



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

"OBTENCION FERMENTATIVA DE XILANASAS
EXTRACELULARES DE *Streptomyces* sp CH-M-103E
A PARTIR DE BAGACILLO DE CAÑA, XILANOS Y
OTROS SACARIDOS PURIFICADOS"

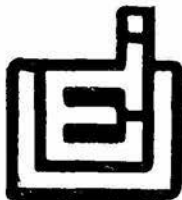
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

CLAUDIA MARCELA ZULETA VARGAS





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

DEDICATORIAS

A mi madre Elba Vargas y mi hermano Rafael por el apoyo, cariño y comprensión que me han brindado. Son un gran ejemplo a seguir y estoy orgullosa de ustedes.

A mi padre Rafael Zuleta por todo su amor y apoyo.

Gracias.

Agradecimientos

Al Dr. Carlos Huitrón Vargas.

A todos mis compañeros del laboratorio y de la planta piloto.

A Rosalba Pérez y Olivia Rodríguez por la amistad compartida.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Propiedades e importancia de las enzimas	1
1.2. Características químicas de los xilanos y su distribución en la naturaleza	4
1.3. Caracterización e importancia de las xilanasas	9
1.4. Fuentes microbianas de xilanasas	14
1.5. Características de las xilanasas de <i>Streptomyces</i>	18
1.6. Objetivos	25
2. Materiales y Métodos	26
2.1. Microorganismo	26
2.2. Medios de cultivo para la propagación de la cepa y obtención de esporas	26
2.2.1. Medio mínimo con xilanos	26
2.2.2. Medio completo	26
2.2.3. Medio Papa dextrosa agar	27
2.2.4. Medio para la conservación de esporas	27
2.2.5. Medio salino mínimo para la producción de xilanasas	27
2.2.6. Sustratos	27
2.3. Producción de xilanasas extracelulares	28
2.3.1. Preparación del inóculo	28
2.3.2. Condiciones de cultivo para la obtención fermentativa de xilanasas	28
2.3.3. Obtención del filtrado libre de células	29
2.4. Cuantificación de la actividad xilanolítica extracelular	27
2.4.1. Método del azul brillante de Remazol-xilanos para la determinación de la actividad endoxilanolítica extracelular	29
2.4.2. Método del DNS	30
2.5. Cuantificación de la actividad celulolítica sobre papel filtro	30

3.	Resultados y Discusión	32
3.1.	Obtención de esporas para el inóculo	32
3.2.	Selección del método para la cuantificación de la actividad xilanolítica extracelular de los filtrados libres de células de <i>Streptomyces sp CH-M-1035</i> .	34
3.3.	Obtención fermentativa de xilanasas extracelulares de <i>Streptomyces sp CH-M-1035</i> a partir de bagacillo de caña, xilanos y otros sustratos purificados.	37
3.3.1.	Producción de xilanasas utilizando como sustrato xilanos purificados.	37
3.3.2.	Efecto de los desechos agroindustriales bagacillo de caña y cáscara de limón en la producción de xilanasas extracelulares de <i>Streptomyces sp CH-M-1035</i> .	40
3.3.3.	Comparación de la producción de xilanasas de <i>Streptomyces sp CH-M-1035</i> utilizando bagacillo de caña y xilanos purificados.	44
3.3.4.	Efecto de la adición de glucosa y xilosa en la producción de xilanasas extracelulares por <i>Streptomyces sp CH-M-1035</i> crecido en bagacillo de caña de azúcar.	47
3.3.5.	Efecto de modificaciones en el medio salino utilizado para la producción de xilanasas extracelulares de <i>Streptomyces sp CH-M-1035</i> .	53
3.3.7.	Producción de xilanasas extracelulares utilizando como fuente de carbono diferentes tipos de celulosas.	58
3.3.8.	Detección de actividad celulolítica extracelular en filtrados libres de células de <i>Streptomyces sp CH-M-1035</i> .	62
4	Conclusiones	65
5	Bibliografía	67

RESUMEN

El *Streptomyces sp CH-M-1035* es un actinomiceto aislado del suelo de una zona cañera del estado de Morelos. Esta cepa es productora de xilanasas extracelulares con requerimientos mínimos en el medio de cultivo para su crecimiento y capaz de utilizar bagacillo de caña como única fuente de carbono. El bagacillo de caña de azúcar es un desecho agroindustrial barato, renovable y subutilizado, obtenido durante el proceso de extracción del azúcar del azúcar en los ingenios azucareros de México. Después de la extracción de sacarosa de la caña de azúcar queda en el bagacillo de caña de un 30 a un 35% de hemicelulosas que a su vez contienen de un 60 a un 80 % de xilanos.

El presente trabajo tuvo como objetivo principal la producción de xilanasas extracelulares de *Streptomyces sp CH-M-1035* a partir de bagacillo de caña de azúcar. También se llevó a cabo la comparación de la producción de enzimas xilanolíticas del microorganismo utilizando otros sustratos como fuente de carbono, el efecto de modificaciones en el medio salino en la producción de xilanasas y la evaluación de producción de celulasas bajo las condiciones de producción de enzimas xilanolíticas.

El *Streptomyces sp CH-M-1035* produce xilanasas extracelulares utilizando bagacillo de caña como única fuente de carbono. Los xilanos purificados inducen la síntesis de xilanasas pero la producción es menor que al utilizar bagacillo de caña; con la cáscara de limón, xilosa y carboximetilcelulosa marca Sigma hay poca producción de xilanasas extracelulares mientras que con glucosa, celulosa microcristalina y carboximetilcelulosa Whatman no hay producción de xilanasas.

La adición de xilosa al medio con bagacillo de caña provoca disminución en la producción de xilanasas mientras que la adición de glucosa reprime catabólicamente la síntesis de las enzimas xilanolíticas.

Con la modificación en la composición del medio salino así como la adición de extracto de malta y extracto de levadura disminuyó la producción de xilanasas extracelulares.

No se detectó actividad celulolítica sobre papel filtro en los filtrados obtenidos bajo condiciones de producción de xilanasas utilizando como fuente de carbono bagacillo de caña, xilanos y celulosa microcristalina

1.0 INTRODUCCION

1.1 Propiedades e importancia de las enzimas

Las enzimas son elementos claves para la vida. Son macromoléculas proteicas de muy alta especificidad que no afectan el equilibrio químico y aceleran la velocidad de las reacciones que ocurren en los sistemas vivos. Las enzimas son proteínas producidas por las células y son altamente eficientes como catalizadores a valores de pH cercanos a la neutralidad y a temperatura ambiente. Su participación es vital en todas las diferentes rutas metabólicas involucradas en la degradación, asimilación y síntesis de biomoléculas así como en la producción de energía y en todos los procesos de la reproducción de los organismos. Todas estas funciones son necesarias para el desarrollo y conservación de los organismos los cuales, sin la participación de las enzimas, morirían en espera de la degradación espontánea y transporte por difusión de los nutrimentos que necesitan (Scriban, 1985).

En todas las enzimas existe una región definida denominada sitio activo y en esta región están contenidos los grupos reactivos que van a ser responsables de la actividad catalítica propia de la enzima. Las enzimas pueden funcionar en el citosol de la célula misma, asociadas a membrana o bien, ser excretadas para llevar a cabo su función catalítica en el medio que rodea a la célula. La regulación de la expresión enzimática es una respuesta directa a los cambios que ocurren en el medio en el cual se encuentran las células. Esta regulación se da a nivel molecular por mecanismos de inducción y represión y a nivel postraducciona por inhibición de la enzima debido a la acumulación de producto final.

Sin saberlo, durante muchos años el hombre ha utilizado a las enzimas en una gran cantidad de procesos para la elaboración y fermentación de alimentos y bebidas. Cuando por fin se estableció que las enzimas eran las responsables de estas catálisis y quedaron demostradas sus características biológicas ya mencionadas, se vislumbró el enorme potencial de uso de su aplicación en diferentes actividades económicas. Por estas razones se desarrollaron técnicas en microbiología, fisiología y bioquímica para obtenerlas y conservarlas con todas sus propiedades biológicas y así poder utilizarlas en diversos procesos industriales (Scriban R., 1985; Johnson, 1977).

Para que los bioprocesos en los cuales se utilizan las enzimas sean viables en cualquier contexto industrial, deben ofrecer ventajas sobre los métodos de producción actuales contra los cuales compiten (Crueger and Crueger, 1982; Gibbons, 1984). En general, para muchos procesos las enzimas ofrecen las siguientes ventajas sobre los catalizadores químicos:

- a) Pueden funcionar en soluciones acuosas bajo condiciones de reacción suaves de pH , temperatura y presión.
- b) Presentan alta especificidad de sustrato sobre el cual actúan.
- c) Se pueden obtener en grandes cantidades, a partir de microorganismos como bacterias y hongos, con muy pocos requerimientos nutricionales.

Estas características hacen de las enzimas biomoléculas de gran potencial para ser empleadas con fines prácticos en diferentes actividades en el sector productivo y en el de servicios.

Por las diversas propiedades que las enzimas presentan, actualmente se están utilizando industrialmente en una amplia variedad de aplicaciones que van desde la elaboración a gran escala de compuestos químicos, hasta alimentos procesados que pueden adquirirse en tiendas de autoservicio.

Las enzimas que se producen para la investigación grado analítico o farmacéutico son altamente purificadas y los costos para su producción y venta son muy altos. Por otro lado las enzimas que se utilizan con fines técnicos, como la preparación de detergentes y alimentos, no están purificadas y es común que se utilicen los filtrados enzimáticos libres de células tal como se obtienen en los procesos de producción por lo que su costo es menor que las enzimas grado analítico (Lowe, 1992).

Las enzimas que actualmente se producen a nivel comercial se han incorporado paulatinamente en diversas áreas de la industria alimenticia como las pectinasas para la extracción, clarificación y reducción de la viscosidad en jugos y néctares de frutas; en el área química utilizan a las proteasas en la elaboración de detergentes y, con fines terapéuticos, se utiliza a la asparaginasa en tratamientos médicos contra la leucemia por citar un ejemplo (Harms, 1991; Jennings and Beachman, 1990).

Es importante señalar que el número de enzimas que tienen un lugar bien definido en la industria y se producen comercialmente es muy pequeño en relación con la cantidad de enzimas que son capaces de sintetizar las células o los microorganismos (aproximadamente unas 30 de más de 2000). Aún cuando se están estudiando una gran cantidad de enzimas y sus diferentes aplicaciones potenciales, la mayoría de estos trabajos se encuentran a nivel laboratorio o planta piloto y todavía no ha sido posible utilizarlas a nivel comercial. Esto se debe a que la mayoría de las enzimas son moléculas inestables a las que las temperaturas altas y valores de pH extremos les provocan cambios en su estructura tridimensional y estas alteraciones en su estructura traen como consecuencia que pierdan su actividad biológica o catalítica. Además, son muy susceptibles de ser degradadas por proteasas, por otros microorganismos o por condiciones fisicoquímicas extremas. Es por estas razones que continúa la investigación biotecnológica de enzimas en aspectos tan diversos como la selección de mejores microorganismos productores, optimización de los medios de producción, caracterización de las enzimas, mejoramiento genético de las cepas productoras de enzimas, procesos de producción y finalmente la incorporación de un mayor número de enzimas en diferentes actividades económicas (Biely et al, 1985; Ishaque and Kluepfel y Kluepfel, 1981; Merivouri and Sands, 1989).

Las enzimas pueden obtenerse de cultivos de células de origen animal, vegetal o microbiano. Sin embargo, los animales y plantas tienen el inconveniente de requerir de mucho tiempo para llevar a cabo la duplicación de su biomasa, por lo tanto, las células animales y vegetales tienen limitaciones en la velocidad de crecimiento ya que requieren para ello de unas 12 a 60 horas aproximadamente, son más grandes, frágiles, complejas y a menudo requieren de un soporte para su crecimiento, asimismo, son más difíciles de aislar y conservar que las células microbianas. Además las células animales tienen requerimientos nutricionales más complejos, los cuales en muchos casos no han sido completamente definidos y algunas veces requieren de suero y hormonas para su crecimiento (Gibbons, 1984).

A diferencia de las células de organismos superiores, la capacidad bioquímica de los microorganismos es muy grande y es posible aislar de ellos una amplia variedad de compuestos nuevos, así como diversos tipos de biomoléculas. El tamaño de las células microbianas varía de 1 a 10 micras; no requieren de sustancias complejas como las hormonas para la regulación de su metabolismo; su tiempo de replicación es corto en relación con las células animales; tienen un amplio margen de tolerancia hacia el medio que las rodea y pueden crecer en suspensión en una gran cantidad de medios nutritivos de composición química sencilla y muy amplia utilizando como sustratos o fuentes de carbono a una gran variedad de compuestos orgánicos como azúcares, alcoholes, aldehídos, aminoácidos, grasas y desechos vegetales ricos en celulosa, hemicelulosa, pectina y xilanos.

1.2 Características químicas de los xilanos y su distribución en la naturaleza

Los xilanos son polisacáridos heterogéneos que presentan una gran variabilidad en su composición y estructura química y que, después de la celulosa, son los biopolímeros más sintetizados en la biosfera por las plantas (Joseleau et al, 1992; Wong et al, 1988). Los xilanos se ubican dentro de una clase de polisacáridos mucho más grande y compleja denominada hemicelulosas y son los principales polisacáridos hemicelulósicos presentes en la mayoría de las plantas (Biely, 1985). El término de hemicelulosas engloba a aquellos polisacáridos de la pared de las células vegetales que están muy asociados con la celulosa en los tejidos lignificados y que, a diferencia de esta, se extraen por medio de agentes alcalinos (Aspinall, 1959). Dentro de las hemicelulosas se han identificado otros grupos de polisacáridos nombrados en base al tipo de azúcar que predomina en su composición química, como los D-mananos; D-galactanos y L-arabinanos en los que el azúcar predominante en su composición química es D-manosa, D-galactosa y L-arabinosa respectivamente (Dekker and Richards, 1976; Wong et al, 1988; Aspinall, 1959). De esta manera el término de xilanos se utiliza para denotar a aquellos polisacáridos en los que la proporción de unidades de D-xilosa es mayor que el resto de azúcares que lo componen.

Se ha determinado que los xilanos están compuestos por residuos D-xilanopiranosil unidos entre sí mediante enlaces β -1,4. En la mayoría de las plantas terrestres de las que se

han extraído y caracterizado los xilanos, se ha podido observar que todos presentan la misma estructura básica, que es una cadena de β -1,4-D-xilosa. Se han identificado diferencias en su estructura más fina ocasionadas por el tipo y proporción de los otros azúcares que lo constituyen y que generalmente son: D-manosa, D-galactosa, L-arabinosa, ácido-D-glucorónico y su derivado el ácido 4-O-metilglucorónico. La mayoría de las veces, estos monómeros se encuentran presentes en forma de cadenas laterales unidas a la cadena principal de unidades de D-xilosa por medio de enlaces α -glicosídicos (Aspinall, 1959; Biely, 1985). Esta complejidad en su composición y estructura química, le confiere a cada grupo de xilanos diferentes propiedades físicas, químicas y biológicas así como diferencias en su estructura química (Aspinall, 1959).

A diferencia de la celulosa que es un polímero de glucosa altamente cristalino, las hemicelulosas, por ser polímeros de composición química más compleja, no son cristalinas sino más bien amorfas lo que les permite poseer una mayor flexibilidad que la celulosa (Gilkes et al, 1991; Wayman, 1986). Los xilanos son sintetizados por las plantas y forman parte de su pared celular junto con la celulosa (constituida por unidades de glucosa en forma de fibras cristalinas e insolubles) y lignina (una compleja estructura polifenólica) además de otros polisacáridos no celulósicos. Los xilanos interactúan químicamente con los otros componentes de las paredes celulares de los tejidos lignificados, en particular con las microfibrillas de celulosa por medio de interacciones no covalentes del tipo de enlaces de hidrógeno y con la lignina a través de uniones o enlaces covalentes (Thomson, 1993; Joseleau et al, 1992; Wong et al, 1988).

Se ha propuesto que en la pared secundaria de las células vegetales los xilanos forman una capa intermedia o interfase entre la celulosa y la lignina por medio de monocapas que rodean a las fibras de celulosa. El grosor variable de las capas de hemicelulosas podría explicar las diferencias en el engrosamiento microfibrilar de la celulosa, y por lo tanto, de la pared celular (Young, 1986; Wong et al, 1988). Su cerrada asociación con la lignina y la flexibilidad dada por su composición y estructura química, permiten que la función principal

de los xilanos en las plantas sea estructural y de soporte, contribuyendo en la rigidez y flexibilidad de la pared celular de las plantas (Gong et al, 1981).

Se calcula que los xilanos constituyen de un 20% a un 40% de la fracción total de carbohidratos presentes en la naturaleza. El tipo, proporción y distribución de los xilanos en las plantas es dependiente de la especie que lo sintetice, del estado y condiciones fisiológicas de su desarrollo y del tipo de tejido en el que se encuentre (Gong et al, 1981; Wong et al, 1988).

El contenido de xilanos en hierbas y gramíneas es aproximadamente del 40% (McCarthy et al , 1985) y se caracterizan por tener residuos L-arabinofuranósidos enlazados como unidades sencillas y formando cadenas laterales al esqueleto xilanopiranosil usualmente en la posición del carbono 3 de las unidades de xilosa (Thomson, 1993; Aspinall, 1959). En algunos casos hay pequeñas cantidades de ácido-D-glucoronico y/o ácido-4-O-metilglucoronico. En el caso de las maderas, sus xilanos se caracterizan por tener altos contenidos de ácido-D-glucoronico y ácido-4-O-metilglucoronico, de un 8% a un 20% aproximadamente, unidos en el carbono 2 de las unidades de D-xilosa de la cadena principal de xilanos (Aspinall, 1959). Sin embargo, resulta difícil definir claramente una división estructural entre estos dos grupos de xilanos.

Los desechos agroindustriales son prácticamente materiales lignocelulósicos y son subproductos que se obtienen de diferentes actividades agrícolas y forestales en los que, una vez que se han obtenido de ellos sus principales productos, conservan una gran cantidad de CO₂ fijado en las paredes celulares en forma de celulosa, lignina y xilanos. La proporción de estos componentes en los desechos agroindustriales es muy variable dependiendo de su origen, así como del proceso al cual han sido sometidos (Gong et al , 1981).

Los desechos lignocelulósicos más comunes son: bagazos, pajas y rastrojos provenientes de la agricultura; pulpas, fibras y cáscaras de frutas y verduras generados por diferentes agroindustrias además de los materiales liberados de la madera como el aserrín y virutas producidas durante la industrialización de los recursos forestales así como la fabricación y procesamiento de la pulpa utilizada para la producción del papel en la industria papelera

(Blancas et al, 1984; Biely, 1985). Apreciables cantidades de xilanos están presentes en todos estos desechos agroindustriales y se calcula que son de un 20% a un 35% aproximadamente del total de los carbohidratos contenidos en los residuos agrícolas.

Esta importante fuente de carbono contenida en los materiales lignocelulósicos de los desechos agroindustriales, especialmente la fracción de xilanos, representa un sustrato potencialmente importante para la producción de proteína unicelular, compuestos químicos, combustibles y enzimas (du Toit et al, 1984; Wong et al, 1988; Enríquez et al , 1981; Brodel et al, 1990; Rajoka and Malik, 1984).

Sin embargo la mayoría de las veces estos desechos agroindustriales se manejan como desperdicio y son abandonados en terrenos cercanos al sitio de producción o los depositan en cuerpos de agua como arroyos y ríos donde pueden ocasionar problemas de contaminación con el consiguiente efecto nocivo sobre el medio. Es en los cuerpos de agua donde estos desechos pueden ser mas perjudiciales, ya que la mayoría de las veces llevan consigo azúcares solubles que pueden favorecer el crecimiento de la población de microorganismos ahí presentes, lo cual provoca que disminuya la concentración de oxígeno disuelto en el agua, creando un ambiente anóxico que puede afectar al resto de organismos que habiten en ese medio y por lo tanto dañar al ecosistema en cuestión (Biely, 1985).

Actualmente, la conversión de los xilanos representa parte del esfuerzo que se está llevando a cabo a nivel mundial para desarrollar aquellos procesos enfocados hacia el aprovechamiento de los materiales lignocelulósicos contenidos en los desechos agroindustriales, los cuales ofrecen las ventajas de ser renovables debido a que son constantemente producidos durante la fotosíntesis y crecimiento de las plantas (Enríquez et al , 1981; Biely, 1985), están disponibles y son relativamente baratos

Los xilanos pueden ser convertidos en monosacáridos por hidrólisis química o enzimática. La hidrólisis química es rápida, pero va acompañada por la formación de compuestos tóxicos, como los compuestos fenólicos clorinados producidos durante la eliminación de los contenidos en la pulpa de papel, para el blanqueamiento de esta. Este tipo

de compuestos son altamente tóxicos, resistentes a la biodegradación y nocivos al medio al que se liberan (Yang et al, 1992; Biely, 1985).

Por estas razones, se ha dado gran énfasis a la investigación y desarrollo de los procesos de bioconversión enzimática que sean altamente eficientes para llevar a cabo la hidrólisis de la hemicelulosa contenida en los desechos agroindustriales (Biely, 1985). Muchos grupos de investigación, incluido el nuestro, intentan explotar la capacidad de las enzimas microbianas para llevar a cabo la bioconversión de los materiales lignocelulósicos. Los productos obtenidos por la hidrólisis enzimática de estos materiales pueden, posteriormente, ser convertidos en combustible líquido, proteína unicelular, solventes y en otros productos químicos utilizando otro tipo de microorganismos con capacidad fermentativa. Además, estos procesos de bioconversión enzimática de los xilanos son muy interesantes y atractivos porque ayudan a eliminar los desechos agroindustriales producidos por las actividades agrícolas y forestales que pueden ser contaminantes (Wong et al, 1988).

En nuestro país, uno de los desechos lignocelulósicos más abundantes es el bagacillo de caña, el cual es obtenido durante el proceso de extracción del azúcar en los ingenios azucareros. La producción anual en nuestro país fue de 3900 toneladas de azúcar con 704,500 toneladas de caña molida que a su vez produjo aprox. 11,600,500 toneladas de bagazo con 14.36% de fibra en caña y 32.68% de caña molida (Estadísticas Azucareras, 1989). Después de la extracción de sacarosa de la caña de azúcar, queda en el bagazo de caña de un 30% a un 35% de hemicelulosas (du Toit et al, 1984). A diferencia del bagazo, el cual se utiliza como combustible, para producir cartón y papel (Prasad, 1992), para fabricar tablas duras y como alimento para ganado (Estadísticas Azucareras, 1989), el bagacillo de caña es subutilizado.

Hasta ahora, la mayoría de las investigaciones dirigidas hacia el aprovechamiento biotecnológico de este desecho se encuentran a nivel laboratorio y planta piloto. Nosotros estamos interesados en utilizar el bagacillo de caña, sin aplicarle ningún pretratamiento físico ni químico, como sustrato de fermentación para la producción e inducción de enzimas microbianas de interés comercial, particularmente para la producción de xilanasas, y en

algunos casos también celulasas y pectinasas, ya que en el bagacillo de caña las hemicelulosas contienen de un 60% a un 80% de xilanos (Gong et al , 1981).

1.3 Caracterización e importancia de las xilanasas

Debido a los resultados satisfactorios obtenidos con las enzimas que se utilizan en algunos procesos industriales, muchos grupos de científicos continúan desarrollando trabajos de investigación con el propósito de incorporar una mayor cantidad de enzimas con potencial de uso en aplicaciones comerciales. Tal es el caso de las xilanasas, las cuales comenzaron a estudiarse como enzimas accesorias de los sistemas celulolíticos, en los que su presencia permite una degradación más completa de los polisacáridos contenidos en los materiales lignocelulósicos de los residuos vegetales. Al estudiar con mayor detalle estos sistemas fue posible caracterizar a las xilanasas, entre otros tipos de hemicelulasas, las cuales actúan sobre un sustrato definido y caracterizado químicamente como xilanos.

Además de tener importancia biológica, las enzimas xilanolíticas tienen un gran potencial de aplicaciones biotecnológicas en diferentes actividades económicas (Biely et al, 1992; Coughlan, 1992).

Se requiere de la acción sinérgica de diferentes tipos de enzimas del sistema xilanolítico para llevar a cabo la hidrólisis completa de los xilanos. En base a las investigaciones realizadas, se sabe que el sistema xilanolítico completo cuenta con diferentes tipos de enzimas que atacan tanto los enlaces internos de la cadena principal de xilanos, como los xilooligosacáridos más pequeños resultantes de esta hidrólisis, los dímeros de xilosa y las ramificaciones laterales (Reilly, 1981; Biely, 1985; Coughlan, 1992).

Las enzimas hidrolíticas que separan las cadenas laterales o ramificaciones de los xilanos se consideran accesorias del sistema xilanolítico ya que liberan dichas ramificaciones. Cabe mencionar que existe una gran diversidad de este tipo de enzimas accesorias debido a la diversidad de cadenas laterales y sus tipos de uniones con la cadena principal en los xilanos (Biely, 1985; MacKenzie et al, 1987; Biely et al, 1986; Copa-Patiño et al, 1993; Biely et al, 1992)

Las enzimas más conocidas y mejor estudiadas de los sistemas xilanolíticos por su importancia práctica son las endo-1,4- β -xilanasas o xilanasas las cuales atacan la cadena principal de los xilanos así como las β -xilosidasas, las cuales hidrolizan los pequeños xiloligosacáridos o dímeros de xilosa para obtener de ellos unidades de D-xilosa (Biely, 1985; Dhalberg et al, 1993; Dekker and Richards, 1976; Pou-Linas and Driguez, 1987; Copa-Patiño et al, 1993; Morag et al, 1990; Khanna and Garui, 1993, Yasui et al, 1984; Okazaki et al, 1984; Biely et al, 1992).

Las enzimas xilanolíticas se clasifican dependiendo del tipo de enlace que ataquen y han sido designadas de la siguiente manera:

***Endoxilanasas** (CE 3.2.1.8 [(1-4)- β -D-xilan-xilanolhidrolasa].- Este tipo de enzimas rompen las uniones β -1,4-xilosídicas internas que hay a lo largo de las moléculas de xilanos. Se ha propuesto que el ataque llevado a cabo por este tipo de enzimas a los enlaces xilosídicos es al azar, pero factores como el tamaño de los xilanos, la distribución y densidad de las cadenas laterales y el tipo de moléculas de azúcares que las componen, como la arabinosa o manosa por mencionar algunos, pueden favorecer o impedir su actividad hidrolítica (Reilly, 1981). Algunos investigadores han propuesto que algunas endoxilanasas tienen la capacidad de hidrolizar las cadenas laterales de los xilanos, pero no se ha comprobado que todas posean este tipo de actividad.

*** β -Xilosidasa** (CE 3.2.1.37 [(1-4)- β -D-xilan-xilohidrolasa].-Rompen pequeños xiloligosacáridos o dímeros de xilosa hasta unidades de D-xilosa, no actúan sobre las cadenas grandes de xilanos y algunas veces presentan actividad tipo transferasa (Win et al, 1988; Reilly, 1981).

***Exoxilanasas** (CE 3.2.1.37 [(1-4)- β -D-xilan-xilohidrolasa].- Actúan sobre xilanos y oligosacáridos grandes de xilosa atacando la porción terminal no reducida de la cadena principal. No hay evidencia concluyente de que el producto final de su hidrólisis sea xilobiosa o xilosa y a diferencia de la β -xilosidasa, no presentan actividad de transferasa. (Reilly, 1981).

Cabe señalar que hasta el momento no se han podido diferenciar claramente las β -xilosidasas y las exoxilanasas. Ambas tienen la misma clasificación dada por la comisión de la International Union of Biochemistry (IUB) y se ha señalado que algunas β -xilosidasas que actúan sobre moléculas grandes de xilanos y no sobre dímeros de xilosa, son denominadas exoxilanasas pero aún hace falta confirmar experimentalmente si son o no diferentes tipos de enzimas.

Aún no se ha definido claramente el mecanismo de acción de las xilanasas. Se ha propuesto que el grupo reactivo de un ácido aspártico (Asp) o glutámico (Glu) en el sitio activo de la enzima, es el responsable del rompimiento de los enlaces β -1;4 internos del esqueleto xilanopiranosil. Posteriormente se disocia una molécula de agua para reprotonar el grupo ácido del aminoácido reactivo (Asp, Glu) localizado en el sitio activo de la enzima, y el ion hidroxilo restante se une al ion carbonio, quedando el azúcar liberado con un grupo reductor (Coughlan, 1992; Marui et al, 1993).

Los microorganismos a menudo producen más de un tipo de xilanasas. Estas difieren en el peso molecular, contenido de aminoácidos, punto isoelectrico, perfiles de tolerancia a pH y temperatura, presencia y contenido de carbohidratos así como en su afinidad hacia el sustrato. El mecanismo de regulación de su síntesis, las modificaciones postraduccionales de las enzimas y el hecho de que muchas de estas xilanasas son el producto de los diferentes genes presentes en los microorganismos, pueden ser considerados los factores que ocasionan la multiplicidad de las xilanasas. No hay que rechazar la posibilidad de que muchas de las xilanasas múltiples reportadas sean alozimas, es decir, producto de diferentes alelos del mismo gen. Esta multiplicidad en las xilanasas posiblemente sea una respuesta de los microorganismos a la gran diversidad de xilanos que existen en la naturaleza para que, de esta manera, tengan la capacidad de utilizar una amplia variedad de materiales lignocelulósicos, lo que les otorga mayores posibilidades de adaptación en caso de que ocurran cambios drásticos en el medio en el que viven (Biely, 1985; Wong et al, 1988).

Aún cuando se ha reportado la presencia de endoxilanasas intracelulares y asociadas a la célula (Saxena et al, 1991), la mayoría de las endoxilanasas son extracelulares. La capacidad

de los microorganismos de excretar las endoxilanasas al medio en el que crecen es una estrategia que les permite utilizar eficientemente la fuente de carbono que representan los xilanos que se encuentran en el medio que los rodea. Por medio de las xilanasas extracelulares, se puede llevar a cabo una degradación parcial de los xilanos extracelulares que son demasiado grandes para entrar completos a la célula y así, los pequeños oligómeros de xilosa obtenidos de la hidrólisis parcial de estos xilanos, pueden pasar a través de la membrana celular al interior de los microorganismos en donde se completa su degradación. El hecho de que las endoxilanasas se excreten al medio se considera ventajoso desde el punto de vista práctico, ya que pueden obtenerse directamente de los filtrados de las fermentaciones sin que haya necesidad de aplicar métodos especiales para romper las células y liberar a la enzima (Roger and Nakas, 1989; MacKenzie et al, 1987, Morosoli et al, 1986; McCarthy et al, 1985; Biely, 1985, Smith and Wood, 1991; Pou-Linas and Driguez, 1987; Hrmová et al, 1989; Ball and McCarthy, 1989; Biely and Petrakova, 1984).

Por lo general, la biosíntesis de las xilanasas es inducible y muchos trabajos de investigación se han enfocado en la búsqueda y selección de los inductores específicos, tanto de origen natural como sintético, que favorezcan y mejoren la producción de xilanasas (Pou-Linas and Driguez, 1987; Fernández-Espinar et al, 1992; Hrmová et al, 1991; Kawaminami, 1969; Marui et al, 1985; Biely and Petrakova, 1984). En algunos casos se ha encontrado que los isómeros posicionales de las moléculas inductoras inducen mejor que los productos o sustratos naturales (Biely and Petrakova, 1984; Nakanishi and Yasui, 1990; Hrmová et al, 1984). Cabe mencionar que algunos microorganismos son capaces de producir xilanasas constitutivamente (Brodell et al, 1990; Wang et al, 1992). Se ha propuesto que estas xilanasas constitutivas degradan parcialmente los xilanos que están en el medio que rodea a los microorganismos que las excretan. Esto es debido a que los grandes sustratos poliméricos como los xilanos son incapaces de entrar a la célula atravesando la membrana plasmática y actuar como inductores. Por esta razón las células deben recibir la señal para iniciar la síntesis de las xilanasas extracelulares por medio de oligómeros de azúcares de bajo peso molecular, derivados de las grandes cadenas de xilanos, como la xilobiosa. Estas

pequeñas cadenas de azúcares se forman por la acción hidrolítica sobre los xilanos de las endoxilanasas extracelulares producidas constitutivamente.

Se ha reportado la presencia de xilanasas en bacterias de ambientes marinos y terrestres (Dhalberg et al, 1993; Dekker and Richards, 1976); en hongos saprófitos, fitopatógenos y micorrizicos; en bacterias y protozoarios del rumen de animales forrajeros y del tracto intestinal de insectos y en el jugo digestivo de moluscos y crustáceos aunque en estos dos últimos su origen no es muy claro. También se ha reportado su presencia en algas marinas y en semillas en germinación de plantas terrestres (Dekker and Richards, 1976). El hecho de que organismos tan diferentes entre sí posean endoxilanasas, demuestra la importancia de los xilanos en la naturaleza, no solo como elementos estructurales de los tejidos vegetales, sino también como sustratos para muchos y diferentes procesos metabólicos.

La importancia biológica de las xilanasas radica en su participación, junto con otras enzimas, en la reincorporación al ciclo del carbono del CO₂ ambiental. Este es fijado por las plantas en sus paredes celulares como xilanos y para que posteriormente pueda ser reutilizado por otros organismos es hidrolizado por las endoxilanasas que secretan los microorganismos xilanolíticos que hay en el ecosistema. Los microorganismos simbióticos y patógenos de plantas así como los saprófitos, son los productores más importantes de enzimas xilanolíticas que hay en la naturaleza. Es importante en estos organismos la presencia de xilanasas, junto con otras enzimas glicosídicas, para eliminar la barrera mecánica que representan los xilanos en la pared celular de las células vegetales y poder introducirse en la planta (Wong et al, 1988; Reilly, 1981). Cuando los microorganismos establecen relaciones simbióticas con algunos animales forrajeros, secretan xilanasas que participan simultáneamente con las celulasas en la hidrólisis del forraje que consumen los animales con los que han establecido la simbiosis, favoreciendo la digestión de la fibra forrajera (Cotta, 1993) y permitiendo para ambos una mayor eficiencia en el aprovechamiento de carbohidratos. Los hongos micorrizicos también pueden presentar actividad xilanolítica, la cual aparentemente es cuidadosamente controlada permitiendo la invasión del hongo a la planta sin causarle daño masivo a la raíz (Wong et al, 1988).

Las xilanasas extracelulares de los microorganismos saprófitos que habitan en el suelo son las que posiblemente tengan la mayor importancia biológica, ya que estas enzimas están involucradas en la descomposición de los desechos vegetales acumulados, mediante la hidrólisis de los xilanos de alto peso molecular en cadenas de azúcares más pequeños para que de esta manera puedan ser utilizados por una mayor variedad de microorganismos en diferentes procesos metabólicos.

Durante los últimos años, los sistemas xilanolíticos han sido estudiados intensamente por el gran potencial biotecnológico que tienen, junto con los sistemas enzimáticos celulolíticos y pectinolíticos, para utilizarse en la hidrólisis enzimática de los materiales lignocelulósicos que hay en los desechos agrícolas, en la clarificación de jugos y licuefacción de frutas y verduras. Otra importante aplicación potencial de las xilanasas es en los procesos de eliminación de xilanos presentes, junto con la celulosa, durante la extracción de la pulpa de celulosa para la elaboración de papel en lugar de su extracción alcalina, y en el pretratamiento de la pulpa para mejorar su blanqueamiento, procesos en los que deben estar ausentes enzimas con actividad celulolítica (Biely, 1985; Gomes et al, 1993; Wong et al, 1988; Purkarthofer et al, 1993; Roberts et al, 1992; Paice et al, 1991; Yang et al, 1992).

1.4 Fuentes microbianas de xilanasas

Para llevar a cabo cualquier aplicación biotecnológica de las xilanasas, es necesario contar con fuentes de las cuales obtener estas enzimas que sean capaces de producirlas en forma rápida, económica, constante, con especificaciones apropiadas para los fines que se persigan. Además las enzimas obtenidas tienen que ser de fácil recuperación y el proceso de producción debe ser reproducible. De entre todos los organismos productores de xilanasas, los microorganismos son las fuentes más confiables y utilizadas para obtener estas enzimas ya que reúnen las ventajas anteriormente señaladas, en particular los hongos y las bacterias. (Ball and McCarthy, 1989; Biely, 1985; Dekker and Richards, 1976).

Muchas especies de hongos filamentosos se han estudiado por su capacidad para producir xilanasas. Las investigaciones hechas al respecto se han enfocado principalmente en la caracterización de cepas productoras y optimización de los medios para su producción

(Copa-Patiño et al, 1993; Purkarthofer et al, 1993; Bailey et al, 1993; Haltrich et al, 1993; Fernández-Espinar et al, 1992) en la prueba y selección de los mejores inductores necesarios para la síntesis de xilanasas (Hrmová et al, 1984; Pou-Linas and Driguez, 1987; Hrmová et al, 1986; Hrmová et al, 1991) y en la caracterización y purificación de xilanasas termofilicas (Ghosh and Nanda, 1993; Purkarthofer, 1993; Gomes et al, 1993; Ghosh et al, 1993, Fernández-Espinar et al, 1993; Gómez de Segura and Feure, 1993; Li et al, 1993). Aunque en menor medida, también se han hecho trabajos a nivel molecular para conocer los genes de las xilanasas y sus mecanismos de regulación (Graaf et al, 1992; Smith and Wood, 1991).

Algunos de los hongos más estudiados por su capacidad de producir xilanasas son especies de los géneros: *Aspergillus* (Ghosh and Nanda, 1993; Fernández-Espinar et al, 1993; Smith and Wood, 1991; Hrmová et al, 1991; Fernández-Espinar et al, 1992; Ghosh et al, 1993; Hrmová et al, 1991, Poutanen et al, 1987); *Thermomyces* (Purkarthofer et al, 1993; Gomes et al, 1993); *Neocallimastix* (Gómez de Segura and Feure, 1993); *Aureobasidium* (Li et al, 1993; Acuña, 1991; Poutanen et al, 1987); *Pullularia* (Pou-Linas and Driguez, 1987) *Phanerochaete* (Copa-Patiño et al, 1993).

Por lo general, los hongos filamentosos excretan sus enzimas endoxilanolíticas al medio en el que se encuentran, junto con otras enzimas glicosídicas (Hrmová et al, 1991;Copa-Patiño et al, 1993, Hrmová et al, 1986; Haltrich et al, 1993; Hrmová et al, 1989) por lo que estos filtrados crudos libres de células, se utilizan comúnmente para llevar a cabo la hidrólisis de materiales lignocelulósicos, o bien, de ellos se purifican las enzimas xilanolíticas cuando desean caracterizar este tipo de actividad (Copa-Patiño et al, 1993; Fernández-Espinar et al, 1993; Li et al, 1993; Gómez de Segura and Feure, 1993). Sin embargo, por el interés que existe de incorporarlas en el proceso del blanqueamiento de la pulpa de papel, parte de las investigaciones se han orientado hacia la producción de filtrados crudos de xilanasas libres de actividad celulolítica (Fernández-Espinar et al, 1992; Haltrich et al, 1993; Fernández-Espinar et al, 1993; Ghosh, 1993; Gomes et al, 1993; Purkarthofer et al, 1993; Ghosh et al, 1993).

Las xilanasas fúngicas son inducibles por xilanos, desechos agroindustriales de tipo lignocelulósico y en algunos casos, por materiales celulósicos (Hrmová et al, 1986; Ghosh, 1993; Hrmová et al, 1989) y es común que se produzcan junto con las β -xilidasas (Hrmová et al, 1991; Ghosh, 1993); algunas veces su actividad enzimática es baja (Hrmová et al, 1986, Copa-Patiño et al, 1993; Hrmová et al, 1989; Ghosh, 1993; Haltrich et al, 1993) aunque se han reportado cepas que producen enzimas con buena actividad xilanólítica (Fernández-Espinar et al, 1993; Hrmová et al, 1991, Fernández-Espinar et al, 1992; Gomes et al, 1993; Bailey et al, 1993). El rango de valores de pH óptimos en el que actúan es ácido, de 4.0 a 6.5 aproximadamente, con tendencia a la neutralidad, (Copa-Patiño et al, 1993; Fernandez-Espinar et al, 1993; Ghosh, 1993; Purkarthofer et al, 1993, Gomes et al, 1993, Li et al, 1993; Gómez de Segura and Feure, 1993) y su rango de temperaturas óptimas es de 30°C a 65°C (Fernández-Espinar et al, 1992; Gomes et al, 1993, Ghosh, 1993; Gómez de Segura and Feure, 1993).

En el caso de las bacterias productoras de xilanasas se han realizado investigaciones similares a las hechas con los hongos. La mayoría de los trabajos han sido para la optimización y selección de los medios para la producción de las xilanasas (Kluepfel et al, 1986; MacKenzie et al, 1987); purificación y caracterización de las enzimas (Khanna and Garui, 1993; Dung et al, 1993; Kluepfel et al, 1986) y, en el caso de las xilanasas bacterianas, se han hecho trabajos de biología molecular y clonación de los genes de xilanasas de diversos microorganismos utilizando *Escherichia coli* como organismo receptor (Lee et al, 1993; Malburg et al, 1993; Paradis et al, 1993; Bhalerao et al, 1990).

Las xilanasas bacterianas generalmente son inducibles con xilanos, con materiales lignocelulósicos y con monómeros y oligómeros de xilosa (Khanna and Garui, 1993; Saxena et al, 1991; Dung et al, 1993, Bhalerao et al, 1990; MacKenzie et al, 1987; Nakanishi and Yasui, 1980; Rajoka and Malik, 1986), salvo ciertas xilanasas reportadas en *Clostridium* y *Streptomyces* (Brodell et al, 1990; Wang et al, 1992) cuya expresión es constitutiva. Al igual que las xilanasas fúngicas su intervalo óptimo de temperatura se encuentra entre los 40°C y 55°C (Saxena et al, 1991; Okazaki et al, 1984; Dung et al, 1993; Rajoka and Malik, 1984),

excepto algunas xilanasas termofilicas que tienen su máxima actividad entre los 55°C y 70°C (Dhalberg et al, 1993; Lee et al, 1993, Kluepfel et al, 1986). Donde existe mayor diferencia con respecto a las xilanasas fúngicas es en el margen de pH óptimo en el que pueden trabajar y que va de valores neutros a alcalinos, de 6.5 a 10.0 (Okazaki et al, 1984; Saxena et al, 1991; Lee et al, 1993; Rajoka and Malik, 1984, Kluepfel et al, 1986), salvo una especie de *Aeromonas* cuya xilanasas tiene su pH óptimo en valores ácidos (Dung et al, 1993) y en que algunas de las bacterias productoras de estas enzimas producen múltiples xilanasas (Dung et al, 1993; Khanna and Garui, 1993; Dhalberg et al, 1993; Malburg et al, 1993; Nakanishi and Yasui, 1980, Wang et al, 1992)

Otra diferencia interesante es que algunas de las cepas bacterianas productoras de xilanasas requieren ambientes anaeróbicos para producirlas (Lee et al, 1993; Brodel et al, 1990;) cosa que no sucede con las cepas de hongos utilizadas, que son aeróbicas.

Entre los sistemas bacterianos estudiados por su capacidad para producir enzimas xilanolíticas están los géneros: *Bacillus* (Okazaki et al, 1984; Akiba and Horikoshi, 1988); *Cellulomonas* (Khanna and Garui, 1993; Saxena et al, 1991; Rajoka and Malik, 1984; Bhalerao et al, 1990; Rajoka and Malik, 1986); *Micrococcus* (Saxena et al, 1991); *Aeromonas* (Dung et al, 1993); *Rhodothermus* (Dhalberg et al, 1993); *Thermonaerobacterium* (Lee et al, 1993); *Fibrobacter* (Malburg et al, 1993; Paradis et al, 1993) *Cytophaga* (Haak and Breznak, 1993); *Clostridium* (Brodel et al, 1990; Morag et al, 1990;) y *Streptomyces* (Kluepfel et al, 1986; MacKenzie et al, 1987; Nakanishi and Yasui, 1980).

El género de *Streptomyces* engloba a bacterias aeróbicas gram-positivas, no patógenas, con crecimiento o desarrollo micelial semejante al de los hongos, que usualmente habitan en el suelo y por lo general son relativamente fáciles de aislar (Anné and Van Mellaert, 1993)

El género *Streptomyces* incluye cierto número de especies que se usan corrientemente en aplicaciones biotecnológicas que abarcan desde la producción comercial de antibióticos hasta la producción de enzimas con potencial para llevar a cabo la bioconversión de residuos agrícolas en compuestos químicos (Crawford, 1988). Durante los últimos años, las especies

de este género, han sido reportadas continuamente por ser fuentes prolíficas de antibióticos, esto es debido a que más del 60% de los aproximadamente 6000 antibióticos de origen microbiano son producidos principalmente por estreptomicetos (Anné and Van Mellaert, 1993). Como resultado de la manipulación biotecnológica de la que han sido objeto los estreptomicetos, se dispone de información referente a los parámetros de fermentación básicos que son necesarios para obtener de ellos ciertas proteínas bioactivas y su sistema genético está relativamente bien estudiado y conocido (Crawford, 1988), por lo que algunos grupos de investigación están intentado utilizar algunas especies de *Streptomyces* como vectores para la obtención de proteína heteróloga en lugar de *Escherichia coli* (Anné and Van Mellaert, 1993).

Además de los antibióticos, muchas especies de *Streptomyces* también secretan inhibidores de enzimas (Anné and Van Mellaert, 1993) y proteínas extracelulares, incluyendo enzimas hidrolíticas. Entre las enzimas de este tipo que secretan los estreptomicetos, y que son interesantes por el potencial biotecnológico que presentan, se encuentran las **xilanasas**. Algunas investigaciones de búsqueda de cepas productoras de xilanasas se han concentrado en especies del género *Streptomyces*.

1.5 Características de las xilanasas de *Streptomyces*

Las xilanasas de los estreptomicetos no han sido tan estudiadas como las de los hongos filamentosos (Okeke and Paterson, 1992) o las de ciertos grupo de bacterias. Sin embargo, las enzimas xilanólíticas suelen estar presentes en algunos estreptomicetos que tienen actividad celulolítica así como en ciertas especies aisladas de ambientes naturales como el suelo o desechos vegetales en estado de descomposición, con altos contenidos de hemicelulosas.

Las investigaciones sobre las xilanasas de estreptomicetos hechas durante los últimos años abarcan diversos aspectos de su estudio como la selección de nuevas cepas productoras, la optimización de los medios de cultivo para mejorar su producción; la purificación, caracterización y modificación química de las xilanasas obtenidas y la secuenciación y clonación de los genes específicos de las xilanasas.

La mayoría de las especies de *Streptomyces* reportadas requiere de medios de cultivo complejos que contengan diferentes sales minerales, además de complementos nutricionales como extracto de levadura o proteosa peptona para que el microorganismo crezca (ver Cuadro 1) y haya una buena producción de xilanasas (Morosoli et al, 1986; Grabski and Jeffries, 1991; Jhonson et al, 1988; MacKenzie et al, 1987; Nakajima et al, 1984; Ishaque and Kluepfel, 1981; Kluepfel et al, 1986; Okeke and Paterson, 1992).

CUADRO 1

Composicion de los medios utilizados para la producción de xilanasas extracelulares de diferentes cepas de *Streptomyces* en fermentaciones sumergidas

ESPECIE	SALES MINERALES	FUENTE DE NITRÓGENO	COMPLEMENTOS ORGÁNICOS
<i>Streptomyces flavogriseus</i> 33331 ATCC, <i>S. olivochromogenes</i> NRCC 2258, <i>Streptomyces</i> C248; <i>Streptomyces</i> C254 (MacKenzie et al, 1987; Jhonson et al, 1988))	KH ₂ PO ₄ ; K ₂ HPO ₄ ; MgSO ₄ ·7H ₂ O; CaCl ₂ ·H ₂ O Solución de elementos traza	(NH ₄) ₂ SO ₄	Proteosa peptona, extracto de levadura.
<i>Streptomyces flavogriseus</i> IAFCD-45 Mutante (Ishaque and Kluepfel, 1981)	KH ₂ PO ₄ , K ₂ HPO ₄ ; MgSO ₄ ·7H ₂ O; CaCl ₂ ·H ₂ O Solución de elementos traza	(NH ₄) ₂ SO ₄	Proteosa peptona, extracto de levadura.
<i>Streptomyces lividans</i> 1326 (Morosoli et al, 1986; Kluepfel et al, 1986)	KH ₂ PO ₄ , K ₂ HPO ₄ ; MgSO ₄ ·7H ₂ O; CaCl ₂ ·H ₂ O Solución de elementos traza	(NH ₄) ₂ SO ₄	Proteosa peptona extracto de levadura.
<i>Streptomyces</i> EC22 (Ishaque and Kluepfel, 1981)	KH ₂ PO ₄ , KCl; MgSO ₄ ·7H ₂ O; CaCl ₂ ·H ₂ O, Na Cl, NH ₂ NO ₃ , CaCl ₂ ·H ₂ O	NH ₂ NO ₃	Extracto de levadura
<i>Streptomyces</i> KT-23 (Nakajima et al, 1984)	KH ₂ PO ₄ , MgSO ₄ ·7H ₂ O, FeSO ₄ ·7H ₂ O.	(NH ₄) ₂ SO ₄	Extracto de levadura
<i>Streptomyces</i> sp CH-M-1035 Este trabajo	KH ₂ PO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄ Úrea	No requiere

Componentes del medio utilizado en esta investigación y los medios reportados bibliográficamente para la producción de xilanasas extracelulares de diferentes cepas del género *Streptomyces*.

Por lo general la temperatura utilizada en las fermentaciones para la producción de xilanasas extracelulares con algunos *Streptomyces* abarca un intervalo de 30°C a 37°C salvo para *Streptomyces CE 22* (Okeke and Paterson, 1992), el cual requiere de una temperatura de 50°C para la producción de xilanasas. En el caso del pH óptimo para la producción de estas enzimas el valor más comúnmente reportado es de 7.0, aunque Vyas en 1990 reportó para la especie *Streptomyces VP-5* un pH inicial de 10.0 para la producción de xilanasas.

Entre las especies de *Streptomyces* más reportadas en la literatura para la producción de enzimas xilanolíticas se encuentran *Streptomyces lividans* (Morosoli et al, 1986; Kluepfel et al, 1986), *Streptomyces olivochromogenes* y *Streptomyces flavogriseus* (Ishaque and Kluepfel, 1981; MacKenzie et al, 1987; Jhonson et al, 1988). Otras especies de este género que han sido reportadas y estudiadas como buenas productoras de xilanasas, generalmente han sido aisladas y caracterizadas por el investigador que las reporta como en el caso de *Streptomyces sp 3137* (Nakanishi and Yasui, 1980), *Streptomyces KT-23* (Nakajima et al, 1984) y *Streptomyces VP-5* (Vyas et al, 1990).

Se han reportado especies de *Streptomyces* productoras de celulasas que también son capaces de producir xilanasas ya sea utilizando materiales celulósicos (Okeke and Paterson, 1992) o hemicelulósicos (Ishaque and Kluepfel, 1981). Sin embargo, debido al interés que ha surgido en los últimos años de utilizar filtrados de xilanasas libres de células sin actividad celulolítica, por su posible aplicación en los procesos de bioblanqueamiento de la pulpa de celulosa utilizada para la fabricación del papel, las investigaciones se han enfocado en el estudio de cepas de *Streptomyces* que no produzcan enzimas celulolíticas durante la producción de xilanasas al crecer el microorganismo sobre xilanos aislados como los de avena, arabinoxilanos de arroz, así como cascarilla de trigo, tal es el caso de *Streptomyces roseiscleroticus* (Grabsky, 1991), *Streptomyces 3137* (Marui et al, 1985), *Streptomyces KT-23* (Nakajima et al, 1984), *Streptomyces flavogriseus* (Jhonson et al, 1988; MacKenzie et al, 1987) y *Streptomyces VP-5* (Vyas et al, 1990).

No han sido muchos los reportes de *Streptomyces* en los que se hayan utilizado materiales lignocelulósicos como sustratos e inductores para la producción de xilanasas, sin

embargo, se encuentran los trabajos de Jhonson en 1988 y MacKenzie en 1987 quienes trabajando con *Streptomyces flavogriseus* 3331ATCC y *Streptomyces olivochromogenes* NRCC 2288 utilizaron cascarilla de trigo tratada químicamente como fuente de carbono para la obtención de xilanasas extracelulares; Ishaque and Kluepfel en 1981 utilizó heno e hidrolizados de heno para la producción de las xilanasas de *Streptomyces flavogriseus*; Vyas en 1990 utilizó cascarilla de trigo sin ningún pretratamiento físico ni químico para la producción de xilanasas con la cepa *Streptomyces* VP-5. Asimismo, Nakajima en 1984 aisló los arabinoxilanos de la cáscara de arroz para la producción de xilanasas con la cepa *Streptomyces* KT-23.

La utilización del bagazo de la caña de azúcar como sustrato y fuente de carbono para la producción de enzimas celulolíticas y hemicelulósicas fue reportada en 1985 por Van Zyl y, aunque su trabajo se enfocó principalmente hacia la producción de celulasas de *Streptomyces albogriseolus* y *S. nitrososporus*, por el análisis de los productos de la hidrólisis se observaron pequeñas cantidades de xilosa, probablemente debido a la hidrólisis enzimática de los xilanos contenidos en el bagazo por xilanasas. En 1988, Johnson y colaboradores utilizaron como fuente de carbono a el bagazo de caña para obtener xilanasas extracelulares de varias cepas de *Streptomyces* con no muy buenos resultados. Cabe señalar que el bagazo de caña, es básicamente la corteza del tallo de la planta, esta constituido por fibras más grandes que las del bagacillo y tiene un alto contenido de lignina. A diferencia del bagazo, el bagacillo de caña forma parte de la matriz de fibras y parénquima localizada en la región medular de la caña, está formado por partículas de menor tamaño que el bagazo de caña y tiene un alto contenido de xilanos. Estas características se consideran ventajosas desde el punto de vista biotecnológico ya que es posible utilizarlo sin ningún tratamiento físico ni químico para eliminar la lignina que contiene, fragmentarlo y exponer las fibras con xilanos al ataque microbiano o enzimático. El bagacillo de caña además se maneja como desperdicio y al acumularse en las zonas cercanas al sitio en donde se produce ocasiona problemas de contaminación, principalmente en ríos y arroyos.

Como ya se mencionó anteriormente, la utilización del bagacillo de caña como sustrato para la producción de enzimas xilanolíticas es muy interesante ya que este desecho agroindustrial es barato, está disponible y por el tamaño de las partículas que lo constituyen es más susceptible que el bagazo de caña al ataque microbiano. En nuestro país, la industria azucarera arroja aproximadamente 11,621,000 toneladas anuales de bagazo y bagacillo de caña los cuales contienen aproximadamente en 70% de celulosa y hemicelulosa (Ortega, 1992) que no son aprovechados. Después de la extracción de la sacarosa de la caña de azúcar, queda en el bagacillo de caña diferentes elementos nutritivos además de un 30% a un 35% de hemicelulosas, las cuales contienen de un 60% a 80% de xilanos, estas características se consideran como ventajas potenciales del bagacillo de caña para diferentes aplicaciones biotecnológicas. Considerando el porcentaje de xilanos en el bagacillo de caña, es de extrañarse que no haya reportes de su utilización como sustrato e inductor de xilanasas.

En nuestro laboratorio, una de las principales líneas de investigación ha sido la búsqueda y caracterización de nuevos microorganismos productores de enzimas glicosídicas de importancia en la industria alimentaria (Aguilar and Huitron, 1987; Larios et al, 1989;). El aislamiento de dichos microorganismos se ha llevado a cabo en regiones cercanas a las zonas donde existen agroindustrias establecidas, las cuales procesan grandes cantidades de cultivos como la caña de azúcar y el limón, arrojando desechos agroindustriales con altos contenidos de materiales celulósicos y hemicelulósicos. El aislamiento de los microorganismos se ha realizado con la intención de obtener a aquellos que tienen la mayor capacidad de utilizar estos desechos como fuente de carbono o sustrato y que además, por estar adaptados naturalmente a ese medio, sean capaces de utilizar los desechos agroindustriales propios de la zona como el bagacillo de caña.

La producción de enzimas por microorganismos nativos a partir de este tipo de sustratos, podría ser mejor que la de algunas cepas de colección que no sean de la región y por lo tanto no estén adaptadas a ciertas características físicas y químicas de la zona.

Por otro lado, hay que señalar que en México no se lleva a cabo la producción industrial de enzimas xilanolíticas, ni otro tipo de enzimas glicosídicas de interés comercial como las celulasas y pectinasas, aún cuando existe una demanda creciente de estas enzimas en el mercado y sustratos para producirlas.

En este laboratorio se aisló y seleccionó una cepa bacteriana identificada como *Streptomyces sp CH-M-1035* (Jiménez G., datos no publicados). Este actinomicete fue aislado del suelo cercano a una zona de cultivo intensivo de caña en el estado de Morelos. Sus características más sobresalientes son su adaptación al bagacillo de caña para obtener de él todos los nutrientes que necesita para crecer y reproducirse y su capacidad para producir filtrados con mayor actividad xilanolítica extracelular, inclusive que otros hongos estudiados en el laboratorio (Acuña, 1991). Otra característica interesante que presenta es su requerimiento mínimo de nutrientes en el medio de cultivo en el cual crece a diferencia de otras especies reportadas en la bibliografía, como se puede ver en el cuadro 1, las cuales requieren de la adición de elementos traza, varias sales minerales y complementos nitrogenados orgánicos más complejos para crecer y producir xilanasas.

Nuestro *Streptomyces* tiene la capacidad de crecer en medio mínimo salino con xilanos purificados como única fuente de carbono y producir xilanasas extracelulares a 37°C y valores de pH óptimos entre 6.5 y 7.0. Además, tiene la capacidad de utilizar bagacillo de caña como única fuente de carbono, sin ningún tratamiento físico ni químico previo. En un medio salino mínimo las xilanasas que produce las secreta al medio en el cual crece, por lo que no hay necesidad de aplicar ningún procedimiento de rompimiento celular y separación para obtener las enzimas, ya que por filtración se puede obtener el filtrado enzimático activo pero libre de células.

Por estas características que presenta el *Streptomyces sp CH-M-1035* lo consideramos como un microorganismo productor de xilanasas con potencial de utilizarlo para la producción de estas enzimas en mayor escala. Debido a que este microorganismo es capaz de utilizar el bagacillo de caña sin ningún pretratamiento como única fuente de carbono en un medio salino mínimo para producir xilanasas, se consideró importante realizar a nivel

laboratorio un estudio comparativo de su capacidad de producción de xilanasas en fermentación sumergida usando como sustrato el desecho agroindustrial bagacillo de caña y otros sustratos purificados químicamente como son los xilanos y algunos sacáridos solubles.

Por lo tanto, el objetivo central de este trabajo es la obtención de xilanasas extracelulares por fermentación sumergida de *Streptomyces sp CH-M-1035* a partir de bagacillo de caña y una evaluación comparativa de la actividad producida en este sustrato, así como en xilanos, otros sacáridos solubles y combinaciones de ellos.

1.6 Objetivos

Objetivo principal

La obtención de xilanasas extracelulares por fermentación sumergida de *Streptomyces sp CH-M-1035* a partir de bagacillo de caña.

Objetivos particulares

- Una evaluación comparativa de la actividad xilanolítica de los filtrados libres de células de *Streptomyces sp CH-M-1035* producida en bagacillo de caña de azúcar, xilanos purificados, cáscara de limón glucosa y xilosa
- Efecto de la adición de glucosa y xilosa en la producción de xilanasas extracelulares por *Streptomyces sp CH-M-1035* utilizando bagacillo de caña de azúcar como sustrato inductor
- Efecto de modificaciones en el medio salino utilizado para la producción de xilanasas extracelulares de *Streptomyces sp CH-M-1035* usando bagacillo de caña de azúcar como única fuente de carbono
- Evaluación de la producción de xilanasas extracelulares utilizando como fuente de carbono diferentes tipos de celulosas.
- Detección de actividad celulolítica extracelular en filtrados libres de células de *Streptomyces sp CH-M-1035* crecido en bagacillo de caña de azúcar, xilanos purificados y celulosa bajo las mismas condiciones de producción utilizadas para las xilanasas.

2.0 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Microorganismo.

Se utilizó la cepa bacteriana *Streptomyces sp CH-M-1035*, aislada del suelo de una zona cañera del Estado de Morelos por investigadores de este laboratorio. Esta cepa es productora de xilanasas extracelulares, con requerimientos mínimos en el medio de cultivo para su crecimiento y capaz de utilizar bagacillo de caña como única fuente de carbono.

2.2 Medios de cultivo para la propagación de la cepa y obtención de esporas

2.2.1 Medio mínimo con xilanos (MX)

KH ₂ PO ₄	0.20%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.14%
Urea	0.03%
Xilanos de Larchwood (Marca Sigma.)	1.00%
Agar	2.00%

Para la preparación de este medio se utilizaron sales grado reactivo y sales grado industrial, independientemente unas de otras, disueltas en agua destilada. Los medios se esterilizaron durante 20 minutos a temperatura de 120°C, excepto la urea, la cual se esterilizo por filtración con ayuda de membrana Millipore estéril con abertura de poro de 0.25 µm y se vaciaron en cajas de Petri estériles de plástico en una campana de flujo laminar para evitar su contaminación. Los valores de pH utilizados fueron de 6.5 y 7.0, los cuales se ajustaron con NaOH 1M y ácido sulfúrico 10% v/v.

2.2.2 Medio completo (MC)

Extracto de levadura	0.4%
Extracto de malta	1.0%
Glucosa	0.4%
Agar	1.5%

Para su preparación se utilizaron sales grado reactivo disueltas en agua destilada. El medio se esterilizó durante 20 minutos a temperatura de 120°C y la urea se esterilizó por filtración con ayuda de membrana Millipore estéril con abertura de poro de 0.25 µm, posteriormente se vació el medio en cajas de Petri estériles de plástico en una campana de flujo laminar para evitar su contaminación. Los valores de pH utilizados fueron de 6.5 y 7.0 los cuales se ajustaron con NaOH 1M y ácido sulfúrico 10% v/v.

2.2.3 Medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA)

PDA	3.90%
-----	-------

Este medio se preparó siguiendo las indicaciones del frasco, disolviendo en agua destilada la concentración correspondiente del medio en polvo, se esterilizó durante 20 minutos a una temperatura de 120°C. No se ajustó el pH de este medio.

2.2.4 Medio para la conservación de esporas (MG)

Extracto de levadura	0.40%
Extracto de Malta	1.00%
Glicerol	40.00%

Las sustancias químicas utilizadas fueron grado reactivo, el medio se esterilizó durante 20 minutos a 120°C, posteriormente el medio se colocó en tubos estériles con tapa de rosca, en los cuales se depositaron las esporas para ponerlas en congelación.

2.2.5 Medio salino mínimo (MSM) para la producción de xilanasas.

KH ₂ PO ₄	0.20%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.14%
Urea	0.03%

Para la preparación de este medio se utilizaron sales grado reactivo disueltos apropiadamente en agua destilada, en todos los casos se esterilizaron durante 20 minutos a una temperatura de 120°C excepto la urea, la cual se esterilizó por filtración con ayuda de membrana Millipore con apertura de poro de 0.25 µm. El medio se ajustó a un valor de pH de 6.5 con NaOH 1M.

2.2.6 Sustratos

Para la realización de las fermentaciones llevadas a cabo durante el transcurso de este trabajo se utilizaron los siguientes sustratos: bagacillo de caña sin ningún pretratamiento físico ni químico, obtenido de una zona cañera del estado de Morelos; cáscara de limón proveniente de Colima; dextrosa anhidra Baker (Glucosa); D-xylosa Merck; carboximetilcelulosa sal de sodio Sigma; carboximetilcelulosa CM23 Whatman; celulosa microcristalina o Avicel Merck y xilanos purificados de madera de lárice de la compañía Sigma. La concentración utilizada de cada uno de estos sustratos se indica en la discusión de resultados. Los sustratos se esterilizaron independientemente de las sales y a cada uno de ellos se les ajustó el pH a 6.5 con NaOH 1M y ácido sulfúrico al 10% v/v.

Para obtener los medios de fermentación que se usaron en este trabajo se mezclaron en matraces Erlenmeyer de 500 ml la urea, el medio salino, y la fuente de carbono, estos últimos previamente esterilizados y con pH de 6.5, hasta hacer un volumen de 200 ml. Esto se llevó a cabo en una campana de flujo laminar en condiciones estériles para evitar la contaminación de los medios.

2.3 Producción de xilanasas extracelulares

2.3.1 Preparación del inóculo

Para la propagación de la cepa y obtención de esporas se usaron los medios MC, MX con sales grado reactivo y grado industrial. Se sembró en las cajas por el método de estría y se incubaron a 37°C durante 96 horas en una agitadora incubadora New Brunswick Scientific. Las esporas obtenidas se recogieron con ayuda del asa de siembra y se depositaron en un volumen de agua estéril del que se tomaron muestras para leer la densidad óptica a en un espectrofotómetro Spectronic 21D Milton Roy. El inóculo para todas las fermentaciones fue de 1.8 D.O/ml a 540 nm. Para conservar el inóculo utilizado en las resiembras se colocaron las esporas en MG manteniéndolas en congelación. Todo el procedimiento se llevó a cabo en condiciones estériles.

2.3.2 Condiciones de cultivo para la obtención fermentativa de xilanasas.

Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 200 ml del medio MSM utilizando sustratos mencionados y 1 ml de inóculo. Se incubaron a 37° en un agitador

orbital (New Brunswick Scientific) a 200 rpm. Durante la fermentación se tomaron alícuotas de 8 ml a 10 ml a diferentes tiempos.

2.3.3 Obtención del filtrado libre de células (F)

A cada alícuota se le midió el pH inmediatamente después de tomar la muestra. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 5000 rpm en tubos cónicos graduados de 15 ml separando la pastilla y el sobrenadante. Una parte de este se almacenó en congelación, de cada alícuota se tomaron 5 ml que fueron dializados en membranas Millipore durante 8 horas con cambios de agua cada 2 horas, en todos los casos se midió el volumen final de la diálisis para calcular el factor de dilución en caso de que fuera necesario. De esta manera se obtuvo el filtrado libre de células (F) que se utilizó para cuantificar la actividad xilanolítica y, donde lo señale el texto, la actividad celulolítica.

2.4 Cuantificación de la actividad xilanolítica extracelular.

2.4.1 Método del Azul brillante de Remazol-xilanos para la determinación de actividad endoxilanolítica extracelular.

Reactivos:

4-O-Methyl-D-Glucorano-D-Xylan-Remazol Brilliant Blue (RBB-X) de Sigma.

Ácido Acético Glacial 0.1M pH 5.4

RBB-X en Buffer 0.1M pH 5.4

El Remazol Brilliant Blue-Xilan es un sustrato soluble cromogénico específico para xilanasas.

Procedimiento

-Se colocan 0.25 ml de la solución Buffer acetatos 0.1M pH 5.4 con RBB-X en un microtubo para centrifuga con volumen de 1.5ml, se preincuba 3 minutos a 30°C y después se adicionan 0.25 ml de Filtrado, se agita ligeramente y el sistema se incuba a 30°C. La reacción se detiene con 1 ml. de etanol absoluto y se deja reposando 30 minutos en un cuarto de temperatura ambiente; posteriormente las muestras se centrifugan a 5000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se lee en un espectrofotómetro a 595 nm.

2.4.2 Método del DNS (Ácido Dinitrosalicílico)

Reactivos para la preparación del DNS

a)NaOH	1.40%
b)3,5-DNS	0.75%
c)Tartrato de Sodio y Potasio	10.00%
d)Fenol	0.54%
e)Metabisulfito de Sodio	0.59%

Buffer Citratos pH 4.8, 0.078M con Xilanos al 0.75%

Ácido Cítrico 0.078M

Citrato de Sodio 0.078M

Xilanos de lardo (Sigma) 0.75 %

Agua Destilada.

El sistema de reacción se compone de 1 ml de buffer citratos y agua, el cual se preincuba 5 minutos a 50°C, después se adiciona el volumen de F necesario para completar 2 ml en el tubo de ensayo (se usaron volúmenes de 0.1 y 0.5 ml). El sistema se incuba a 50°C durante diferentes tiempos y para detener la reacción se adicionan 3.0 ml de DNS. Las muestras se ponen 5 minutos a baño maría, después se les adicionan 15 ml de agua y se agitan para homogeneizar, posteriormente se leen las muestras en espectrofotómetro para cuantificar los azúcares reductores obtenidos. La lectura de los azuceres reductores liberados se llevó a cabo en un espectrofotómetro Spectronic 21D Milton Roy a 550 nm. La actividad xilanolítica se expresa en unidades volumétricas (U/ml) las cuales equivalen a los micromoles de D-xilosa liberadas por 1 ml de filtrado libre de células en un minuto de reacción enzimática bajo las condiciones de reacción indicadas en el texto usando como referencia una curva patrón de micromoles de D-Xilosa.

2.5 Cuantificación de la actividad celulolítica extracelular sobre papel filtro.

Buffer citratos 0.1 M pH 4.8

Ácido Cítrico 0.1M

Citrato de Sodio 0.1M

Papel filtro Whatman No 1 en tiras de 6 cm x 1 cm(50 mg)

El sistema de reacción se compone de 1 ml de buffer citratos, agua y una tira de papel filtro, el cual se preincuba 5 minutos a 50°C, después se adiciona el volumen de F necesario para completar 2 ml en el tubo de ensayo (se uso un volumen de 0.5 ml). El sistema se incuba a 50°C durante 60 minutos y para detener la reacción se adicionan 3.0 ml de DNS. Las muestras se ponen 5 minutos a baño maría, después se les adicionan 15 ml de agua y se agitan para homogeneizar, posteriormente se leen las muestras en espectofotómetro para cuantificar los azúcares reductores obtenidos. La lectura de los azúcares reductores liberados se llevó a cabo en un espectrofotómetro Spectronic 21D Milton Roy a 550 nm. La actividad celulolítica se expresará en unidades volumétricas (U/ml) las cuales equivalen a los micromoles de D-glucosa liberadas por 1 ml de filtrado libre de células en un minuto de reacción enzimática bajo las condiciones de reacción indicadas en el texto usando como referencia una curva patrón de micromoles de D-glucosa.

3.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Obtención de esporas para el inóculo

Para llevar a cabo el objetivo propuesto en este trabajo utilizamos esporas de *Streptomyces sp CH-M-1035* en suspensión como inóculo para los experimentos de fermentación sumergida. En primer lugar se consideró importante conocer el efecto de diferentes medios de cultivo sólido sobre la esporulación del *Streptomyces*, para seleccionar de estos el medio en el que se obtuviera la mejor esporulación. Para tal efecto utilizamos medio completo (MC), medio mínimo con xilanos (MMX) con sales grado reactivo y sales grado industrial así como PDA, además de utilizar un intervalo de pH entre 5.6 y 7.0. En el cuadro 2 se muestran los resultados cualitativos de la esporulación relativa obtenida en cada uno de los medios probados.

CUADRO 2
Obtención de esporas de *Streptomyces sp CH-M-1035*

MEDIOS DE CULTIVO	pH	ESPORULACION
Medio completo	6.5	++
Medio completo	7.0	++
MMX grado reactivo	6.5	++++
MMX grado reactivo	7.0	+++
MMX grado industrial	6.5	+++
MMX grado industrial	7.0	++
PDA	5.6	+

Las cajas se incubaron a 37°C durante 4 días. Esporulación mala (+); regular (++); buena (+++); muy buena (++++). La escala es relativa ya que se consideró el crecimiento en medio con xilanos como el mejor, asignándole la mayor puntuación.

El PDA se utilizó como un medio de referencia ya que comúnmente se utiliza para la propagación de hongos. Por lo tanto este medio fue el menos apropiado para la obtención de esporas de *Streptomyces sp CH-M-1035*, ya que la esporulación resultó muy pobre con respecto a los otros medios utilizados y las esporas ahí obtenidas fueron difíciles de recoger. En MC la esporulación del microorganismo fue regular con respecto a la obtenida en los otros medios sólidos y no hubo diferencia en la esporulación obtenida con los dos valores de pH. Las esporas obtenidas en MC son difíciles de recoger ya que se encuentran adheridas a el agar y es común tomar porciones de micelio al recogerlas. Mayores diferencias se observaron al utilizar MMX, donde hubo una mayor esporulación cuando el microorganismo creció en MMX con sales grado reactivo que cuando lo hizo en MMX con sales grado industrial. En ambos casos hubo una mejor esporulación cuando el pH del medio fue de 6.5, ya que a pH de 7.0 fue menor la esporulación de la cepa. A diferencia del MC, las esporas obtenidas en MMX se encuentran en la superficie externa del medio por lo que son de fácil manipulación sin el riesgo de tomar partes vegetativas del microorganismo durante la recolección.

En un trabajo previo se había establecido que esta cepa de *Streptomyces* era capaz de crecer en medio sólido con xilanos como única fuente de carbono (Jiménez G, comunicación personal). Los resultados del **cuadro 2** confirman lo anterior y además muestran que se favorece la esporulación de *Streptomyces sp CH-M-1035* al utilizar medio salino mínimo con xilanos con sales grado reactivo y a pH de 6.5. La mayor esporulación posiblemente se deba a que por limitación de nutrientes presentes en el medio, se crea una situación de estrés ambiental que lleva al microorganismo a interrumpir su desarrollo somático para dar lugar a la esporulación. Esta condición resulta ventajosa para la obtención de esporas con las cuales preparar los inóculos para las fermentaciones a realizar en esta investigación. Por estas razones decidimos en lo subsecuente utilizar el medio mínimo con xilanos y sales grado reactivo con pH 6.5 para la obtención de esporas para la preparación de los inóculos, y para conservarlas en congelación las colocamos en medio con glicerol (ver Materiales y Métodos).

3.2 Selección del método para la cuantificación de la actividad xilanolítica extracelular de los filtrados libres de células de *Streptomyces sp CH-M-1035*

La selección del método para la determinación cuantitativa de la actividad xilanolítica fue necesaria, ya que esta actividad enzimática es el parámetro que nos permitió comparar la actividad obtenida por el microorganismo en diferentes condiciones de cultivo. No todos los métodos tienen igual sensibilidad de detección para las actividades xilanolíticas. Entre los métodos reportados en la bibliografía para la cuantificación de la actividad xilanolítica se encuentran el método del DNS, el cual mide los azúcares reductores resultantes del rompimiento de los xilanos por la acción de las xilanasas y el otro es el del azul brillante de Remazol-xilanos. La medición de la actividad enzimática de este último se estima por la cantidad de colorante unido a los xilanos que es liberado por la acción de las xilanasas. Las moléculas así liberadas del azul brillante de Remazol-xilanos, separadas por la precipitación con alcohol de los xilanos, se cuantifican fotométricamente (Biely, 1985; Biely et al, 1992).

Decidimos comparar el método del DNS con el del azul brillante de Remazol-xilanos ya que ambos métodos han sido reportados como adecuados para la cuantificación de las endoxilanasas. Del resultado de esta comparación seleccionamos el método más conveniente para la determinación de la actividad enzimática de los filtrados obtenidos durante esta investigación.

En la **figura 1a** se observan los resultados de la acción de las xilanasas de *Streptomyces sp CH-M-1035* sobre el sustrato azul brillante de Remazol-xilanos, también se observan los resultados de la liberación del colorante en una curva similar a la anterior en la que se sustituyó la enzima por un volumen igual de agua destilada con el fin de saber si el sustrato se mantenía estable a través del tiempo de incubación en el sistema de reacción utilizado. Al adicionar la enzima hay liberación rápida de color y a partir de los diez minutos de incubación los incrementos de la absorbancia ya no son tan grandes. Cuando no hay adición de filtrado enzimático, se observa una liberación de color desde el inicio de la curva, pero los incrementos más grandes de absorbancia se presentan a los 25 y 30 minutos. En la **figura 1b** se presentan los resultados de la detección de la actividad xilanolítica

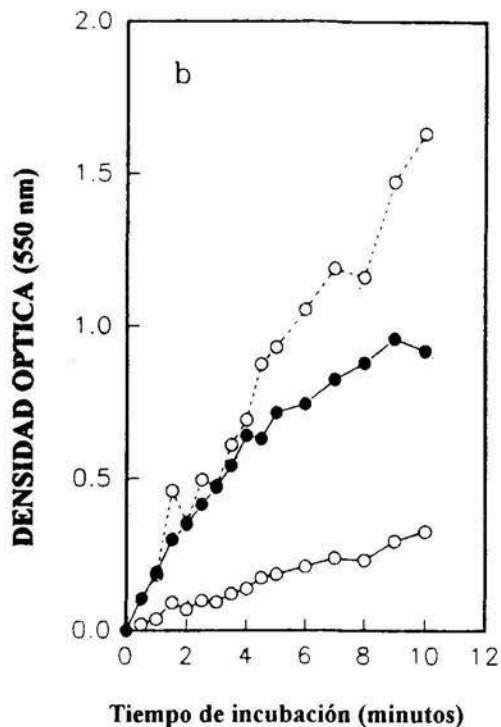
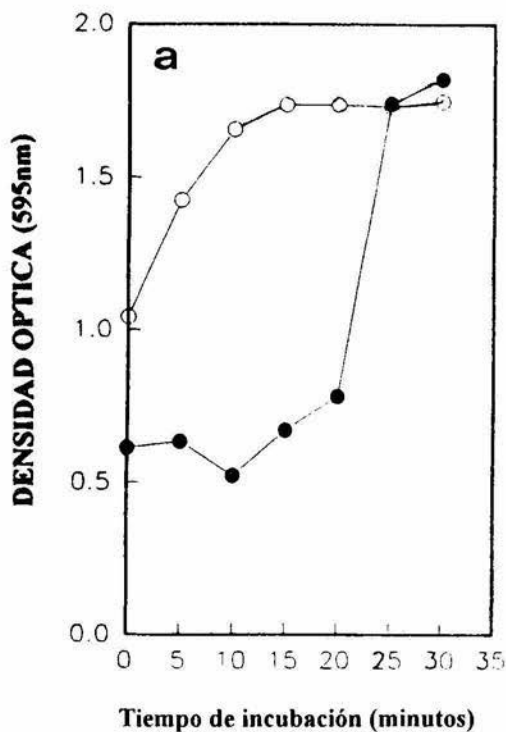


Fig. 1 Comparación de los métodos DNS y azul brillante de Remazol-xilanos para la determinación de la actividad xilanólítica extracelular de filtrados libres de células y dializados de *Streptomyces sp CH-M-1035* crecido en xilanos al 1%.

a) Curvas de progreso utilizando como sustrato el Azul brillante de Remazol-xilanos. Con filtrado enzimático (○), sin filtrado enzimático (●).

b) Curvas de progreso de la actividad xilanólítica extracelular por el método del DNS utilizando xilanos purificados como sustrato. Con 0.5 ml de filtrado (●); con 0.1 ml de filtrado (○); con los valores de la curva con 0.1 ml multiplicados por 5 (○---○).

por medio del método del DNS. Se observan las curvas de progreso con intervalos cortos en los tiempos de incubación y usando dos diferentes volúmenes de filtrado (0.1 ml y 0.5 ml) para tener un seguimiento del comportamiento enzimático de las xilanasas presentes en los filtrados libres de células de nuestra cepa de *Streptomyces* y, así, seleccionar el volumen de filtrado y tiempo de incubación que nos permitan obtener valores más precisos de la actividad xilanolítica extracelular producida en diferentes condiciones. Como se puede apreciar hay una diferencia considerable entre los valores obtenidos de la utilización de 0.1 ml y 0.5 ml de filtrado. Aunque se presenta un incremento en la absorbancia no se observa una proporcionalidad entre la actividad con 0.1 ml y la de 0.5 ml después de los 4 minutos. Esto es debido a que al multiplicar por cinco los valores del primero, después de los 4 minutos de incubación, se van separando mucho las dos curvas porque los valores de la alícuotas de 0.5 ml no se mantienen en línea recta.

Cabe señalar que autores como Kluepfel en 1986 y Jhonson en 1988, utilizaron para la cuantificación de la actividad xilanolítica 10 o 15 minutos como tiempo de incubación y el volumen de enzima que llegan a utilizar no lo establecen con claridad en los artículos publicados. Generalmente, estos autores indican que los filtrados en los que cuantifican la actividad xilanolítica están diluidos, sin que mencionen el grado de dilución utilizado ni los ajustes en los cálculos de la actividad reportada (Grabsky and Jeffries, 1991; Kluepfel et al, 1986; Marui et al, 1985; Nakajima et al, 1984; Jhonson et al, 1988; Ishaque and Kluepfel, 1981). En cuanto a la metodología, solamente Morosoli con *Streptomyces lividans*, Vyas con *Streptomyces VP-5* y Kluepfel con *Streptomyces flavogriseus* utilizan el método del DNS para la cuantificación de la actividad xilanolítica, ya que otros autores utilizan el método de Somogyi-Nelson para la cuantificación de la misma.

En conclusión podemos decir que para la cuantificación de las xilanasas de *Streptomyces sp CH-M-1035* no es de utilidad el método del azul brillante de Remazol-xilanos por la liberación no enzimática del colorante. Esta formación de color posiblemente sea consecuencia del rompimiento de los enlaces de la molécula del colorante con el sustrato debido a las condiciones físicas y químicas del ensayo. En relación al método del DNS

consideramos que es útil en este estudio si se usa en intervalos de incubación no mayores de 4 minutos, de tal forma que se puedan detectar diferencias en la producción de actividad xilanolítica extracelular de los filtrados de *Streptomyces sp CH-M-1035*, tanto en el tiempo de fermentación como en las diferentes condiciones de cultivo usadas.

3.3 Obtención fermentativa de xilanasas extracelulares de *Streptomyces sp CH-M-1035* a partir de bagacillo de caña, xilanos y otros sacáridos solubles.

3.3.1 Producción de xilanasas utilizando como sustrato xilanos purificados

Previamente se había establecido la capacidad de la cepa *Streptomyces sp CH-M-1035* para crecer en placas de medio sólido con xilanos como única fuente de carbono (Jiménez G., comunicación personal). Sin embargo, por razones ajenas a este trabajo, las esporas de esta cepa se mantuvieron almacenadas en congelación durante cierto tiempo. Por tal motivo antes de iniciar la evaluación de la producción de enzimas xilanolíticas en bagacillo de caña de azúcar consideramos necesario, en primer lugar, probar su capacidad de producción de xilanasas extracelulares utilizando xilanos purificados como sustrato.

En la **figura 2** se muestran los resultados de esta fermentación. Al utilizar xilanos al 1% la producción de xilanasas va incrementándose paulatinamente desde tiempo cero, donde no se detecta actividad enzimática, hasta alcanzar a las 60 horas la máxima actividad reportada que corresponde a 4.2 U/ml. Posteriormente, en la última etapa de la fermentación, disminuye la actividad llegando a un valor de 3.4 U/ml a las 120 horas. Los valores de pH tienden a disminuir durante las primeras 45 horas y posteriormente se vuelven más básicos alcanzando valores de 8. Con xilanos al 2% hubo menor producción de xilanasas pues los valores de actividad no son mayores de 0.2 U/ml durante las primeras 55 horas, después de este tiempo aumenta la actividad cuantificada para alcanzar a las 90 horas la mas alta actividad de esta gráfica que corresponde a 0.8 U/ml; los valores de pH se mantuvieron constantes durante la fermentación.

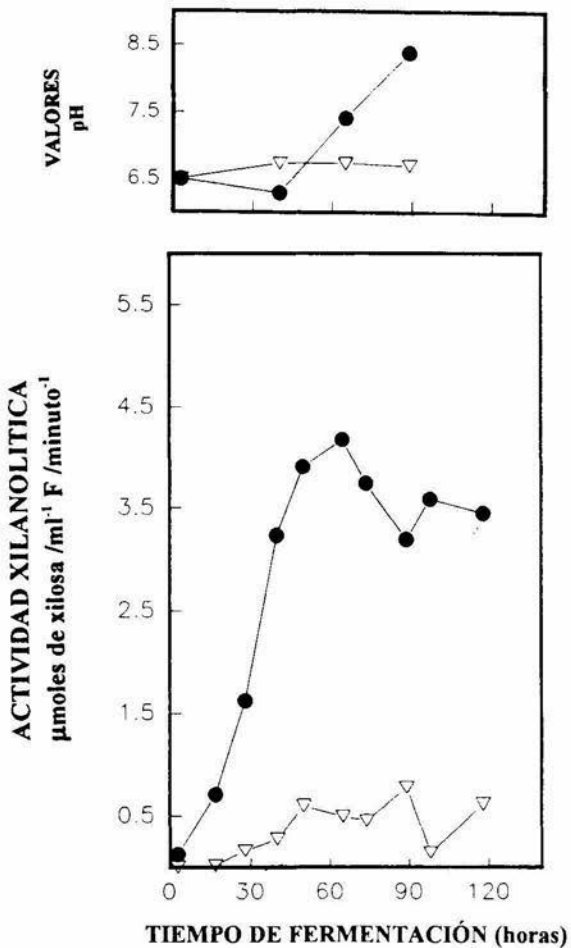


Fig. 2 Producción de xilanasas extracelulares de *Streptomyces sp CH-M-1035* crecido sobre xilanos purificados como única fuente de carbono en matraces agitados a 200 rpm y 37°C. La cuantificación de la actividad xilanolítica extracelular se determinó en alícuotas de filtrados libres de células dializados. Xilanos al 1% (●), xilanos al 2% (▽)

Ya se ha mencionado que la hidrólisis de los xilanos se lleva a cabo extracelularmente en el medio que rodea al microorganismo. Como resultado de esta hidrólisis se producen oligómeros de xilosa de diferentes longitudes (xilobiosa, xilotriosa, xilotetraosa etc) que son consumidos por los microorganismos. Sin embargo es posible que la velocidad de consumo de estos oligómeros sea lenta con respecto a la hidrólisis de los xilanos presentes en el medio por lo cuál comienzan a acumularse los productos de ésta hidrólisis. Es posible que en el medio donde se adicionaron los xilanos a concentración del 2% hubiese una mayor cantidad de productos acumulados en el medio resultantes de la degradación de los xilanos y que ciertos productos de esta degradación tuvieran un efecto negativo en la síntesis de enzimas xilanolíticas. Biely y colaboradores (1980) señalan que para *Cryptococcus albidus* los xilanos sirven como fuente de inductores ya que a partir de ellos se obtienen pequeños oligómeros de xilosa. Sin embargo altas concentraciones de estos oligómeros, especialmente de xilobiosa que se obtiene de la degradación de los xilanos hidrolizados en el medio de cultivo, provocan que disminuya la síntesis de enzimas xilanolíticas (Biely, 1985).

Se ha reportado en la bibliografía la utilización de xilanos purificados para la producción de xilanasas con otras especies de *Streptomyces*. Ishaque y Kluepfel (1981) trabajaron con *Streptomyces flavogriseus* y Kluepfel trabajó con *Streptomyces lividans* en 1986, en ambos trabajos se reporta la utilización de xilanos, con una concentración de 1%, como inductores para la producción de estas enzimas encontrando que los xilanos inducen la síntesis de xilanasas al igual que en esta fermentación.

De acuerdo con estos resultados se concluye que la cepa *Streptomyces sp CH-M-1035* no se vio afectada por el tiempo que estuvo almacenada en congelación conservando la capacidad de producción de xilanasas extracelulares, similar a la reportada cuando fue aislada y seleccionada de entre muchas otras cepas (Jiménez G., comunicación personal), utilizando xilanos purificados como única fuente de carbono.

3.3.2 Efecto de los desechos agroindustriales bagacillo de caña y cáscara de limón en la producción de xilanasas extracelulares de *Streptomyces sp CH-M-1035*.

Comprobada la capacidad de producción de xilanasas extracelulares de *Streptomyces sp CH-M-1035* sobre xilanos purificados, evaluamos la producción de estas enzimas utilizando como sustratos desechos agroindustriales. El trabajo se enfocó en la utilización de bagacillo de caña de azúcar sin ningún pretratamiento físico ni químico y cáscara de limón, ya que ambos desechos agroindustriales son abundantes, renovables se manejan como basura y se producen en México. El bagacillo tiene de un 30% a un 35% de hemicelulosas de las cuales de un 60% a un 80% son xilanos, además fue el medio natural del cual se aisló esta cepa por lo que consideramos que es un buen sustrato para la inducción de xilanasas por *Streptomyces sp CH-M-1035*. La cáscara de limón ha sido utilizada como sustrato para la producción de pectinasas y celulasas ya que la pectina es el polisacárido predominante de este desecho (Monroy et al, 1990), sin embargo se desconoce su contenido de xilanos por lo que consideramos interesante utilizarlo como referencia para comparar la producción de las xilanasas obtenidas con el bagacillo de caña.

En la **figura 3** se muestran los resultados de esta fermentación hecha con bagacillo de caña de azúcar (BC) y cáscara de limón (CL) utilizando concentraciones de 1% y 2% para ambos sustratos. Hubo producción de xilanasas al utilizar bagacillo de caña como sustrato; con la concentración de 1% hubo incremento progresivo durante el transcurso de la fermentación alcanzando el máximo valor de esta actividad, que corresponde a 5.2 U/ml, a las 90 horas. Después disminuye la actividad para recuperarse en el último tiempo finalizando la fermentación con una actividad de 5.4 U/ml. Los valores de pH durante las primeras 20 horas fueron más ácidos que el pH inicial, pero después de las 30 horas y hasta el final de la fermentación volvieron a un valor de 6.5 aproximadamente. Cuando se utilizó bagacillo al 2% se alcanzó más rápidamente la máxima actividad pues a las 30 horas hubo una actividad de 4.2 U/ml y después de este tiempo los valores cuantificados de la actividad xilanólítica se mantuvieron en un intervalo de 3.8 U/ml a 4.2 U/ml hasta el término de la

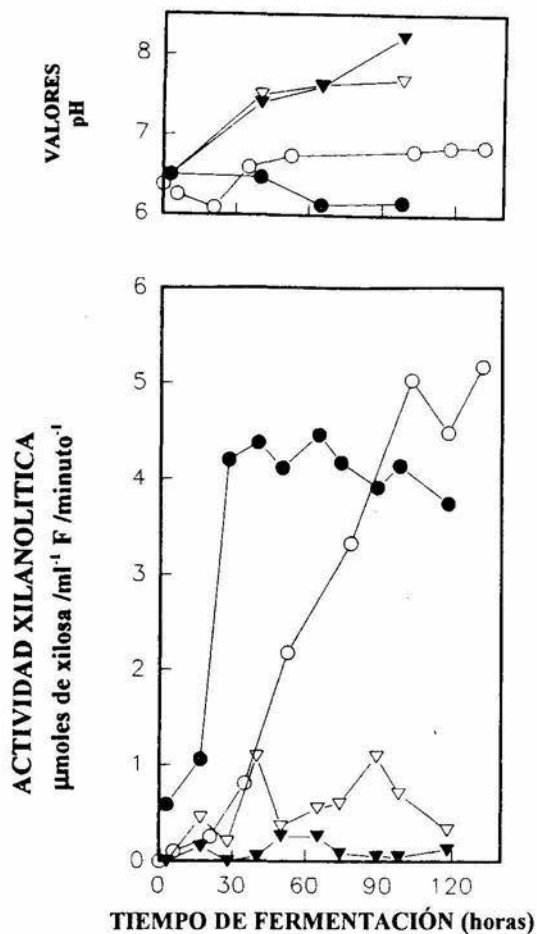


Fig. 3 Efecto de desechos agroindustriales como única fuente de carbono en la producción de xilanasas extracelulares de *Streptomyces sp CH-M-1035* en matraces agitados a 200 rpm y 37°C. La cuantificación de la actividad xilanolitica se determinó en alícuotas de filtrados dializados libres de células. Bagacillo de caña al 1% (O); bagacillo de caña al 2% (●), cáscara de limón al 1% (▽), cáscara de limón al 2% (▼).

fermentación. En el transcurso de esta fermentación los valores de pH fueron tornándose más ácidos que el pH inicial.

También se registró actividad xilanolítica cuando se usó como fuente de carbono cáscara de limón (CL) pero los valores fueron más bajos que al utilizar bagacillo de caña. Con CL al 1% los valores de actividad enzimática fueron menores de 0.5 U/ml salvo a las 40 y 90 horas de fermentación, tiempos en los que se detectó una actividad de 1.0 U/ml. La actividad cuantificada en los filtrados de la fermentación con CL al 2% es aún más baja que en el caso anterior ya que, si bien se detecta actividad enzimática, los valores de esta actividad no sobrepasan las 0.2 U/ml. Los valores de pH en ambas fermentaciones se vuelven más alcalinos en el transcurso de la fermentación pero el pH final de CL al 1% es de 7.5 mientras que el de CL al 2% es de 8.2. Como se puede apreciar en las gráficas de la **figura 3**, si bien hay producción de xilanasas con los dos desechos agroindustriales, se obtienen mejores resultados al utilizar bagacillo de caña que al utilizar cáscara de limón.

Esto puede explicarse considerando que el *Streptomyces sp CH-M-1035* fue aislado del suelo de una zona de cultivo intensivo de caña (ver Materiales y Métodos). En esta región se depositan al aire libre grandes cantidades de bagacillo de caña el cual es degradado naturalmente por este microorganismo entre otros. Esta capacidad del *Streptomyces sp CH-M-1035* para degradar en la naturaleza al bagacillo de caña implica que ha sido objeto de la selección natural para su aprovechamiento, por lo que está adaptado y tiene las enzimas xilanolíticas necesarias para llevar a cabo la hidrólisis de los xilanos contenidos en este desecho agroindustrial. Además es posible que los xilanos contenidos en el bagacillo de caña se encuentren expuestos al ataque enzimático de las xilanasas extracelulares debido al tamaño de partícula que tiene la fibra del bagacillo y a que este desecho ya ha sido sometido a diversos tratamientos físicos y químicos para la extracción del azúcar por lo que los otros polisacáridos contenidos en las fibras del bagacillo es posible que estén tan fragmentados que no actúen como barrera física que proteja a los xilanos de la actividad de las enzimas xilanolíticas. De tal manera es factible que algunos de estos fragmentos de estos xilanos expuestos actúen como inductores para la síntesis de xilanasas de *Streptomyces sp CH-M-*

1035 y a su vez estas xilanasas extracelulares encuentren pocas barreras físicas, lo que les permite hidrolizar los xilanos presentes en las fibras del bagacillo de caña de azúcar.

A diferencia del bagacillo de caña, del que se conoce el contenido de xilanos, en la cáscara de limón no se conoce el contenido de éstos pero se sabe que la pectina es el polímero predominante (Monroy et al, 1990). Es probable que los xilanos presentes, además de ser escasos, sean inaccesibles a la acción de las enzimas xilanolíticas por la presencia de la pectina, dificultándose la inducción de la síntesis de xilanasas por lo problemático que puede ser la obtención de inductores.

En cuanto a los resultados obtenidos con bagacillo de caña, resulta claro que con ambas concentraciones se obtuvo una buena producción de xilanasas ya que con BC al 1% se obtuvo una actividad de 5.2 U/ml que es mayor que cualquiera de las obtenidas con BC al 2%, pero el tiempo en el que se obtuvo la mayor actividad en BC al 2% es a las 30 horas a diferencia de BC al 1 % donde hasta las 90 horas se alcanza la máxima actividad. Sin embargo, consideramos más práctico trabajar con BC al 1% ya que este sustrato absorbe gran cantidad de agua, por lo que el manejo de las muestras es más fácil con BC al 1%. Además, al tomar las muestras se va concentrando más el medio en el que se tiene BC al 2% por lo que es difícil comparar los resultados obtenidos con BC al 1 % donde el filtrado enzimático se encuentra más diluido.

Son pocos los trabajos reportados en la bibliografía en los que se utilizan desechos agroindustriales para la producción de xilanasas de *Streptomyces*, menos aún en los que se utiliza bagazo de caña de azúcar y no encontramos ningún reporte donde se utilice bagacillo de caña de azúcar para la producción de filtrados con xilanasas extracelulares libres de celulasas. Van Zyl en 1985 reportó la utilización del bagazo de caña para la producción de enzimas pero enfocado a las celulasas mencionando que por el análisis de productos de hidrólisis en los que se detectaron xilosa y oligómeros de xilosa se supone la presencia de xilanasas. En 1988 Jhonson utilizó bagazo de caña para la producción de xilanasas. Otros autores reportan la utilización de otro tipo de desechos agroindustriales como MacKenzie en 1985, quien utilizó fibra de trigo para la producción de xilanasas al igual que Ishaque y

Kluepfel en 1981, quienes utilizaron heno como sustrato para la producción de estas enzimas. Por los resultados obtenidos en esta fermentación podemos concluir que el *Streptomyces sp CH-M-1035* es capaz de producir xilanasas extracelulares utilizando los desechos agroindustriales bagacillo de caña y cáscara de limón, que se producen en nuestro país, como única fuente de carbono siendo mejor inductor para la síntesis de las mismas el bagacillo de caña que la cáscara de limón.

3.3.3 Comparación de la producción de xilanasas de *Streptomyces sp CH-M-1035* utilizando bagacillo de caña y xilanos purificados.

En la **figura 4** se comparan las actividades enzimáticas de las xilanasas extracelulares de *Streptomyces sp CH-M-1035* obtenidas con xilanos y bagacillo de caña al 1% en las fermentaciones anteriormente discutidas. Como se puede observar el comportamiento de ambas gráficas es semejante pero es en los filtrados del medio con bagacillo de caña al 1% donde se obtiene la mayor actividad enzimática. La máxima actividad obtenida con bagacillo de caña es de 5.2 U/ml, mientras que con xilanos la actividad más alta es de 4.2 U/ml, valor que representa un 80% de la actividad conseguida con el bagacillo de caña. Es posible que al crecer el microorganismo en xilanos haya una mayor acumulación de los productos finales en el medio que afecten negativamente la síntesis de xilanasas mientras que con bagacillo de caña haya una menor acumulación de estos productos y de esta manera no se afecta de igual manera la síntesis de xilanasas.

Considerando que la cantidad de sustrato inductor es mayor en el medio con xilanos purificados que en el medio con bagacillo de caña (el cual contiene otros polisacáridos como la celulosa además de los xilanos) resulta interesante que se detectara una mayor actividad de actividad xilanólítica con bagacillo de caña como sustrato que con xilanos purificados.

La inducción de xilanasas extracelulares de *Streptomyces sp CH-M-1035* se da tanto con xilanos purificados como con bagacillo de caña. Es posible que a pesar de la mayor cantidad de sustrato inductor presente en el medio con xilanos, el consumo de los productos de esta hidrólisis se hubiese dado lentamente en relación con el tiempo de fermentación, de tal forma que la acumulación de estos productos finales en el medio afectaran negativamente la

síntesis de xilanasas. Biely y colaboradores (1980) señalan que el efecto inductivo de ciertos oligómeros de xilosa puede ser dependiente de la concentración de estos en el medio y que altas concentraciones de estos inductores dan como resultado una menor síntesis de xilanasas. En el caso del bagacillo de caña los xilanos presentes no se encuentran tan disponibles como en el medio con los xilanos purificados así que es probable que sincronizado con la síntesis de xilanasas el microorganismo vaya consumiendo los productos de la hidrólisis de los xilanos, evitando su acumulación y permitiendo que continúe la síntesis de xilanasas.

Además, cabe recordar que la composición química de los xilanos varía dependiendo de su origen por lo que es diferente el tipo y proporción de sustituyentes que presentan los xilanos del bagacillo de caña y los xilanos purificados. Los residuos L-arabinofuranósidos predominan en los xilanos de gramíneas como el bagacillo de caña de azúcar mientras que los xilanos de maderas como el lárice tienen altos contenidos de ácido D-glucorónico y sus derivados (ver página 6). Como ya se mencionó el *Streptomyces sp CH-M-1035* está adaptado naturalmente para utilizar el bagacillo de caña por lo que cuenta con las enzimas xilanolíticas necesarias para la hidrólisis de los xilanos de este desecho agroindustrial. Es posible que por su composición química los xilanos de madera aquí utilizados no sean igual de eficientes que los xilanos que se encuentran en el bagacillo de caña para la inducción de las xilanasas de *Streptomyces sp CH-M-1035*.

Jhonson (1988) al trabajar con varias cepas de *Streptomyces* usó como sustratos para la producción de xilanasas bagazo de caña además de cascarilla de trigo y otros sustratos purificados. Obtuvo los valores más bajos de actividad xilanolítica con bagazo y los más altos con los xilanos purificados. Otros autores reportan la utilización de otro tipo de desechos agroindustriales como MacKenzie (1985), quien utilizó además de sustratos purificados fibra de trigo para la producción de xilanasas aunque la mejor producción la obtiene con los xilanos de avena; Ishaque y Kluepfel (1981) usaron xilanos purificados y heno como sustratos para la producción de xilanasas obteniendo la mejor producción con

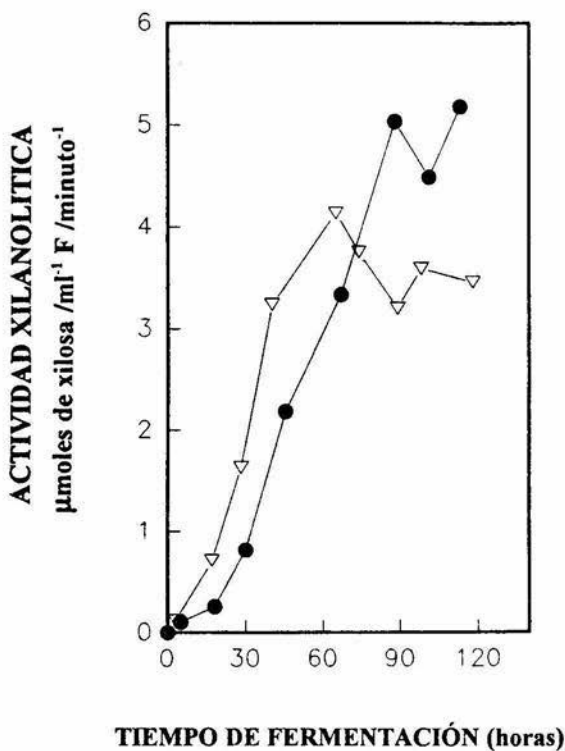


Fig. 4 Comparación de la producción de xilanasas extracelulares de *Streptomyces sp CH-M-1035* utilizando como única fuente de carbono bagacillo de caña de azúcar y xilanos purificados. La cuantificación de la actividad xilanolítica extracelular se determinó en alícuotas de filtrados dializados libres de células. Bagacillo de caña al 1% (●); xilanos al 1% (▽).

xilanos purificados. En nuestro trabajo sucede lo contrario a lo reportado en los trabajos mencionados anteriormente, ya que se obtiene una mejor producción con el desecho agroindustrial bagacillo de caña que con xilanos purificados. Como se puede apreciar en la **figura 4** es claro que el bagacillo de caña de azúcar fue mejor sustrato inductor para la producción de xilanasas que los xilanos purificados. Además es interesante la capacidad del *Streptomyces sp CH-M-1035* para llevar a cabo una mayor producción de xilanasas utilizando el bagacillo de caña sin ningún pretratamiento en lugar de los xilanos purificados, ya que la utilización de este desecho agroindustrial para la obtención de xilanasas a diferentes niveles de producción es una alternativa con potencial para realizarse a futuro con la utilización del *Streptomyces sp CH-M-1035* el cual puede utilizar este sustrato para producir xilanasas extracelulares.

3.3.4 Efecto de la adición de glucosa y xilosa en la producción de xilanasas extracelulares por *Streptomyces sp CH-M-1035* crecido en bagacillo de caña de azúcar.

Por los valores de actividad enzimática obtenidos con bagacillo de caña (BC) al 1% consideramos importante evaluar el efecto de la adición de monosacáridos en la producción de estas enzimas al utilizar este desecho como única fuente de carbono. Fueron seleccionados glucosa y xilosa ya que ambos son los monómeros constituyentes de la celulosa y los xilanos respectivamente y además son fácilmente metabolizables.

a) Glucosa

La glucosa es una molécula fácilmente metabolizable que es aprovechada por los microorganismos cuando se encuentra disponible en el medio e indirectamente reprime la síntesis de ciertas enzimas catabólicas. En la **figura 5a** se muestran los resultados del efecto de la glucosa en la producción de xilanasas utilizando bagacillo de caña como fuente de carbono. Al adicionar glucosa desde el inicio de la fermentación a concentraciones de 1% y 2% se anula la actividad enzimática en relación a la obtenida en los filtrados de los medios en los que no se adicionó glucosa. Los valores de pH en ambos casos se tornan ácidos conforme transcurre el tiempo de fermentación y a partir de las 60 horas se mantienen en un valor de 3.6 aprox. En la **figura 5b** se muestran los resultados del efecto de la glucosa

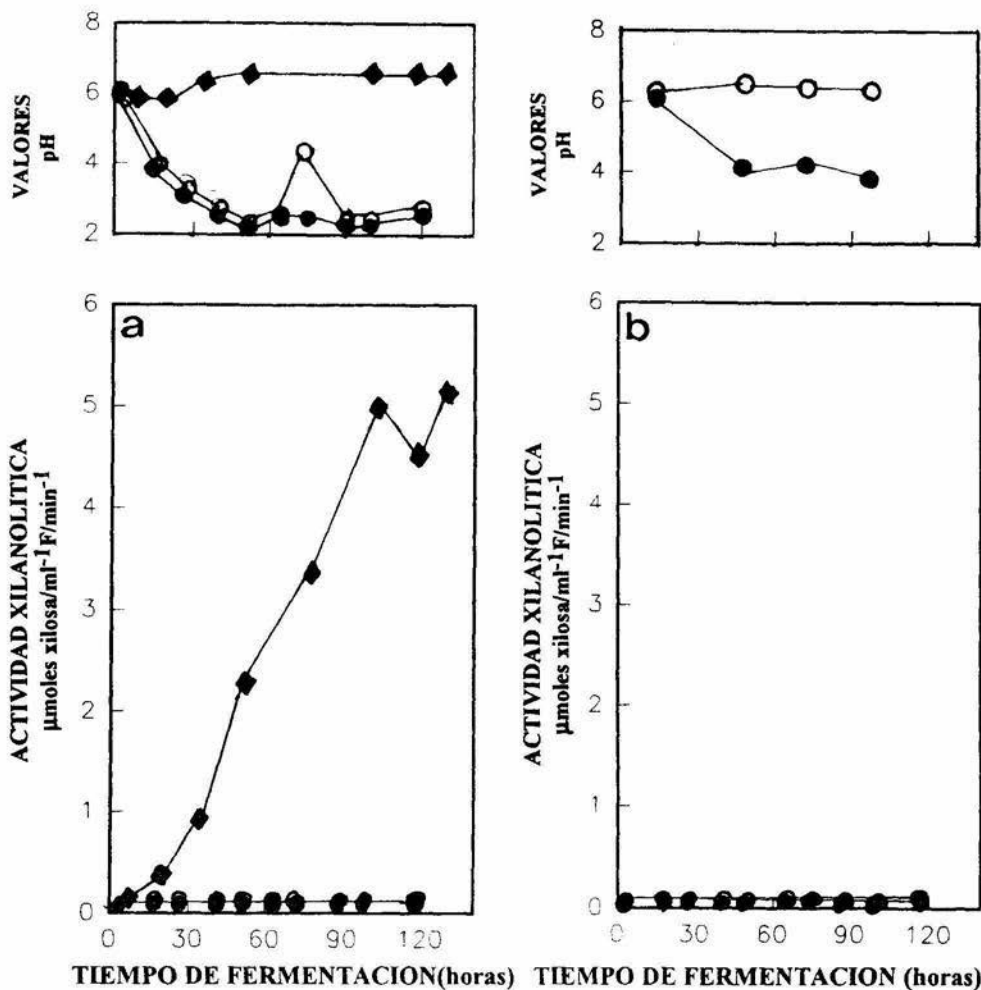


Fig. 5 Efecto de la adición de glucosa en la producción de xilanasas extracelulares de *Streptomyces sp CH-M-1035* crecido en bagacillo de caña en matraces agitados a 200 rpm y 37°C. La cuantificación de la actividad xilanolitica extracelular se determinó en alicuotas de filtrados dializados libres de células

a) Adición desde el inicio de la fermentación de glucosa a medios con bagacillo de caña al 1% como fuente de carbono. Control sin glucosa (♦); con glucosa al 1% (●); con glucosa al 2% (○).

b) Efecto de la glucosa como única fuente de carbono Glucosa al 1% (●); glucosa al 2% (○).

sobre la producción de xilanasas usando concentraciones de 1% y 2% en ausencia de bagacillo de caña de azúcar. Se puede apreciar que no se detectó actividad enzimática con glucosa en el transcurso de la fermentación con ninguna de las concentraciones utilizadas (Fig. 5b). En este caso, los valores de pH con glucosa al 1% se acidifican llegando hasta un pH de 4, mientras que con glucosa al 2% el pH no sufre variaciones durante la fermentación.

Como se puede observar, la adición de glucosa al medio con y sin bagacillo de caña tuvo el mismo efecto negativo en la producción de xilanasas extracelulares de *Streptomyces sp CH-M-1035* provocando un abatimiento total de la producción de xilanasas con respecto al medio en el que no se adicionó glucosa. Al estar la glucosa disponible en el medio, aún en presencia de un buen inductor como el bagacillo de caña, el microorganismo activa los mecanismos moleculares necesarios para introducir la glucosa al interior de la célula y utilizarla. Es posible que al igual que con las xilanasas de *Aspergillus sydowii* (Ghosh and Nanda, 1994) y *Cryptococcus albidus* (Biely et al, 1980) el consumo de glucosa afecte la concentración intracelular de AMP cíclico, dando como resultado una represión en la síntesis de xilanasas debido a la utilización de esta molécula para la fosforilación de la glucosa lo que ocasiona el bloqueo de las rutas metabólicas involucradas en la síntesis de xilanasas por medio de la represión catabólica. Se ha reportado el efecto de represión catabólica de las enzimas xilanolíticas por glucosa en las especies *Cellulomonas fimi* (Khanna and Garui, 1993), *Trichoderma longibrachiatum* (Roger and Nakas, 1989), *Trichosporon cutaneum* (Hrmová et al, 1984), *Pullularia pullulans* (Pou-Linas and Driguez, 1987), *Aspergillus sydowii* MG49 (Ghosh and Nanda, 1994) y *Schizophyllum commune* (Haltrich and Steiner, 1994).

b) Xilosa

La xilosa es uno de los productos finales de la hidrólisis de los xilanos por las xilanasas y se ha propuesto que puede actuar como represor catabólico en la síntesis de estas (Biely, 1985), así que decidimos evaluar su efecto en la producción de enzimas xilanolíticas de *Streptomyces sp CH-M-1035* crecido en bagacillo de caña como fuente de carbono. Los resultados de su adición en medios con bagacillo de caña como fuente de carbono se

muestran en la **figura 6a**. Al adicionar desde el inicio de la fermentación xilosa al 1% podemos observar que hay un incremento a tiempos cortos de la actividad xilanolítica, alcanzando el máximo valor de 1.7 U/ml a las 16 horas, después de este tiempo disminuye la actividad paulatinamente hasta el final de la fermentación. Cuando se adicionó xilosa al 1%, 24 horas después de iniciada la fermentación, el comportamiento de la actividad es semejante a la gráfica anterior alcanzando a las 27 horas alcanza su máximo valor que es de 2.08 U/ml. Posteriormente hay una caída en la actividad de la cual se recupera para alcanzar valores de más de 1U/ml de las 65 a las 89 horas, después de este tiempo la actividad disminuye hasta que concluye la fermentación. Al adicionar desde el inicio de la fermentación xilosa a concentración de 0.5% se detectó actividad xilanolítica progresiva a partir de los primeros tiempos de la fermentación y a las 60 horas aumenta bruscamente la actividad alcanzando un valor de 6 U/ml pero en el siguiente tiempo hay una caída en los valores que continúa hasta que termina la fermentación. En todos los casos los valores de pH se vuelven más ácidos manteniéndose después de las 60 horas en valores cercanos a 4.0.

Los resultados obtenidos al utilizar xilosa al 1% como única fuente de carbono, o sea sin bagacillo de caña, se muestran en la **figura 6b**. En los filtrados de las primeras 30 horas se detectaron actividades enzimáticas no mayores de 0.2 U/ml; a las 40 horas se detectó una actividad de 0.48 U/ml y en el siguiente tiempo, que fue a las 70 horas, se registró el valor más alto de esta fermentación que fue de 0.8 U/ml y después de este tiempo la actividad enzimática disminuyó ligeramente manteniéndose constante hasta el final. Los valores de pH se mantuvieron estables durante el curso de la fermentación.

La obtención de actividad enzimática con xilosa como única fuente de carbono no la esperábamos, considerando que es una molécula fácilmente metabolizable que no requiere de enzimas hidrolíticas o catabólicas como las xilanasas para poder ser utilizada. Este efecto podría explicarse tomando en cuenta la presencia de β -xilosidasas en *Streptomyces sp CH-M-1035* (Dra. Flores M. E., comunicación personal) que es otro componente enzimático de las xilanasas, que además de su actividad hidrolítica sobre los dímeros de xilosa, es capaz de llevar a cabo la reacción reversa cuando hay suficiente xilosa en el medio, es decir de

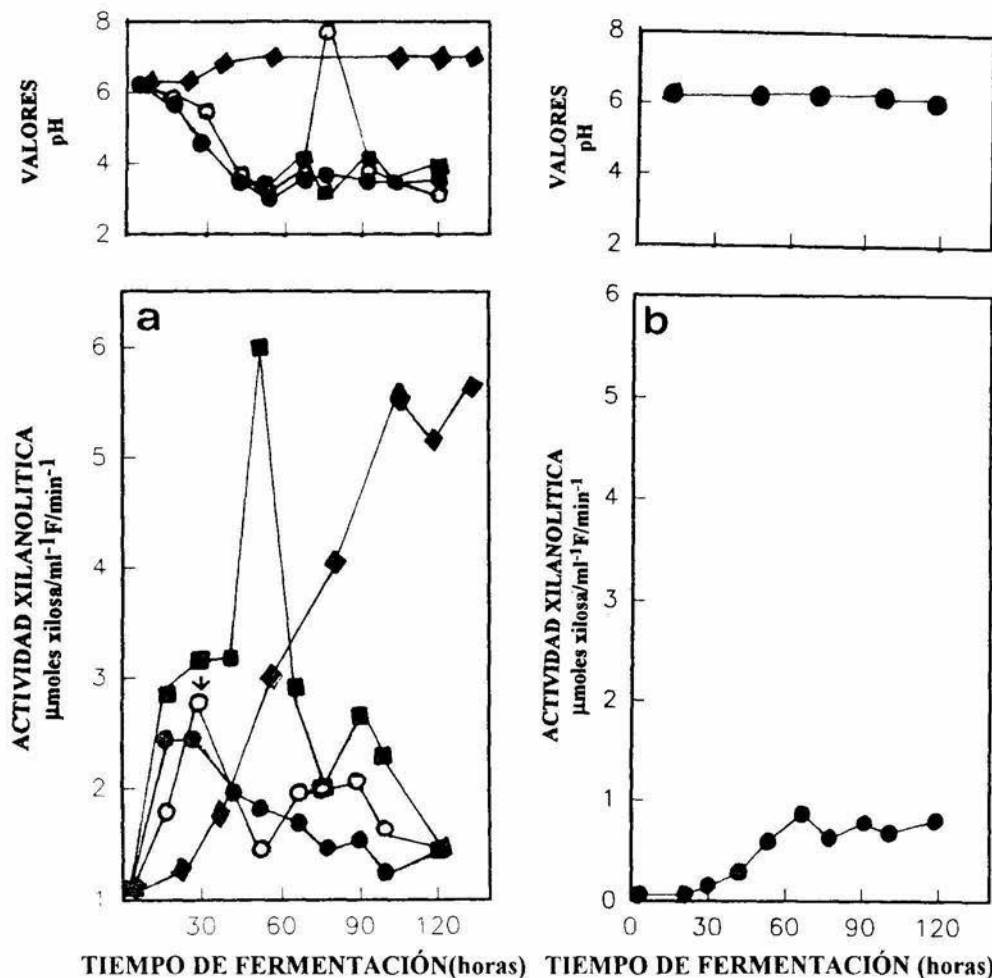


Fig. 6 Efecto de la adición de xilosa en la producción de xilanasas extracelulares de *Streptomyces sp* CH-M-1035 crecido en bagacillo de caña en matraces agitados a 200 rpm y 37°C. La cuantificación de la actividad xilanolitica extracelular se determinó en alícuotas de filtrados dializados libres de células

a) Adición de xilosa a medios con bagacillo de caña al 1% como fuente de carbono. Control sin xilosa (◆); con xilosa al 1% desde el inicio de la fermentación(●); con xilosa al 1% adicionada 24 horas después de iniciada la fermentación como lo indica la flecha (O); con xilosa al 0.5% desde el inicio de la fermentación (■)

b) Efecto de la xilosa al 1% como única fuente de carbono sin bagacillo de caña (●).

transxilosidación, dando como productos de esta reacción xilooligómeros de hasta 5 moléculas con diferentes tipos de enlaces β (Win et al, 1988). Se ha propuesto que posteriormente estos pequeños oligómeros de xilosa pueden actuar como inductores para la síntesis de xilanasas extracelulares. Aún cuando no está confirmado directamente, es posible que la β -xilosidasa del *Streptomyces sp CH-M-1035* también presente la actividad de transxilosidación, sintetizando xilooligómeros que actúen como inductores para la síntesis de xilanasas.

La adición de xilosa a los medios con bagacillo de caña tiene efectos negativos en la producción de xilanasas pues aún cuando se detecta la actividad xilanolítica más rápidamente, se obtienen valores de actividad enzimática más bajos que con bagacillo de caña solo. El comportamiento de las fermentaciones en las que se adicionó xilosa desde el inicio y a las 24 horas después de iniciada la fermentación es similar, parece ser que la xilosa actúa como represor catabólico de la síntesis de xilanasas al adicionarse 24 horas después de iniciada la fermentación. Mientras que cuando se adicionó xilosa desde el inicio de la fermentación, parece haber un efecto combinado de inducción inicial y después represión. El efecto de inducción por xilosa se puede ver mejor al disminuir la concentración de xilosa al 0.5%, ya que se obtuvo uno de los valores más altos de esta investigación, mayor incluso que los obtenidos con bagacillo de caña al 1% solo, sin embargo esta mayor actividad se obtiene solo en un punto de la investigación por lo que no es suficiente para asegurar que a esta concentración la xilosa mejora la producción de xilanasas en presencia del bagacillo de caña. Consideramos que hace falta un estudio más detallado utilizando más concentraciones de xilosa y llevando a cabo muestreos con intervalos de tiempo más cortos, que nos permitan conocer mejor el efecto de la xilosa en la producción de xilanasas en presencia de bagacillo de caña.

En la bibliografía se ha reportado que el efecto inductor de la xilosa en la síntesis de xilanasas de los microorganismos xilanolíticos es variable. Para la levadura *Pullularia pullulans* (Pou-Linas and Driguez, 1987) y el hongo *Aspergillus sydowii MG49* (Ghosh and Nanda, 1994) la xilosa induce la síntesis de xilanasas mientras que para otras especies la

xilosa tiene un efecto inductor muy bajo o nulo comparado con el efecto inductor de otros sustratos (Piñaga et al, 1993; Biely et al, 1980; Lindner et al , 1994; Khanna and Garui, 1993; Roger and Nakas, 1989)

Otros investigadores han utilizado xilosa y glucosa como fuentes de carbono para la producción de xilanasas, encontramos que en 1992 Okeke utilizó xilosa al 1% como sustrato para la producción de xilanasas extracelulares de *Streptomyces EC22* reportando una actividad de 0.26 U/ml (estas unidades están dadas bajo las condiciones del ensayo enzimático reportadas en ese trabajo) que es una cuarta parte aproximadamente del máximo valor reportado utilizando xilosa a la misma concentración en este trabajo. En ese mismo reporte los investigadores utilizaron glucosa al 1% como fuente de carbono y detectaron una actividad de 0.18 U/ml, que es mayor que cualquiera de las detectadas en este trabajo al utilizar glucosa al 1% o 2%.

De los resultados obtenidos en esta fermentación podemos concluir que la adición de los monómeros glucosa y xilosa, en fermentaciones con bagacillo de caña como fuente de carbono y a concentraciones de 1%, tienen un efecto negativo en la producción de xilanasas extracelulares de *Streptomyces sp CH-M-1035*. Este efecto negativo probablemente se deba a la represión catabólica provocada por estos monómeros. Solo en la fermentación en la que se adicionó xilosa al 0.5% se observa una estimulación de la producción de xilanasas extracelulares, pero solo en un tiempo fue mayor la actividad que la obtenida cuando creció en bagacillo de caña de azúcar.

3.3.5 Efecto de modificaciones en el medio salino utilizado para la producción de xilanasas extracelulares de *Streptomyces sp CH-M-1035*.

Una de las ventajas que ofrece el *Streptomyces sp CH-M-1035* es el requerimiento mínimo de sales minerales que tiene para producir xilanasas extracelulares utilizando bagacillo de caña o xilanos purificados como única fuente de carbono. A diferencia de nuestra cepa otras cepas de *Streptomyces* reportadas en la bibliografía necesitan de medios salinos de composición química más compleja, además de la adición de complementos orgánicos, para producir xilanasas extracelulares (Cuadro 1 de Introducción). Para conocer

el efecto de modificaciones en el medio utilizado sobre la producción de xilanasas, hicimos una serie de fermentaciones en las que se suprimieron o cambiaron las concentraciones de las sales utilizadas además de probar el efecto de la adición de complementos orgánicos. Utilizamos como fuente de carbono bagacillo de caña, que es uno de los mejores sustratos utilizados durante esta investigación para producir xilanasas, y evaluamos la actividad xilanolítica de los filtrados obtenidos.

Los resultados de la modificación del medio se muestran en las gráficas de la **figura 7** donde incluimos la gráfica control en la que no se modificó el medio usado para la fermentación. En todos los casos en los que se modificó la composición del medio, la producción enzimática fue menor en comparación con la actividad obtenida con todos los componentes del medio. Al suprimir el fosfato de potasio monobásico la actividad enzimática fue baja durante las primeras 60 horas pero a partir de las 64 horas se incrementa. Los valores de pH se hicieron más ácidos durante el transcurso de la fermentación probablemente debido a la falta de la propiedad amortiguadora del potasio.

Con la eliminación del sulfato de amonio, apenas se detecta actividad enzimática durante las primeras 60 horas; a las 100 horas hubo una actividad de 3.0 U/ml. Al aumentar a 0.3% la concentración de sulfato de amonio en lugar de eliminarlo la producción enzimática fue muy baja. Los perfiles de pH al modificar el sulfato de amonio se mantuvieron relativamente estables durante la fermentación, salvo en la fermentación con sulfato al 0.3% donde a las 50 horas, hay un valor de pH que bajó considerablemente. Al suprimir las sales minerales usadas y utilizar agua de la llave con urea la actividad enzimática prácticamente no se produce.

Con la supresión de cualquiera de las sales utilizadas para la producción de xilanasas, la actividad enzimática obtenida es menor en comparación con la obtenida en el medio control donde no se modificó la composición del medio salino. La eliminación total de las sales utilizadas no permitió que se llevara a cabo la producción de enzimas xilanolíticas aún cuando estuviera presente el bagacillo de caña, posiblemente por la limitación de los átomos

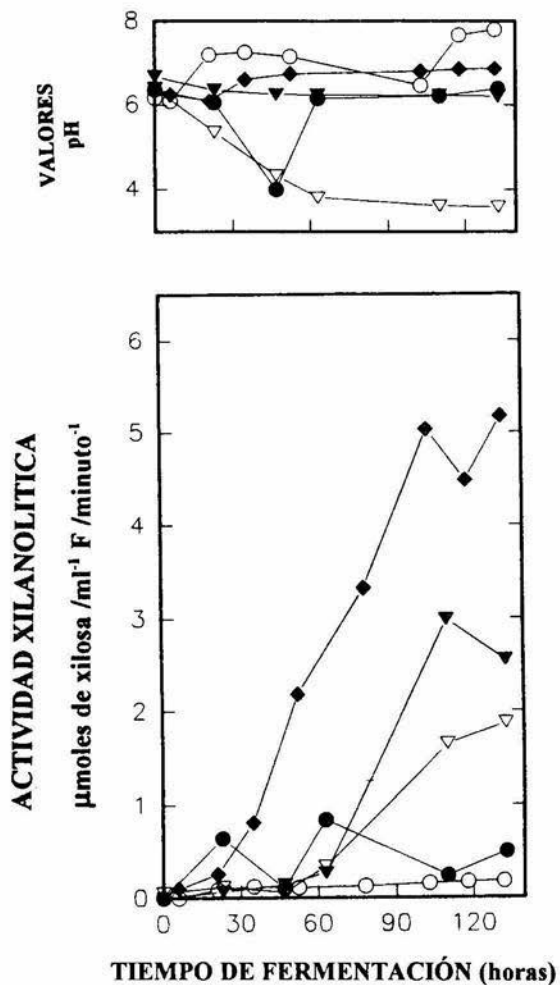


Fig. 7 Efecto de la modificación del medio salino mínimo en la producción de xilanasas extracelulares por *Streptomyces* sp CH-M-1035 utilizando bagacillo de caña al 1% como única fuente de carbono en matraces agitados a 200 rpm y 37°C. La cuantificación de la actividad xilanolítica se determinó en alícuotas de filtrados libres de células y dializados. Control (◆); sin fosfato de potasio (▽); sin sulfato de amonio (▼); con 0.3% de sulfato de amonio (●); con agua de la llave y urea (○).

de fosfato y azufre que están involucrados en la biosíntesis de la biomasa microbiana, por lo que se puede inferir que el crecimiento del microorganismo es muy bajo.

a) Complementos nitrogenados

Además de la modificación en la composición del medio salino mínimo, evaluamos el efecto de la adición de los complementos nitrogenados orgánicos extracto de malta y extracto de levadura en la producción de xilanasas extracelulares de *Streptomyces sp CH-M-1035*. Para ambos complementos manejamos una concentración de 0.1% y fueron adicionados a medios en los que se usó bagacillo de caña de azúcar al 1% como única fuente de carbono. Los resultados se muestran en la **figura 8** donde se incluyó un control con bagacillo de caña y medio salino mínimo sin complementos nitrogenados. Al adicionar independientemente el extracto de levadura y malta, durante las primeras 50 horas la actividad xilanolítica no fue mayor de 0.2U/ml, en ambos casos se incrementó la actividad a partir de las 60 horas y se alcanzó el máximo valor de 3.4U/ml a las 100 horas en el medio complementado con extracto de levadura y en el medio en el que se adicionó extracto de malta fue de 2.2 U/ml con extracto de malta también a las 100 horas, después de este tiempo la actividad se mantiene relativamente constante para ambas gráficas. Cuando se complementó el medio con extracto de malta y extracto de levadura la actividad enzimática fue menor que al adicionarlos independientemente y es hasta las 100 horas que se obtuvo el máximo valor en la actividad enzimática que fue de 0.4 U/ml. Todos los perfiles de pH de esta fermentación, salvo el control, muestran un comportamiento irregular ya que con extracto de levadura el pH se mantiene en un intervalo de 6.0 a 6.5 salvo a las 60 horas en que es de 7.0; con extracto de levadura el pH se vuelve ácido y a las 60 horas se detecta un valor de 4.5 aprox. pero en el siguiente tiempo vuelve al rango de neutralidad, finalmente con ambos extractos el pH se registró ácido las primeras 70 horas y después de este tiempo los valores de pH se tornan alcalinos pero, aparentemente, el comportamiento de pH no tiene relación alguna con la producción de xilanasas.

Los resultados aquí presentados muestran que la adición del extracto de malta y extracto de levadura al medio utilizado para la producción de xilanasas dio como resultado que la

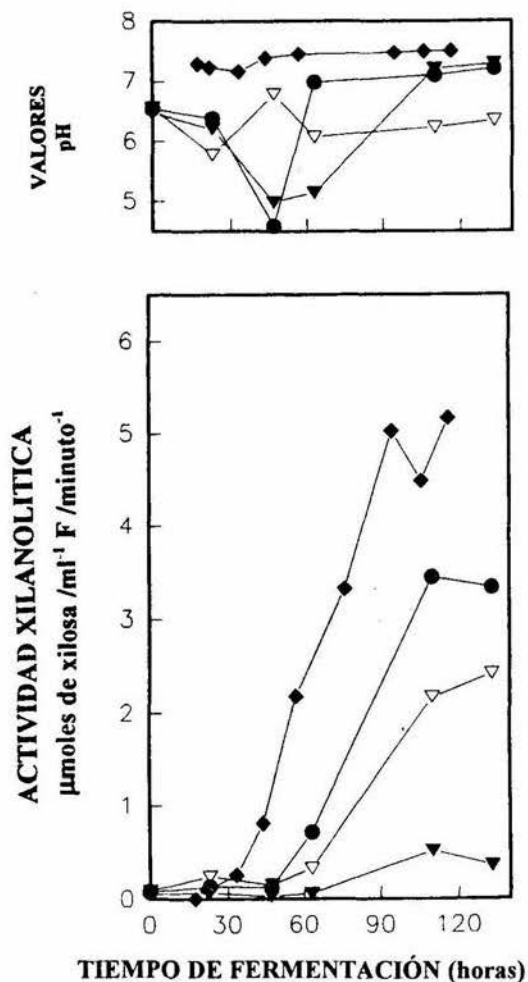


Fig. 8 Efecto de la adición de complementos nitrogenados orgánicos en la producción de xilanasas extracelulares de *Streptomyces sp CH-M-1035* utilizando como fuente de carbono bagacillo de caña al 1%. La cuantificación de la actividad xilanolitica extracelular se determinó en alícuotas de filtrados dializados y libres de células. Control sin complementos (◆); con 0.1 % de extracto de levadura (●); con 0.1% de extracto de malta (▽); con 0.1% de extracto de malta y 0.1 % de extracto de levadura (▼).

actividad xilanolítica de estos filtrados fuera menor que en el medio en el que no se adicionaron. Probablemente esto se deba a que el medio se enriqueció nutricionalmente con la adición de los extractos de malta y de levadura por las vitaminas, factores de crecimiento y otras moléculas orgánicas que presentan. Es posible que en este medio tan enriquecido los microorganismos prescindieran de la utilización del bagacillo de caña mientras consumían las moléculas orgánicas proporcionadas por los extractos. De esta manera podría explicarse el atraso en el tiempo de producción de las xilanasas del *Streptomyces sp CH-M-1035*. Este efecto negativo del extracto de levadura en la producción de xilanasas del *Streptomyces sp CH-M-1035* es opuesto al reportado para la especie *Bacillus polymixa* (Piñaga et al, 1993) y *Schizophyllum commune* (Haltrich and Steiner, 1994) quienes reportan que en los medios que solamente tienen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuente de nitrógeno la producción de xilanasas es muy baja y que para ambos microorganismos es indispensable la adición de extracto de levadura para tener una buena producción de xilanasas extracelulares.

Tanto el extracto de levadura como el extracto de malta son orgánicamente complejos pues tienen varios tipos de vitaminas, fuentes de nitrógeno y fuentes de carbono. La presencia de estos elementos enriquecen el medio al que se adicionan favoreciendo el crecimiento de los microorganismos. Es posible que el *Streptomyces sp CH-M-1035* evite la utilización del bagacillo de caña mientras consume los complementos orgánicos del medio y una vez agotados estos comienza a utilizar el bagacillo de caña retrasando el tiempo de producción de xilanasas.

Por los resultados obtenidos en esta fermentación, podemos decir que el *Streptomyces sp CH-M-1035* no requiere de complementos orgánicos para la producción de xilanasas al utilizar medio salino mínimo con bagacillo de caña como única fuente de carbono ya que su presencia implica disminución en la producción de estas enzimas xilanolíticas.

3.3.7 Producción de xilanasas extracelulares utilizando como fuente de carbono diferentes tipos de celulosas

Algunos de las cepas que actualmente se estudian como productoras de xilanasas fueron seleccionadas previamente como degradadoras de materiales lignocelulósicos (que están

constituidos principalmente de celulosa, hemicelulosas y lignina). Estos microorganismos se seleccionaban por su capacidad de sintetizar celulasas y hemicelulasas, principalmente xilanasas (Haltrich and Steiner, 1994). Por tal razón es común encontrar que las xilanasas de varios microorganismos xilanolíticos pueden ser inducidas, además de los xilanos, con diferentes tipos celulosas (Roger and Nakas, 1989).

En este trabajo evaluamos la producción de xilanasas de *Streptomyces sp CH-M-1035* utilizando como fuente de carbono celulosa microcristalina (CM), carboximetilcelulosa Whatman (CMC_w) y carboximetilcelulosa Sigma (CMC_s), que son de las celulosas más comúnmente utilizadas para la inducción de enzimas celulolíticas y xilanolíticas.

Los resultados se muestran en la **figura 9** y, como se puede apreciar, no se detectó actividad xilanolítica en los filtrados de la fermentación en la que se utilizó CM al 1% como sustrato; en cuanto a su perfil de pH los valores se hicieron más neutros durante el curso de la fermentación. Son interesantes los resultados obtenidos con las carboximetilcelulosas ya que las producciones son diametralmente opuestas entre sí, pues mientras que con CMC_w no se detectó actividad xilanolítica si hubo producción de xilanasas con CMC_s. Al utilizar la CMC_s se registró actividad xilanolítica a partir de las 50 horas de fermentación con un comportamiento ascendente y a las 74 horas se registró el máximo valor de actividad xilanolítica de esta fermentación que fue de 1.2 U/ml. Los perfiles de pH de los filtrados con las carboximetilcelulosas utilizadas se hicieron más básicos con el transcurso del tiempo, aunque los valores de pH de los filtrados de CMC_s fueron más básicos que los medidos en los filtrados de CMC_w.

La CM y CMC_w son celulosas insolubles en agua por lo que el microorganismo pudo tener dificultades para la utilización de este sustrato limitando su crecimiento y la producción de xilanasas. En cuanto a la producción de xilanasas obtenida en el medio con carboximetilcelulosa Sigma puede explicarse considerando la naturaleza de este sustrato ya que las celulosas comerciales contienen xilanos que se consideran contaminantes (Haltrich and Steiner, 1994). Si a esto le agregamos la solubilidad de la carboximetilcelulosa Sigma conferida por la sal de sodio que contiene (Aspinall, 1986), que lo hace un sustrato más

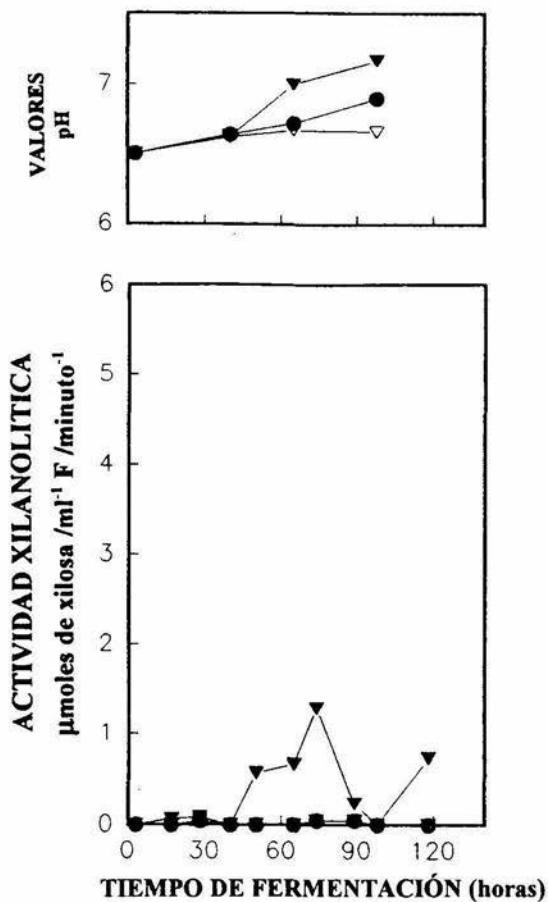


Fig. 9 Producción de xilanasas extracelulares por *Streptomyces sp CH-M-1035* utilizando como fuente de carbono diferentes tipos de celulosas en matraces agitados a 200 rpm y 37°C. La cuantificación de la actividad xilanolitica extracelular se determinó en alícuotas de filtrados dializados libres de células. Carboximetilcelulosa Whatman al 1% (▽); carboximetilcelulosa Sigma al 1% (▼); celulosa microcristalina Avicel al 1% (●).

susceptible al ataque enzimático que las otras celulasas utilizadas, es posible que el microorganismo pueda utilizar estas pequeñas cantidades de xilanos presentes en la CMC para inducir la síntesis de xilanasas. También existe la posibilidad de que la actividad cuantificada sea el resultado de la acción de alguna enzima con doble actividad capaz de hidrolizar celulosa y xilanos, como la reportada por Bailey y colaboradores en 1993, aunque para confirmar o rechazar esta propuesta hace falta realizar estudios de purificación y determinación de actividades enzimáticas más específicos.

Ishaque y Kluepfel (1986) reportaron para la especie *Streptomyces flavogriseus*, que al utilizar como fuente de carbono Avicel al 1% no detectó actividad xilanolítica. Caso diferente es el de la cepa *Streptomyces EC22* (Okeke and Paterson, 1992) para la cual la celulosa microcristalina induce mejor que los xilanos la síntesis de xilanasas reportando una actividad máxima 2.10 U/ml con la celulosa microcristalina (bajo las condiciones reportadas para la cuantificación de xilanasas en ese trabajo). En lo referente a las carboximetilcelulosas, bibliográficamente se ha reportado para *Streptomyces EC22* (Okeke and Paterson, 1992) una actividad de 0.67 U/ml utilizando como sustrato CMC (según las condiciones de reacción reportadas en ese trabajo), que es un valor menor que el obtenido en este trabajo. Para las cepas *Aspergillus sydowii* MG49 (Ghosh and Nanda, 1994), *Cellulomonas fimi* (Khanna and Garui, 1993) y *Trichosporon cutaneum* (Hrmová et al, 1984) la carboximetilcelulosa y la celulosa microcristalina no inducen la síntesis de xilanasas. Caso contrario es el de las cepas *Schizophyllum commune* (Haltrich and Steiner, 1994) y *Trichoderma longibrachiatum* (Roger and Nakas, 1989) para las cuales las celulosas utilizadas son mejores inductores que los xilanos.

Por los resultados aquí presentados resulta claro que la celulosa microcristalina y la carboximetilcelulosa de la marca Whatman no son inductores para la síntesis de xilanasas de *Streptomyces sp CH-M-1035*. Solamente con la carboximetilcelulosa de la marca Sigma hubo producción de xilanasas pero hace falta realizar un estudio detallado para saber si esta carboximetilcelulosa es la responsable de esta actividad, contiene impurezas hemicelulósicas

que son las responsables de la producción de las xilanasas o se produce alguna enzima con cierta inespecificidad en cuanto al sustrato que puede actuar sobre xilanos y sobre celulosa.

3.3.8 Detección de actividad celulolítica extracelular en filtrados libres de células de *Streptomyces sp CH-M-1035*.

Por la aplicación potencial de las xilanasas en el bioblanqueamiento de la pulpa de celulosa para la fabricación de papel, para la eliminación de los xilanos sin dañar a la celulosa (Wong and Saddler, 1992; Khanna and Garui, 1993), se ha dado énfasis a la selección de cepas productoras de xilanasas a partir de las cuáles se puedan obtener filtrados crudos con altos niveles de actividad xilanolítica pero libres de celulasas. Muchos de los organismos productores de xilanasas reportados en la bibliografía también son productores de enzimas celulolíticas (Biely et al, 1995; Hrmová et al, 1985; Ishaque and Kluepfel, 1981; MacKenzie et al, 1987; Morag et al, 1990; Pometto III and Crawford, 1986; Rajoka and Malik, 1984). Son relativamente pocos los sistemas productores de xilanasas en los que sus filtrados carecen de actividad celulolítica (Purkarthofer et al, 1993; Ghosh and Nanda, 1994) y, como se mencionó en la introducción, hay un particular interés en este tipo de microorganismos xilanolíticos que no produzcan celulasas bajo las condiciones de producción de xilanasas.

Se había detectado en forma preliminar la carencia de actividad celulolítica en filtrados de *Streptomyces sp CH-M-1035* (Datos no mostrados), lo que consideramos una característica particularmente interesante del microorganismo. Por tal razón decidimos evaluar la presencia de actividad celulolítica en filtrados libres de células del organismo creciendo bajo las condiciones de producción de enzimas xilanolíticas en medios con xilanos purificados, bagacillo de caña y celulosa microcristalina como fuente de carbono, todos en concentración de 1%

Como se puede apreciar en la **figura 10** no se detectó actividad enzimática de celulasas sobre papel filtro (PF) en ninguno de los filtrados obtenidos. Esto puede explicarse considerando que ninguno de los sustratos utilizados como fuente de carbono induce la.

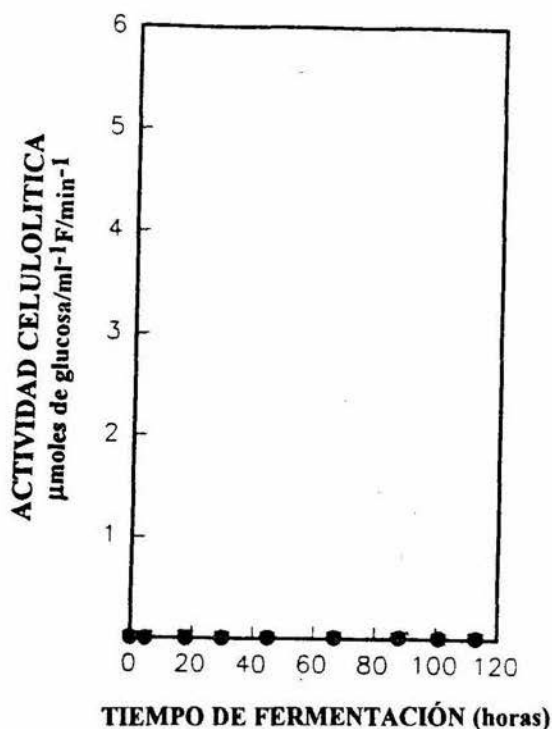


Fig. 10 Detección de actividad celulolítica extracelular sobre papel filtro de *Streptomyces sp CH-M-1035* crecido sobre sustratos celulósicos y hemicelulósicos como fuente de carbono en matraces agitados a 200 rpm y 37°C. La cuantificación de la actividad celulolítica se determinó en alícuotas de filtrados dializados libres de células. Bagacillo de caña al 1% (●); xilanos al 1% (◆); celulosa microcristalina Avicel al 1% (■).

síntesis de celulasas capaces de hidrolizar al PF bajo las condiciones de producción de xilanasas o bien que el microorganismo no cuenta con la información genética necesaria para la síntesis de celulasas degradadoras de celulosa organizada.

Por estos resultados podemos afirmar que el *Streptomyces sp CH-M-1035* no produce celulasas bajo las condiciones de producción de enzimas xilanolíticas utilizando bagacillo de caña, celulosa microcristalina o xilanos purificados como fuente de carbono siendo los dos primeros materiales celulósicos. También se confirman los resultados anteriores de que el *Streptomyces sp CH-M-1035* no produce celulasas en sustratos celulósicos (Jiménez G., comunicación personal), probablemente porque no hay crecimiento del microorganismo sobre ellos por carecer de la maquinaria enzimática celulolítica necesaria para la utilización de estos materiales

4. CONCLUSIONES

Se lograron obtener xilanasas extracelulares en fermentación sumergida por *Streptomyces sp CH-M-1035* a partir de bagacillo de caña y se realizó la evaluación comparativa de esta producción con la obtenida al utilizar otros sustratos.

1. El *Streptomyces sp CH-M-1035* es un buen productor de xilanasas extracelulares. La síntesis de estas enzimas es inducida por bagacillo de caña y xilanos purificados consiguiendo mejores valores de actividad enzimática con el primero. La cáscara de limón, xilosa y carboximetilcelulosa Sigma también inducen la síntesis de xilanasas pero en menor grado que bagacillo de caña.
2. La adición de xilosa a medios con bagacillo de caña provoca disminución en la producción de la actividad xilanolítica, mientras que la adición de glucosa no permite la expresión de la síntesis de xilanasas por represión catabólica.
3. Con materiales celulósicos como la celulosa microcristalina y la carboximetilcelulosa Whatman el *Streptomyces sp CH-M-1035* no produce xilanasas extracelulares, mientras que con carboximetilcelulosa Sigma se registran niveles bajos de esta actividad.
4. No se detectó actividad celulolítica sobre papel filtro en los filtrados de *Streptomyces sp CH-M-1035* crecido en bagacillo de caña de azúcar ni en celulosa microcristalina.
5. La modificación del medio salino mínimo provoca disminución en la producción de xilanasas de este microorganismo por lo que se establece que la composición que presenta es la mínima necesaria para la producción de xilanasas en presencia de bagacillo de caña.
6. La adición de los complementos orgánicos complejos como extracto de levadura y extracto de malta afectan negativamente la producción de xilanasas extracelulares de *Streptomyces sp CH-M-1035*.

Por todas estas razones consideramos que la especie mexicana *Streptomyces sp CH-M-1035* es una cepa xilanolítica interesante, con potencial de aplicación y explotación biotecnológica a futuro, la cual vale la pena continuar estudiando para profundizar en el conocimiento de sus sistemas enzimáticos, los mecanismos que lo regulan y el

esclarecimiento de los procesos biotecnológicos necesarios para su producción a gran escala.

5. BIBLIOGRAFIA

- **Acuña Argüelles M. E., 1991**, Evaluación de los parámetros fisicoquímicos que afectan la producción de celulasas y xilanasas por *Aureobasidium sp.* Tesis Maestría UNAM, IIBM.
- **Aguilar G. And Huitron C., 1987**, Stimulation of the production of extracellular pectinolytic activities of *Aspergillus sp* by galacturonic acid and glucose addition, Enzyme Microb. Technol., Vol. 9, November, 690-699
- **Anné J. and Van Mellaert L.; 1993**, *Streptomyces lividans* as host for heterologous protein production, FEMS Microbiology Letters, 114:121-128
- **Akiba T. and Horikoshi, 1988**, Xylanases of alkalophilic thermophilic *Bacillus*, In Methods in Enzimology, Vol 160. pp 655
- **Aspinall G., 1959**, Structural Chemistry of hemicelluloses, Adv. Carbohyd. Chem. 429-468.
- **Bailey M., Buchert J. and Viikari L., 1993**, Effect of pH on production of xylanase by *Trichoderma reesei* on xylan and cellulose-based media, Appl. Microbiol. Biotechnol. 40:224-229
- **Ball A. and McCarthy, 1989**, Production and properties of xylanases from actinomycetes. Journal of Applied Bacteriology 66: 439-444
- **Bhalerao J., Patki A., Bhave M., Khurana I., and Deobagkar D., 1990**, Molecular cloning and expression of a xylanase gene from *Cellulomonas sp.* into *Escherichia coli*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 34:71-76
- **Blancas A., Aguilar G. and Huitron C., 1984**, Simplification of culture medium and conditions for fermentation of henequen pulp, Biotechnology and Bioengineering Symp., No. 14, 479-484
- **Biely P., Kratky Z., Vrsanska M. and Urmanikova D., 1980**, Induction and inducers of endo-1,4- β -xylanase in the yeast *Cryptococcus albidus*, Eur. J. Biochem. 108, 323-329
- **Biely P., and Pétráková E., 1984**, Novel inducers of the xylan-degrading enzyme system of *Cryptococcus albidus*, J. Bacteriol. Vol. 160, No.1, 408-412

- **Biely P., 1985**, Microbial xylanolytic systems, Trends in Biotechnology Vol.3 No. 11, 286-290
- **Biely P, Mislovicova D. and Toman R., 1985**; Soluble chromogenic substrates for the assay of endo-1,4- β -xylanases and endo-1,4- β -glucanases, Analytical Biochemistry, 144:142-146
- **Biely P; Mislovicova D. and Toman R., 1988**; Remazol brilliant blue-xylan: a soluble chromogenic substrate for xylanases. Methods en Enzymology, vol 160 pp 536-541
- **Biely P., Mackenzie C., Puls J. and Schneider H., 1986**, Cooperativity of esterases and xylanases in the degradation of acetylxylan, Bio/Technology, Vol. 4 731-733
- **Biely P., Vrsanska M. and Kuckar S., 1992**, Identification and mode of action of endo-(1,4)- β -xylanases. In Xylan and Xylanases Ed, Visser J. et al., Elsevier Science Publishers 81-95
- **Brodel B., Samain E. and Debeire P., 1990**, Regulation and optimisation of xylanase production in *Clostridium thermolacticum*, Biotechnology Letters, Vol. 12, No. 1, 65-70
- **Cauchon N. and LeDuy A.; 1984**, Effect of dilution on carboxymethylcellulase and xylanase assays; Biotechnology and Bioengineering, Vol 26, 988-991.
- **Copa-Patiño J., Kim G. and Broda P., 1993**, Production and initial characterisation of the xylan degrading system of *Phanerochaete chrysosporium*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 40:69-76
- **Cotta M., 1993**, Utilisation of xylooligosaccharides by selected ruminal bacteria, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 59, No.11, pp 3557-3563
- **Coughlan M., 1992**, Towards an understanding of the mechanism of action of main chain-hydrolysing xylan In: Xylans and Xylanases ed. Visser J., Elsevier Science Publishers p 111-139
- **Crawford D.; 1988**; Development of recombinant *Streptomyces* for biotechnology and environmental uses. Biotech. Adv., Vol. 6 pp 183-206
- **Crueger W. and Crueger A., 1982**, Biotechnology, a textbook of a industrial microbiology, Science Tech. Inc. USA

- **Deboald L.** and Crawford D., **1987**, Activities of cellulase and other extracellular enzymes during lignin solubilisation by *Streptomyces viridosporus*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 26:158-163
- **Dekker R.**, and Richards G., **1976.**, Hemicellulases; their occurrence, purification, properties and mode of action, Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 32:277-352
- **Deshpande B.**, Ambeadakar S. and Shewale J.; **1988**; Biologically active secondary metabolites from *Streptomyces*; Enzyme Microb. Technol Vol. 10, August, 455-473
- **Dhalberg L.**, Holst O. and Kistjansson J., **1993**, Thermostable xylanolytic enzymes from *Rhodothermus marinus* grown on xylan, Appl. Microbiol. Biotechnol. 40:63:68
- **du Toit P.**, Olivier S. and van Biljon L., **1984**, Sugar cane bagasse as a possible source of fermentable carbohydrates. I. Characterisation of bagasse with regard to monosacharide, hemicellulose and aminoacid composition, Biotechnology and Bioengineering, Vol 26, 1071-1078
- **Dung N.**, Vetayasuporn S., Kamio Y., Abe N., Kanero J. and Izaki K., **1993**, Purification and properties of β -1,4- xylanases 2 and 3 from *Aeromonas caviae* W-61, Biosci. Biotech. Biochem., 57(10), 1708-1712
- **Enríquez A.**, Montalvo R. and Canales M., **1981**, Variation of bagasse crystallinity and cellulase activity during the fermentation of *Cellulomonas* bacteria, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 23, 1431-1436
- **Enzyme Nomenclature IUB**, **1978**, Recommendations of the nomenclature committee on the International Union of the Nomenclature and Classification of enzymes, Academic Press, pp 276,283
- **Fernandéz-Espinar M.**, Ramón D., Piñaga F. and Vallés S., **1992**, Xylanase production by *Aspergillus nidulans*, FEMS Microbiology Letters, 91-96
- **Fernandez-Espinar M.**, Piñaga F., Sanz P., Ramón D. and Vallés S., **1993**, Purification and characterisation of a neutral endoxylanase from *Aspergillus nidulans*, FEMS Microbiology Letters 113:223-228

- **Ghosh M., Das A., Mishra A. and Nanda G., 1993**, *Aspergillus sydowii* MG49 is a strong producer of thermostable xylanolytic enzymes, Enzyme Microb. Technol., Vol. 15, August.
- **Ghosh A. and Nanda G., 1993**, High activity xylanase from *Aspergillus sydowii* MG49 during growth on jute stalk lignocellulose, Letters in Applied Microbiology 17:68-71
- **Ghosh A. and Nanda G., 1994**, Physiological studies on xylose induction and glucose repression of xylanolytic enzymes in *Aspergillus sydowii* MG49, FEMS Microbiology Letters, 117, 151-156
- **Gibbons J., 1984.**, Commercial Biotechnology, an international analysis, Vol. I, Congress of the United States, Office of Technology Assessment, Washington D. C.
- **Gilkes N., Henrissat B., Kilburn D., Miller R. and Warren R., 1991**, Domains in microbial β -1,4-glycosidases: sequence, conservation, function, and enzyme families, Microbiological Reviews, Vol. 55, No. 22, 303-315
- **Gomes J., Purkathofer H., Hayn M., Kapplmüller M., Sinner M. and Steiner W., 1993**, Production of high level of cellulase-free xylanase by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* in a laboratory and pilot scales using lignocellulosic materials, Appl. Microbiol. Biotechnol. 39:700-707
- **Gomez de Segura B. and Feure M., 1993**, Purification and characterisation of two 1,4- β -xylan endohydrolases from the rumen fungus *Neocallimastix frontalis*, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 59 No. 11 3654-3660
- **Gong C., Chen L., Flickinger M. and Tsao G., 1984.**, Conversion of hemicellulose carbohydrates, Advances in Biochemistry Engineering. Vol. 20:93-118
- **Graaf L., van den Broeck H., van Ooijen A. and Visser J., 1992**, Structure and regulation of an *Aspergillus* xylanase gen., In Xylans and Xylanases ed. Visser J., Elsevier Science Publishers, pp 235-249
- **Grabski, A. and Jeffries T.; 1991**, Production, purification and characterisation of β -(1,4)-endoxyylanase of *Streptomyces roseiscleroticus*; Applied and Environmental Microbiology, Vol. 57; No. 4 987-992

- **Haak S. and Breznak J., 1993**, *Cytophaga xylanolitica* sp nov., a xylan-degrading anaerobic gliding bacterium. Arch. Microbiol., 159:6-15
- **Haltrich D., Preiss M. and Steiner W., 1993**, Optimization of a culture medium for increased xylanase production by a wild strain of a *Schizophillum commune*, Enzyme Microb. Technol. Vol. 15 pp 854-860
- **Haltrich D. And Steiner W., 1994**, Formation of xylanase by *Schizophillum commune*: Effect of medium components, Enzyme Microb. Technol., vol. 16, 229-235
- **Harms E., 1991**, Construction of expression systems for *Escherichia coli* Asparaginase II and two step of purification of the recombinant enzyme from periplasmic extracts., Protein Expression and Purification, 2:144-150
- **Hrmová M., Biely P., Vrsanska M. and Petrakova E., 1984.**, Induction of cellulase- and xylan-degrading enzyme complex in the yeast *Trichosporon cutaneum*, Arch. Microbiol. 138:371-376
- **Hrmová M., Biely P. and Vrsanska M., 1986**, Specificity of cellulase and β -xylanase induction in *Trichoderma reesei* QM 9414, Arch. Microbiol., 144:307-311
- **Hrmová M., Biely P. and Vrsanska M., 1989**, Cellulase- and xylan-degrading enzymes of *Aspergillus terreus* and *Aspergillus niger.*, Enzyme Microb. Technol. Vol. 11-September, 610-616
- **Hrmová M., Petraková E. And Biely P., 1991**, Induction of cellulose- and xylan-degrading enzyme systems in *Aspergillus terreus* by homo- and heterodisaccharides composed of glucose and xylose. Journal of General Microbiology, 137:541-547
- **Ishaque M. and Kluepfel D.; 1981**; Cellulase complex of a mesophilic *Streptomyces* strain, Can. J. Microbiol. Vol 26:183-189
- **Ishaque M. and Kluepfel D.; 1981**; Production of xylanolytic enzymes by *Streptomyces flavogriseus*; Biotechnology Letters Vol. 3 No. 9 ,481-486
- **Jennings M. and Beachman I., 1990**, Analysis of the *Escherichia coli* gene encoding L-Asparaginase II *ans B*, and its regulation by cyclic AMP receptor and FNR proteins, Journal of Bacteriology, Vol 172 No.3 1491-1498.

- **Jhonson K.**, Harrison B., Schneider C., MacKenzie C. and Fontana J.; **1988**; Xylan-hydrolysing enzymes from *Streptomyces sp.* Enzyme Microb. Technol. Vol. 10 July 403-407.
- **Johnson J.**, **1977**, Industrial enzymes, Noyes Data Corporation, USA., p 1
- **Joseleau J.**, Comtat J. and Ruel K., **1992**, Chemical structure of xylans and their interaction in the plant cell walls, In: Xylans and Xylanases ed. Visser J. et al., Elsevier Science Publishers 1-15
- **Kawaminami T.** and Iizuka, **1969**, Studies on xylanases from microorganisms, part. III, Production of xylanase by *Streptomyces xylophagus* nov sp. Agr. Biol. Chem. Vol. 33 No. 12, 1787-1789
- **Khanna S.** and Garui., **1993**, Regulation, purification and properties of xylanase from *Cellulomonas fimi*, Enzyme Microbiol. Technol. Vol. 15, November, 990- 995
- **Kluepfel D.**, Shareck F., Mondou F., and Morosoli R., **1986**, Characterisation of cellulase and xylanase activities of *Streptomyces lividans*, Appl. Microbiol Biotechnol. 24:230-234
- **Larios G.**, García J. And Huitron C., **1989**, Endopolygalacturonase production from untreated lemon peel by *Aspergillus sp CH-Y-1043*, Biotechnology Letters, Vol. 11, No. 10, 729-734
- **Lee Y.**, Lowe S. and Zeikus G., **1993**, Gene cloning, sequencing, and biochemical characterisation of endoxylanases from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A-R1, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 59., No. 9, 3134-3137
- **Li Xin-Liang**, Zhang Z, Dean J., Eriksson K. and Ljungdahl L., **1993**, Purification and characterisation of a new xylanase (APX-II) from the fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1, Applied and Environmental Microbiology 59:10:3212-3218
- **Lindner C.**, Stülke J. and Hecker M., **1994**, Regulation of xylanolytic enzymes in *Bacillus subtilis*, Microbiology, 140, 753-757.

- **MacKenzie T.**, Bilous D., Schneider H. and Jhonson K., **1987**, Induction of cellulolytic and xylanolytic enzyme systems in *Streptomyces spp.*, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 53, No. 12 pp 2835-2839.
- **Malburg L.** , Smith D., Shellhorn H. and Forsberg C., **1993**. *Fibrobacter succinogens* S85 has multiple xylanase genes. J. Applied Bacteriology, 75:564-573
- **Marui M.**, Nakanishi K. and Yasui T., **1985**, Purification and properties of three types of xylanases induced by methyl β -xyloside from *Streptomyces sp.* Agric. Biol. Chem. 49:12:3399-3407
- **Marui M.**, Nakanishi K. and Yasui, **1993**; Chemical modification of xylanases from *Streptomyces sp.*, Biosci. Biotech. Biochem. 57(4)662-663
- **McCarthy A.**, Peace E. and Broda P., **1985**, Studies on the extracellular xylanase activity of some thermophilic actinomycetes, Appl. Microbiol. Biotechnol. 21:238-244
- **Merivuori H.** and Sands J., **1989**, Effects of alcohol and temperature on secretion by *Trichoderma* In *Trichoderma reesei* cellulases, Biochemistry, Genetics, Physiology and Application, ed. Kubicek C. et al, Royal Society of Chemistry U. K. pp 109-114.
- **Monroy J.**, Moreno R., Pedroza R., Pietrini F., Aguilar E. y Castrazana M., **1990.**, Obtencion de pectinas, Tecnología de Alimentos , Septiembre, pp 37-39
- **Morag E.**, Bayer E. and Lamed R., **1990**, Relationship of cellulosomal and non-cellulosomal xylanases of *Clostridium thermocellum* to cellulose degrading enzymes. Journal of Bacteriology, Vol. 172 No. 10 6098-6105
- **Morosoli R.**, Bertrand J., Mondou F., Shareck F. and Kluepfel D., **1986**, Purification and properties of a xylanase from *Streptomyces lividans.*, Biochem J., 239: 587-592
- **Nakajima K.**, Tsukamoto K., Watanabe T., Kainuma K. and Matsuda K., **1984**; Purification and some properties of an endo1,4- β -D-xylanase from *Streptomyces sp.*; J. Ferment. Technol. Vol.62, No. 3, 269-276
- **Nakanishi K.** and Yasui T., **1980**, Production of xylanase by *Streptomyces sp* using non-metabolizable inducer, Agric. Biol. Chem., 44 (11) 2729-2730

- **Okazaki W.**, Akiba T., Horikoshi L. and Akahoshi R., **1984**, Production and properties of two types of xylanases from alkalophilic and thermophilic *Bacillus spp.*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 19: 335-340
- **Okeke B.** and Paterson A., **1992**, Simultaneous production and induction of cellulolytic enzymes in a *Streptomyces sp.*, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 8:483-487
- **Paice M.**, Gurnagul N., Page D. and Jurasek L., **1991**, Mechanism of hemicellulose-directed prebleaching of Kraft pulps, Pulp and Paper Research Institute of Canada
- **Paradis F.**, Zhu H., Krell P., Phillips J. and Forsberg W., **1993**. The xynC gene from *Fibrobacter succinogenes* S85 codes for a xylanase with two similar catalytic domains, J. Bacteriol. Vol 175, No. 23, 7666-7672
- **Piñaga F.**, Peña J. and Vallés S., **1993**, Xylanase production by *Bacillus polymyxa*, J. Chem. Tech. Biotechnol., 57, 327-333
- **Pometto III A.** and Crawford D., **1986**; Effects of pH on lignin and cellulose degradation by *Streptomyces viridosporus*, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 52 No. 2, 246-250
- **Pou-Linas J.** and Driguez H., **1987** D-xylose as inducer of the xylan degrading enzyme system in the yeast *Pullularia pullulans*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 27:134-138
- **Poutanen K.**, Rätö M., Puls J. and Viikari L., **1987**, Evaluation of different microbial xylanolytic systems, J. Biotech., 6:49-60
- **Prasad D.**, **1992**, The anaerobic biodegradation of a bagasse-based paper-mill waste in fixed-film reactor. J. Chem. Tech. Biotechnol. 53, 67-72
- **Purkharthofer H.**, Sinner M. and Sterner W., **1993**., Cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: optimisation of production in submerged and solid state culture, Enzyme Microb. Technol. Vol. 15, August,
- **Rajoka I.** and Malik K., **1984**, Cellulase and hemicellulase production by *Cellulomonas flavigena* NIAB 441., Biotechnology Letters, Vol. 6, No. 9, 597-600

- **Rajoka I. and Malik K., 1986**, Comparison of different strains of *Cellulomonas* for production of cellulolytic and xylanolytic enzymes from biomass produced on saline lands, Biotechnology Letters Vol.8, No.10, 753-756
- **Reilly P., 1981**, Xylanases: Structure and function, Basic Life Sci. 18, 111-1129
- **Roberts J., McCarthy A., Flynn N. and Broda P., 1990**, Modification of paper properties by the pretreatment of pulp with *Saccaromonospora viridis* xylanase, Enzyme Microb. Technol. Vol 12, 210-213
- **Roger J. and Nakas J., 1989**, Xylanase production by *Trichoderma longibrachiatum*, Enzyme Microbiol. Technol. Vol. 11, July, 405-410
- **Saxena S., Bahadur J. and Varma A., 1991**, Production and localisation of carboximethylcellulase, xylanase and β -glucosidase from *Cellulomonas* and *Micrococcus* spp., Appl. Microbiol. Biotechnol. 667-669
- **Scriban R., 1981**, Biotecnología, Ed. El Manual Moderno, México D.F.
- **Senior D., Mayers P., Miller D. et al; 1988**; Selective solubilisation of xylan in pulping using a purified xylanase from *Trichoderma harzanium*; Biotechnology Letters; Vol. 10, No. 12; 907-912.
- **Smith D. and Wood T., 1993**, Isolation of mutants of *Aspergillus awamori* with enhanced production of extracellular xylanase and β -xylosidase, World Journal of Microbiology and Biotechnology 7:343-345
- **Thomson J., 1993**, Molecular biology of xylan degradation, FEMS Microbiology Reviews, 104:65-82
- **Van Zyl W.; 1985**; A study of the cellulases produced by three mesophilic Actinomycetes grown on bagasse as substrate, Biotechnology and Bioengineering; Vol. 27, September. 1367-1373
- **Vyas P., Chauthaiwale V., Phadatare S., Deshpande V. and Srinivasan M., 1990**, Studies on the alkalophilic *Streptomyces* whit extracellular xylanolytic activity, Biotechnology Letters, Vol. 12, No. 3, 225-228.

- **Wang P.**, Ali S., Mason C., Sims P. and Broda P., **1992**, Xylanases from *Streptomyces cyaneus*, In Xylans and Xylanases, ed. Visser J., Elsevier Science Publishers pp 225-234
- **Wayman M.**, **1986**, Comparative effectiveness of various acids for hydrolysis of cellulose., In: Cellulose: structure, modification and hydrolysis, ed. Young R. and Rowell R., Jhon Wiley & Sons., pp 266-269
- **Win M.**, Kamiyama Y., Matsuo M. and Yasui T., **1988**, Transxylosylation products of xylobiose by β -xylosidase I from *Penicillium wortmanii* IFO 7237, Agric. Biol. Chem., 52(5), 1151-1158
- **Wong K.**, Tan U. And Saddler J., **1988**, Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications, Microbiological Reviews Vol.52, No. 3, 305-317
- **Wong K.** and Saddler J., **1992**, *Trichoderma* xylanases their properties and application, In: Xylans and Xylanases, Ed. Visser J., Elsevier Science Publishers., 171-186
- **Yang J.**, Lou G. and Eriksson K., **1992**, The impact of xylanase on bleaching of Kraft Pulps., Tappi Journal, December, 95-101
- **Yasui T.**, Nguyen B. and Nakanishi K., **1984**, Inducers for xylanase production by *Criptomococcus flavus*, J. Ferment. Technol. Vol. 62, No. 4, pp353-359.
- **Yasui T.**, Marui M., Kusakabe I. and Nakanishi K., **1988.**, Xylanases of *Streptomyces*. In Methods in enzymology, Vol. 160:648-654
- **Young R.**, 1986, Structure, swelling and bonding of cellulose fibers, In: Cellulose: structure, modification and hydrolysis, ed. Young R. and Rowell R., Jhon Wiley & Sons., pp 99-101