



16  
2ET  
Universidad Nacional Autónoma  
de México

Facultad de Química

Evaluación del Efecto del pH y la Fuente de  
Carbono Sobre la Producción de Xilanasas  
en Cepas de *Aspergillus* Creciendo  
a 45° C

T E S I S

Que, para obtener el título de :

QUIMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

Ana Mercedes Hernández Tejada



México, D.F.

1995

FALLA DE ORIGEN



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.



## **AGRADECIMIENTOS**

**Al Dr. Guillermo Aguilar Osorio por su tiempo y asesoría para la elaboración de ésta tesis, así como la formación que he recibido, a su esposa Blanca Trejo por sus comentarios y ayuda.**

**A mis amigos y compañeros : Lauris, Ricardo, Luis, Marti, Leo , Sarita, Normita por hacer mas agradable mi estancia en el laboratorio.**

**Al Sr. Rodolfo Robles, Jacobo Garibay y Susana Mendoza por su enorme ayuda en la realización del estudio morfológico, así como su amistad.**

**Al Dr. Eliseo Hernández Baumgarten por su gentileza y ayuda para la realización de ésta tesis.**

**Al Ing. Rincón y al Dr. Esteban Labrandero por su ayuda y su tiempo.**

**A Mauricio por ser mi fiel amigo por tantos años.**

**A Eloisa, Ximena e Ivonne por ser mis amigas y consejeras en los buenos y malos momentos de mi vida.**

**A Moni, Rosi y Alicia por su amistad durante la carrera. Espero que se prolongue.**

**Y a todos mis amigos de la carrera: Araceli, Bety, Claudia, Eneida, Heber, Gus, Ale, July, Margarita y aquellos que haya olvidado mencionar.**

**A Magda por darme sus consejos tan acertados y su amistad incondicional.**

**A Ari y Lupita por una amistad fuerte que aunque hemos estado lejos se ha conservado.**

**Este trabajo fué financiado parcialmente por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico Proyecto IN209194 y por el Programa de Becas para Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación de la Secretaría General de la UNAM.**

## **DEDICATORIA**

**A mis padres por ser un ejemplo a seguir en el camino de la ciencia y de la vida.  
Gracias por brindarme todo su amor y apoyo.**

**A Cheo, mi queridísimo hermano por su amistad y apoyo a lo largo de toda mi vida.  
Gracias por todos tus consejos !!**

**A Gerardo mi queridísimo novio por su enorme espíritu de lucha y superación . Te amo.**

**A mi dulce abuelita "colibri", tíos y primos, por su apoyo y amor constante.**

**"Nadie consigue atar un trueno, y nadie consigue apropiarse de los cielos del otro en el momento del abandono"**

**Luis Sepúlveda (Escritor Chileno)**

## **DEDICATORIA**

**A mis padres por ser un ejemplo a seguir en el camino de la ciencia y de la vida.  
Gracias por brindarme todo su amor y apoyo.**

**A Cheo, mi queridísimo hermano por su amistad y apoyo a lo largo de toda mi vida.  
Gracias por todos tus consejos !!**

**A Gerardo mi queridísimo novio por su enorme espíritu de lucha y superación . Te amo.**

**A mi dulce abuelita "colibri", tíos y primos, por su apoyo y amor constante.**

**"Nadie consigue atar un trueno, y nadie consigue apropiarse de los cielos del otro en el momento del abandono"**

**Luis Sepúlveda (Escritor Chileno)**

<b>CONTENIDO</b>		<b>PAG</b>
<b>1. INTRODUCCION</b>		<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>		
2.1 Estructura química de las hemicelulosas		3
2.3 Género <i>Aspergillus</i>		4
2.4 Morfología de <i>Aspergillus</i>		7
2.5 Tipos de xilanasas		8
2.6 Xilanasas microbianas		8
2.7 Mecanismo de acción de las xilanasas		11
2.8 Usos de las xilanasas		13
2.9 Regulación de la síntesis de xilanasas		16
2.10 Nuevas Posibilidades		17
2.11 Microscopía Electrónica		18
<b>3. MATERIALES Y METODOS</b>		
Estrategia experimental		20
3.1 Selección		20
3.2 Producción de xilanasas a 45°C		21
3.3 Determinación de las características morfológicas		24
<b>4 . RESULTADOS Y DISCUSION</b>		
4.1 Selección a 37°C		25
4.2 Efecto del pH		25
4.3 Efecto de diferentes fuentes de Carbono		33
4.4 Efecto de diferentes fuentes de Nitrógeno y vitaminas		41
4.5Morfología		48
<b>5. CONCLUSIONES</b>		<b>57</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>		<b>60</b>

## **1.INTRODUCCION**

Los residuos orgánicos del bosque y agrícolas contienen celulosa, hemicelulosa y lignina en una proporción de 4:3:3; el porcentaje de extracción de estos tres componentes varía de fuente en fuente.

Fuentes potenciales de hemicelulosa incluyen caña de azúcar, sorgo y cultivos con alto contenido de almidón como el maíz, papas dulces, yuca y otros residuos forestales y agrícolas. Los residuos de desecho contienen hasta un 40 % de hemicelulosa como pentosas.

Varios microorganismos están involucrados activamente en la degradación de hemicelulosas. La presencia de microorganismos capaces de degradar la hemicelulosa, particularmente los xilanos, fué reportado hace mas de cien años por Hoppe-Seyler (1889), quien describió un proceso de producción de gas utilizando una suspensión de xilanos de madera y microbios del lodo de un río. Los monómeros de varias hemicelulosas son útiles en la producción de diferentes antibióticos, alcoholes, alimento para animales, químicos y combustibles. Los requerimientos de la humanidad de químicos y alimento para animales pueden ser llenados mediante la utilización de desechos hemicelulósicos agrícolas e industriales .

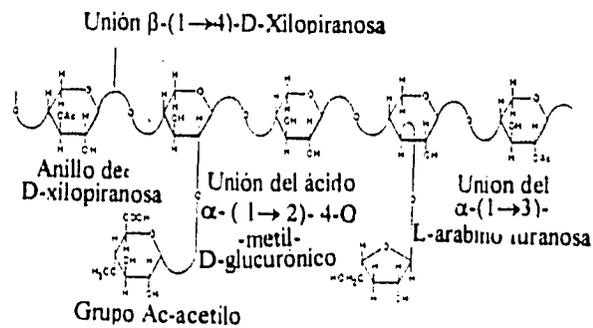
La mayoría de las especies fúngicas producen xilanasas y celulasas al ser cultivadas en celulosa pura y materiales de desecho agrícola como únicas fuentes de carbono. Se han realizado estudios para conseguir la optimización en la producción de xilanasas variando diversos parámetros como son pH, temperatura, aereación y composición del medio (1)

## **2.ANTECEDENTES**

### **2.1 Estructura química de las hemicelulosas**

La hemicelulosa es el segundo recurso natural mas abundante de la naturaleza después de la celulosa. Esta se localiza en la pared celular de los vegetales y es un polímero que se encuentra almacenado en las semillas.(1). Se asocia principalmente a la pectina, a la celulosa y a otros polímeros con estructuras de mananas, glucomananas, arabinogalactanas, etc. Su composición química consta de pentosas (arabinosa y xilosa), hexosas ( glucosa, manosa y galactosa), ácidos urónicos ( galacturónico y glucurónico) y algunos desoxiazúcares ( Fig. 1). Una de las hemicelulosas más abundantes son los xilanos y están compuestos por la unión  $\beta$  (1,4) de

unidades de D-xilopiranosas y con ramificación de L-arabinofuranosas mediante los carbonos 2 o 3 de xilosa.(2)



**Fig 1. Estructura de los xilanos con ramificaciones**

Fuente Bastwade (1)

La madera está constituida por: hemicelulosa, holocelulosa,  $\alpha$ -celulosa y lignina (Tabla 1). Las hemicelulosas son heteroglucanos que consisten de D-xilosa, D-manosa, D-glucosa, D-galactosa, L-arabinosa, L-rahmnosa, ácido 4-O-metil-D-glucurónico, ácido D-glucurónico y ácido D-galacturónico.

Los xilanos de maderas suaves poseen pocas cadenas ácidas laterales en comparación con los xilanos de maderas duras. Generalmente, existe un grupo acetilo por cada dos residuos de xilosa en madera dura, pero tal acetilación ocurre en la posición O-3 en vez de la O-2. Casi todos los xilanos acetilados en pastos son desacetilados durante los tratamientos con alcalis. En el caso de los xilanos de maderas suaves, se observa a un grupo ácido por cada nueve a doce residuos de D-xilosa. Dutton y Smith (3) encontraron que las unidades fundamentales de los xilanos de madera suave consistían de 13 residuos de (1,4)  $\beta$ -D-xilanopiranososa unidos a tres residuos  $\alpha$ -(1,2) L-arabinofuranosa.(1)

Se ha aceptado que los xilanos de maderas duras son polímeros lineales. El hecho de que los xilanos sean capaces de formar películas fuertes debe de considerarse como indicativo de su

naturaleza linear. De acuerdo con Horio e Imamura una película de xilanos de haya, en su estado seco, tiene la fuerza tensil comparable al celofán.(4).

**TABLA 1. COMPOSICION QUIMICA DE LA BIOMASA CELULOSICA**

NOMBRE	CELULOSA	HEMICELULOSA	LIGNINA	ALMIDON
	%	%	%	%
Maderas duras	40-55	25-35	25-35	----
Maderas Suaves	45-50	25-35	25-35	----
Pajas de pasto	25-40	25-40	10-30	----
Maiz/Trigo	3-4	----	1-2	80-85
Algodón	89	5	----	----
Olote	38	26	11	----
Hojas	15-20	80-85	----	----
Periodico	40-55	25-40	18-30	----
Abedul	40.9	32.7	19.3	----
Abeto	46.1	24.6	26.3	----

Fuente Vermeer *et al* (44)

## 2.2 Extracción de las hemicelulosas

Las hemicelulosas pueden ser extraídas de forma efectiva de los tejidos maderables de pastos y plantas maderables mediante un tratamiento alcalino. Sin embargo, se puede lograr la extracción parcial de la hemicelulosa presente en plantas mediante la utilización de agua caliente y/o fría o con alcali diluido. Generalmente se utilizan KOH o NaOH del 4 al 10 %. Sin embargo, Wilkie (5) logró la máxima extracción de hemicelulosa empleando KOH al 24 %, pero encontró que los grupos acetilo presentes en los xilanos de plantas y pastos se encontraban hidrolizados. Las fracciones extraídas con alcali diluido contenían fracciones de xilanos de bajo peso molecular, mientras que aquellas tratadas con alcali concentrado removían fracciones de alto peso molecular de forma selectiva.(1)

Las propiedades de los xilanos son las siguientes:

- 1) Los xilanos desacetilados son insolubles en agua, pero solubles en soluciones alcalinas y son fácilmente hidrolizados con ácidos.

- 2) Los xilanos acetilados pueden ser extraídos con agua caliente y son más solubles en agua.
- 3) Las soluciones de xilanos no reducen la solución Fehling.
- 4) Las soluciones de xilanos poseen rotación óptica negativa variando de  $\alpha$  78.2° a 109.5°.
- 5) Los xilanos acetilados son fácilmente degradados por enzimas microbianas.

Los monómeros de varias hemicelulosas son empleados en la producción de diferentes antibióticos, alcoholes, alimentos para animales, químicos y combustibles. (1)

Los hongos filamentosos han sido utilizados de manera tradicional desde hace miles de años. Industrialmente se emplean en la producción comercial de una gran variedad de productos útiles para el hombre como antibióticos, enzimas y ácidos orgánicos entre otros. Asimismo, poseen una gran versatilidad bioquímica y metabólica, que les permite adaptarse a diversas condiciones que incluyen condiciones que extremas limitan el desarrollo de muchos microorganismos. Los hongos también pueden ser empleados para la descomposición de materia orgánica, la degradación de hidrocarburos, tratamientos de aguas residuales, etc.

Dentro de este grupo de microorganismos destacan los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, por el sinnúmero de aplicaciones que actualmente se han desarrollado con ellos y por su gran potencial pueden ser utilizados como modelos de expresión y secreción de diversas moléculas de interés biológico.

### 2.3 Género *Aspergillus*

El género *Aspergillus* es de los que presentan una mayor distribución geográfica, encontrándose desde las regiones árticas hasta el Ecuador. Son de los hongos más omnívoros que existen, capaces de asimilar como alimento una enorme variedad de sustancias debido al gran número de enzimas que pueden producir para degradarlas. Los dos requisitos principales que deben tener los diferentes sustratos para que se desarrollen estos hongos son la presencia de algún tipo de materia orgánica y un poco de humedad. Si ambos factores están presentes pueden crecer en casi cualquier sustancia, afectando el bienestar del hombre en multitud de maneras. Algunas especies se desarrollan en granos, semillas y alimentos para humanos y para animales domésticos en los que, además de provocar su descomposición, producen sustancias tóxicas llamadas micotoxinas.

Algunas especies crecen en artículos de piel, telas, papel y otros productos manufacturados provocando su deterioro y reducción de valor, impartiendoles un característico

olor a moho.

Algunas especies son patógenas para el hombre y animales y pueden producir infecciones denominadas colectivamente aspergilosis, siendo la pulmonar la más seria.

Debido a las grandes actividades enzimáticas de los aspergilos, varias especies son utilizadas en diversos procesos industriales para la elaboración comercial de productos que abarcan desde ácidos orgánicos hasta enzimas, antibióticos y alimentos fermentados de varias clases, estos últimos principalmente en países orientales. Por ejemplo, los ácidos cítrico y gluconico son sintetizados en una escala industrial utilizando cultivos seleccionados de *A. niger*; la salsa de soya y otros productos fermentados similares, como la salsa tamari, son elaborados con la intervención de *A. oryzae* y *A. tamaris*.

Junto con *Penicillium*, son el género dominante en alimentos almacenados, siendo capaces de sobrevivir en situaciones de baja actividad de agua y altas temperaturas (7).

Debido a que los aspergilli son hongos filamentosos algunos factores extrínsecos poseen una profunda influencia sobre su crecimiento y biosíntesis de micotoxinas, pudiendo ser los siguientes: agua, temperatura, pH y composición de los gases.

**a) Aw:** La actividad del agua puede afectar a la germinación de diferentes formas:

- \* El Aw mínimo para la germinación.
- \* El tiempo lag antes de la germinación.
- \* La razón de extensión del tubo germinal.

**b) Temperatura:** El género *Aspergillus* crece normalmente en temperaturas que oscilan entre los 15 y los 30 °C. Sin embargo, algunas especies son capaces de crecer a temperaturas por arriba de este rango. Especies de *A. fumigatus* han sido aisladas del suelo caliente del desierto, paja, de los pulmones de aves, de fetos abortados de mamíferos y de combustible de avión.

Por otro lado, especies de *Aspergillus* pueden sobrevivir a 4 °C por lo que pueden ser conservados en refrigeración. Algunos microorganismos son dañados por los efectos del congelamiento, algunos no son capaces de recuperarse. Los *Aspergillus* si son afectados por el congelamiento pero son capaces de sobrevivir el estrés causado por este fenómeno.

**c) pH:** Los niveles de pH son difíciles de controlar, ya que el crecimiento fúngico en sí resulta en un cambio en el pH del sustrato. De hecho, la adición de conservadores a los alimentos pueden afectar sus procesos metabólicos modificando los límites de Aw en los cuales la germinación y el crecimiento ocurren. *A. niger* puede crecer en un rango de 1.5 a 9.8, *A. candidus* en uno de 2.1 a 7.7 y *E. repens* en uno de 1.8 a 8.5. (6)

Se ha visto que varias especies del género *Aspergillus* son productoras de diversas enzimas: (Tabla 2)

**TABLA 2. ENZIMAS PRODUCIDAS POR ASPERGILLUS**

<b>GENERO</b>	<b>ENZIMAS QUE PRODUCE E,C, IUB No.</b>
<i>Aspergillus niger</i>	$\alpha$ -amilasa 3.2.1.1 $\gamma$ -amilasa 3.2.1.1 Amiloglucosidasa Catalasa 1.11.1.6 Celulasas 3.2.1.4 $\alpha$ -galactosidasa 3.2.1.22 $\beta$ -galactosidasa 3.2.1.23 $\beta$ -glucanasa 3.2.1.6 Glucosa oxidasa 1.1.3.4 Hemicelulasa 3.2.1.26 Lipasa 3.1.1.3 Pectinasa 3.2.1.5 Proteasa ácida 3.4.23.6 Tanasa 3.1.1.20 XILANASA 3.2.1.32
<i>Aspergillus oryzae</i>	$\alpha$ -amilasa 3.3.1.1 $\gamma$ -amilasa 3.2.1.1 amiloglucosidasa $\beta$ -galactosidasa 3.2.1.22 $\beta$ -glucanasa 3.2.1.6 Hemicelulasas 3.2.1.78 Invertasa 3.2.1.26 Lipasa 3.1.1.3 Pectinasa 3.2.1.5 Proteasa alcalina 3.4.2.14 Proteasa ácida 3.4.23.6
<i>Aspergillus phoenicis</i>	Amiloglucosidasa 3.2.1.1
<i>Aspergillus sojae</i>	Celulasas 3.2.1.4
<i>Aspergillus saitoi</i>	Hemicelulasas 3.2.1.78
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Pectinasa 3.2.1.15
<i>Aspergillus flavus</i>	Proteasa alcalina 3.4.21.14

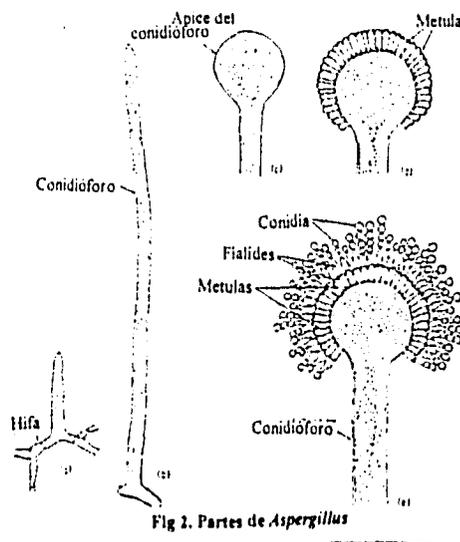
En particular, los hongos del género *Aspergillus* tienen gran capacidad para la secreción de diversas moléculas. Se les considera organismos GRAS (Generally recognized as Safe), y se tiene el conocimiento genético fundamental de algunas especies, lo que permite su manipulación a nivel molecular. Se han utilizado tanto de manera tradicional como en la producción de muchos productos.

#### 2.4 MORFOLOGIA DE ASPERGILLUS:

División: Eumycota II  
Subdivisión: Deuteromycotina  
Deuteromicetes  
Clase: Hyphomycetes  
Orden: Moniliales  
Familia: Moniliaceae  
Género: *Aspergillus*

Raper and Fennell (1965) reconocen 132 especies y 18 variedades en el género. Estas pueden ser clasificadas en 18 grupos todas con características en común. Las características son :

1. Color de la cabeza: Negra, blanca, amarilla y varios tonos de verde.
2. Forma de la cabeza: Globosa, radiada y columnar suelta o compacta.
3. Fialides en serie: Simples o dobles.
4. Forma de la vesícula: En forma de clava, globosa, subglobosa, subclava, espiral, hemisférica o plana y con o sin contracción en el conidioforo inmediatamente abajo de la vesícula.
5. Conidioforo: Suave o rugoso, con color o incoloras.
6. Células de Hülle: Presencia o ausencia . (9) ( Fig 2).



## 2.5 TIPOS DE XILANASAS:

Las enzimas que degradan la hemicelulosa son conocidas como hemicelulasas: son definidas y clasificadas de acuerdo con el sustrato específico sobre el que actúan. Se les agrupa como glucan hidrolazas (EC 3.2.1).

Las L-arabinasas degradan solamente arabinanos; las D-galactanasas degradan galactanos y L-arabino-D-galactanas; las mananasas hidrolizan las uniones  $\beta$ -(1,4)-D-manopiranosas de las mananas y las  $\beta$ -xilanasas desdoblan las uniones  $\beta$ -(1,4)-D-xilopiranosil de los xilanos. (1)

Las xilanasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, ya que están presentes tanto en procariotes como en eucariotes. Dentro de los eucariotes se han encontrado en protozoarios, caracoles y semillas de plantas en germinación, así como en hongos. Dentro de los procariotes se han encontrado en bacterias y cianobacterias de ambientes marinos. Se han estudiado xilanasas intra y extracelulares de varios hongos y bacterias. (1)

**TABLA 3.-MODO DE ACCION DE LOS DISTINTOS TIPOS DE XILANASAS**

1) $\beta$ XILOSIDASA	Degradan xiloligómeros cortos a xilosa y poseen actividad de transferencia sustancial.
EXOXILANASAS	Producen xilosa a partir de xilanos y no poseen actividad de transferencia.
ENDOXILANASAS	Existen 4 tipos:
A)	No pueden cortar ramificaciones que inician con L-arabinosil y producen xilosa y xilobiosa como productos finales.
B)	No pueden cortar ramificaciones y producen oligómeros más grandes que dímeros
C)	Cortan ramificaciones y producen xilosa y xilobiosa.
D)	Cortan ramificaciones y producen oligómeros de tamaño intermedio.

Fuente Murray et al (45)

## 2.6 Xilanasas microbianas-

Las D-xilanasas ( E.C. 3.2.1.8 , 1,4 - $\beta$ -xilano xilano hidrolazas) son capaces de hidrolizar las uniones (1,4)- $\beta$ -D-xilanopiransil de la 4-O-metilglucuronoxilano.

Los microrganismos producen D-xilanasas así como otras hemicelulasas siendo tanto constitutiva como inducibles. Las enzimas que se encuentran en cantidades esencialmente constantes bajo diversas condiciones de crecimiento se denominan constitutivas, mientras que las enzimas inducibles se forman en respuesta a la introducción del sustrato sobre el que actúan.

Muchos organismos producen más de una endoxilansa, y las endoxilanasas tienen diferente especificidad por distintos sustratos. Por ejemplo, Comtat (10) aisló nueve xilanasas de cultivo de *Sporotrichum dimorphosporum*. John et al (11) aislaron seis xilanasas de *Aspergillus niger*. Estas enzimas parecen hidrolizar sinérgicamente a los xilanos. Las curvas de pH de las xilanasas eran muy distintas entre sí variando su pH óptimo desde 4.0 a 6.5. Las enzimas degradan arabinoxilanos por un endo mecanismo produciendo L-arabinosa, D-xilosa, xilobiosa y una mezcla de oligosacáridos ramificados de arabinoxilosa y D-xilosa. Dos de las xilanasas poseían una amplia capacidad de degradar a diferentes sustratos incluso eran capaces de degradar celulosa cristalina. Por otro lado la  $\beta$ -xilosidasa poseía una actividad óptima a pH 6.7 a 7.0 a 42 ° C.

### 2.6.1 Xilanasas de hongos

Dentro de los hongos se han estudiado diversos géneros *Chrysosporium* (13), *Sclerotium* (14), *Aspergillus* (15) y *Aureobasidium* (16), levaduras y bacterias filamentosas y discretas (17).

Según Bailey et al (12) se encontraron altos niveles de xilanasas en *Aspergillus foetidus* VTT-D-71002 que aparentemente es no celulósica y por lo tanto podría ser una posible fuente de hemicelulasas libres de celulosa para su posible utilización en la industria del pulpeo.

En esta especie de *Aspergillus* se encontró que la mayor producción de xilanasas fue utilizando un análogo de la xilobiosa la  $\beta$ -metil-D-xilosido que resultó ser el mejor inductor.

Por otro lado Nakanishi et al (18) encontraron una xilanasas extracelular producida por *Cryptococcus flavus*, la cual posee un pH óptimo de 4.5 y es estable en un rango 3 a 8.0 siendo su temperatura óptima de 55 °C. La enzima resultó ser especialmente activa sobre varios xilooligosacáridos (xilotriosa sobre todo) y xilanos e inactiva sobre celulosa, almidón y arabinosa. Su patrón de hidrólisis sobre varios xilooligosacáridos ( desde xilobiosa hasta xilopentaosa) y xilanos demostró que éste enzima es del tipo endo y que posee actividad trans-

xilosídica.

Gosh *et al* (19) encontraron que *Aspergillus sydowii* MG-49 produce la xilanasa (EC 3.2.1.8) y la  $\beta$ -xilosidasa (EC 3.2.1.37) en un periodo corto de incubación (72 hrs), cultivada en xilanos como única fuente de carbono. Se encontró que la xilosa ( producto de degradación de los xilanos) puede inducir la producción de ambas enzimas xilanolíticas. La xilanasa producida era excretada extracelularmente mientras que la  $\beta$ -xilosidasa se localizó en el interior del micelio, a diferencia de otros microorganismos donde ésta es extracelular. El pH óptimo para la producción de ambas enzimas era de 4.0 mientras que la temperatura era de 30°C. Sin embargo, ambas enzimas mostraron características termoestables teniendo su actividad máxima *in vitro* a 60°C. La producción de la xilanasa se encontró fuertemente influenciada por la adición de algunos aminoácidos en el medio de fermentación y además no producía celulasas.

Milagres *et al* (21) encontraron que *Penicillium janthinellum* es un buen productor de xilanasas comparable con *T.reesei*. Su actividad era inducida por xilanos, bagazo de caña de azúcar o xilosa. La inducción por xilanos era reprimida por la presencia de xilosa o glucosa. Las condiciones óptimas de actividad xilanolítica fue una temperatura de 40°C y un pH de 5.5. Además no se encontró actividad endocelulolítica.

Según Herzog *et al*(31) en *T.reesei* tanto los productos de degradación de los xilanos y de la celulosa sinérgicamente inducen a la formación de xilanasa. En el caso de *Trichoderma longibrachiatum* se encontró que al ser cultivada sobre lactosa mas xilanos producía tanto celulasas como xilanasas, pero se obtuvieron altos niveles de xilanasas al ser crecidos en pulpa de madera al 1% a pH de 7.0. La máxima actividad se observó a pH de 4.8 a 5.5 a 55°C. Se ha observado que el mecanismo de la endoxilanasa podría ser como sigue:

McCarthy *et al* (1985) investigaron cuatro actinomicetos termofílicos para la producción de xilanasas utilizando xilanos y oligosacáridos como inductores. Ellos sugirieron que una pequeña cantidad de actividad xilanolítica constitutiva puede generar xilooligosacáridos de bajo peso molecular a partir de xilanos y que éstos pueden actuar como inductores para aumentar la producción de xilanasas. Sin embargo, la xilosa falló como inductora de xilanasas, así como la glucosa, galactosa y fructosa cuando eran empleadas como única fuente de carbono ( 1).

Debido a que los xilanos son incapaces de entrar a la célula microbiana, la inducción de xilanasas es estimulada por fragmentos de bajo peso molecular de los xilanos, los cuales son producidos en el medio por una pequeña cantidad de enzima producida constitutivamente.

### 2.6.2. Xilanasas bacterianas

Biely y Petrakova (20) probaron diferentes inductores para  $\beta$ -xilanasas producidas por *Cryptococcus albidus* encontrándose que ésta es inducida por compuestos que contengan unidades  $\beta$ -xilopiranosilo en su porción no reductora. Aunque esto no significa que todos sirvan sino que también depende de su estructura aglicona. En *C. albidus* tanto la  $\beta$ -xilanasas como la  $\beta$ -3-xilosidasa son inducibles por isómeros posicionales Xil $\beta$ 1-4xyl pero resultó ser mejor xil $\beta$ 1-4 ara ya que su periodo de incubación es corto.

Según Keskar *et al* (22) en las xilanasas producidas por una cepa de *Streptomyces T7* encontraron que hay un residuo de triptofano y uno de cisteína en el sitio de unión del sustrato. Además, mencionan que lo mismo ocurre con las lisosimas y las celulasas por lo que sugieren una relación entre las tres.

Biely y Petrakova (20) dicen que la xilobiosa es el inductor de enzimas xilandegradativas así como la celobiosa es el inductor de enzimas que degradan la celulosa. Sin embargo, en algunos casos la aplicación de estos oligosacáridos no asegura una alta síntesis de enzima debido al metabolismo de las células de estos oligosacáridos y su represión catabólica subsecuente. Se ha visto que los isómeros posicionales resultan ser mejores inductores. Así mismo encontraron que en algunos microorganismos la soforosa (2-O-  $\beta$ -D-glucopiranosil-D-glucopiranososa) es un inductor más eficiente para celulasas que la celobiosa. Así también la alolactosa, un isómero posicional de la lactosa, se conoce como un excelente inductor de  $\beta$ -galactosidasa en *E. coli*. Tanto la alolactosa como la soforosa se forman de la unión 1,4 beta de sus dímeros mediante reacciones de transglucosilación catalizada por las  $\beta$ -glucosidasas en sus respectivos sistemas celulares.

También se han encontrado xilanasas termoestables de bacterias termofílicas, tanto anaerobias como aerobias. La xilanasas producida por *Bacillus thermoalkalophilus* es óptimamente activa a 70 C y pH 6 a 7.0 (24). Las xilanasas de una bacteria termofílica estricta *Caldocellum saccharolyticum* tiene una temperatura óptima de 70°C y un pH óptimo entre 5.5 y 6.0 (22).

Simpson *et al* (26) describieron una xilanasas extremadamente termoestable de *Thermotoga sp* activa a 105°C y pH de 5.0 a 5.5.

Los miembros del género *Dictyoglomus* representan a un grupo relativamente nuevo de bacterias termofílicas anaerobias productoras de xilanasas (27).

Sunil y Sunil (28) encontraron que *Cellulomonas fimi* producía tres xilanasas (A,B y C), pero que su cantidad era mayor al crecerlo sobre carboximetilcelulosa y xilanos. Además que

existe una represión catabólica sobre la actividad xilanolítica al agregar glucosa, celobiosa u otro sustrato fácilmente metabolizable al medio durante su crecimiento sobre CMC.

La xilanasa A poseía una temperatura óptima de 45°C y un pH de 5.0, la xilanasa B poseía una temperatura óptima de 40 °C y un pH de 6.5 y la xilansa C poseía una temperatura óptima de 45°C y un pH de 5.5 a 6.5.

En bacterias se han estudiado diversas especies de *Streptomyces sp* ya que son muy abundantes en vegetales en descomposición y en el suelo. Se han encontrado que *Streptomyces lividans* es un buen productor de xilanasas así como *Streptomyces xilophagus* y especies de *Chainia*. Grabski y Jeffries (29) dicen que la especie que resultó ser la mejor en cuanto a la producción de xilanasas es *Streptomyces roseiscloticus* además de que produce pocas o ninguna de celulasas y es termoestable mostrando una buena actividad a pH alcalino. Aunque posee una desventaja que es la presencia de pigmentos, los cuales hacen difícil su purificación. También se encontró que esta  $\beta$ -1-4-endoxilanasas mostró alta actividad sobre xilanos pero muy baja actividad sobre celulosa hinchada con ácido. Siendo su pH óptimo de hidrólisis sobre arabinoxilano de 6.5 a 7.0 y una temperatura de 70 °C.

La inducción de enzimas xilanolíticas en diferentes células microbianas es regulada por diversos compuestos como son alquil o aril- $\beta$ -D-xilosidos en *Streptomyces sp* ( Nakanishi *et al* , 1976) y metil- $\beta$ -D-xilosidos en *Cryptococcus albidus* (20).

## 2.7 Mecanismo de acción de las xilanasas

La endoxilanasas I (EXI) se une a la superficie del micelio siendo entonces constitutivas (30) y pudiendo entonces atacar xilanos cuando estos se encuentren disponibles. A diferencia de la celulosa, que es solamente atacada por la conidia y sus celulasas asociadas, la degradación de los xilanos puede ser inducida también en el micelio.

El producto final principal del ataque del EXI, es la xilobiosa, la cual puede entrar a la célula y promover la biosíntesis de más EXI, mediante su acción a un nivel pre traduccional. La xilosa formada por la  $\beta$ -xilosidasa unida a la pared también induce bajos niveles de EXI. La xilobiosa es muy probable que sea acarreada por un transportador disacárido  $\beta$ -unido, el cual también transporta celobiosa y sofrosa. Además los requerimientos estructurales para el inductor parecen ser muy relajados ya que otros disacáridos  $\beta$ -unidos son capaces de inducir la secreción de un poco de EXI. Aparentemente la unión de EXI con la conidia no es indispensable para el crecimiento en xilanos ya que al ser eliminado con detergentes no impide la habilidad de la conidia de germinar en xilanos como fuente de carbono.

En realidad existen muchas teorías de como es el mecanismo de acción de las xilanasas: Otro grupo de investigadores proponen otro mecanismo son Wang et al (32) . Dicen que en *Streptomyces cyaneus* se producen 3 xilanasas ,la xilanasas I y II son inducidos por xilanos pero no por la xilosa o metil- $\beta$ -D-xilosido. Su producción también es reprimida por glucosa. La xilanasas III es constitutiva, pero su producción es parcialmente reprimida por la glucosa. Se propone que la xilanasas III actúa sobre los xilanos produciendo inductores para las xilanasas I y II, funcionando como sensor.

Comtat *et al* (33) probaron la acción de una xilanasas encontrando una posible explicación de su forma de actuar, confirman lo que otros autores han propuesto acerca de que la unión glicosídica del lado izquierdo de la molécula es más fácilmente hidrolizable por las xilanasas. Conforme la xilobiosa se acumula como producto final de la hidrólisis y que los heterosacáridos más pequeños son Ara-Xil2 y Glc-Xil3, es posible concebir que el grupo xilotriosil es necesario para que la hidrólisis se lleve a cabo. Para poder justificar la presencia de los oligómeros, éste componente trisacárido debe de tener su residuo xilosil (I) en el lado izquierdo y sustituido en O-2,(II) insustituido en O-2 y O-3, y el residuo II ramificado o sin ramificar.El corte se realiza entre los residuos II y III. Y que por lo tanto el sitio de unión de la xilanasas acomoda al residuo de xilobiosa sin considerar la presencia del sustituyente en O-3(I). Cuando el sustituyente está en O-2 del residuo xilosil I, las dos uniones glicosídicas de la derecha de éste residuo ramificado no son accesibles para el enzima.

Por otro lado Wong *et al* (34) dicen que es posible que los sustituyentes tengan un papel importante en la unión enzima-sustrato y que esto ayude a la acción de la xilanasas. De hecho, se ha visto que esta pudiera ser la razón del porque tres xilanasas tienen preferencia por xilanos ramificados. Sin embargo, estas conclusiones son difíciles de amillarar ya que el grado de sustitución también es directamente proporcional a la solubilidad, siendo ésta última otra propiedad de los xilanos que influencia la hidrólisis enzimática. Las actividades de las xilanasas y  $\beta$ -xilosidasas dependen de el largo de la cadena de xilooligosacáridos.

Okasaki *et al* (30) han trabajado con cuatro cepas de distintas de *Bacillus spp* con una temperatura de 45 a 50°C y un pH de 10. En estos estudios encontraron que las xilanasas producidas por éstas cuatro cepas están formadas por dos componentes. De éstas cuatro cepas se tomaron dos,por ser las más representativas ,(W1 y W2). Al medir el pH W1-I y W2-I poseían una actividad óptima a pH 6.0. Por otro lado, W1-II y W2-II poseían actividades elevadas a pH alcalinos. W1-II era más activa a pH 7 a 9.6. Al realizar pruebas de estabilidad al pH las cuatro resultaron ser estables en un rango de pH de 4.5 a 10. Lo que respecta a su temperatura óptima para W1-I y W2-I fué de 65°C y para W1-II y W2-II fué de 70°C. Durante la hidrólisis, en las

primeras etapas se producían xilooligómeros de alto peso molecular, conforme iba avanzando la hidrólisis. Con W1-I y W2-I los productos finales de la hidrólisis fueron xilobiosa (X2), Xilotriosa(X3), Xilotetraosa(X4) y Xilopentaosa(X5), sin embargo, xilosa(X1) no se produjo. Por otro lado con W1-II y W2-II los productos finales X1, X2, X3 y X5.

En otros estudios realizados con ayuda de las endoxilanasas purificadas del hongo café *Tyromyces palustris*, los azúcares neutros en los hidrolizados eran xilosa y xilobiosa en una proporción de 1 a 4. Los principales azúcares ácidos fueron ácido 4-O-metil-D- glucurónico y O-(4-O- Me-  $\alpha$ -GlcAp)-(1,2)-O-  $\beta$ -D-Xilp-(1,4)-D-XilpO-(4-O-Me-  $\alpha$ -D-GlcAp)-(1,2)-O-  $\beta$ -D-Xilp(1,4)-D-Xil,O-(4-O-Me-  $\alpha$ -D-GlcA)-(1,2)-O-  $\beta$ -D-Xylp-(1,4)-O-  $\beta$ -D-Xilp(1,4)-O-  $\beta$ -D-Xilp(1,4)-D-Xil estuvieron presentes en baja cantidad.

Estos ácidos aldourónicos acarrean al residuo ácido 4-O- metil-D-glucopiransilurónico a la porción no reductora de la xilosa. Este hecho indica que las xilanasas poseen una alta afinidad por las uniones  $\beta$ -(1,4)-xilosídicas. Por otro lado las dos uniones  $\beta$ -(1,4)-xilosídicas en la vecindad derecha de la cadena ácida son muy resistentes a la acción enzimática debido al impedimento estérico del sustituyente.

La hidrólisis de los xilanos de maderas suaves con xilanasas homogéneas ha sido estudiada por varios investigadores. Debido a que los xilanos de madera suave contienen una porción arabinofuranosido además de la porción del ácido 4-O-metil-D- glucopiransilurónico los productos de hidrólisis son mucho más complejos que aquellos obtenidos con maderas duras. Al utilizar xilanasas altamente puras se producen altas cantidades de xilobiosa y xilosa a partir de los xilanos después de la producción de xilooligosacáridos de varias longitudes. Este endo-mecanismo es obstruido por la L-arabinofurano y el ácido 4-O-metilglucurónico dando como resultado la formación de una mezcla de los oligosacáridos de arabinosa-xilosa (GlcA-Xyln).

De acuerdo a algunos reportes, parece ser que la acción de las xilanasas es diferente entre sí, dando un grado diferente de hidrólisis para los xilanos-arabino-(4-O-metilglucurono) y por lo tanto distintos productos de hidrólisis.

Debido a que las estructuras de los residuos xilosilicos de los xilanos difieren levemente de aquellos residuos glucosídicos de la celulosa, algunas preparaciones de enzimas altamente purificadas de *T. viride*, *C.paradoxa*, *A. niger* y *Bacillus sp* han mostrado la capacidad de degradar xilanos, Carboximetilcelulosa y celulosa.

Algunas endo-xilanasas homogéneas son capaces de escindir uniones L-arabinosilicas, dando como producto L-arabinosa, mientras que otras preparaciones homogéneas no son capaces de desramificar xilanos.(4)

Las enzimas xilanolíticas incluyen endo y exoglicosidasas: 1,4-  $\beta$ -xilanasas EC3.2.18,  $\beta$ -xilosidasa (EC3.2.1.37) y  $\alpha$ -arabinosidasa (EC3.2.1.55), acetil xilanesterasa y  $\alpha$ -glucuronidasa. Según estudios realizados por Poutanen y Puls (36) y Viikari *et al* (37) se ha observado que el acceso de las enzimas en madera o pulpa puede estar limitada por varios factores. Se ha visto que el principal factor limitante de este acceso es la superficie específica (37), porosidad de la fibra (38) y el tamaño de los poros medios (39). Así como la organización molecular de los demás componentes de la madera o de la matriz de la pulpa, la presencia de celulosa y lignina pueden limitar el acceso del sustrato a las enzimas.

La completa degradación de los xilanos requieren de la acción de diversas enzimas, sin embargo el enzima clave es la endo-1,4-  $\beta$ -xilanasas (EC3.2.18) despolimerizadora.

## 2.8 USOS DE LAS XILANASAS:

Las xilanasas se utilizan en la industria de los alimentos y en la remoción de xilanos de la pulpa de madera y otras fibras vegetales, así como en el proceso de blanqueo en el papel o bien para mejorar las propiedades de la fibra.

Las xilanasas juegan un papel importante en la descomposición de material vegetal mediante microorganismos. Se pueden lograr mejoras en la bioconversión de biomasa en combustible y químicos si el componente hemicelulósico de la biomasa, el cual incluye xilana, es usado. Esta aplicación, y la licuefacción de frutas y vegetales, requiere de una actividad conjunta de sistemas enzimáticos (xilanasas, celulasas y pectinasas). Las celulasas deben de estar ausentes si las xilanasas son usadas para eliminar el xilano de la pulpa de madera durante la elaboración del papel. De esta manera el xilano de la pulpa da como resultado efluentes que contienen xilanos. (41)

Actualmente ha aumentado la preocupación por la contaminación del ambiente con todo tipo de residuos tóxicos de las diferentes industrias. El empleo del cloro y sus compuestos (hipoclorito de sodio y otros) para blanquear la pulpa de papel causa una serie de reacciones químicas que aún cuando se recicle el ácido clorhídrico; las cloraminas como tales son liberadas al medio. Si bien la toxicidad de las diversas cloraminas es baja; existen en la naturaleza concentradores biológicos y una vez que ingresan a la cadena alimenticia tendrán el efecto de dañar a diversas especies y por tanto afectan la biodiversidad logrando inclusive extinguir localmente algunas especies. Vermeer, K. *et al* (44) han estudiado aves corriente abajo de las

fábricas de papel y han encontrado daños en higado, riñón y gónadas, como ya se mencionó anteriormente.

Por ello se buscan métodos alternativos para el blanqueo del papel. Actualmente se está explorando la posibilidad de utilizar a las xilanasas para blanqueo de pulpas sin los inconvenientes de los compuestos a base de cloro.

Las xilanasas reducen el consumo de compuestos químicos para el blanqueo en un 30 a 50 % en pulpas de madera dura y 20 a 30 % en pulpas de madera suave. Las xilanasas son las enzimas más eficientes hasta ahora estudiadas ( Viikari et al, 1987; Kantelinen et al, 1988 ).

El blanqueo es el proceso por el cual se elimina la lignina residual de la pulpa. Esta lignina residual está unida covalentemente a los fragmentos reactivos de los carbohidratos en la pulpa (11). Conforme el cocimiento de la pulpa avanza, los xilanos se precipitan en la superficie de las fibras de celulosa (11) entrapando productos de degradación en la matriz. Estos imparten el característico color café a la pulpa. Es por esto que se requiere de hacer un blanqueo, logrando con ello que el papel sea blanco.

Durante la elaboración del papel a partir de madera se requiere de la separación de las fibras de la madera y después su reconstrucción a una hoja. En la madera la lignina mantiene unidas a las fibras; estas pueden ser separadas ya sea por degradación y eliminación de la lignina (pulpeo químico) o físicamente rompiendo las fibras ( pulpeo mecánico). Ambos métodos presentan diversos inconvenientes, por ejemplo en el pulpeo mecánico disminuye la fuerza de las fibras, reversión en el brillo y un requerimiento alto de energía es por esto que se están buscando nuevas alternativas. Debido a que la madera y otras materias primas utilizadas en el pulpeo del papel son degradados de forma natural, se pensó que las xilanasas podrían resultar útiles para el proceso del pulpeo.

El pulpeo mecánico usualmente consiste de dos fases. En la primera ( refinado primario ) rompe la madera a fibras individuales. Subsecuentemente, la fase de refinado secundario suelta la estructura de las paredes de las fibras incrementándose así su flexibilidad y fibrilación de la superficie de las fibras. Estos efectos aumentan la fuerza de unión de las fibras.

Actualmente se han estudiado los efectos del tratamiento biológico a la pulpa mecánica en bruto después del refinado primario. Se han tratado las pulpas con diversos hongos ligninolíticos como *Trametes versicolor*, *P. chrysosporium* y *Pleurotus ostreatus*. El tratamiento con *P.chrysosporium* redujo la energía requerida para el refinado secundario de la pulpa. Se han comparado los resultados obtenidos al emplear los hongos lignino-degradantes antes y después de la desfibración. Los efectos del post-tratamiento en la fuerza y reacción durante el refinado fueron muy buenos, sin embargo, en todos los hongos estudiados en el pre-tratamiento resultaron ser más eficaces al aumentar la fuerza de la pulpa. No nada más hubo una disminución en la energía requerida sino también una mejora en algunas de las características (libertad

"freeness", Largo de rompimiento "breaking length" e índice de explosión "burst index) del papel obtenido, excepto en el brillo. Una de las características que más atención ha atraído es que se eliminan los desechos que son tan difíciles de tratar. (12)

La habilidad de los hongos madero-degradadores para hidrolizar la celulosa, hemicelulosa y lignina sugiere que podrían utilizarse en el tratamiento de residuos de industrias utilizadoras de lignocelulosa. Estos hongos no son parte de la flora microbiana de los sistemas actuales de tratamiento de residuos.

En Finlandia se ha desarrollado un proceso fúngico para convertir los licores de desecho del proceso de pulpeo al sulfito en biomasa rica en proteínas. Esta ha sido utilizada con éxito en pollos.

También se ha desarrollado un proceso para convertir agua de desecho usada en la elaboración del tablero de fibra a un alimento para animales rico en proteína utilizando *Sporotrichum pulverulentum*. El desecho consiste en una mezcla de azúcares y oligosacáridos ácidos de bajo peso molecular y partículas lignocelulósicas suspendidas. El producto se usa para rumiantes y además posee un alto valor nutricional para animales monogástricos. (45).

Debido a que la hemicelulosa es más fácilmente hidrolizada con ácido y bajas temperaturas el uso de las hemicelulosas para producción de azúcar ha causado un poco de entusiasmo. Desde el punto de vista del proceso la hemicelulosa es más fácil de hidrolizar que el almidón. En el caso de la sacanificación del grano la masa tiene que ser calentada hasta 120° C para poder tener todo el almidón gelatinizado y luego hidrolizarlo con ácido o con enzimas. En el caso de la hemicelulosa una alta temperatura es indeseable en presencia de ácido porque la xilosa y arabinosa son degradadas y convertidas por el calor y el ácido en furfural y materiales poliméricos inútiles. Este furfural tiende a inhibir la fermentación de levaduras. Por lo que se ha visto que trabajando a bajas temperaturas y ácido diluido solubiliza una fracción significativa de celulosa sin la formación de furfural (46).

Otro uso que se le está dando a las xilanasas es en la elaboración de pan. Según Mutsaers *et al* (48) uno de los constituyentes polisacáridos del endosperma del trigo es arabinoxilanos (pentosanos). En el trigo el arabinoxilano representa de un 2 a un 3% (w/w) del harina total. De estos el 0.5 -0.8 % (w/w) es soluble en agua. El interés de los arabinoxilanos en la elaboración del pan radica en su capacidad para retener agua. Esta absorbe alrededor de un tercio del agua adicionada a la masa. Por lo que una hidrólisis enzimática parcial de estos arabinoxilanos con xilanasas (producidas por *A. niger*) liberan agua. Ahora bien, si ésta agua es liberada en el

momento adecuado durante el horneado el resultado es una firmeza de la miga reducida, aumento de la estructura de la miga y aumento en el volumen de la hogaza.

También se ha utilizado la xilosa producida a partir de hemicelulosa para la elaboración de etanol. Así como otros azúcares de la hemicelulosa han sido utilizados en la fermentación para producir acetona y butanol por *Clostridium*, xilitol por *Candida* y 2,3-butanediol por *Klebsiella pneumoniae*.(43)

## 2.9 Regulación de la Síntesis de xilanasas

En su habitat natural, la célula se enfrenta a una diversidad de fuentes potenciales de energía. La supervivencia de una especie en este ambiente competitivo ha resultado de capacidad para adaptarse a su medio ambiente. Produciendo la maquinaria enzimática para la degradación de una amplia gama de compuestos orgánicos. Esta maquinaria está regulada por mecanismos que responden directa o indirectamente al medio ambiente. Las enzimas involucradas en el catabolismo de ciertos compuestos pueden ser sintetizadas solo cuando están presentes el sustrato o bien sustratos análogos; estos últimos son aquellos que la enzima no puede atacar pero inducen la producción enzimática. Gracias a éste proceso de inducción, las enzimas son rápidamente formadas cuando son necesarias. En la represión catabólica, la síntesis de enzimas es suspendida cuando se ofrece al organismo energía catabolizable. El crecimiento ocurre con una fuente de energía y cuando esta se termina utiliza otra. La represión catabólica involucra al AMP cíclico que estimula la síntesis de un gran número de enzimas y es necesario para la síntesis del RNA mensajero. Este nucleótido se une al gene promotor por medio de una proteína especial llamada proteína activadora de catbolitos (CAP) e incrementa la afinidad de la RNA polimerasa por el gene promotor aumentando la frecuencia de transcripción ( 49 ).

El adecuado aprovechamiento de la producción de xilanasas requiere del conocimiento de los mecanismos regulatorios que regulan la biosíntesis de estas enzimas. Los estudios concernientes a este tema han sido enfocados hacia la inducción ( Okeke & Paterson, 1992; McKenzie et al, 1987; Ishaque & Kluepfel, 1981; Piñaga et al, 1994); hacia el establecimiento de estrategias para obtener sistemas xilanolíticos libres de celulasas ya que esta cualidad es importante en la designificación de la celulosa para la obtención de la pulpa del papel (Biely et al, 1978; Clarke & Strating, 1989), así como la manipulación de cepas a través de clonación (Kluepfel et al, 1991; Khana & Gauri, 1993; Brodel et al, 1990). ( 50 )

Se ha visto que tanto las celulasas como las xilanasas son inducibles en las células microbianas por fragmentos de los polisacáridos correspondientes, que se forman por la acción de hidrolasas, producidas constitutivamente y que son secretadas al medio de crecimiento o bien

están asociadas a las células acelerando la síntesis de las enzimas.

Otros factores que deben de ser considerados para los sistemas de regulación de xilanasas son los sistemas de transporte de la xilosa y sus oligosacáridos al interior de la célula así como la concentración de los inductores metabolizables ya que a bajas concentraciones son efectivos pero a concentraciones más elevadas la inducción es menos pronunciada ya que se presenta la represión catabólica por los productos de degradación. Por ejemplo en *Cryptococcus albidus* (Biely et al., 1980) a altas concentraciones la xilobiosa reprime la síntesis de enzimas .

Los xilanos al ser hidrolizados suministran inductores pero no hay que descartar la posibilidad que puedan producir inductores no metabolizables o gratuitos. Incluso se ha visto que éstos pueden ser mejores inductores ya que son resistentes a la hidrólisis enzimática. Tales compuestos se encuentran en la célula por un periodo indefinido y mientras que estén presentes los nutrientes necesarios, la inducción de las enzimas puede continuar.( 50 )

## 2.10 Nuevas Posibilidades

Obviamente hay que realizar mucha más investigación en el área del pulpeo biológico, ésta investigación debe de enfocarse en tres áreas:

1) Encontrar mejores cepas de hongos, actualmente se emplean pocas de las 2000 especies de hongos ligninolíticos conocidos. Solo se han probado en periodos de incubación largos, esto podría no ser una buena opción ya que en todos los procesos industriales, el tiempo es de primordial importancia. Para ser usados en periodos de incubación más cortos asociados con biopulpeo se requiere de cepas más activas. También falta por probar la posibilidad de alterar las características bioquímicas y fisiológicas del hongo con ayuda de la ingeniería genética.

En el presente trabajo se está probando con una cepa de *Aspergillus* no estudiada hasta ahora. Se ha visto que algunas cepas de hongos encontradas en el medio ( y no del banco de cepas de un laboratorio) tienden a ser más resistentes a medios hostiles y por esto mismo es que desarrollan métodos para poder emplear el escaso alimento que les rodea generando enzimas que les ayuden a degradar más sustratos. Las enzimas pueden ser estructurales, inducibles o inclusive captadas de otros microorganismos por medio de plásmidos o hasta virus.

2) La segunda área es el encontrar condiciones de optimización para la acción del hongo .

3) La tercera es la de investigar el mecanismo del efecto fúngico, ya que aún no queda claro porque causan una disminución en la energía de refinado y un aumento de la unión de las fibras.

Actualmente se están empleando técnicas de microscopía electrónica como método de identificación para microorganismos, además de que se han encontrado diferencias morfológicas de acuerdo al sustrato en el que crecieron. En ésta tesis se trató de tipificar la cepa MGM-470 con la ayuda de la microscopía electrónica, aunque ésta no sea una prueba concluyente para identificar microorganismos.

## **2.11 Microscopía Electrónica**

Existen básicamente dos tipos de microscopio electrónico : microscopio electrónico de transmisión (MET), y el microscopio electrónico de barrido (MEB), sus equivalentes en microscopía óptica son el microscopio de campo claro y el microscopio de disección respectivamente. (51)

### **Formación de la imagen en el microscopio electrónico**

Los microscopios electrónicos de transmisión y barrido tienen como fuente común de electrones lo que se denomina el cañón electrónico. Este dispositivo como su nombre lo sugiere, es el encargado de suministrar el haz de electrones con que se va a bombardear el espécimen. Los electrones requieren de un alto vacío para reducir las probabilidades de interacción con una molécula de gas, y son modificados en su trayectoria solo por los campos electrostáticos como los que contienen los átomos, y que atraen o rechazan a los electrones según su carga. Los campos magnéticos también afectan la trayectoria de los electrones, de tal manera que el campo magnético circular que crean las bobinas de las lentes magnéticas de estos aparatos tienen el efecto de una lente convergente. Variando la corriente a través de las bobinas, se cambia la convexidad de las lentes y su aumento.

La formación de la imagen del microscopio electrónico de barrido, el haz de los electrones es enviada sobre el objeto, ( la muestra), chocando contra la superficie de la misma, dando origen a un complicado fenómeno de interacción. Como resultado de esta interacción, se emiten diferentes tipos de radiaciones, entre ellos se encuentran los electrones secundarios que serán recogidos por medio de un detector el cual se encarga de transformarlos en señales eléctricas que, a su vez serán presentadas en una pantalla de rayos catódicos, obteniéndose una imagen con profundidad de campo y una agradable perspectiva tridimensional. Para el microscopio electrónico de barrido, la muestra puede ser gruesa, pero dado el mecanismo de formación de imágenes por electrones secundarios, es necesario que la muestra tenga una superficie electroconductora. Esto se debe a que los electrones que caen sobre la muestra son más que los electrones secundarios que la muestra emite; esto a su vez crea un campo electrostático en la muestra y una distorsión de la imagen. La capa electroconductora más frecuentemente usada es una lluvia de iones de oro sobre

la muestra. Por otra parte dado que solo se observan estructuras de superficie, es también importante deshidratar la muestra a punto crítico a fin de evitar que una interfase gas-líquido pase sobre la muestra y por tensión superficial colapse las estructuras más finas.

**NOTA:**

Este proyecto forma parte de una línea de investigación más amplia sobre la regulación y secreción de xilanasas producidas por cepas de *Aspergillus* en ambientes extremos. Este trabajo fue financiado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM. Proyecto: IN209194.

### **OBJETIVO :**

- \* Determinar las condiciones de producción de xilanasas por una cepa de *Aspergillus* en condiciones restrictivas .
- \* Determinar el efecto del pH , fuentes de carbono , nitrógeno y vitaminas sobre el crecimiento y la producción de xilanasas a 45°C..

**OBJETIVO :**

\* Determinar las condiciones de producción de xilanasas por una cepa de *Aspergillus* en condiciones restrictivas .

\* Determinar el efecto del pH , fuentes de carbono , nitrógeno y vitaminas sobre el crecimiento y la producción de xilanasas a 45°C..

### 3.MATERIAL Y METODOS

#### **Estrategía Experimental.-**

Para el desarrollo del presente trabajo fue necesario seleccionar una cepa que fuera capaz de crecer y producir xilanasas a temperaturas elevadas. Esto se llevó a cabo evaluando el crecimiento de todas las cepas con las que se cuenta en el laboratorio en medio sólido y líquido así como la producción de actividad, seleccionándose aquella cepa capaz de producir la mayor actividad específica, es decir, la mayor actividad por unidad de biomasa obtenida, creciendo las diferentes cepas a 45°C.

Una vez elegida la cepa se procedió a establecer las condiciones de producción de las xilanasas por la misma. Para lograr lo anterior se evaluó el efecto de diferentes componentes del medio de cultivo así como el pH de crecimiento y producción. Los componentes evaluados fueron xilanos y materiales que los contienen (olote,hemicelulosa), algunos polisacáridos y azúcares solubles. También se evaluó el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno y el efecto de diferentes aminoácidos y vitaminas.

Por último se consideró conveniente realizar una caracterización morfológica preliminar de la cepa utilizada en el presente trabajo.

A continuación se describe detalladamente la metodología utilizada para el desarrollo del trabajo.

#### **3.1 Selección**

La selección se llevó a cabo en dos etapas, la primera de preselección y una segunda de selección propiamente dicha. La preselección se realizó de la siguiente manera:

##### **Microorganismos usados**

Se usaron 48 cepas del cepario del laboratorio todas ellas del género *Aspergillus* . Estas se probaron para poder elegir una cepa productora de xilanasas extracelulares.

##### **Medio de cultivo**

Las cepas se propagaron y conservaron en PDA ( potato dextrose agar). Para evaluar la producción de xilanasas se utilizó un medio basal con xilanos de abedul como fuente de carbono. Las placas se incubaron a 37 °C por 72 hrs.

Para poder elegir la o las cepas a utilizar se utilizaron los siguientes parámetros de selección:

a) Medición del diámetro de las colonias en cm.

b) Medición de los diámetros de los halos de hidrólisis: Con lugol se revelaban los halos de hidrólisis, se dejaba 30 min reposando con dicho colorante, luego se elimina con agua corriente.

c) Se determina la producción específica de la siguiente manera:

$$R = \text{Diámetro de halos} / \text{Diámetro de colonia.}$$

La selección se llevó a cabo utilizando las cepas obtenidas en la fase de preselección éstas fueron probadas en medio líquido a 45°C.

#### **Microorganismos usados**

Las cepas preseleccionadas fueron probadas en medio líquido con xilanos de abedul como única fuente de carbono. Las cepas fueron cultivadas a 37 y 45°C a 100 rpm por 72 hrs

#### **Medio de cultivo ( Medio Basal)**

Medio líquido para el crecimiento y la producción de xilanasas extracelulares durante la selección de la cepa.

Extracto de levadura 0.3 %

Fosfato de potasio 0.2 %

Difosfato de potasio 0.2 %

Sulfato de amonio 0.4 %

Agua 200 ml

Y como fuente de carbono se le adicionó xilanos de abedul al 1%.

El pH se ajustó a 5.0 con NaOH y ácido sulfúrico diluidos y se esterilizó a 121°C por 20 min.

### **3.2 Producción de xilanasas a 45°C**

#### **Condiciones para la producción de enzimas**

Fueron utilizados matraces Erlenmeyer de 500 ml con 200 ml del medio basal adicionado de la fuente de carbono deseada a una concentración de 1% ,excepto donde se especifique lo contrario, inóculándose con el volumen calculado de esporas/ml, los matraces fueron incubados a 45°C y 100 rpm. Durante el transcurso de la fermentación se tomaron muestras de 10 ml en tubo de ensayo bajo condiciones estériles a las 24, 48, 72 y 96 h. Después de tomada las muestras se midió el pH.

#### **Preparación del inóculo**

En condiciones estériles se sembró al microorganismo en placas conteniendo medio de PDA (potato dextrose agar) y se incubó a 37 °C durante 72 hrs. Después de este tiempo fueron cosechadas las esporas con asa bacteriológica y suspendidas en agua estéril, agitando constantemente ya que las esporas son hidrófobas; antes de inocular los matraces se realizó un conteo con microscopio, una vez obtenido la cantidad de esporas por ml se les pone a los matraces la misma cantidad de inóculo calculado ( $0.5$  a  $1 \times 10^6$  esporas/ml).

#### **Evaluación del crecimiento y producción de xilanasas con diferentes fuentes de carbono y nitrógeno**

Una vez elegida la cepa se evaluó el efecto de la fuente de carbono siendo las fuentes evaluadas las siguientes:

Xilanos de abedul, xilanos de avena, xilanos de olote de maíz, xilanos molidos.

Así mismo se utilizaron azúcares solubles como son: xilosa, L-arabinosa, D- galactosa, D- manosa, glucosa y mezcla de ellos, como es la mezcla de los cuatro tipos de xilanos con glucosa y /o xilosa, para determinar así la sensibilidad a la represión catabólica.

Por otro lado, se evaluó también el efecto de la concentración de la fuente de carbono en un intervalo de 0.5 al 3 % ( Sólo en xilosa y xilanos de abedul, todas las demás se probaron al 1%).

Y las fuentes de nitrógeno evaluadas fueron las siguientes:

L-asparagina, sulfato de amonio, casaminoácidos, aminoácidos, nitrito y nitrato de sodio .

Todas se calculó el contenido de nitrógeno presente en sulfato de amonio y con base en esto se les puso la misma cantidad de nitrógeno.

## **Determinación de Crecimiento**

Para determinar el crecimiento del microorganismo se realizó por dos métodos:

- 1) Determinación de peso seco
- 2) Determinación de proteína con el método de Lowry

### **a) Determinación de peso seco**

Se tomaron muestras de 10 ml correspondientes a distintos tiempos de fermentación y se filtraron a través de un sistema Millipore, con membranas de  $5\mu$  de tamaño de poro. La biomasa retenida y las membranas fueron puestas a secar en un horno a peso constante durante 48 hrs a  $50^\circ\text{C}$ . Se determinó la biomasa producida por diferencia de peso.

### **b) Determinación de proteína extracelular**

La cantidad de proteína extracelular fue determinada por el método de Lowry (1951) basado en la formación de un complejo colorido entre la proteína y el cobre.

Este método es empleado cuando el sustrato es parcialmente soluble. Consiste de lo siguiente:

Se centrifuga una alícuota de 10 ml a 5000 rpm por 5 min y se le dan tres lavados con agua destilada a las células, finalmente se resuspende en 1 ml de agua destilada y se determina la proteína por el método de Lowry.

Método Lowry:

Para la determinación de proteína celular se coloca en tubos de ensayo 0.5 ml de células, 0.7 ml de agua destilada y 5 ml de reactivo D, compuesto por 1 parte de  $\text{CuSO}_4$  al 1% en agua, 1 parte de tartrato de sodio y potasio al 2% en agua y 50 partes de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% en  $\text{NaOH}$  0.1 N; se agita vigorosamente y se deja reposar por 10 min. Se agregan 0.5 ml de reactivo Folin-Cicalteau diluido en agua destilada 1:1, se agitan y se dejan reposar 30 min. Se leyó a una longitud de onda de 590 nm (Spectronic 20) y se interpoló en una curva de albúmina sérica bovina.

## **Determinación de Actividades Enzimáticas**

### **a) Determinación de Actividad Xilanolítica**

Como sustrato se utilizó una solución de xilanos de abedul (birchwood, Sigma) al 1 % en

buffer de citratos 0.15 M, pH 5. La determinación de los grupos reductores se realizó por el método de Miller (1959) del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

El sistema de reacción estuvo compuesto por 0.5 ml de xilanos de abedul, 0.4 ml de buffer de citratos 0.15 M, pH 5. Se preincubó este sistema durante 30 min a 50°C. Se detuvo la reacción adicionando 1 ml de DNS, se calentó a ebullición en baño maría por 5 min y se agregaron 5 ml de agua destilada. Se leyó en el espectrofotómetro (Spectronic 20) a una longitud de onda de 540 nm y se expresó como reductores equivalentes de xilosa por mililitro de filtrado enzimático interpolando en una curva patrón de dicho azúcar.

Para cada una de las determinaciones se realizó un control inactivando a la enzima agregando antes el DNS.

#### **b) Determinación de Actividad Celulolítica**

Como sustrato se utilizó una solución de Carboximetilcelulosa (CMC) al 1 % en buffer de Citratos 0.15 M, pH 5.0. La determinación de los grupos reductores se realizó por el método de Miller (1959) del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

El sistema de reacción estuvo compuesto por 0.5 ml de xilanos de abedul, 0.4 ml de buffer de citratos 0.15 M, pH 5.0 y 0.1 ml filtrado enzimático libre de células. Se incubó 30 min a 50°C. Se detuvo la reacción adicionando 1 ml del reactivo de DNS, se calentó a ebullición en baño maría y se agregaron 10 ml de agua destilada. Se leyó el espectrofotómetro (Spectronic 20) a una longitud de onda de 540 nm y se expresó como reductores equivalentes de xilosa por mililitro de filtrado enzimático interpolando en una curva patrón de dicho azúcar.

Para cada una de las determinaciones se realizó un control inactivando a la enzima agregando antes el DNS.

#### **Determinación de grupos reductores**

Se determinó la concentración de grupos reductores en los filtrados libres de células por el método de DNS ( Miller, 1959). El sistema enzimático estuvo compuesto de 0.1 ml de filtrado libre de células, 0.9 ml de agua destilada y 1 ml del reactivo de DNS. Se hirvió 5.0 min en baño de agua. Se agregaron 10 ml de agua destilada y se leyó a una longitud de onda de 540 nm (Spectronic 20).

### **Vitaminas**

Las vitaminas a probar son biotina y tiamina con y sin extracto de levadura así como combinadas sin extracto de levadura.

### **Evaluación del efecto del pH**

Para el pH se probó un rango de 3.0 a 10.0 con intervalos de 1.0 utilizando medio líquido conteniendo xilanos de avena o de abedul como única fuente de carbono.

## **3.3 Determinación de las características Morfológicas de la cepa seleccionada**

### **Morfología de las colonias**

Morfometría del hongo en diferentes condiciones de crecimiento.

Las muestras evaluadas fueron xilosa, xilanos de abedul y olote tanto en medio sólido como en medio líquido crecidos a 37 y 45°C.

### **Microscopía Electrónica de barrido**

Para éste estudio se crecieron los hongos en medio basal líquido o sólido y como fuente de carbono xilosa, xilanos de abedul y olote al 1%. A las 72 hrs de crecimiento se fijaron con glutaraldehído al 3 % en buffer de fosfatos, se deshidrataron con alcoholes de concentración creciente y se secaron a punto crítico en una cámara de bióxido de carbono líquido. Una vez secas las muestras se cubrieron con una capa de 150 Å de oro.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1) SELECCION A 37 °C

Las 48 cepas con las que se cuenta en el laboratorio fueron agrupadas en 3 grupos de acuerdo con el diámetro de la colonia, diámetro del halo de hidrólisis y R. Estas fueron crecidas en medio que contenía xilanos de abedul como fuente de carbono. Las del grupo I fueron todas aquellas cuyos diámetros eran mayores de 2.9 cm, las del grupo II cuyo diámetro estaba entre 2.0 y 2.9 cm y las del grupo III cuyo diámetro era inferior a 2.0 cm. De acuerdo a lo anterior se eligieron 5 cepas : 60, 290, 370, 470 y 480.

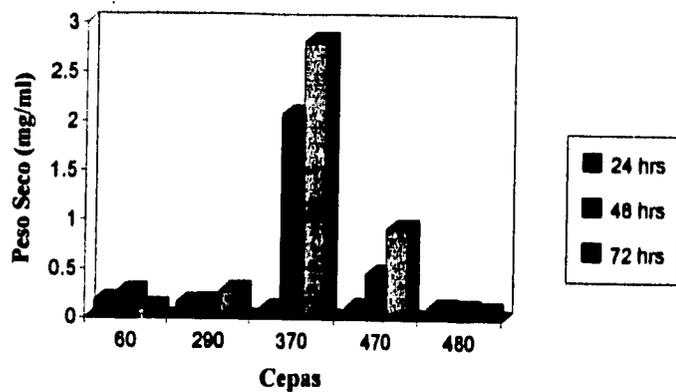
La cepa 60 pertenece al grupo I y el resto al grupo III. A continuación sus diámetros de colonia y halo así como el de R de estas cinco cepas ( Tabla 4.1.1).

**TABLA 4.1.1**

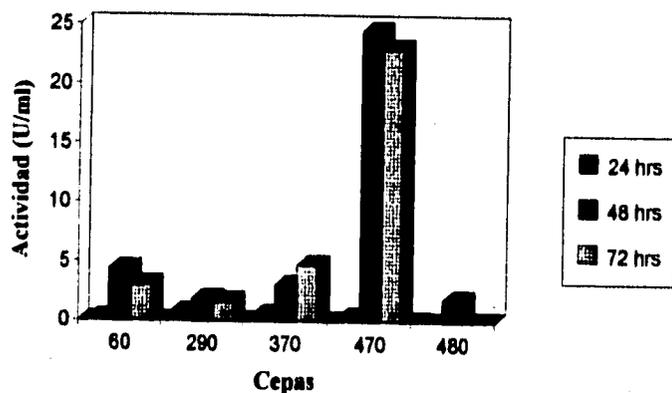
<b>CEPA</b>	<b>DIAMETRO DE COLONIA</b>	<b>DIAMETRO DE HALO</b>	<b>R</b>
60	1.55	3.35	2.15
290	1.6	3.65	2.27
370	0.1	1.0	10
470	0.95	1.3	1.3
480	0.8	1.9	3.16

Se procedió a determinar la actividad de las xilanasas producidas en medio líquido utilizando como fuente de carbono xilanos de abedul a pH= 5.0 . Los matraces se pusieron a 45 °C por 72 hrs.

Posteriormente se determinó el crecimiento ( Fig 1 y la actividad de la enzima. (Fig 2)



**Fig 1** Comparación del crecimiento de las cepas en matraces con xilanos de abedul al 1% a 37°C, agitación 100 Strokes/min.

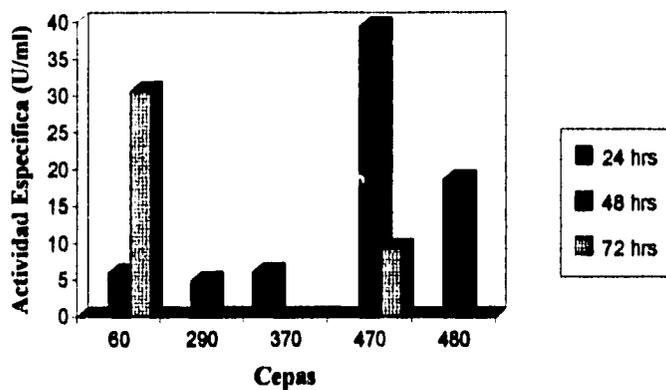


**Fig 2** Comparación de la actividad xilanolítica de las cepas en matraces con xilanos de abedul al 1% a 37°C, agitación 100 Strokes/min.

Con ambos valores se determinó la actividad específica. Siendo la ecuación para ella la siguiente:

$$AE = \text{Actividad} / \text{Crecimiento}$$

Los valores de actividad específica son los siguientes: (Fig 3)



**Fig. 3 Comparación de la actividad específica de las cepas en matraces con xilanos de abedul al 1% a 37°C, agitación 100 Strokes/min.**

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede observar que la cepa con mayor actividad xilanolítica y actividad específica fué la cepa 470, sin embargo en cuanto al crecimiento ésta fué la segunda. Esto nos indica que la producción xilanolítica y el crecimiento no están relacionados.

Estas pruebas se realizaron también a 45°C (datos no mostrados) obteniéndose los mismos resultados; de aquí que se haya elegido dicha cepa para la producción de xilanasas. En virtud de que las xilanasas se utilizan a temperaturas relativamente elevadas se eligió utilizar 45°C como temperatura de producción. La cepa de *Aspergillus* ha probar es una cepa silvestre, se ha visto que éste tipo de cepas tienden a adaptarse más fácilmente a situaciones precarias, de aquí el interés por utilizar una cepa de éste tipo.

Una vez elegida la cepa se inició el largo proceso para encontrar las condiciones de producción de dicho sistema enzimático.

## 4.2 EFECTO DE pH

Para determinar el pH al que se produjera la mayor actividad se probó en un rango de pH de 3 a 10 utilizando como fuente de carbono xilanos de abedul y de 4 a 7 utilizando como fuente de carbono xilanos de avena.

**TABLA 4.3.1**  
**COMPARACION DE LAS ACTIVIDADES XILANOLITICAS MAXIMAS EN**  
**DIFERENTES pH UTILIZANDO XILANOS DE AVENA AL 1% COMO FUENTE DE**  
**CARBONO**

<b>pH</b>	<b>ACTIVIDAD U/ml</b>	<b>ACTIVIDAD ESPECIFICA U/mg DE PROTEINA</b>
4	32.72 (48 hrs)	32.39 (48 hrs)
5	37.76 (72 hrs)	109.45 (72 hrs)
6	25.88 (72 hrs)	43.70 (72 hrs)
7	26.98 (72 hrs)	42.21 (48 hrs)

### **Xilanos de avena**

En este sustrato hay actividad en un rango de 4 a 7, encontrándose a las 48 hrs que no hay gran diferencia entre pH 4 y 5. Sin embargo, a las 72 hrs la actividad xilanolitica aumenta (37.76U/ml). En el caso de pH 6 y 7 su actividad fué menor.

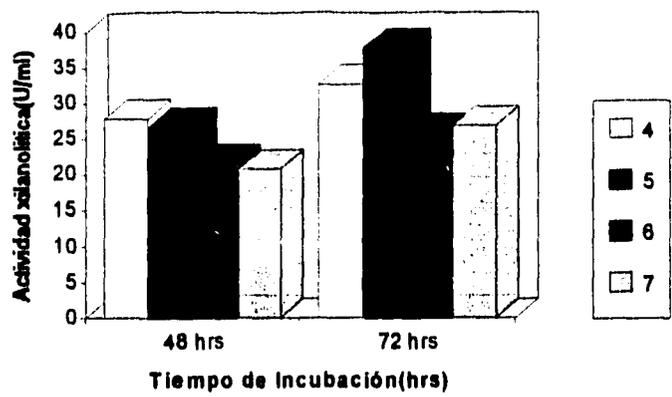


Fig.4 Actividad Xilanólítica producida sobre xilanos de avena al 1 % a diferentes pH en con agitación 100 Strokes/min, pH 4,5,6 y 7 creciendo a una temperatura de 45°C.

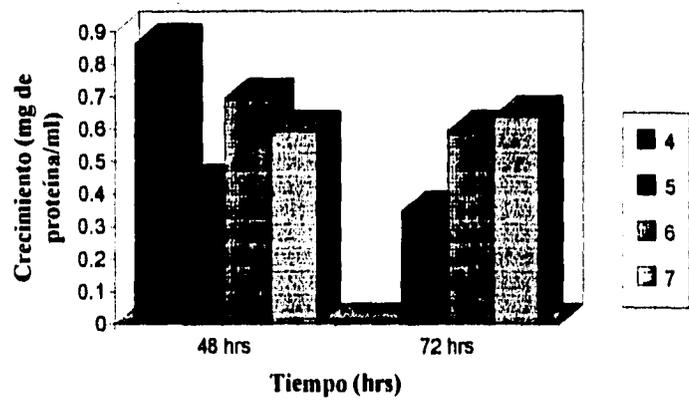


Fig 5. Crecimiento sobre xilano de avena al 1% a diferentes pH a 45°C, 100 Strokes/min, pH 5.0.

**TABLA 4.3.2**  
**COMPARACION DE LA ACTIVIDAD CELULOLITICA MAXIMA EN**  
**DIFERENTES pH UTILIZANDO XILANOS DE ABEDUL AL 1%**

pH	ACTIVIDAD U/ml
4	1.903 (48 hrs)
5	1.148 (48 hrs)
6	2.064 (48 hrs)
7	0.00 (48 y 72 hrs)

**Xilanos de abedul**

**TABLA 4.3.3**  
**COMPARACION DE LA ACTIVIDAD XILANOLITICA MAXIMA EN**  
**DIFERENTES pH UTILIZANDO XILANOS DE ABEDUL AL 1 % COMO**  
**FUENTE DE CARBONO**

pH	ACTIVIDAD U/ml	ACTIVIDAD ESPECIFICA U/mg
3	0.399 (72 hrs)	0.805 (72 hrs) <sup>a/</sup>
4	25.63 (72 hrs)	14.64 (48 hrs)
5	27.25 (72 hrs)	58.95 (48 hrs)
6	19.27 (72 hrs)	28.81 (72 hrs)
8	0.00	0.00 <sup>a/</sup>
9	0.00	0.00 <sup>a/</sup>
10	0.00	0.00 <sup>a/</sup>

<sup>a/</sup> Las unidades de éstos son U/mg de proteína los demás son U/mg de peso seco.

Si observamos la tabla 4. 8 vemos que sólo se obtuvo actividad xilanolítica en un rango de pH de 3 a 6. Siendo el pH 5 que promueve la actividad mas elevada (27.25 U/ml), pero ésta actividad no se encuentra tan alejada de la que presenta pH 4 (25.63 U/ml).

De acuerdo a los resultados se puede decir que la actividad xilanolítica mas elevada se obtiene entre pH 4 y 5 independientemente del sustrato , lo cual nos da la idea de que la actividad xilanolítica es dependiente de el pH. Gosh *et al* (19) reportan con *Aspergillus sydowii* que la

inducción de las xilanasas era dependiente del pH al que fuera crecido y que éste crecía en el mismo rango de pH que la cepa *Aspergillus* MGM-470.

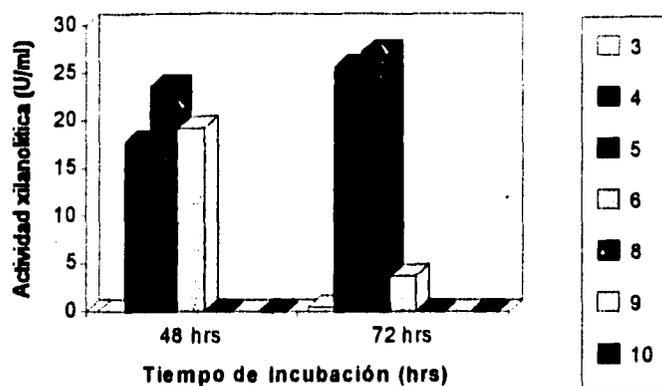


Fig 6 Actividad Xilanolitica producida sobre xilanos de abedul al 1 % a diferentes pH con agitación 100 strokes/min , pH 3,4,5,6,8,9 y 10 creciendo a una temperatura de 45°C.

**Celulasas** El contenido de celulasas es al igual que en los otros casos bastante bajo a comparación de la cepa productora.

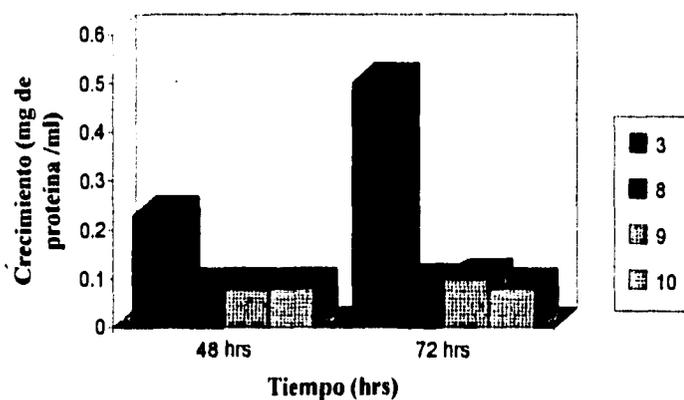
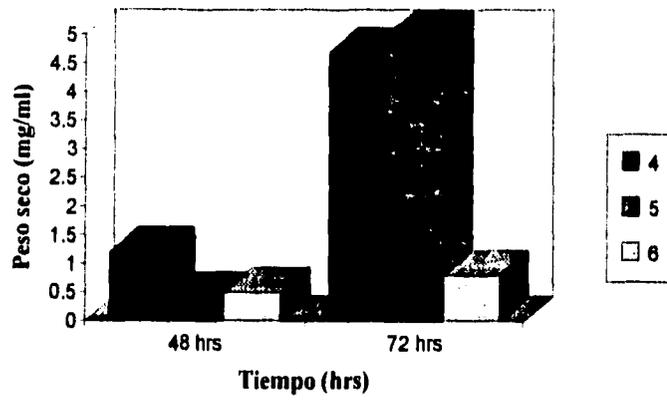


Fig. 7 Crecimiento crecimiento de *Aspergillus* MGM-470 sobre xilanos de abedul al 1% a diferentes pH a 45°C, 100 Strokes/min y pH 5.0.



**Fig. 8** Crecimiento de *Aspergillus* MGM-470 sobre xilano de abedul al 1% en diferentes pH a 45°C, 100 Strokes/min y pH 5.0.

### 4.3 EFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE CARBONO

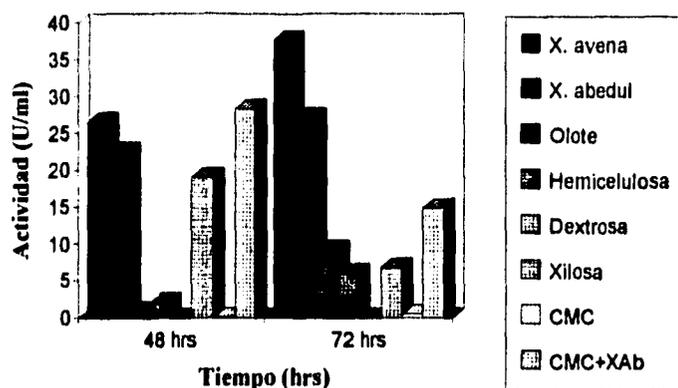
Para encontrar el mejor sustrato que induzca la producción de xilanasas se llevaron a cabo varios experimentos utilizando diferentes fuentes de carbono. Como se encuentran listadas en la Tabla 4.4. 1.

**TABLA 4.4.1**  
**MAXIMA ACTIVIDAD XILANOLITICA DE MGM-470 EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO**

Fuente de Carbono	Actividad (U/ml)	Actividad Especifica (U/mg)
Xilanos de avena	37.76 (72 hrs)	109.44 (72 hrs) <sup>a/</sup>
Xilanos de abedul	27.15 (72 hrs)	5.29 (72 hrs)
Olote	9.22 (72 hrs)	8.66 (72 hrs) <sup>a/</sup>
Hemicelulosa	6.08 (72 hrs)	5.70 (72 hrs) <sup>a/</sup>
Dextrosa	0.00	0.00
Xilosa	15.51 (48 hrs)	6.80 (72 hrs)
CMC	0.539 (72 hrs)	0.642 (48 hrs)
CMC+XAb	28.350 (48 hrs)	11.24 (48 hrs)
XAb+Xil	19.02 (48 hrs)	4.16 (48 hrs)
XAb+Dex	20.98 (72 hrs)	4.11 (72 hrs)
Sorbitol	0.492 (48 hrs)	0.235 (48 hrs)
Glicerol	0.492 (72 hrs)	0.153 (72 hrs)
Acetato	0.00	0.00
Citrato	0.00	0.00
Pectina	5.63 ( 48 hrs)	3.29 ( 48 hrs)
Almidón	0.739 (72 hrs)	0.177 ( 72 hrs)
Arabinosa	0.00	0.00
Ramnosa	0.00	0.00

<sup>a/</sup> Están expresadas en U/mg de proteína las demás en U/mg de Peso Seco.

Existen numerosas evidencias de que la síntesis de enzimas xilanolíticas es regulada mediante sistemas de inducción y represión en muchos microorganismos (Gomes *et al* ,58). La prueba de un gran número de fuentes de carbono por su habilidad para inducir xilanasas en diferentes microorganismos mostró que los xilanos y compuestos relacionados a los productos de hidrólisis inducen la síntesis de enzima, mientras que azúcares fácilmente metabolizables como la glucosa reprimen la síntesis. En éste trabajo se probaron diversas fuentes de carbono dentro de los cuales había xilanos (avena y abedul), así como otros azúcares como la glucosa, además de fuentes de celulosa. Por otro lado, se evaluaron combinación de las fuentes de carbono, así como polisacáridos ( almidón, pectina) y ácidos orgánicos ( acetato y citrato) además de polioles ( sorbitol y glicerol).



**Fig 9** Actividad xilanólítica extracelular sobre varios sustratos. La actividad está expresada como U/ml. Todas las fuentes de carbono están al 1 %. Agitación 100 Strokes/min, pH 5.0 y 45°C.

### Xilanos

La cepa de *Aspergillus* MGM-470 produce una buena actividad xilanólítica 37.76 U/ml al ser empleado como fuente de carbono, además de un buen crecimiento 0.427 mg /ml de proteína. Lo cual concuerda con los resultados obtenidos por algunos grupos de investigadores como Aprasyukina *et al* (56) quienes encontraron que al trabajar con enzimas producidas por *Aspergillus terreus* y *Aspergillus niger* la mejor actividad enzimática así como el crecimiento eran superiores sobre xilanos de avena.

También se probaron xilanos de abedul encontrándose una actividad xilanólítica un poco inferior en comparación con la obtenida sobre xilanos de avena 27.15 U/ml, además su crecimiento fué bueno 5.51 mg/ml. Otro grupo de investigadores que corroboran los resultados obtenidos son Milagres *et al* (21) quienes encontraron una actividad xilanólítica elevada al crecer *Penicillium janthinellum* sobre xilanos ( no aclaran cual es la fuente de xilanos empleada).

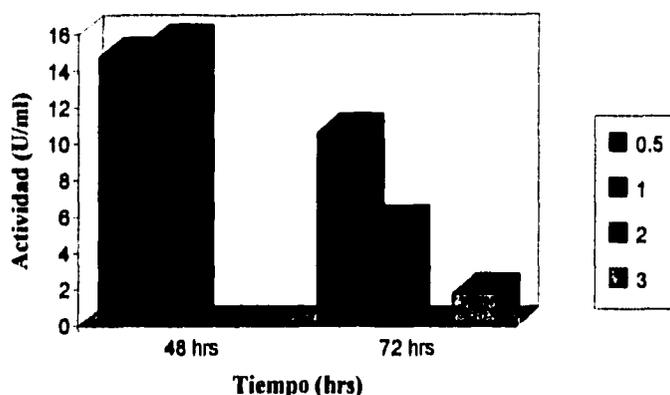
### Azúcares Solubles

En la Tabla 4.4.2 se muestra la actividad xilanolítica obtenida sobre xilosa en diferentes concentraciones 0.5, 1, 2 y 3%. Se puede observar que en ciertas concentraciones la xilosa funciona como inductor para la producción de xilanasas y en otras como represor de dicha producción. De acuerdo a nuestros resultados el sistema xilanolítico producido por *Aspergillus* MGM-470 es inducible, ya que se produce sobre xilanos y combinaciones de éstos en donde el producto final de la hidrólisis es la xilosa. De acuerdo a nuestros resultados la mayor actividad xilanolítica se obtuvo con una concentración de xilosa del 0.5 y 1 % mientras que en 2 y 3 % hubo una pérdida de la misma. El grupo de Gosh *et al* (19) encontraron que en *A. sydowii* se induce la producción de xilanasas con xilosa

**TABLA 4.4.2**  
**VARIACIÓN DE CONCENTRACION DE XILOSA COMO INDUCTOR Y/O**  
**REPRESOR**

CONCENTRACION( %)	ACTIVIDAD XILANOLITICA U/ml	ACTIVIDAD XILANOLITICA ESPECIFICA U/mg DE P.S.
0.5	11.828 (48 hrs)	5.40 (48 hrs)
1.0	11.262 (48 hrs)	4.93 (48 hrs)
2.0	0 (48 y 72 hrs)	0 (48 y 72 hrs)
3.0	1.838 (72 hrs)	0.406 (72 hrs)

Por otro lado, al observar la actividad específica vemos que es más alta la de xilosa al 0.5 % por lo que se seleccionó esta concentración como más adecuada para la inducción de enzimas.



**Fig 10.-Actividad xilanólítica extracelular sobre xilosa en diferentes concentraciones (0.5,1,2 y 3 %) a 45°C, 100 Strokes/min, pH 5.0 .**

También se probó la dextrosa en donde la actividad xilanólítica fue de cero lo cual nos podría indicar que ésta reprime la producción de xilanasas. Sin embargo *Aspergillus* MGM-470 crece sobre dextrosa 5.38 mg/ml siendo un valor muy similar al crecimiento obtenido sobre xilano de abedul. Royer et al (54) encontraron que muchas xilanasas fúngicas eran reprimidas por sustratos fácilmente metabolizables como la glucosa. Ésto podría explicar los resultados obtenidos. Otra posibilidad es que ésta cepa no produce xilanasas constitutivas.

Tanto en arabinosa como en ramnosa no se obtuvo actividad xilanólítica. De hecho esto se contrapone con los resultados obtenidos por otros investigadores en donde la arabinosa se comporta como inductor para la producción de xilanasas. Sin embargo, el crecimiento obtenido no es despreciable 1.68 mg/ml para la arabinosa y 2.52 mg/ml con ramnosa. Con esto podemos ver que la producción de xilanasas no está relacionada con el crecimiento del hongo y volvemos a constatar que la presencia de la xilosa es indispensable para la inducción de las xilanasas.

Según Haltrich *et al* (55) algunos compuestos que se encuentran en los xilanos como sustituyentes de forma natural pueden tener un efecto inductor sobre la formación de xilanasas. La hemicelulosa consisten de D-xilosa, D-manosa, D-glucosa, D-galactosa, L-arabinosa, L-ramnosa, ácido 4-O-metil-D-glucurónico, ácido D-glucurónico y ácido D-galacturónico. Nuestros resultados indican que *Aspergillus* MGM-470 no produce xilanasas en éstos azúcares.

#### **Poliol ( Sorbitol y Glicerol)**

Si observamos los resultados de la Tabla 4.4.2 vemos que la actividad xilanólítica producida sobre dichos poliols fue pobre en comparación con la de los xilanos. Esto podría

deberse a una represión por parte de éstos. Hoq *et al* (62) encontraron que en *T. lanuginosus* el glicerol reprímia la producción de xilanasas. De acuerdo a nuestros resultados podría pensarse que lo mismo ocurrió con *Aspergillus* MGM-470.

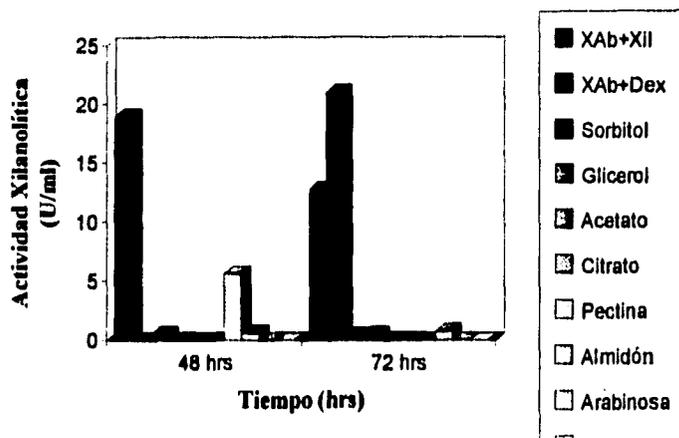


Fig 11 Actividad xilanólitica extracelular sobre varios sustratos al 1% a 45 °C, 100 Strokes/min, pH 5.0.

#### Ácidos Orgánicos

Como podemos ver en la Tabla 4.4.2 *Aspergillus* MGM-470 no produce actividad xilanólitica creciendo sobre acetato y citrato. Esta cepa no crece sobre acetato. En citrato su crecimiento fue de 0.97 mg/ml

Además estos resultados nos llevan a concluir que entonces el sistema xilanólitico es inducible y no constitutivo. Estos datos se contraponen con los obtenidos por el grupo de Walis *et al* (61) quienes dicen que los hongos termofílicos requieren de la suplementación de un ácido orgánico para el crecimiento apropiado del hongo. Gupta *et al* (60) dicen que esto es debido a su acción amortiguadora, ya que los aniones del ácido orgánico suministrado absorberán a los protones excretados. Como ya se había propuesto la producción y el crecimiento apropiado del hongo son pH dependientes, por lo que podría pensarse que entonces el pH al cual amortiguan tanto el acetato como el citrato no es el adecuado.

#### Polisacáridos

De acuerdo a los resultados obtenidos con pectina no se obtuvo actividad xilanólitica alguna, lo cual es previsible ya que al degradarse la pectina da moléculas de ácido D-

galacturónico y no xilosa. Sin embargo, su crecimiento no fué despreciable 1.71 mg/ml. Por lo que una vez más constatamos que no hay relación entre el crecimiento y la producción de xilanasas.

Por otro lado, en almidón se obtuvo una actividad xilanolítica baja en comparación con los xilanos 1.538 U/ml, aunque si hubo crecimiento importante 4.12 mg/ml. Con respecto a la actividad xilanolítica los resultados fueron previsibles ya que Haltrich *et al* (55) han encontrado que el almidón reprime la producción de xilanasas. Es probable que esto se deba a que al hidrolizarse se obtienen unidades de glucosa la cual reprime la producción de xilanasas. Sin embargo, se puede observar que si hubo una pequeña actividad a diferencia de la dextrosa donde ésta era cero. Este fenómeno podría explicarse a que el almidón también contiene maltosa y maltotriosa, Haltrich *et al* (55) encontraron que *S. commune* producía xilanasas al ser crecido sobre maltosa, ésta actividad era baja en comparación con otras fuentes de carbono. Podríamos pensar que hubo presencia de maltosa que hizo que se produjera una pequeña cantidad de xilanasas.

### **Combinaciones**

Se evaluaron combinaciones de xilanos de abedul con otras fuentes de carbono donde el producto final de la hidrólisis también fuera la xilosa, siendo las combinaciones estudiadas las siguientes: XAb+Xil, XAb+ Dex y CMC+XAb.

Al combinar xilano de abedul y xilosa se podría esperar que se potenciaron y que hubiera una mayor producción, sin embargo, éste no fue el caso, sino que incluso hubo una disminución, 19.02 U/ml. Podría haber ocurrido lo siguiente: Al haber una concentración baja pero suficiente de xilosa en el medio (0.5%), el hongo comenzó la producción de más xilanasas para poder degradar los xilanos de abedul. Al degradar este xilano podría haber ocurrido que la concentración de xilosa fuera elevada ocurriendo entonces una represión por producto final, menguando así la producción de xilanasas.

Milagres *et al* (21) al combinar xilanos con xilosa obtenían que la producción de xilanasas también disminuía. Probablemente la suma de la concentración de xilosa se toma represora y por eso se obtiene menor actividad.

Por otro lado, al combinar xilano de abedul con dextrosa se observó que la actividad fué de cero a las 48 hrs (dato no mostrado), sin embargo a las 72 hrs se disparó dicha producción 20.98 U/ml esto puede deberse a la presencia de xilano de abedul. Como la dextrosa es mas fácilmente metabolizable el microorganismo consumió primero dicho azúcar reprimiendo así la producción de xilanasas, pero al terminarse la dextrosa requirió la producción de xilanasas para poder utilizar los xilanos. Esto puede constatarse al observar el crecimiento que presentó el hongo a las 72 hrs.

### Otras fuentes de carbono

Se probó olote de maiz en algunos de los trabajos consultados se empleaban otras partes del maiz como fuente de carbono, pero en ninguno se probaba olote. El olote es una buena fuente de xilano no exclusivamente porque también contiene celulosa. Al observar los datos de la tabla 4.4.2 vemos que dentro de las 3 fuentes de carbono con mayor actividad xilanolitica está el olote 9.22 U/ml y su crecimiento también fue importante 0.710 mg de proteína/ml.

También se probó la hemicelulosa, como se mencionó en los antecedentes la hemicelulosa está compuesta en su mayoría por xilanos, pero también tiene sustituyentes como azúcares fácilmente metabolizables. Estos azúcares pudieron haber menguado la producción de xilanas de aquí que la actividad xilanolitica fué de 6.08 U/ml, sin embargo tuvo un buen crecimiento 1.066 mg de proteína / ml.

### Celulasas

Se ha encontrado que en muchos microorganismos la celulosa y la celobiosa son inductores de celulasas Rho *et al* (59).

Uno de los objetivos de ésta tesis es el encontrar una cepa buena productora de xilanasas pero que produzca poco o nada de celulasas. Si observamos los resultados de la tabla 4.4.3 vemos que la concentración de celulasas es baja en comparación con algunas especies de *Trichoderma* (*viride* y *reesei*).

Posteriormente se probó su crecimiento sobre carboximetilcelulosa (CMC) y combinaciones de éstas.

En el caso del CMC la actividad celulolitica fué casi cero y la actividad xilanolitica fue bastante baja 0.539 U/ml en comparación los xilanos.

Al combinar el CMC con xilanos de abedul tampoco hubo una producción celulolitica importante 1.74 U/ml, éste valor es despreciable. En cuanto a su actividad xilanolitica ésta fué bastante interesante 28.350 U/ml, esto debido a la presencia de los xilanos y no del CMC.

**TABLA 4.4.3**  
**PRODUCCION DE CELULASAS EN ALGUNAS FUENTES DE CARBONO**  
**U/ml**

FUENTE DE CARBONO	ACTIVIDAD CELULOLITICA
Xilanos de avena	1.148 (48 hrs)
Xilanos de abedul	0.871 (48 y 72 hrs)
Olote	0.832 (72 hrs)
Hemicelulosa	0.00
CMC	0.260 (72 hrs)
CMC+ XAb	1.74 (48 hrs)

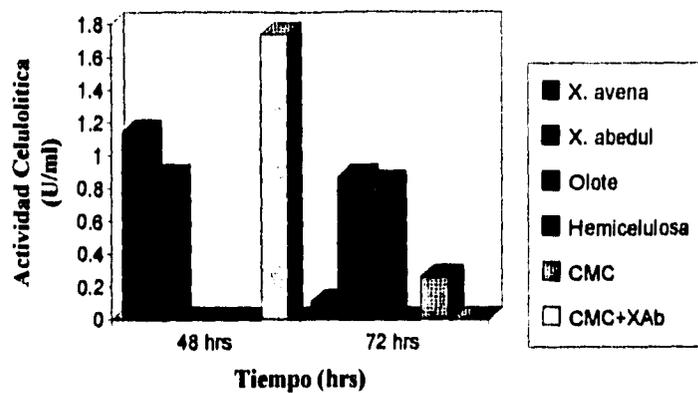


Fig. 12 Actividad celulolítica sobre algunos de los sustratos estudiados, todos al 1%, agitados a 100 Strokes/min, pH 5.0 y 45°C.

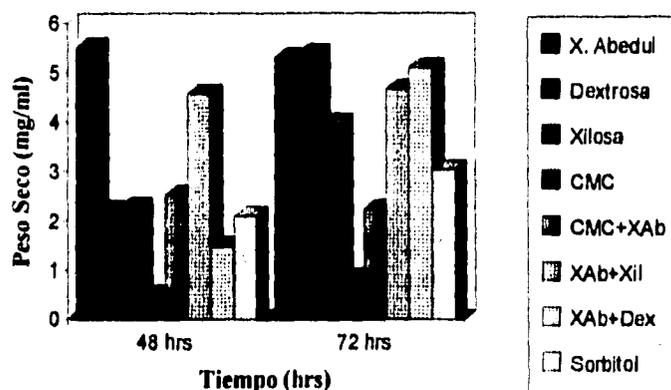


Fig. 13 Crecimiento producido sobre diferentes fuentes de carbono, todas al 1%, a 45°C, con agitación 100 Strokes/min y pH 5.0.

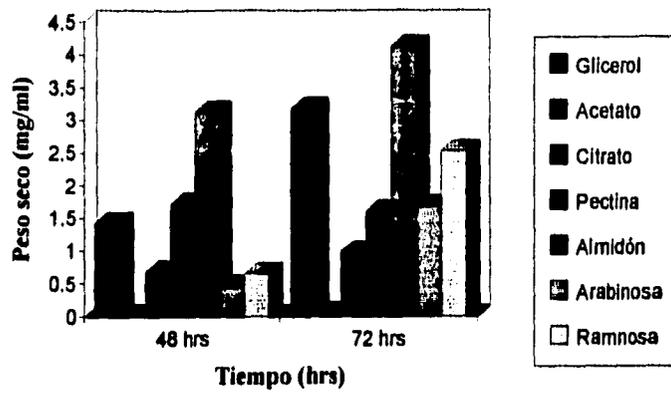


Fig. 14 Crecimiento sobre diferentes fuentes de carbono al 1% a 45°C, agitación 100 Strokes/min y pH 5.0.

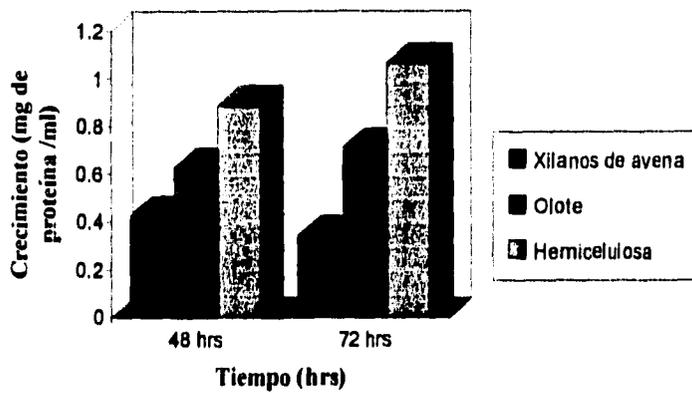


Fig. 15 Crecimiento sobre diferentes fuentes de carbono al 1% a 45°C, 100 Strokes/min, pH 5.0

#### 4.4 EFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE NITROGENO Y VITAMINAS

En ésta parte del trabajo se probaron diferentes fuentes de nitrógeno, variando única y exclusivamente ésta , ya que la fuente de carbono a utilizar en todas fue xilano de abedul al 1% y con un pH de 5.0

**TABLA 4.5.1  
COMPARACION DE LA ACTIVIDAD MAXIMA UTILIZANDO DIFERENTES FUENTES DE NITROGENO**

FUENTES	ACTIVIDAD U/ml	ACTIVIDAD ESPECIFICA U/mg de Peso seco
Sulfato de amonio	27.15 (72 hrs)	5.29 ( 72 hrs)
L-Asparagina 0.2 %	38.46 (72 hrs)	6.40 (72 hrs)
L-Asparagina 0.4 %	27.07 (48 hrs)	12.08 (72 hrs)
Lisina	16.25 (72 hrs)	14.18 (48 hrs)
Arginina	14.45 (72 hrs)	9.12 (72 hrs)
Histidina	13.51 (72 hrs)	6.62 (48 hrs)
Nitrito de sodio	0.00	0.00
Nitrato de sodio	10.32 (72 hrs)	7.93 (72 hrs)
Casaminoácidos 0.2 %	14.49 (48 hrs)	14.11 (48 hrs)
Casaminoácidos 0.4 %	14.95 (72 hrs)	17.98 (48 hrs)

##### Aminoácidos

Se probaron varios aminoácidos por si solos (L-asparagina, Lisina, arginina e Histidina) y combinados ( casaminoácidos).

Si observamos la tabla 4.5.1 vemos que la actividad xilanolítica mas elevada fué producida al emplear L-asparagina tanto al 0.2 como al 0.4 % 38.46 U/ml y 27.7 U/ml respectivamente. Según Maheshwari *et al* (57) esto se debe a que al emplear sales de amonio el pH del medio se vuelve muy ácido, pero que al emplear L-asparagina ésta tiende a amortiguar, manteniendo un pH mas constante. Como ya se explicó en pH la actividad xilanolítica es dependiente de éste , entonces si se mantiene en un pH entre 4 y5 la producción xilanolítica es alta.

Por otro lado, al agregar al medio lisina, arginina o histidina la actividad xilanolítica observada es menor que aquella obtenida con L-asparagina, aparentemente estos aminoácidos están menguando dicha producción. En un trabajo de Gosh *et al* (19) se observan resultados similares, dichos investigadores encontraron que algunos aminoácidos (Cisteina, Glicina y lisina) poseían un efecto inhibitorio ya que probablemente modificaban la estructura de la proteína

(enzima) debido a la incorporación de aminoácidos no proteicos, quedando parcialmente inactiva.

Los tres aminoácidos poseen carácter básico, pero aparentemente no amortiguan el pH del medio, sino que mas bien tendieron a aumentar el pH entre 6 y 7.

El crecimiento en L-asparagina también fué superior sobre los otros aminoácidos 6.0 mg/ml al 0.2 % y 5.4 mg/ml al 0.4 %.

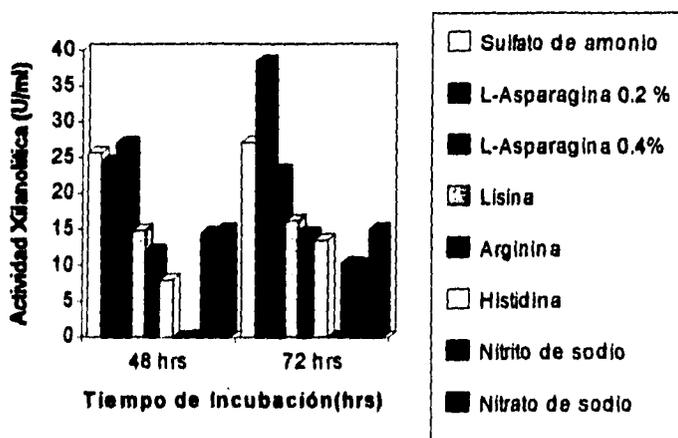


Fig. 16 Actividad xilanolitica extracelular producida sobre diferentes fuentes de nitrógeno al 0.2 % excepto L-Asparagina que también se probó a 0.41 %, agitación 100 strokes/min, pH 5.0 y 45°C.

#### Sulfato de amonio

La actividad xilanolitica observada al emplear sulfato de amonio es 27.15 U/ml mientras que la obtenida con L-asparagina 0.4% es de 27.07 U/ml, se podría decir que son practicamente iguales. En cambio con L-asparagina 0.2% si es superior 38.46 U/ml. Aparentemente el pH no baja tanto como para afectar la producción de manera importante, sin embargo la producción es mejor al amortiguar un poco el medio. El crecimiento observado es muy similar a aquel observado sobre L-asparagina 5.30 mg/ml. Además de que se trata de una fuente fácilmente asimilable, de hecho buena parte de los trabajos consultados emplean sulfato de amonio por todas las ventajas que éste ofrece.

### Nitrito y nitrato de sodio

La actividad xilanolítica del nitrito de sodio fue cero mientras que la del nitrato de sodio fue de 10.32 U/ml. En nitrito de sodio tampoco hubo crecimiento. Aparentemente la diferencia de utilización radica en el grado de oxidación. El nitrato de sodio al ser oxidado produce nitrito de sodio y oxígeno, mientras que el nitrito de sodio al ser oxidado da hidróxido de sodio y ácido nítrico, lo cual modifica el pH. Nuevamente se puede observar la importancia del pH en la producción de xilanasas.

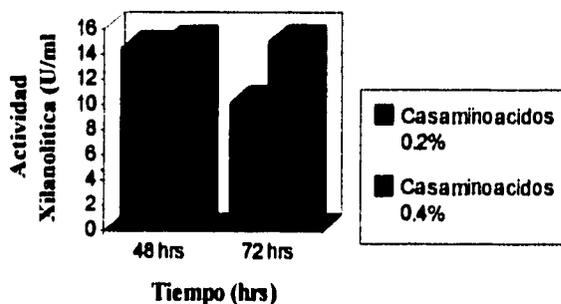


Fig 17 Actividad xilanolítica producida sobre diferentes fuentes de nitrógeno al 0.2 y 0.4 % a 45°C, agitación 100 Strokes/min y pH 5.0

**TABLA 4.5.2**  
**COMPARACION DE LAS ACTIVIDADES CELULOLITICAS MAXIMAS CON**  
**DIFERENTES FUENTES DE NITROGENO**

FUENTE	ACTIVIDAD U/mg DE PESO SECO
Sulfato de amonio	0.871 (48 hrs)
L-asparagina 0.2 %	----
L-asparagina 0.4 %	0.00 (48 hrs)
Lisina	0.727 (48 y 72 hrs)
Arginina	1.165 (48 hrs)
Histidina	0.00
Nitrito de sodio	0.00
Nitrato de sodio	1.309 (72 hrs)
Casaminoacidos 0.2 %	2.325 (48 hrs)
Casaminoacidos 0.4 %	0.294 (72 hrs)

**Celulasas** Como se puede observar en la tabla 4.5.2 la actividad celulolítica al ser crecido el hongo con diferentes fuentes de nitrógeno es bajo al ser comparado con alguna cepa productora de celulasas, por lo que podría decirse que la producción de celulasas por la cepa MGM-470 es muy baja.

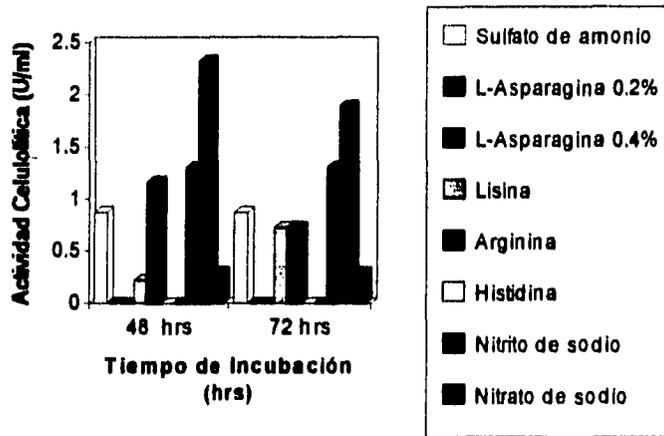


Fig 18 Actividad celulolítica extracelular producida sobre diferentes fuentes de nitrógeno, todas al 0.2%, excepto L-Asparagina que también se probó al 0.4 %, agitación 100 strokes/min, pH 5.0 y 45°C.

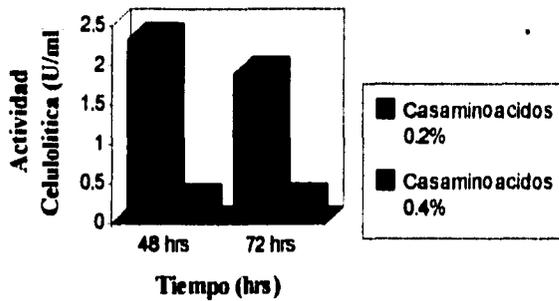


Fig 19 Actividad Celulolítica extracelular producida sobre diferentes fuentes de nitrógeno al 0.2 y 0.4% a 45°C, agitación 100 Strokes/min, pH 5.0.

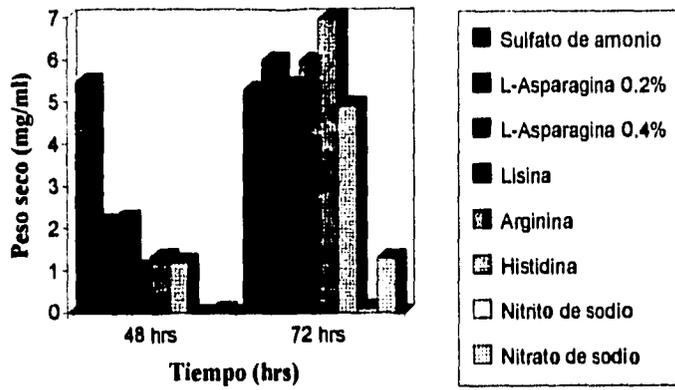


Fig 20 Crecimiento con diferentes fuentes de nitrógeno al 0.2 % y al 0.4% (cuando así se especifica) a 45°C, con agitación a 100 Strokes/min y pH 5.0.

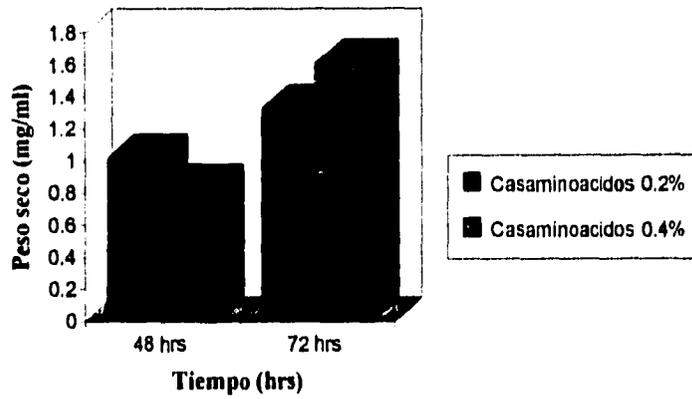


Fig 21 Crecimiento con diferentes fuentes de nitrógeno al 0.2 y 0.4 % a 45°C, agitación 100 Strokes/min y pH 5.0.

## Vitaminas

En ésta parte se probó si la adición de vitaminas al medio alteraba el crecimiento de *Aspergillus* MGM-470. El medio usado contenía como fuente de carbono xilanos de abedul al 1%, sulfato de amonio al 0.2% como fuente de nitrógeno y demás sales, todos a pH 5.0. Se probó la adición y la ausencia del extracto de levadura en el medio.

**TABLA 4.6.1**  
**COMPARACION DE LA ACTIVIDAD XILANOLITICA MAXIMA CON VITAMINAS**  
**CON Y SIN EXTRACTO DE LEVADURA**

FUENTE	ACTIVIDAD U/ml	ACTIVIDAD ESPECIFICA U/mg DE PESO SECO
Control con Extracto	27.15 (72 hrs)	5.29 (48 hrs)
Biotina con extracto	22.44 (48 hrs)	3.54 (48 hrs)
Biotina sin extracto	4.84 (48 hrs)	36.4 (48 hrs)
Tiamina con extracto	16.33 (72 hrs)	120.1 (48 hrs)
Tiamina sin extracto	9.74 (72 hrs)	7.70 (72 hrs)
Biotina + Tiamina s/extracto	11.16 (48 hrs)	9.31 (72 hrs)
XAb sin extracto	6.68 (48 hrs)	7.72 (72 hrs)

Se probaron tiamina y biotina solas y combinadas, con y sin extracto de levadura como podemos ver en la tabla 4.6.1 el control con extracto posee la actividad xilanolitica mas elevada, aún sobre aquella que sólo posee biotina y tiamina. Podríamos pensar que esto se deba a que no solamente la biotina y la tiamina son las responsables del crecimiento del hongo sino que le hacen falta también los demás componentes del extracto de levadura. El extracto de levadura tiene la siguiente composición (Manual Difco, 1994).

Sulfato de amonio	3.5 g	Molibdato de sodio	200 µ
L-Histidina	10 mg	Sulfato de cinc	400 µ
D,L- Metionina	20 mg	Fosfato monobásico de K	1.0 g
D,L-Triptofano	20 mg	Sulfato de magnesio	0.5 g
Biotina	2.0µ	Cloruro de sodio	0.1 g
Pantotenato de Calcio	400µ	Cloruro de calcio	0.1 g
Acido Fólico	2.0µ	Sulfato de manganeso	400 µ
Inositol	2000µ	Yoduro de potasio	100 µ

Cloruro férrico	200 $\mu$	Niacina	400 $\mu$
Acido <i>p</i> -aminobenzoico	200 $\mu$	Sulfato de cobre	40.0 $\mu$
Hidrocloruro de piridoxina	400 $\mu$		
Riboflavina	200 $\mu$		
Hidrocloruro de Tiamina	400 $\mu$		
Acido Bórico	500 $\mu$		

Como se puede observar la composición del extracto de levadura es bastante compleja, según los resultados obtenidos podríamos decir que a la cepa MGM-470 requiere de no sólo de biotina y tiamina sino también de algunos otros componentes del extracto de levadura para conseguir un desarrollo adecuado.

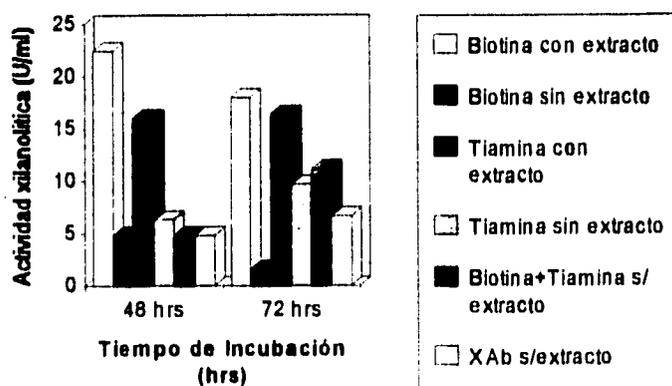


Fig. 22 Actividad xilanolitica producida sobre xilanos de abedul al 1% con vitaminas: biotina y tiamina a 45°C, con agitación 100 Strokes/min, y pH 5.0.

#### Celulasas

Tampoco se obtuvo una actividad celulolítica importante.

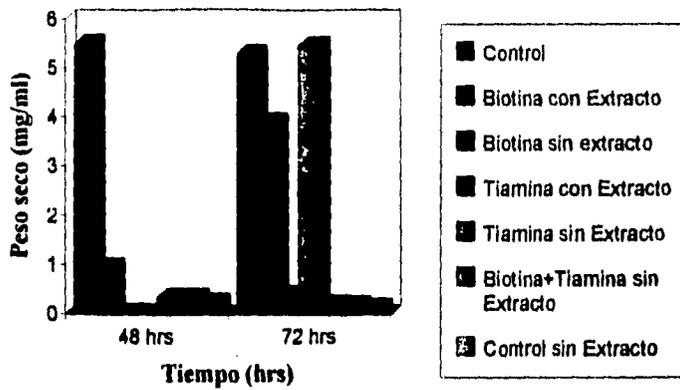


Fig 23 Crecimiento con vitaminas con o sin extracto de levadura al 0.3% a 45°C, con agitación 100 Strokes/min y pH 5.0.

#### 4.5 Morfología

La cepa MGM-470 es un *Aspergillus* de color blanco por lo que podría pertenecer a algunos de los siguientes grupos:

1. **Grupo *A. candidus*.**-Cabezas (grandes) globosa o radiales; conidioforos con paredes suaves, incoloras o amarillas cerca de la vesicula (solamente); esclerotia ocasionalmente visible.
2. **Grupo *A. niveus*.**-Cabezas blancas, hemiesféricas hasta columnares, conidioforos con paredes lisas, incoloras
3. **Grupo *A. flavipes*.**- Cabezas inicialmente blancas, tendiendo a ser columnares; conidióforos con paredes suaves, mostrando algún tono de amarillo; presencia de células de Hülle torcidas
4. **Grupo *A. janus* ( fase blanca).**-Cabezas blancas, sostenida de conidióforos largos, con paredes suaves, incoloros terminando en vesiculas con forma clava y sterigmata en dos series
5. Cepas de *Aspergilli* blancas poseyendo las características básicas de sus contrapartes coloreadas también ocurren como mutaciones en *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. terreus* y grupo *glaucus*
6. **Grupo *A. versicolor***

## Características

### Grupo *A. candidus*

1. Cabezas conidiales persistentemente blancas o convirtiéndose a crema con la edad; típicamente globosa, pero acercándose a columnares en cabezas pequeñas.
2. Conidioforos suaves, incoloros o ligeramente amarillos en áreas terminales.
3. Sterigmata en dos series, en algunos casos las primarias son más grandes aún dentro de la misma cabeza.
4. Conidia globosa o subglobosa, suave.
5. Escleorotia presente en algunas cepas, oscuras acercándose a morado hasta negro cuando maduras.

### Grupo *A. niveus*

Sinónimo: *A. eburneus*

1. Cabezas columnar en colores canela, amarillo claro, color carne claro o blanco.
2. Conidioforos suaves, incoloros raramente exceden de 250  $\mu$  en largo.
3. Vesículas hemiesféricas, con la mitad a 2/3 cubierta con fialides.
4. Fialides en dos series, generalmente apiñadas.
5. Conidia suave, globosa hasta ligeramente elíptica, pequeñas.
6. Colonias constantemente blancas o ligeramente marfil con la edad.
7. Presentes en el suelo y vegetación en descomposición. Crecen bien a 35 a 37 °C.

### Grupo *A. jans*

Posee dos tipos de cabeza:

1. Cabezas blancas grandes, sostenida por conidioforos largos terminando en vesículas con forma de clava.
2. Cabezas pequeñas, verdes sostenida por conidioforos cortos con vesículas típicamente ovaladas.

Las colonias varían de color y en textura dependiendo del sustrato y la temperatura de incubación.

Cabezas conidiales de color blanco con textura suelta, consistiendo de cadenas de conidia radiales y divergentes, comúnmente de 150 a 200  $\mu$  de diámetro a veces más grandes.

Conidioforos largos, delgados, generalmente con una longitud de 2 a 2.5 mm por 8 a 10  $\mu$  de

diámetro, ocasionalmente son mas grandes, erectas y uniformes en diámetro, pero a veces son marcadas por numerosas e irregulares contracciones, paredes suaves, incoloros, aproximadamente de 1 a 1.4  $\mu$  de grosor.

Vesículas con paredes delgadas, con forma de clava, generalmente de 45 a 60  $\mu$  por 15 a 18  $\mu$  con estructuras individuales mas grandes o más pequeñas, superficie sueltamente cubierta con sterigmata.

#### **Grupo *A. flavipes***

1. Conidioforos suaves , en un tono amarillo, color confinado en la última capa.
2. Cabezas en forma de barril hasta columnar cuando está bien desarrollada, blanca o un tono vino a avellanoso.
3. Vesículas- Subglobosas a elípticas
4. Conidia incolora, suave, pared delgada.
5. Células de Hülle generalmente presentes de forma helicoidal o torcida.
6. Presente en el suelo y en material en descomposición.

#### **Grupo *A. versicolor***

1. Cabezas conidiales- Hemisféricas hasta casi globosa, en diferentes tonos.
2. Conidioforos-Suaves, incoloros mas o menos sinuosos.
3. Vesículas.- Globosa hasta ovalada o elíptica con fialides radiales sostenidas sobre la superficie
4. Fialides.- Dos series.
5. Esporas.- Globosa o Subglobosa, equinulada.
6. Células de Hülle presentes en algunas cepas de forma globosa.

A fin de determinar las características morfológicas de la cepa de *Aspergillus* MGM-470 se cultivó tanto en medio líquido como en medio sólido para poder determinar si es que existen diferencias morfológicas al ser crecido en tres medios distintos a 37 y 45°C. Los medios empleados fueron xilosa, olote y xilanos de abedul todos al 1%. En la Tabla 4.7.1 se observan las medidas aproximadas de algunas de las estructuras encontradas.(8)

TABLA 4.7.1

Medio Líquido	Cabeza conidial μ (Diámetro)	Hifas μ( Diámetro)
<b>37°C</b>		
Xilano de abedul	14.28	5.00
Olote	---	1.90
Xilosa	---	1.58
<b>45°C</b>		
Xilano de abedul	5.80	2.15
Olote	---	1.14
Xilosa	---	2.40
<b>Medio Sólido</b>		
<b>37°C</b>		
PDA	36.10	---
Xilano de abedul	20.55-36.11	---
Olote	23.07	---
<b>45°C</b>		
PDA	41.11	---
Xilano de abedul	31.70-50.76	---
Olote	25.00	---

**Características generales que presenta la cepa MGM-470:**

**Color de la cabeza:** Blanca

**Forma de la cabeza:** Globosa

**Fialides:** En series dobles

**Forma de la vesícula:** Globosa

**Conidioforos:** Lisas y blancas.

Sin embargo, variaron las características morfológicas de acuerdo al sustrato en el que fueron crecidas.

**Medio Líquido** Las cabezas son de forma irregular por lo que no puede decirse a que especie de *Aspergillus* pertenece.

1. Xilosa a 37°C- Cabezas irregulares, hifas blancas delgadas sin presencia de estructuras globosas rugosas (limones).
2. Olote a 37°C- Cabezas irregulares, hifas blancas delgadas sin presencia de estructuras globosas rugosas (limones).
3. Xilano de abedul a 37°C- Cabezas irregulares, hifas "vellosas" gruesas sin presencia de estructuras globosas rugosas (limones).
4. Xilosa a 45°C- Hifas blancas delgadas, no se encontraron cabezas, sin presencia de estructuras

- globosas (limones).
5. Olote a 45°C- No se encontraron cabezas conidiales ,hifas blancas delgadas, presencia de estructuras globosas lisas (limones).
  6. Xilano de Abedul a 45°C- Cabezas blancas irregulares, hifas blancas delgadas, presencia de estructuras globosas rugosas (limones).

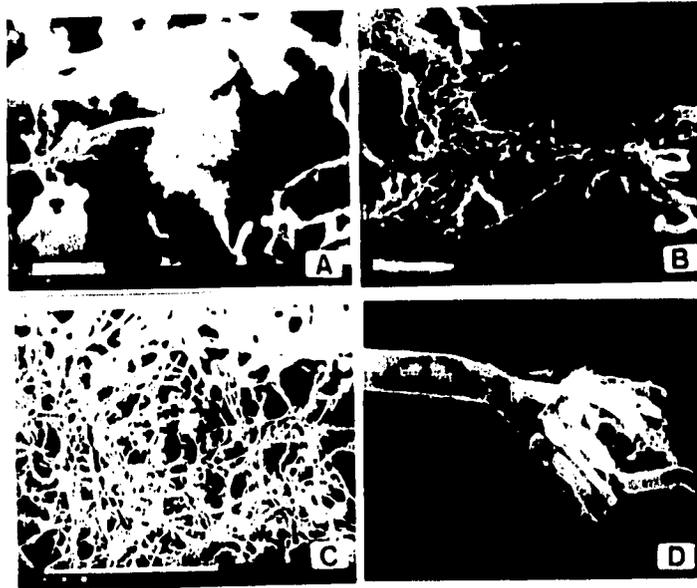
#### **Medio sólido**

1. PDA a 37°C- Cabezas globosas características, no se tomaron las hifas,no se encontraron estructuras globosas.
2. Xilano de abedul a 37°C- Cabezas globosas características, no se tomaron hifas, no se encontraron estructuras globosas.
3. Olote a 37°C- Cabezas globosas características,hifas de tamaño irregular, no se encontraron estructuras globosas.
4. PDA a 45°C- Cabezas globosas características ,blancas, no se tomaron hifas, no se encontraron estructuras globosas.
5. Xilano de abedul a 45°C-Cabezas características, blancas, no se tomaron hifas, no se encontraron estructuras globosas.
6. Olote a 45°C-Cabezas globosas características, blancas, no se tomaron hifas, no se encontraron estructuras globosas.

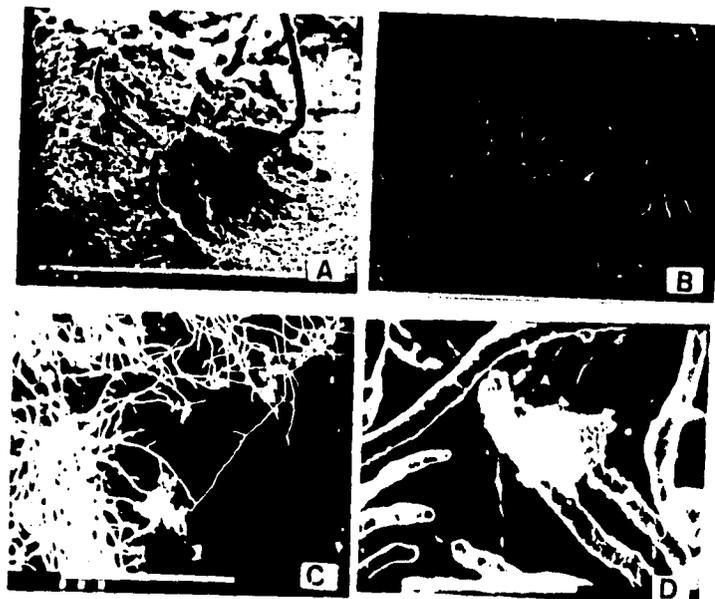
De acuerdo a los resultados ,excepto el tamaño de las conidias, la especie mas parecida es *Aspergillus jamae* del grupo *versicolor*, ya que una buena parte de las características que éste grupo posee fueron encontradas, excepto quizá en el tamaño de la conidia. Thom y Raper (1945) reportan un tamaño que oscila entre 150-200 $\mu$ . Las observadas no son tan grandes, sin embargo, estos mismos investigadores dicen que éstas características cambian de acuerdo con el medio en el que hayan sido crecidos. Ahora bien, no se puede tomar como prueba concluyente de la identidad de un hongo basados solamente en un estudio microscópico sino que también deben de realizarse otro tipo de pruebas para lograr s identificación de forma certera.

Con respecto a las estructuras globosas encontradas en dos de los sustratos a 45°C Omar *et al* (63) encontraron unas estructuras globosas que eran las responsables de la síntesis de ácido cítrico en *Aspergillus niger* . Se podría pensar entonces que éstas estructuras globosas son las responsables de la producción de productos, en éste caso el producto son las xilanasas. Incluso

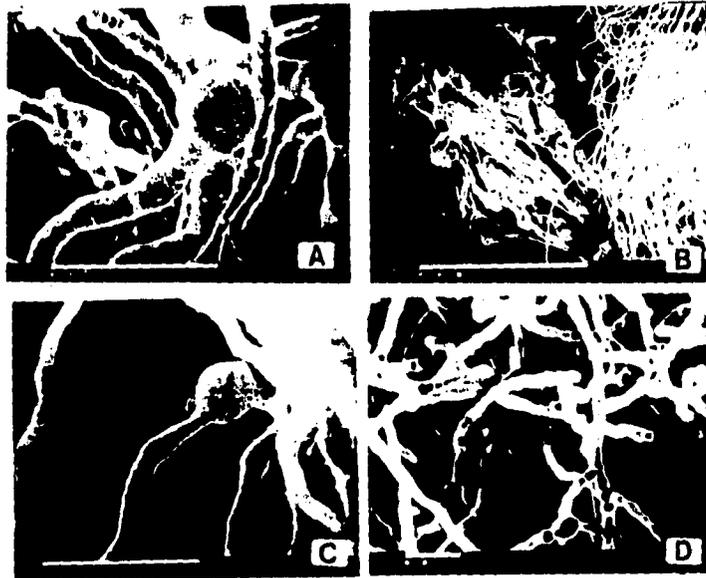
argumentarse el hecho de que no se encuentren en todos los sustratos, sobre todo si consideramos que en todos se tiene un buen crecimiento y además buena producción de xilanasas, sin embargo durante la elaboración del estudio fotográfico, se observó que éstas estructuras eran demasiado frágiles y que al ser sometidas al paso de electrones eran destruidas, además de que generalmente no se encontraban expuestas en el pellet. Pero éstos resultados encontrados tampoco son concluyentes, ya que para poder aseverar que éstas estructuras son las responsables de la secreción de xilanasas habría que realizar un estudio utilizando microscopia inmunoelectrónica empleando un anticuerpos para las xilanasas producidas por la cepa de *Aspergillus* MGM-470.



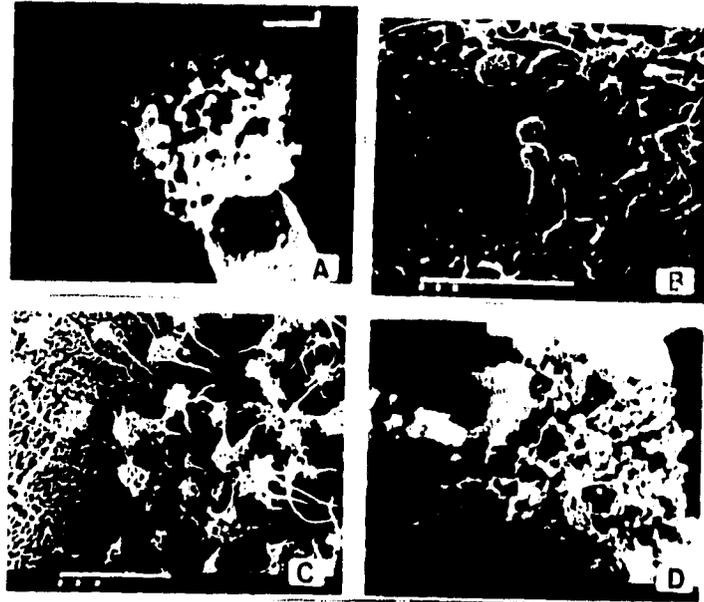
**Fig 4.7.1** Vista de cabeza conidial irregular de *Aspergillus* MGM-470. La barra corresponde a 10  $\mu$ . **B** Vista de hifa gruesa de *Aspergillus* MGM-470 con adherencias en su superficie. La barra corresponde a 10  $\mu$ . **C** Vista panorámica de hifas cubiertas con hebras. La barra corresponde a 100  $\mu$ . **A, B y C** Crecidas en medio líquido sobre xilano de abedul al 1% a 37°C, 100 Strokes/min, 72 hrs de incubación y pH 5.0. **D** Vista de cabeza conidial sin conidias de *Aspergillus* MGM-470 crecido en medio líquido sobre xilosa al 1% a 37°C, 100 Strokes/min, incubación 72 hrs y pH 5.0. La barra corresponde a 100 $\mu$ .



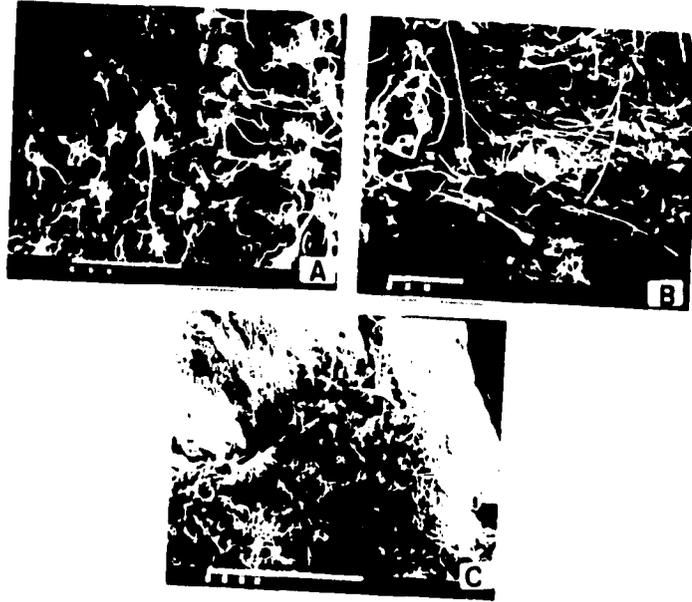
**Fig 4.7.2** A Vista panorámica de hifas regulares con escasos ensanchamientos y cabezas conidiales irregulares de *Aspergillus* MGM-470 crecido en medio líquido sobre xilosa al 1% a 37°C, 100 Strokes/min, incubación 72 hrs y pH 5.0. La barra corresponde a 100 $\mu$ . B Vista de una probable cabeza conidial irregular de *Aspergillus* MGM-470. La barra corresponde a 10 $\mu$ . C Vista de hifas de *Aspergillus* MGM-470 penetrando un fragmento de olote. La barra corresponde a 100  $\mu$ . A y C fueron crecidos en medio líquido sobre olote a 37°C, 100 Strokes/min, incubación de 72 hrs y pH 5.0. D Vista de cabeza conidial irregular de *Aspergillus* MGM-470 crecida en medio líquido sobre xilano de abedul a 45°C, 100 Strokes/min, incubación 72 hrs y pH 5.0. La barra corresponde a 10 $\mu$ .



**Fig 4.7.3** **A** Vista de estructura globosa de *Aspergillus* MGM-470 con gotitas retenidas en la superficie que parecen indicar que no son solubles en el alcohol que se empleó para deshidratar la muestra. Crecida en medio líquido sobre xilano de abedul a 45°C, 100 Strokes/min, incubación 72 hrs y pH 5.0. La barra corresponde a 10 $\mu$ . **B** Vista de fragmento de olote con hifas de *Aspergillus* MMG-470 crecido en medio líquido sobre olote a 45°C, 100 Strokes/min, incubación 72 hrs y pH 5.0. La barra corresponde a 100 $\mu$ . **C** Vista de estructura globosa de *Aspergillus* MGM-470 con fibras sugestivas de xilanas. Crecido en medio líquido sobre olote a 45°C, 100 Strokes/min, incubación 72 hrs y pH 5.0. La barra corresponde a 10  $\mu$ . **D** Vista de hifas septadas de *Aspergillus* MGM-470 crecido en medio líquido sobre xilosa a 45°C, 100 Strokes/min, incubación 72 hrs y pH 5.0. La barra corresponde a 10 $\mu$ .



**Fig 4.7.4.** **A** Vista de cabeza conidial irregular de *Aspergillus* MGM-470 cultivada en medio líquido sobre xilosa a 45°C, 100 Strokes/min, incubación 72 hrs y pH 5.0. La barra corresponde a 1 $\mu$ . **B** Vista de cabezas conidiales de forma globosa característica de *Aspergillus* MGM-470 crecido en medio sólido sobre xilano de abedul a 37°C, 100 Strokes/min, incubación 72 hrs y pH 5.0. La barra corresponde a 100 $\mu$ . **C** Vista de cabezas conidiales de forma regular de *Aspergillus* MGM-470 crecido en medio sólido sobre xilano de abedul a 45°C, 100 Strokes/min, incubación 72 hrs y pH 5.0. La barra corresponde a 100 $\mu$ . **D** Vista de cabeza conidial de *Aspergillus* MGM-470 crecido en medio sólido sobre PDA a 45°C, 100 Strokes/min, incubación 72 hrs y pH 5.0. La barra corresponde a 10 $\mu$ .



**Fig 4.7.5** **A** Vista de cabezas conidiales regulares de *Aspergillus* MGM-470. **B** Vista de cabezas conidiales regulares de *Aspergillus* MGM-470 sobre un fragmento de olote. **C** Vista panorámica de cabezas conidiales crecidas sobre un fragmento de olote. **A, B** y **C** fueron crecidos en medio sólido sobre olote a 45°C, 100 Strokes/min, incubación 72 hrs y pH 5.0.

## 5. CONCLUSIONES

1. - La cepa 470 fue la que mejor creció y produjo mas xilanasas .
2. - El mejor pH está en un rango entre pH 4 y 5.
3. - Los resultados muestran que las xilanasas extracelulares de *Aspergillus* MGM-470 son inducidas por xilosa en concentración de 0.5 y 1%, xilanos de abedul, olote, xilanos de avena así como combinaciones de estos y en menor grado por la hemicelulosa.
4. - Las mejores fuentes de carbono para el crecimiento de *Aspergillus* MGM-470 y arreglados en orden decreciente son: xilanos de avena, xilanos de abedul, xilosa y olote.
5. - No se produjo actividad xilanolitica en: acetato, citrato, pectina, arabinosa y ramnosa, lo que sugiere que las xilanasas extracelulares de *Aspergillus* MGM-470 no son constitutivas.
6. - El contenido de celulasas producidas por *Aspergillus* MGM-470 es bajo incluso podría considerarse como despreciable.
7. - Los resultados también muestran que el empleo de otras fuentes de nitrógeno favorecen la síntesis de xilanasas. La mejor resultó ser L-Asparagina al 0.2 %, seguida de Sulfato de amonio y en menor grado: Lisina, Arginina, Histidina y Casaminoácidos al 0.2 y 0.4 %.
8. - La biotina y la tiamina no son las responsables del crecimiento del hongo, aparentemente se requiere de otros componentes del extracto de levadura.
9. - De acuerdo con lo observado en las fotografías del microscopio electrónico la cepa *Aspergillus* MGM-470 podría ser *Aspergillus jamae* del grupo *versicolor*, sin embargo, esto no es concluyente sino que hay que realizar otras pruebas para descartar cualquier otra especie.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- (1) Bastwade, K.B.  
Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action *World Journal of Microbiology and Biotechnology* Vol. 8, 1992 Pag 353-368
- (2) Badui, S. *Química de los alimentos Alhambra Mexicana México*, 1990
- (3) Dutton, G.G.S. and Smith, F., 1956 The constitution of western Hemlocks ( *Tsuga heterophyllis*) II. Hidrolisis of the methylated hemicellulose *Journal of the American Chemical Society* 78, 3744- 3748 Citado por Bastwade, K.B.
- (4) Wilkie, K.C.B. 1979 The hemicellulose of grasses and cereals *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 36 Pag 215- 262 (4) Libby C. *Ciencia y Tecnología sobre pulpa y papel. Fabricación y Comercio. Ed. CECSA*, 1974.  
Citado por Bastwade, K.
- (6) *Aspergillus. Biotechnology handbooks* 7 Ed. Smith .. Plenum Press pag 23 a 40 1994
- (7) Herrera, T. y Ulloa, M. *El reino de los hongos. Micología básica y aplicada. Fondo de Cultura económica. México*, 1990 Pag 183-184.
- (8) Thom, C. and Rapper, K. *Manual of the Aspergilli The Williams and Wilkins Company*, 1945.
- (9) *Genetics and Physiology of Aspergillus. Edited by Smith, E. and Pateman, J. Academic Press*, 1977 Pag 9.
- (10) Comtat, J., 1983 Isolation, properties and postulated role of some of the xylanase form Basidiomycete *Sporotrichum dimorphosporum* *Carbohydrate Research* 118, 215-231. Citado por Bastwade, K.B.
- (11) John M, Schmid, B and Schmid, J., 1979 Purification and some properties of five endoxylanase and beta-D-xylosidase produced by a strain of *Aspergillus niger* *Canadian Journal of Biochemistry* 57, 125-134.
- (12) Bailey, M and Poutanen, K. Production of xylanolytic enzymes by strains of *Aspergillus* *Appl.*

Microb. Biotechnol. (1989) 30:5-10.

(13) Erikson, K.E., Rzedowski, W. Extracellular enzyme system utilized by the fungus *Chrysosporium lignorum* for the breakdown of cellulose. Arch. Biochem. Biophys. 129:683-688. Citado por Bailey et al.

(14) Sadana, J.C. Shewale, J.G., Deshpande, M.V. (1980) High Cellobiase and xylanase production by *Sclerotium rolfsii* UV-8 mutant in submerged culture. Appl. Environ. Microbiol. 39:935-936 citado por Bailey.

(15) Stewart, J.C. Lester, A., Milburn, B. Parry, J.B. (1983) Xylanase and cellulase production by *Aspergillus fumigatus* fresenius Biotechnol. Lett. 5: 543-548. Citado por Bailey.

(16) Leathers, T.D., Detroy, R.W., Bothast, R.J. (1986) Induction n-glucose repression of xylanase from a color variant strain of *Aureobasidium pullulans*. Biotechnol. Lett. 8:867-872. Citado por Bailey.

(17) Rapp, P., Wagner, F. (1986) Production and Properties of xylan-degrading enzymes from *Cellulomonas uda* Appl. Environ. Microb. 51:746-752. Citado por Bailey.

(18) Nakanishi, K., Arai, H. and Yasui, T. Purification and some properties of xylanase from *Cryptococcus flavus*. J. Ferment. Technol., Vol. 62, No. 4 p 361-369, 1984

(19) Ghosh, M., Das, A., Mishra, A.K. and Nanda, G. *Aspergillus sydowii* MG 49 is a strong producer of thermostable xylanolytic enzymes. Enzyme Microb. Technol. 1993 Vol. 15 Aug. p 703-709.

(20) Biely, P. and Petraková Novel inducers of the xylan degrading enzyme system of *Cryptococcus albidus*. Journal of Bacteriology Oct 1984 p 408-412 Vol 160 No. 1.

(21) Milagres, A., Lacis, L. and Prade, R. Characterization of xylanase production by a local isolate of *Penicillium janthinellum*. Enzyme Microb. Technol, 1993 Vol. 15 March pp.248-253.

(22) Keskar, S., Srinivasan, M and Deshpande, V. Chemical modification of xylanase from thermotolerant *Streptomyces*. Evidence for essential tryptophan and cysteine residues at the active site. Biochem. J. (1989) 261:49-55.

- (23) Rättö, M., Mathrani, I., Birgitte, A., Viikari, L. Application of thermostable xylanase of *Dictyoglomus* sp in enzymatic treatment in kraft pulps. *Appl. Microbiol. Biotechnol* (1994) 41:130-133.
- (24) Sridevi, R., Varma, A. Production and characterization of xylanase from *Bacillus thermoalkalophilus* grown on agricultural wastes *Appl. Biotechnol.* 34:141-144. Citado por Rättö
- (25) Lüthi, E.; Jasmat, N.B.; Bergquist, P.L. (1990) Xylanase from the extremely thermophilic bacterium *Caldocellum saccharolyticum*: overexpression of the gene in *E. coli* and characterization of the gene product *Appl. Environ Microbiol.* 56:2677-2683. Citado por Rättö et al
- (26) Simpson, H.D., Hauffer, U.R., Daniel, R.M. (1991) An extremely thermostable xylanase from thermophilic eubacterium *Thermotoga* *Biochem. J.* 277:413-417. Citado por Rättö.
- (27) Saiki, T., Kobayashi, K., Kawagoe, K., Beppu, T. (1985) *Dictyoglomus thermophilum* gen nov., sp. nov. a chemoorganotrophic anaerobic, thermophilic bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35:253-259. Citado por Rättö.
- (28) Sunil, K. and Sunil, G. Regulation, purification and properties of xylanases from *Cellulomonas fimi* *Enzyme Microb. Technol.* (1993) Vol. 15 Nov. pag 990-995.
- (29) Grabski, A. and Jeffries, T.W. Production, purification and characterization of a  $\beta$ -(1-4)-endoxylanase of *Streptomyces roseiscleroticus*. *Appl. Environ. Microb.* Apr. 1991 p 987-992.
- (30) Okasaki, W.; Akiba, T.; Horikoshi and Akahoshi, R. Purification and characterization of xylanases from Alkalophilic thermophilic *Bacillus* spp. *Agric. Biol. Chem.* 49:(7) 2033-2039, 1985.
- (31) Herzog, P., Törrönen, A.; Harkki, A. and Kubicek, P. Mechanism by which xylan and cellulose trigger the biosynthesis of endo-xylanase I by *Trichoderma reesei*. *Xylans and xylanases* (1992). Elsevier Science Publishers B. V.
- (32) Wang....

- (33) Comtat, J. and Joseleau, J.P. Mode of action of a xylanase and its significance for the structural investigation of the branched l-arabino-d-glucurono-d-xylan from redwood (*Sequoia sempervirens*) Carbohydrate Research 95 (1981) 101-112
- (34) Wong, K.K.Y., Tan, L. and Saddler, J.N. Multiplicity of  $\beta$ -1,4-Xylanase in Microorganisms: Functions and Applications Microbiological Reviews Sept 1988 p. 305-317
- (35) Viikari, L., Kantelinen, A., Buchert, J. and Puls, J. Enzymatic accessibility of xylans in lignocellulosic materials. Appl. Microb. Biotechnol. (1994) 41:124-129.
- (36) Poutanen, K. and Puls, J. (1989) The xylanolytic enzyme system of *Trichoderma reesei* In: Lewis G, Paice M (eds) Plant cell wall polymers. Biogenesis and biodegradation of plant cell wall polymers. American Chemical Society, Washington, D.C. pp. 630-640.
- (37) Viikari, L., Tenkanen, M., Buchert, J., Rättö, M., Bailey, M., Siika-aho, M., Linko, M. (1993) Hemicellulases for industrial applications IN: Saddler J. (ed) Bioconversion for Forest and agricultural wastes. CAB International, Oxon, U.K. pp 131-182 Citado por Viikari et al (1994)
- (38) Stone, J.E., Scallan, A.M., Donefer, E., Ahlgren, E. (1969) Digestibility as a simple function of a molecular of a similar size to a cellulase enzyme. Adv. Chem. Ser 95:219-241. Citado por Viikari et al.
- (39) Wong, K.K.Y., Deverell, K.F., Mackie, K.L., Clark, T.A., Donaldson, L.A. (1988) The relationship between fiber porosity and cellulose digestibility in steam-exploded *Pinus radiata*. Biotechnol. Bioeng. 31: 447-456. Citado por Viikari et al.
- (40) Rozic, H.J. Affinity Purification of Polysaccharide Degrading Enzymes with Crosslinked substrates Wageningen 1992 pag 64.
- (41) Grethlein, H.E. (1985) The effect of pore size distribution on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates. Biotechnology 3: 155-160. Citado por Viikari et al.
- (42) Yamasaki et al. Citado por Patel, N., Grabski, A.C. and Jeffries, T.W. Chromophore release from kraft pulp by purified *Streptomyces roseiscleroticus* xylanases Applied Microbiology and Biotechnology, 1993 vol.39 No.3 pag 405-412.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA.

- (43) Servos, M.R., Carey, J.H., Ferguson, M.L., Van-der-kraak, G., Ferguson, H., Parrot, J., Gorman, K., Cowling, R. Impact of a modernized bleaching kraft mill on white sucker populations in the Spanish River, Ontario Water-Pollut.-Res. Journal Can. 1992 Vol.27 No.3 pp. 423-437.
- (44) Vermeer, K., Cretney, W.J., Elliot, J.E., Norstrom, R.J., Whitehead, P.E. Elevated polychlorinated dibenzodioxin and benzofuran concentrations in grebes, ducks, and their prey near Port Albeni, British Columbia, Canada Mar.-Pollut.-Bull, 1993 Vol. 26, No. 8, pp. 431-435.
- (45) Murray, W.D., Richardson, M. Development of biological and process technologies for the reduction and degradation of pulp mill wastes that pose a threat to human health Crit.-Rev.-Sci.-Technol. 1993 Vol. 23 No.2, pp. 157-194.
- (46) Kirk, K. Degradation and Conversion of lignocelluloses. Chapter 11 from The Filamentous Fungi. Vol IV Fungal Technology. Edward Arnold pp 266-295.
- (47) Tsao, T. and Chiang, L. Cellulose and Hemicellulose Technology Chapter 12 from The Filamentous Fungi Vol. IV Fungal Technology. Edward Arnold pp 296-326.
- (48) Mutsaers, J.H.G.M. Xylanase in breadmaking. Xylans and xylanases. International Symposium Wageningen The Netherlands Dec. 8-11, 1991.
- (49) Joklik, w.k., Willet, H., Bernard, A.M. (1991) Microbiologia. Editorial Panamericana pp 173-180.
- (50) Tesis. Zavala, O.R. Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y producción de actividad xilanolítica extracelular en *Streptomyces* sp CH-M-1035. Facultad de Química, 1994.
- (51) González, S. y Hernández, E. Manual de Técnicas de Microscopía Electrónica ( En prensa)
- (52) Miller, L (1959) Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31:426-428
- (53) Lowry, O.H., Rosebrough, A., Farr, A., Randall, R. (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent J.Biol. Chem. 193:265-275.

(54) Royer, J.C. and Nakas, J.P. Xylanase Production by *Trichoderma longibrachiatum* Enzyme Microb. Technol, 1989. vol 11 July pag 405-410.

(55) Haltrich, D. and Steiner, W. Formation of xylanase by *Schizophyllum commune*: Effect of medium components. Enzyme Microb. Technol., 1994 Vol. 16 March pg 229-235.

(56) Aprasyukhina, N.I., Tavobilov, I.M., Rodionova, N.A and Bezborodov, A.M. Study the content of extracellular hemicelulases in several mycelial fungi Traducido de *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya*, Vol. 21, No. 6, pp 736-740, November-December, 1985.

(57) Maheshwari, R. and Kamalam, P.T. Isolation and culture of a Thermophilic Fungus, *Melanocarpus albomyces* and factors influencing the production and activity of xylanase J. of General Microbiology (1985) 131 3017-3027.

(58) Gomes, D.J., Gomes, J., Steiner, W. Factors influencing the induction of endo-xylanase by *Thermoascus aurantiacus* Journal of Biotechnology 33 (1994) 87-94.

(59) Rho, D., Desrochers, M., Jurasek, L., Driguez, H. and Defaye, J. (1982) Induction of cellulase in *Schizophyllum commune*: Thiocellobiose as a new inducer J. Bacteriol., 149, 47-53 Citado por Gomes *et al.*

(60) Gupta, S.D. and Maheshwari, R. Is organic acid required for nutrition of thermophilic fungi? Arch. Microbiol. (1985) 141: 164-169.

(61) Walis, A.S., Mattoo, A.K., Modi, V.V. (1978) Stimulation of growth and glucose catabolite enzymes by succinate in some thermophilic fungi Arch. Microbiol. 118: 49-53. Citado por Gupta *et al.*

(62) Hoq, M.M., Hempel, C., Deckwer, W.D. Cellulase-free xylanase by *Thermomyces lanuginosus* RT-9: Effect of agitation, aeration and medium components on production. Journal of biotechnology 37 (1994) 49-58.

(63) Omar, S.H., Honeker, S. and Rehm, H. A comparative study on the formation of citric acid and polyols and on morphological changes of three strains of free and immobilized *Aspergillus niger* App. Microbiol. Biotechnol. (1992) 36: 518-524.