

121  
2 ej<sup>o</sup>



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Caracterización parcial de las  
xilanasas de la cepa termotolerante  
Aspergillus MGM-470  
producidas a 37° y 45°C”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

PRESENTA:

Laura Patricia Mendicuti Castro



Director de Tesis  
DR. GUILLERMO AGUILAR OSORIO

MEXICO, D. F. FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

1996

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis 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.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**"Caracterización parcial de las xilanasas  
de la cepa termotolerante  
*Aspergillus* MGM-470  
producidas a 37° y 45°C"**

**T E S I S**

Que, para obtener el título de:

**BIOLOGA**

Presenta:

**Laura Patricia Mendicuti Castro**

Director de Tesis  
Dr. Guillermo Aguilar Osorio

1996



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
P r e s e n t e

**Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:**  
" Caracterización parcial de las xilanas de la cepa termotolerante  
Aspergillus NRW-470 producidas a 27° y 45° C "

realizado por Laura Patricia Mendivil Castro

con número de cuenta 8623973-C , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

Dr. Guillermo Aguilar Ceorio

Propietario

M. en C. Roberto Arturo Miranda y Espinosa

Propietario

Dici. Carmen Castillo Romero

Suplente

M. en C. Jorge Arturo Guillén Rodríguez

Suplente

Dici. Patricia Martínez Gutiérrez

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología

COORDINACIÓN GENERAL  
DE BIOLOGÍA

*[Handwritten signatures and stamps]*

## **Agradecimientos**

*Al Dr. Guillermo Aguilar, por su asesoría para la realización de este trabajo, por su tiempo y su paciencia.*

*A Paty Santos, Carlos Castillo y Jorge Antonio Aguilar, que muy amablemente aceptaron revisar este trabajo, por sus valiosos comentarios.*

*Al maestro Rodrigo Arturo Cárdenas por sus consejos y su amistad.*

*A todos mis queridos amigos.*

*Este trabajo fue 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 Gloria y Andrés, a quienes amo, porque sin ellos este trabajo no hubiera sido posible.*

*A mis hermanos Luis Javier, Gloria Maricela y Andrés.*

*A Ricardo.*

*"Cuica ichtequeuini  
¿quien ticcuiz noyol?  
Timotolinia  
ihuhqui in tlacuillo, huel xic tllanqui, huel xic tlapalanqui,  
ya at ah ihuetzin timotolinia."*

*"Ladrón de cantares, corazón mío,  
¿dónde los hallarás?  
Eres menesterozo,  
como de una pintura, toma bien lo negro y rojo  
(El Saber)  
Y así tal vez dejes de ser un indigente"*

*Pensamiento náhuatl.*

## CONTENIDO

CAPITULO	PAGINA
I. Resumen	1
II. Introducción	
II.1 El género <i>Aspergillus</i>	2
II.2 Xilanos y xilanasas	4
II.3 Aplicaciones de las xilanasas	15
II.4 Temperatura y crecimiento	25
II.5 Importancia económica de la termoestabilidad enzimática	28
III. Materiales y Métodos	
III.1 Microorganismo	33
III.2 Medios de cultivo	33
III.3 Crecimiento celular	33
III.4 Determinación de la actividad enzimática	33
III.5 Electroforesis. SDS-PAGE	35
III.6 Determinación de actividad "in situ"	35
III.7 Cromatografía.	36
IV. Resultados y Discusión	
IV.1 Selección de la cepa	37
IV.2 Producción y Crecimiento	44
IV.3 pH y temperatura óptimos	49
IV.4 Estabilidad a pH y temperatura	51
IV.5 Efecto de Iones	55
IV.6 Caracterización electroforética	56
IV.7 Determinación de productos de hidrólisis	58
IV.8 Determinación de $V_{max}$ y $k_m$	60
V. Conclusiones	61
VI. Apéndice	63
VII. Bibliografía	64

## I. RESUMEN

Se llevó a cabo la selección de una cepa termotolerante del género *Aspergillus sp.*, productora de xilanasas extracelulares. A partir de 48 cepas silvestres, se eligió la cepa que mejor actividad xilanolítica produjo. El microorganismo se creció a dos temperaturas 37° y 45°C. Se encontró que el crecimiento se retardaba a 45°C entrando el hongo en una fase lag más larga. Los valores óptimos de pH y temperatura fueron diferentes para los dos sistemas; así como su estabilidad. El análisis electroforético mostró que a 37°C se produce un sistema xilanolítico más complejo que el producido a 45°C. Aparentemente, el agcbio por temperatura reduce el número de xilanasas liberadas por el hongo.

## II. INTRODUCCIÓN

### II.1 El género *Aspergillus*

El género *Aspergillus* pertenece al grupo de los ascomycetes y es considerado un hongo imperfecto por su forma de reproducción asexual, mediante estructuras llamadas conidios(2). Los miembros de este género presentan hifas tabicadas, hialinas y muy ramificadas, sus células son haploides y multinucleadas. El micelio se divide en numerosos compartimentos que contienen varios núcleos haploides que se multiplican por mitosis. Sobre el micelio aéreo se forman abundantes conidióforos (que nacen de las hifas somáticas) que portan las esporas asexuales. Los conidióforos terminan en un hinchamiento llamado vesícula, a partir de la cual nace en su superficie una hilera de fiálides (en las especies monoseriadas) o una de métulas y sobre éstas las fiálides (en las especies biseriadas) productoras de cadenas de conidios tipo filasporas. Las cadenas de conidios crecen a partir de una sola célula madre en el extremo basal de la cadena, y cada cadena contiene arriba de 100 esporas. Un conidióforo contiene aproximadamente 100 cadenas y cuando madura, las esporas se dispersan para dar lugar a nuevas colonias.(2)

De acuerdo con Alexopoulos (1977), el género *Aspergillus* pertenece a la familia Moniliaceae, orden Moniliales en la clase Deuteromycetes.

Este género está constituido por numerosas especies, Raper y Fernell (1965) han reconocido 132 especies y 18 variedades, muchas de las cuales son de gran importancia en las actividades humanas. Presenta una amplia distribución geográfica, encontrándose desde las regiones árticas hasta el Ecuador. El aire y el suelo de casi cualquier parte del mundo contiene los conidios de diferentes especies.

Estos hongos son capaces de asimilar una enorme variedad de sustancias debido al gran número de enzimas que pueden producir para degradarlas. Es debido a esta variedad de actividades enzimáticas, que muchas especies son utilizadas en procesos industriales para la elaboración comercial de diversos productos como algunos alimentos fermentados; entre ellos la salsa de soya, el tamari y similares, elaborados con intervención de *A. oryzae* y *A. tamaritii*. Otras aplicaciones son la síntesis de ácidos orgánicos como los ácidos cítrico y glucónico producidos por algunas cepas de *A. niger*, y antibióticos.(18) Sin embargo la producción de enzimas a gran escala es una de las aplicaciones más importantes (Tabla 1). La primera enzima microbiana para uso industrial fue preparada por Takamine (1894), quien desarrolló un proceso para la manufactura de amilasa usando una cepa de *Aspergillus oryzae*. El producto llamado "Taka-diasatasa", es utilizado comercialmente todavía. (11).

Las enzimas producidas son utilizadas en diversos campos por ejemplo: en la producción de aminoácidos (amilasa). En la industria alimenticia se utilizan la Biozima S para la fabricación de Harina-Asa, que se emplea principalmente en panificación para ayudar a descomponer el almidón, también se usa en la fabricación de jarabes de maltosa a partir de almidón. La Catalasa L se emplea en procesos donde se usa peróxido de hidrógeno para destruir microorganismos patógenos, como en el caso de la leche, éste peróxido debe después eliminarse usando esta enzima. La glucosa oxidasa que se puede utilizar por su característica de reaccionar con el oxígeno y la glucosa produciendo ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, para eliminar el oxígeno presente en sistemas cerrados, por ejemplo en las bebidas embotelladas que pueden perder sus características por oxidación (mezclada con catalasa para eliminar el peróxido que se produce en la reacción), o bien para la eliminación del azúcar en las claras y yemas de huevo. Para la hidrólisis de proteínas vegetales o animales, y en la fabricación de aditivos para galletería y panificación se emplean diferentes proteasas. Y en la industria de jugos se utilizan pectinasas y celulasas, estas últimas también para aumentar los rendimientos en extracto de vainilla y en aditivos para panadería y, junto con algunas proteasas y lipasas en la fabricación de alimentos para animales.(3)

En la industria farmacéutica algunas enzimas se utilizan para la elaboración de digestivos (Celulasa AP y L, Lipasa AP y proteasas ácido-estables), o para diagnóstico (Glucosa oxidasa).(3)

Las enzimas también se pueden aplicar al tratamiento de materiales de desecho lo que permite su mejor reutilización, en la industria papelera para la fabricación de algunos papeles con textura especial, y en general para biopulpeo y bioblanqueo; las enzimas encargadas de estos procesos son celulasas y hemicelulasas (3). Es precisamente por estas aplicaciones, el porque las hemicelulasas han despertado gran interés en los últimos años, y en particular las xilanasas que son las enzimas más importantes de este grupo.

**Tabla 1.** Enzimas y preparaciones enzimáticas producidas comercialmente por hongos del género *Aspergillus*.

ENZIMA	NOMBRE COMERCIAL	ORIGEN
Amino-acilasa	Acilasa	<i>Aspergillus sp</i>
Amiloglucosidasa	GNL-3000	<i>A. niger</i>
Amilasa	Biozima S	<i>A. oryzae</i>
	Biozima L	
	Biodiastasa	
Catalasa	Catalasa	<i>A. niger</i>
Celulasa	Celulasa AP	<i>A. niger</i>
	Celulasa AP 3	
	Celulasa L	
	Hemicelulasa	
Deaminasa	Deamizima	<i>Aspergillus sp</i>
Glucosa oxidasa	Hidrelasa	<i>A. niger</i>
	Glucosa oxidasa	
Lactasa	Lactasa F	<i>A. oryzae</i>
	Lactasa AIE	
Lipasa	Lipasa AP	<i>A. niger</i>
	Lipasa AP 6	
Pectinasas	Pectinasa PE	<i>A. niger</i>
	Pectinasa PEL	
	Super Pec G	
	Super Pec P	
	Super Pec PL	
Proteasas	Newlase A	<i>A. niger</i>
	Peptidasa A	<i>A. oryzae</i>
	Proteasa M	
	Prozima G	<i>Aspergillus sp</i>

Tomado de AMANO, Technical bulletin. (3).

## II.2 Xilanos y xilanasas.

El uso de materiales celulósicos, tales como madera y residuos agrícolas, como una fuente renovable de combustibles y solventes (como el alcohol etílico) y el tratamiento de desechos y efluentes adquieren día con día mayor importancia debido a la legislación en torno a proteger el ambiente que, también cada día se vuelve más estricta. Pero existen también razones puramente económicas que justifican este creciente interés en la utilización de estos materiales.

La hidrólisis de la madera por ácidos diluidos se conoce desde hace un siglo, sin embargo el relativamente bajo rendimiento de glucosa a partir de la celulosa disponible y la falta de tecnología para utilizar las fracciones hemicelulósicas parecen ser los dos principales obstáculos para establecer una industria sustentable basada en la celulosa y hemicelulosa.

Cereales, árboles y muchas otras plantas verdes son producidas por numerosas razones económicas, y siempre existe una gran porción de biomasa que no es completamente utilizable. Conforme la demanda en la producción de alimentos y energía se incrementa debido al crecimiento de la población mundial, es esencial que esos residuos ricos en glucosa sean utilizados completa y más eficientemente (24).

La hemicelulosa y la celulosa, junto con la lignina (fig 1) son los tres principales constituyentes poliméricos de las paredes celulares vegetales, las cuales son la fuente principal de carbono fijado en la naturaleza. Estos polisacáridos son recursos renovables, ya que están siendo producidos continuamente gracias a la energía de la luz solar mediante el proceso de la fotosíntesis. Cerca de  $4 \times 10^{21}$  joules de energía solar, usadas para unir  $15 \times 10^9$  toneladas de carbono, son colectados anualmente (53). Comúnmente, la principal fuente potencial de compuestos hemicelulósicos y celulósicos, que existe en cantidades significativas y accesibles son los desechos sólidos de las industrias papeleras y forestal, los desechos agrícolas y los domésticos.

Por otro lado, estos materiales no sólo se pueden emplear como materia prima para la producción de solventes, sino también como alimentos o complementos alimenticios para animales. No obstante, debido a la estrecha asociación entre la celulosa, la hemicelulosa y la lignina en la pared celular vegetal, la resistencia estructural de estos polímeros ha hecho que los materiales celulósicos y hemicelulósicos no sean nutritivos por su difícil o imposible digestión. Para incrementar el valor nutricional, el material debe primero, ser convertido en azúcares solubles.

La hemicelulosa está asociada con la celulosa y la lignina para suministrar a la pared vegetal rigidez y flexibilidad, siendo el segundo componente más abundante de éstas.

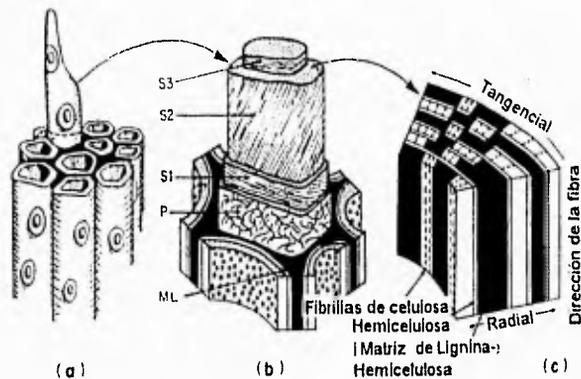


Fig.1 Arquitectura molecular del tejido de la madera, mostrando las relaciones intracelulares (a), corte transversal que muestra las capas de la pared celular (b), postulado de la relación entre la hemicelulosa y la lignina con las fibras de la celulosa en la pared secundaria (c, de Goring, 1977). El diámetro de cada célula es aproximadamente 25µm. S1-S3, paredes celulares secundarias; P, pared celular primaria y LM lamela media.(24)

A diferencia de la celulosa, la hemicelulosa es un heteropolímero que contiene de dos a seis tipos de unidades de pentosas y hexosas; la distribución de estos carbohidratos es frecuentemente utilizada para la clasificación de los tipos de hemicelulosa. D-xilosa, D-manosa, D-glucosa, D-galactosa, L-arabinosa, ácido D-glucurónico, Acido 4-O-metil-D-glucurónico y ácido D-galacturónico, son los principales azúcares constituyentes. El grado de polimerización de la hemicelulosa es comúnmente menor a 200. La cantidad de hemicelulosa, así como de celulosa y lignina, varía considerablemente entre los diferentes materiales vegetales, dependiendo de la edad, ambiente de crecimiento y condiciones fisiológicas.

**Tabla2** Composición química de algunos materiales vegetales.

MATERIAL	HEMICELULOSA%	CELULOSA %	LIGNINA%	ALMIDON%
maderas duras	24-40	40-55	18-25	----
maderas suaves	25-35	45-50	25-35	----
paja de pastos	25-50	25-40	10-30	----
maíz/ trigo	----	3-4	1-2	80-85
algodón	5	89	—	----
olote de maíz	26	38	8	----
hojas	80-85	15-20	—	----
papel periódico	25-40	40-55	18-30	----
abedul	32.7	44.9	19.3	----
abeto	24.6	46.1	26.3	----

Tomado de Tsao et al (1983).

### Xilano. Estructura y función

De entre los constituyentes de la hemicelulosa el xilano es el más importante, es el principal componente en las paredes vegetales secundarias en general, y el más abundante en las paredes primarias de las monocotiledóneas. La importancia del xilano como fuente de reserva de carbono está bien ejemplificada en la madera del abedul, donde representa alrededor del 35% de su peso seco. Y es muy abundante en la madera de angiospermas constituyendo de 7 a 12% (53,56).

El xilano es un heteropolisacárido que consiste en una cadena principal de residuos de D-xilosil unidos por enlaces  $\beta$ -1,4 (85-93% de la molécula), altamente ramificada. Los principales sustituyentes son residuos acetil, arabinosil, glucuronosil. La frecuencia y composición de las ramificaciones en el xilano dependen de su origen, (y determina su clasificación en diferentes tipos, por lo que me referiré a los xilanos o al xilano de manera indistinta).(fig 2) El homopolímero de xilano, compuesto sólo por xilosa, es difícil de aislar, (se ha logrado aislar de algunos pastos y de tabaco).

El xilano acetilado de las maderas duras y el arabinoxilano de las maderas suaves son los dos tipos principales encontrados en la madera. Estos dos tipos de xilano tienen un sustituyente único de ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico, apareciendo de 10 a 18% respecto a los residuos de xilosil, uniéndose al C<sub>2</sub> de residuo xilosil; mientras que los sustituyentes O-acetil y  $\alpha$ -L-arabinofuranosil tienden a unirse al C<sub>3</sub>. Ninguno de los residuos de xilosil tiene más de una ramificación. Tanto en maderas duras como en las suaves los xilanos tienen un extremo reductor que consiste de un residuo rhamnosil, galacturonosil y xilosil. Los xilanos de los pastos, son por lo general arabinoxilanos, y algunos xilanos tienen ramificaciones que contienen varias combinaciones de residuos de arabinosil, galactosil, glucuronosil y xilosil.

Los xilanos de maderas duras están altamente sustituidos: 60-70% de los residuos de xilosa están acetilados en el grupo hidroxil del carbono 2 o 3, o en ambos en el anillo de xilopiranososa. Además cada diez unidades de xilosa hay unido un grupo 4-O-ácido metilglucurónico en enlace  $\alpha$ -1,2. El papel de los sustituyentes es ambivalente. Por un lado, son los responsables de la solubilidad del xilano, especialmente del acetilxilano; y por otra los sustituyentes acetyl 4-O-metil-glucuronosil impiden a las xilanasas la liberación de productos de degradación uniformes.

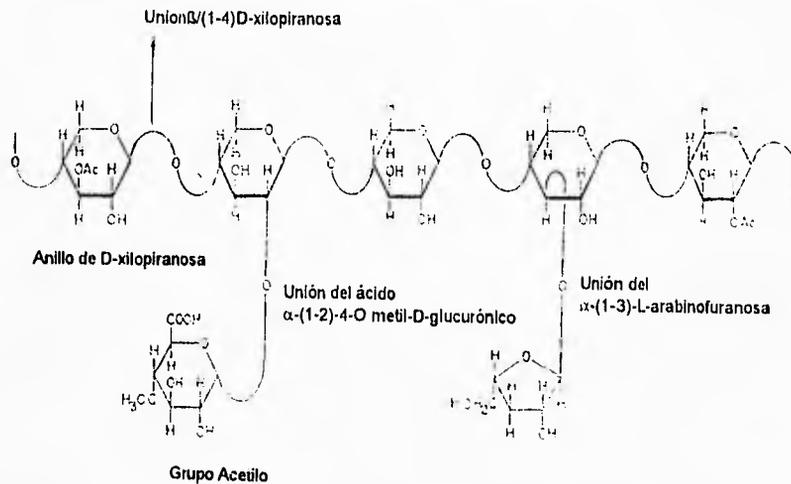


Fig. 2. Estructura del xilano con cadenas laterales unidas. Tomado de Bastawde.

La distribución de los componentes lignocelulósicos a través de la pared celular vegetal depende de las diferentes especies de plantas, de su crecimiento y diferenciación de la misma pared. El xilano aparece como el mayor constituyente de la interface entre la lignina y otros carbohidratos en la pared celular secundaria en las plantas. Es el principal carbohidrato que compone los complejos fenol-carbohidrato que se han aislado, se encuentra unido covalentemente a los residuos fenólicos vía residuos arabinosil y glucuronosil. El alto contenido fenólico presente en estos complejos muestra que los carbohidratos están unidos a fragmentos de lignina, además esto sugiere que los sustituyentes fenólicos también se unen en forma cruzada a las moléculas del xilano, y a éstas con otros polisacáridos. Se ha sugerido también una posible unión del xilano con sustancias pécticas y en complejos proteína-glucano-xilano (56).

Es difícil reconocer completamente todas las uniones covalentes que presenta el polímero debido a que algunas se rompen durante el aislamiento, han podido ser reconocidos los extremos reductores y algunos sustituyentes acetil lábiles a pH básicos, pero cerca del 50% de éstos no han podido ser identificados en muchos vegetales. Por otro lado, la asociación de los xilanos a otros carbohidratos puede ser también de naturaleza no covalente. El xilano tiende a adsorberse en la celulosa y a agregarse con otros componentes hemicelulósicos,

resultando de estas interacciones la formación de puentes de hidrógeno. Este heteropolisacárido quizá, de hecho, juega el principal papel en la cohesión de la pared celular tomando en cuenta que su remoción selectiva de la madera delignificada resulta en un sustancial incremento de la porosidad de las fibras. Ambas asociaciones, covalente y no covalente pueden contribuir a la integridad estructural de los materiales lignocelulósicos, siendo la idea corriente que las fibras de celulosa se hayan embebidas en una matriz de lignina y polisacárido (56).

La hidrólisis de los materiales lignocelulósicos resulta entonces complicado, diversos métodos tanto físicos, químicos y enzimáticos se han utilizado para este fin. Entre los métodos físicos encontramos la molienda y el vapor, recientemente se ha descrito un pretratamiento de desechos agrícolas y domésticos con vapor a 180-220°C por 15 min a dos horas; esta técnica provee un alto rendimiento de los xilooligómeros y xilosa. El tratamiento con álcali y con bióxido de azufre se encuentran entre los principales métodos químicos (24). Sin embargo, ninguno de ellos logra una hidrólisis completa, pero dada la alta especificidad de las enzimas para atacar a un enlace determinado resulta uno de los métodos más eficientes. Con frecuencia se emplean combinaciones de los tres métodos para obtener mejores resultados, permitiendo los pretratamientos químico y físico mayor área de ataque y mejor acceso de las enzimas para actuar.

Se ha mencionado que la hidrólisis por métodos enzimáticos tiene ventajas sobre otros tratamientos por la especificidad en el sitio de ruptura, pero existen otras razones, una de las más importantes radica en que este proceso a diferencia del químico resulta mucho menos contaminante para el medio ambiente, además hay muy poca pérdida de sustrato debido a modificaciones químicas y es relativamente fácil la producción de estos catalizadores a gran escala.

**Tabla 3.** Composición de monosacáridos (% de molaridad) de diferentes xilanos de varias fuentes.

FUENTES	Rha	Ara	Xil	Man	Gal	Glc	AAU
Cascarilla de arroz							
fracción neutral	n.d.	44.9	46.0	n.d.	6.1	1.9	1.1
fracción ácida	0.6	40.9	45.6	n.d.	5.9	n.d.	7.0
Ojuelas de avena	n.d.	9.7	81.4	n.d.	1.1	3.4	4.3
Trigo	n.d.	33.5	65.8	0.1	0.1	0.3	n.d.
Lárice	n.d.	11.4	55.6	n.d.	3.1	25.7	4.2
Madera de abedul	n.d.	1.0	89.3	n.d.	n.d.	1.4	8.3
Madera de abedul (tratada con vapor)	n.d.	1.0	79.2	1.2	3.7	3.6	11.5

Abreviaturas: n.d., no detectado; Rha, rhamnosa; Ara, arabinosa; Xil, xilosa; Man, manosa;

Gal, galactosa; Glc, glucosa; AAU, ácido anhidrourónico.

Tomado de Kormelink y Voragen (28).

### Enzimas xilanolíticas.

Las xilanasas están ampliamente distribuidas. Son producidas por numerosos organismos procariontes y eucariontes .

Se ha mencionado ya que la estructura de los xilanos es variada y compleja; además su interacción con otros polímeros resulta aún más complicada, debido a esto es necesario una compleja batería enzimática, para lograr una hidrólisis más eficiente.

El modo de acción, cinética y otras propiedades de estos sistemas enzimáticos no están aún totalmente entendidos.

En términos generales estas enzimas se clasifican en tres grupos (11,56):

1. Endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasa. Actúa cortando el polisacárido al azar produciendo grandes cantidades de xilooligosacáridos de longitud variable.

Éstas a su vez se dividen en:

a) Endoxilanasa no liberadora de arabinosa. No puede atacar en los puntos de la unión  $\beta$ -1,4, donde se inicia una ramificación con L-arabinosil; y produce sólo xilobiosa y xilosa.

b) Endoxilanasa no liberadora de arabinosa. No puede romper los puntos de la unión  $\alpha$ -1,2 y  $\alpha$ -1,3 de las ramificaciones y produce principalmente oligosacáridos.

c) Endoxilanasa liberadora de arabinosa. Puede romper la cadena de xilano en las ramificaciones produciendo principalmente xilobiosa, xilosa y arabinosa.

d) Endoxilanasa liberadora de arabinosa. Puede hidrolizar en las ramificaciones y producir xilooligosacáridos y arabinosa.

2. Exo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasa. Esta enzima remueve las unidades de xilosa de los extremos no reductores de la cadena de xilano.

3.  $\beta$ -xilosidasa o xilobiasa. Hidroliza disacáridos como xilobiosa y grandes xilooligosacáridos pero con menos afinidad.

Existe un cuarto grupo de enzimas denominadas acetil-xilan-esterasas que rompen, justamente donde está unido un grupo acetil.

La cooperación en la actividad de estas enzimas es de suma importancia para lograr una hidrólisis completa del xilano.

Esta cooperación de las diferentes xilanasas se ha investigado en diferentes sistemas. Dos xilanasas fueron purificadas de *A. niger* por Takenishi and Tsujisaka (tomado de Wong,(56) ). Se encontró que una de las enzimas era responsable de la hidrólisis de la xilotriosa mientras otra, lo era de la hidrólisis de los sustituyentes de arabinosil. La hidrólisis del arabinoxilano por la xylanasa I fue

resultado de la acumulación de arabinoxylotriosa y arabinoxilobiosa las cuales fueron removidas cuando se agregó la xilanasas II. La hidrólisis de la xilanasas II dió como resultado la acumulación de xilotriosa y xilooligosacáridos mayores, los cuales fueron hidrolizados fácilmente a su vez, por la xilanasas I.

#### Distribución de las xilanasas.

Las xilanasas son producidas por numerosos organismos tanto eucariontes como procariontes, entre los que se encuentran protozoarios, insectos, plantas, caracoles, hongos y bacterias, (6), debido a la amplia distribución de los xilanos en la naturaleza.

No obstante los organismos productores más estudiados han sido bacterias y hongos, debido a la potencial aplicación que tienen las xilanasas producidas por ellos en diversos procesos industriales como el biopulpeo y bioblanqueo, el tratamiento de desechos agrícolas, el mejoramiento de la calidad nutricional de alimentos para animales y de las propiedades de diversos productos en panadería. Por otro lado, se ha otorgado gran interés a las xilanasas con un amplio intervalo de estabilidad a pH y temperatura dadas las condiciones a las que se llevan a cabo ciertos procesos en la industria.

**Tabla 4.** Hongos y bacterias productores de enzimas xilanolíticas.

	Tipo de xilanasas producida.
<b>BACTERIAS</b>	
<i>Bacillus sp.</i>	endoxilanasas
<i>B. polymixa</i>	$\beta$ -(1,4)-xilanhidrolasa
<i>B. stearothermophilus</i>	endo(1,4)- $\beta$ -xilanasas
<i>B. subtilis</i>	endo(1,4)- $\beta$ -xilanasas
<i>Cellomonas sp.</i>	$\beta$ -xilosidasa
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	$\beta$ -xilosidasa
<i>Saccharomonospora viridis</i>	endoxilanasas, arabinofuranosidasa
<i>Streptomyces cyaneus</i>	endoxilanasas, arabinofuranosidasa
<i>S. lividans</i>	endoxilanasas, arabinofuranosidasa
<i>Thermoactinomyces sacchari</i>	endoxilanasas, arabinofuranosidasa
<i>T. vulgaricus</i>	endoxilanasas, arabinofuranosidasa
<b>HONGOS</b>	
<i>Actinoadura sp.</i>	endoxilanasas, arabinofuranosidas
<i>Aspergillus awamori</i>	(1,4)- $\beta$ -arabinoxilanasas, arabinofuranohidrolasa, (1,4)- $\beta$ -D-xilosidasa, (endo-(1,4)- $\beta$ -xilanasas
<i>A. fumigatus</i>	endo (1,4)- $\beta$ -xilanasas, $\beta$ -D-xilosidasa

<i>A. niger</i>	acetilxilanesterasa, endoxilanasas $\beta$ -xilosidasa
<i>A. ochraceus</i>	endoxilanasas
<i>A. oryzae</i>	endo(1,4)- $\beta$ -xilanasas
<i>Malbranchea pulchella</i>	$\beta$ -xilosidasa
<i>Penicillium</i> sp.	$\beta$ -xilosidasa
<i>P. islandicum</i>	$\beta$ -xilosidasa
<i>P. funiculosum</i>	$\beta$ -xilosidasa, endo(1,4)- $\beta$ -xilanasas
<i>Sclerotium rolfsii</i>	$\beta$ -xilosidasa
<i>Sporotrichum cellulophilum</i>	$\beta$ -xilosidasa
<i>Thielavia terrestris</i>	$\beta$ -xilosidasa
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	endo(1,4)- $\beta$ -xilanasas, $\beta$ -xilosidasa
<i>T. reesei</i>	endo(1,4)- $\beta$ -xilanasas, $\beta$ -xilosidasa
<i>T. viride</i>	endo(1,4)- $\beta$ -xilanasas, $\beta$ -xilosidasa

---

Ref. 6,21,45,53,56

#### Xilanasas bacterianas.

Los actinomicetos son un grupo de microorganismos en el que se han encontrado numerosas especies buenas productoras de xilanasas. McCarthy, Peace y Broda (33) han reportado la producción de xilanasas en *Thermomonospora fusca*, *T. curvata*, *T. chromogena* y *Saccharomonospora viridis* creciendo a 50°C. Zimmermann, Winter y Broda en 1988 (57), encontraron ocho cepas de actinomicetos que presentaban actividades xilanolíticas. Estas cepas son *Pseudonocardia thermophila*, *Saccharomonospora viridis*, *Streptomyces cyaneus*, *Thermoactinomyces sacchari*, *Thermoactinomyces vulgaris*, *Actinomadura* sp. MT809 y *Microbispora bispora*.

Varios miembros del género *Streptomyces* son también buenos productores de xilanasas, por ejemplo, *Streptomyces* sp. A451 de la que aislaron dos xilanasas extracelulares xyl I y xyl II.

Otro género bacteriano muy importante es *Bacillus*, no sólo por la producción de xilanasas, sino por su posible utilización en biología molecular como un buen modelo para la recombinación genética. Shendye y Rao (50), clonaron los genes para las xilanasas de la cepa alcalófila termófila *Bacillus* NCIM59 en la cepa *Bacillus subtilis* A8 obteniendo un 96% de actividad xilanolítica extracelular, y teniendo la ventaja de que *B. subtilis* A8 es una cepa de la cual se conoce gran parte de su biología. Morales et al (36), purificaron tres xilanasas del complejo enzimático extracelular producido por *Bacillus polymyxa*, fueron tres pequeñas proteínas de 34, 34 y 22 kDa; cada una de éstas presentan diferencias en pH y temperatura óptima.

### Xilanasas fúngicas.

Entre los hongos existen numerosos reportes de cepas de hongos termófilos que producen estas enzimas. *Melanocarpus albomyces* crece a 50°C y presenta a 40°C su máxima estabilidad (30). *Thermoascus aurantiacus* el cual produce xilanasas y  $\beta$ -xilosidasa con actividad máxima a 80°C y 75°C respectivamente. (14). Otra xilanasas producida por una cepa de *Thermoascus aurantiacus* fue estudiada por Tan et al (52). Tales enzimas muestran gran estabilidad, reteniendo el 100% después de 24h a 70°C o 97h a 60°C. A 80°C la vida media de la enzima fue de 54 min. Grajek (17) también reportó xilanasas de diferentes hongos. *S. thermophile*, *A. terrestris*, *T. aurantiacus*, *T. thermophila*, *a. fumigatus*, *Humicola lanuginosa* y *Mucor pusillus*; los cuales presentan temperatura óptima entre 35°C y 75°C.

### Xilanasas de *Aspergillus*.

El género *Aspergillus* tienen también muchas cepas productoras de xilanasas. *Aspergillus sydowii* MG 49 produce dos xilanasas con máxima actividad a 60°C (15). Kitpreechavanich et al encontraron una xilanasas estable a 65°C, producida por *Aspergillus fumigatus* (25), y una cepa de *Aspergillus niger* reportada por John, Schmidt y Schmidt produce dos enzimas con actividad en un amplio intervalo de temperatura, y la máxima actividad entre 64°C y 80°C (49).

Tabla 5. Algunas especies de *Aspergillus* que producen xilanasas.

Especie	Referencia
<i>A. awamori</i>	Poutanen et al. (1986, 19879), Friedrich et a. (1987)
<i>A. foetidus</i>	Linko (1981)
<i>A. japonicus</i>	Sharma et a. (1985)
<i>A. terreus</i>	Aprasyukhina et al. (1985), Abdel-Fattah et al. (1987).
<i>A. nidulans</i>	Fernandez-Espinar et al. (1992)
<i>A. niger</i>	Frederick et al. (1981, 1985), Shei et al. (1985), Fukumoto et al. (1970).
A.MGM-470	Este trabajo (1995).

Adaptado de Fogarty (11).

### II.3 Aplicaciones de las xilanasas.

#### Producción de papel.

##### Obtención de Pasta Mecánica.

Para producir pasta mecánica la madera para pulpa se hace forzando la madera contra una piedra de molino que gira a alta velocidad. Este proceso utiliza prácticamente toda la fibra de madera que existe en el tronco, en la que se incluye tanto a la celulosa como a la lignina. Mientras que los diferentes procesos químicos disuelven la lignina en distinto grado, de modo que el rendimiento de las pulpas químicas es aproximadamente la mitad del de la pasta mecánica. Puesto que las fibras de esta pasta en realidad se desgarran de la madera, varían en longitud y composición. Aunque los mayores tonelajes de pasta mecánica se emplean en la fabricación de papel para periódico, por medio de cambios en el proceso y en la operación es posible obtener otras calidades de pasta mecánica apropiadas para usarse en papeles para libros y otros tipos especiales.

Existen dos razones básicas para usar pasta mecánica en papeles de impresión y similares. La más importante es su bajo costo, dado que el proceso utiliza prácticamente toda la fibra de la madera para pulpa, que es una materia prima bastante cara. La segunda razón es que las fibras rotas desgarradas de la pasta mecánica pueden absorber rápidamente la tinta en las prensas de impresión de alta velocidad, de los periódicos, revistas y publicaciones similares. En los papeles base para papeles recubiertos, también tiene aceptación un cierto porcentaje de fibras de pasta mecánica. Las características satisfactorias de impresión y opacidad de la pasta mecánica, la hacen una pulpa muy aceptable para los papeles que no requieren permanencia. Cuando se refina apropiadamente, también se emplea con éxito en papeles "tissue", para toallas, y similares (7).

##### Obtención de pulpas químicas.

Existen diversos procesos químicos para la obtención de pulpa, los más importantes son el de la sosa, el del sulfato o kraft y el del sulfito, aunque existen muchas variables y combinaciones entre ellos.

En la fabricación de pulpa por el proceso a la sosa, se usa un licor de cocción que consiste principalmente en sosa caústica. El proceso al sulfato difiere del de la sosa porque en su licor de cocción utiliza sulfuro de sodio junto con el hidróxido de sodio. La ventaja de este último proceso es que la pulpa adquiere mayor resistencia y la cocción es más rápida (51).

Las astillas se cuecen, durante un tiempo de 2 a 4 h. a temperatura y presión controladas, la presión aproximada es de 100 a 110 lb/plg<sup>2</sup>.

En el tanque de descarga quedan la pulpa y el licor negro que contiene los reactivos de cocción gastados, así como la lignina y otros sólidos extraídos de la madera.

La pulpa lavada se depura entonces y se envía a la planta de blanqueo o a la fábrica de papel.

El licor negro utilizado para la cocción de la pulpa es tratado hasta obtener licor verde, que contiene sulfuro de sodio, sulfato de sodio y carbonato de sodio. Y se llevan a cabo las sig reacciones:

Se caustifica el licor verde convirtiéndose el carbonato de sodio en hidróxido de sodio y el calcio se precipita como carbonato de calcio  $\text{Ca(OH)}_2 + \text{Na}_2\text{CO}_3 \rightarrow \text{CaCO}_3 \downarrow + 2\text{NaOH}$ .

El carbonato se calcina para recuperar el calcio  $\text{CaCO}_3 \rightarrow \text{CaO} + \text{CO}_2 \uparrow$

El óxido de calcio se apaga con agua de lavado o licor diluido proporcionando el hidróxido de calcio para la formación de "licor verde".  $\text{CaO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ca(OH)}_2$ . La cal de reposición se agrega como cal viva o carbonato de calcio.

El hidróxido de sodio obtenido se utiliza como licor de cocción junto con el sulfuro de sodio originado en el horno de recuperación.

La mayoría de especies de maderas pueden transformarse en pulpa en el proceso al sulfato. El uso final de la pulpa determina qué maderas son apropiadas para procesarse. La pulpa que se va a blanquear debe hacerse, de preferencia, a partir de maderas de colores ligeros.

Algunas especies para la obtención de maderas son: *Pinus palustris*, *P. laeda*, *P. caribea*, *P. virginiana*, *Abies balsamea*, *P. banksiana*, *Picea sp.*, *Pseudotsuga*, *Taxifolia*, *P. ponderosa* y *Sequoia vivens*. Además de estas coníferas se utilizan maderas duras de árboles latifoliados como Liquidambar, *Styraciflua*, *Quercus sp.*, *Acer sp.*, *Populus sp.* y *Betula sp.*

La pulpa producida a partir de diferentes tipos de madera varía considerablemente en el tiempo de cocción requerido y en resistencia. Los árboles de maderas duras tienen una longitud de fibra menor y contienen menos lignina que las coníferas. Es decir, las maderas duras se cuecen en menor tiempo (y se puede esperar un mayor rendimiento y un menor contenido de lignina). Las dimensiones de la fibra determinan la resistencia de la pulpa, siendo más resistentes las de las coníferas (51).

El propósito de cocer las astillas es disolver la lignina y otras porciones no celulósicas de la madera, que sementan las fibras entre sí. Con lo anterior quedará una pulpa de fibras individuales que pueden volver a unirse en una hoja de papel. El grado de eliminación de lignina depende del uso final de la pulpa.

En el proceso al sulfato, al comenzar la digestión, el digestor se llena con astillas y licor de cocción. El licor de cocción del proceso al sulfato consiste de hidróxido de sodio y una cierta cantidad de sulfuro de sodio. Las calidades corrientes del papel requieren menos productos químicos por cocción que las calidades más finas. El sulfuro de sodio se hidroliza en agua para formar hidróxido de sodio y sulfhidrato de sodio:  $\text{NaS} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NaOH} + \text{NaSH}$ .

**Tabla 6. Comparación de propiedades entre las maderas y pulpas de coníferas y de árboles latifoliados.**

	Longitud de la fibra, mm	Celulosa, %	Lignina, %	Rendimiento kraft, %	Resistencias físicas		
					Explosión	Rasgado	Tensión
<b>Coníferas:</b>							
Pinabete (género <i>Picea</i> )	3.5	60.4	29.0	50	100	100	100
Abeto balsam ( <i>Abies balsamea</i> )	3.5	.....	.....	50	96	91	105
Pino gris ( <i>Pinus banksiana</i> )	3.5	58.7	28.5	51	90	92	96
<b>Arboles latifoliados:</b>							
Alamo temblón ( <i>Populus tremuloides</i> )	1.25	65.5	23.4	46	42	61	53
Abedul amarillo ( <i>Betula lutea</i> )	1.50	61.3	.....	47	52	93	59
Haya americana ( <i>Fagus grandifolia</i> )	1.20	.....	.....	37	38	52	41

Resistencia de la pulpa: pinabete al sulfato =100% (51).

Las reacciones del proceso de pulpeo también modifican la naturaleza de los carbohidratos no celulósicos remanentes en la pulpa. Las cocciones kraft originan una pérdida algo grande de glucosa. Además de la pérdida real de hemicelulosa y celulosa, la celulosa residual en la pulpa se despolimeriza progresivamente durante la digestión y el blanqueo. El grado de polimerización progresiva sin blanquear es una medida de la calidad de la pulpa (G. P. más exacta que su resistencia). El G. P. se determina midiendo la viscosidad de la celulosa después de disolverla a una concentración del 0.5% en solución de cuprietilendiamina. Normalmente la digestión al sulfato debe interrumpirse antes de que el G. P. disminuya de 1500 unidades de glucosa, correspondientes a una viscosidad de 30 cp. o mayor.

A medida que el G.P. disminuye por abajo de 500, la resistencia decae rápidamente, y a valores aproximados de 200, la pulpa no sirve para la fabricación de papel.

#### Variables de la cocción.

Los factores que determinan la calidad de la pulpa son principalmente:

1. Especie y calidad de madera. Como ya se mencionó las mayores diferencias de comportamiento en digestión y calidad de la pulpa depende de las variaciones dentro de una especie de madera. Por otra parte las maderas suaves difieren de las duras, como resultado, las pulpas de fibra corta (1 a 1.5 mm) de maderas duras tienen propiedades diferentes que las pulpas de fibra larga (3 a 4 mm) de las coníferas.

2. Tiempo de digestión, temperatura y factor H. El tiempo de digestión está relacionado con otras variables de la digestión, como la temperatura, cantidad y concentración de álcali y sulfidez del licor. Un aumento en cualquiera de estas últimas 3 variables disminuirá dentro de ciertos límites, el tiempo requerido para cocer una materia prima a un rendimiento y calidad especificadas.

Para expresar el tiempo de cocción y la temperatura se emplea el factor H (que relaciona las dos variables). Cualquier combinación de tiempo de cocción y temperatura que dé el mismo factor H, origina pulpas similares.

3. Sulfidez. La velocidad de cocción depende tanto de la alcalinidad del licor como de la cantidad de sulfuro. La presencia de esta sustancia en el licor de cocción, no sólo causa una disolución más selectiva de lignina sino que también mejora la calidad de la pulpa, aumentando su resistencia.

4. Relación de productos químicos a madera. Con las astillas, se deben agregar al digestor suficientes productos químicos para disolver la cantidad deseada de lignina y cocer las astillas a un grado conveniente. La relación de reactivos a madera (relación de baño) fijan la concentración inicial de los reactivos de cocción. La velocidad de la reacción química está determinada por la concentración de los reactivos de cocción, factor determinante en la velocidad de deslignificación.

El objetivo del proceso de obtención de pulpa es la separación de fibras de celulosa de la madera en condiciones tales que en la fibra se produzcan propiedades comercialmente deseables. Esto se logra solubilizando la capa de lignina que rodea a las fibras. Frecuentemente, las propiedades deseadas en las

fibras están ligadas con la eliminación de lignina y con la mínima degradación química de la celulosa.

La lignina existe en grandes cantidades en la lamela media del tejido del xilema, es decir, en la capa intermedia del tejido situado entre fibras o células adyacentes; y en la matriz de fibras celulósicas de la pared secundaria. Probablemente, se encuentra en la madera en forma de una red polimérica y está químicamente combinada con los carbohidratos.

Para efectuar la eliminación de la lignina, es necesario que el reactivo llegue a los sitios de reacción. Se ha encontrado que la penetración de las soluciones ácidas en la madera, se lleva a cabo, principalmente, en dirección longitudinal (fig 3). La penetración está influida por la densidad y por la estructura de la madera. La presencia en la madera, de materiales extraños, tales como las resinas, retarda la penetración.

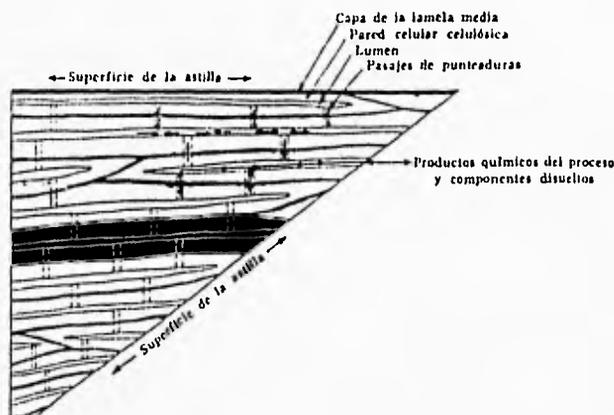


Fig. 3. Esquema simplificado de una astilla de madera que ilustra la posible trayectoria del transporte de la solución de productos químicos del proceso hacia la lignina de la lamela media. Los productos para la deslignificación quizá lleguen por la trayectoria indicada por las líneas gruesas.

Durante el proceso de obtención de pulpa al sulfito también se presentan cambios químicos en los componentes carbohidratados de la madera. Los carbohidratos de tipo hemicelulósico son atacados por la hidrólisis más que la celulosa. En los licores gastados se obtienen ciertos azúcares monoméricos como glucosa, manosa y fructuosa, que son fácilmente fermentables por las levaduras. En la práctica, el rendimiento de azúcares obtenidos a partir de las hemicelulosas, es de solamente la mitad o dos terceras partes del rendimiento teórico. El producto de esta hidrólisis son las omega-ligninas (10).

#### Blanqueo.

Después del proceso de pulpeo, para la elaboración de ciertos tipos de papel se requiere que la pulpa se someta a un proceso de blanqueo.

Obviamente, los compuestos de carbohidratos, celulosa y hemicelulosas, no contribuyen al color, porque son intrínsecamente blancos. Por medio de los tratamientos químicos usuales, tampoco se transforman fácilmente en compuestos coloreados. El único efecto de color que se ha demostrado se debe a los compuestos carbohidratados, es el amarillamiento de las pulpas químicas blanqueadas, por efecto de los álcalis.

La porción de lignina representa probablemente el sitio de los llamados grupos cromofóricos o de color. Debido a que la lignina contiene un gran número de grupos fenólicos, tanto en forma libre como esterificada, se puede hacer la suposición de que varios procesos oxidativos podrían convertir una parte de dichos grupos a sustancias del tipo de la quinona que absorben la luz visible.

Los constituyentes extraños de la madera también contribuyen al color de ciertas pulpas, especialmente de las pastas mecánicas. Un menor efecto de color se puede deber a los compuestos resinosos de la madera, como las grasas, ácidos resínicos y esteroides. Los iones de metales pesados, tales como los iones férrico y cúprico, pueden formar complejos coloreados con los elementos fenólicos de la pulpa y así intensificar su color. Los taninos pueden ejercer un efecto similar.

Muchas pulpas parecen más oscuras al suspenderlas en una solución alcalina. Esto se debe, quizá, a la ionización producida por el álcali de algunos grupos fenólicos o ionizables, asociados con los cromóforos.

Existen dos procedimientos para blanquear las pulpas. Primero, se pueden usar agentes selectivos de blanqueo que destruyan, al menos, una parte de los grupos cromofóricos sin ser materialmente consumidos por el cuerpo de la lignina. Este método se utiliza para pulpas con alto contenido de lignina, tales como la pasta mecánica, y las pulpas químico-mecánica, a la sosa en frío, y semiquímicas. En estos casos la deslignificación no es deseable, ya que disminuiría materialmente el rendimiento. El otro método es una combinación de la eliminación total o casi total de la lignina, y de blanqueo, como se practica en relación con las pulpas al sulfito, kraft, y a la sosa, que contienen sólo cantidades relativamente pequeñas de lignina residual. Únicamente mediante este último método se puede efectuar un blanqueo permanente a altos valores de blancura.

La eliminación parcial de grupos cromofóricos puede efectuarse usando agentes reductores, tales como el hidrosulfito de sodio o de zinc. Actualmente, por un proceso de oxidación, se puede obtener un blanqueo mejor y más permanente, usando peróxido de sodio o peróxido de hidrógeno en solución alcalina amortiguada. Ni el método reductor ni el oxidante producen un efecto permanente de blanqueo. Por la acción combinada de la luz y del oxígeno atmosférico, ciertos grupos de la pulpa se transforman gradualmente en compuestos coloreados. Este efecto, llamado reversión de color, es particularmente pronunciado en el blanqueo con reductores.

Para producir pulpas de alta calidad para papel, así como pulpas para disolver, se deben usar métodos de blanqueo que completen la deslignificación. El método convencional para las pulpas kraft y al sulfito consiste de tres tipos de reacciones: 1) cloración en medio ácido (pH 2 a 4) que degrada la mayor parte de la lignina residual de la pulpa a una forma soluble; 2) extracción alcalina, por medio de la cual los productos de lignina solubles en álcali se separan de la pulpa; y 3) blanqueo con hipoclorito en solución alcalina (pH 9 a 10) que completa la deslignificación y destruye los grupos cromofóricos residuales. Mediante este procedimiento en varios pasos se pueden obtener valores de blancura de 80 y mayores, sin debilitar las propiedades de resistencia de la pulpa. La introducción de un paso adicional de blanqueo usando bióxido de cloro o clorito de sodio, se ha visto tiene un efecto degradante menor sobre las fibras que el hipoclorito, y con ellos se obtienen blancuras superiores a 90 sin una pérdida significativa en la resistencia de la pulpa (40).

Como se ha mencionado la elaboración de papel a partir de madera requiere la separación de las fibras de la madera y posteriormente unirlos nuevamente en la hoja de papel. En la madera la lignina mantiene unidas las fibras, así que pueden separarse ya sea por degradación o remoción de la lignina (pulpeo químico); o por un proceso físico arrancando las fibras (pulpeo Mecánico). Ambos métodos son importantes procesos industriales: aproximadamente 120 millones de toneladas de pulpa química y 35 millones de toneladas de pulpa mecánica se producen cada año. Las pulpas química y mecánica tienen diferentes propiedades y ocupan diferentes nichos en el mercado. Muchos productos derivados de esta industria contienen ambos tipos de pulpa en proporciones variables, dependiendo de las propiedades requeridas.

La principal característica de la pulpa mecánica es su alto rendimiento, arriba del 95% (por peso del material inicial). En contraste, el rendimiento del pulpeo químico de la madera es generalmente menor al 50%. La pulpa mecánica es más barata que la química debido a su rendimiento y porque el equipo utilizado en el proceso representa un menor costo que el utilizado en el pulpeo químico.

La rigidez y habilidad de dispersar la luz de las pulpas mecánicas constituye una ventaja en algunos papeles porque aumenta la rigidez, grosor y opacidad. Sin embargo con frecuencia el alto contenido de lignina presente en esta pasta disminuye la calidad del papel porque las fibras tienen poca flexibilidad, no se unen unas con otras muy bien y el papel tiene poca resistencia. Otro problema con la

pulpa mecánica es su tendencia a ponerse amarillo al exponerse a la luz solar, (reversión de la brillantez).

La reversión de la brillantez, resulta de la oxidación fotoquímica de la lignina en la pulpa. Esta reversión no es problema en las pulpas químicas por su bajo contenido de lignina. La reversión limita el uso de pulpa mecánica en papeles donde la longevidad es importante. Más aún, la pulpa mecánica requiere mucha energía eléctrica que, por otra parte es cara y aumenta día con día.

De tal manera que existe un obvio incentivo comercial para superar las desventajas de la pulpa mecánica (baja resistencia, reversión de la brillantez y altos requerimientos energéticos); reteniendo las ventajas (alto rendimiento y bajo costo).

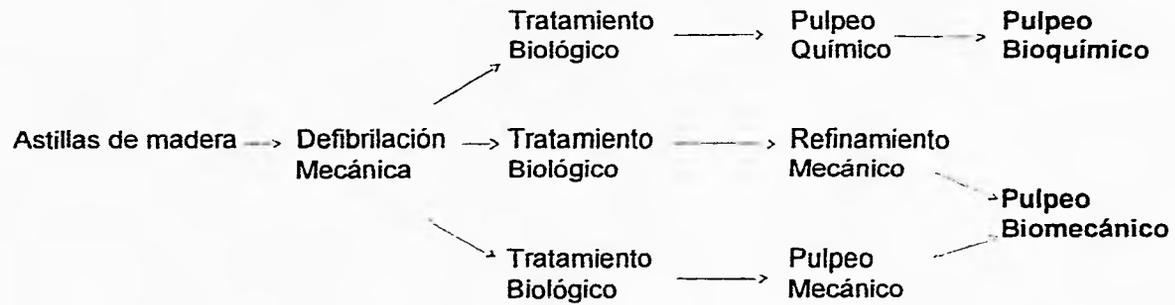
#### Aplicación de la biotecnología al pulpeo.

Debido a que la madera y otros materiales vegetales utilizados para el pulpeo son de origen biológico, y son fácilmente degradados naturalmente, es lógico considerar los tratamientos biológicos en los procesos de pulpeo.

Existen tres vías para integrar el paso biológico en la producción de pulpa (fig 4). El tratamiento biológico previo al pulpeo kraft, (método de pulpeo químico más ampliamente utilizado), que ya se ha llevado a cabo utilizando una cepa de *Phanerochaete chrysosporium* (43). Este tratamiento mejoró la resistencia de la pulpa a la tensión y explosión, pero disminuyó su resistencia a la elongación transversal, brillantez y rendimiento.

Los pretratamientos fúngicos a escala experimental se llevan a cabo bajo condiciones de fermentación sólida. La madera es suplementada con una solución nutritiva esterilizada y después se inocula con el micelio del hongo. La madera así tratada es incubada en condiciones de alta temperatura y a temperatura óptima para el crecimiento del hongo, manteniendo el sistema con aireación. Tal tratamiento puede producir un considerable ahorro en energía, además de mejorar la resistencia del papel.

Una estudio preliminar sobre la incorporación del pretratamiento fúngico en la fabricación de la pulpa mecánica demostró que el ahorro de energía es considerable. El costo de la energía representa el 40% del total del costo de producción de la pulpa, más el costo de la madera. El costo de la energía, 90% , es debido a la electricidad empleada en el proceso. Un 40% de ahorro en esta energía (debida al tratamiento biológico), podría reducir los costos de operación, en \$33 USD por tonelada. Para un molino mediano este ahorro podría cubrir una inversión de \$10 USD millones en equipo para el tratamiento fúngico, más los costos de operación USD \$26.40 por tonelada. Este ahorro de energía permitiría producir mayor volumen de pulpa (43).



**Fig. 4.** Tratamiento biológico en la manufactura de la pulpa. Posibles vías de incorporació del paso biológico en el proceso de pulpeo. Tomado de Reid (43).

### Xilanasas en panadería.

Otra de las aplicaciones de estas enzimas es en la hidrólisis parcial de los xilanos de la harina de trigo para mejorar las características de la masa y el pan.

Como se ha mencionado uno de los principales polisacáridos que constituyen la pared celular de los cereales son los xilanos, particularmente los arabinoxilanos. En el trigo el arabinoxilano representa de 2 a 3% (peso húmedo, p h) en la harina completa, apareciendo tanto en forma soluble como insoluble, de esto alrededor del 0.5-0.8% (p h) es soluble en agua. El interés de los arabinoxilanos en panadería radica principalmente en su gran capacidad de retener agua. Mutsaers (38), encontró que este polisacárido absorbe al rededor de la 3ª parte del agua adicionada en la elaboración de la masa. Un rompimiento enzimático parcial de los arabinoxilanos por enzimas xilanolíticas de *Aspergillus niger* libera agua. Si esta liberación sucede en el momento adecuado en el proceso de horneado se puede reducir la dureza y compactación del migajón y mejorar su estructura, así mismo se puede incrementar el volumen del pan.

Por otra parte, Rouao y Moreu (43), trabajaron con una preparación comercial de alfa-amilasa y observaron que mejoraban las características del pan, esto se debió a la fracción xilanolítica de la preparación. Las xilanasas presentes eran: endo- $\beta$  D-xilanasas y  $\alpha$ -L- arabinofuranosidasas. Estas enzimas solubilizan la mitad de la fracción de pared celular presente en la harina, liberando 75% de arabinoxilanos insolubles. El residuo insoluble es rico en glucanos y su capacidad de retener agua (CRA) no cambia. Sin embargo, la CRA de la fracción que contiene las paredes celulares en la masa se reduce aproximadamente un 50%.

En los trabajos de Maat, et al (30), se encontró una  $\beta$ -1-4 xilanasas producida por *Aspergillus niger var awamori* muy efectiva para incrementar el volumen del pan sin producir efectos colaterales en la calidad del mismo.

### Mejoramiento de alimentos para animales.

El mejoramiento de las características del alimento para animales también se puede lograr con un tratamiento con xilanasas.

Las dietas de aves de corral y cerdos se basan frecuentemente en cereales ricos en arabinoxilanos, tales como el trigo y el centeno. Algunas investigaciones han establecido que suplementando tales alimentos con xilanasas se puede llevar a cabo una degradación parcial de los arabinoxilanos en el sistema digestivo de los animales. Esto permite una mejor y más completa absorción de nutrientes como almidón, proteínas y lípidos y reduce los problemas digestivos y de parto comúnmente encontrados con tales dietas (8,41).

Desde el punto de vista de la complejidad de la composición y variabilidad del alimento de animales, y del hecho de que algunos animales quizá bajo ciertas condiciones, sean deficientes en la producción de enzimas endógenas, la dieta basada en materiales tratados o adicionados con xilanasas y productos

multienzimáticos constituyen gran ayuda. La aplicación de tales productos en alimentos para aves otorga mejoras en costos y efectividad de la conversión del alimento y por tanto mejora en el crecimiento de los animales (8). Además, problemas de ovoposición son eliminados frecuentemente y la variación dentro del grupo de aves es reducida. En la cría de cerdo una mejora substancial en la producción es también observada, así como menor variación entre los animales. Además la aparición de desórdenes digestivos normalmente se reduce. (16).

Las enzimas para aplicación comercial en alimentos para animales necesitan cumplir ciertos requisitos:

1. Ser suficientemente estables para su almacenamiento
2. Ser suficientemente estables para su procesamiento
3. Ser estables en el pH intestinal del hospedero
4. Ser parcialmente resistentes a las proteasas del hospedero
5. Ser activas contra los componentes del alimento a tratar.

Numerosos métodos de producción y estabilización enzimática han sido y están siendo desarrollados para cubrir estos requerimientos (16).

#### II.4 Temperatura y crecimiento.

La temperatura, como la humedad, juega un papel crucial en el crecimiento, supervivencia, distribución y diversidad de los hongos. La mayoría de éstos tienen un óptimo crecimiento entre 20° y 30°C y pueden crecer entre 5° y 40°C. Estos hongos son considerados mesófilos.

Los organismos termófilos son aquellos que pueden crecer en temperaturas cercanas a los 50°C. Ningún hongo crece a los 60°C, sin embargo existen bacterias que crecen en condiciones extremas de temperatura, se ha reportado que bacterias del género *Pyrodictium* tienen su óptimo crecimiento a 105°C.

Los hongos termófilos están bien representados en poblaciones microbianas de materiales orgánicos aerobios o semiaerobios en los que se genera calor como jardines, compostas, pastos, pilas de maderos, granos frescos almacenados, nidos de aves, suelos y heces de hervívoros. Existe evidencia de que una extensa flora fúngica de termófilos habita en suelos "calientes" de regiones volcánicas (19).

Un hongo termófilo, es aquel que tiene una temperatura máxima de crecimiento a, o cerca de 50°C y un mínimo a, o cerca de 20°C (según Cooney y Emerson 1964; tomado de Hudson (20)). Basando esta definición en la evidencia de que existen pocos hongos que crecen a esta temperatura (50 C°), y que muchos de éstos son incapaces de crecer a temperaturas por debajo de 20°C; aunque existen algunos que presentan un intervalo de crecimiento mucho más amplio p. ej. *Chaetomium thermophile* que crece de 27° a 58°C o *Aspergillus fumigatus* cuyas temperaturas máxima y mínima de crecimiento son 52° y 12°C respectivamente.

Los hongos termófilos como se ha mencionado tienen su máximo crecimiento

entre 45° y 50°C. Existen, sin embargo otros hongos que pueden crecer a estas temperaturas pero sin tanto éxito y presentando su óptimo crecimiento a temperaturas más bajas. Estos son considerados microorganismos termotolerantes.(fig 5)

La clave para el aislamiento de estos hongos no es un medio especial, pudiendo crecer en una amplia gama de medios comerciales (PDA, Agar-levadura-glucosa, etc.); sino incubar a temperaturas entre 45° y 50°C, donde seguramente se desarrollarán los hongos termófilos y termotolerantes.

Por los que se refiere al género *Aspergillus*, existen varias especies que crecen arriba de 30°C. Las especies termotolerantes más comúnmente encontradas son *A. fischerianus*, *A. fumigatus*, y *A. nidulans*. Las especies de *A. fumigatus* han sido aisladas de suelo de desiertos o zonas calientes, crecen a temperaturas más altas que lo normal, también pueden crecer en el intervalo de temperatura de los mesófilos.

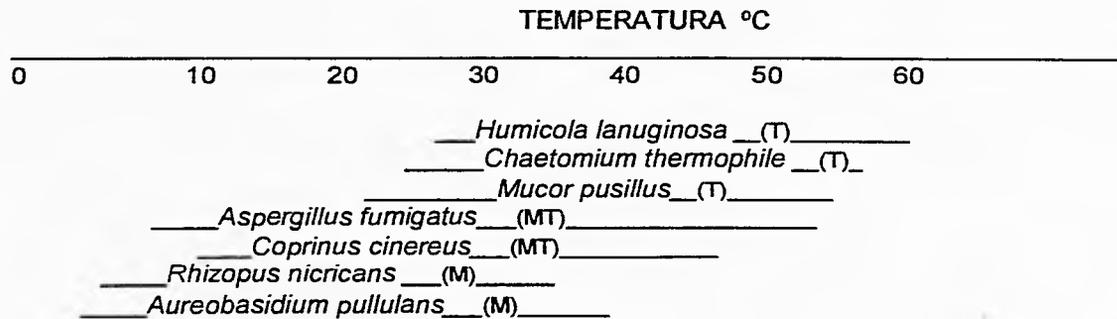


Fig. 5. Temperatura de crecimiento común para termófilos (T), mesófilos tolerantes (MT) y mesófilos (M). Tomado de Hudson (20).

Tabla 7. Intervalos de temperatura para el crecimiento de algunas especies de *Aspergillus*.

Especie	Temperatura °C	
	Intervalo	Optimo
<i>Eurotium amstelodami</i>	5-46	33-35
<i>E. chevaliere</i>	5-43	30-35
<i>E. repens</i>	7-40	25-27
<i>E. rubrum</i>	5-40	25-27
<i>E. xerophilicum</i>	10-36	24
<i>Aspergillus restrictus</i>	9-40	25-30
<i>A. clavatus</i>	5-24	25
<i>A. fumigatus</i>	12-65	37-45
<i>A. flavipes</i>	6-40	26-28
<i>A. terreus</i>	11-48	35-40
<i>A. ustus</i>	6-42	25-28
<i>A. sydowii</i>	5-40	25
<i>A. versicolor</i>	4-40	21-30
<i>A. flavus</i>	6-45	25-37
<i>A. niger</i>	9-60	17-42
<i>Neosartorya fischeri</i>	12-65	37-43
<i>Emericella nidulans</i>	6-48	35-37

Tomado de Kozakiewicz (26).

## II.5 Importancia económica de la termoestabilidad enzimática.

Una de las principales razones que han despertado el interés en la investigación de los organismos termófilos es la producción de enzimas termoestables y su aplicación en procesos industriales. Actualmente los principales procesos industriales que utilizan enzimas operan a temperaturas relativamente altas y muchas de las enzimas termoestables usadas son producidas por microorganismos mesófilos. Aunque existen muchos organismos termófilos que producen enzimas termoestables, los mesófilos tienen la ventaja de mayor facilidad de manipulación, no necesitan ambientes anaerobios o de altas presiones, que necesitan muchos termófilos por ser las condiciones de su hábitat natural.

Existen numerosas ventajas que presentan las enzimas termoestables frente a las que no resisten altas temperaturas. La termoestabilidad por sí misma confiere además de la tolerancia a altas temperaturas una vida media más larga. Una

además de la tolerancia a altas temperaturas una vida media más larga. Una temperatura óptima elevada que da la ventaja de tener poca actividad a baja temperatura, y una larga vida de anaquel. Estas enzimas por lo general son más resistentes a agentes desnaturalizantes; no sólo a elevadas temperaturas, sino también a solventes orgánicos y pHs extremos. Esta mayor resistencia permite someterlas a severas condiciones de purificación dando mayor rendimiento. Una aceleración de reacciones químicas como la difusión, hidrólisis de sustrato y otros procesos también es posible utilizando enzimas termoestables. La solubilidad puede ser mejorada, ya que se pueden utilizar altas concentraciones de compuestos poco solubles (en frío). De la misma forma la viscosidad también disminuye, por lo tanto el mezclado y el bombeo pueden acelerarse y la tasa de transferencia de masa se incrementa. La contaminación por microorganismos mesófilos se reduce considerablemente. La actividad biológica en materiales crudos también disminuye debido a que el calor inactiva la mayoría de las enzimas o actividades microbianas.

No obstante hay también algunas desventajas como la disminución de la solubilidad de los gases como el oxígeno; la termolabilidad de algunos reactivos, materiales crudos y cofactores lo que limita su uso, y la mayor tensión en el equipo por las altas temperaturas (27).

Sin embargo son más las ventajas que las desventajas en la utilización de enzimas termoestables, por otro lado se puede adecuar el uso a las condiciones y requerimientos de cada proceso en particular.

La importancia de seleccionar nuevas cepas de microorganismos radica en su potencial producción de enzimas con propiedades y características que permitan su utilización en procesos industriales y que confieran ventajas sobre las enzimas ya existentes en el mercado.

Las características enzimáticas requeridas en procesos industriales varían de acuerdo a cada proceso, sin embargo en la mayoría de ellos existen requerimientos comunes, útiles para mejorar el rendimiento y eficiencia del proceso. Algunas de estas características son que las enzimas presenten una vida media larga, temperatura óptima elevada que permita una larga vida de anaquel, ser activas a temperaturas elevadas y presentar mayor resistencia a otras condiciones extremas como pH ácidos o básicos y solventes orgánicos.

Muchas de estas propiedades están presentes en las enzimas de microorganismos termófilos, no obstante, numerosos microorganismos mesófilos o termotolerantes también producen enzimas termoestables. Por otra parte, existe la ingeniería genética que es una excelente herramienta para la transformación de microorganismos y mejoramiento de cepas. De tal manera que la búsqueda de nuevas cepas y la aplicación de técnica de biología molecular constituye un importante avance de la microbiología y enzimología industriales.

**Tabla 8. Procesos enzimáticos industriales llevados a cabo a temperaturas elevadas.**

<b>ENZIMA</b>	<b>TEMPERATURA (°C) DE OPERACIÓN</b>	<b>APLICACIÓN PRINCIPAL</b>
alfa-amilasa (bacteriana)	90-100	Hidrólisis de almidón en cervecería, panadería y para detergentes.
glucoamilasa	50-60	Hidrólisis de maltodextrina
alfa-amilasa (fúngica)	50-60	Jarabes con alto contenido de fructuosa
pectinasa	20-50	Clarificación de jugos y
	45-55	Hidrólisis de la celulosa
lactasa	30-50	Hidrólisis de la lactosa en procesos alimenticios
proteasa ácida	30-50	Procesos alimenticios
proteasa fúngica (neutra)	40-60	Panadería, cervecería y otros procesos
proteasa alcalina	40-60	Detergentes
lipasas	30-70	Detergentes, procesos alimenticios.

Tomado de Kristjansson (27).

Por otra parte se siguen investigando los procesos de la termoestabilidad y se sabe que ésta se debe en parte, a las interacciones hidrofóbicas, iónicas y los puentes disulfuro, los que contribuyen a la estabilidad de las enzimas; todas estas interacciones debidas a algunas diferencias entre los aminoácidos de las enzimas de termófilos y de mesófilos. Quizá la capacidad de sintetizar una cantidad suficiente de ácidos grasos saturados contribuye a mantener la integridad de las membranas celulares bajo temperaturas elevadas.

Existen todavía muchas preguntas acerca de los mecanismos de la termoestabilidad en las enzimas y de cómo se regula; así como del comportamiento de los organismos cuando se encuentran en condiciones de agobio térmico. ¿Los tipos de xilanasas producidas por los distintos organismos se pueden modificar como el mismo organismo en respuesta a cambios en el medio ambiente? ¿Porque la producción de varias enzimas y su funcionamiento pueden determinar la viabilidad de éste en un ambiente determinado? , etc.

## **OBJETIVOS**

En base a todo anterior los objetivos de nuestro trabajo fueron la selección de una cepa termotolerante productora de xilanasas. Determinar el efecto de la temperatura en el crecimiento del hongo, y en producción de enzimas. La caracterización del sistema xilanolitico producido por esta cepa. Y comparar dicho sistema producido a dos temperaturas, 37°C, temperatura en la cual el microorganismo se encuentra en condiciones fisiológicas normales, y 45°C, que es una temperatura alta para el crecimiento de este hongo.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### III.1 Microorganismo.

Se utilizaron 48 cepas silvestres de hongos del género *Aspergillus sp* aislados de frutos en estado de descomposición, de los que se seleccionó una. La cepa utilizada para la producción de xilanasas fue *Aspergillus sp* MGM-470. Todas las cepas fueron propagadas en tubos con medio inclinado de Papa-dextrosa-agar (PDA), por un período de 72h, a una temperatura de 37°C; y conservadas de la misma forma a temperatura ambiente.

#### III.2 Medios de cultivo.

Para la conservación y propagación se utilizó un medio de PDA (39g/l) y agar (5%).

Para la selección de la cepa se utilizaron medios sólidos: (a) PDA-agar (anteriormente descrito) y (b) maltosa-agar que contenía en g/l de sol: extracto de malta 20, agar 20, dextrosa 20 y peptona 1. El microorganismo se creció en estos medios sólidos a 50°C, durante 96 h. También se utilizó medio líquido: (c) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.4%); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.2%); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.2%); extracto de levadura (0.3%) y xilanos de abedul (1.0%) como fuente de carbono, a 50°C y a 45°C durante 72 h. Se seleccionó la cepa que presentó mejor actividad xilanolítica y específica a la mayor temperatura.

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento del microorganismo y la producción de la enzima fue el mismo medio líquido empleado para la selección de la cepa.

La fermentación se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 200 ml de medio, a dos temperaturas 37°C y 45°C con agitación constante de 100 r.p.m., en un agitador (Newbrunswick Sci. Co. USA). El pH inicial fue de 6.3.

#### III.3 Crecimiento celular.

El crecimiento celular fue determinado como peso seco. Tomándose muestras de los cultivos cada 24h. y filtrándose a través de una membrana Millipore de 5.0 µm, previamente pesada; la biomasa que quedó retenida en la membrana fue secada en una estufa a 50°C hasta obtener su peso constante.

#### III.4 Determinación de la actividad enzimática.

Al filtrado libre de células se le determinó la actividad xilanolítica cuantificando los azúcares reductores producidos a partir de xilanos de abedul utilizados como sustrato; mediante el método del DNS. La mezcla de reacción contenía: 0.5ml de xilanos de abedul al 1% ; 0.4ml de buffer McIlvaine citrato-fosfato, 0.15M pH 5.0, y 0.1 ml de filtrado enzimático. Esta mezcla fue incubada a 50°C durante 30 minutos, y al cabo de este tiempo se agregó 1 ml de DNS, se colocaron en un baño a ebullición durante 5 min., posteriormente, las muestras se llevaron a un volumen de 7 ml adicionando agua destilada. A la muestra blanco se agregó el filtrado enzimático después de haber adicionado el DNS. La absorbancia

fue determinada a 540 nm. La concentración de grupos reductores se expresa como equivalentes de xilosa liberada a partir de la solución de xilanos. Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de una  $\mu\text{mol}$  de xilosa en treinta minutos bajo las condiciones de ensayo.

#### III.4.1. Temperatura y pH óptimos.

La temperatura óptima se estableció midiendo la actividad enzimática 30 min. a pH de 5.0, para diferentes temperaturas desde 30°C hasta ebullición, en intervalos de diez grados.

Así mismo para el pH óptimo se midió la actividad enzimática variando los valores de pH desde 2.7 hasta 10.5 en el sistema de reacción manteniendo el tiempo y temperatura de ensayo constantes.

#### III.4.2. Estabilidad a pH.

Para la determinación de la estabilidad el filtrado se incubó durante 24h antes de desarrollar la actividad a 4° C y temperatura ambiente a diferentes valores de pH de 2.7 a 10.5. Finalizado el período de incubación se colocó la muestra en una proporción 1:1 (1ml de filtrado , 1ml de buffer). Se determinó la actividad enzimática residual siguiendo la técnica anteriormente descrita. Se utilizaron buffer McIlvaine (pH 2.2-8.0) y Sorensen glicina (pH 7.0-12) para los diferentes valores de pH.

#### III.4.3. Estabilidad a temperatura.

Se incubó el filtrado a la temperatura deseada durante 60 min con buffer McIlvaine pH 5.0 . El ensayo se llevó a cabo en ausencia y presencia de sustrato, en una concentración final del 1%. Posteriormente se midió la actividad xilanolítica residual.

#### III.4.4. Vida media.

Se estableció la vida media de ambos filtrados enzimáticos a 50°C. Se desarrolló el ensayo para determinar actividad enzimática monitoreando cada media hora hasta que los valores de actividad se redujeron en un 50%.

#### III.4.5. Efecto de iones sobre la actividad enzimática.

La actividad enzimática se midió en las condiciones estándar, en presencia de diferentes iones. El sistema de ensayo consistió en 0.1ml del filtrado correspondiente, 0.4 ml de Buffer McIlvaine pH 5; 0.5 ml de xilanos de abedul y 0.1 ml del ion correspondiente obteniendo una concentración final de 100 mM.

Los iones utilizados fueron  $\text{Na}^+$ , ( $\text{NaCl}$ );  $\text{Cl}^-$ , ( $\text{NaCl}$ );  $\text{K}^+$ , ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ );  $\text{Cu}^{++}$ , ( $\text{Cu SO}_4$ );  $\text{Mg}^{++}$ , ( $\text{MgSO}_4$ );  $\text{Zn}^{++}$ , ( $\text{ZnSO}_4$ ).

#### III.4.6 Actividad celulolítica.

La actividad celulolítica de los filtrados se determinó con el mismo sistema de reacción, sólo sustituyendo el sustrato (xilanos de abedul) por carboximetilcelulosa.

#### III.4.7 Medición de azúcares reductores.

Los azúcares reductores presentes en el medio fueron medidos directamente en el filtrado libre de células por el método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalisílico, Miller 1959). La mezcla de reacción contenía 0.1 ml de filtrado enzimático, 0.4 de buffer McIlvaine citrato-fosfato 0.15M pH 5.0 y 1ml de DNS, esta mezcla fue puesta en ebullición por 5 min., luego fueron añadidos ml de agua destilada y se determinó la absorbancia a 540 nm. La concentración de azúcares reductores fue calculada utilizando xilosa como estándar.

#### III.5 Electroforesis (PAGE-SDS).

La electroforesis en geles de poli-acrilamida -SDS fue hecha de acuerdo a Laemmli (1970). El gel contenía acrilamida al 10% y bis-acrilamida al 2.7%. La concentración de SDS (Bio-Rad Laboratories) fue de 0.1% en el gel y en el buffer de corrimiento. Las muestras a utilizar fueron sometidas a ebullición durante 60 segundos en el buffer de muestra (SDS 4%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 10%, buffer Tris-HCl 125 mM a pH 6.8 y azul de bromofenol 0.005%).

Se emplearon 200 µg de proteína, de cada muestra para realizar la electroforesis, la cual se llevó a cabo a corriente constante, 60 mA de 3-4 h. A través de una unidad de geles verticales de 1.5 mm. SE-600 (Hoefer Scientific Instruments USA). Los geles fueron teñidos con una solución que contenía azul de coomasie R-250 (Bio-Rad Laboratories) al 0.125%, metanol al 50% y ácido acético al 10%. Se destiñeron con una solución de ácido acético al 10%.

La proteína fue determinada por el método de Lowry(30), utilizando albúmina de suero bovino como estándar.

#### III.6 Determinación de actividad "in situ" (zimograma).

Se corrió la electroforesis en el gel de poli-acrilamida, del modo anteriormente descrito. Posteriormente, con el gel sin teñir, se renaturalizó el gel de acrilamida con buffer R.N.-tris 0.01M pH 7.5. a 37°C. durante 1-1.5 horas, cambiando el buffer cada 30 minutos.

Para la preparación del gel de agarosa se disolvió por calentamiento agar (1%) en buffer McIlvaine pH 5.0 y se adicionó el xilano de abedul teñido con azul brillante de Remazol (xilano-ABR), en una concentración final del 0.2%. Esta mezcla se vació entre placas de vidrios con separadores de 0.7mm y se dejó gelificar.

El gel de acrilamida, se colocó encima del gel de agar-xilanos-ABR, y se dejó en una cámara húmeda con buffer McIlvaine pH 5.0 por 12-15 h. Al concluir el tiempo de incubación los geles se separaron. Se puede observar en el gel de agar-xilanos ABR los halos de hidrólisis producto de la actividad xilanolítica de las bandas de proteína separadas en el gel de poli-acrilamida.

### III.6.1 Preparación del xilano teñido.

El xilano fue teñido con ABR (azul brillante de Remazol) siguiendo la técnica descrita por Biely et al (1987). Los xilanos de abedul (SIGMA Lab.) fueron molidos en mortero y disueltos en agua obteniendo una concentración de 1g xilano / 30 ml H<sub>2</sub>O; se disolvió el colorante ABR (SIGMA Lab.) en la sol de xilano; y se agregó Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Baker), 10mg/10ml de agua gota a gota y con agitación durante 5 min. La mezcla se alcalinizó con NaOH (Baker) 10%, a temperatura ambiente manteniendo agitación constante por noventa minutos. El producto teñido se precipitó con 2 vol de etanol 96%, y se colectó por filtración. Se lavó con una mezcla de etanol 0.05 % y acetato de sodio en agua 2:1v/v, hasta obtener un filtrado incoloro. El producto fue lavado sucesivamente con etanol-agua 4:1 v/v, etanol, acetona, y se secó a temperatura ambiente. Se obtiene cerca de 1g de complejo xilano-ABR.

### II.7 Cromatografía.

Se realizó un análisis de los productos de digestión de las enzimas producidas por medio de cromatografía en capa fina, de acuerdo a la técnica de Ganju et al (1988). Se utilizó un sistema de ensayo consistente de 0.5ml de xilanos de abedul (1%), 0.4ml de buffer McIlvaine, pH 5.0 y 0.1ml de filtrado enzimático, a diferentes tiempos de digestión; las muestras fueron aplicadas a una cromatoplaaca Kieselgel-60, (Merk, México). El filtrado antes de ser utilizado se trató con NaOH 0.5N y ZnSO<sub>4</sub> al 9% seguido de centrifugación a 5000 r.p.m. por 5 min. para precipitar la proteína.

Se utilizaron como controles: xilosa, xilobiosa y xilanos de abedul (0.1%). El eluyente utilizado fue una solución de acetato de etilo, ácido acético y agua en una relación 3:3:1 (v/v). Como revelador se utilizó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20% en etanol, seguido por calentamiento del cromatograma a 110° -115°C durante 15-20 min.

\* El número de clasificación de las cepas pertenece a la notación de la Colección Microbiana del Laboratorio de Fisiología de Hongos Filamentosos del Depto. de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

##### IV.1. Selección de la Cepa.

La selección de la cepa se llevó a cabo en dos partes a partir de 48 cepas aisladas de fuentes naturales. Todas las cepas pertenecen al género *Aspergillus* sp.

La primera etapa consistió en evaluar el crecimiento de estas 48 cepas a temperaturas de 37°, 45° y 50°C en medios sólidos a) y b) y líquido c). A 37° todas las cepas crecieron tanto en medio sólido como en medio líquido. Cuando se probó el crecimiento a 45°C en medio sólido crecieron 34 cepas de las 47 originales. En medio líquido a esta temperatura, 10 cepas fueron capaces de crecer. En el caso de 50°C la última temperatura probada encontramos que, en medio sólido sólo crecieron 22 cepas, mientras que en líquido ninguna presentó crecimiento (fig 6).

El resultado de esta primera etapa fue la selección de las 10 cepas que presentaron crecimiento a 45°C en los medios líquido y sólido.

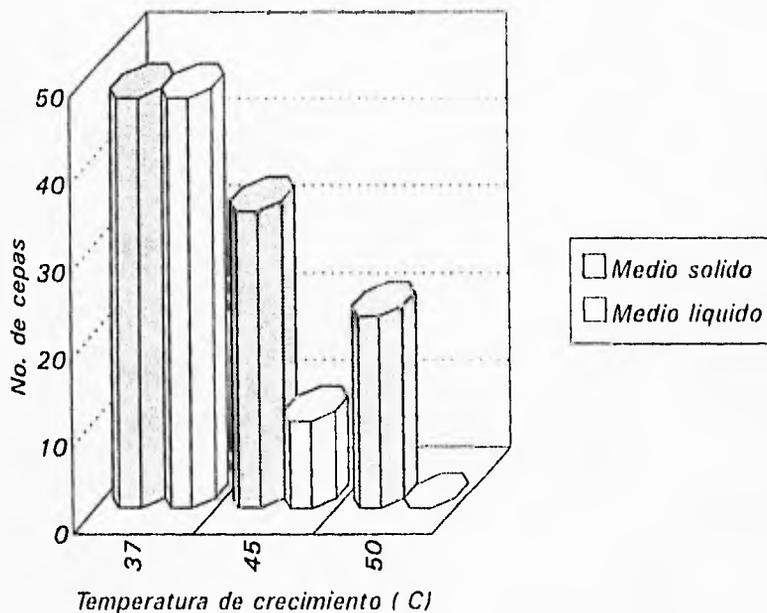


Fig. 6 Crecimiento de las cepas a 37°, 45° y 50°C en medios sólido y líquido.

En la siguiente etapa de la selección, las 10 cepas elegidas se crecieron en medio c), utilizando xilanos de abedul como fuente de carbono y extracto de levadura al 0.3%.

Las 10 cepas elegidas tienen los números de clasificación: MGM-030, MGM-030L, MGM-160, MGM-330, MGM-370, MGM-420, MGM-430, MGM-450 Y MGM470. Todas ellas se conservan en el Laboratorio de Fisiología de Hongos Filamentosos, del Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química de la UNAM.

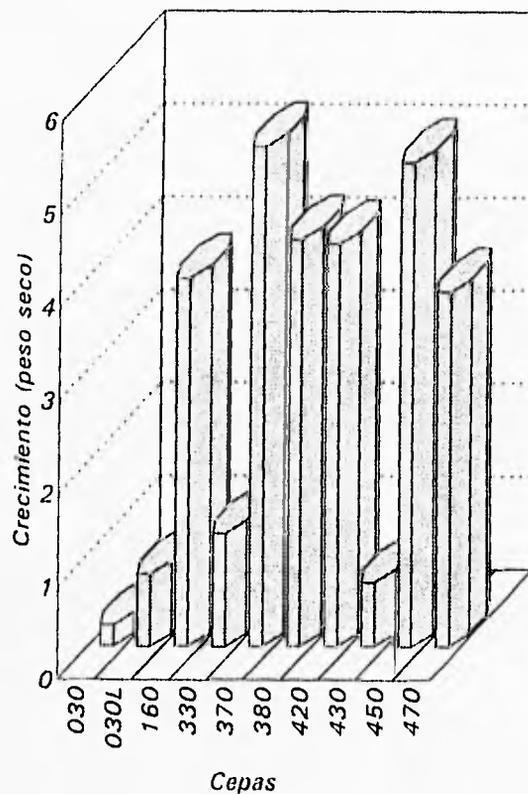


Fig. 7 Crecimiento de las 10 cepas resultantes de la primera etapa de selección.

El crecimiento de estas cepas fue evaluado. Las cepas que presentaron el mayor crecimiento fueron la MGM-370, MGM-380, MGM-420, MGM-450 y MGM-470, con valores entre 3.8 y 5.4 mg/ml de peso seco (PS). Estos valores resultaron muy superiores en comparación con los de las otras cinco cepas MGM-030, MGM-30L, MGM-160, MGM-330 y MGM-430, cuyo crecimiento en cuatro casos no llega a 1.0 mg PS y solo la cepa 330 alcanza 1.22 mg PS.

La mayor actividad xilanolítica la presentó la cepa 470, con 42.903 U/ml y valores similares se encontraron para las cepas MGM-370, MGM-380, MGM-420 y MGM-450. Por lo que se eligieron estas cinco cepas como posibles candidatos

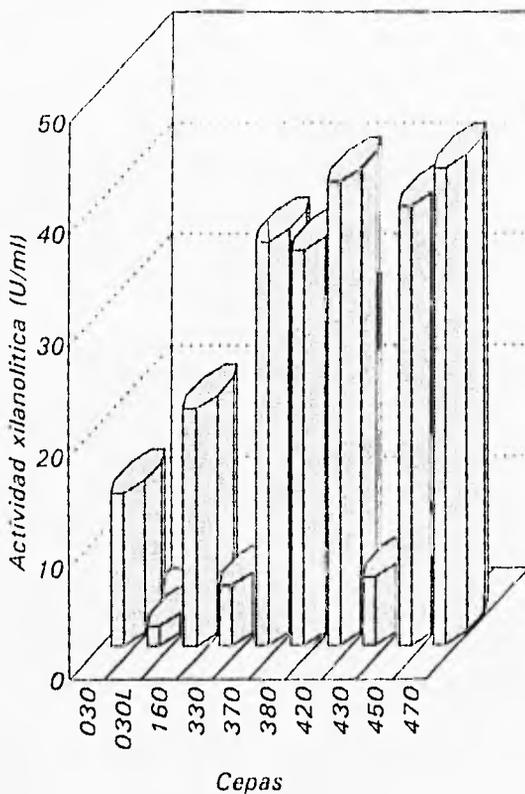


Fig. 8 Actividad xilanolítica de las 10 cepas seleccionadas en la primera etapa.

Se evaluó nuevamente el crecimiento y actividad xilanolítica de estas cinco cepas y se determinó la actividad específica.

De las cinco cepas, tres presentaron actividad xilanolítica superior a 40 U/ml y dos entre 36 y 40 U/ml. En cuanto a la actividad específica, la cepa 470 presentó el valor más alto, a pesar de no ser la cepa con mayor crecimiento, produce la mayor actividad xilanolítica por unidad de masa celular. Las cepas MGM-380 y MGM-420 presentaron valores similares de actividad específica. Por lo que se decidió trabajar con las tres primeras; no obstante las cinco cepas son productoras de xilanasas y presentan crecimiento a 45°C.

Se evaluó el crecimiento de las cepas MGM-370, MGM-420 y MGM-470, en medio c) sin extracto de levadura en agitación orbital.

El crecimiento obtenido bajo estas nuevas condiciones fue menor en comparación con el que se obtuvo cuando el medio se adicionó con extracto de levadura.

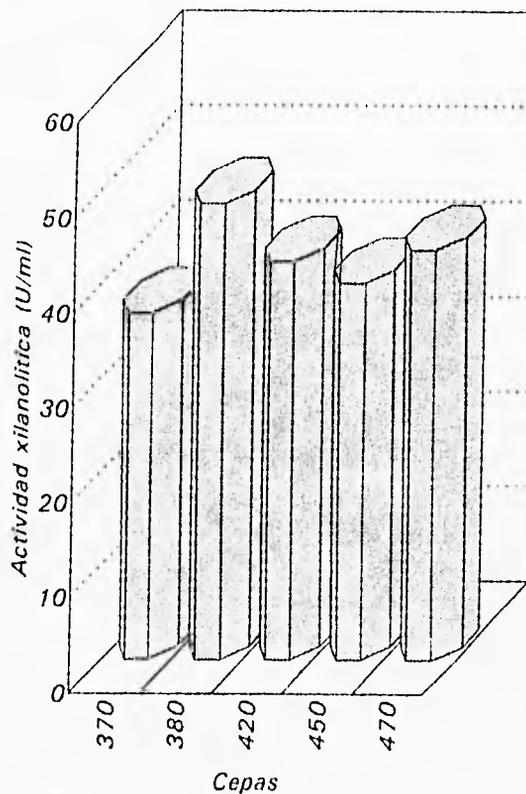


Fig 9. Actividad xilanolítica de las cepas MGM-370, MGM-380, MGM-420, MGM-450, MGM-470

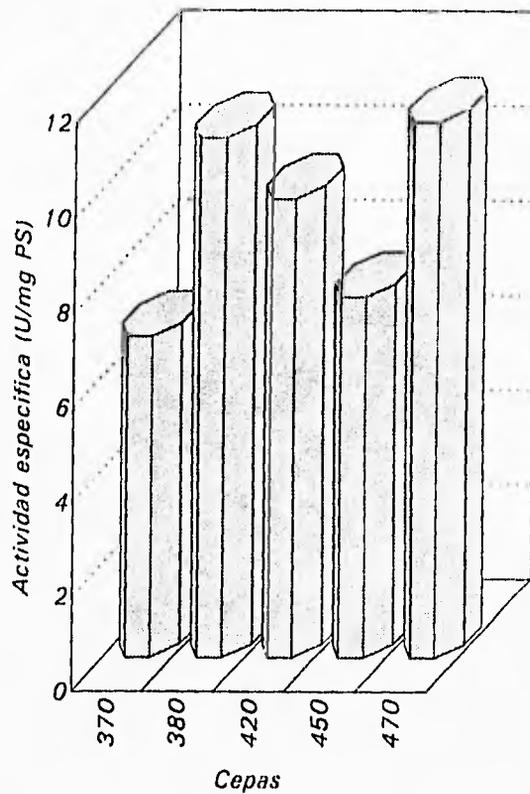
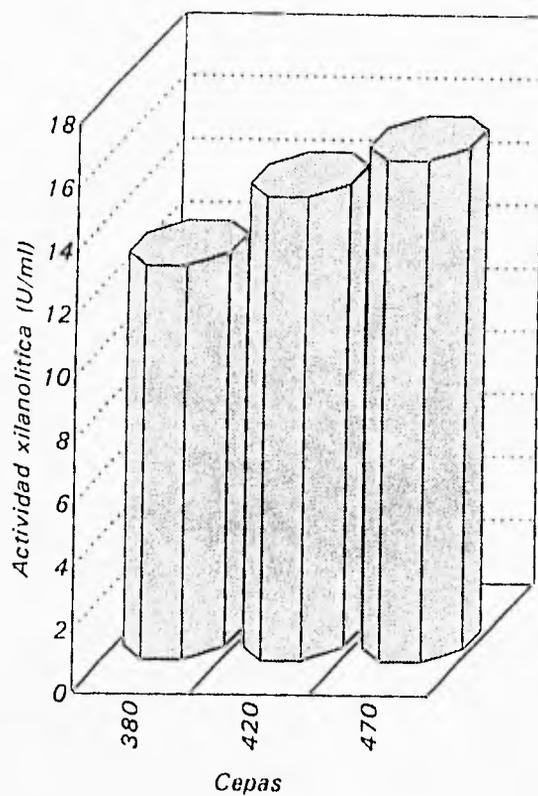


Fig. 10. Actividades específica de las cepas MGM-370, MGM-380, MGM-420, MGM-450 MGM-470

La cepa que más crecimiento presentó fue la MGM-380, mientras que las cepas MGM-420 y MGM-470 crecieron casi cuatro veces menos. Sin embargo, en cuanto a la producción de actividad xilanolítica, la cepa MGM-470 fue la que presentó los valores más altos en contraste con la cepa MGM-380 que fue la que menos actividad produjo. La mayor actividad específica también fue producida por la cepa MGM-470. Estos resultados confirman los anteriormente obtenidos

indicando que la cepa MGM-470 es buena productora de actividad xilanolítica en ambas condiciones.



**Fig. 11.** Actividad xilanolitica de las cepas MGM-380, MGM-420 Y MGM-470. Medio c) sin extracto de levadura.

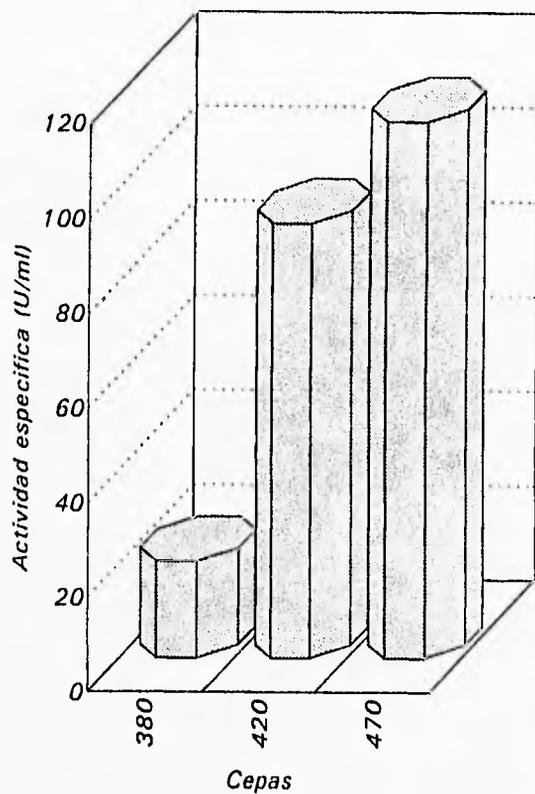


Fig 12. Actividad específica de las cepas MGM-380, MGM-420 y MGM-470.

Por lo anterior la cepa seleccionada fue la MGM-470, un hongo del género *Aspergillus sp*, de color blanco y textura algodonosa. Según la clasificación de Cooney y Emerson 1964, (tomado de Hudson 1980) esta cepa pertenece al grupo de los hongos termotolerantes.

## IV.2 Producción y crecimiento.

El medio seleccionado para el crecimiento del *Aspergillus sp* MGM-470 y la producción de las enzimas fue el medio c), utilizando extracto de levadura y bajo agitación recíproca. En estas condiciones se obtuvo la mejor producción de actividad xilanolítica.

Para observar el efecto de la temperatura en el crecimiento y producción de xilanasas se eligieron dos temperaturas de trabajo, 37°C una temperatura alta, tomando en cuenta que el óptimo de crecimiento de la mayoría de los hongos está entre 20° y 30°C, que, sin embargo para esta cepa no representó ninguna limitante para su crecimiento y desarrollo. Y 45°C que representó una condición poco favorable para el hongo, ya que su crecimiento se vio seriamente afectado.

El crecimiento de *Aspergillus sp* MGM-470 fue diferente en las dos temperaturas. A 37°C el hongo presentó crecimiento desde las primeras horas, pero a 45°C se presentó al principio una larga fase lag, retardando el crecimiento hasta las 48h. Siendo aproximadamente diez veces menor que el presentado a 37°C (fig.10). El crecimiento del microorganismo comenzó a descender hacia las 96h a 37°C. En el caso de 45°C se presentó un ligero incremento. Este hecho confirma la condición termotolerante de *Aspergillus sp* MGM-470, ya que en el caso de ser termófilo se esperaría presentara mejor crecimiento a temperaturas más altas.

Aparentemente la temperatura alta retardó la germinación de las esporas y el crecimiento, pero después de 48h la producción enzimática aumentó en gran medida en respuesta a la elevada temperatura, en comparación con el comportamiento del microorganismo a 37°C, temperatura que no constituye un factor limitante para el hongo. En términos generales toda la cinética de crecimiento sufre un retraso que obedece a un período de adaptación del hongo a las condiciones adversas.

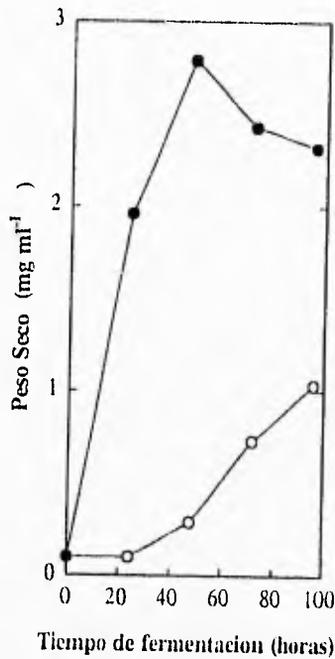


Fig. 13. Crecimiento de *Aspergillus* sp MGM-470 a 37° (●) y 45°C (○).

Tres patrones de producción de biomasa han sido registrados en cepas de hongos termófilos (Satyanarayana et al 1992). En el primero la fase lag fue bastante más larga y gradualmente, el microorganismo entró en la fase log de crecimiento. Consecuentemente, la producción de micelio fue lenta y la autólisis no ocurrió hasta el quinto día de incubación. El segundo patrón consistió en extendidas fases lag y los con un agudo pico de producción de micelio entre los días 9 y 12. En el tercero, las fases lag y log estuvieron juntas, y combinadas no excedieron los tres días, un decremento en la producción de micelio comenzó después de los seis días. Como resultado se presentó un pico agudo en el peso seco producido, seguido de una disminución significativa en el mismo. Una disminución abrupta en la producción de biomasa fue reportada en *Humicola lanuginosa* por arriba de su temperatura óptima la cual también afectó el período lag y la tasa de crecimiento (Emerson 1968, citado por Satyanarayana). El comportamiento de *Aspergillus* sp-MGM 470 creciendo a 45°C fue muy parecido al primer caso, entrando en una fase lag larga y presentando una tasa de producción de biomasa lenta en comparación al crecimiento presentado a 37°C; como respuesta a las nuevas condiciones ambientales (cambio de temperatura).

Este retraso en el crecimiento quizá se puede deber a que el hongo no está produciendo todas las enzimas necesarias para una degradación rápida del sustrato y por tanto de la germinación de las esporas y el crecimiento. Otra posible causa es que si se produzcan tales enzimas pero sean lábiles a la temperatura de cultivo. La actividad de agua ( $A_w$ ), también puede ser modificada por cambios en la temperatura provocando una disminución de aquella. La disminución de la  $A_w$ , puede ocasionar retraso en la germinación, una prolongación en la fase lag (periodo en que el microorganismo no crece) y en la tasa de elongación del tubo germinal (26). En el trabajos previos en nuestro laboratorio se observó que este comportamiento de crecimiento de *Aspergillus sp* MGM-470 es similar para diversas fuentes de carbono como glucosa y almidón cuando crece a 45°C, lo que confirma el efecto de la temperatura sobre el crecimiento.

Por otra parte, cuando la actividad xilanolítica fue evaluada, se encontró que en las primeras 48 horas fue mayor para las enzimas producidas a 37°C respecto a las de 45°C, pero hacia las 72h el comportamiento cambió. Las enzimas de 37°C presentaron descenso en la actividad mientras que para el otro sistema ésta fue aumentando, siendo ligeramente mayor (0.8 veces) a las 72h. A las 96h seguía descendiendo para el sistema producido a 37°C y a 45°C alcanzó una actividad de 40U/ml, más del doble de la actividad producida por el otro sistema. Estos resultados se reflejaron en la actividad específica. (fig.14 y 15).

Este comportamiento también se ha observado en otras cepas de *Aspergillus* y otras condiciones extremas de pH. Aguilar et al (1) reportaron que la cepa *Aspergillus sp* CH-Y-1043, creciendo en pectina, producía mayor actividad específica en un medio con pH inicial de 3.5, alrededor de 2.5 U/mg PS; en comparación con 0.15 U/mg PS valor que se alcanzó con pHs menos ácidos de 4.5 y 5.2.

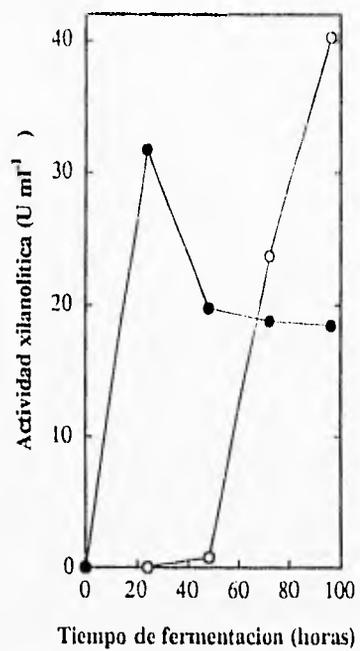


Fig.14. Actividad xilanolítica producida por las enzimas producidas a 37° (●) y 45°(○)

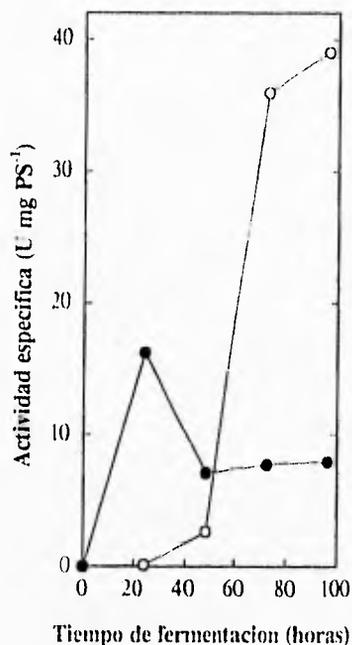


Fig. 15. Actividad específica de los sistemas xilanolíticos producidos a 37°C (●) y 45°C (○).

#### IV.2.1. Actividad celulolítica.

Se evaluó la presencia de enzimas celulolíticas en los filtrados producidos y se obtuvieron valores de actividad en U/ml de 2.3, para el filtrado producido a 37°C y 1.7 para el de 45°C que, comparados con los encontrados para xilanasas son del orden de 8 y 13 veces menos. Estos valores son despreciables comparados con los producidos por cepas celulolíticas. Por otra parte, caen en el intervalo de error permitido para la técnica de determinación utilizada.

Esta casi nula actividad celulolítica detectada es debido a que, al igual que las xilanasas, las celulasas son enzimas inducibles y/o reprimidas por sustrato, de tal manera que necesitan el sustrato adecuado para ser producidas.

Los resultados de nuestros experimentos son similares a otros reportados para diferentes microorganismos. Mitsuishi, et al. 1987, encontraron que la cepa Y-94, un hongo mesófilo, produce celulasas cuando se utilizó celulosa y otras fuentes de carbono como sustrato, sin embargo, disminuyó o desapareció esta producción

en presencia de xilano como fuente de carbono. Gomes et al 1994, por su parte, encontraron que la actividad xilanolítica de las enzimas producidas por *Thermoascus aurantiacus*; caía de 162.36 (nkat ml/1) a 4.00 (nkat ml/1) cuando se utilizaron como sustratos xilanos de abedul y celulosa, respectivamente. En nuestro laboratorio se realizaron otros estudios sobre medios de producción de xilanasa para la cepa MGM-470 y se obtuvieron los mismos resultados que en el presente trabajo. Se probó el crecimiento utilizando sustratos ricos en celulosa como fuentes de carbono y la actividad celulolítica presentada es muy similar a la anteriormente descrita. Los sustratos probados fueron carboximetilcelulosa y olate de maíz. La actividad celulolítica producida por esta cepa es muy limitada aún creciendo en sustratos celulósicos.

### VI.3. pH y temperatura óptimos.

Se determinó el pH óptimo de actividad xilanolítica para los dos sistemas producidos. El intervalo de pH fue de 2.74 hasta 8.8. Para las enzimas producidas a 37°C la actividad a pH 2.7 fue del 32% de la máxima alcanzada, pero aumentó hasta un 73% a un pH de 3.4 que sigue siendo considerablemente ácido. El máximo valor de actividad se alcanzó a un pH de 6.2, y una disminución en este valor se produjo a pHs más alcalinos llegando al 8.5% de actividad producida a pH de 8.8. Por lo que se refiere al filtrado producido a 45°C los resultados fueron similares a pHs extremos, siendo la actividad xilanolítica 17.3% y 5.4% de la actividad más alta a pH 2.7 y 8.8 respectivamente (fig 13).

El intervalo de temperatura para evaluar la máxima actividad enzimática fue de 30°C hasta ebullición. A 80°C las xilanasas producidas a 37°C presentaron la actividad más elevada, a 60°C y 65°C las enzimas retuvieron más de un 80% de actividad, a temperaturas superiores a 80°C las enzimas perdieron alrededor de 70% de actividad y en ebullición se retuvo casi el 12% de actividad xilanolítica. La temperatura óptima del sistema xilanolítico producido a 45°C fue de 50°C, pero un 97.3% de actividad fue retenida a 65°C y a 70°C se conservó el 90%. A partir de 75°C la actividad disminuye llegando a un 6.8% en ebullición.

Es importante destacar la resistencia de las enzimas a tan altas temperaturas, característica que se podría utilizar en procesos industriales.

El comportamiento de los sistemas xilanolíticos es diferente, como lo indican los valores de actividad obtenidos en ambos casos. Esto responde a que están actuando más de una enzima. El sistema xilanolítico producido es muy complejo, esta constituido por numerosas enzimas, particularmente en el caso del sistema producido a 37°C. Otra causa probable de este comportamiento es que muchas enzimas xilanolíticas (al igual que otras enzimas), presentan reacciones de transglucosilación.

Es importante recordar que no existe un valor óptimo para la temperatura, sino un intervalo en el cual la actividad enzimática es la mejor, y en el cual no hay desnaturalización enzimática por calor.

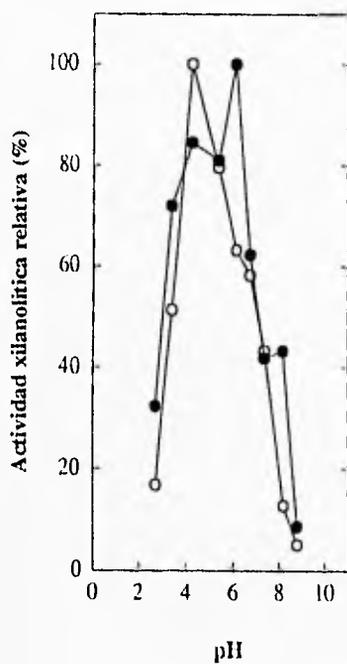


Fig 16. pH óptimo registrado para los filtrados producidos a 37° (●) y 45°C (○).

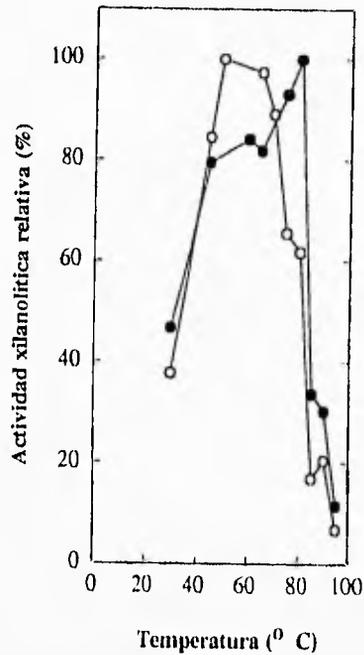


Fig 17. Temperatura óptima de los sistemas xilanólíticos producidos a 37° ( — ) y 45°C ( --- ).

#### VI.4. Estabilidad a pH y temperatura.

En cuanto a la estabilidad a pH, ambos sistemas presentaron un amplio intervalo de estabilidad desde 2.7 hasta 10.5. Valores de pH por arriba o debajo de este intervalo ocasionaron una rápida caída en la actividad.

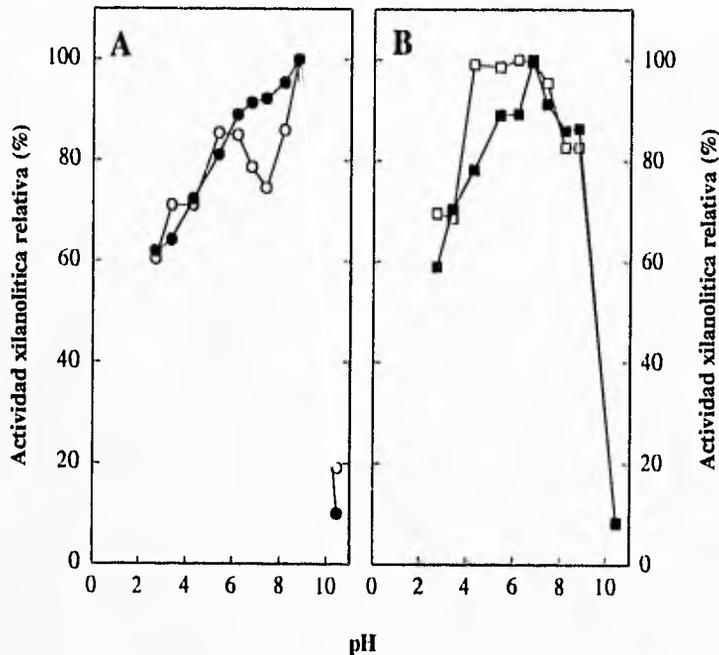
Cuando la mezcla de reacción fue incubada a temperatura ambiente, los dos grupos de enzimas perdieron 30-40% de actividad a pH 2.7. Pero de pH 4 a 7.5 las enzimas generadas a 45°C fueron muy estables, mientras que, las producidas a

37°C perdieron alrededor de 15%. Por el contrario, a pH 8.0 cuando las enzimas producidas a 37°C retuvieron el 100% de actividad el otro sistema perdió cerca del 15%. No obstante, cuando el ensayo de pH fue realizado a 4°C, ambos sistemas mostraron comportamientos similares, excepto en el máximo valor de actividad que fue de 8.8 para las enzimas producidas a 37°C y 6.2 para las generadas a 45°C.

La termoestabilidad fue probada con y sin sustrato desde 20°C hasta ebullición, obteniéndose mayor estabilidad cuando se realizó el ensayo en presencia de sustrato.

En ausencia de sustrato la mayor estabilidad se encontró a 40°C para ambos filtrados. El 79.5% se retuvo a 20°C y el 51.5% a 50°C en el sistema de 37°C, hacia los 70°C la actividad tan solo conservó e. 3.6%. Las enzimas de 45°C fueron menos estables perdiendo más del 50% de actividad a 20° y más del 70% a 50°C, mientras que a 70°C sólo retuvieron el 3.4%, al igual que en el otro sistema.

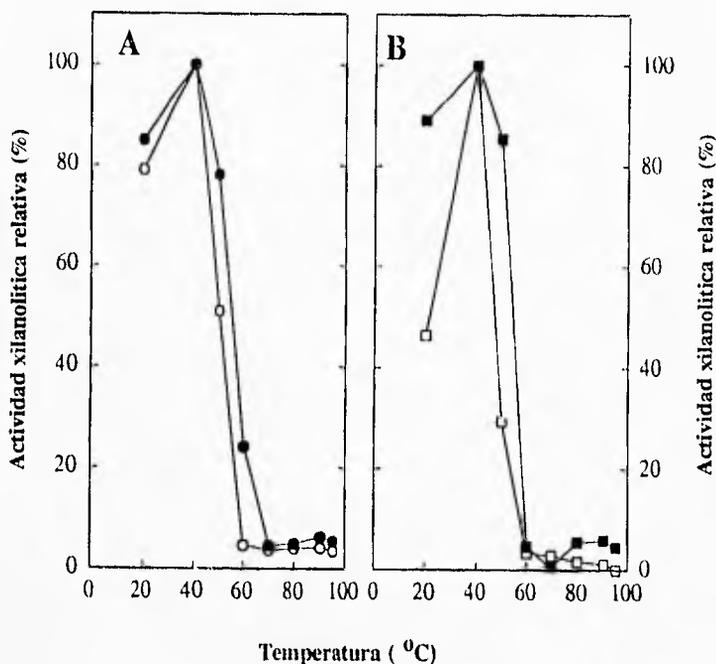
Cuando se evaluó la estabilidad en presencia de sustrato (xilanos de abedul), la estabilidad aumentó considerablemente. A 20°C se conservó entre el 84% y 90% de actividad xilanolítica, y entre el 78% y 86% a 50°C para las enzimas de 37° y 45°C respectivamente. Se evaluó también la estabilidad arriba de los 70°C, conservándose hasta el 5% de actividad aún después de someterse a ebullición. Lo que indica el papel estabilizador que juega el sustrato en el complejo enzima-sustrato. Existen numerosos trabajos que confirman el hecho de que el sustrato actúa protegiendo el sitio catalítico de la enzima.



**Fig. 18.** Esta figura muestra la estabilidad al pH del sistema xilanolítico producido A) a 37°C cuando el ensayo se llevo a cabo a 4°C (●) y a temperatura ambiente (○). B) El sistema producido a 45°C también fue evaluado en las mismas condiciones a 4°C (■) ya temperatura ambiente(□).

El efecto estabilizador del sustrato se debe a la unión de éste a la enzima ayudando a conservar la estructura terciaria de la proteína y por tanto su actividad. Gomes et al, encontraron que la termoestabilidad de las xilanasas de *T. aurantiacus* a 75°C, varía considerablemente con respecto a la naturaleza del sustrato en el cual las enzimas se producen. Estos resultados indican que, no solo el sustrato, sino también la naturaleza del mismo estabiliza las enzimas contra la inactivación térmica. Por otro lado, las cantidades de proteasas producidas en los diferentes sustratos quizá también tienen influencia en la estabilidad enzimática. En el caso de *Aspergillus* MGM-470 el medio de cultivo en que fue crecido era muy sencillo, y el xilano de abedul la única fuente de carbono. Es posible que usando un medio de cultivo diferente se incremente la termoestabilidad de las enzimas.

Por otra parte, si bien la actividad residual después de hervir es baja, se debe hacer notar que muy pocas proteínas resisten tratamientos de esa naturaleza. Además el intervalo en que son estables es amplio otorgando grandes posibilidades de utilización.



**Fig 19.** Estabilidad a temperatura de ambos sistemas enzimáticos . Comparación del comportamiento de las enzimas cuando el ensayo se realizó en presencia y ausencia de sustrato. A) Enzimas generadas a 37° con sustrato (●), sin sustrato (○). B) Enzimas generadas a 45°C con sustrato (■), sin sustrato (□).

#### IV.4.1 Determinación de la vida media.

Se determinó la vida media de los sistemas, encontrándose que es de 28 minutos a 50°C para el grupo de enzimas producido a 37°C, mientras que para las generadas a 45°C es de 15 minutos a la misma temperatura.

#### IV.5. Efecto de los iones sobre la actividad.

Fue probado el efecto de algunos iones sobre la actividad xilanolítica. Las xilanasas no requieren ningún ion específico para su actividad, pero la presencia de algunos iones en una concentración de (0.1M) 100mM incrementa la actividad. Una ligera estimulación se presentó en la actividad del filtrado de 37°C con Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> y K<sup>+</sup>. Mientras que el efecto opuesto se obtuvo con Cu<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>. Para el filtrado de 45°C el Na<sup>+</sup>, el Cl<sup>-</sup>, el Mg<sup>++</sup> y el Zn<sup>++</sup> presentaron una ligera estimulación sobre la actividad enzimática. Ningún ion produjo efecto inhibitorio para las enzimas obtenidas a esta temperatura. (Tabla 8).

Tabla 8. Efecto de iones sobre la actividad xilanolítica.

Ion adicionado	% de actividad	
	37°C*	45°C*
Control (ningún ion adicionado)	100	100
Na <sup>+</sup>	134	127
Cl <sup>-</sup>	114	131
K <sup>+</sup>	113	103
Cu <sup>++</sup>	91	102
Mg <sup>++</sup>	145	143
Zn <sup>++</sup>	101	110

\*Temperatura de producción de los sistemas xilanolíticos evaluados.

Estos resultados concuerdan con los encontrados por Gosh et al (15), quien menciona que una xilanasas producida por *Aspergillus sydowii* MG-49 no requiere ningún ion para su actividad, no obstante, ciertos cationes como Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup> y Zn<sup>++</sup>, presentes en la mezcla de reacción en trazas incrementa la estabilidad o la resistencia de la unión enzima-sustrato mediante interacción

electrostática. En cuanto a la  $\beta$ -xilosidasa producida por este mismo hongo, presentó un marcado incremento en presencia de  $\text{Co}^{++}$ . La presencia de  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^{++}$  y  $\text{Fe}^{+++}$ , provocaron la disminución de la actividad de las dos enzimas, lo que indica que los grupos sulfidrilos quizá estén relacionados con el sitio catalítico de la enzima.

En el caso de los resultados obtenidos para *Aspergillus* MGM-470, es importante recordar que se trata de sistemas enzimáticos complejos, es decir, de grupos de enzimas y no enzimas purificadas, no obstante, la diferencia en el comportamiento de las enzimas en presencia de los diferentes iones puede deberse a que se producen diferentes tipos de enzimas a  $37^\circ\text{C}$  y  $45^\circ\text{C}$  o a que existe algún cambio en la estructura o sitio catalítico de alguna o algunas enzimas, lo que modifica también su comportamiento en presencia de determinado ion.

#### IV.6. Caracterización electroforética.

El análisis electroforético mostró que existen algunas diferencias entre las proteínas de ambos sistemas xilanolíticos (fig 17).

A  $37^\circ\text{C}$  *Aspergillus* MGM-470 produjo un mayor número de proteínas extracelulares respecto al número producido a  $45^\circ\text{C}$ . Algunas de estas enzimas fueron identificadas en los geles de electroforesis. Los pesos moleculares de estas enzimas están entre 16 y 70 kDa como se muestra en la tabla 8. De estas, las más importantes fueron las bandas de masa molecular de 16, 18, 22, 35, 40 y 48 se produjeron en ambas temperaturas.

La técnica de actividad in situ, reveló actividad xilanolítica para las bandas abajo de 27 KDa (4 bandas) y por arriba de las bandas entre 34 y 70KDa para el sistema xilanolítico producido a  $37^\circ\text{C}$ . El zimograma obtenido del gel de las proteínas producidas a  $45^\circ\text{C}$  mostró que sólo presentaban actividad las bandas de 16, 18 y 22, y bandas en el intervalo de 43 a 60 KDa.

Es interesante notar que las bandas de masa molecular de 16, 18 y 22 KDa fueron sobreproducidas a  $45^\circ\text{C}$  respecto a la cantidad total de proteína en el gel, y en relación a la concentración de proteínas producidas a  $37^\circ\text{C}$ .

La presencia de estas xilanasas en los geles en ambas temperaturas, particularmente las de 16, 18 y 22 KDa sugiere que las xilanasas de bajo peso molecular son enzimas clave, esenciales para la hidrólisis del xilano y el crecimiento del hongo en este polisacárido. Mientras que, las otras xilanasas (aquellas que solo aparecen en el filtrado de  $37^\circ\text{C}$ ) quizá tengan funciones que no las requieran en grandes cantidades (ej. hidrólisis de uniones que no aparecen con frecuencia), tomando en cuenta que el sustrato es un heteropolisacárido muy complejo con múltiples ramificaciones.

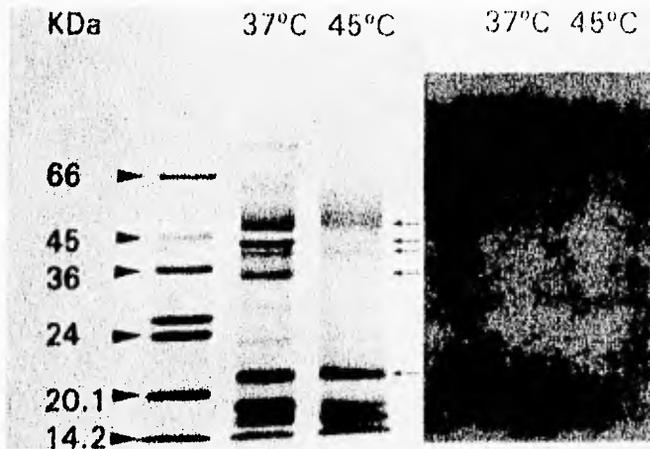


Fig. 20 SDS-Page de proteínas producidas por *Aspergillus* MGM-470 creciendo en xilanos de abedul (1%), después de incubar 72h a 37° y 45°C; y zimograma que muestra los halos de hidrólisis producidos por las bandas proteicas que presentan actividad xilanolitica.

Estas diferencias entre ambos sistemas sugieren que las condiciones de agobio por temperatura afectan la producción de enzimas.

El efecto inhibitorio de la temperatura sobre la síntesis proteica ha sido observado para otras enzimas. Gomes et al (1994) encontraron que la síntesis de xilanasas de *Thermoascus aurantiacus* estuvo profundamente influida por la temperatura de cultivo. El hongo sintetizó el más alto nivel de xilanasas entre 45° y 50°C. El nivel de enzima sintetizada descendió drásticamente cuando el organismo fue cultivado a 55°C o por arriba de esta temperatura, y a 37°C o por debajo. No obstante, los mismos autores reportaron posteriormente que a diferentes

temperaturas de crecimiento 45-55°C no hubo cambio en la termoestabilidad enzimática a 75°C. Esto sugirió que las xilanasas producidas por *T. aurantiacus* a varias temperaturas de crecimiento son iguales. *Aspergillus* MGM-470 produce seis xilanasas con los mismos pesos moleculares (aparentemente iguales) a 37° y 45°C, pero a 45°C la concentración proteica es mayor, resultado que confirma, en parte, lo observado por Gomes y sus colaboradores. Sin embargo, otras xilanasas son producidas a 37°C y a 45°C que difieren en sus pesos moleculares (véase Tabla 9). Por otra parte, la estabilidad y valores óptimos de actividad a pH y temperatura son diferentes para ambos sistemas, así como el efecto de iones en la actividad y la Vmax. Lo que confirma que sí existen diferencias entre las xilanasas producidas bajo diferentes temperaturas.

Este resultado concuerda con el de varios autores. Mathrani y Ahring en 1992, (citado por Gomes), encontraron que las xilanasas producidas por *Dictioglomum* sp. a altas temperaturas 78°C fueron relativamente más activas en altas temperaturas que aquellas producidas a una temperatura más baja (68°C). Bailey, por su parte, reporta que la producción de una poligalacturonasa de *A. niger* es dependiente de la temperatura. Se llevó a cabo una serie de fermentaciones a diferentes temperaturas 15°, 18°, 21° y 30°C, siendo la producción a 18°C muy superior respecto a las otras temperaturas. Y Crisan en 1969m (citado por Satyanarayana) observó que *Penicillium dupontii* producía un gran número de proteínas termoestables a temperaturas de incubación altas, de las cuales, una mostró una relación directa entre la cantidad de proteína producida y la termoestabilidad al incrementar las temperaturas de crecimiento.

Los cambios fisiológicos de *Aspergillus* MGM-470 inducidos por el agobio térmico todavía no están claros, pero es posible que bajo estas condiciones el microorganismo sinteticen un reducido número de proteínas, pero probablemente las que son vitales para su desarrollo. Por otra parte, es posible que los patrones de secreción hayan sido afectados bajo el agobio térmico. Algunas proteínas también pudieron ser producidas en bajas concentraciones debido a las condiciones de cultivo, alternativamente las xilanasas principales quizá fueron sobreproducidas bajo las mismas condiciones. Es importante tomar en cuenta que el crecimiento y la secreción de proteína con frecuencia presentan diferentes temperaturas óptimas.

#### IV.7. Determinación de los productos de hidrólisis.

El análisis de carbohidratos hecho por cromatografía en capa fina (TLC). Mostró que los principales productos de hidrólisis son xilosa, xilobiosa y algunos xilooligosacáridos. No se encontraron diferencias significativas en los productos generados por ambos sistemas.

Por otra parte, para tiempos de digestión largos fueron detectadas reacciones de transglicosilación. Ya que durante los primeros minutos de hidrólisis fueron detectados xilotriosa, xilobiosa y xilosa como productos principales, pero conforme avanzó la hidrólisis se detectó un aumento en la producción de xilooligómeros.

Tabla 9. Pesos moleculares de las enzimas xilanolíticas encontradas en los filtrados producidos a 37° y 45°C.

Temperatura de producción	
37°C	45°
PM KDa	
66.1	60.26
63.1	56.2
52.5	50.1
47.8	47.8
43.6	40.0
40.0	35.0
35.0	21.8
27.5	17.8
23.4	16.2
21.8	
17.8	
16.2	

Estas enzimas fueron identificadas por la técnica de actividad "in situ".

Este tipo de reacciones no son raras en los sistemas xilanolíticos. Vrsanská et al en 1982 (citado por Bastawde) reportaron una endoxilanasas ácida de *Aspergillus niger* que tiene la capacidad de resintetizar grandes xilooligosacáridos a partir de xilobiosa y xilosa, los cuales son después degradados a xilobiosa y xilotriosa. John et al (1982), aisló dos xilanasas de *Trichoderma lignorum*. Ellos encontraron que la xilanasas II, presentaba actividad transglicosídica, produciendo oligosacáridos más largos que los sustratos usados, mientras que la xilanasas I producía xilosa, xilobiosa, arabinoxilotetraosa y arabinoxilopentosa como productos principales (Bastawde). También entre las levaduras existe este fenómeno, *C. albidus* produjo una endoxilanasas que presenta reacciones de transglicosilación,

donde la transferencia de un grupo glicosil toma lugar de un sustrato a otro (Bastawde). Y para bacterias, Nakanishi et al, purificaron una endoxilanasas de *Cryptococcus flavus*, que posee actividad transxilosídica.

#### IV.8. Determinación de Vmax y km aparentes.

Los valores cinéticos aparentes fueron determinados para ambos sistemas. La afinidad por el sustrato (Km) fue similar para ambos, siendo 0.172 mg de xilano/ml, y 0.177 mg xilano/ml para las enzimas producidas a 37°C y 45°C. Pero el valor de Vmax es dos veces más alto para las xilanasas producidas a 37°C ( $1.96 \times 10^{-2}$  umol/ml/min), que aquella encontrada para el otro sistema ( $0.986 \times 10^{-2}$  umol/ml/min). Quizá debido al mayor número de enzimas encontradas a 37°C en comparación con las producidas a 45°C.

El análisis de las constantes cinéticas en este caso, se llevó a cabo con fines comparativos. La obtención de un dato numérico que describe la afinidad al sustrato del sistema xilanolítico que produce *Aspergillus sp* MGM-470, y cual es su velocidad de reacción cuando es producido a diferentes temperaturas, nos otorga otra evidencia de que existen diferencias significativas en el complejo enzimático producido a 37°C respecto al que se produce a 45°C.

Todos estos resultados indican que creciendo a 37°C *Aspergillus* MGM-470 producen un sistema xilanolítico más complejo, más estable a pH alcalino y similar a altas temperaturas que el sistema producido a 45°C. Aparentemente las xilanasas de 37°C, debido a que se encuentran en mayor concentración y número, tienen mayor capacidad de llevar a cabo un a hidrólisis más completa del sustrato.

El sistema xilanolítico producido por *Aspergillus* MGM-470 presenta estabilidad en un amplio intervalo, tanto de pH así como de temperatura, la cual se ve incrementada en presencia de sustrato. Esta característica puede ser útil para algunos procesos industriales, particularmente en el de biopulpeo y bioblanqueo, tomando en cuenta que la actividad celulolítica es prácticamente nula, factor que resulta de vital importancia para este proceso. Además por las características de esta cepa es muy probable que utilizando otros sustrato se pueda incrementar la termoestabilidad y la producción de xilanasas.

## V. CONCLUSIONES.

-Tanto la cepa seleccionada *Aspergillus* MGM-470 como las cepas MGM-370, MGM-380, MGM-420 y MGM-450 son microorganismos termotolerantes y producen enzimas xilanolíticas extracelulares.

-El agobio por temperatura provoca que el microorganismo *Aspergillus* MGM-470 retrase su crecimiento entrando en una fase lag más larga, diferente a la presentada a temperaturas que no representan un factor limitante., como consecuencia a la adaptación a las nuevas condiciones ambientales.

-Cuando este microorganismo crece en altas temperaturas, se producen proteínas que difieren en cantidad y tipo a las producidas creciendo en condiciones normales.

-Las xilanasas producidas por *Aspergillus* MGM-470 son estables en un amplio intervalo de pH y temperatura, no obstante las producidas a 37°C son más estables en ambos parámetros que las obtenidas a 45°C.

-La estabilidad de las enzimas se incrementa en presencia de sustrato. Sugiriendo que el sitio activo de estas enzimas es protegido por el sustrato, incrementando su estabilidad cuando son incubadas a elevadas temperaturas.

-El sistema xilanolítico que produce el hongo a 37°C no es el mismo que el producido a 45°C, ya que ambos presentan diferencias en valores óptimos y de estabilidad en temperatura y pH. Su comportamiento cinético también cambia, así como su sensibilidad a iones y vida media. Además el patrón de bandas encontrado en el análisis electroforético también indica diferencia entre las proteínas producidas en ambos casos.

-El sistema xilanolítico producido a 37°C, en comparación con el generado a 45°C es más complejo, constituido por un mayor número de xilanasas. Lo que le puede permitir realizar una hidrólisis del sustrato más eficiente.

-La temperatura provoca una disminución de las xilanasas producidas a 45°C, pero estimula la sobreproducción de, al menos, un tipo de xilanasas, que también es producida a 37°C. Esto sugiere que dichas xilanasas son indispensables para la hidrólisis del sustrato y, por ende, para el crecimiento del microorganismo.

Por lo anterior, se puede decir que, el efecto de la temperatura provoca una disminución en el número de proteínas del sistema xilanolítico de *Aspergillus* MGM-470, así como en su eficiencia.

## **VI. Apendice**

## DETERMINACION DE LOS VALORES CINETICOS Km y Vmax.

Concentracion de sustrato		Actividad xilanolitica mg / ml min-1			
S	1/S	37°	45°	1/37	1/45
0.125	8	0.1278	0.0601	7.8220	16.6389
0.250	4	0.1582	0.0898	6.3224	11.1317
0.50	2	0.2153	0.1217	4.6446	8.2191
0.75	1.3	0.2472	0.1262	4.0458	7.9239
1.00	1.0	0.2692	0.1172	3.7152	8.5324
1.25	0.8	0.2602	0.1180	3.8436	8.4721

\* Temperatura de produccion de los filtrados en grados Celcius.

Se graficaron los valores de  $1/S$  contra los inversos de las actividades, mediante regresion lineal se obtuvieron los sig. resultados.

Para el sistema xilanolitico producido a 37 grados:

- a) 3.398 =  $1/V_{max}$
- b) 0.5851 = m (pendiente)
- c) -5.81 = -1/km
- r) 0.9816

Por lo tanto :

$$V_{max} = 0.2943 \text{ mg/ml min}^{-1}$$

convirtiendo a moles:  
 $150.10\text{g} = 1 \text{ mol de xilosa}$   
 $0.000293 = 1.96 \times 10^{-6} \text{ moles}$   
 $V_{max} = 1.98 \times 10^{-2} \mu\text{mol} / \text{ml min}^{-1}$

$$k_m = 0.172 \text{ mg xilano} / \text{ml}$$

Para el sistema xilanolitico producido a 45 grados

- a) 6.750 =  $1/V_{max}$
- b) 1.193 = m (pendiente)
- c) -5.65 = -1/km
- r) 0.9806

$$V_{max} = 0.1481 \text{ mg} / \text{ml min}^{-1}$$

convirtiendo a moles :  
 $150.10\text{g} = 1 \text{ mol de xilosa}$   
 $0.0001481 = 0.986 \times 10^{-6} \text{ moles}$   
 $V_{max} = 0.986 \times 10^{-2} \mu\text{mol} / \text{ml min}^{-1}$

$$k_m = 0.177 \text{ mg xilano} / \text{ml}$$

## VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar, G. et al. 1991. Influence of pH on endo and exo-pectinase production by *Aspergillus* sp. Ch-Y-1043. *Can. J. Microbiol.* Vol 37:912-917.
2. Alexopoulos, John. 1979. *Introducción a la Micología*. Editorial Universitaria de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina 663 p.
3. AMANO. Technical Bulletin. AMANO, International Enzyme Co.
4. Bailey, M. 1990. Effect of temperature on polygalacturonase production by *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb Technol.* Vol. 12:622-625.
5. Bajpai, P.; N.K. Bhardway, P.K. Bajpai, M. B. Jauhari. 1994. The impact of xylanases on bleaching of eucalyptus kraft pulp. *Journal of Biotechnology* 38:1-6.
6. Bastawde, K. B. 1992. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol 8.
7. Bearce, C. D. 1979. *Obtención de Pasta Mecánica, en Ciencia y Tecnología Sobre Pulpa y Papel*. Editado por C. Earl Libby. Cía Editorial Continental, S.A. México.
8. Bedford, M. R. and H. C. Classen. 1991. The influence of dietary xylanase in intestinal viscosity and molecular weight distribution of carbohydrates in rye-fed broiler chicks. In *Xylans and Xylanases, International Symposium*. Wageningen; The Netherlands.
9. Blély, P.; Mislovicová D. and Toman R. 1985. Soluble Chromogenic substrates fore the assay of endo-1,4- $\beta$ -xylanases and endo-1,4- $\beta$ -glucanases. *Analytical Biochemistry* 144:142-146.
10. Ericsson, E. O., et al. 1979. *Obtención de Pulpas al Sulfito, en Ciencia y Tecnología Sobre Pulpa y Papel*. Editado por C. Earl Libby. Cía Editorial Mexicana, S. A. México.
11. Fogarty, W. M. 1994. Chapter 7 Enzymes of the Genus *Aspergillus*, en *Biotechnology Handbooks Vol 7. Aspergillus*. Editado por J. E. Smith. Plenum Press, N. York.
12. Ganju et al. 1989. Purificataion and characterrization of two xylanasas from *Chaetomium thermophile* var *coprophile*. *Can. J. Microbiol.* Vol 35: 826-842.
13. Gomes, D. J.; Gomes, J. and W. Steiner. 1994. Factors influenciang the induction of endo-xylanase by *Thermoascus aurantiacus*. *Journal of Biotechnology* 33: 87-94.

14. Gomes, D J.; Gomes, J. and W. Steiner. 1994. Production of highly thermostable xylanase by a wild strain of thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* and partial characterization of the enzyme. *Journal of Biotechnology* 37: 11-22.
15. Gosh, M, et al. 1993. *Aspergillus sydowii* MG49 is a strong producer of thermostable xylanolytic enzymes. *Enzyme Microb Technol.* Vol 15 August 703-709.
16. Graham, H and J. Ingorr. 1991. Application of xylanase-based enzymes in commercial pig and poultry production. In *Xylans and Xylanases*. International Symposium. Wageningen, The Netherlands.
17. Grajek, J. 1987. Production of xylanases by thermophilic fungi using different methods of culture. *Biotechnology Letters*. Vol 9 No. 5.
18. Haltrich, D. and W. Steiner. 1994. Formation of xylanase by *Schizophyllum commune*. Effect of medium components. *Enzyme Microb. Technol.*, Vol 16: 229-235.
19. Herrera, T. y M. Ulloa. 1990. *El Reino de los Hongos. Micología básica y aplicada*. UNAM-FCE. México, D.F.
20. Hudson, J. H. 1980. *Fungal Saprophytism*. Edward Arnold (Publishers) Limited. London.
21. Jeffries, T. W. 1983. Utilization of xylose by Bacteria, Yeast and Fungi, en *Advances in biotechnology. Pentoses and Lignin*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio.. 2-28 pp.
22. Jeffries, T. W. et al. 1994. Comparison of enzyme enhanced with conventional deinking of xerographic and laser-printed paper. *Tappi Journal*. Vol 77. No. 4.
23. Kelly, R. M. and S. H. Brown. 1993. Enzymes from high-temperature microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology* 4: 188-192.
24. Kirk, Kent T. 1983. Chapter 11. Degradation and Conversion of Lignocelluloses. en *The Filamentous Fungi. Volume IV. Fungal Technology*. Editado por J.E. Smith, D. R. Berry y B. Kristiansen. Edward Arnold (Publishers).
25. Kitpreechavanich, V. et al. 1984. Production of xylan degrading enzymes by thermophilic fungi, *Aspergillus fumigatus* and *Humicola lanuginosa*. *J. Ferment. Technol.* 62:63-69.
26. Kozakiewicz, Z and D. Smith. 1994. Chapter 2. Physiology of *Aspergillus*, en *Biotechnology Handbooks, Vol 7 Aspergillus*. Editado por J. E. Smith. Penum Press, N. York.
27. Kristjansson, Jakob K. 1989. Thermophilic organisms as sources of thermostable enzymes. *TIBTECH*. Vol 7.

28. Kormelink, F. J. M. and A. G. J. Voragen. 1993. Degradation of different (glucurono-arabion)xylans by a combination of purified xylan-degrading enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol* 38: 688-695.
29. Laemmli, U. K. et al. 1970. Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227:680-685.
30. Lowry, O. H. et al. 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
31. Maheshwari, R. and P. T. Kamalam. 1985. Isolation and Culture of a Thermophilic Fungus, *Melanocarpus albomyces*, and factors influencing the production and activity of xylanase. *Journal of General Microbiology* 131: 3017-3027.
32. Maat, J. et al. 1991. *Aspergillus* xylanases and their application in bakery. In *Xylans and Xylanases. International Symposium. Wageningen, The Netherlands.*
33. McCarthy, A. J.; Peace E. and P. Brode. 1985. Studies on the extracellular xylanase activity of some thermophilic actinomycetes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 21: 238-244.
34. Milagres, A.M.F. and Rolf A. Prade. 1994. Production of xylanases from *Penicillium janthinellum* and its use in the recovery of cellulosic textile fibers. *Enzyme Microb. Technol.* Vol 16: 627-631.
35. Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31:426-428.
36. Mitsuishi, Y. et al. 1987. Purification and Properties of Thermostable Xylanases from Mesophilic Fungus Strain Y-94. *Agric. Biol. Chem.*, 51 (12): 3207-3213.
37. Morales, P. et al. 1993. Purification and Characterization of alkaline xylanases from *Bacillus polymixa*. *Applied and Environmental Microbiology.* May, 1376-1382.
38. Mustaers, J. H. G. M. 1991. Xylanase in breadmaking. In *Xylans and Xylanases. International Symposium. Wageningen, The Netherlands.*
39. Nakanishi, K. et al. 1984. Purification and some properties of xylanase from *Cryptococcus flavus*. *J. Ferment. Technol.* Vol. 62 No.4:361-369
40. O'Neil, F. et al. 1979. Blanqueo, en *Ciencia y Tecnología Sobre Pulpa y Papel.* Editado por C. Earl Libby. Cía Editorial Continental, S.A. México.
41. Paridon, P. A. et al. 1991. The application of fungal endoxylanase in poultry diets. In *Xylans and Xylanases. International Symposium. Wageningen, The Netherlands.*

42. Patel, B. N. and R. M. Ray. 1994. Short Note: Production and characterization of xylanase from a *Streptomyces* species grown on agricultural wastes. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. Vol 10: 599.
43. Reid, Ian D. 1991. Biological pulping in paper manufacture. *Trends in Biotechnology*, August Vol. 9: 262-265.
44. Rouau, X. and d. Moriau. 1991. Extensive degradation of wheat flour pentosans by a commercial  $\alpha$ -amylase preparation containing side activities. In *Xylans and Xylanases*. International Symposium. Wageningen, The Netherlands.
45. Rutter-Smith, L. Daniel, R. M. and H. D. Simpson. 1989. Cellulolytic and Hemicellulolytic enzymes functional above 100°C. *Enzyme Engineering XI* Ed. Douglas. Clark, Davids A. Estell. *Annals of New York Academy of Sciences*. Vol 627.
46. Satyanarayana, T. et al. 1992. Biotechnological Potential of Thermophilic Rungi, en *Handbook of Applied Mycology. Fungal Biotechnology*. Vol 4. Editado por D. K. Arora, R. P. Elander y K.G. Mukerji. Marcel Dekker Inc. USA.
47. Senior, David J. and H. Janice. 1993. Xylanase treatment for the bleaching of softwood draft pulps: the effect of chlorine dioxide substitution. *Tappi Journal*. Vol 76 No. 8.
48. Simpson, H.; Haufler, U. and R. Daniel. 1991. An extremely thermostable xylanase from the thermophilic eubacterium *Thermotoga*. *Biochem. J.* 277: 413-417.
49. Smith, John, et al. 1979 Purification and some properties of five endo-1,- $\beta$ -xylanases and a  $\beta$ -D-xylosidase produced by a strain of *A. niger*.
50. Shendye, A. and M. Rao. 1993. Molecular cloning and expression of xylanases from an alkalophilic thermophilic *Bacillus* (NLIM59) in *Bacillus subtilis* A8. *Enzyme Microb. Technol.* Vol 15:
51. Swartz, J. N. y R. C. McDonald. 1979. Obtención de Pulpas Alcalinas, en *Clencia y Tecnología Sobre Pulpa y Papel*. Editado por C. Earl Libby. Cía Editorial Continental, S. A. México.
52. Tan, Larry; Mayers, Paul and John H. Saddler. 1987. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Can. J. Microbiol.* Vol 33...
53. Tsao, G. T. and Liu-Chang Chiang. 1993. Capter 12., Cellulose and Hemicellulose Technology. In *The filamentous Fungi*. Vol IV. Fungal Technology. Editado por J. E. Smith, D. R. Berry y B. Kristiansen. Edward Arnold (Publishers).
54. Viikari, L.; Kantelinen, A; Buchert, J. and P. Jürgen. 1994. Enzymatic accessibility of xylans in lignocellulosic materials. *App. Microbiol Biotechnol.* 41: 124-129.

55. Wang, P. et al. 1991. Xylanases from *Streptomyces cynaeus* in Xilans and Xilanases. International Symposium. Wageningen, The Netherlands.

56. Wong, K; tan, L. and J. Saddler. 1988. Multiplicity of  $\beta$ -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. Microbiological Reviews Vol 52: 305-317.

57. Zimmerman, W. et al. 1988. Xylanolytic enzyme activities produced by mesophilic and thermophilic actinomycetes grown on graminaceous xylan and lignocellulose. FEMS Microbiology Letters. 55: 181-185.