,4)-beta-xilanasasa de Cryptococcus albidus ha mostrado reaccionar con sustrato multimolecular además de la simple hidrólisis. (9)

El sitio de enlace sustrato de la beta-xilanasasa de la levadura parece estar compuesto de cuatro subsitios, los cuales solamente dos, subsitios -II y II muestran -- una fuerte afinidad para enlazar los residuos xilosil de los (1,4)-beta-xilooligosacáridos. El sitio de enlace de la enzima esta compuesto de cuatro subsitios con los gru pos catalíticos localizados a la mitad, y está de acuer con el hecho de que la xilotetraosa, a baja concentración, es desdoblada casi específicamente en el segundo enlace glicosídico. El concepto del sitio de enlace con cuatro subsitios de la enzima también cumple los valores de los parámetros  $V/K_m$  obtenidos para los oligosacáridos probados. Los parámetros no aumentan significativamente de lo que va de xilotetraosa a xilopentosa. La xilotetraosa pa rece ser el sustrato más pequeño que es rápidamente hi-- drólizado por la enzima.

Los calculos de las afinidades de subsitios imagina rios alrededor de los cuatro subsitios de enlace de la - beta-xilanasasa señalaron que estas regiones de la enzima, a pesar de que se unen al sustrato, juegan un papel muy importante en la interacción enzima-sustrato. Los subsitios

imaginarios a la izquierda del sitio de enlace mostraron poca o ninguna afinidad para enlazar a los residuos xilosil. Estos subsitios ni enlazan ni rechazan a los residuos xilosil, por lo tanto quizá no existan y corresponden al espacio exterior de la molécula de la proteína. - Para los subsitios del lado derecho del sitio de enlace, los valores negativos para la afinidad fueron obtenidos. Esta región de la enzima (subsitios III, IV y V) es desfavorable para la complejación con residuos xilosil. La barrera de energía en el lado derecho del subsitio II -- parece ser el factor principal que hace que la enzima -- ataque a los sustratos preferencialmente en el segundo -- enlace glicosídico del extremo reductor y explica por que las frecuencias de desdoblamiento de enlaces de oligosacáridos disminuye hacia el extremo no reductor. Sin embargo, no hay duda de que la enzima también es capaz de desdoblar enlaces internos de polimeros grandes. Esto se -- obtuvo a partir de las mediciones viscosimétricas y frecuencias de desdoblamiento de enlaces de oligosacáridos más grandes.

La observación de que los oligosacáridos más grandes que la xiloheptaosa eran los peores sustratos que la xilotetraosa nos da entender que los subsitios imaginarios -IV o V fueron también desfavorables para el enlace de -- los residuos xilosil.

La afinidad del subsitio II también se evaluó en base a la eficiencia de xilosa y xilobiosa para servir como aceptores glicosil en las reacciones transglicosilicas. Los valores obtenidos de esta manera y por el método del grupo de Hiromi difiere aproximadamente en 1 --- Kcal/mol. De acuerdo a Chipman y Sharon, está discrepancia no puede ser necesariamente un error experimental o método lógico debido a que el valor de afinidad también puede incluir cambios conformacionales en la enzima que son necesarios para el enlace. En cuanto a esto también hay que considerar que cada uno de los valores se obtuvo por diferentes grados de saturación de la enzima con xilotriosa.

Una comparación de las velocidades iniciales de utilización de aceptores de xilosa y metil beta-D-xilosido señala una contribución relativamente pobre del enlace glicosídico al enlace de aceptores en el subsitio II. - Aproximadamente las mismas velocidades de utilización de xilobiosa y fenil beta-D-xilosido sugirieron que el subsitio II es capaz de unir al aril aglicon casi tan fuertemente como el residuo extremo reductor de xilobiosa. - La comprensión total de estos resultados esta condicionado al conocimiento de la estructura del sitio activo de la beta-xilanasa. (9)

Todas las características de la degradación de oligo sacárido por la beta xilanasas son consistentes con el me canismo de reacción tipo lisosima.

Por lo tanto se puede concluir que la enzima está - compuesta por cuatro sitios -II,-I,I, II con grupos catalíticos localizados entre los subsitios -I y I. Siendo - los subsitios -II y II los que presentan alta afinidad - por las unidades xilosil. Los valores negativos de la su ma de afinidades de subsitios -I y I está de acuerdo con el hecho de que la xilobiosa es un sustrato pobre para - la enzima.

Bajo las condiciones de hidrólisis unimolecular, la xilotriosa forma dos complejos productivos con la beta - xilanasas, uno de los cuales predomina fuertemente. La -- xilotriosa ( $I-H^3$ ), a concentraciones iniciales bajas, es desdoblada casi exclusivamente para dar xilosa marcada; con el aumento de la concentración de xilotriosa, sin em bargo, la proporción de  $H^3-(xil)_2/H^3-xil$  aumenta debido a la participación de mecanismos de reacción bimolecular. De acuerdo a los análisis desarrollados para una alfa-- amilasa por Robyt y French, pueden considerarse tres me canismos bimoleculares para la degradación de la xilotrio sa que son:

- a).- Un complejo termomolecular: una segunda molécula de xilotriosa "empuja" a la primera a una posición que promueve la hidrólisis del segundo enlace glicosídico. (13)
- b).- Transglicosilación.- transferencia de un grupo glicosil de una molécula del sustrato a otra molécula de sustrato; en el caso de la xilotriosa uno puede considerar la transferencia xilosil o xilobiosil -- para dar xilotetraosa y xilopentaosa, respectivamente, debido a que son mejores sustratos para beta xilanasas que la xilotriosa, y son rápidamente digeridos por una hidrólisis unimolecular. (10)
- c).- Condensación.- un proceso de apareamiento de dos moléculas de xilotriosa para dar xilopentaosa (reversión de la hidrólisis) que es un mejor sustrato para la beta xilanasas que la xilotriosa, la xilopentaosa sufriría una hidrólisis unimolecular rápida.

Conociendo los valores de las frecuencias de desdoblamiento de enlaces de oligosacáridos elevados bajo condiciones de hidrólisis unimolecular, uno puede predecir los intervalos para los valores de  $H^3-(xil)_2/H^3-xil$  y - promedios molares  $(xil)_2/xil$  para los mecanismos de reacción bimoleculares (10). Para distinguir a los mecanismos que dan el mismo promedio de productos, la distribución de la marca en la xilobiosa formada de xilotriosa ( $I-H^3$ ) debería utilizarse como otro criterio.

Al comparar los valores experimentales de  $H^3-(xil)_2/$   
 $H^3-xil$  y los promedios molares  $(xil)_2/xil$  obtenidos a va-  
rias concentraciones de xilotriosa con los valores predi-  
chos se puede concluir que: La hidrólisis unimolecular -  
se lleva a cabo a bajas concentraciones de xilotriosa.  
El cambio de dos a un enlace del sustrato seguido por la  
hidrólisis en el segundo enlace glicosídico participa a  
concentraciones aproximadas de 5mM. Con otro aumento pos-  
terior de la concentración de xilotriosa, ocurre el aumen-  
to del promedio molar  $(xil)_2/xil$  y de esta manera, soporta  
la evidencia para la ausencia de la redistribución de la  
marca en la xilobiosa tritiasa, y sirve como buena evi-  
dencia de que el cambio de dos a un enlace y la subsigui-  
ente transferencia glicosil es el mecanismo bimolecular  
predominante en la degradación de xilotriosa a concentra-  
ciones elevadas. Este mecanismo encontro apoyo en el he-  
cho de que la xilotetraosa encontrada entre los produc-  
tos de reacción a concentraciones elevadas de xilotriosa.  
La transferencia xilobiosil, no puede excluirse completa-  
mente pero ciertamente no contribuye significativamente  
con las proporciones de producto observadas (poca xilo-  
biosa marcada es formada inicialmente a concentraciones  
altas de xilotriosa). Una prueba para la redistribución  
de la marca en xilobiosa tritiasa dió resultados negati-  
vos, por lo tanto, podemos desechar a la condensación co-  
mo un mecanismo bimolecular de la degradación de xilo-  
triosa.

Bajo condiciones de hidrólisis unimolecular, la xilotetraosa forma un complejo productivo con la enzima en el que todos los sitios de enlace de la enzima están ocupados. Son formados dos complejos productivos a frecuencias bajas. En contraste con la xilotriosa, que muestra mayores variaciones en los promedios de productos que dependen de la concentración, los promedios de productos de xilotetraosa ( $I-H^3$ ) cambia solamente a concentraciones altas. El aumento del promedio de xilotriosa marcada estuvo acompañada por la formación de oligosacáridos más grandes que la xilotetraosa. Por lo tanto, el cambio de dos a un enlace de la xilotetraosa no es seguido por hidrólisis, sino que se une a una reacción de transferencia que lleva la formación de cantidades significativas de xilopentaosa.

La hidrólisis unimolecular de ( $I-H^3$ ) xilopentaosa - libero dos productos principales marcados que corresponden a la formación de dos complejos productivos. Un complejo predomina sobre el otro, quizá debido a la distribución asimétrica de afinidades entre los subsitios -II y II, y de fuerzas de repulsión alrededor del sitio de enlace de la enzima que tiene cuatro subsitios. Los cambios en la frecuencia de desdoblamiento de enlace de xilopentaosa con la concentración, similar a aquellos en el caso de xilotetraosa, indican un cambio del sustrato a la

derecha del sitio de enlace de la enzima. El cambio no parece ser seguido por hidrólisis sino por una transferencia de xilosil y xilobiosil, reflejado en la formación de oligosacáridos más largos que la xilopentaosa.

Las reacciones de transferencia estuvieron bien manifestadas por los resultados de análisis de productos marcados formados durante la degradación de oligosacáridos no marcados, en la presencia de xilobiosa marcada. Durante cierta incubación de xilotriosa por ejemplo, solamente fue xilotriosa el oligosacárido recién marcado en la mezcla, lo que puede ser realizado solo si es efectiva la transferencia xilosil. Este resultado al mismo tiempo, señala la existencia de un intermediario enzima-xilosil, el residuo xilosil se encuentra cerca del subsitio -I. Los subsitios I y II interactúan con el aceptor xilobiosa, y la reacción reversible lleva a la formación de la misma unión glicosídica que se había desdoblado antes. Esto es una anomalía a la interpretación de reacciones transglicosílicas de la lisosima. Todas estas observaciones no apoyan la posibilidad de formación de intermediarios enzima-glicosil del extremo reductor de xilooligosacáridos.

En conclusión el modo de acción de las beta-xilanasas de C. albidus, muestra fuerte similitudes con el modo de acción de la lisosima y alfa amilasa. El mecanismo de reacción sugerido para la degradación de xilotriosa por la beta xilanasas difiere ligeramente del modelo

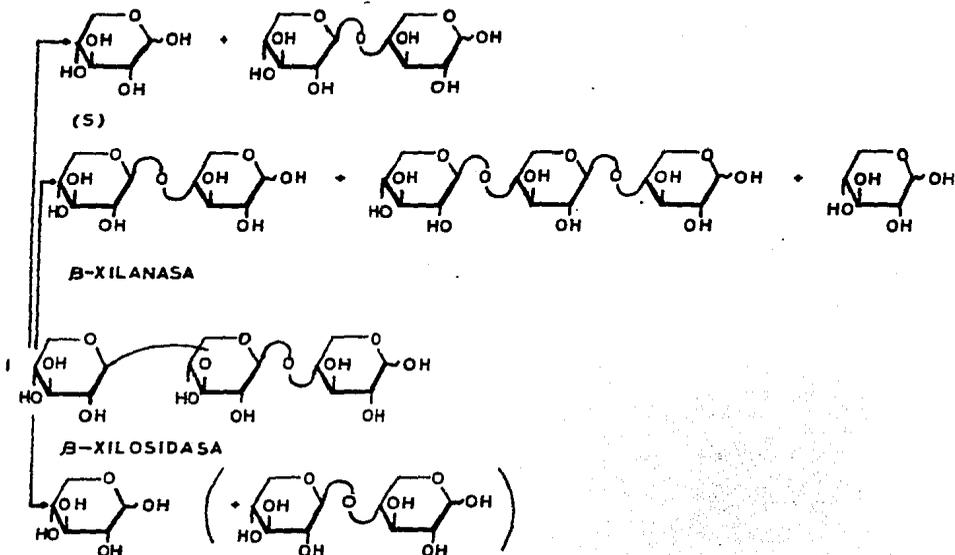
propuesto para la degradación de maltotriosa por la alfa amilasa.

#### 5.6.- Síntesis e Hidrólisis.

De los enlaces (1,3)-beta-xilosídicos por la endo--(1,4)-beta-xilanasa de Cryptococcus albidus, la endo-(1,4)-beta-xilanasa extracelular purificada de la levadura Cryptococcus albidus cataliza no solamente los enlaces - (1,4) sino también en una reacción de transglicosilación alternativa lleva a la formación de enlaces (1,3)-glicosídicos. Se aislaron por cromatografía preparatoria en papel a partir de una mezcla de productos de la degradación por beta xilanasa de fenil beta-D-xilopiranosido, - tres fracciones de oligosacáridos, que difieren cromatográficamente de los productos de enlace (1,4)-beta. Su - estructura se elucidó por espectrometría por resonancia magnética nuclear e hidrólisis enzimática por beta xilanasa y beta xilosidasa. La xilotriosa isomérica se identificó como 3-O-beta-D-xilopiranosil-4-O-beta-D-xilopiranosil-D-xilosa.

La estructura del isomero trisacárido se confirmó - por degradación enzimática. A una concentración de 20 mM, el trisacárido produjo (1,4)-beta-xilobiosa, (1,4)-beta-xilotriosa y trazas de xilosa. En este caso el mecanismo

de la degradación del sustrato involucre más transglucosilación que una simple hidrólisis.

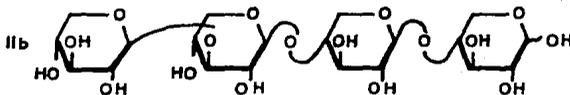
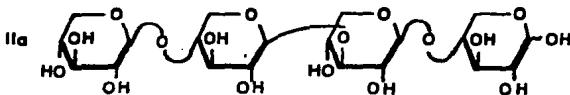


LA ESTRUCTURA DE TRISACARIDO ISOMERICO Y SU PRODUCTO DE DEGRADACION POR  $\beta$ -XILANASA Y  $\beta$ -XILOSIDASA.

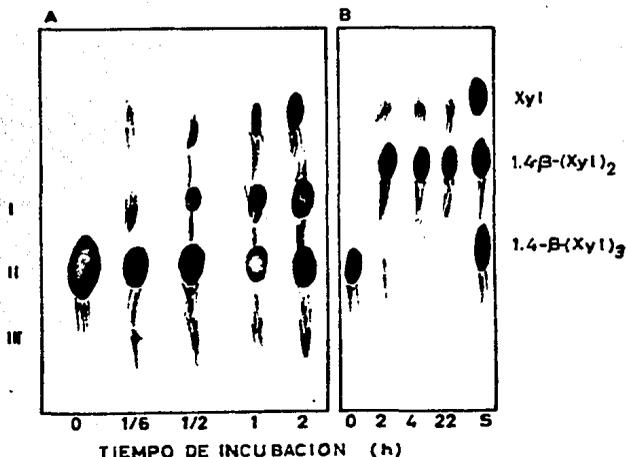
El trisacárido solo fue ligeramente degradado por la beta xilosidasa en comparación con el promedio de hidrólisis del enlace (1,4)-beta de los xilooligosacáridos. -

De los dos productos inicialmente esperados, la xilosa y (1,4)-beta-xilobiosa, se detecto solamente la xilosa en la mezcla por medio de la cromatografía en capa fina. La afinidad más alta de beta-xilosidasa para el enlace (1,4)-beta de los residuos xilosil que para el enlace (1,3)-beta de los residuos xilosil es la razón principal de porque (1,4)-beta-xilobiosa fue hidrólizada tan pronto como se formaba.

En otra fracción se encontró tetrasacáridos los cuales está representado principalmente por 4-O-beta-D-xilopiranosil-3-O-beta-D-xilopiranosil-4-O-beta-D-xilopiranosil-D-xilosa. Su estructura se trató de elucidar con el espectro  $C^{13}$  resonancia magnetica nuclear sugiriendo que el tetrasacárido tiene una xilosa sustituida en (1,3)-beta en el extremo reductor. Sin embargo, los datos de  $C^{13}$  resonancia magnetica nuclear no hacen posible distinguir entre otras posibles estructuras de tetrasacáridos.



Por lo tanto sus asignaciones no pueden hacerse sin la información adicional de la hidrólisis enzimática. El tratamiento de la fracción donde se encontraba este tetra sacárido por beta xilosidasa lleva a la formación de xilosa y un trisacárido isómero que tiene movilidad de - 3-O-beta-D-xilopiranosil-(1,4)-O-beta-D-xilopiranosil-D-xilosa, en aproximadamente el mismo promedio molar (fig.)



El promedio de desdoblamiento del residuo xilosil - terminal fue similar al de los xilooligosacáridos unidos por beta-(1,4). El trisacárido isómero fue el peor --

sustrato para otra digestión con beta-xilosidasa, lo que indica la presencia de un residuo xilosil unido por (1,3)-beta en su extremo no reductor. Este resultado sirvió como una fuerte evidencia de que la fracción de estos tetrasacáridos contiene el tetrasacárido II a como el constituyente predominante. La presencia del tetrasacárido - II b no se puede excluir, ya que en el caso del desdoblamiento del residuo xilosil (1,3)-beta, no se pudo encontrar la (1,4)-beta xilotriosa entre los productos de hidrólisis debido a las mismas razones que la (1,4)-beta-xilobiosa en la digestión por beta-xilosidasa del trisacárido anterior.

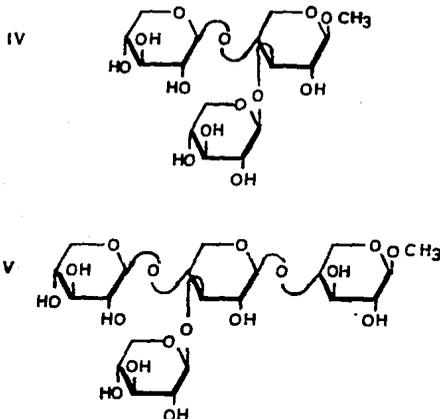
Los productos del tratamiento con la beta-xilanasas de C. albidus sobre la fracción de los tetrasacáridos - dependió de la concentración del sustrato. A una concentración de 0.5 mM, la (1,4)-beta-xilobiosa se liberó como el producto principal además de pequeñas cantidades de xilosa y (1,4)-beta-xilotriosa (figura). Estos resultados confirman nuevamente que la fracción de los tetrasacáridos está representada principalmente por oligosacárido IIIa mientras que el oligosacárido IIb es solo el -- componente menor. A una concentración de 20mM la fracción de los tetrasacáridos fue convertida por la beta xilanasas a varios productos: (1,4)-beta-xilobiosa, trisacárido isomérico I (1,4)-beta-xilotriosa, (1,4)-beta-xilotetraosa y un pentasacárido isomérico.

Otra fracción III, contiene pentasacáridos isoméricos en muy pequeña cantidad, por lo tanto, se sometió solamente, a degradación por beta-xilosidasa. La enzima liberó rápidamente xilosa, xilotetraosa isomérica y xilotriosa isomérica. Por esto esta fracción parece ser principalmente una mezcla de pentasacáridos isoméricos que contienen cada uno de ellos enlaces (1,3)-beta entre dos diferentes residuos xilosil internos. Los oligosacáridos isoméricos se hidrolizaron en el enlace (1,3)-beta, a pesar del hecho de que la enzima no ataca al (1,3)-beta-xilanas. Los resultados están interpretados en relación a los cuatro subsitios del sitio de enlace de la enzima -- con el sustrato.

El (1,3)-beta xilana de Caulerpa filiformis es prácticamente insoluble en agua. Cuando la enzima se aplicó en suspensión en agua, no se observó hidrólisis. Se obtuvo el mismo resultado cuando la enzima se incubó durante 10 días (en presencia de azida de sodio) con el primer polisacárido solubilizado en NaOH caliente (0.5M) y neutralizado subsiguientemente con ácido acético. Por lo tanto concluimos que la beta xilanas de Cryptococcus albidus es incapaz de atacar al (1,3)-beta-xilana lineal.

Sin embargo, la enzima es capaz de hidrólizar a la xilana que contiene ambos enlaces; (1,4)-beta y (1,3)-beta. Esto se demostró por la cromatografía de los productos de digestión de Rhodymenis por Cryptococcus albidus; aunque la estructura de estos productos no se ha establecido; se pudo ver en el cromatograma productos unidos por (1,4)-beta y por (1,3)-beta. (9)

Cuando la beta xilanasasa actúo sobre los (1,4)-beta-xilooligosacáridos que contienen ramificaciones xilosil unidas por enlaces (1,3)-beta (figura)

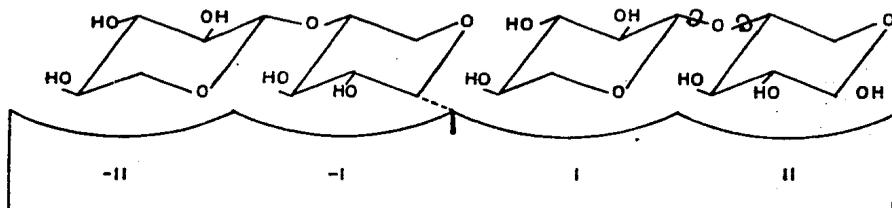


Se encontró que el compuesto IV era completamente resistente al ataque de la enzima. Sorpresivamente el compuesto V sirvió como sustrato. Sin tomar en cuenta su —

concentración fue hidrólizado lentamente en tetrasacárido libre y metal. Siendo la movilidad cromatografica del te trasacárido semejante a la de (1,4)-beta-xilotriosa.

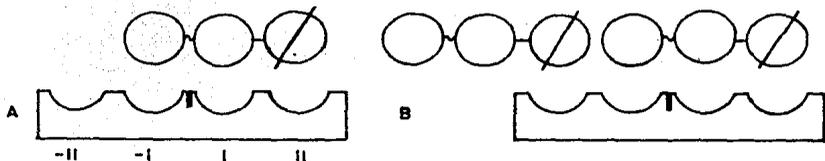
La capacidad demostrada de la endo-(1,4)-beta-xilanasas de Cryptococcus albidus para catalizar las reacciones transglicosílicas que llevan a la formación de enlaces (1,3)-beta. es otro hallazgo inesperado que señala - un nuevo aspecto de la especificidad de la enzima estudia da e indica que otras endo glicanasas pueden tener propiedades similares. En un experimento que se llevó a cabo - (11) se demostró claramente que los xilooligosacáridos - isoméricos contienen solo un enlace (1,3)-beta. Basandose en sus estructuras uno puede asumir que fueron formados principalmente por la transferencia (1,3)-beta de re siduos glicosil a (1,4)-beta-xilobiosa, Su formación puede enfocarse mejor en vista al signo de enlace del sustrato establecido para la beta xilanasas de Cryptococcus albidus. El dímero unido por (1,4)-beta que sirve como aceptor glicosil se puede encontrar firmemente a través de - su unidad reductora en el subsitio II. Un enlace débil - de su unidad no reductora en el subsitio I puede permitir una rotación limitada de la unidad alrededor del oxígeno glicosídico, de tal manera que el grupo hidroxilo del -- carbono 3 puede acercarse a los grupos de la enzima a los lugares donde se lleva a cabo la reacción de transferencia. El grupo hidroxilo del C-2 parece estar distante de

este locus y esto puede ser la razón principal de porque no ocurren las reacciones de transferencia (1,2)-beta. - (figura)



Representación esquemática de la posibilidad de transferencia de los residuos (1,3)-beta glicosil a (1,4)-beta xilobiosa.

Cuando se trataron con la enzima responsable de la síntesis los trisacáridos isoméricos se desdoblaron exclusivamente en el enlace (1,3)-beta. A elevadas concentraciones su enlace (1,3)-beta también se reorganiza a un (1,4)-beta, debido más frecuentemente a su transferencia (1,4)-beta. De esta manera en contraste a la (1,4)-beta xilotriosa, el trisacárido isomérico forma con la enzima un complejo tanto a bajas como a elevadas concentraciones (figura A y B).



A. COMPLEJO ENZIMA TRISACARIDO A BAJAS CONCENTRACIONES.  
B. COMPLEJO TERMOLECULAR DE  $\beta$ -XILANASA CON TRISACARIDO ISOMERICO A ALTAS CONCENTRACIONES.  
(O—O) ENLACES 1,4- $\beta$ -XILOSIL.  
(O~O) ENLACES 1,3- $\beta$ -XILOSIL.

El tetrasacárido isomérica IIa forma con la enzima dos complejos productivos. En el primero de ellos, formado a bajas concentraciones de sustrato, el sustrato es desdoblado exclusivamente en los enlaces (1,3)-beta de la parte media. La formación de trisacárido isomérico y pentasacárido isomérico a elevadas concentraciones de sustrato señala la formación de un complejo enzima-sustrato en el que la hidrólisis del enlace (1,4)-beta terminal en una extensión considerable seguida también por transglucosilación.

En base a la hidrólisis establecida de xilooligosacáridos isoméricos uno puede concluir que la xilanasasa de Cryptococcus albidus tolera la distorsión en la regularidad de los sustratos lineales unidos por (1,4)-beta. Debido a la inserción de un enlace (1,3)-beta, tanto en el sitio de los grupos catalíticos como en el sitio aceptor

(subsitios I y II), mientras que los subsitios II y I -- parecen ser específicos para el residuo (1,4)-beta-xilobiosil. La enzima puede acomodar, sin embargo, un residuo xilosil que lleva una ramificación (1,3)-beta-xilosil al subsitio II.

#### 5.7.- Otras endo (1,4)-Beta-D-xilanasas.

El interés de realizar una investigación similar con una beta-D-xilanasas diferente del hongo Cryptococcus albidus para proporcionarnos datos que permitirían obtener una idea más general del mecanismo de acción de las Beta-D-xilanasas indujo el estudio en endo-(1,4)-B-D-xilanasas de Aspergillus niger principalmente.

Una endo-(1,4)-beta-D-xilanasas acídica (1,4-beta-xilana-xilanolidrolasa, EC 3.2.1.8) de Aspergillus niger - cataliza la degradación de (1,4)-beta-xilooligosacáridos lineales por múltiples vías de reacción análogas a las - catalizadas por lisosima y alfa-amilasas.

El análisis cuantitativo del producto de las mezclas de sustratos de la enzima utilizando xilooligosacáridos marcados en el extremo reductor con I-H<sup>3</sup> y C<sup>14</sup>-xilotriosa nos llevó a las siguientes conclusiones:

I.- Las frecuencias de desdoblamiento de los enlaces de

xilotriosa, xilotetraosa y xilopentaosa son fuertemente dependientes de la concentración de los sustratos.

- 2.- A una concentración relativamente baja de los oligosacáridos la enzima cataliza las reacciones transglicosílicas produciendo productos más grandes que los sustratos.
- 3.- La xilobiosa y en menor cantidad la xilosa son utilizadas como aceptores glicosílicos en las reacciones de transferencia.
- 4.- Los intermediarios glicosil de la enzima efectivos en las reacciones de transferencia se forman solamente de la parte no reductora de los oligosacáridos, - debido a que no se obtuvo evidencia por condensación de dos moléculas de oligosacáridos.
- 5.- La enzima no cataliza la degradación de xilobiosa y aril xilosidos en una velocidad apreciable.
- 6.- El sitio de enlace de beta-D-xilanasa de Aspergillus niger está compuesto por siete subsitios.

U S O S

Los métodos modernos de fraccionamiento utilizados hoy en día para aislar enzimas específicas, hacen posible usar tales enzimas en el aislamiento e investigación estructural de polisacáridos de plantas. Las xilanas son los polisacáridos hemicelulósicos principales que ocurren en materiales de desecho lignocelulósicos como paja de las gramíneas, bagazo, cáscaras, residuo de explotación forestal, semillas de girasol y residuos de aserrín, ver otros página 78.

Las xilanasas son enzimas capaces de desdoblar este tipo de enlaces (1,4)-B-D-xilanopiranosil. Las xilanasas asociadas con la acción sinérgica de otras enzimas -- principalmente celulasas; son las enzimas responsables para la biodegradación de materiales lignocelulósicos. - El uso de xilanasas homogéneas son herramientas altamente específicas para elucidar la estructura de las xilanas, así como en la organización de las paredes celulares intactas de la planta.

Las xilanasas en el Japón son de gran valor práctico en la industria ya que son utilizadas para obtener xi l o s a partir de las xilanas (productos de la agricultura; bagazo de arroz, semillas de girasol residuos de ase rr ín, residuos de la explotación forestal; etc.) y de --

aquí xilitol; por hidrólisis enzimática.

Las xilanasas últimamente son de interés considerable por los nutriólogos, bioquímicos en alimentos y médicos. Estudios nutricionales han mostrado que mucha de la hemicelulosa ingerida no es recuperada de las heces, presumiblemente debido a la fermentación de estas sustancias por bacterias que colonizan el colón humano. La investigación de los Bacteroides ovatus, Bacteroides eggerthii y Bacteroides fragilis; especies de bacterias que habitan el colón humano y que además utilizan a la xilana como única fuente de carbohidrato, han dado razón para que las xilanasas, enzimas producidas por estas especies de bacteroides sea motivo de estudio en la salud humana. (47)

El conocimiento de las propiedades catalíticas de las xilanasas son también de gran importancia en el almacenamiento de las maderas. En años recientes ha habido un marcado interés en la producción de proteínas, de levaduras en sustratos sacáridos presentes en los desechos industriales de la madera, la producción de la biomasa está basada en la capacidad de las levaduras para utilizar oligosacáridos liberados de la madera durante la producción de celulosa, papel y fibras de celulosa. La conversión de polisacáridos de las plantas a proteínas es realizada mejor con cepas de levaduras capaces de la utilización directa de polisacáridos sin sacarificación ---

previa. Por esta razón centramos nuestra atención en la ocurrencia de actividades enzimáticas que degradan xilana y hemicelulosa.

CONCLUSIONES

Las xilanasas son enzimas hidrolíticas (1,3)-B-D-xilanxilanohidrolasas capaces de hidrolizar (1,3)-B-D-xilanos, EC 3.2.1.72, o D-xilosa y D-xilooligosacáridos; -endo-(1,3)-B-D-xilanasas, EC 3.2.1.32, y/o (1,4)-B-D-xilopiranosil de las (1,4)-B-D-xilanas que pueden ser ----(1,4)-B-D-xilanxilanohidrolasas. 3.2.1.8. endo xilanasas y 3.2.1.37 a las (1,4)-B-D-xilanxilanohidrolasas, exo xilanasas.

Estas xilanasas se han encontrado en bacterias de ambiente marino y terrestre, en hongos sáprofitos, fitopatógenos y micorriza, bacterias del rumen, protozoarios, insectos, caracoles, crustáceos, algas marinas y semillas germinadas. De entre la de origen microbiano han sido más estudiadas las producidas por las cepas de: Bacillus subtilis, Streptomyces xilopagus, Streptomyces sp., Aspergillus niger, Aspergillus niger van Tieghem, Ceratocystis paradoxa y Cryptococcus albidus.

Los sustratos más comunmente usados: arabinoxilana, arabinoglucuronixilana, glucuronoxilana y xilanas. Las técnicas de separación y purificación de estas enzimas son: Cromatografía de intercambio iónico, Cromatografía por permeabilidad en gel, enfoque isoeléctrico, zona de

electroforesis, afinidad por los enlaces de D-xilana y -  
Cristalización. Sus propiedades fisicoquímicas estudiadas  
son: pH, pI, temperatura óptima, temperatura estable, pe-  
sos moleculares, Km e inhibidores. De estas enzimas; Las  
xilanasas podemos decir presentan actividad en un rango  
muy amplio de pH, de 3 a 10; tienden a ser termoestables  
a temperaturas bastante altas como la xilanasas de Cerato-  
cystis paradoxa; sus pesos moleculares fluctúan entre los  
16,000 a 38,000, determinados por diferentes métodos y -  
son inhibidas por reactivos sulfihidrilo, metales iónicos  
como  $Hg^2$ ,  $Ag^+$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ; glicerol, (1,2)-etanodiol, va-  
rios azúcares y Iodo. Su composición en aminoácidos ya -  
fue determinada y comparada con su peso molecular. El mo-  
do de acción de las beta xilanasas muestra fuerte simili-  
tudes al modo de acción de la lisosima y las alfa amilasa-  
sas; siendo del tipo de las endo enzimas, son enzimas --  
constitutivas e inducidas y tienen un gran uso en la bio-  
conversión industrial de los productos agrícolas y en la  
química orgánica.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- ABIGAIL, A.SALYERS., J.R. BALASCIO & J.K. PALMER  
Breakdown of xylan by enzymes from human colonic bacteria  
Journal of Food Biochemistry 6 (1982), 39-55.
- 2.- AHLGREN, E., ERIKSON, K.E.&VASTER BERG, O. (1967)  
Characterization of cellulases and related enzymes by Iso  
electric Focusing, Gel Filtration and zone Electrophore--  
sis I. .  
Acta Chemica Scandinavica 21 (1967) 937-944 .
- 3.- AHLGREN, E. & ERIKSSON, K.E (1967)  
Characterization of cellulases and related enzymes by Iso  
electric Focusing, Gel Filtration and zone Electrophore--  
sis II.  
Acta Chemica Scandinavica 21 (1967) 1193-1200.
- 4.- BAKER, C.J., WHALEN, C.H.& BATEMAN, D.F. (1977)  
Xylanase from Trichoderma pseudokoningii purification. --  
Characterization and effects on isolated plant cell walls  
Phytopathology 67, 1250-1258.
- 5.- BIELY, P., KRATKY, Z., KOCKOVA-KRATOCHVILOVA, A. & BAUER, S. (1978)  
Xylan-Degrading Activity in yeast: growth on xyloza, xy--  
lan and hemicelluloses  
Folia Microbiol 23; 366-371(1978).
- 6.- BIELY, P., VRSANSKA, M. & KRATKY, Z. (1980)  
Xylan-Degrading Enzymes of the yeast Cryptococcus albidus  
Eur.J.Biochem. 108, 313-321.

- 7.- BIELY, P., VRSANSKA, M. & KRATKY, Z. (1980)  
Induction and Inducers of Endo-1,4-B-Xylanase in the yeast Cryptococcus albidus.  
Eur.J.Biochem. 108, 323-329.
- 8.- BIELY, P., VRSANSKA, M. & KRATKY, Z. (1980)  
Complex Reaction Pathway of Aryl-B-Xyloside Degradation by B-Xylanase of Cryptococcus albidus.  
Eur.J.Biochem; 112, 375-381.
- 10.- BIELY, P., VRSANSKA, M. & KRATKY, Z. (1981)  
Mechanisms of Substrate Digestion by Endo-1,4-B-Xylanase of Cryptococcus albidus.  
Eur.J.Biochem 119, 565-571.
- 9.- BIELY, P., KRATKY, Z. & VRSANSKA, M (1981)  
Substrate-Binding site of Endo-1,4-B-Xylanase of the yeast Cryptococcus albidus.  
Eur.J.Biochem 119, 559-564.
- 11.- BIELY, P., & VRSANSKA, M (1983)  
Synthesis and Hidrolysis of 1,3-B-Xylosides linkages by - Endo-1,4-B-Xylanase of Cryptococcus albidus.  
Eur.J.Biochem 129, 645-671.
- 12.- BIELY, P., VRSANSKA, M (1983)  
Xylosyl transfer-to-cellobiose catalysed by an Endo-(1,4)-B-D-Xylanase of Cryptococcus albidus.  
Carbohydrate Research 123, 97-107.
- 13.- BISHOP, C.T.  
Structure of trisaccharide from wheat straw xylan  
Journal Amer.Chem.Soc. 78:2840 (1956).

- 14.- COMTAT, J., JOSELEAU, J.P (1981)  
Mode of action a xylanase and its significance for the -  
structural investigation of the branched L-arabino-glucurono-D-xylan from red wood (*Sequoia sempervirens*)  
Carbohydrate Research, 95; 101-112.
- 15.- DEKKER, R.F.H & RICHARDS, G.N.(1975)  
Purification, properties and mode of action of hemicellulose II, produced by Ceratocystis paradoxa.  
Carbohydrate Research 42, 107-123.
- 16.- DEKKER, R.F.K.& RICHARDS, G.N.(1975)  
Purification, properties and mode of action of hemicellulose I produced by Ceratocystis paradoxa.  
Carbohydrate Research 39, 97-114.
- 17.- DEKKER, R.F.& RICHARDS, G.N. (1975)  
Structures of the oligosaccharides from the enzymic hydrolysis of hemicellulose by a hemicellulose of Ceratocystis paradoxa.  
Carbohydrate Research 43; 335-344.
- 18.- DEKKER, R.F.H.& RICHARDS, G.N.(1976)  
Hemicellulases  
Adv.Carbohydr.Chem.Biochem, 32;277-352.
- 19.- DEKKER, R.F.H. (1983)  
Bioconversion of hemicellulose:Aspctes of Hemicellulose.  
Production by Trichoderma reesei QM 9414 and Enzymic ---  
Saccharification of hemicellulose.  
Biotechnology and Bioengineering Vol. XXV;1127-1146.

- 20.- DENNIS, C (1972)  
Breakdown of cellulose by yeast species.  
J.Gen.Microbiol;71;409-411.
- 21.- ERIKSSON, K.E. & HAMP, S.G. (1978)  
Regulation of Endo-1,4-B-glucanase production in Sporo-  
trichum pulverulentum  
Eur.J.Biochem.90;183-190.
- 22.- ESTEBAN, R., J.R.VILLANUEVA. & T.G.VILLA (1982)  
B-D-Xylanase of Bacillus circulans WL-12  
Can.J.Microbiol 28: 733-739.
- 23.- FOGARTY, W.M. & GRIFFIN, P.J. (1973)  
A preliminary study on the production purification and -  
properties of a xylan-degrading enzyme from Bacillus sp.  
Isolated from water stored sitka spruce (*Picea sitchensis*)  
Biochem. Soc.Trans.Vol. I: 260-262.
- 24.- FREDERICK, M.M., FREDERICK, J.R., FRATZKE, A.R. & REILLY, P.J.  
(1981)  
Purification and Characterization of a xylobiose and xyl<sub>o</sub>  
se producing endo-xylanase from Aspergillus niger.  
Carbohydrate Research, 97: 87-103.
- 25.- GASCOIGNE, I.A. & GASCOIGNE, M.M (1960)  
La xylanase of Fusarium roseum  
J.Gen.Microbiol 22: 242-248.
- 26.- GORBACHEVA, I.V. & RODIONOVA, N.A (1977)  
Studies on xylan-degrading enzymes. I.-Purification and  
Characterization of endo-1,4-B-xylanase from Aspergillus  
niger str 14  
Biochem.Biophys. Acta, 434: 79-93.

- 27.- GORBACHEVA, I.V. & RODIONOVA, N.A. (1977)  
Studies on xylan-degrading enzymes. II. - Action pattern of endo-1,4-B-xylanase from Aspergillus niger str 14 on xylan and xylooligosaccharides.  
Biochimica. Biophysica. Acta, 484: 94-102.
- 28.- HASHIMOTO, S., MURAMATSU, T. & FUNATSU, M (1971)  
Studies on xylanase from Trichoderma viride  
Agric. Biol. Chem. 35:(4):501-508.
- 29.- HOEBLER, C. & BRILLOVET, J.M (1984)  
Purification and Properties of endo(1,4)-B-D-Xylanase from Irpex lacteus (Polyporus tulipiferae)  
Carbohydrate Research, 128:141-155.
- 30.- IIZUKA, H. & KAWAMINAMI, T. (1965)  
Studies on the xylanase from Steptomyces Part I  
Agric. Biol. Chem., 29(6): 520-524.
- 31.- IIZUKA, H. & KAWAMINAMI, T. (1969)  
Studies on xylanase from microorganism Part II  
Agric. Biol. Chem., 33(9):1257-1263.
- 32.- JOHN, M., SCHMIDT, B. & SCHMIDT, J (1979)  
Purification and some properties of five endo-1,4-B-D-xylanases and a B-D-xylosidase produced by a strain of ---  
Aspergillus niger.  
Can. J. Biochem, 57:125-134.
- 33.- KANDA, T., WAKABAYASHI, K. & NISIZAKA, K. (1976)  
Xylanase Activity of an cellulose of Carboxymethyl-cellulose type from Irpex lacteus (Polyporus tulipiferae)  
J. Biochem, 79: 989-995.

- 34.- KAWAMINAMI, T., & IIZUKA, H. (1969)  
Studies on xylanase from microorganism Part III  
Agric. Biol. Chem., 38(12):1787-1789.
- 35.- KENNETH, C. B., WILKIE, & SWEE-LENG WOO. (1977)  
A Heteroxylan and Hemicellulosic materials from Bamboo -  
leaves, and a reconsideration of the general nature of -  
commonly occurring xylans and other hemicelluloses.  
Carbohydrate Research, 57:145-162.
- 36.- KESTERS-HILDERSON, H., LOONTIENS, F. G., CLAESSENS, M. & DE --  
BRAYNE C. K. (1969)  
Partial purification and properties of an B-D-xylosidase  
induced of Bacillus pumilus 12.  
Eur. J. Biochem 7: 434-441.
- 37.- KING, N. J. & FULLER, D. B. (1968)  
THE Xylanase System of Coniophora cerebella  
Biochem. J., 108:571-576.
- 38.- KITPRECHAVANICH, V., HAYASHI, M. & NAGAI, S. (1984)  
Production of xylan-degrading enzymes by thermophilic --  
fungi, Aspergillus fumigatus and Hemicola lanuginosa.  
J. Fermente. Technol. 62(1):63-69.
- 39.- KOVAC, P. (1979)  
Synthesis of methyl 3,4-di-O-(B-D-xylopyranosyl)-B-D-xy-  
lopyranoside a methyl-B-xylotrioside related to branched  
xylans.  
Collection Czechoslov. Chem. Commun. 44:928-932.

- 40.- KOVAC,P., HIRSCH,J.&KOVACIK,V.(1979)  
The stepwise synthesis of methyl-B-xylotetraoside related to branched xylans.  
Carbohydrate Research 75:109-116.
- 41.- KOVAC,P.& HIRSCH,J. (1980)  
Stepwise synthesis of methyl 4-O-(3-O-(B-D-xylopyranosyl)-B-D-xylopyranosyl)-B-D-xylopyranoside.  
Carbohydrate Research, 79:303-307.
- 42.- KOVAC,P.,HIRSCH,J.,SHASHKOV,A.S.,USOV,A.I.&YAROTSKY,S.V (1980)  
C-NMR Spectra of xylo-oligosaccharides and their application to the elucidation of xylan structures.  
Carbohydrate Research 85:177-185.
- 43.- KOVAC,P.(1980)  
Synthesis of a series of positionally isomeric methyl-O (alfa and B-D-xylopiranosyl)-B-D-xylopyranosides  
Collection.Czechoslov.Chem.Comm. 45:892-900.
- 44.- KOVACIK,V.,MIHALOV,V & KOVAC,P. (1981)  
Structural analysis by mass spectrometry of oligosaccharides related to xylans.  
Carbohydrate Research, 88:189-201.
- 45.- KOTOYOSHY NAKANISHI.&TSUNEO YASUI (1980)  
Production of xylanase by Streptomyces sp., using non-metabolizable inducer.  
Agric.Biol.Chem, 44(II):2729-2730.

- 46.- KOTOYOSHI NAKANISHI.&.TSUNEO YASUI. (1980)  
Uptake of B-Xyloside by Streptomyces sp. during induction  
of xylanase.  
J.Fermente.Technol, 58(2):171-174.
- 47.- KOTOYOSHI NAKANISHI & TSUNEO YASUI (1980)  
Kinetic Studies on xylanase Induction by -B-xyloside in  
Streptomyces sp.  
Agric.Biol.Chem.44(8):1885-1889.
- 48.- KRATKY, Z.&.BIELY, P (1980)  
Inducible B-Xyloside Permease as a constituent of the --  
Xylan-Degrading Enzyme. System of the yeast Cryptococcus  
albidus.  
Eur.J.Biochem 112:367-373.
- 49.- KRARKY, Z., BIELY, P & VRSANSKA, M (1981)  
A method for preparing lower (U<sup>14</sup>C)-labelled (1,4)-B-D--  
xylo-oligosaccharides.  
Carbohydrate Research, 93:300-303.
- 50.- KUBACKOVA, M., KARACSONGI, S.&.VARADI, J. (1975)  
Studies on xylanase from Basidiomycetes  
Folia Microbiol, 20:29-37.
- 51.- KUBACKOVA, M., KARACSONYI, S.&.TOMAN, R. (1976)  
Purification of xylanase from the wood-rotting fungus --  
Trametes hirsuta.  
Folia Microbiol, 21:28-35.
- 52.- KUBACKOVA, M., KARACSONYI, S.&.TOMAN, R (1978)  
Some properties of an Endo-1,4-B-D-Xylanase from the lig  
niperdous Fungus Trametes hirsuta.  
Folia Microbiol, 23:202-209.

- 53.- KUSAKABE, I., YASUI, T. & KOBAYASHI, T. (1975)  
A new method for preparation of xylobiose, eliminating -  
xylose from enzymatic xylan hydrolyzate by yeast.  
*Agric. Biol. Chem.* 39(7):1355-1362.
- 54.- KUSAKABE, I., OHGUSHI, S., TSUNEO YASUI. & KOBAYASHI (1983)  
Structures of the Arabinoxyl-oligosaccharides from the  
Hydrolytic Products of Corn cob Arabinoxylan by a Xylana-  
se from Streptomyces.  
*Agric. Biol. Chem.* 47(12):2713-2723.
- 55.- NOTARIO, V., VILLA, T.G. & VILLANUEVA. J.R. (1976)  
B-xylosidases in the yeast Cryptococcus albidus var. aerius  
*Can. J. Microbiol.* 22:312-315.
- 56.- NOTARIO, V., VILLA, T.G. & VILLANUEVA. J.R. (1979)  
Cell Wall-associated 1,4-B-Xylanase in Cryptococcus albi-  
us var. aerius: in situ Characterization of the activity.  
*Journal. General. Microbiology.* 114:415-422.
- 57.- ODZUCK, W & KAUSS, H. (1972)  
Biosynthesis of pure araban and xylan.  
*Phytochemistry*, II:2489-2494.
- 58.- PAICE, M.G., JURASEK, L., CARPENTER, M.R. & SMILLIE, L.B. (1978)  
Production, Characterization and Partial amino acid se--  
quence of xylanase a from Schizophyllum commune.  
*Applied and Environmental Microbiology*, 36(6):802-808.
- 59.- PANDA, T., BISARIA, V.S., & GHOSE, T.K. (1983)  
Studies on Mixed Fungal culture for cellulase and hemicel-  
lulase production Part I: optimization of medium for the  
mixed culture of Trichoderma reesei DL-6 and Aspergillus  
wentii pT 2804  
*Biotechnology Letters*, 5(II): 767-772.

- 60.- RICHARDS, G.N & SHAMBE, T. (1976)  
Production and purification of two hemicellulases from -  
Cenhalosporium cacchari.  
Carbohydrate Research, 49:371-381.
- 61.- RICKARD, P.A.D. & LAUGHLIN, T.A. (1980)  
Detection and assay of xylanolytic enzymes in a cellulomonas isolate.  
Biotechnology Letters 2(8):363-368.
- 62.- RODIONOVA, N.A., GORBACHEVA, I.V. & BUYVID, V.A. (1977)  
Fractionation and purification of endo 1,4-B-xylanases -  
and exo-1,4-B-xylosidases of Aspergillus niger.  
Biokhimija 42:659-671.
- 63.- SADANA, J.C., SHEWALE, J.G. & DESHPANDE, M.V. (1980)  
High Cellobiase and Xylanase production by Sclerotium --  
rolfsii UV<sup>8</sup> Mutant in submerged culture.  
Appl. Environ. Microbiol: 39:935-936.
- 64.- SALYERS, A.A., VERCELLOTTI, J.R.S.E.H. WEST & WILKINS, T.D.  
(1977)  
Fermentation of mucin and plant polysaccharides by strain  
of bacteroides from the human colon.  
Appl. Environ. Microbiol: (1977b):33(2):319-322.
- 65.- SCHMIDT, O & LIESE, W. (1930)  
Variability of wood degrading enzymes of Schizophyllum -  
commune.  
Holzforschung 34:67-72.

- 66.- SREENATH, H.K., JOSEPH, R & MURTHY, V.S. (1978)  
Studies on xylan hydrolases from different strains of -  
Streptomyces and their mutual influences in the break--  
down of xylan Folia Microbiol 23:299-303.
- 67.- STEVENS, B.J.H & PAYNE, J. (1977)  
Cellulase and xylanase production by yeast of the genus  
Trichosporon.  
J.Gen microbiol:100:331-393.
- 68.- STROBEL, G.A. (1963)  
A Xylanase System produced by Diplodia viticola  
Phytopathology:53:592-596.
- 69.- STURGEON, R.J. (1973)  
Determination of the degree of polymerisation of xylans.  
Carbohydrate Research:30:175-178.
- 70.- TAKAHASHI, M. SHIMOMURA, T. & CHIBA, S (1969)  
Biochemical Studies on buckwheat alfa-glucosidase Part III  
Agric.Biol.Chem. 33:1399-1410.
- 71.- TAKENISHI, S. & TSUJISAKA YOSHIO (1973)  
Structures of the oligosaccharides from the enzymic hy--  
drolysate of Rice-straw. Arabinoxylan by a Xylanase of -  
Aspergillus niger.  
Agric. Biol. Chem: 37(6):1335-1391.
- 72.- TAKENISHI, S & TSUJISAKA, Y. (1975)  
On the modes of action of three xylanases produced by a  
strain of Aspergillus niger van Tieghem.  
Agric. Biol. Chem 39(12):2315-2323.

- 73.- VAN, ETTEN, H.D. & BATEMAN, D.F. (1969)  
Enzymatic Degradation of galactan, galactomannan and -  
xylan by Sclerotin rolfsii.  
Phytopathology: 59:1969:968-972.
- 74.- VRSANSKA, M., ILONAV., GORBACHEVA., KRATKY & BIELY, P. (1982)  
Reaction Pathways of substrate degradation by an acidic  
endo-1,4-B-xylanase of Aspergillus niger  
Biochimica et Biophysica Acta: 704:114-122.
- 75.- WHISTLER, R.L & EDWARD MASAK, JR (1955)  
Enzymatic Hydrolysis of Xylan  
Journal Amer.Chem.Soc. 77:1241-1243.