



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

CAMPUS IZTACALA

FRACCIONAMIENTO DEL SISTEMA XILANOLITICO
EXTRACELULAR DE *Streptomyces* sp. CH-M-1035

BO 1308/97
Ej. 3

T E S I S

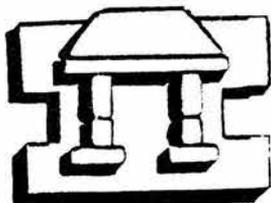
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

GABRIELA ANGELES SERRANO

DIRECTOR DE TESIS: DR. CARLOS HUITRON VARGAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS UNAM



IZTACALA

MEXICO, D. F.

1997



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA
JEFATURA DE LA CARRERA DE BIOLOGIA

Los Reyes Iztacala, a 02 de abril de 1997.

APROBACION DE TESIS

LIC. AMERICA LANDA ROMERO
JEFE DE LA UNIDAD
DE ADMINISTRACION ESCOLAR.
P R E S E N T E .

Por medio de la presente manifestamos a Ud. que como Miembros de la Comisión Dictaminadora del trabajo de Tesis del Pasante de Biología:

GABRIELA ANGELES SERRANO

titulado:

"Fraccionamiento del sistema xilopolítico extracelular
de Streptomyces sp. CH-M-1035".

para obtener el grado de Licenciatura, después de haber sido cuidadosamente revisado y realizadas las correcciones que se consideraron pertinentes, declaramos nuestra aprobación del trabajo escrito, ya que reúne las características, calidad y decoro académico del título al que aspira.

A t e n t a m e n t e
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

M. EN C. SERGIO GONZALEZ MORENO

M. EN C. ROBERTO VELASCO GARCIA

M. EN C. RAMON V. MORENO TORRES

DR. CARLOS HUITRON VARGAS

M. EN C. IGNACIO PEÑALOSA CASTRO

(Nombre completo)

Sergio González Moreno
Roberto Velasco García
Ramón V. Moreno Torres
Carlos Huitron Vargas
Ignacio Peñalosa Castro
(Firma)

Este trabajo de tesis se realizó en el Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Carlos Huitrón Vargas.

*Quien no conoce nada, no ama nada... Quien nada comprende nada sabe. Pero quien comprende también ama, observa, ve...
Cuanto mayor es el conocimiento inherente a una cosa, más grande es el amor...*

Paracelso

Dedico esta tesis con infinita gratitud y cariño a mis padres Hilda Ferrano y José Angeles y a mis hermanos Fabiola y José Carlos.

A Rosa E. Escalante, Penélope Aguilera y Minerva Arco por la amistad que compartimos y compartiremos.

A mi prima Rocío Brenda Anguiano, quien estuvo conmigo en los momentos más difíciles de mi carrera profesional.

A quien tuvo la determinación y el placer, de conocer y comprender las satisfacciones, los disgustos y las enseñanzas que recibí durante todo este tiempo.

Por todos ustedes...

Agradecimientos

Al Dr. Carlos Huitrón Vargas por su asesoría durante la realización de mi servicio social y trabajo de tesis, así como por el tiempo que dedicó y el interés que mostró, en mi formación académica.

A la Dra. Ma. Elena Flores Carrasco, por la asesoría y el apoyo que me brindó durante la realización de mi Tercera Etapa.

A Rosalba Pérez Villalba por su valiosa asistencia técnica y a Edgar L. Esparza Ibarra por su apoyo en la elaboración de figuras y diapositivas.

A Guillermina López y al Sr. Eduardo por su valiosa ayuda durante la realización de mi trabajo experimental.

A mis compañeros de laboratorio y planta piloto, por brindarme su amistad y su apoyo y porque fueron siempre mi fuente de inspiración.

A la Comisión Dictaminadora, en especial al M. en C. Roberto Velasco García y al M. en C. Ramón V. Moreno Torres por sus valiosos comentarios.

INDICE

1. INTRODUCCION1
2. ANTECEDENTES.6
2.1. <i>XILANOS.</i>	.6
2.2. <i>ENZIMAS XILANOLITICAS.</i>	.13
2.2.1. Clasificación de las xilanasas.16
2.2.2. Enzimas accesorias.18
2.3. <i>EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE LA SINTESIS DE ENZIMAS XILANOLITICAS.</i>	.20
2.4 <i>FRACCIONAMIENTO Y CARACTERIZACION DE ENZIMAS XILANOLITICAS.</i>	.22
2.5 <i>XILANASAS DE ACTINOMICETOS.</i>	.24
3. OBJETIVO GENERAL.32
3.1. <i>OBJETIVOS PARTICULARES.</i>	.32
4. MATERIALES Y METODOS.33
4.1. <i>REACTIVOS.</i>	.33
4.2. <i>MICROORGANISMO, PROPAGACION Y CONSERVACION.</i>	.33
4.3. <i>PRODUCCION DE XILANASAS EXTRACELULARES EN FERMENTADORES DE 14L.</i>	.34
4.3.1. Preparación del inóculo.34
4.3.2. Cinética de producción de xilanasas extracelulares de <i>Streptomyces</i> sp. CH-M-1035 en fermentador MICROGEN (14L).35
4.3.3. Producción de xilanasas de <i>Streptomyces</i> sp. CH-M-1035 en fermentador LABROFERM (14L)36
4.4. <i>DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS.</i>	.36
4.4.1. Actividad endoxilanolítica EC 3.2.1.8.36
4.4.2. Actividad de β -xilosidasa EC 3.2.1.37.37
4.5. <i>DETERMINACION DE PROTEINA.</i>	.38

4.6. <i>CONCENTRACION DEL FILTRADO LIBRE DE CELULAS.</i>	38
4.6.1. Precipitación con sulfato de amonio de la proteína total del filtrado xilanolítico.	38
4.6.2. Precipitación con acetona de la proteína total del filtrado xilanolítico.	39
4.6.3. Ultrafiltración del filtrado xilanolítico.	40
4.7. <i>FRACCIONAMIENTO POR CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO DE LA ACTIVIDAD ENDOXILANOLITICA DE Streptomyces sp. CH-M-1035.</i>	40
4.7.1. Preparación de las muestras para cromatografía de intercambio iónico.	40
4.7.2. Preparación de las columnas de intercambio iónico.	40
4.7.3. Cromatografías de intercambio iónico.	42
4.7.3.1. Cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-Celulosa.	42
4.7.3.2. Cromatografía de intercambio catiónico en CM-Celulosa o CM-Sephadex.	43
4.8. <i>EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD ENDOXILANOLITICA EXTRACELULAR DE Streptomyces sp. CH-M-1035.</i>	43
4.9. <i>EFECTO DEL pH Y LA TEMPERATURA SOBRE LA ESTABILIDAD DE LA ACTIVIDAD ENDOXILANOLITICA.</i>	44
4.9.1. Efecto del pH.	44
4.9.2. Efecto de la temperatura.	45
4.10. <i>EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO SOBRE LA ACTIVIDAD ENDOXILANOLITICA.</i>	45
5. RESULTADOS Y DISCUSION.	46
5.1. <i>EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD ENDOXILANOLITICA EXTRACELULAR DE Streptomyces sp. CH-M-1035.</i>	54
5.2. <i>CONCENTRACION DEL FILTRADO XILANOLITICO LIBRE DE CELULAS.</i>	60
5.2.1. Concentración de la proteína total del filtrado xilanolítico por precipitación con sulfato de amonio.	60
5.2.2. Concentración de la proteína total del filtrado xilanolítico por precipitación con acetona.	63

5.2.3. Concentración de la proteína total del filtrado xilanolítico por Ultrafiltración.	65
5.2.4. Liofilización del filtrado enzimático ultrafiltrado.	68
5.3. <i>FRACCIONAMIENTO DE LA ACTIVIDAD XILANOLITICA DE Streptomyces sp.CH-M-1035 POR CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO.</i>	71
5.4. <i>CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LOS PICOS CON ACTIVIDAD XILANOLITICA FRACCIONADOS POR CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO ANIONICO</i>	92
5.4.1. Efecto del pH sobre la actividad xilanolítica de P-I, P-II y P-III.	92
5.4.2. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la actividad xilanolítica de P-I, P-II y P-III.	97
5.4.3. Estabilidad a la temperatura de la actividad xilanolítica de los picos fraccionados.	101
5.4.4. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad xilanolítica de P-I. . . .	104
6. CONCLUSIONES.	109
7. BIBLIOGRAFIA.	110
8. APENDICES.	115

RESUMEN

Las endo-1,4- β xilanasas, EC 3.2.8.1, son el componente fundamental del sistema multienzimático cuya función es degradar los enlaces glicosídicos β -1,4 del xilano, el cual es el principal polisacárido contenido en las hemicelulosas de las plantas. Debido a la importancia biotecnológica que ha cobrado la degradación selectiva del xilano en varias aplicaciones para las industrias de fabricación de pulpas de celulosa, se han incrementado las investigaciones sobre microorganismos que poseen estos sistemas, entre los cuales se ha visto que algunos de ellos producen más de una forma molecular de este tipo de enzimas. Asimismo, por su potencial valor práctico, se ha puesto particular atención en aquellos microorganismos que se encuentran libres de actividad celulolítica, aunque se ha encontrado que son muy escasos. Recientemente, fue reportado que *Streptomyces* sp. CH-M-1035, es el tercero de los actinomicetos encontrados que produce xilanasas extracelulares, libres de actividad celulolítica, utilizando como única fuente de carbono desechos agroindustriales, los cuales en México se encuentran disponibles y en abundancia. Es por estas características que este microorganismo se ha revelado como una fuente importante de estas enzimas con potencial aplicación biotecnológica, por lo que está actualmente en estudio. En particular, en este estudio se llevó a cabo el fraccionamiento del sistema xilanolítico extracelular de *Streptomyces* sp. CH-M-1035, por cromatografía de intercambio aniónico. Para esto, las enzimas fueron obtenidas creciendo al microorganismo en xilanos de abedul como única fuente de carbono en fermentador de 14L; posteriormente el medio fue concentrado por ultrafiltración y liofilización y aplicado a una columna de DEAE-Celulosa equilibrada a pH 5.0 con buffer acetato de sodio 0.01M. El eluido de esta cromatografía mostró tres picos de actividad, los cuales presentaron diferentes propiedades de pH óptimo y de estabilidad al pH y a la temperatura. También fueron estudiadas algunas propiedades cinéticas del pico principal fraccionado, encontrando que su K_m ap. sobre xilanos de abedul fue de 1.94 mg ml^{-1} y su V_{max} fue de 80 U mg^{-1} de proteína.

1. INTRODUCCION

En la naturaleza, la principal fuente renovable que contiene mayor cantidad de polisacáridos son las paredes celulares de las plantas, las que están compuestas principalmente de: i) Celulosa, un polímero insoluble constituido de residuos de β -D-glucosa unidos por enlaces glicosídicos β -1,4; ii) Hemicelulosa, una variedad de heteropolisacáridos que incluyen glucanos, mananos, arabinanos y xilanos y iii) Lignina, polímeros complejos de naturaleza fenólica (Biely, 1993). Asimismo, estos polisacáridos están contenidos abundantemente en los desechos generados de actividades agrícolas e industriales, tales como: tala de árboles, obtención de celulosa y papel, obtención de granos, cultivo de caña de azúcar, de sorgo, de cítricos, así como en desechos de origen urbano (papel, cartón, etc.).

Particularmente en el caso de México, uno de los desechos lignocelulósicos más abundante es el bagazo de caña, ya que anualmente se producen en los ingenios más de 12 millones de toneladas, como subproducto de la extracción del azúcar. Sin embargo, actualmente sólo una pequeña porción de este material es utilizado como alimento para animales, como combustible y como materia prima para extraer celulosa; el resto (que incluye las partículas de menor tamaño denominadas "bagacillo"), es acumulado cerca de los sitios de producción, constituyendo un serio problema ambiental, a pesar de que está considerado un valioso recurso renovable potencialmente útil como materia prima en algunos procesos biotecnológicos (Moo-Young *et al*, 1979; Huitrón *et al*, 1984).

Así como otros subproductos, a nivel de laboratorio se han llevado a cabo estudios de hidrólisis química de la hemicelulosa que contiene el bagazo de caña, y se ha encontrado que tales hidrolizados pueden ser utilizados como materia cruda para la producción de proteína unicelular (Molina *et al*, 1984), xilitol (Domínguez *et al*, 1996), etanol y azúcares fermentables (Roberto *et al*, 1991; Wilke *et al*, 1981), entre otros (acetona, metano, etc.). También ha sido estudiada

la utilidad del bagazo de caña como fuente de carbono (en estado nativo o pretratado químicamente) para la producción de enzimas de interés industrial, las cuáles se obtienen mediante procesos de bioconversión llevados a cabo por los sistemas enzimáticos de los microorganismos degradadores de tales materiales (Huitrón *et al*, 1984; Patel y Ray, 1994; Stutzenberger, 1994).

En nuestro laboratorio estamos interesados en proyectos de investigación enfocados al desarrollo de procesos biotecnológicos utilizando microorganismos aislados de zonas donde se produce el bagacillo de caña; de tal forma que estos microorganismos estén adaptados para utilizarlo eficientemente como sustrato de fermentación para la producción de xilanasas y otras enzimas extracelulares de interés industrial (Huitrón *et al*, 1984).

Las xilanasas poseen potencial biotecnológico ya que tienen varias aplicaciones prácticas, principalmente en algunos procesos para el blanqueado de la pulpa de celulosa para papel, donde la utilización de estas enzimas puede llegar a reemplazar la utilización de agentes químicos dañinos; lo que implica importantes beneficios a nivel ecológico (Eriksson, 1991; Biely, 1993). Cabe mencionar además, que con el fin de preservar las propiedades de las fibras de celulosa, tales aplicaciones requieren preparaciones enzimáticas libres de actividad celulolítica (Viikari *et al*, 1991).

Las xilanasas son el componente fundamental de un sistema multienzimático cuya función es degradar a los xilanos, que son el principal polisacárido contenido en las hemicelulosas de las plantas y en desechos de las mismas tales como el bagacillo de caña (Biely, 1993; du Toit *et al*, 1984). Por esta razón, este último puede ser usado ventajosamente como sustrato de producción de estas enzimas, ya que se encuentra en abundancia, está disponible a bajo costo y no resulta tóxico. Además de todo ello, su utilización a gran escala también sería benéfica desde el punto de vista ambiental.

Como ya se ha mencionado, la hidrólisis de la cadena principal de los xilanos requiere xilanasas (endo- β -(1,4) xilanasas: EC 3.2.1.8). Estas enzimas atacan los enlaces xilosídicos internos, pero también se requiere de β -xilosidasas: (EC 3.2.1.37) que ataquen los extremos de los xilooligosacáridos liberados (Reilly, 1981; Biely, 1985; Bastawde, 1992). Sin embargo, la completa degradación de los xilanos requiere además la participación de un conjunto de enzimas accesorias que liberen los distintos tipos de sustituyentes, pues a diferencia de la celulosa, su composición y estructura química son más complejas (Johnson *et al*, 1988; Pavlov y Alexander, 1993).

Así, en la naturaleza existen diferentes tipos de xilanos constituídos esencialmente por una cadena principal de monómeros de β -D-xilosa, unidos mediante enlaces β -1,4. En la mayoría de los casos, tales monómeros se encuentran sustituidos por distintos grupos: residuos de acetil se encuentran unidos al carbono 2 y/o 3, residuos de α -L-arabinofuranosyl en el carbono 3 (algunos de los cuáles presentan ácido ferúlico o coumarico esterificado en posición 5) y residuos de ácido α -D-4, O-metil glucurónico en la posición 2; por lo que sus estructuras varían no solo entre distintas especies vegetales, sino también entre diferentes tejidos de la misma planta. (Wong *et al*, 1988; Biely, 1985).

Otros estudios han demostrado que muchos microorganismos son capaces de sintetizar en forma inducible, más de una forma molecular de xilanasas y β -xilosidasas con propiedades fisicoquímicas diferentes (Wong *et al*, 1988). Así, la síntesis de xilanasas múltiples ha sido reportada principalmente en hongos del género *Aspergillus* (Fernández-Espinar *et al*, 1993), *Trichoderma* (Tan *et al*, 1985) y *Aerobasidium* (Li *et al*, 1993) y bacterias de los géneros *Bacillus* (Wong *et al*, 1988), *Cellulomonas* (Rapp y Wagner, 1986) y *Streptomyces* (Biely *et al*, 1993). Tal fenómeno ha sido visto como una estrategia de los microorganismos para su sobrevivencia en distintos ambientes (Wong *et al*, 1988; Coughlan *et al*, 1993). Sin embargo, se requiere más información para entender el origen y el papel de esta

multiplicidad enzimática en la degradación de los varios tipos de xilanos presentes en la naturaleza (Biely *et al*, 1993), así como la forma en que este fenómeno beneficia a los microorganismos que las sintetizan.

Es ampliamente conocido que la mayoría de los microorganismos que crecen de la biomasa vegetal usualmente producen conjuntamente enzimas xilanolíticas y celulolíticas. Esto es atribuido a la cercana asociación de la celulosa y el xilano en las paredes celulares de las plantas (Biely, 1993). La característica de coproducción de celulasas y xilanasas resulta desventajosa desde el punto de vista biotecnológico; ya que como fue mencionado anteriormente, la aplicación de estas enzimas en algunos procesos de bioconversión requiere preparaciones enzimáticas xilanolíticas libres de celulasas.

Desde la década pasada, los actinomicetos se han revelado como una fuente importante de estas enzimas degradadoras de materiales lignocelulósicos. Inclusive algunos de ellos sintetizan más de una forma molecular de xilanasas (McCarthy, 1987). Sin embargo, en la actualidad solo han sido reportados dos actinomicetos que sintetizan xilanasas libres de actividad celulolítica: *Chainia* sp. NCL-82-5-1 (Bastawde *et al*, 1991) y *Streptomyces* sp. T7 (Keskar *et al*, 1989).

En nuestro laboratorio estamos interesados en el actinomiceto *Streptomyces* sp. CH-M-1035, el cual se aisló de una zona cañera del Edo. de Morelos; debido a que esta cepa produce actividad xilanolítica extracelular cuando se le crece en presencia de xilanos y desechos agroindustriales; además esta cepa se encontró libre de celulasas (Flores *et al*, 1996^b). Asimismo, la producción de xilanasas es mayor cuando crece en bagacillo de caña que cuando lo hace en xilanos purificados y puede llevarse a cabo sin la adición de vitaminas, o suplementos nitrogenados complejos o el pretratamiento del desecho (Zuleta, 1995). También se ha escalado el proceso fermentativo a fermentador de 14L sin aparente disminución de la producción. Por estas importantes características, actualmente es sometido a diversos estudios.

Actualmente se sabe que *Streptomyces* sp. CH-M-1035 crece en una amplia variedad de fuentes de carbono monoméricas, oligoméricas y poliméricas. Sin embargo la actividad endoxilanolítica solo es inducida por xilanos, cáscara de limón y bagacillo de caña (en menor medida por xilosa, lactosa y arabinosa) asimismo se sabe del efecto negativo de la glucosa y el glicerol sobre su síntesis (Rodríguez, 1994; Flores *et al*, 1996^a). No obstante, no se conocen la composición enzimática y las propiedades del sistema xilanolítico extracelular que posee dicho microorganismo, a pesar de que es importante este conocimiento para llevar a cabo mejoras en la aplicación biotecnológica de dichas enzimas.

Debido a ello, este trabajo tiene como finalidad fraccionar el sistema xilanolítico extracelular de *Streptomyces* sp. CH-M-1035 para conocer si presenta endoxilanasas (xilanasas), β -xilosidasas, y si se detecta una sola forma molecular de endoxilanasas o pueden ser observadas múltiples formas moleculares de la misma.

2. ANTECEDENTES

2.1 XILANOS

Las hemicelulosas son polisacáridos de menor peso molecular, que se encuentran en las paredes celulares de las plantas asociados con la celulosa y ligninas. Aunque las hemicelulosas son generalmente consideradas polisacáridos estructurales, es conveniente incluir en este grupo algunos tipos de polisacáridos que tienen otras funciones en las plantas (Puls y Scuseil, 1993). Las hemicelulosas son heteroglicanos compuestos principalmente por residuos de D-xilosa, D-manosa, D-glucosa, D-galactosa, L-arabinosa y ácido 4-O-metil-D-glucurónico, así como por los polímeros formados por estos: xilanos, glucanos, glucomananos, y mananos (Aspinall, 1959). De estos, los D-xilanos son uno de los más abundantes en las angiospermas y en menor grado en las gimnospermas, representando aproximadamente de 15 a 30 y del 7 al 12% del total de peso seco, respectivamente (Wong *et al*, 1988; Bastawde, 1992; Joseleau *et al*, 1992).

Generalmente los β -1,4-xilanos son constituyentes de la pared secundaria de las células vegetales, aunque pueden también formar parte de la pared primaria de las células en crecimiento, así como de semillas y bulbos en ciertas especies de

plantas, donde tienen función de reserva (Joseleau *et al*, 1992). En cuanto a su estructura química, han sido caracterizados en dos niveles de complejidad: el polisacárido aislado y en asociación con otros componentes lignocelulósicos (Wong *et al.*, 1988).

Los xilanos aislados generalmente son heteropolímeros dispersos cuyas cadenas principales están formadas por unidades de D-xilopiranosas unidas por enlaces β -(1 \rightarrow 4), las cuáles se pueden encontrar sustituidas. Los azúcares que se han encontrado como sustituyentes del esqueleto principal son ácido D-glucurónico, L-arabinosa y 4-O-metilésteres de ácido glucurónico, y en menor grado grupos acetyl y compuestos de naturaleza fenólica. Cabe señalar que de una especie a otra y aún entre tejidos de una misma fuente, existen diferencias en cuanto a la distribución, cantidad y tipos de sustituyentes que presentan (Aspinall, 1959). Por lo que existen en la naturaleza muchas variaciones en cuanto a composición y complejidad de estructuras; no obstante estas diferencias también pueden deberse a los métodos de aislamiento (Fig. 1) (Wong *et al*, 1988; Coughlan y Hazlewood, 1993; Atkins, 1992).

Los xilanos constituidos únicamente por residuos de xilosa (homoxilanos) son muy raros en la naturaleza, el más estudiado hasta la fecha ha sido el xilano del pasto esparto (*Stipa tenacissima*), que por su sencillez ha sido utilizado como modelo para estudios físicos y químicos (Aspinall, 1959; Atkins, 1992; Bastawde,

1992). Asimismo, también han sido aislados homoxilanos de la planta del tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Woodward, 1984; Wong *et al*, 1988).

Se han considerado cuatro familias de xilanos con base en los sustituyentes que contienen: i)arabinoxilanos, que están sustituidos por α -arabinosa; ii)glucuronoxilanos, sustituidos por el ácido α -D-glucurónico, iii) glucuronoarabinoxilanos, en los cuáles la α -D-arabinosa y el ácido α -D-glucurónico están presentes y iv) galactoglucurono-arabinoxilanos, porque contienen α -arabinosa, ácido D-glucurónico y residuos de β -D-galactopiranosil. (Joseleau *et al*, 1992). Asimismo, también han sido agrupados con base en la fuente de la que provienen, puesto que se ha visto que su estructura y características generales son muy similares (Coughlan y Hazlewood, 1993).

Así, los xilanos presentes en la madera de algodón y otras maderas duras (abedul, maple rojo, roble, etc.) son del tipo acetil-4-O-metilglucuronoxilanos y representan del 10 al 35% del peso seco de la fuente. Este tipo de xilanos se caracteriza porque presenta un residuo de ácido 4-O-metil- α -D-glucurónico, unido por enlace α (1 \rightarrow 2) al carbono 2; en promedio, se encuentra aproximadamente un residuo por cada diez unidades de β -D-xilopiranososa, además, el 70% de estas unidades se encuentran acetiladas en el carbono 2 o 3, lo que aumenta la solubilidad del material (Biely, 1985). Inclusive, la mayoría de estos polímeros contiene pequeñas cantidades de ramnosa y ácido galacturónico como componentes de la cadena principal (Joseleau *et al*, 1992). Cabe mencionar que la presencia de

substituyentes en los heteroxilanos, determina en gran medida algunas de las propiedades fisicoquímicas que estos poseen, tales como solubilidad, viscosidad, etc. (Biely, 1993).

Por otra parte, las maderas suaves (abeto, pino, alerce), contienen de 10 a 15% de xilanos denominados arabino-4-O-metilglucuronoxilanos, los cuáles no se encuentran acetilados y contienen β -D-xilopiranososa, ácido 4-O-metil- α -D-glucurónico y L-arabinofuranosa en proporción de 100:20:13. Los residuos de ácido glucurónico y de arabinosa, se encuentran unidos al carbono 2 y 3 respectivamente, de cada 8 o 9 unidades de xilopiranososa del esqueleto principal (Fig. 1)(Atkins *et al*, 1992)

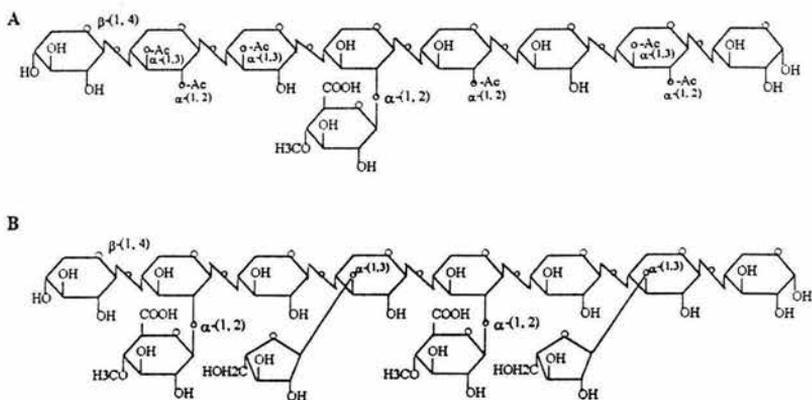


Fig. 1.- Estructura química de un O-acetil-4-O-metilglucuronoxilano de maderas duras: A y de un arabino-4-O-metilglucuronoxilano de maderas suaves: B (Coughlan y Hazlewood 1993)

Los xilanos de pastos también son arabino-4-O-metilglucuronoxilanos, pero estos se encuentran más altamente ramificados y tienen menos ácidos urónicos y más cadenas laterales de residuos de L-arabinofuranosil que los de las maderas suaves; estos residuos están unidos a los carbonos 2 y/o 3 de las unidades de xilopiranosas. Además, el 6 % de las cadenas laterales de arabinosa están a su vez sustituidas en la posición 5 con grupos feruol, mientras que el 3% están sustituidos con residuos p-coumaroil. A su vez, los xilanos de las plantas gramíneas contienen de 1-2% de grupos O-acetilo (Pulls y Schuseil, 1993).

Cabe hacer notar que durante los procesos de extracción para su estudio pueden perderse parcial o totalmente estos sustituyentes; asimismo, tales residuos pueden ser puntos de interacción entre la cadena de xilanos y otros materiales como la lignina, o con otras moléculas del mismo xilano (Coughlan y Hazlewood, 1993).

La distribución de los diferentes componentes lignocelulósicos dentro de la pared celular de las plantas, depende tanto de la especie de que se trate, como del grado de crecimiento y diferenciación celular (Aspinall, 1959; Puls y Schuseil, 1993). En este sentido, los xilanos de la pared celular secundaria, parecen ser la principal interface entre la lignina y otros carbohidratos que incluyen sustancias pécticas, otras hemicelulosas y glucanos (Wong *et al*, 1988).

Ha sido documentada la existencia de enlaces covalentes entre la lignina y la hemicelulosa. En muchos casos estas uniones se dan a través de los sustituyentes de los xilanos. Así, en algunos estudios se ha demostrado la existencia de un enlace

éter entre la celulosa y la lignina y un enlace éster entre el ácido glucurónico y la lignina. Grupos feruoil también enlazan el xilano y la lignina. Mientras que las porciones lineales no sustituidas de la molécula, se encuentran asociadas con las cadenas de celulosa (Aspinall, 1959). Resulta difícil detectar todas las posibles uniones covalentes entre las distintas estructuras, ya que algunas de estas, suelen ser selectivamente eliminadas durante los procesos de aislamiento de los xilanos (Puls y Schuseil, 1993; Wong *et al.*, 1988).

También las asociaciones de xilanos a otros polisacáridos pueden ser de naturaleza no covalente. Los xilanos tienden a adsorberse en la celulosa y a agregarse con otros componentes hemicelulósicos, posiblemente mediante puentes de hidrógeno. De esta manera, se considera que el xilano juega un papel importante en la cohesión de la pared celular, puesto que la remoción selectiva de las fibras deslignificadas, resulta en un incremento substancial de la porosidad de la fibra. Ambas asociaciones covalentes y no covalentes, contribuyen a la integridad estructural de la lignocelulosa (Wong *et al.*, 1988).

En la naturaleza existen otros polisacáridos que contienen xilosa, estos son los xiloglucanos que presentan un esqueleto de β -1,4-glucanos substituidos con residuos de α -1,6-xilosil, algunos de los cuales están a su vez enlazados a residuos de arabinosil, galactosil o fucosil. En algas existen β -1,3 xilanos y también se han encontrado xilanos con enlaces β -1,3 y β -1,4 (Aspinall, 1959; Joseleau *et al.*, 1992).

Los xilanos sufren degradación microbiana como parte del ciclo del carbono; tal degradación es llevada a cabo por sistemas enzimáticos especializados producidos por los microorganismos degradadores (Dekker y Richards, 1976). Recientemente, ha crecido el interés por los sistemas enzimáticos microbianos que degradan los xilanos, debido a que tales enzimas son fundamentales en diversos procesos biológicos y además poseen potencial biotecnológico para su aplicación en varios procesos industriales (Woodward, 1984; Wong *et al.*, 1988).

Tal potencial, se ve fuertemente reforzado por el hecho de que muchas de las fuentes vegetales que pueden ser útiles para la producción de xilanasas, son productos vegetales de desecho o materiales subutilizados; lo cual posibilita que su utilización como sustrato resulte atractiva, ya que son abundantes, renovables y se encuentran disponibles. Tales materiales son por ejemplo; aquellos desechos producto de las actividades agroindustriales que incluyen bagazos, rastrojos, pajas, pulpas y cáscaras de frutas y verduras, así como aserrín, virutas, ramas y cortezas liberados de las maderas durante la industrialización de los recursos forestales y algunos desechos urbanos como periódico, cartón y papel. Ya que en todos estos, se calcula que el contenido de xilanos fluctúa entre un 20 y un 35 por ciento de peso seco (Wong *et al.*, 1988).

Sin embargo, pese a su potencial estos materiales continúan considerándose desechos no utilizables, en particular en los lugares donde estas tecnologías aún no han sido desarrolladas. En tales sitios, son depositados y abandonados en los

terrenos cercanos al sitio de producción, o lo que resulta más perjudicial, en los cuerpos de agua y efluentes, donde tal exceso de material orgánico causa eventualmente la eutroficación del ecosistema. Lo cuál resulta desfavorable, porque al haber un aumento de materia orgánica, se disminuye la disponibilidad de oxígeno y se favorece el crecimiento de unos cuantos organismos, principalmente algunas bacterias e insectos, en detrimento de las demás especies acuáticas.

En México, uno de los desechos lignocelulósicos más abundantes es el bagacillo de caña, el cual es generado en los ingenios azucareros durante el proceso de extracción del azúcar. Tan solo en 1989, durante la producción anual de azúcar; fueron generadas 12×10^6 millones de toneladas de residuos de caña, principalmente bagazo (corteza del tallo de la caña) y bagacillo (parte medular del tallo). Los cuáles contienen de un 30 a un 35% de hemicelulosas (du Toit *et al.*, 1984). De tales productos el bagazo de caña es utilizado como combustible, para fabricar tablas y una pequeña parte como alimento para animales; no obstante, el bagacillo de caña es subutilizado a pesar de que constituye una fuente abundante, renovable y relativamente barata de material hemicelulósico. Considerando esto, nuestro grupo de investigación se encuentra actualmente explorando la capacidad de algunos microorganismos para degradar dichos desechos con el fin de eventualmente aprovechar el potencial que tiene el bagacillo de caña como sustrato; particularmente para la producción de enzimas xilanolíticas.

2.2. ENZIMAS XILANOLITICAS

Las xilanasas son fundamentales en la descomposición del material vegetal que llevan a cabo por diferentes microorganismos, los cuales promueven el reciclaje del carbono fijado como biomasa vegetal. Así, ha sido descrita su acción en conjunción con otras carbohidrasas durante la degradación de los diferentes materiales, tales como cortezas, maderas, rastrojos, hojas de los árboles, etc. (Dekker y Richards, 1976, Woodward, 1984, Wong *et al.*, 1988).

Está documentada también la importancia de las xilanasas que son producidas por algunos organismos de la flora microbiana del rumen, para la degradación de la hemicelulosa del forraje, durante la digestión de los herbívoros (Woodward, 1984; Matte y Forsberg, 1992; Gasparic *et al.*, 1995).

También han sido implicadas en el parasitismo de plantas; así como en otro tipo de interacciones planta-microorganismo, tales como las micorrizas (Wong *et al.*, 1988, Yamaura *et al.*, 1990; Ritschkoff *et al.*, 1994; Maijala *et al.*, 1995).

Se ha visto también que actúan durante los procesos de germinación de semillas de cereales como el arroz, el sorgo, el trigo y la cebada. Por ejemplo, cuando se lleva a cabo la degradación de los arabinoxilanos de las paredes celulares de las semillas de cebada en germinación a sus monosacáridos constituyentes es importante la acción concertada de tres endoxilanasas (Slade *et al.*, 1989). Otros estudios sugieren que estas enzimas posiblemente sean relevantes durante la

maduración de los frutos, puesto que su actividad se ve incrementada durante esta etapa (Woodward, 1984; Wong et al., 1988).

Ha sido sugerido por muchos autores que en la industria alimenticia las xilanasas pueden ser usadas en conjunción con otras enzimas. Por ejemplo para la maceración de frutas y vegetales (Biely, 1985) y la clarificación de jugos y vinos (Woodward, 1984), en conjunción con pectinasas y celulasas. También ha sido sugerido su uso previo a la hidrólisis con amilasas para aumentar el volumen específico del pan y por lo tanto potenciar su valor comercial (Maat *et al*, 1992). Otro uso que posee amplias perspectivas desde el punto de vista económico, es la bioconversión de hidrolisados lignocelulósicos para la producción de xilitol (Domínguez *et al*, 1996).

En la industria del forraje y alimentos para animales¹, la utilización de xilanasas puede aumentar la eficiencia de producción del ensilaje agrícola, así como las propiedades nutricionales de los alimentos para pollos. En este último punto, se ha visto que el tratamiento de los granos de arroz y trigo con una mezcla de celulasas- xilanasas, redundo en una ganancia en el peso de estos animales.²

Cabe señalar que en algunos de los diferentes procesos de conversión anteriormente mencionados, es deseable una conversión máxima del sustrato, lo que implica la necesidad de contar con microorganismos que posean sistemas enzimáticos más "completos" (principalmente celulasas y xilanasas), y que las

¹ Vandhelle, M y Vertin, G. 1989 en *Enzyme Systems for Lignocellulose Degradation* (Coughlan, M.P., ed), pp. 357-369, Elsevier Applied Science, London; citado en Wong y Saddler, 1993, p.130.

² Peterson y Aman, P. 1989 *Br. J. Nutr.* 62:139-149; citado en Wong y Saddler, 1993, p.130.

preparaciones enzimáticas comerciales sean asimismo baratas, activas y que se puedan obtener en grandes cantidades (Wong *et al.*, 1988).

Otros usos que han sido sugeridos involucran la utilización de enzimas xilanolíticas libres de actividad celulolítica, para el ablandamiento de algunas fibras textiles (lino y cáñamo) y en la industria de la pulpa y el papel, ya que para estas aplicaciones, la presencia de celulasas produce daños a las fibras de celulosa (Biely, 1985; Viikari *et al.*, 1991; Buchert *et al.*, 1992). En esta último rubro, después de que la madera o los materiales fibrosos han sido preparados (libres de organismos, descortezados, astillados, etc), son llevados a cabo dos procesos principales: el pulpeo, que es la obtención de la pulpa (fibras de la madera o materiales vegetales) mediante procesos químicos y/o mecánicos, con o sin remoción de lignina, y el blanqueamiento, que es definido como una secuencia de tratamientos (cloración. extracción con álcali y dióxido de cloro) para obtener aumento en la brillantez de la misma. En cuanto al primer proceso, algunas investigaciones han llevado a cabo el pretratamiento biológico de la madera, usando microorganismos lignocelulósicos, previo al pulpeo químico y han demostrado que este "biopulpeo" redunda en un ahorro substancial de energía y un incremento en la fuerza del papel (Kirk y Chang, 1990). Por otra parte, ha sido visto que las xilanasas aplicadas para la hidrólisis controlada de las hemicelulosas de las pulpas kraft (pulpas obtenidas por un proceso químico que utiliza sulfato) aumentan la extracción de lignina durante el blanqueo químico, lo cual además de aumentar la brillantez final, disminuye el

consumo de cloro activo, lo que tiene un impacto favorable a nivel ambiental (Viikari *et al.*, 1991; Buchert *et al.*, 1992). Otras aplicaciones en las que se ha sugerido el uso de estas enzimas, es en el mejoramiento de las características de las fibras (flexibilidad, fuerza, brillantez, etc), No obstante su potencial, el número de investigaciones publicadas en este sentido ha sido mínimo (Kirk y Chang, 1990).

2.2.1. CLASIFICACION DE LAS XILANASAS

Las enzimas que catalizan la hidrólisis de los D-xilanos actúan sobre la cadena principal de xilopiranososa rompiendo los enlaces $\beta(1 \rightarrow 4)$, de acuerdo con su modo de acción han sido clasificadas de la siguiente manera:

Endo- β (1 \rightarrow 4) -D-Xilanasas (β -1,4-D Xilano Xilano hidrolasa EC 3.2.1.8).

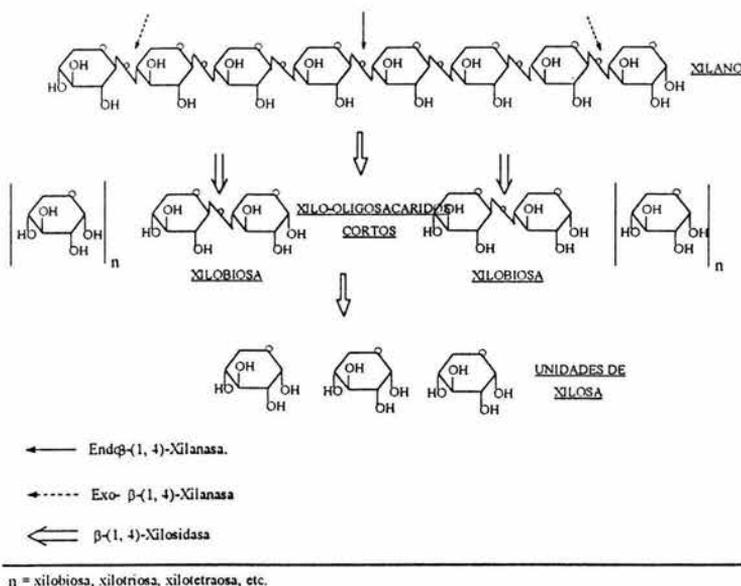
Estas enzimas son consideradas cruciales para la degradación del xilano. Puesto que reaccionan en el interior de la cadena principal produciendo xilooligosacáridos de longitud variable (Reilly 1981; Woodward, 1984; Bastawde, 1992; Thompson, 1993). Para algunos tipos de endoxilanasas, se ha visto que su actividad disminuye paralelamente al grado de polimerización del polisacárido (Thompson, 1993) y no son capaces de hidrolisar xilotriosa o xilobiosa (Viet *et al.*, 1993; Fernández Espinar *et al.*, 1993; Gomez de Segura y Fevré, 1993; Teunissen *et al.*, 1993; Biely *et al.*, 1993). Otras xilanasas se ha visto que producen xilooligosacáridos de tamaño intermedio y arabinosa (Fig. 2) (Matte y Forsberg, 1992; Grabski y Jeffries, 1991).

β -Xilosidasa o Xilobiasa (E.C. 3.2.1.37) Hidroliza disacáridos como xilobiosa, y a velocidades menores también actúan sobre el extremo no reductor de los xilooligosacáridos cortos produciendo xilosa. Además, se ha reportado que presenta actividad de transferasa (Fig. 2)(Biely, 1985; Nanmori *et al.*, 1990; Shao y Wiegel, 1992).

Exo- β -(1 \rightarrow 4)-D-Xilanasas (β -(1 \rightarrow 4)-D- Xilanasas) Algunas β -xilosas han sido tentativamente llamadas por Reilly (1981) exoxilanasas ya que a diferencia de éstas, producen xilosa a velocidades altas a partir del extremo no reductor del xilano, pero a bajas velocidades cuando hidroliza xilooligosacáridos cortos. (Woodward, 1984; Wong *et al.*, 1988; Bastawde, 1992). No obstante su existencia no ha sido demostrada, por lo que la IUB³ no le ha asignado un número de clasificación particular.

³ IUB.- International Union of Biochemistry

Figura 3.- Sitios de acción de las xilanasas involucradas en la hidrólisis del esqueleto principal de xilano

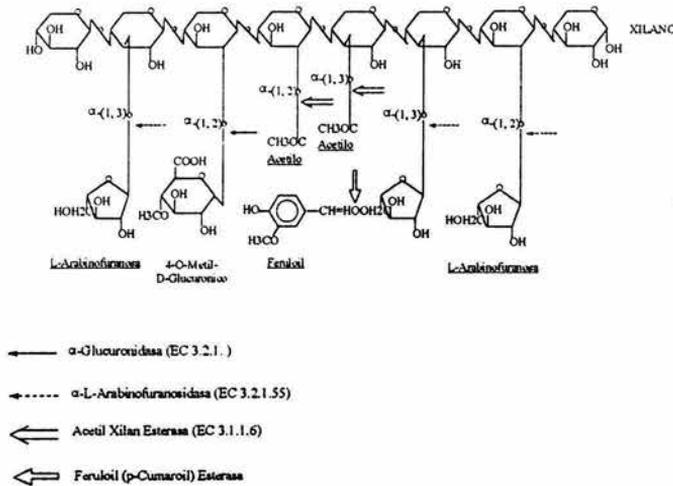


2.2.2. ENZIMAS ACCESORIAS

La compleja estructura de los xilanos también limita el acceso físico de las xilanasas a los enlaces xilosídicos, por lo que en algunos casos también se requiere la participación no sólo de las xilanasas sobre el esqueleto principal de xilosas, sino también de enzimas accesorias que liberen los diferentes sustituyentes de la cadena principal y los compuestos enlazados a estos, produciendo más sitios de ataque para que pueda llevarse a cabo la hidrólisis enzimática total (Wong *et al.*, 1988; Pavlov y Alexander, 1993). Estas enzimas incluyen a α -L-arabinofuranosidasas (E.C. 3.2.1.55) (Gasparic *et al.*, 1995) y α glucuronidasas (E.C. 3.2.1.1), las

cuales remueven los residuos de arabinosa y ácido 4-O metilglucurónico respectivamente (Puls *et al.*, 1987). Asimismo, también se reporta la participación de las enzimas que rompen los enlaces éster (esterasas E.C. 3.1.1) de los residuos acetil del xilano acetilado (acetil xilano esterasa, E.C. 3.1.1.6) o de los residuos fenólicos que se encuentran ligados a las cadenas laterales de arabinosa, tales como el ácido ferúlico (feruol esterasa) y el ácido p-coumarico (p-coumaroil esterasa) (Fig. 3) (Kormelink *et al.*, 1993^b; Biely *et al.*, 1986; Bachmann y McCarthy, 1991; Pavlov y Alexander, 1993). Cabe señalar, que la mayoría de los autores coinciden en que estas enzimas son requeridas en alguna medida para la completa sacarificación de la hemicelulosa (Johnson *et al.*, 1988), por lo que este sistema enzimático resulta ser aún más complejo que el celulolítico (Thompson, 1993)

Figura 3.- Sitios de acción de las enzimas accesorias involucradas en la liberación de los diferentes tipos sustituyentes del xilano



Thompson, 1993.

2.3 EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE LA SINTESIS DE ENZIMAS XILANOLITICAS

Los estudios de regulación de la síntesis de enzimas xilanolíticas se han enfocado principalmente a determinar el efecto de varias fuentes de carbono sobre la síntesis de las mismas. En este sentido, se ha observado la inducción de xilanasas cuando los microorganismos son crecidos en xilanos purificados, como es el caso de *Aspergillus niger* (John y Schmidt, 1979), *Trichoderma harzianum* (Tan *et al.*, 1985), *Phanerochaete chrysosporium* (Copa-Patiño *et al.*, 1993) y *Aspergillus nidulans* (Fernández-Espinar *et al.*, 1993) o en sustratos lignocelulósicos como aserrín de abeto y harina integral de trigo como en *Gloeophyllum trabeum* (Ritschkoff *et al.*, 1994), cascarilla de trigo (Johnson *et al.*, 1988; Bastawde *et al.*, 1994), cañas de maíz o bagazo de caña tratados y no tratados con álcali (Patel y Ray 1994; Rodríguez *et al.*, 1991) y fibras de algodón (Stutzenberger y Bodine, 1992), aunque cabe señalar que en todos los casos mencionados, se reporta menor rendimiento en la producción de xilanasas cuando son usados sustratos heterogéneos en vez de xilanos, excepto en el último caso, cuando se utilizaron fibras de algodón.

Para algunos organismos se ha podido establecer qué tipo de moléculas penetran en la célula y funcionan como inductores o precursores directos de esta actividad enzimática. Tales moléculas son por ejemplo: la xilosa, que se ha visto que es el inductor directo para *Aspergillus terreus*, *A. tubigenensis*, *A. sydowii* MG49

y *Trichoderma reesei* (De Graff *et al.*, 1992; Ghosh y Nanda, 1994) y la xilobiosa, para la levadura *Cryptococcus albidus* (Biely *et al.*, 1980). Asimismo, en distintos trabajos se sugiere que en el caso de algunos organismos, varios isómeros posicionales y análogos de la xilobiosa son mejores inductores de la síntesis de enzimas xilanolíticas que la xilobiosa. Tal es el caso de los isómeros de la xilobiosa, 1-2 y 1-3 β -xilobiosa, para *Trichoderma cutaneum* y *Pullularia pullulans* (Biely, 1993) y del metil- β -xilósido para *Streptomyces* KT23 (Nakamishi y Yasui, 1980).

La mayoría de los microorganismos que crecen a partir de las plantas usualmente producen enzimas celulolíticas y xilanolíticas, esto es debido a la fuerte asociación que hay entre la celulosa y el xilano en las paredes celulares de las plantas (Ishaque y Kluepfel, 1980; Mackenzie *et al.*, 1984; Biely, 1985; Kluepfel *et al.*, 1986; Bastawde *et al.*, 1994; Khandke *et al.*, 1989; Okeke y Paterson, 1992).

En general, es aceptado que en células microbianas, las celulasas y xilanasas son inducibles por fragmentos de los polisacáridos que se forman por la acción de bajos niveles de hidrolasas producidas constitutivamente, las cuáles pueden ser secretadas al medio de crecimiento, o también pueden estar asociadas a la superficie celular. Tales fragmentos, a diferencia de los polisacáridos, son capaces de penetrar en la célula y activar el sistema de transcripción genético para la síntesis de las enzimas respectivas (Biely *et al.*, 1992; McCarthy *et al.*, 1985). Sin embargo,

tanto en procariotes como en eucariotes, el conocimiento que se tiene de cómo se lleva a cabo la inducción de xilanasas a nivel molecular es escaso; además de que existen evidencias que sugieren que estos sistemas enzimáticos presentan complejos mecanismos de regulación (Biely, 1993; Thompson, 1993).

2.4 FRACCIONAMIENTO Y CARACTERIZACION DE ENZIMAS XILANOLITICAS

Entre los microorganismos que degradan xilanos, existen algunos que producen más de una xilanasas, con la misma actividad pero con diferentes propiedades (peso molecular, punto isoelectrico, etc). Tales enzimas pueden tener diferente origen. Por ejemplo, pueden ser producto de un mismo gene y haber sufrido modificaciones postraduccionales; o ser producto de genes distintos o de diferentes alelos del mismo gen (Johnson *et al.*, 1988; Da Silva *et al.*, 1994; Okeke y Obi, 1992; Dahlberg *et al.*, 1993; Pellerín *et al.*, 1991). Tal fenómeno se conoce como multiplicidad enzimática, y se ha sostenido que ocurre como una estrategia del microorganismo para sobrevivir en un medio ambiente cambiante o para completar la hidrólisis de la compleja estructura del xilano (Wong *et al.*, 1988; Viet *et al.*, 1993).

La multiplicidad de xilanasas se manifiesta al momento de realizar el fraccionamiento del sistema enzimático o por medio de zimogramas, más que

durante el estudio de su modo de acción o propiedades catalíticas (Woodward, 1984)

Los estudios de fraccionamiento del sistema xilanolítico, mediante procesos cromatográficos, son llevados a cabo en muchos microorganismos. Así se ha reportado la composición y características de los sistemas enzimáticos xilanolíticos extracelulares de hongos y bacterias, como ocurre con los hongos filamentosos: *Aspergillus niger* (John y Schmidt *et al.*, 1979), *Piromyces* sp E2 (Teunissen *et al.*, 1993), el hongo de raíces cafés *Gloeophyllum trabeum* (Ritschkoff *et al.*, 1994), *Aspergillus sydowii* MG49 (Ghosh y Nanda, 1994), el hongo termofílico *Thermoascus aurantiacus* (Khandke *et al.*, 1989), *Aspergillus awamori* CMI142717 (Kormelink *et al.*, 1991^b), el hongo del rumen *Neocallimastix frontalis* (Gomez de Segura y Fevre, 1993), y con *Aspergillus nidulans* (Fernandez-Espinar *et al.*, 1993), así como con el hongo levaduriforme *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1, (Li *et al.*, 1993). Entre las bacterias a las que se les ha estudiado su composición enzimática extracelular, se encuentran: *Fibrobacter succinogenes* S85, (Matte y Forsberg, 1992), *Bacillus stearothermophilus* (Nanmori *et al.*, 1990), *Pseudomonas* sp PT5 (Yamaura *et al.*, 1990) y *Cellulomonas fimi* (Khanna y Gauri, 1993)

En otros microorganismos también se ha logrado, mediante fraccionamiento cromatográfico, la identificación de los diferentes componentes del sistema y el estudio de algunas de las propiedades de los mismos. Como es el caso de la levadura *Cryptococcus albidus*, en la que se logró determinar que produce al menos

dos enzimas con actividad endoxilanólítica, las que fueron caracterizadas con base en su peso molecular y en los productos de degradación que originan las fracciones parcialmente purificadas de un filtrado libre de células (Biely *et al.*, 1980). Asimismo, Okeke y Obi reportan en 1992 que un hongo identificado como *Arthrographis* sp. F4 produce una endoxilanasas que fue parcialmente purificada y descritas algunas de sus propiedades cinéticas y fisicoquímicas; Da Silva y col. (1994) logran separar por cromatografía de intercambio iónico tres fracciones del filtrado extracelular de *Humicola* sp. crecido en cáscara de trigo y determinan algunas de sus propiedades fisicoquímicas. Copa-Patiño y col. (1993) también separan por columna de intercambio iónico, cuatro picos con actividad de endoxilanasas en el filtrado extracelular del hongo *Phanerochaete chrysosporium* crecido en arabinóxilano, los cuáles difieren con respecto a la solubilización y producción de grupos reductores a partir de este sustrato.

En cuanto a bacterias se refiere, se ha conseguido el fraccionamiento por filtración en gel del medio extracelular de *Rhodothermus marinus* crecido en xilanos de abedul, tal proceso reveló la existencia al menos de dos endoxilanasas y una β -xilosidasa termoestables (Dahlberg *et al.*, 1993). Este proceso cromatográfico, también se usó para separar una endoxilanasas y una β -xilosidasa extracelulares de *Bacillus stearothermophilus* (Nanmori *et al.*, 1990). Asimismo, la bacteria anaerobia *Clostridium thermolacticum* mostró una fracción de endoxilanasas extracelular constitutiva con alta actividad específica, la cual fue obtenida mediante

un solo paso de cromatografía de intercambio iónico del sobrenadante del cultivo (Pellerín *et al.*, 1991).

2.5. XILANASAS DE ACTINOMICETOS

Los actinomicetos se encuentran ampliamente distribuidos en ambientes naturales como suelos y compostas, en tales sitios realizan una importante contribución para la reincorporación de nutrimentos y la humificación. Debido a ello son considerados una importante fuente de enzimas que degradan la biomasa vegetal y en muchas cepas se ha identificado su actividad sobre los principales componentes lignocelulósicos, encontrando que la capacidad para degradar xilanos está particularmente extendida (McCarthy, 1987).

Aunque desde finales de la década pasada se han realizado estudios mas profundos sobre las propiedades de las endoxilanasas producidas por una amplia variedad de cepas representativas de la diversidad de actinomicetos (Ball y McCarthy, 1988, 1989), estos estudios han sido más amplios en especies del género *Streptomyces* (Marui *et al.*, 1985; Okeke y Paterson, 1992,). Tal género engloba bacterias aeróbicas, gram-positivas, no patógenas, que presentan desarrollo micelial parecido al de los hongos (Anne y Meallert, 1993)

En cuanto a los estudios de fraccionamiento y caracterización de los sistemas enzimáticos de actinomicetos, estos se han llevado a cabo con profundidad en pocas especies en comparación a los estudios realizados en hongos y aunque la

gran mayoría de estos se han enfocado a especies del género *Streptomyces* otras especies de distinto género también han cobrado importancia.

Así, el sistema enzimático xilanolítico de *Thermomonospora fusca* fue parcialmente purificado y definido como un sistema multienzimático de alta complejidad (Bacchmann y Mc Carthy, 1991), debido a que presenta varias fracciones con actividad de endoxilanasas, al menos una β -xilosidasa y actividades accesorias que también contribuyen a la degradación del xilano como acetil esterasas y ∞ arabinofuranosidasas. Asimismo Stutzenberger y Bodine (1992) fraccionaron el sistema xilanolítico extracelular de *Thermomonospora curvata*, obteniendo tres picos mayores y uno menor, todos con actividad de endoxilanasas y Bastawde y col. (1991) obtuvieron dos picos por gel de filtración del filtrado extracelular de *Chainia* sp. NCL-82-5-1.

Por lo que respecta al género *Streptomyces* ha sido reportado el fraccionamiento y caracterización del sistema xilanolítico de diferentes especies. De estos, el más interesante estudio de fraccionamiento, es el reportado por Johnson y colaboradores en 1988, en el cuál se detalla la metodología para el fraccionamiento de la actividad xilanolítica extracelular de las cepas *S. flavogriseus* 45-CD y *S. olivochromogenes* NRCC 2811.

Desde la década pasada, como se mencionó anteriormente, los actinomicetos se han revelado como una fuente importante de enzimas con actividad xilanolítica.

Inclusive algunos de ellos sintetizan más de una forma molecular de xilanasas (McCarthy, 1987).

Se ha visto que la mayoría de las endoxilanasas de los actinomicetos estudiados a la fecha, son producidas simultáneamente con celulasas (Ball y McCarthy, 1988, 1989). Desde el punto de vista biotecnológico, esta situación sólo es ventajosa si se pretende utilizar a las enzimas en procesos de sacarificación de materiales lignocelulósicos, puesto que se contaría con preparaciones enzimáticas más completas para degradar a las celulosa y hemicelulosa. Sin embargo, es claro que para hacer uso de las xilanasas en la industria de la pulpa y el papel, será necesario llevar a cabo procesos adicionales, ya sea para la separación de las enzimas, posteriores a la producción de xilanasas, o para la inactivación de celulasas, con el fin de evitar la presencia de la actividad celulolítica; la cual, como ha sido mencionado, dañaría la calidad de las fibras de celulosa. En vista de que tales procesos pueden aumentar el costo de producción de estas enzimas o inclusive hacerlo inviable a nivel industrial, podría ser más ventajoso el uso de cepas silvestres libres de celulasas como fuente de enzimas xilanolíticas.

Hasta el momento, solo han sido reportados dos actinomicetos que sintetizan xilanasas libres de actividad celulolítica: *Chainia* sp. NCL-82-5-1 (Bastawde *et al.*, 1991) y *Streptomyces* sp. T7 (Keskar *et al.*, 1989), por lo que los estudios de nuevas cepas con esta importante característica son de gran importancia, no solo

desde el punto de vista biotecnológico, sino que pueden servir como modelo para el estudio de las xilanasas sin la interferencia de celulasas.

En nuestro laboratorio se inició un programa de aislamiento de cepas microbianas con alta capacidad xilanolítica extracelular a partir de muestras de diferentes zonas, en particular de los lugares donde se produce la caña de azúcar y sus sub-productos como son el bagazo y el bagacillo, con la intención de aislar y seleccionar microorganismos adaptados a las condiciones de altas temperaturas de esta zona y a la utilización de bagacillo de caña de azúcar como fuente de carbono y energía. Como resultado, fue aislado un *Streptomyces* que produce xilanasas extracelulares cuando crece en xilanos o en bagacillo de caña y su característica más interesante, es que no produce celulasas.

Este microorganismo fue denominado *Streptomyces* sp. CH-M-1035, presenta colonias grisáceas de apariencia seca cuando esporula crecido en placas que contienen medio mínimo con xilanos como única fuente de carbono y examinado al microscopio de luz, se observa que presenta micelio muy fino, lo que lo ubica dentro del grupo de bacterias filamentosas (Actinomycetales).

Posteriores estudios, han confirmado la capacidad de *Streptomyces* sp. CH-M-1035 de producir xilanasas extracelulares libres de celulasas cuando es crecido en xilanos, y desechos agroindustriales ricos en xilanos como bagacillo de caña o cáscara de limón (Flores et al, 1996^b). Además, establecieron que posee otras ventajas que son importantes si se pretende escalar su producción a nivel industrial:

Produce xilanasas libres de celulasas en desechos agroindustriales (bagacillo de caña o cáscara de limón) sin pretratamientos físicos o químicos, a diferencia de otros microorganismos xilanolíticos los cuáles producen buenos niveles de xilanasas, solo cuando son crecidos en sustratos lignocelulósicos pretratados por métodos físicos y/o químicos (Enríquez, 1981) los cuáles incrementan los costos de producción y pueden hacer impracticable el proceso a nivel industrial. Asimismo a diferencia de la mayoría de los *Streptomyces* reportados (Tabla I) no se requiere la adición de complementos nutricionales complejos (extracto de levadura o proteosa peptona), para obtener una buena producción de enzimas (Zuleta, 1995) y los niveles de producción obtenidos en matraz agitado con estos sustratos, fueron mantenidos en fermentador de 14L; lo cual sugiere que es factible el escalamiento. Por último se ha visto que en fermentación sumergida no forma "pellets" (esferas de micelio y sustrato), por lo cual se evitan limitaciones de crecimiento y producción de enzimas por una deficiente difusión y transferencia de oxígeno y nutrimento. Todas estas características sugieren que este microorganismo tiene potencial de ser utilizado para la producción a mayor escala de xilanasas libres de celulasas.

Con respecto a los estudios que se han llevado a cabo con *Streptomyces* sp. CH-M-1035, en buena medida se han dirigido hacia el estudio del efecto de diversas fuentes de carbono sobre la producción de enzimas xilanolíticas (Rodríguez, 1994), con el fin de conocer los aspectos regulatorios de las mismas

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

ESPECIE	SALES MINERALES	Fuente de nitrógeno	COMPLEMENTOS ORGANICOS COMPLEJOS
<i>S. flavogriseus</i> 33331 ATCC, <i>S. olivochromogenes</i> NRCC 2258, <i>Streptomyces</i> C248, <i>Streptomyces</i> C254, <i>Streptomyces</i> R-39, <i>S. flavogriseus</i> IAFCD-45, <i>S. lividans</i> 1326, <i>Streptomyces</i> T7, <i>S. roseiscleroticus</i> (MacKenzie et al, 1984; Jhonson et al, 1988; Morosoli et al, 1986; Keskar et al, 1989; Grabski y Jeffries, 1991).	KH ₂ PO ₄ , K ₂ HPO ₄ , MgSO ₄ 7H ₂ O, CaCl H ₂ O, solución de elementos traza	(NH ₄) ₂ SO ₄	Proteosa peptona, extracto de levadura
<i>Streptomyces</i> EC22 (Okeke y Paterson, 1992)	KH ₂ PO ₄ , KCl, MgSO ₄ •7H ₂ O, Ca Cl •H ₂ O, NaCl	NH ₂ NO ₃	Extracto de levadura
<i>Streptomyces</i> KT-23 (Nakajima et al, 1984)	KH ₂ PO ₄ , MgSO ₄ •7H ₂ O, FeSO ₄ 7H ₂ O	(NH ₄) ₂ SO ₄	Extracto de levadura
<i>Streptomyces cyaneus</i> (Wang et al, 1993)	NaCl, MgSO ₄ , CaCO ₃ , elementos traza	(NH ₄) ₂ SO ₄	Extracto de levadura
<i>Streptomyces</i> sp. A451 (He et al, 1993)	K ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ , MgSO ₄ 7H ₂ O, Twen 80, Elementos traza	(NH ₄) ₂ SO ₄	Extracto de levadura, peptona
<i>Streptomyces</i> HM-15 (Patel y Ray, 1994)			Extracto de levadura, extracto de carne, casitona aminoácidos
<i>Streptomyces</i> sp. 3137 (Marui et al, 1985)	KH ₂ PO ₄ , MgSO ₄ 7H ₂ O	Urea	Extracto de levadura, licor de maíz
<i>Streptomyces</i> sp. CH-M-1035 (Flores et al, 1996 ^b)	KH ₂ PO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄ Urea	No requiere

(Flores *et al.*, 1996^a). Paralelamente, se han enfocado también a la optimización de la producción de enzimas xilanolíticas sobre desechos agroindustriales a nivel matraz y fermentador de 14L. No obstante, solamente se ha medido la actividad de endoxilanasas con xilanos como sustrato y aún no se conocen las características del sistema extracelular que produce, ni si está formado por una o varias enzimas con actividad endoxilanolítica, por lo que son necesarias más investigaciones encaminadas hacia el esclarecimiento de este punto ya que el determinar si hay una o múltiples xilanasas, podría no solo contribuir al entendimiento de este sistema desde el punto de vista básico, sino que a largo plazo, también podrían hacer posible la manipulación, tanto del sistema enzimático como del microorganismo, lo que eventualmente ofrecería alternativas para el planteamiento de estrategias dirigidas a su producción y aplicación biotecnológica.

Por todo lo anterior el objetivo de este trabajo está centrado en el fraccionamiento por cromatografía de intercambio iónico de la actividad xilanolítica extracelular de *Streptomyces* sp. CH-M-1035 y la caracterización parcial de sus componentes enzimáticos con el fin de estudiar algunas propiedades de los mismos.

3. Objetivo general

Estudiar la composición enzimática del sistema xilanolítico extracelular de *Streptomyces* sp. CH-M-1035 mediante el fraccionamiento cromatográfico del filtrado libre de células y su posterior caracterización.

3.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- Producción de xilanasas extracelulares de *Streptomyces* sp. CH-M-1035 en fermentador de 14L con bagacillo de caña o xilanos de abedul como única fuente de carbono y determinación de la actividad de endoxilanasas y β -xilosidasas.
- Selección del método más adecuado para concentrar el sistema xilanolítico extracelular de *Streptomyces* sp. CH-M-1035.
- Fraccionamiento de la actividad xilanolítica extracelular de *Streptomyces* sp. CH-M-1035 mediante distintos métodos cromatográficos y comparación de los perfiles cromatográficos obtenidos.
- Caracterización bioquímica de las principales fracciones con actividad xilanolítica de *Streptomyces* sp. CH-M-1035 bajo los siguientes parámetros: pH óptimo, estabilidad al pH y a la temperatura y K_m y V_{max} . ap.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. REACTIVOS

Acetato de sodio, ácido cítrico, ácido acético, carbonato de sodio, citrato de sodio, fenol, glicerol, hidróxido de sodio, metabisulfito de sodio, sulfato cúprico, sulfato de amonio, tartrato de sodio y potasio, fosfato de potasio dibásico, fosfato de potasio monobásico y cloruro de potasio fueron obtenidos de J. T. Baker. Extracto de levadura, extracto de malta, triptona y agar bacteriológico de Difco Laboratories. Albúmina Sérica Bovina, Xilanos de abedúl, lárice y avena, reactivo de Folín y Trizma Base (Tris-hidroximetil, aminometano) de Sigma Chemical Co. U.S.A. Carboximetil celulosa (CMC52) y Dietilaminoetil celulosa (DEAE52) de Whatman Inglaterra, D-xilosa y acetona de Merck, ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) de Aldrich Chemical Co. y CM-Sephadex C₅₀ de Pharmacia. Como sustrato nativo y heterogéneo se usó bagacillo de caña de azúcar, el cual se obtuvo del ingenio azucarero "Emiliano Zapata" ubicado en Zacatepec Morelos.

4.2. MICROORGANISMO, PROPAGACION Y CONSERVACION.-

Se utilizó una cepa identificada como *Streptomyces* sp. CH-M-1035, la cual fue aislada por el grupo del Dr. Carlos Huitrón de muestras del suelo de una zona cañera del Estado de Morelos.

La propagación se llevó a cabo en condiciones estériles, sembrando la cepa por estría en cajas de petri con 15ml de **medio A (Apéndice I)**, las cuales se incubaron a 37°C por 96h. La cepa propagada, fue almacenada a 4°C hasta por tres meses, colocando papel parafilm en la hendidura de las cajas, para evitar que el medio se seque.

Cuando se requirió conservar la cepa por más tiempo, fueron colectadas las esporas de las cajas con asa bacteriológica, suspendidas en tubos con 5.0ml de **medio D (Apéndice I)** y almacenadas a -20°C. Cabe señalar que cuando fue propagada la cepa a partir de esta suspensión, se hicieron diluciones de la misma con agua destilada estéril (1×10^3 , 1×10^4 y 1×10^{10}). De estas diluciones se tomaron 0.1ml y se inocularon por plaqueo en cajas de agar con **medio A**.

4.3. PRODUCCION DE XILANASAS EXTRACELULARES EN FERMENTADORES DE 14L

4.3.1 Preparación del inóculo.-

El microorganismo (a partir de una sola colonia), se sembró por estría en una placa de agar conteniendo **medio A** y fue incubada a 37°C durante 96h. Después de este tiempo, fueron cosechadas las esporas con asa bacteriológica y suspendidas en un matraz de 150ml con 50ml de **medio C (Apéndice I)**, este último fue incubado por 24 h a 37 °C y 200 rpm de agitación. Después de este

tiempo el contenido del matraz fue vertido en 450 ml de medio C, en un matraz Fernbach, e incubado a 37°C y 200 rpm de agitación por 24h.

4.3.2. Cinética de producción de xilanasas extracelulares de *Streptomyces* sp. CH-M-1035 en fermentador MICROGEN (14L).-

Para determinar la cinética de producción de xilanasas sobre bagacillo de caña sin pretratamiento y xilanos de abedul, se llevó a cabo el cultivo del microorganismo en un fermentador de 14L MICROGEN, (New Brunswick Scientific Co.) conteniendo 9.5 litros de medio B con bagacillo de caña al 1% (sin pretratamiento) o con xilanos de abedul al 0.15% (Apéndice I). Para cada cultivo, fue preparado el inoculo descrito anteriormente (500ml, relación 5% v/v). Los detalles del cultivo están especificados en las leyendas de las figuras correspondientes. Durante los cultivos fueron tomadas asepticamente muestras de 50 ml a diferentes tiempos. Estas muestras fueron centrifugadas a 2600 rpm por 15 min en una centrífuga clínica (Sol-Bat) a temperatura ambiente y decantadas, para obtener los filtrados a los que posteriormente se les determinó actividad enzimática de endoxilanasas, de β -xilosidasa y proteína extracelular.

El medio de cultivo de la fermentación en bagacillo de caña de azúcar fue recuperado a las 96h de incubación. Un volumen aproximado a 8.0L, fue centrifugado a 2100 rpm en una centrífuga de canasta REMSA (modelo 305SPO) con capacidad de carga de 9.07 dm³ a temperatura ambiente; con lo cual fue separado el líquido de la mayor parte de las células y el bagacillo residual, los cuales quedaron retenidos en una

mallá de nylon colocada en la centrifuga. Posteriormente, este líquido fue centrifugado a 4°C, a 11 000 x g por 30min, en una centrifuga Sorvall desechando los sólidos. Así, se obtuvieron aproximadamente 6L de filtrado libre de células de *Streptomyces* sp. CH-M-1035 que fueron almacenados a -20°C.

4.3.3 Producción de xilanasas de *Streptomyces* sp. en fermentador LABROFERM (14 L).-

Para la obtención del lote de filtrado libre de células (FO) utilizado en el fraccionamiento, la producción de xilanasas fue llevada a cabo en un fermentador LABROFERM, equipado con tres jarras de 14L (New Brunswick), cada una con 9.5L de medio B con xilanos de abedul al 0.5% como única fuente de carbono, inoculado como se describió anteriormente. El cultivo fue mantenido por 25h y posteriormente se recuperaron aproximadamente 8.0L de medio por cada jarra. Los volúmenes de las tres jarras fueron centrifugados a temperatura ambiente a 10,000 rpm por 20min en una centrifuga de discos Westfalia Separator A.G. (modelo SAOH205). El líquido obtenido de dos ellas, fue mezclado y posteriormente centrifugado a 4°C en una centrifuga Sorvall a 11000 xg por 30min, desechando los sólidos. A continuación, el sobrenadante obtenido fue decantado y mezclado para recuperar aproximadamente 9.0L de filtrado libre de células (FO) y almacenado a -20°C.

4.4. DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

4.4.1. Actividad endoxilanolítica (EC 3.2.1.8).-

La actividad endoxilanolítica (AEX) fue determinada midiendo los grupos reductores liberados a partir de xilanos de abedul por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). El sistema de reacción contenía 1.0 ml de una solución de xilanos de abedul 0.75% en buffer acetato de sodio 0.1M (pH 5.5) más 0.7ml del mismo buffer. Este sistema fue preincubado por 3.0min a 50°C y posteriormente se añadieron 0.3ml de enzima sin diluir o apropiadamente diluida y la mezcla completa fue incubada a diferentes tiempos (2 - 15min) a 50°C. La reacción se detuvo añadiendo 3.0ml de DNS (**Apéndice II**). Posteriormente se puso en ebullición a baño María por 5.0min, se agregaron 15.0 ml de agua destilada y se leyó densidad óptica (D.O) a una longitud de onda de 550nm (Spectronic 21D). Los azúcares reductores liberados de la reacción fueron cuantificados interpolando la D.O obtenida en una curva estándar de xilosa. Cada determinación se hizo al menos por triplicado. Para cada una de las muestras se preparó un control o tiempo cero de reacción, agregando antes el DNS para inactivar la enzima.

Una Unidad (U) de actividad se definió como la cantidad de enzima que libera una micromola de reductores equivalentes de xilosa, por minuto bajo las condiciones de ensayo.

4.4.2 Actividad de β -xilosidasa EC 3.2.8.1.-

La actividad de β -xilosidasa se determinó por la liberación de p-nitrofenol (pNF) a partir de p-nitro-fenil- β -D-xilopiranosido (pNPX). El sistema de reacción

estuvo compuesto por 3.0ml de una solución de pNPX (2mg ml^{-1}) en buffer acetatos 0.01M, pH 6.0. Este sistema fue preincubado a 50°C durante 3.0min, posteriormente se añadieron 3.0ml de filtrado libre de células. El sistema fue incubado a 50°C y fueron tomadas alícuotas de 0.5ml a diferentes tiempos, las cuales fueron puestas en tubos (13x100) con 1.0ml de carbonato de sodio (NaCO_3) 1.0M previamente colocados en baño con hielo. A continuación se añade a cada tubo 0.5ml de agua destilada y se lee D.O. a 400nm. Para cuantificar la actividad se preparó una curva estándar de p-nitrofenol (pNF). Una Unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima que libera una micromola de pNF por minuto por ml de filtrado enzimático bajo las condiciones de ensayo. Para cada determinación se hizo un tiempo cero de reacción incubando el sistema de reacción el tiempo requerido para la reacción y añadiendo el carbonato de sodio antes de la alícuota de enzima.

4.5. DETERMINACION DE PROTEINA

La proteína de los filtrados enzimáticos fue determinada por el método modificado de Lowry, *et al* (1951) y la proteína de las fracciones obtenidas en las cromatografías, fue estimada por D.O a 280nm. Para llevar a cabo la determinación de proteína extracelular, las muestras fueron previamente dializadas contra agua o contra buffer acetato de sodio usando bolsas para diálisis (Spectra/Por) de 25 mm de ancho y 12-14 kDa de capacidad de corte.

Se colocaron en tubos de ensayo alícuotas de diferentes volúmenes de muestra y se completó a 1.0 ml con agua destilada más 5.0 ml de reactivo D (Apéndice II); se

agitó vigorosamente y se dejó reposar por 10 min. Posteriormente se agregaron 0.5 ml de reactivo de Fenol Folin-Ciocalteu diluido en agua destilada 1:1, se agita y se deja reposar 30 min. Se lee D.O a una longitud de onda de 590 nm (Spectronic 21D) y la absorbancia obtenida fue interpolada en una curva estándar de albúmina serica bovina. Cada determinación se hizo al menos por triplicado.

4.6. CONCENTRACION DEL FILTRADO LIBRE DE CELULAS

4.6.1 Precipitación con sulfato de amonio de la proteína total del filtrado xilanolítico.-

A partir del filtrado libre de células (FO), se tomaron muestras de 16.0ml y se colocaron en baño con hielo a 4°C en vasos de precipitado de 50ml de capacidad, a continuación, a cada vaso se le añadió lentamente el sulfato de amonio en la cantidad correspondiente para llevarlo al porcentaje de saturación requerido: 8.37g para 80%, 9.78g para 90% y 10.54g para 95% (Harris y Angal, 1989), manteniendo agitación lenta y constante. Posteriormente, la solución se dejó en las mismas condiciones por 30min, para después centrifugar cada volumen en una centrifuga Sorvall a 11000 xg por 30min a 4°C. Los precipitados obtenidos fueron resuspendidos en 4.0ml de buffer acetato de sodio, 0.1M, pH 5.5. El precipitado resuspendido y el sobrenadante de cada prueba, fueron dializados por 4.5h contra agua destilada con bolsas para diálisis con capacidad de corte de 12-14 kDa, haciendo cambios de agua cada 30min

4.6.2 Precipitación con acetona de la proteína total del filtrado xilanolítico.-

Se tomaron 16.0 ml de **FO** dializado y se colocaron en un vaso de precipitado de 50ml de capacidad (en un baño con hielo) y se agitaron suavemente con un agitador magnético. A continuación fueron añadidos por goteo, dos volúmenes de acetona (previamente enfriada a -20°C en hielo seco). Posteriormente, la solución se mantuvo en las mismas condiciones por 30min y después se centrifugó a 4°C en una centrifuga Sorvall a 2300 xg por 15min. El sobrenadante fue desechado y el precipitado resuspendido en 4.0 ml de buffer citratos pH 4.8, 0.078M y dializado por cinco horas contra el mismo buffer, con bolsas de diálisis de 12-14 kDa de capacidad de corte, haciendo cambios de buffer cada hora.

4.6.3 Ultrafiltración del filtrado xilanolítico.-

El filtrado **FO** (9.0L) se concentró por un sistema Pellicon Cassette System (Millipore Co. Massachussets U.S.A) de ultrafiltración por flujo tangencial equipado con una membrana de filtración de 10,000 kDa de capacidad de corte. El lote se concentró siete veces obteniéndose 1.6L de **FO** ultrafiltrado (**FOu**), el cual se dividió en volúmenes más pequeños para su almacenamiento a -20°C. Este paso dio como resultado la concentración del color café presente en el filtrado libre de células y ocasionó un incremento en la intensidad del mismo.

4.7. FRACCIONAMIENTO POR CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO DE LA ACTIVIDAD ENDOXILANOLITICA DE *Streptomyces sp.* CH-M-1035

4.7.1 Preparación de las muestras para cromatografía de intercambio iónico.-

Se liofilizaron 300ml de **FOu** y fueron resuspendidos en 140ml de buffer acetato de sodio 0.1M, pH 5.5, los cuales fueron dializados por 4h contra el mismo buffer 0.05M, con bolsas para diálisis de 3.5 kDa de capacidad de corte, haciendo cambios del mismo buffer cada hora. El volumen recuperado (175ml) fue liofilizado nuevamente para concentrarlo y después fue resuspendido en 27ml del mismo buffer pH 5.5, 0.01M y dializados contra este último en las mismas condiciones, obteniéndose al final 33.0 ml de filtrado xilanolítico concentrado (FC) con un contenido de 5.02mg de proteína por ml, el cual fue usado para el fraccionamiento por intercambio aniónico.

4.7.2. Preparación de las columnas de intercambio iónico.-

Se pesaron aproximadamente 25g de resina de intercambio iónico y se colocaron en un vaso de precipitado añadiendo 400-800 ml del buffer de inicio de la elución (el tipo de buffer usado se especifica para cada caso en la leyenda de la figura correspondiente). Esta suspensión se agitó lentamente durante 15min con agitador magnético, posteriormente se dejó sedimentar la resina por 10-15min; después de lo cual, se decanta el buffer sin el sedimento, con lo cual se remueven los finos, y se añade más buffer. Esta operación fue repetida hasta que la resina fue equilibrada (cuando el pH del buffer claro es el mismo que el del buffer de inicio y se mantiene

constante). A continuación, se procedió a degasificar la suspensión de resina colocándola en un matraz quitasato con barra magnética y el matraz fue tapado y conectado a una bomba de vacío (Koblenz modelo FE-1500) sobre un agitador magnético, hasta que dejaron de salir burbujas del intercambiador iónico (aproximadamente 1-2h).

Paralelamente al proceso anterior, fue montada en un soporte universal, una columna de vidrio con envoltura refrigerante (LKB de Pharmacia de 1.6 x 35cm), de acuerdo al manual de Instrucciones para Columna de Cromatografía de Pharmacia y alineada verticalmente. El adaptador inferior fue colocado a una altura aproximada de 7.0cm dentro de la columna.

El tubo de salida fue cerrado con una pinza y fueron colocados 45-50ml de la suspensión del intercambiador iónico por medio de una pipeta de plástico con una abertura de 0.35mm de diámetro, evitando la aparición de burbujas de aire. Posteriormente se procedió a empaçar el lecho del intercambiador: primero dejándolo sedimentar hasta que se observó un límite bien definido entre el lecho del intercambiador y el buffer. A continuación, con el tubo de salida cerrado, fue colocado el adaptador superior (previamente conectado a una bomba peristáltica Cole Parmer WZ1R057), presionando hasta que el mismo quedó en la superficie del lecho; finalmente, fue abierto el tubo de salida y pasados aproximadamente 300ml del buffer de inicio a una velocidad de flujo de 5.0ml por minuto; el buffer fue colectado en vasos de precipitado de 50ml y se le midió el pH a diferentes tiempos para determinar

cuando la columna ya estuviera equilibrada. Una vez que salió todo el buffer, el tubo de salida fue cerrado y se retiró el adaptador superior para colocar la muestra. La columna fue empacada a una altura del lecho de 17-18cm,

En cada caso, tanto el tipo de buffer de inicio, como el pH y la molaridad usados son especificados en las leyendas de las figuras correspondientes. Todos los buffers se adicionaron con 0.01% de azida de sodio (NaN_3) para evitar contaminación.

4.7.3. Cromatografías de intercambio iónico.-

4.7.3.1. Cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-Celulosa

En la superficie del lecho de la resina fueron colocados 12 ó 15ml de muestra (según se especifica en resultados) con una pipeta pasteur, a continuación se abrió el tubo de salida y se dejó que la muestra pasara a través de la columna. Posteriormente, fue añadido un poco de buffer y colocado el adaptador superior. La muestra fue eluida con el buffer de equilibrio hasta que dejó de detectarse proteína (estimada por absorbancia a 280nm) y posteriormente con KCl en el mismo buffer (tanto el tipo de buffer como las concentraciones de KCl usadas, están especificadas en las figuras 9 y 14).

Fraciones de 5.0ml fueron recuperadas manualmente en tubos graduados colocados en baño con hielo y medida su **D.O** a 280nm. Durante la elución de la muestra se mantuvo una velocidad de flujo de 2.5ml min^{-1}

4.7.3.2. Cromatografía de intercambio catiónico en CM-Celulosa ó CM-Sephadex .-

Las fracciones de los picos con actividad endoxilanolítica, obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-Celulosa, fueron mezcladas, dializadas contra agua desionizada con bolsas de diálisis de 3.5 kDa de capacidad de corte, liofilizadas, resuspendidas en 2.0-6.0ml del buffer de equilibrio y cromatografiadas en columnas de intercambio catiónico. En todos los casos las muestras fueron colocadas como se describió en (4.7.3.1) en la columna correspondiente y eluidas con el buffer de inicio (el cual es especificado en las figuras 10, 11, 12 y 13 respectivamente). La velocidad de flujo se mantuvo a 1.5ml por minuto y como en el caso anterior, las fracciones fueron colectadas manualmente en tubos graduados en baño con hielo y determinada su D.O. a 280nm.

4.8 EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD ENDOXILANOLITICA EXTRACELULAR DE *Streptomyces* sp. CH-M-1035

Se determinó el efecto del pH sobre la actividad endoxilanolítica en el filtrado original (FO), en el filtrado concentrado (FC) y en los picos obtenidos en el fraccionamiento cromatográfico (P-I, P-II y P-III).

Excepto FO, cada muestra a analizar fue diluida con buffer acetato de sodio. Para FC se usó buffer 0.1M, pH 5.5 (el mismo que se usó para determinar la actividad de FO), para ajustarlo a una actividad similar a FO. Para los picos, se utilizó buffer 0.01M, pH 5.0 (el mismo en el que se eluyeron los picos), para diluirlos a una

actividad de 1.0 Uml^{-1} . Las diluciones fueron: **FC** (1:20), **P-I** (1:15), **P-II** (1:4.33) y **P-III** (1:2.34). Posteriormente, en un sistema de reacción conteniendo 0.1M de buffer citratos o acetato de sodio (según se especifica en la leyenda de la figura correspondiente), ajustado a diferentes valores de pH en un rango de 3.0 a 6.0; se determinó la actividad endoxilanolítica de 0.3ml de cada muestra, en las condiciones normales de ensayo.

Se comprobó que en ninguno de los casos, el pH del sistema de reacción varió al añadir la alícuota de enzima.

4.9. EFECTO DEL pH Y DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ESTABILIDAD DE LA ACTIVIDAD ENDOXILANOLITICA

Se determinó la estabilidad al pH y a la temperatura de la actividad endoxilanolítica en los picos P-I, P-II y P-III obtenidos del fraccionamiento cromatográfico.

4.9.1. Efecto del pH.-

Alicuotas de cada pico fueron diluidas como se describió en 4.8. Posteriormente, 1.0ml de cada dilución fue mezclado con 2.5ml de buffer acetato de sodio 0.1M a diferentes valores de pH: 4.8, 5.0, 5.3, 5.5, 5.6, 5.8 y 6.0. A continuación, los tubos fueron incubados a 50°C por 20h. De cada tubo se tomaron alícuotas de 0.3ml a diferentes tiempos (0, 0.5, 1, 3, 6 y 20h) y se les determinó

actividad endoxilanolítica en las condiciones ya descritas anteriormente. Como en el caso anterior, el pH del sistema de reacción no varió al añadir la muestra enzimática.

4.9.2. Efecto de la temperatura.-

Alicuotas de cada pico fueron diluidas como se describió en 4.8 (P-I: 0.614 U, P-II: 0.408 U, P-III 0.396 U). De cada muestra se tomaron 3.0ml y se colocaron en tubos de ensayo los cuales fueron incubados sin sustrato a 40, 60 y 65°C. Cabe señalar que no fue determinada la estabilidad a 50°C puesto que en los anteriores ensayos de estabilidad al pH, la preincubación a 50°C por 1h no causó pérdida apreciable de actividad en alguno de los picos. Durante la incubación, alícuotas de 0.3ml fueron tomadas a los 0, 30 y 60min y colocadas en tubos sobre un baño con hielo. A continuación, la actividad endoxilanolítica fue determinada en las condiciones normales de ensayo. Cabe mencionar que la estabilidad a 50 °C no fue medida

4.10. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO SOBRE LA ACTIVIDAD ENDOXILANOLITICA

Alicuotas de 0.3ml de P-I (diluido 1:10, con buffer acetato de sodio 0.01M, pH 5.0), fueron incubadas por 10min a 50°C en un sistema de reacción conteniendo diferentes concentraciones de sustrato en un rango de 1-15mg. Para esto se tomaron diferentes alícuotas (0.2 -1.7ml), de una solución de xilanos de abedul (7.0mg ml^{-1}) en buffer acetato de sodio 0.1M, pH 5.5 y cuando fue necesario, se completó el volumen de la mezcla sin enzima a 1.7ml con el mismo buffer. A continuación, se determinó la actividad endoxilanolítica en las condiciones normales de ensayo.

Cada determinación de actividad se hizo por triplicado y se promedió. Posteriormente se graficaron los recíprocos de los promedios, contra los de la concentración de sustrato y se calcularon los parámetros cinéticos por el método de Lineweaver-Burk.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

En este trabajo se propuso como objetivo principal llevar a cabo el fraccionamiento cromatográfico de las xilanasas extracelulares producidas por *Streptomyces* sp. CH-M-1035 con el fin de conocer la composición enzimática del sistema xilanolítico extracelular que produce este actinomiceto, así como algunas propiedades de sus componentes enzimáticos.

Para lograr este objetivo, en primer lugar se determinaron las cinéticas de producción de las xilanasas extracelulares de *Streptomyces* sp. CH-M-1035 sobre xilanos de abedul y bagacillo de caña en fermentador de 14L, con el fin de conocer el tiempo óptimo de su producción a este nivel.

Se usaron estos dos sustratos porque, como se mencionó anteriormente, se ha visto a nivel matraz que ambos inducen eficientemente la producción de enzimas xilanolíticas (Flores *et al.*, 1996³), por lo que se consideró conveniente la comparación de la cinética de producción a nivel fermentador de 14L, con un sustrato homogéneo como es el xilano de abedul y un sustrato heterogéneo insoluble y natural, como es el bagacillo de caña, a fin de observar si existen diferencias en cuanto a la producción de actividad endoxilanolítica volumétrica (AEX), en actividad específica (AE) y en el tiempo óptimo de producción.

Por otra parte, las cinéticas de producción de xilanasas fueron llevadas a cabo en fermentador de 14L, con el fin de obtener la cantidad suficiente de filtrado enzimático libre de células que se requiere para el fraccionamiento.

Debido a que no han sido realizados los estudios de optimización de la producción a nivel fermentador de 14L, en este trabajo fueron usadas las condiciones de producción óptima de xilanasas por *Streptomyces* sp. CH-M-1035 que habían sido establecidas con anterioridad a nivel matraz en nuestro laboratorio (Flores *et al.*, 1996^b), excepto la preparación del inóculo, que en este estudio fue micelio de 24h de edad crecido en medio completo y la concentración de xilanos fue de 0.15% p/v.

En la **fig. 4** se muestra la cinética de producción de xilanasas extracelulares con xilanos de abedul (0.15% p/v), en fermentador de 14L. En esta figura se puede observar que la mayor producción de AEX se obtiene desde las 36h de cultivo. Este resultado es congruente con las cinéticas de producción obtenidas en matraz con 200ml de medio de cultivo reportadas por Flores, *et al* (1996^b). Sin embargo, en el caso reportado, la actividad decae al poco tiempo de haber alcanzado el máximo de producción, y como se muestra en la **figura 4**, a nivel fermentador la producción se mantiene constante casi hasta el final de la fermentación. Este comportamiento puede deberse a que las condiciones de aireación y agitación son mejores que a nivel matraz agitado. En la literatura revisada se reportó que para el microorganismo xilanolítico y celulolítico *Aureobasidium* sp. CH-M-1018, las cinéticas de producción de xilanasas fueron similares tanto a nivel matraz como en fermentador de 14L (Acuña, 1991) lo que confirma la conveniencia de integrar los estudios de producción a diferentes volúmenes, de enzimas xilanolíticas con *Streptomyces* sp. CH-M-1035.

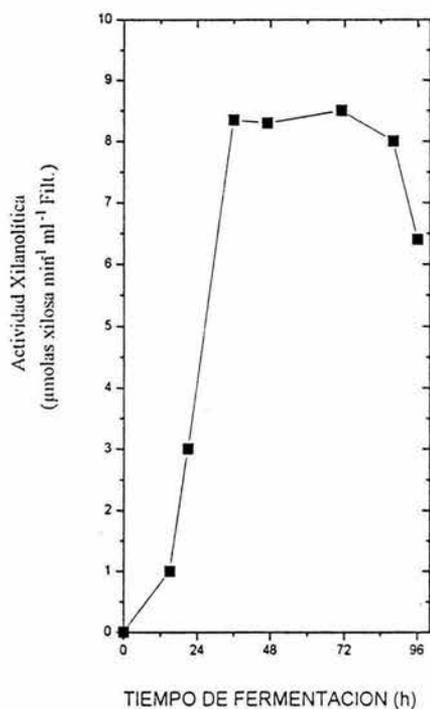


Figura 4.- Producción de xilanasas extracelulares de *Streptomyces* sp. CH-M-1035 cultivado en fermentador de 14L (Microgen), con medio mínimo (9.5L) y xilanos de abedul 0.15%, inoculado con 500ml de micelio precrecido 24h en medio completo. El cultivo se incubó a 37°C, con agitación de 200rpm y aireación de 1vvm.

La cinética de producción de β -xilosidasa no se realizó debido a que no se pudo detectar esta actividad en ninguno de los filtrados libres de células obtenidos.

Como se observó en la Fig. 4, que la mayor producción volumétrica de AEX fue obtenida desde las 36h y también que se presentó un decaimiento de la misma después de las 72h de cultivo, se realizó una nueva producción de xilanasas en xilanos de abedul como única fuente de carbono; pero con el objeto de recuperar el sobrenadante en el tiempo de máxima producción.

Esta última fermentación para la producción de xilanasas se realizó en un fermentador Labroferm en vez del Microgen anteriormente usado, puesto que el primero está equipado con tres jarras de fermentación de 14L en vez de una, por lo que se puede obtener un volumen mayor de medio de cultivo (10 litros de medio en cada jarra), lo que era deseable en virtud de la necesidad de contar con un volumen mayor de filtrado libre de células. Cabe señalar que ambos reactores están equipados para mantener las mismas condiciones de cultivo, por lo que se considera que la cinética de producción es similar.

No obstante, se debe considerar también que la concentración de la fuente carbono fue aumentada a 0.5%p/v. Este incremento fue debido a que se tenían evidencias que indicaban que en experimentos de producción llevados a cabo en matraz agitado, el aumento en la concentración de sustrato mejoraba los rendimientos en la producción (Rodríguez, 1994; Flores, *et al* 1996^b), por lo que se pensó que se podría tener el mismo efecto a nivel fermentador. Debido a este cambio fue necesario

seguir nuevamente la producción de xilanasas en el tiempo. Este seguimiento fue realizado a las 20, 22, 24 y 25 horas, ya que se había observado que en el rango comprendido entre las 20 y hasta las 36h, se detectaban los mayores cambios en la producción, por lo que se consideró que es dentro de este intervalo donde se podrían presentar las mayores diferencias en los rendimientos con respecto al experimento anterior.

Así, los resultados de esta última fermentación se muestran en la **Tabla II**, en la que se observa que la máxima producción se alcanzó a las 24h de cultivo, puesto que se detectó un decaimiento en la actividad volumétrica una hora después, en comparación con la fermentación en xilanos de abedul 0.15% presentada en la Fig.4, en la que prosiguió el aumento en la actividad hasta las 36h de cultivo. Es decir, que el tiempo de máxima producción se redujo en doce horas.

TABLA II
Producción de actividad endoxilanólítica de
Streptomyces* sp. CH-M-1035 con xilanos de abedul 0.5%

Jarra	Tiempo de fermentación (Horas)				
	0	20	22	24	25
A	0	2.16	7.07	7.83	6.96
A'	0	2.0	6.94	7.7	7.04

*El cultivo fue llevado a cabo en dos jarras del fermentador de 14L (Labroferm). Las condiciones de cultivo se especifican en la Fig.4. La actividad xilanólítica esta reportada como $\mu\text{M xilosa min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ de filtrado.

También se observó que a diferencia de la producción de xilanas llevada a cabo con xilanos de abedul al 0.15% (p/v), con 0.5% se obtuvo una actividad máxima de aproximadamente 7.8 U ml^{-1} esto es 5% menor que la producción máxima obtenida anteriormente, asimismo se observó un decaimiento en la AEX de aproximadamente 10% una hora después de haber alcanzado el máximo.

Como fue mencionado, con el incremento en la concentración de sustrato de 0.15 a 0.5% (p/v), se alcanzó más rápidamente el nivel máximo de producción; el cual, sin embargo, resultó ligeramente menor. Además, en este último caso se registró un rápido decaimiento en la producción. Estos resultados no concordaron con lo que se había obtenido anteriormente a nivel matraz; puesto que en fermentador de 14L, al incrementar la concentración de sustrato se observó un efecto negativo sobre la producción volumétrica. No obstante, cabe resaltar que en los primeros experimentos llevados a cabo por Flores y col. (1996³) en matraz agitado, no fueron probadas concentraciones de sustrato inferiores al 0.5%p/v; por lo que estos nuevos resultados podrían indicar que a nivel fermentador de 14L, la producción puede mejorarse a concentraciones de sustrato inferiores al 0.5%.

Se decidió colectar el filtrado del cultivo a las 25 y no alrededor de las 36h como se tenía contemplado en un principio. De esta manera, se obtuvo un lote de filtrado enzimático libre de células de 9.5L con 7.0 U ml^{-1} de actividad, 0.4 mg ml^{-1} de proteína extracelular, 17.5 U mg^{-1} de actividad específica y sin actividad de β -

xilosidasa. Este lote fue el que se utilizó en todos los experimentos de concentración y fraccionamiento reportados en este estudio.

Como fue mencionado, se decidió utilizar el filtrado del cultivo sobre xilanos purificados para implementar los métodos de fraccionamiento de la actividad xilanólítica de *Streptomyces* sp. CH-M-1035. Esto fue debido a que el crecimiento del microorganismo en un sustrato heterogéneo como es el bagacillo de caña, puede inducir la secreción de mayor cantidad de enzimas, puesto que este sustrato contiene además de xilanos, otros polisacáridos hemicelulósicos: mananos, arabinanos y galactanos, además de celulosa y compuestos de naturaleza proteica (du Toit, *et al* 1984), los cuáles por sí mismos podrían incrementar la complejidad del medio de cultivo y dificultar el fraccionamiento de las xilanasas. Sin embargo, también fue realizada la cinética de producción en bagacillo de caña con el fin de comparar ambos perfiles de producción, ya que es del interés de nuestro laboratorio, producir eventualmente a las enzimas xilanolíticas a mayor escala sobre este desecho agroindustrial.

En la **fig. 5** se presenta la cinética de producción de actividad endoxilanólítica extracelular de *Streptomyces* sp. CH-M-1035 utilizando bagacillo de caña de azúcar como única fuente de carbono. La AEX máxima que se obtuvo fue de 4.2 Uml^{-1} a las 96h de cultivo y fue 50% menor que la obtenida en xilanos 0.15%. Sin embargo, no se observa un decaimiento en la producción al final de la fermentación, por lo que es posible que 96h no sea el tiempo óptimo de producción. En la **Fig.5** también se puede

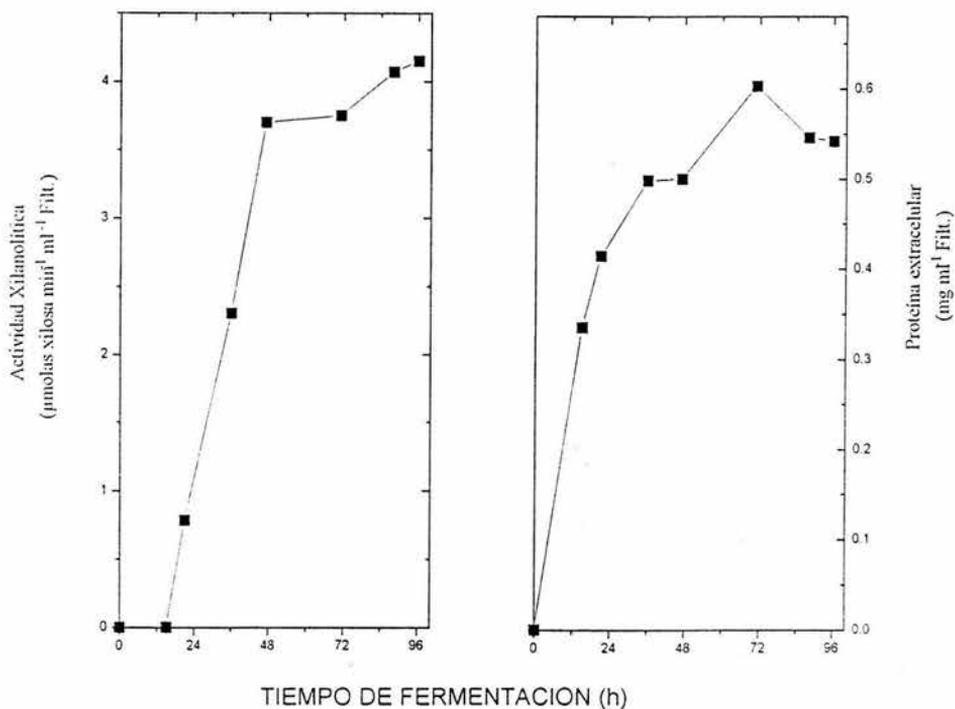


Figura 5.- Producción de xilanasas extracelulares de *Streptomyces* sp. CH-M-1035 cultivado en fermentador de 14L (Microgen), con medio mínimo (9.5L) y bagacillo de caña al 1%, inoculado con 500ml de micelio precrecido 24h en medio completo. El cultivo se incubó a 37°C, con agitación de 200rpm y aireación de 1vvm.

ver que la producción de proteína extracelular alcanzó el máximo alrededor de las 72h, aunque a las 96h la cantidad de proteína detectada fue 7% menor (0.54 mg ml^{-1}), a la obtenida con xilanos 0.15% (0.58 mg ml^{-1}).

Por ahora no es posible clarificar las causas de las diferencias en la producción volumétrica obtenidas en ambos sustratos. Sin embargo, cabe resaltar que los niveles de producción máxima obtenidos en fermentador de 14L con bagacillo de caña 1%, fueron al menos 29% más altos que los obtenidos en matraz agitado con este mismo sustrato y con xilanos de abedul a la misma concentración (Flores et al., 1996³). Esto indica la conveniencia de continuar los estudios de producción de xilanasas a mayores volúmenes.

5.1. EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD ENDOXILANOLITICA EXTRACELULAR DE *Streptomyces sp. CH-M-1035*

Anteriormente, los ensayos de AEX de *Streptomyces sp. CH-M-1035* eran llevados a cabo con buffer citratos 0.078M, pH 4.8 (Zuleta, 1995; Rodríguez, 1994). Sin embargo, durante los ensayos enzimáticos se observó que al diluir este buffer a una concentración de 0.045M con agua destilada, el pH aumentaba 0.09 unidades y como resultado, se incrementaba la actividad xilanolítica. Por tal motivo, fue necesario determinar el efecto del pH, en un rango de 3.0 a 6.0, sobre la AEX de FO, utilizando en este experimento intervalos de 0.2 a 0.3 unidades de pH con el fin de determinar con mayor precisión su pH óptimo.

En la **Figura 6** se presenta la curva del efecto del pH sobre la AEX de *Streptomyces* sp. CH-M-1035. Como se puede ver por la disposición de los puntos en la línea de unidades de actividad, la curva presenta una típica forma de campana. Asimismo, se observa que el pH óptimo está en 5.5, ya que se obtuvo la máxima actividad que fue de 5.5 U ml⁻¹. A este pH, la actividad fue 14% más alta que a pH 4.8, por lo que a partir de este experimento se utilizó pH 5.5 para determinar la AEX.

En esta gráfica también puede ser visto que hacia el lado ácido, la actividad disminuye 90% a pH 3.0 en relación a la obtenida a pH 5.5 y hacia arriba de este pH, la AEX decae 10% a pH 6.0. La actividad no fue determinada a valores de pH más altos puesto que el rango utilizado fue suficiente tanto para definir el pH óptimo, como también para determinar que en el intervalo comprendido entre pH 4.8 a 6.0, la actividad relativa es igual o mayor a 85%. Esto es importante puesto que se considera que la actividad endoxilanolítica es óptima dentro de este intervalo (McCarthy *et al.*, 1985). Similares resultados fueron obtenidos para *Streptomyces lividans* por Kluepfel y col. (1986), quienes determinaron que el pH óptimo es 6.0 y del 85% al 100% de actividad máxima se mantiene en un rango de pH de 5.0 a 6.5. Asimismo Okeke y Paterson (1992) observaron que la AEX del filtrado de cultivo de *Streptomyces* sp. EC22 presenta también un pH óptimo de 5.5; aunque en este último caso, se retiene 90 a 100% de su actividad máxima en un intervalo de pH más amplio (4.5 a 7.0).

Para 4 cepas de actinomicetos reportados por McCarthy y col. (1985) la AEX de los filtrados del cultivo fue óptima en un rango de pH de 5 a 8. Para estos

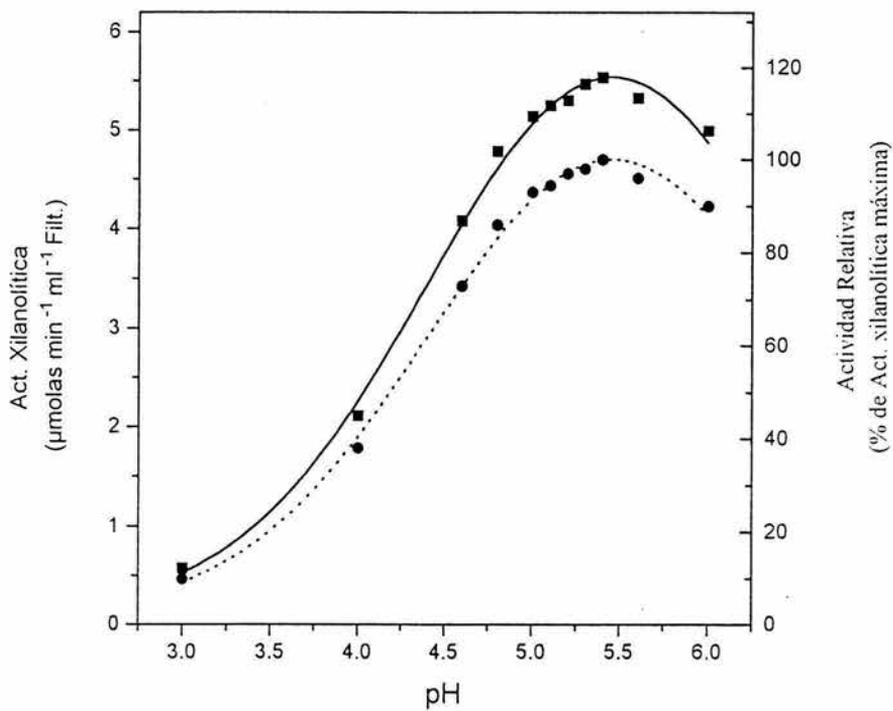


Figura 6.- Efecto del pH sobre la actividad xilanolítica de un filtrado libre de células obtenido del cultivo de *Streptomyces* sp. CH-M-1035 sobre xilanos de abedul 0.5% en fermentador de 14L (Labroferm). La actividad fue medida en un sistema de reacción con xilanos de abedul al 0.75% en buffer citrato 0.1M. (■) Act. xilanolítica, (●) Act. Relativa.

investigadores, las xilanasas y celulasas de los actinomicetos generalmente presentan valores de pH óptimos cercanos a la neutralidad o alcalinos: pH 6.0 a 9.0, en contraste con los requerimientos de pH de las enzimas fúngicas que tienden a ser más ácidos: pH 3.5 - 5.0 (Ball y McCarthy, 1989). A diferencia de esto, los actinomicetos *Streptomyces* sp. CH-M-1035 y *Streptomyces* sp. EC22, no exhiben valores de pH óptimo cercanos a la neutralidad, ya que ambos presentan un pH óptimo ligeramente más ácido (pH 5.5). Una situación similar ocurre con algunos hongos; por ejemplo, se ha reportado que el filtrado xilanolítico del hongo *Aspergillus sidowii* MG49 presenta un pH óptimo un poco menos ácido (pH 5.5) que lo reportado para la mayoría de las xilanasas fúngicas (Ghosh *et al.*, 1993).

También fue considerado conveniente determinar el efecto del pH sobre la AEX pero utilizando el filtrado que fue ultrafiltrado y liofilizado (FC), con el fin de comparar el efecto del pH entre éste y el filtrado original (FO). En este último caso, el efecto del pH sobre la actividad xilanolítica de FC fue determinado utilizando dos tipos de buffer: citratos y acetato de sodio. Cabe señalar, que como FC es un concentrado, fue diluido para obtener una cantidad de proteína similar a la que se utilizó en FO.

Como puede ser visto en la **Figura 7**, el pH óptimo es el mismo con los dos tipos de buffer (pH 5.8); sin embargo, la forma de la curva es diferente; ya que con buffer acetato de sodio, la AEX es 10% más alta al pH óptimo. Asimismo, declina más lentamente hacia el lado ácido; de manera que, al pH más bajo que fue determinado

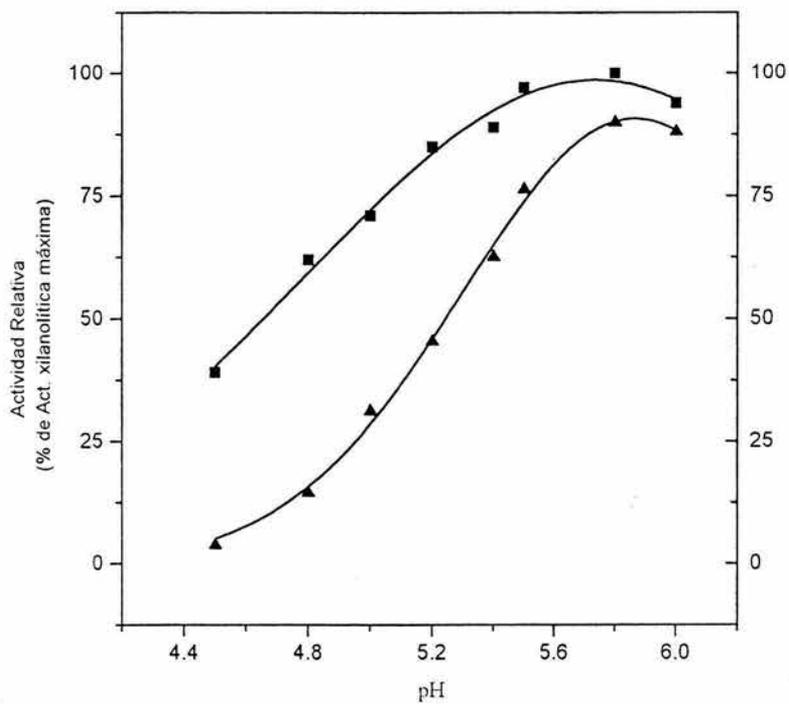


Figura 7.- Efecto del pH sobre la actividad xilanolítica del filtrado concentrado (FC) obtenido del cultivo de *Streptomyces* sp. CH-M-1035 sobre xilanos de abedul 0.5% en fermentador de 14L (Labroferm). La actividad fue medida en un sistema de reacción con xilanos de abedul al 0.75% en buffer citratos 0.078 M (▲) y buffer acetato de sodio 0.1M (■).

(pH 4.5), la AEX obtenida con acetato de sodio es 34% más alta. De manera similar, fue observado que el perfil de actividad de la xilanas II del ascomiceto termofílico *Thielavia terrestris* 255B, declina más lentamente hacia el lado ácido cuando es usado buffer acetato de sodio que buffer citratos (Gilbert *et al.*, 1992).

Finalmente, en la **Figura 7** también se puede observar que se retiene más del 90% de la AEX máxima en un rango de pH más amplio cuando se usó buffer acetato de sodio (pH 5.4 a 6.0) que usando buffer citratos (pH 5.8 a 6.0).

El pH óptimo obtenido para FC (pH 5.8) es ligeramente mayor (0.3 unidades de pH) en los dos buffers que el que se había obtenido para FO en citratos. Debido a que en ambos casos la AEX fue determinada con buffer citratos y se utilizaron concentraciones similares de proteína al hacer las determinaciones, esta diferencia pudiera ser debido a la ausencia de iones y otros compuestos de bajo peso molecular que fueron removidos de FC mediante ultrafiltración. Sin embargo, por el momento se desconoce la causa directa de este desplazamiento.

No obstante, en vista de que el pH óptimo es igual en ambos tipos de buffer; para determinar la AEX durante los experimentos de fraccionamiento, se decidió utilizar buffer acetato de sodio a pH 5.5 (ya que la actividad resultó prácticamente igual que a pH 5.8). Se prefirió este tipo de buffer puesto que es menos susceptible a contaminación, además de que es ampliamente reportada su utilización tanto para determinación de AEX como en los estudios de fraccionamiento cromatográfico de la misma. (Biely *et al.*, 1980; Da Silva *et al.*, 1994; Esteban *et al.*, 1982; Grabski y

Jeffries, 1991; John *et al.*, 1979; Keskar *et al.*, 1989; Khandke *et al.*, 1989; Kormelink *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1993; Nakajima *et al.*, 1984; Nanmori *et al.*, 1990; Ohkoshi *et al.*, 1985; Okeke y Obi 1992; Slade *et al.*, 1989; Tan *et al.*, 1985; Tsujibo *et al.*, 1992 y Wang *et al.*, 1993).

5.2. CONCENTRACION DEL FILTRADO LIBRE DE CELULAS

Para llevar a cabo el fraccionamiento cromatográfico de la actividad endoxilanolítica de *Streptomyces* sp. CH-M-1035, en primer lugar se requirió concentrar el filtrado original (FO) obtenido del cultivo del microorganismo a nivel fermentador en xilanos de abedul al 0.5%.

Para concentrar FO fueron probados varios métodos con el fin de elegir el más adecuado y a continuación se presentan los resultados de cada prueba.

5.2.1. Concentración de la proteína total del filtrado xilanolítico por precipitación con sulfato de amonio.-

En primer lugar, fue realizada la precipitación de proteína de FO con sulfato de amonio. Fueron probados porcentajes altos de saturación: 80, 90 y 95%, con el fin de precipitar la mayor cantidad posible de actividad y proteína.

Como se observa en la **Tabla III**, la AEX total obtenida después de precipitar con sulfato de amonio a estos porcentajes de saturación, fue de 51, 62 y 55 U totales, respectivamente; tales valores corresponden en orden al 54, 65 y 57% de la AEX

original. En cuanto a los rendimientos en la cantidad de proteína que precipita al 80% de saturación, se obtuvo aproximadamente el 22% de la proteína (0.758mg) y esta cantidad aumentó a 25.6% al 90% de saturación y a 26.2 % al 95%. Estos resultados indican que del 80 al 90% de saturación, el incremento de la AEX que precipita fue del 11.4%. En cambio, al 95% de saturación, aunque hay un ligero aumento en la cantidad de proteína que precipita (0.6%), hay una disminución del 8% en la recuperación de actividad. Es posible que esta disminución de la AEX que precipita al 95% de saturación sea indicio de un efecto de desnaturalización de las xilanasas debido al aumento en la concentración de sulfato de amonio, el cuál no pudo ser revertido eliminando la sal por diálisis. Debido a este efecto, y a que el aumento en la cantidad de proteína que precipita es mínimo, no fueron probados mayores porcentajes de saturación.

Por otra parte, como era posible que los porcentajes de recuperación de AEX obtenidos a los diferentes porcentajes de saturación probados, fueran consecuencia de una separación inicial de diferentes componentes xilanólitos en las dos fracciones obtenidas (sobrenadante y precipitado). fue determinada la AEX en los sobrenadantes dializados. Aunque se detectó de un 25 a un 30% de proteína, no se encontró actividad alguna en los sobrenadantes, no obstante esto no descarta la posibilidad de que estuviera presente algún componente cuya actividad no pudo ser detectada por encontrarse diluida o desnaturalizada.

TABLA III
CONCENTRACION DEL FILTRADO XILANOLITICO DE *Streptomyces* sp. CH-M-1035
POR PRECIPITACION CON SULFATO DE AMONIO

% de saturación	Vol. final	PROTEINA			ACTIVIDAD ENDOXILANOLITICA			A.E	V.P.
		mg ml ⁻¹	TOTAL	%	U ml ⁻¹	TOTAL	%		
0	16	0.216	3.456	100	6	96	100	28	1
80	4.8	0.158	0.758	21.9	10.73	51.5	53.6	68	2.43
90	5.0	0.177	0.885	25.6	12.46	62.3	65	70.4	2.5
95	4.7	0.193	0.907	26.2	11.72	55.08	57	60.72	2.17

Para cada prueba se utilizó filtrado xilanolítico libre de células FO, obtenido del cultivo de *Streptomyces* sp. CH-M-1035 sobre xilanos de abedul 0.5% en fermentador de 14L (Labroferm). A cada volumen de 16ml le fue añadido sulfato de amonio como se indica en Materiales y Métodos, posteriormente la mezcla fue centrifugada a 11000 x g por 30min y la pastilla separada del sobrenadante y resuspendida en 4ml de buffer acetato de sodio 0.1M, pH 5.5, las fracciones fueron dializadas y posteriormente determinada actividad endoxilanolítica y proteína.

En la **Tabla III** también se puede ver que a los diferentes porcentajes de saturación probados, se obtuvieron incrementos en la actividad específica de aproximadamente 2.4, 2.5 y 2.17 al 80, 90 y 95% de saturación, respectivamente. Este incremento se debe a que es mayor la cantidad de actividad que precipita que la proteína y por lo tanto se obtienen mayores actividades específicas.

Por los resultados obtenidos, parece ser 90% el mejor porcentaje de saturación, ya que bajo esta condición se recuperó el mayor porcentaje de AEX original (65%) y también se detectó la mayor actividad específica (70 U mg⁻¹ de proteína), que fue además, 2.5 veces más alta que la actividad específica inicial (28 U mg⁻¹ de proteína). No obstante, también fue notada una pérdida del 35% de la

actividad original, la cuál como fue mencionado, al menos en parte puede ser debida a desnaturalización. Aunque también cabe como explicación de esta disminución otras alternativas, tales como que no se detecte la actividad en el sobrenadante de sulfato de amonio, porque la enzima se encuentra más diluida o inclusive, porque haya habido una separación de un componente xilanolítico diferente cuya actividad no fue posible detectar bajo las condiciones de medición establecidas. Otra alternativa podría ser que hubiera sido debido a una separación de componentes enzimáticos que potencian la degradación del xilano por las enzimas xilanolíticas. De cualquier forma y tomando en cuenta el fraccionamiento, no resultó un método muy conveniente para concentrar la actividad de FO que va a ser fraccionada, a pesar de que es una técnica usada frecuentemente como paso inicial durante la purificación o el fraccionamiento de xilanasas extracelulares (Copa-Patiño *et al.*, 1993; Gomez y Fevre, 1993; Grabski y Jeffries, 1991; John *et al.*, 1979; Khandke *et al.*, 1989; Kilunga *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1993; Nanmori *et al.*, 1990; Pellerin *et al.*, 1991; Slade *et al.*, 1989; Viet *et al.*, 1991 y Yamaura *et al.*, 1990).

Resultados similares al nuestro, fueron obtenidos por Copa-Patiño y col. (1993) quienes usando sulfato de amonio al 70% de saturación, logran recuperar 64% de la actividad xilanolítica y 28% de la proteína extracelular del filtrado libre de células de *Phanerochaete chrysosporium*; aumentando 2.3 veces la actividad específica. Estos investigadores en parte atribuyeron la pérdida de actividad a la separación de componentes enzimáticos no xilanolíticos que actúan sinérgicamente con las

xilanasas en la degradación del sustrato. Por otra parte, la precipitación del filtrado de *Streptomyces roseiscleroticus* resultó en un incremento del factor de purificación similar al obtenido: 2.2 pero con un rendimiento en la AEX del 83% (Grabski y Jeffries, 1991).

5.2.2. Concentración de la proteína total del filtrado xilanolítico por precipitación con acetona .-

En vista de los resultados obtenidos con sulfato de amonio, decidimos probar la concentración de actividad xilanolítica por precipitación con acetona .

En este caso, se utilizó una relación acetona - filtrado de 2:1. Con este método, los rendimientos en actividad y proteína fueron similares a los obtenidos con sulfato de amonio, ya que se obtuvo una recuperación del 60% de la actividad original y un 17% de recuperación de proteína. Asimismo, como se vio con el sulfato de amonio, es mayor la actividad que precipita que la proteína total, por lo que se obtuvo un incremento en la actividad específica inicial (3.55).

A pesar de que la acetona es muy utilizada para la concentración de proteínas, en la literatura revisada solo fueron encontrados dos reportes de la utilización de este solvente orgánico para la concentración de la actividad xilanolítica de microorganismos. En el primero, se utilizó acetona 5:1 para concentrar 300 ml de filtrado del cultivo de un actinomiceto alcalofílico: *Nocardioopsis dassonvillei* con lo que obtuvo un rendimiento del 75% de actividad y un aumento de 2.2 veces la actividad específica (Tsujibo *et al.*, 1990). En el otro estudio, Okeke y Obi (1992)

reportaron haber utilizado acetona en las mismas condiciones usadas en este trabajo, para precipitar 250ml del filtrado de cultivo de *Arthrographis* sp. F4; obteniendo un rendimiento de actividad de 11.4% y un aumento en la actividad específica de 1.6 veces. Sin embargo, en estos estudios solo fue reportado el fraccionamiento de una xilanasas de cada especie.

En vista de que, como ocurrió con el sulfato de amonio, entre otras alternativas también cabía la posibilidad de que los bajos rendimientos en actividad fueran debido a una separación de componentes, este método tampoco resultó adecuado, puesto que el objeto de nuestro estudio es fraccionar todas las xilanasas presentes en el filtrado. Por este motivo, decidimos probar otro método para concentrar la actividad xilanolítica de FO.

5.2.3. Concentración de la proteína total del filtrado xilanolítico por Ultrafiltración.-

En vista de que con los dos anteriores métodos de concentración se obtuvieron bajos rendimientos en actividad xilanolítica, fue probado un equipo de ultrafiltración para concentrar el filtrado original, en base a que mediante este equipo, es posible concentrar litros de filtrado en poco tiempo, además de que las proteínas son mantenidas en solución durante todo el proceso de concentración, por lo que los niveles de desnaturalización pueden ser relativamente bajos.

En la **Tabla V** se muestran los valores de actividad y proteína de FO, antes y después de ser concentrado por ultrafiltración utilizando una membrana de 10kDa de capacidad de corte. Como se puede notar, en el concentrado que contiene las

moléculas de pesos moleculares mayores que 10kDa, la actividad xilanolítica de la muestra concentrada fue el 67% de la actividad de FO. Este valor resultó ser únicamente 2% más alto que el máximo obtenido con sulfato de amonio. No obstante, en este caso, si se logró detectar el resto de la actividad (33%) en la muestra filtrada que contenía los compuestos de pesos moleculares inferiores a 10kDa.

Por otra parte, se observó que la AEX de la muestra concentrada se debía diluir para llevarlo a una concentración de proteína similar a FO, puesto que al medir la muestra directamente solo se detectaba el 21% de la actividad original. Este efecto pudiera ser debido a que durante el ensayo de actividad del concentrado, se produce una limitación de sustrato y esto es superado ajustando la muestra a una cantidad de proteína similar a la original o un poco más baja.

En cuanto a la recuperación de proteína, de los 3.535g de proteína inicial, se recuperaron en la muestra concentrada 1194mg (34%) y 1945mg (55%) más fueron detectados en la muestra filtrada (Tabla V).

TABLA V
CONCENTRACION DEL FILTRADO XILANOLITICO DE
Streptomyces sp CH-M-1035 por ULTRAFILTRACION

	Vol. ml	PROTEINA			ACTIVIDAD XILANOLITICA		
		mg ml ⁻¹	mg x vol.	%	µmolos xilosa min ⁻¹ ml ⁻¹	µmolos xilosa min ⁻¹ x Vol.	%
FO	9000	0.393	3537	100	3.74	33660	100
MUESTRA RETENIDA:	1580	0.756	1194	34	14.4	22752	67*
MUESTRA FILTRADA:	7420	0.262	1945	55	1.49	11108	33

El filtrado xilanolítico libre de células (FO) obtenido del cultivo de *Streptomyces* sp. CH-M-1035 sobre xilanos de abedul 0.5% en fermentador de 14L (Labroferm), fue concentrado en dos ciclos de filtración por un equipo de ultrafiltración Pellicon Cassete System (Millipore Ltd.). * Para medir la AEX de la muestra concentrada, el filtrado fue diluido 1:4 con buffer acetato de sodio 0.1M.

En vista de que el 55% de la proteína pudo atravesar la membrana de ultrafiltración puede considerarse que FO es rico en compuestos de menos de 10kDa que pueden ser filtrados y los cuales dan positivo el ensayo de proteína. Asimismo, como fue detectado el 33% de la actividad en la muestra filtrada, cabe la posibilidad que por este método haya sido filtrado un componente enzimático de peso molecular cercano al límite de corte de la membrana (10kDa). Esto explicaría en parte la pérdida de actividad con los anteriores métodos de concentración, puesto que el límite de corte de las membranas de diálisis usadas para eliminar el sulfato de amonio o la acetona fue de 12 a 14kDa. A propósito de esto, ha sido reportado que xilanasas de 20 y 29 kDa de *Trichoderma harzianum* E58 fueron susceptibles de atravesar la membrana de ultrafiltración de 10 kDa de límite de corte con la que estaba equipado un equipo de ultrafiltración de la misma marca que el usado en este estudio (Tan *et al.*, 1985). En este trabajo, no se tuvo la certeza de si esta habilidad de penetración fuera debido a que ambas enzimas poseen una estructura que les permite atravesar la membrana, o si fue debido a que el tamaño de poro de la membrana no estuviera estrictamente controlado (Tan *et al.*, 1985).

En la mayoría de los casos, en el concentrado de filtrados xilanólicos que han sido ultrafiltrados, la recuperación de AEX es superior al 90%; tal es el caso de los actinomicetos *Thermomonospora fusca* (Stutzenberger y Bodine, 1992) y *Streptomyces* sp. 3137 (Marui *et al.*, 1985) y de las bacterias *Cellulomonas fimi* (Khanna y Gauri, 1993) y *Clostridium thermolacticum* (Pellerín *et al.*, 1991). En

nuestro caso, en el concentrado solo fue recuperado el 67% de la actividad xilanolítica de *Streptomyces* sp. CH-M-1035; no obstante, el resto de la actividad fue detectada en la muestra filtrada, esto podría ser indicio de que en el filtrado xilanolítico existe un tipo de xilanasas de peso molecular cercano a 10kDa; lo cual no ha sido reportado en actinomicetos. Aunque para tener la certeza de esto, sería necesario llevar a cabo otro tipo de pruebas para corroborar el buen funcionamiento de la membrana.

Mediante la ultrafiltración del filtrado xilanolítico de *Streptomyces* sp. CH-M-1035, se logró un incremento en la AEX de 3.74 a 14.4 Uml⁻¹ y la concentración de proteína aumentó alrededor de 1.92 veces (de 0.39 a 0.76 mg ml⁻¹). Asimismo, el método de ultrafiltración fue muy efectivo para concentrar FO en términos de volumen a tiempos cortos, puesto que el volumen de filtrado disminuyó casi siete veces (de 9 a 1.58 litros) mediante dos ciclos de ultrafiltración que llevaron dos horas. Sin embargo, el rendimiento en actividad xilanolítica (67 %), fue solo ligeramente superior al obtenido con los métodos anteriormente descritos. No obstante, no fue observada desnaturalización o pérdida de proteína con actividad puesto que la recuperación de AEX en la muestra filtrada y la retenida suman el 100% de la actividad original.

5.2.4. Liofilización del filtrado enzimático ultrafiltrado.-

Con el fin de obtener un concentrado cuyo volumen pudiera ser manipulado fácilmente durante el fraccionamiento por cromatografía en columna, se decidió probar

el método de liofilización, utilizando el filtrado que fue concentrado por ultrafiltración (FOu). Para esto, fue necesario llevar a cabo varias pruebas liofilizando volúmenes pequeños para poder determinar los porcentajes de recuperación de actividad y proteína que serán obtenidos después de liofilizar las muestras, esto con el fin de estimar las recuperaciones en actividad y/o proteína y así poder decidir sobre su utilización.

Los resultados de estas pruebas se presentan en la **Tabla VI**. Como se puede observar, las muestras de 150ml que fueron liofilizadas y después resuspendidas en 35ml de buffer, retuvieron alrededor del 95% de la actividad inicial sin pérdida de proteína por lo que la actividad específica se conservó prácticamente igual (18 U mg^{-1} de proteína). En vista de que al liofilizar FOu no se detectó una pérdida considerable de actividad, se juzgó conveniente utilizar este método para concentrar las muestras de filtrado xilanólico ultrafiltrado que fueron aplicadas a las columnas cromatográficas.

Por otro lado, como el volumen en el que pudo ser recuperado el material era aún demasiado grande para que pudiera ser aplicado a columnas cromatográficas, se volvió a liofilizar el material para resuspenderlo en el menor volumen posible. No obstante, como volver a liofilizar el material implicaba concentrar las sales del buffer de resuspensión, se decidió dializar las muestras que serán liofilizadas nuevamente, para evitar que el incremento en la salinidad por los cambios en la concentración del buffer, pudiera ocasionar desnaturalización (Geisow, 1991).

TABLA VI
CONCENTRACION DEL FILTRADO XILANOLITICO
DE *Streptomyces* sp. CH-M-1035 POR LIOFILIZACION

MUESTRA	Vol. Final (ml)	Proteína (mg ml ⁻¹)	Prot. Tot. mg x Vol.	Rendimiento (% Prot. Tot.)	Act. Xilanolítica (μmolas xilosa min ⁻¹ ml ⁻¹)	Act. Tot. (μmolas xilosa min ⁻¹ x Vol).	Rendimiento (% Act. Tot.)	Actividad Especifica (μmolas min ⁻¹ mg ⁻¹ de Prot)
FOu	150	0.777	115.56	100	14.4	2160	100	18.5
FOu. LIOFILIZADO	35	3.26 ±0.06	114.16	99	58.6 ± 1.0	2052	95	18.0
Dializado A (12-14 kDa)	46.5	2.25 ±0.2	104.46	90	42.7 ± 1.0	1986	92	19.0
Dializado B (3.5 kDa)	47.48	2.27 ±0.1	107.95	93	44.0 ± 2.0	2089	97	19.3

El filtrado xilanolítico obtenido del cultivo de *Streptomyces* sp. CH-M-1035 sobre xilanos de abedul fue previamente concentrado por ultrafiltración, posteriormente se liofilizó y resuspendió en buffer acetatos 0.1 M, pH 5.5, después se tomaron varias muestras las cuales fueron dializadas por 4h contra mismo buffer 0.05M, usando bolsas de celulosa de diferente tamaño de poro. La actividad xilanolítica de las muestras liofilizadas y dializadas se midió haciendo una dilución 1:4.3 con buffer acetatos 0.1M, pH 5.5. El Concentrado por ultrafiltración (FOu), fue LIOFILIZADO, resuspendido en 35ml de buffer acetatos 0.1M, pH 5.5 y dializado con membranas de diálisis de 12-14 kDa de diámetro de exclusión (A) y con membranas de 3.5 kDa (B). Los valores mostrados son el resultado de promediar tres muestras independientes.

Los resultados de dializar varias muestras liofilizadas con membranas de 12 a 14 y de 3.5 kDa de capacidad de corte, se muestran también en la **Tabla VI**. Como se puede observar, en las muestras liofilizadas con membrana de celulosa de 12 a 14 kDa, se recuperó un 92% de actividad y un 90% de proteína. En cambio, la recuperación de actividad y proteína dializando las muestras con membranas de 3.5kDa, fue más alta: 97 y 93% respectivamente.

Por el número de pruebas realizadas, no fue posible determinar si la disminución del 8% en actividad, que fue obtenida al dializar las muestras con membrana de 12 a 14 kDa de capacidad de corte, se debía o no a la difusión a través de la membrana de algún componente enzimático, por lo que decidimos utilizar membranas de diálisis de 3.5kDa de capacidad de corte para dializar todas las muestras que fueron aplicadas a las columnas cromatográficas.

Los resultados obtenidos mostraron que la liofilización y diálisis posterior con membranas de 3.5 kDa de capacidad de corte, resultaron ser métodos efectivos para concentrar **FOu**, puesto que los rendimientos obtenidos superan el 97% de recuperación de actividad. Además, la actividad específica se conservó prácticamente igual. Por lo que tales métodos fueron usados para obtener 33.0ml de filtrado xilanolítico ultrafiltrado con un total de 4390 U de actividad y 166.0mg de proteína. Este filtrado fue denominado filtrado concentrado (**FC**) y fue el que se utilizó en la cromatografía de intercambio iónico para el fraccionamiento de la actividad xilanolítica extracelular de *Streptomyces* sp. CH-M-1035. Cabe señalar, que aunque era posible

concentrar el filtrado xilanolítico original mediante liofilización directa, decidimos concentrar el filtrado después de la ultrafiltración, debido a que al ultrafiltrado ya le fueron eliminados iones y compuestos de bajo peso molecular (menos de 10kDa), lo cual resulta necesario para llevar a cabo el fraccionamiento por cromatografía de intercambio iónico.

5.3. FRACCIONAMIENTO DE LA ACTIVIDAD XILANOLÍTICA DE *Streptomyces* sp CH-M-1035 POR CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO.-

Si bien existe poca información sobre las propiedades de las xilanasas de *Streptomyces* sp. CH-M-1035 y nada sobre su fraccionamiento, en otras especies del mismo género se ha reportado el fraccionamiento de xilanasas extracelulares. Por tal motivo, se consideró pertinente llevar a cabo en primer lugar, una revisión bibliográfica con el fin de determinar cuales métodos han sido más utilizados con este propósito. Los resultados de esta revisión se presentan en la **Tabla VII**. Como se puede observar, en algunos casos se han logrado detectar por cromatografía en columna, varios picos de proteína con la misma actividad. Esto implica no solo la separación de varias proteínas, sino también el fraccionamiento de enzimas diferentes con actividad endoxilanolítica. Asimismo, se puede ver que existen diferencias entre los pesos moleculares de las xilanasas, aún en las producidas por una misma especie; sin embargo, se observa que en el fraccionamiento, las resinas de intercambio iónico son preferidas a las de filtración en gel, es decir las que están basadas en la separación

Tabla VII
FRACCIONAMIENTO DE Endo-β-1,4-D-XILANASAS
EN VARIAS ESPECIES DE *Streptomyces*

CEPA	RESINAS PARA FRACCIONAMIENTO	pH DE CORRIDA	PROPIEDADES FISICOQUIMICAS PI / PM (≈Kd)	PICOS DE ACTIVIDAD	REFERENCIA
<i>Streptomyces</i> sp. KT-23	DEAE Celulosa (2 veces) BIOGEL P100*	pH 7.0 pH 8.0	6.9 / 44.0	1	Nakajima <i>et al.</i> , 1984.
<i>Streptomyces</i> sp. 3137	DEAE Sephadex Bio-Gel P 100* Enfoque Isoel.	pH 5.5	XI 7.1 / 50.0 XIIA 10.06 / 25 XIIIB 10.26 / 25	3	Marui <i>et al.</i> , 1985.
<i>Streptomyces</i> <i>lividans</i> (66) 1326 (<i>mut.</i> 8-7)	DEAE 5 PW*	pH 8.5	5.2 / 43.0	1	Morosoli <i>et</i> <i>al.</i> , 1986.
I. <i>Streptomyces</i> <i>olivochromo-</i> <i>genes</i> II. <i>Streptomyces</i> <i>flavogriseus</i>	DEAE Biogel A i) CM-3SW HPC* ii) TSK-DEAE-3SW HPLC*	pH 7.0 pH 6.0	No Determinado	I) 3 II) 4	Johnson <i>et</i> <i>al.</i> , 1988.
<i>Streptomyces</i> T7	DEAE Celulosa Sephadex G-50*	pH 8.0	7.8 / 20.0	1	Keskar <i>et al.</i> , 1989.
<i>Streptomyces</i> <i>lividans</i> 66 (IAF42)	DEAE HPLC*	pH 8.5	8.4 / 31.0	1	Kluepfel <i>et al.</i> , 1990.
<i>Streptomyces</i> <i>roseiscleroticus</i>	CM Bio Gel* Mono Q FPLC (Int. Cat. Fuerte)	pH 4.0	9.5 / 55.0	4	Grabski <i>et</i> <i>al.</i> , 1991.
<i>Streptomyces</i> <i>lividans</i> 66 (IAF20)	DEAE HPLC*	pH 8.5	>10.25 / 22.0	1	Kluepfel <i>et al.</i> , 1992.
<i>Streptomyces</i> <i>thermoviolaceus</i> OPC-520	DEAE Toyopearl 650 M*	pH 5.0	STXI 4.2 / 54.0 STXII 8.0 / 33	2	Tsujibo <i>et al.</i> , 1992.
<i>Streptomyces</i> sp. A451	DEAE Sephadex CM Sephadex (si) Sephadex G-75*	pH 7.5	XIII 8.6 / 23.0 XIII 8.9 / 33.0	2	He <i>et al.</i> , 1993.
<i>Streptomyces</i> <i>cyaneus</i>	Superosa 12* XI QAE Sephadex DEAE Sepharosa XII DEAE Sepharosa Mono Q Columna	pH 7.5	XI 5.1 / 37.5 XII 5.3 / 34.0 XIII - / 45.0	3	Wang <i>et al.</i> , 1993.

* Método cromatográfico donde se observó la separación.

por peso molecular. También se observa que el pH inicial que se usó en las columnas de intercambio iónico durante el fraccionamiento de las xilanasas de estas cepas, fue en el 66% de los casos arriba de 7.0. No obstante, para *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 se usó pH 5.0 (Tsujibo *et al.*, 1992) y para *Streptomyces* sp. 3137 se usó pH 5.5 (Marui *et al.*, 1985).

En la **Tabla VII** también se presenta el punto isoeléctrico (PI) de varias xilanasas. Como puede observarse, los PI de estas enzimas de *Streptomyces* varían dentro de un amplio rango de valores de pH (de 4.2 a más de 10.2). Esta propiedad es importante para el fraccionamiento pues determina la carga eléctrica de la proteína de interés a un pH específico. No obstante, en la mayoría de los casos el PI se desconoce en las primeras etapas del fraccionamiento, por lo que una manera de determinar si la proteína de interés se adsorbe o no a un determinado intercambiador iónico, es llevando a cabo pruebas de adsorción en lote (“batch”), para encontrar la resina apropiada y las condiciones de enlace más adecuadas. Asimismo, en vista de que las resinas de intercambio aniónico (carga positiva), fueron utilizadas para fraccionar a las xilanasas de varias especies del género *Streptomyces* mencionadas anteriormente, se eligió probar inicialmente a un intercambiador aniónico para fraccionar las xilanasas de *Streptomyces* sp. CH-M-1035. Por este motivo, se llevó a cabo una prueba de adsorción en “batch”, utilizando como intercambiador DEAE-Celulosa equilibrado con buffer acetato de sodio 0.01M a pH 5.5.

En la **Tabla VIII** se puede ver que el 64% (107 U Tot.) de la AEX se recuperó en la fracción no adsorbida y en esta misma, se detectó el 23% de la proteína; esto dio como resultado un aumento en la actividad específica a 62 Umg^{-1} de proteína. En cambio, en la fracción que fue adsorbida a la resina y posteriormente eluída con KCl 0.5 y 1.0 M, solo se recuperó 18% de la actividad y un 46% de proteína. Como en este caso la cantidad de proteína recuperada fue mas alta con respecto a la AEX, la actividad específica disminuyó a 9.

La disminución en la actividad específica de la fracción adsorbida no fue debida a un efecto negativo del KCl, ya que se determinó la AEX de FC en un sistema de reacción conteniendo diferentes concentraciones de KCl y no se observó disminución en la actividad en los sistemas de reacción con mayor concentración de KCl con respecto al control (**Figura 8**).

El tratamiento en "Batch" con DEAE-Celulosa ha sido usado por Ohkoshi y col. (1985), en el fraccionamiento de xilanasas de *Aeromonas* sp. No. 212. En este caso, el 92% de la actividad no se adsorbó a la resina y sólo un 0.85% fue recuperada al eluir esta con 1.0 M de NaCl.

Posteriormente se llevó a cabo el fraccionamiento en columna de la actividad xilanólítica de *Streptomyces* sp. CH-M-1035, utilizando DEAE-Celulosa equilibrada con buffer acetato de sodio 0.05 M a pH 5.5. La muestra de 15 ml de FC con 2000 U de actividad, fue eluída por pasos con el buffer de equilibrio y después con el mismo buffer más KCl a diferentes concentraciones y se tomaron fracciones de 5 ml.

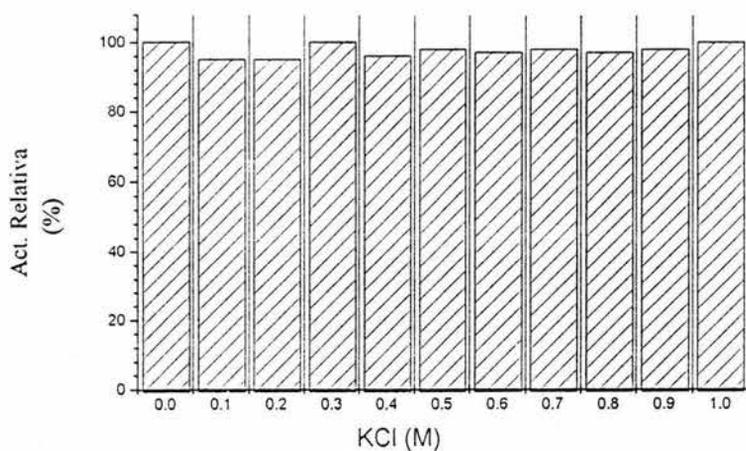


Figura 8.- Efecto del KCl sobre la determinación de la actividad xilanolítica de *Streptomyces* sp. CH-M-1035. Se utilizó el filtrado FC, el cual fue incubado en un sistema de reacción conteniendo xilanos de abedul 0.75% en buffer acetato de sodio 0.1M, pH 5.5 con KCl a la molaridad indicada.

En la **Figura 9** se muestra el perfil cromatográfico que fue detectado en los primeros 1200ml de elución. Aunque la elución se continuó hasta que se dejó de detectar proteína en las fracciones eluidas con KCl 2.0M (volumen total: 3250 ml). Como puede verse en esta figura, en el buffer de lavado se presentan doce picos de proteína; esto indicó que algunas proteínas logran ser retenidas por la resina aunque no fueran unidas fuertemente a la columna. También se observa que los primeros tres picos de proteína que fueron detectados en los volúmenes 18 a 130ml, presentan actividad xilanolítica. Posteriormente a este volumen, en las fracciones obtenidas no pudo ser detectada la actividad xilanolítica, por lo que se puede decir que no son xilanasas las proteínas que contienen los otros picos que fueron retenidos un poco más por la matriz.

Los resultados obtenidos indican que el total de la actividad xilanolítica que fue recuperada, fue el 60% (1200 U totales) de la AEX aplicada inicialmente a la columna. Asimismo, la actividad específica de las principales fracciones con actividad, se incrementó 3.6 veces con respecto a FC (94 U mg^{-1} de proteína).

Este bajo rendimiento, al menos en parte es probable que sea debido a desnaturalización durante la cromatografía o a un efecto de dilución de la proteína. Aunque también cabe la posibilidad que fuera debido a un fraccionamiento en diferentes picos, de los componentes enzimáticos que pudieran estar actuando de manera cooperativa con las xilanasas en la degradación del sustrato .

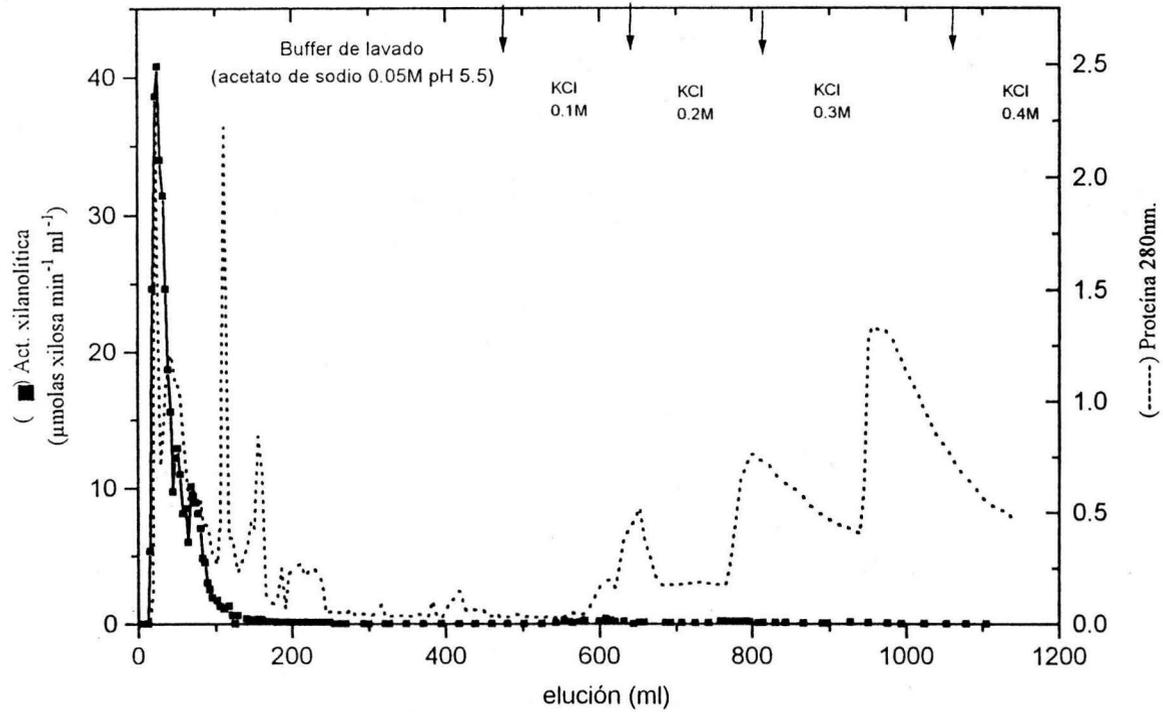


Figura 9.- Fraccionamiento por cromatografía de intercambio aniónico de xilanasas extracelulares producidas por *Streptomyces* sp. CH-M-1035 cultivado en xilanos de abedul. Fueron aplicados 75mg de proteína de FC en 15ml de buffer acetato de sodio 0.01M, pH 5.5, a una columna DEAE-Celulosa previamente equilibrada con buffer acetato de sodio 0.05M a pH 5.5. La muestra se eluyó con el buffer anterior y después con KCl 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5 y 2.0 M en el mismo buffer.

Durante el fraccionamiento de las xilanasas extracelulares del hongo *Phanerochaete chrysosporium* (Copa-Patiño 1993) por cromatografía de intercambio aniónico, se observó que la suma de las fracciones con actividad de los diferentes picos obtenidos, solo restablecía el 32% de la AEX inicial. Por lo que también en este caso fue sugerido que los bajos rendimientos obtenidos pueden ser debido a que han sido separados componentes enzimáticos de un sistema que actúa sinérgicamente (Copa-Patiño *et al.*, 1993).

Otra alternativa, era que la actividad faltante pudiera seguir adsorbida fuertemente a la matriz de celulosa. Puesto que es bien conocida la propensión de muchas xilanasas glicosiladas a interactuar con las matrices de las columnas, particularmente a las que tienen base de celulosa (Coughlan *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1993; Gilbert *et al.*, 1992).

Finalmente, cabe señalar que una característica del filtrado concentrado, que había sido mencionada anteriormente en la sección 4.6.3. de Materiales y Métodos, era que presentaba una coloración café, que se intensificó al concentrar el filtrado y cuyo origen no ha sido determinado si es debido al sustrato del medio de cultivo, o a un pigmento producido por el microorganismo. Tal color, fue retenido por la columna de intercambio y paulatinamente eluido con el KCl aplicado. Debido a esto, las fracciones con AEX obtenidas en el buffer de lavado resultaron completamente libres de este pigmento, ya que este fue fuertemente adsorbido a la resina, de manera que no pudo ser completamente eluido de la columna con KCl 2.0M.

En vista de que el 60% de la AEX fue rápidamente recuperada en el buffer de lavado, era probable que la misma pudiera ser cromatografiada en una columna de intercambio catiónico equilibrada a las mismas condiciones usadas anteriormente. Por esta razón, se hizo una mezcla de las principales fracciones con actividad obtenidas (volúmenes 16 a 100 ml), la cual fue aplicada a una columna de CM-Celulosa equilibrada a pH 5.5 con buffer acetato de sodio.

Como se observa en la **Figura 10**, la AEX también fue recuperada en el buffer de lavado (volumenes 15 a 90ml). Sin embargo, en este caso, la actividad eluyó en un pico mayor (volumenes 20 a 40ml) y uno menor (volumenes 55 a 85 ml); ya que el tercer pico no se consideró puesto que anteriormente había sido aplicado KCl 0.1M y se consideró que esto aceleró la elución de las proteínas del segundo pico. Cabe señalar que se continuó la elución con KCl en concentraciones de hasta 0.5M en buffer acetato de sodio. Sin embargo, sólo se detectó AEX en el rango de volumen mostrado y rastros de proteína solo hasta 0.3M.

El hecho de que la proteína con actividad xilanolítica recuperada en el buffer de lavado de la columna de DEAE-Celulosa no se adsorbiera a CM-Celulosa a pH 5.5, podría indicar que se trata de xilanasas con carga neutra bajo estas condiciones. Sin embargo, como la adsorción depende también del tipo de resina y la capacidad de la misma para adsorber macromoléculas, se decidió cambiar la matriz de CM-Celulosa por CM-Sephadex ya que en este intercambiador los grupos ionizados (OCH_2COOH)

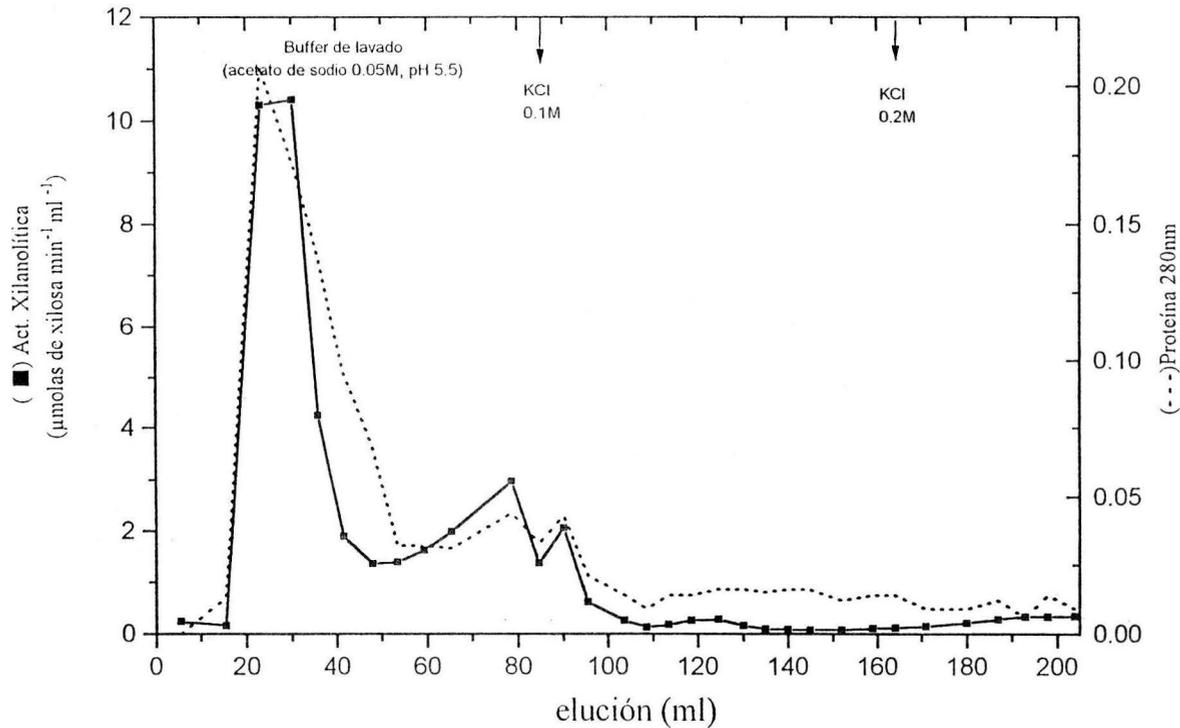


Figura 10.- Fraccionamiento por cromatografía de intercambio iónico en CM-Celulosa de la actividad xilanolítica de *Streptomyces* sp. CH-M-1035 obtenida en vol. 18-100ml de la cromatografía en DEAE-Celulosa. Fueron aplicados 6.8mg de proteína en 5.5ml de buffer acetato de sodio 0.05M, pH 5.5 a una columna de CM-Celulosa previamente equilibrada con el buffer anterior. La muestra fue eluida primero con este buffer y después con KCl 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 en el mismo.

se encuentran unidos a un soporte de esferas de polidextran las cuales poseen un tamaño de poro más homogéneo y mayor capacidad de hidratación.

En la **Figura 11** se presenta el perfil cromatográfico obtenido en la columna con CM-Sephadex equilibrada a pH 5.5. Como en el caso anterior, puede observarse que la actividad no se adsorbió fuertemente; puesto que apareció con el buffer de lavado de la columna. Sin embargo, también se pudo observar una separación más clara de los dos picos con actividad xilanolítica.

En nuestro trabajo no pudo ser esclarecido porqué la actividad recuperada en el buffer de lavado de un intercambiador aniónico no se adsorbe a intercambiadores catiónicos ya sea al mismo pH y fuerza iónica, como bajo otras condiciones de adsorción (Datos no mostrados). Sin embargo, en otros estudios se ha observado que xilanasas extracelulares básicas (PI 8.9) de *Fibrobacter succinogenes* S85 no adsorben a CM-Sepharosa (intercambiador catiónico débil) a pH 6.5, y en este caso, se especuló que este efecto pudo ser debido entre otros factores, a fenómenos de agregación de proteínas básicas con componentes celulares ácidos que pudieron haber obstaculizado la interacción con el intercambiador (Matte y Forsberg, 1992).

Si bien la AEX recuperada de CM-Celulosa o CM-Sephadex, aparentemente es separada en dos picos, ambos son recuperados en el buffer de lavado. Cabe resaltar además, que en CM-Sephadex solo fue posible detectar un pico de proteína que correspondió al pico principal de actividad. En cambio, con DEAE-Celulosa se observaron al menos tres picos de proteína que correspondieron a tres picos de actividad. Esto podría indicar que el fraccionamiento con intercambiadores catiónicos

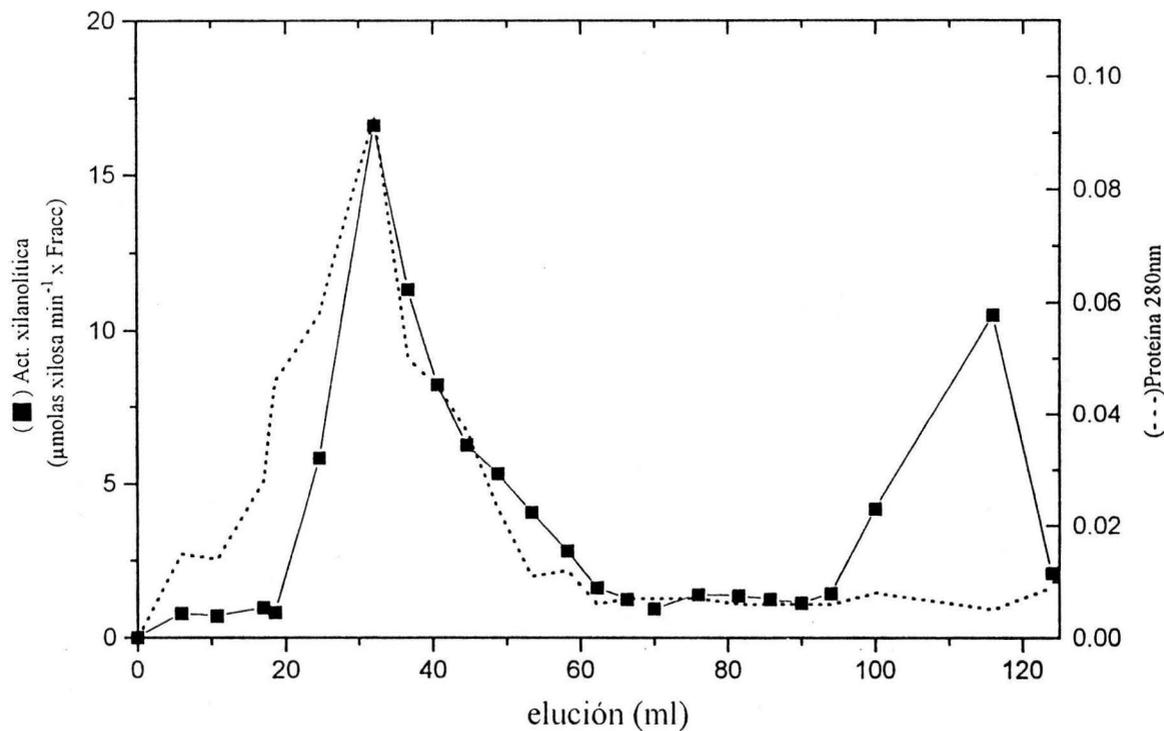


Figura 11.- Fraccionamiento por cromatografía de intercambio iónico en CM-Sephadex de la actividad xilanolítica obtenida en vol. 15-113ml de CM-Celulosa. Fueron aplicados 1.04mg de proteína en 5.0ml de buffer acetato de sodio 0.05M, pH 5.5 a una columna CM-Sephadex C₅₀ equilibrada con el buffer anterior. La muestra fué eluída con el mismo buffer.

pudo dar como resultado la no detección de un tercer componente xilanólico. En virtud de esto, se decidió continuar los estudios de fraccionamiento del filtrado concentrado con DEAE-Celulosa. En un esfuerzo por obtener una mejor resolución de los picos con actividad aparentemente vistos en la primera cromatografía, fue disminuído el pH del buffer acetato de sodio a 5.0, con el fin de aumentar la capacidad de amortiguamiento del buffer y con esto la ionización de las proteínas; así como la fuerza iónica a 0.01M para disminuir la competencia de los aniones del buffer por los sitios de adsorción del intercambiador. Así, fue corrida una columna de DEAE-Celulosa equilibrada a pH 5.0 con buffer acetato de sodio 0.01M. La muestra de 12 ml de FC con 1160 U de actividad, fue eluída por pasos con el buffer de equilibrio y después con el mismo buffer más KCl a diferentes concentraciones.

En la **Figura 12** se presenta el perfil cromatográfico obtenido. Como se puede observar, en las fracciones que comprenden los volúmenes 15 a 41ml eluidas con el buffer de lavado, fue detectado el pico de proteína con la mayor concentración de AEX (P-I). El segundo pico (P-II), fue eluído aumentando la fuerza iónica con KCl 0.05M (volúmenes 245 a 255ml) y el tercer pico fue detectado al final de este primer paso de elución con KCl 0.05M (volúmenes 486 a 502ml). Además en la **Figura 12** con una flecha se señala una concentración de actividad que no llega a ser un pico bien definido pero que alcanza un 1.5% de la actividad total.

Los picos de actividad observados, resultaron ser simétricos; sin embargo, solo la actividad de P-III correspondió con un pico simétrico de proteína. Posteriormente se hizo una selección de las fracciones con mayor actividad de los picos P-I, P-II y P-

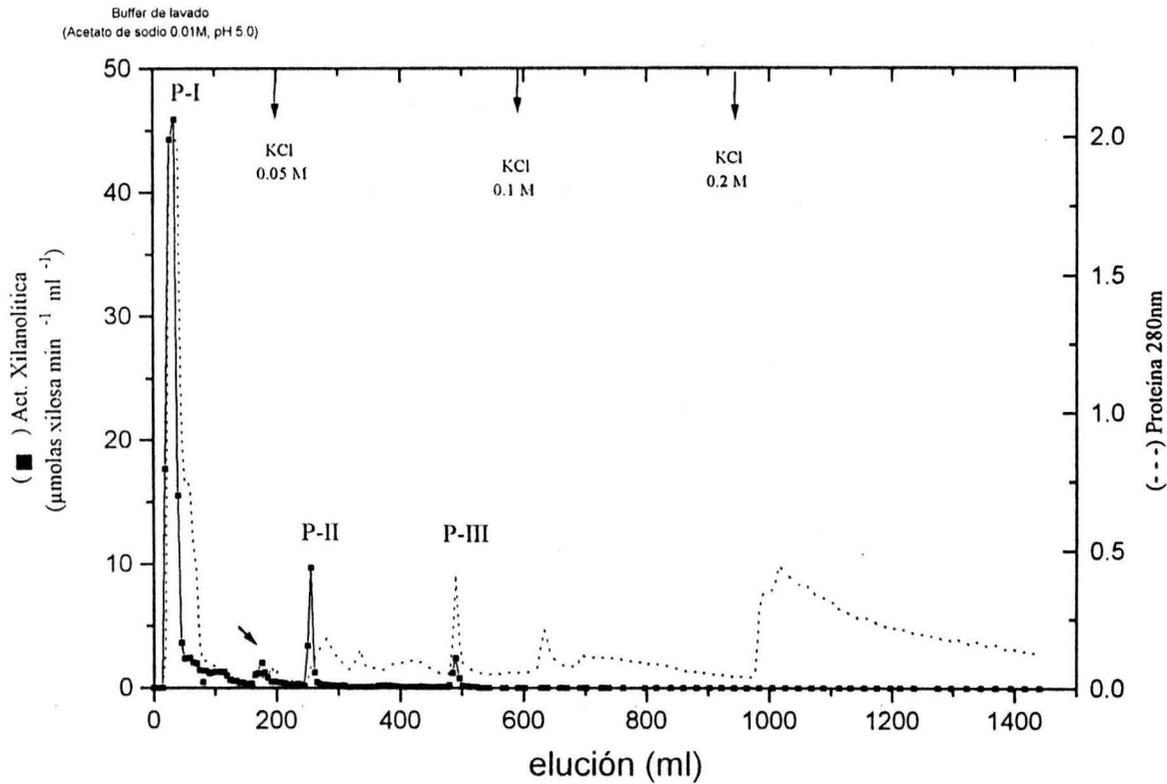


Figura 12.- Fraccionamiento por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Celulosa a pH 5.0 de xilanasas extracelulares de *Streptomyces* sp. CH-M-1035 cultivado en xilanos de abedul. Fueron aplicados 58mg de proteína de FC en 12ml de buffer acetato de sodio 0.01M, pH 5.5, a una columna DEAE-Celulosa equilibrada a pH 5.0 con el buffer anterior. La muestra primero fué eluida con este buffer y después con KCl 0.05, 0.1 y 0.2M en el mismo.

III y los rendimientos de estas fueron 74, 6 y 2% respectivamente. Es decir que en estas fracciones se recuperó el 82% de la actividad total. La diferencia de la actividad que pudo ser detectada (aproximadamente 16%), fue recuperada en las fracciones de los volúmenes 41 a 200ml, las cuales no se consideraron como parte del pico principal a fin de evitar en lo posible la contaminación de éste por otras proteínas.

En esta cromatografía (que fue denominada DEAE II), se presentaron diferencias con respecto a la primera (DEAE I). Por principio, en DEAE II fue recuperado el 98% de la actividad original y en DEAE I solo el 60%. Otra diferencia fue que cambió el perfil cromatográfico obtenido. Así, en los primeros 200 ml de elución con el buffer de lavado, la proteína de FC fue fraccionada en 7 picos en DEAE I (Figura 9), y únicamente en 3 con DEAE II. Aunque en DEAE I la actividad también parece repartida en tres picos de proteína y actividad, en DEAE II se observan claramente separados tres picos con actividad. El primero de los cuales resultó ser el pico principal, que no fue retenido por la resina. En cambio, si lo fue la actividad de los dos picos más pequeños (P-II y P-III), que cabe mencionar, en el caso anterior, aparentemente sólo fue débilmente retenida (puesto que también fue eluida con el buffer de lavado).

Cabe señalar que en la selección de fracciones del pico de actividad principal de DEAE-I, se recuperó el 56% de la actividad total en 72 ml. En cambio, en la selección de DEAE-II se recuperó el 74% en solo 26ml. Es decir, 18% más de actividad en 64% menos volumen que en DEAE-I. Adicionalmente, la recuperación de

proteína fue de 17 y 11% para DEAE-I y DEAE-II respectivamente. Tales resultados propiciaron un mayor aumento de la actividad específica obtenida, puesto que para DEAE-I la actividad específica del pico principal aumento 3.6 veces (94 U mg^{-1} de proteína) y para DEAE-II se incrementó 6.2 veces (138 U mg^{-1} de proteína).

Los resultados obtenidos sugieren que las condiciones de pH y fuerza iónica fueron más adecuadas en DEAE-II puesto que en ésta se logró fraccionar las xilanasas de *Streptomyces* sp. CH-M-1035 en tres picos de proteína claramente separados.

Adicionalmente, el aumento en la actividad específica obtenido en el pico principal (P-I) de DEAE-II resultó ser más alto que el obtenido utilizando procesos similares (concentración del filtrado y cromatografía de intercambio aniónico) para el fraccionamiento de xilanasas extracelulares de diferentes microorganismos; puesto que tales factores variaron de 1.3 a 5.9 (Li *et al.*, 1993; Nakajima *et al* 1984; Okeke y Obi 1992; Morosoli *et al* 1986; Teunissen *et al* 1993; Khandke *et al.*, 1989; Matte y Forsberg, 1992; Biely *et al*, 1980; Wang *et al* 1993; Marui *et al* 1985).

Como ya se ha mencionado, la hidrólisis enzimática de xilanos es muy compleja debido a la naturaleza heterogénea del sustrato, de tal manera que puede involucrar endo y exo xilanasas, β -xilosidasas y una o más enzimas desramificantes (Johson *et al.*, 1988; Biely *et al.*, 1993). Asimismo, el fraccionamiento y purificación de estas enzimas se complica aun más debido a la presencia en el medio de cultivo de múltiples formas o isoenzimas de una o más de estas enzimas. Como resultado de esto, la purificación de las mismas requiere de elaborados procesos y consecuentemente falta información

sobre la purificación de estas enzimas a partir de microorganismos (Khandke *et al.*, 1989).

A pesar de la escasa información sobre fraccionamiento y purificación de xilanasas, se ha encontrado que en varios trabajos, se han usado diferentes tipos de intercambiadores aniónicos como paso inicial para el fraccionamiento de filtrados del cultivo de diferentes microorganismos, en algunos casos únicamente con el fin de separar el material colorido y algunas otras proteínas, como es el caso de *Aeromonas caviae* W-61 (Dung *et al.*, 1993; Viet *et al.*, 1991) y *Streptomyces* sp. 3137 (Marui *et al.*, 1985). En otros casos, a pesar de que la actividad no es retenida por esta columna, este proceso resulta ser exitoso como paso de purificación; como en el caso de la xilanasas única de *Arthrographis* sp. F4 (Okeke y Obi, 1992) de *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1 (Li *et al.* 1993) y las xilanasas de *Thielavia terrestris* 255B (Gilbert *et al.* 1992). Cabe señalar que en todos estos casos sólo se requirió un paso más de filtración en gel para obtener la homogeneidad electroforética. En el último caso además, fue demostrado que a pH 7.2 con 20mM de buffer Bis Tris la mayor proporción de actividad de xilanasas con PI 6.1 (Xilanasas II) era recuperada en el buffer de equilibrio de un intercambiador aniónico fuerte (Q-Sepharosa). A propósito de esto fue especulado que aunque la carga neta era probablemente negativa bajo las condiciones cromatográficas, estos grupos negativos eran obstaculizados para interactuar con los grupos ionizados de la matriz y esto pudo ser ocasionado por las características de la enzima en sí misma o por interacciones de la misma con otras

moléculas presentes en el material crudo, tales como polisacáridos u otras proteínas (Gilbert *et al.*, 1992). En nuestro caso, en las condiciones que fueron probadas, únicamente se logró enlazar menos del 10% de la actividad a una resina de intercambio; sin embargo, sería conveniente conocer el PI de las xilanasas de *Streptomyces* sp. CH-M-1035, para poder discutir sobre las posibles causas de esto.

Con los cambios hechos a la cromatografía de intercambio aniónico, fue posible tanto recuperar aproximadamente el 98% de la actividad original, como fraccionar la misma en tres picos de actividad claramente definidos (Figura 12). Dos de ellos que además corresponden a dos picos de proteína (P-I y P-III), lo anterior sugiere que las condiciones establecidas en DEAE-II dieron por resultado una mejor retención de las proteínas a la columna y por consiguiente, una mejor resolución de la proteína con actividad detectada en los volúmenes 20 a 100ml de DEAE I. Estos resultados podrían indicar además, que se ha conseguido una separación inicial de al menos tres proteínas con actividad xilanolítica.

En este trabajo, también se realizó la caracterización bioquímica parcial de los tres picos obtenidos, ya que es conocido que midiendo algunos parámetros fisicoquímicos como la estabilidad al pH y/o temperatura, es posible determinar si existen diferencias estructurales entre las tres proteínas fraccionadas (Khanna y Gauri, 1993; Woodward, 1984). Paralelamente en este laboratorio, se están implementando las técnicas de zimogramas de actividad en geles de poliacrilamida, las cuales en

determinado momento serán de gran ayuda para conocer con más detalle la naturaleza de estas diferencias y tener un mejor entendimiento del sistema xilanolítico.

5.4. CARACTERIZACION BIOQUIMICA PARCIAL DE LOS PICOS CON ACTIVIDAD XILANOLITICA FRACCIONADOS POR CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO ANIONICO

Para poder comparar los resultados obtenidos de llevar a cabo la caracterización bioquímica de los picos fraccionados, inicialmente fue necesario conocer si la AEX de estos picos era alterada al hacer diluciones de las muestras, puesto que es sabido que mediciones realizadas a diferentes concentraciones de proteína, pueden rendir resultados diferentes durante la medición de la actividad xilanolítica (Copa-Patiño *et al.*, 1993; Ball y McCarthy, 1989). En virtud de esto, fue medida la actividad xilanolítica de P-I a diferentes tiempos de incubación y usando diferentes diluciones. Como se observa en la **Figura 13**, la actividad es lineal hasta los diez minutos en las tres diluciones probadas.

También se observa que si la enzima se usa más concentrada, se obtiene un decaimiento en la curva de progreso, esto probablemente sea debido a una limitación de sustrato. Estos resultados permiten trabajar con la enzima diluida hasta 30 veces y con tiempos de incubación de hasta 10min, puesto que la actividad es prácticamente lineal en estos extremos.

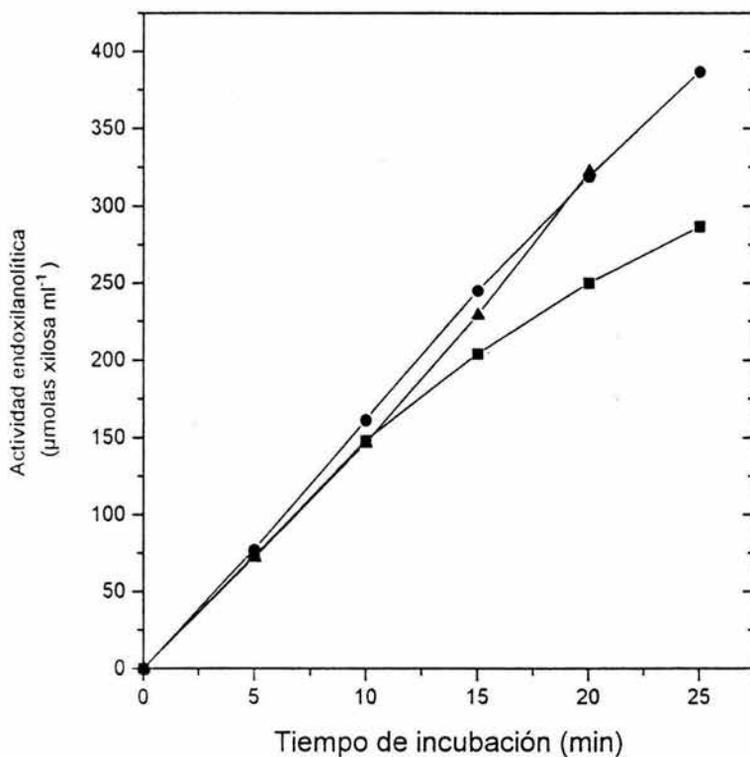


Figura 13.- Curva de progreso de la actividad xilanólítica de P-I. La enzima se diluyó 1:10 (■), 1:20 (●) y 1:30 (▲) con buffer acetatos 0.01 M, pH 5.0. La determinación se realizó como se indica en Materiales y Métodos.

5.4.1. Efecto del pH sobre la actividad xilanolítica de P-I, P-II y P-III

Se determinó el efecto del pH sobre la actividad de cada pico, y los resultados de este experimento son mostrados en la **figura 14**, donde se puede ver que el pH óptimo de P-I y P-II fue 5.6 en cambio el de P-III fue 5.5. Aunque el pH óptimo de los tres picos resultó prácticamente el mismo, es posible observar considerables diferencias con respecto a la forma del perfil de actividad obtenido para cada pico. Así, mientras que a pH 4.8 el pico III mantiene el 83% de su AEX máxima, P-II y P-I sólo retienen el 65 y 56% respectivamente, de su actividad en relación a la obtenida al pH óptimo y hacia el lado básico de este, puede notarse que a pH 6.0, la actividad de P-II y P-III es de alrededor del 97% del máximo, en cambio para P-I fue del 90%.

Por otro lado también se observa que P-III mantiene más del 80% de su actividad en el rango de pH de 4.8 a 6.0. En cambio para P-I y P-II también se mantiene más del 80%, pero en un rango de pH más pequeño (5.2 a 6.0).

En la **Figura 15** se presentan también las curvas de pH obtenidas para los tres picos, pero en unidades de actividad xilanolítica. Como se puede observar, la máxima actividad obtenida en los picos fue de 11.7 U ml^{-1} para P-I, de 4.6 U ml^{-1} para P-II y de 1.38 U ml^{-1} para P-III. En la gráfica se aprecia además, que la curva de actividad de P-III se mantuvo prácticamente sin cambio a todos los pH's probados. En cambio la AEX de P-II disminuye a pH 4.8 hasta 2.88 Uml^{-1} (63%) y la AEX de P-I disminuye a 6.53 U ml^{-1} (56%). Estos resultados sugieren que la actividad xilanolítica de los tres picos reaccionan de distinta manera al pH.

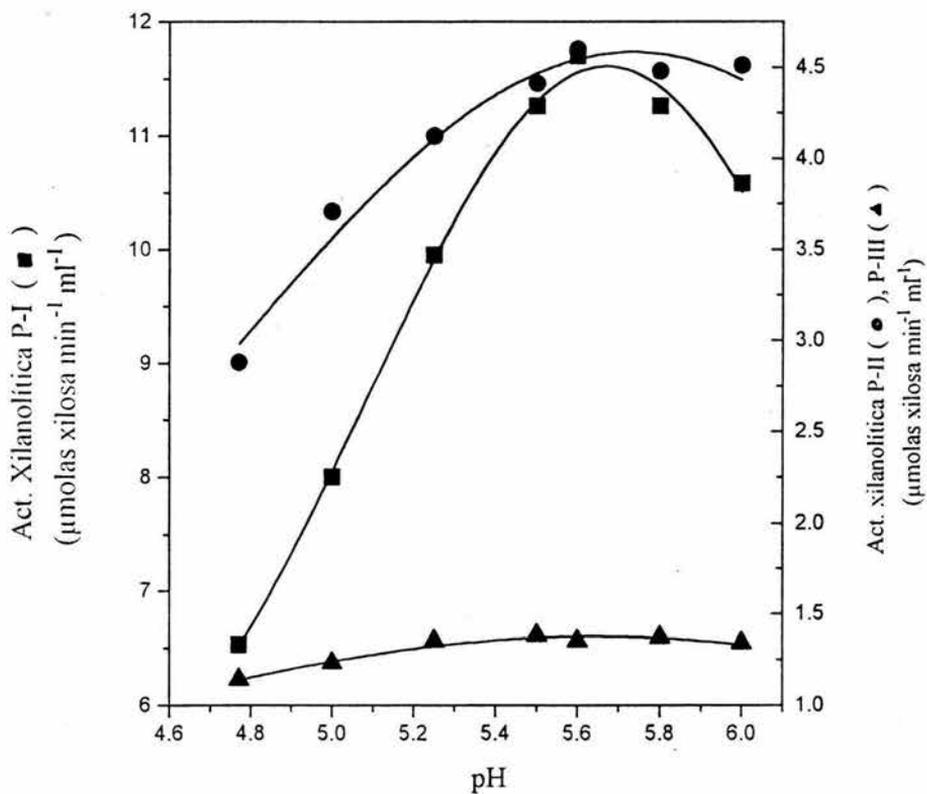


Figura 15.-Efecto del pH sobre la actividad xilanólítica de P-I, P-II y P-III. La actividad fué medida con buffer acetato de sodio 0.1M a 50°C.

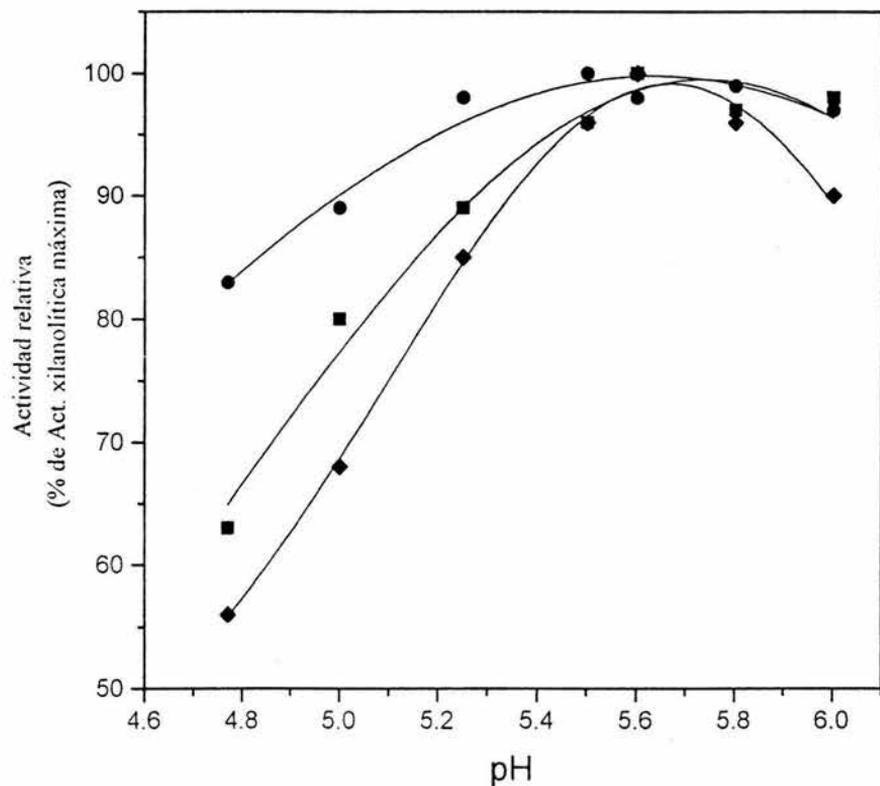


Figura 14.- Actividad xilanólítica relativa a diferentes pH's de P-I (◆), P-II (■) y P-III (●). Para cada pico se tomó como 100% el máximo valor de actividad xilanólítica que se obtuvo. La actividad se midió con buffer acetato de sodio 0.1 M a 50 °C.

Como en nuestro caso también han sido comparados los perfiles de actividad a diferentes pH's de xilanasas producidas por otros organismos, tal es el caso de *Streptomyces* sp. A451 el cual produce dos xilanasas (xylanase I y xylanase II), cuyos perfiles de actividad son diferentes entre sí, con pH's óptimos de 5.6 para xylanase I y 5.4 para xylanase II. Además se observó que ambas enzimas conservan más del 80% de su actividad de pH 4.9 a 6.25 (He *et al.*, 1993). Cabe mencionar que en este caso ambas enzimas mostraron una disminución de la actividad hacia el lado ácido de su pH óptimo, similar al que fue observado para las xilanasas contenidas en P-II de *Streptomyces* sp. CH-M-1035.

Por otro lado se reportó que son diferentes entre sí los perfiles de actividad de las xilanasas STXI y STXII de *Streptomyces thermoviolaceus*, aunque en este caso ambas presentaron el mismo pH óptimo de 7.0 (Tsujibo *et al.*, 1992). Asimismo, fueron diferentes los perfiles de actividad y los rangos de pH óptimo de la xilanasas X-I de *Streptomyces* sp. 3137, con respecto a las xilanasas X-IIA y X-IIB sintetizadas por el mismo organismo (Marui *et al.*, 1985).

Como en los casos anteriormente mencionados, el hecho de haber observado diferencias con respecto al pH óptimo y forma de la curva, en los tres picos con actividad xilanolítica obtenidos por cromatografía de intercambio aniónico, sugiere que son diferentes entre sí las proteínas que eluyen en uno y otro pico.

5.4.2. Efecto del pH sobre la estabilidad de la actividad xilanolítica de P-I, P-II y P-III.-

Se realizaron experimentos de estabilidad con los tres picos obtenidos, para lo cual fueron incubados a 50°C a diferentes valores de pH en el tiempo

En la **Figura 16** puede ser visto que P-II y P-III exhiben una mayor estabilidad al pH que P-I. El pico III mantiene su actividad arriba del 80% de máxima durante todos los tiempos y valores de pH utilizados. En cambio, a las 6 y 20 horas la actividad de P-I se mantuvo a todos los valores de pH por abajo del 80% y la actividad de P-II a pH 4.8, 5.0 y 6.0 y 20h de incubación tuvo una ligera disminución de este valor, Para apreciar mejor como cambia la estabilidad al pH en el transcurso del tiempo, estos resultados fueron graficados de distinta manera. En la **figura 17**, claramente se aprecia que P-I es la fracción menos estable al pH puesto que desde las tres horas la actividad a valores de pH más ácidos, es menor que a su pH óptimo. A las 20h, la pérdida de actividad a pH 4.8 con respecto a su óptimo, es ya del 30%. En contraste, en P-II solo puede verse un efecto del pH hasta las 20h de incubación, ya que en los anteriores tiempos, las líneas rectas obtenidas indican estabilidad al pH bajo ese rango. Por lo tanto, la disminución en la actividad puede ser debido a un efecto de la temperatura a la que fue incubada la enzima.

Como en nuestro caso, diferencias en la estabilidad al pH fueron vistas entre las xilanasas X-I, X-II y X-III del actinomiceto alcalofílico *Nocardioopsis dassonvillei* OPC-18 (Tsujiyo, 1990), de las xilanasas STX-I y STX-II de *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 (Tsujiyo *et al.*, 1992) y de los componentes xilanolíticos

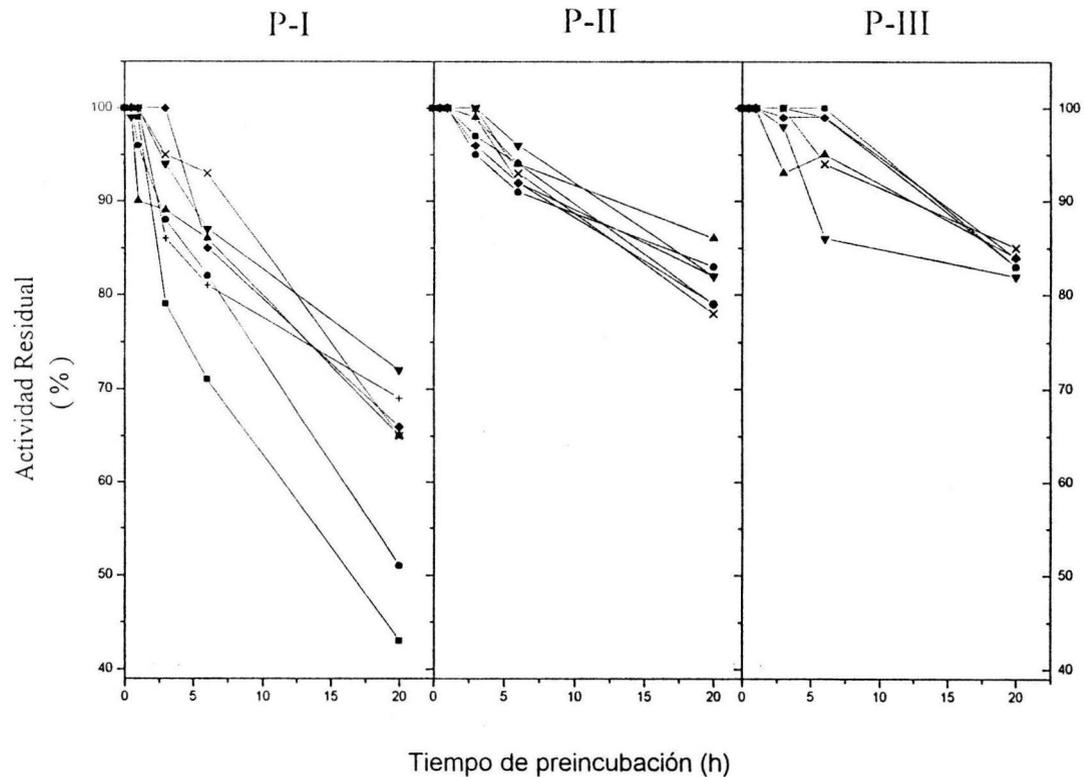


Figura 16.- Estabilidad al pH de la actividad xilanólítica de P-I, P-II y P-III. Alicuotas de cada pico fueron preincubadas sin sustrato a 50°C en buffer acetato de sodio 0.1M a pH 4.8 (■), 5.0 (●), 5.3 (▲), 5.5 (▼), 5.6 (◆), 5.8 (+) y 6.0 (x). Al tiempo indicado se determinó la actividad residual tomando alicuotas de cada tubo e incubándolas con xilanos de abedul 0.75% en buffer acetato de sodio 0.1M, pH 5.5.

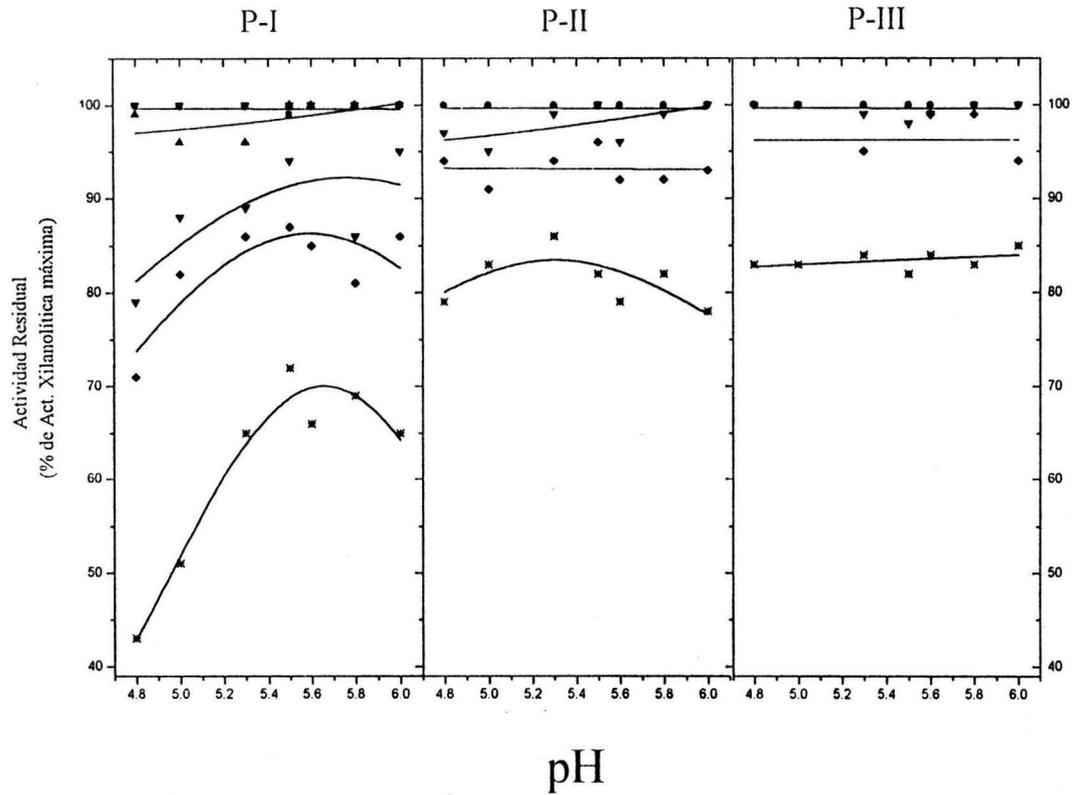


Figura 17.- Cambios en la estabilidad de la actividad xilanólítica de P-I, P-II y P-III a diferentes pH's durante el tiempo de preincubación a 50°C: 0h (•), 0.5h (▲), 1.0h (■), 3.0h (▼), 6.0h (◆) y 20h (*). Los valores utilizados son los mostrados en Fig. 17, pero graficados en otra forma.

X-I, X-IIA y X-IIB de *Streptomyces* sp. 3137 (Marui *et al.*, 1985). En estos casos, la actividad residual fue determinada hasta los treinta minutos de incubación a diferentes temperaturas en los dos primeros y solo a 35°C en el final.

De manera similar a nuestro experimento, la estabilidad de una xilanasa extracelular purificada de *Gloephyllum trabeum* fue medida a diferentes valores de pH hasta las 24h encontrando que hasta este tiempo se mantiene un 75% de la actividad inicial al pH óptimo, en cambio a los valores de pH extremos (4.0 y 9.0), la actividad residual es del 40 y 50% respectivamente (Ritschkoff *et al.*, 1994). Asimismo, en otro estudio fue determinado que después de 24h de incubación sin sustrato a diferentes valores de pH (5-10), las xilanasas I y II de *Bacillus* sp, presentan ligeras diferencias en los perfiles de estabilidad únicamente en los extremos: pH 5, 9 y 10 (Dey *et al.*, 1991).

5.4.3. Estabilidad a la temperatura de la actividad xilanolitica de los picos fraccionados.-

El efecto de la temperatura sobre la actividad es ampliamente citado tanto para determinar la temperatura óptima de incubación de las diferentes xilanasas fraccionadas de un mismo microorganismo, como para mostrar algunas diferencias en los perfiles de actividad de las mismas (Viet *et al.*, 1993; Gomez y Fevré 1993; Tsujibo *et al.*, 1990, 1992; Marui *et al.*, 1985) Sin embargo, debido a que la temperatura óptima simplemente representa una relación entre el aumento de la velocidad de reacción como resultado del incremento de la temperatura y la desnaturalización termal de las enzimas. El efecto de la temperatura sobre las xilanasas se describe mejor

en términos de propiedades de termoestabilidad. Por este motivo, con el fin de observar si hay diferencias entre las xilanasas fraccionadas, algunos investigadores prefieren sólo reportar curvas de termoestabilidad (Biely *et al.*, 1980; Dahlberg *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1993; Kormelink *et al.*, 1993; He *et al.*, 1993).

En la **figura 18** se presenta el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de los picos fraccionados; en la cual, se observa que a 40°C y a 0.5 y 1h de incubación, P-II es la fracción que presenta una disminución de actividad más marcada: 31 y 37% respectivamente. En cambio P-I y P-III mantienen a 1h de incubación sin sustrato el 89 y 79% respectivamente de su actividad.

A 60°C, la vida media de P-I, P-II y P-III, es de aproximadamente 35, 30 y 45 min respectivamente. También se pueden notar diferencias en la vida media de las mismas a 65°C: 22, 16 y 22min respectivamente, sin embargo, por el poco cambio de actividad que resultó entre los 30 y los 60min probablemente la vida media a 65°C está sobrestimada por la inclinación de la curva. Sin embargo, esto no pudo ser confirmado posteriormente midiendo actividad a menores tiempos de incubación sin sustrato puesto que en estos ensayos fue agotada la muestra de los picos P-II y P-III. No obstante, los resultados obtenidos aparentemente señalan a P-II como la fracción de xilanasas con menos estabilidad a la temperatura. Entre P-I y P-III, las diferencias no son tan marcadas, resaltando únicamente que P-I es aparentemente más estable a 40°C y P-III a 60°C.

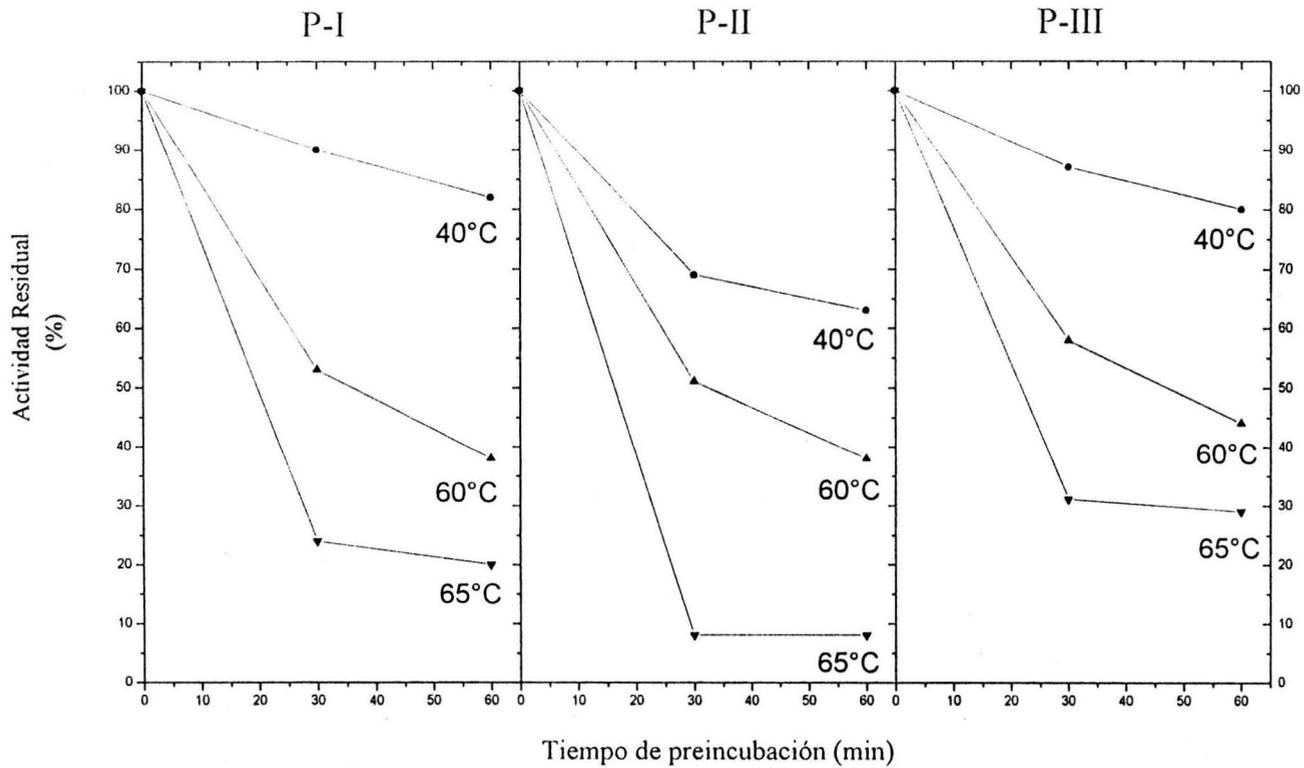


Figura 18.- Estabilidad a la temperatura de la actividad xilanólítica de P-I, P-II y P-III. Aliquotas de cada pico fueron apropiadamente diluidas con buffer acetato de sodio 0.1M, pH 5.5 para ajustarlas a una actividad similar; posteriormente fueron preincubadas a la temperatura indicada, transcurrido el lapso de tiempo señalado, fué determinada la actividad xilanólítica residual a pH 5.5 a 50°C. Para cada pico se tomó como 100% la actividad xilanólítica obtenida al tiempo cero de preincubación.

Independientemente del pico que se trate, las xilanasas de *Streptomyces* sp. CH-M-1035 parcialmente purificadas por cromatografía de intercambio aniónico exhiben propiedades de termoestabilidad semejantes a las xilanasas de otros actinomicetos termofílicos citados; cuya vida media oscila entre 13 y 40min a 65°C (Marui *et al.*, 1985; Nakajima *et al.*, 1984; Ball y McCarthy, 1989; McCarthy *et al.*, 1987).

5.4.4. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad xilanólítica de P-I

Finalmente, fueron estudiadas las propiedades cinéticas del principal pico de actividad parcialmente purificado por cromatografía de intercambio aniónico. Tales experimentos son justificados aún en preparaciones no purificadas, puesto que es improbable que en las potenciales aplicaciones industriales sean utilizadas preparaciones puras (Ball y McCarthy, 1989).

Antes de llevar a cabo el experimento, fue necesario conocer el efecto de la concentración de proteína sobre la AEX de P-I medida en las condiciones normales de ensayo, con el fin de seleccionar una concentración de proteína tal, que se encuentre dentro del rango lineal y así no interfiera con el efecto de la concentración de sustrato.

En la **Figura 19**, puede ser visto que el rango lineal se mantiene hasta 5.3 µg de proteína y después de tal cantidad, hay un decaimiento de la actividad. Por tal motivo, la concentración de proteína que se seleccionó para los ensayos fue de 4.05 µg.

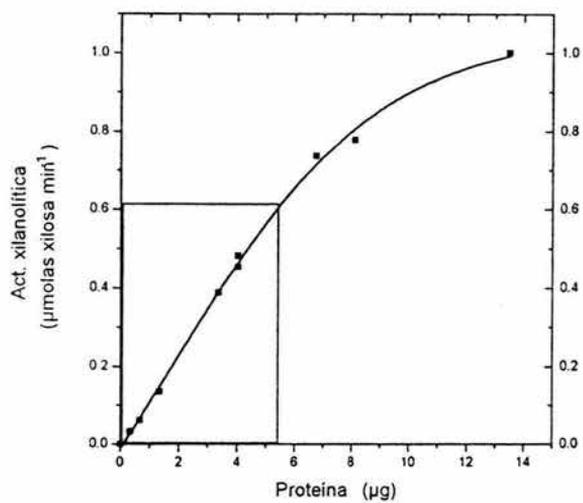


Figura 19.- Efecto de la concentración de proteína sobre la actividad xilanolítica de P-I. medida a pH 5.5 con buffer acetato de sodio 0.1M a 50°C. El rectángulo pequeño señala el intervalo dentro del cuál la actividad es lineal con respecto a la cantidad de proteína.

En la **Figura 20**, se observa el efecto de la concentración de sustrato en la AEX de P-I, como una típica curva de Michaelis-Menten (A) o graficados los puntos de manera lineal por el método de Lineweaver-Burk (B), este último mediante el cual fueron calculados V_{max} y K_m aparente.

La velocidad máxima a la que las xilanasas contenidas en esta fracción hidrolizan el sustrato fue de 80 Umg^{-1} de proteína y la constante de afinidad por el sustrato aparentemente resultó ser de 1.94 mg ml^{-1} . Estos resultados concuerdan con los valores de K_m reportados para las xilanasas sin purificar de varias especies de actinomicetos (Ball y McCarthy, 1989).

Por otra parte, también han sido reportados los parámetros cinéticos de algunas de las xilanasas purificadas de especies de *Streptomyces*. Como puede ser visto en la **Tabla IX**, la K_m obtenida por *Streptomyces* sp. CH-M-1035 es menor que la obtenida de las xilanasas B y C de *S. lividans* y un tipo de endoxilanasas de *Streptomyces* T7 y de *Streptomyces. roseiscleroticus*. No obstante, hay que tener en cuenta que la cinética de reacción varía dependiendo del tipo de sustrato de que se trate, por lo que se pueden presentar diferencias en los parámetros cinéticos que sean determinados con uno u otro sustrato (Biely *et al.*, 1993).

Finalmente cabe señalar que es conveniente continuar con la determinación de los parámetros cinéticos de los picos P-II y P-III, con el fin de determinar si existen diferencias entre estos, tal como ha sido reportado para las formas de xilanasas de algunos microorganismos (Biely *et al.*, 1993; Rapp y Wagner, 1986).

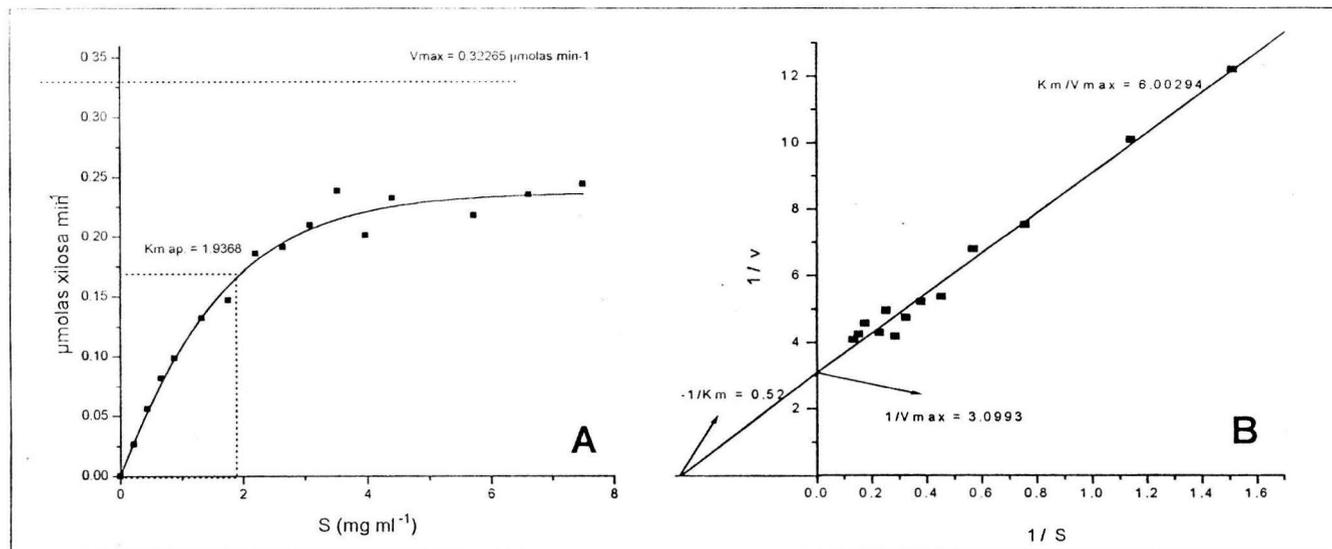


Figura 20.- Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad xilanólica de P-I. Aliquotas diluidas con buffer acetatos 0.1M, pH 5.5 (4.05 μg de proteína), fueron incubadas con concentraciones crecientes de xilanos de abedul en las condiciones de ensayo ya descritas.
A.- Curva de Michaelis Menten **B.-** Gráfica de la doble recíproca

TABLA IX
COMPARACION DE LOS PARAMETROS CINETICOS DE XILANASAS EXTRACELULARES PURIFICADAS DE VARIAS
ESPECIES DE *Streptomicetos* CON LAS XILANASAS DE *Streptomyces* sp. CH-M-1035 FRACCIONADAS POR
CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO ANIONICO

Microorganismo	Denominación de xilanasa	Sustrato	[S] (mg)	Km ap. (mg ml ⁻¹)	Vmax (μmol min ⁻¹ mg ⁻¹ de proteína)	Referencia
<i>S. lividans</i> 1326 mutante 8-7, (Cel ⁻)	(A)	xilanos de avena solubles	0.1 - 2.0	0.78	800	Morosoli R., et al., 1986.
<i>S. lividans</i> IAF42 (clon Cel ⁻ Xil ⁻ con xlnB)	(B)	xilanos de avena solubles	0.44 - 15.0	3.71	1960	Kluepfel D., et al., 1990.
<i>S. lividans</i> IAF20 (clon Cel ⁻ Xil ⁻ con xlnC)	(C)	xilanos de avena solubles	0.98 - 15.0	4.2	650	Kluepfel D., et al., 1992.
<i>Streptomyces</i> sp. KT-23	extracelular xylanase	arabinoxilanos de cáscara de arroz	0.25 - 5	0.2	N.D.	Nakajima T., et al. 1984
<i>Streptomyces</i> T7	extracelular xylanase	xilanos de lárice	3 - 15	10	7.6 x 10 ³	Keskar S., et al, 1989.
<i>Streptomyces roseiscleroticus</i>	peak II xylanase	xilanos de avena	0.1 - 16.0	7.9	305	Grabski C., et al, 1991
<i>Streptomyces</i> sp. CH-M-1035	P- 1	xilanos de abedul	0.44 - 15.0	1.94	80	Este trabajo

Cel⁻.- Mutante celulasa menos, Cel⁻ Xil⁻.- Mutante celulasa menos, xilanasa menos, xlnB.- Gene B de *Streptomyces lividans* 1326 que codifica para xilanasa B, xlnC.- Gene C de *Streptomyces lividans* 1326 que codifica para xilanasa C. [S].- Concentración de sustrato usada.

6. CONCLUSIONES

- La producción de xilanasas de *Streptomyces* sp. CH-M-1035 en fermentadores de 14L cuando es cultivado en xilanos de abedul o bagacillo de caña como única fuente de carbono, es al menos 30% más alta con respecto a la obtenida en matraz agitado bajo similares condiciones de cultivo.
- El pH óptimo para la determinación de la actividad xilanolítica extracelular de *Streptomyces* sp. CH-M-1035 es de 5.5 aunque más del 90% de la actividad máxima se mantiene en el rango de pH de 5.8 a 6.0 utilizando buffer citratos y de 5.4 a 6.0 utilizando buffer acetato de sodio.
- La actividad xilanolítica extracelular de *Streptomyces* sp. CH-M-1035 obtenida a partir de un cultivo sobre xilanos de abedul, aparentemente contiene endoxilanasas que logran ser filtradas por una membrana de ultrafiltración de 10 kDa de capacidad de corte.
- Las enzimas extracelulares con actividad xilanolítica, de *Streptomyces* sp CH-M-1035 que logran ser retenidas y concentradas con un aparato de ultrafiltración equipado con un membrana de 10kDa de capacidad de corte, son fraccionadas por cromatografía de intercambio aniónico en tres picos de proteína con diferentes características de retención.
- Son obtenidos diferentes patrones de fraccionamiento de proteínas y diferentes rendimientos cuando las enzimas de *Streptomyces* sp CH-M-1035 son fraccionadas por el mismo intercambiador iónico a diferentes valores de pH y fuerza iónica.
- Los tres picos con actividad xilanolítica fraccionados por cromatografía de intercambio aniónico presentaron distintos perfiles de actividad a diferentes valores de pH así como distintas propiedades de estabilidad al pH y la temperatura, esto sugiere que pueden ser diferentes las xilanasas que eluyen en cada pico.
- Las xilanasas de *Streptomyces* sp. CH-M-1035 que eluyen en el pico principal obtenido por cromatografía de intercambio aniónico a pH 5.0, presentaron una Km ap. de 1.94 mg ml⁻¹ y una Vmax de 80 μM mg⁻¹ de proteína.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Acuña M. 1991 Evaluación de los parámetros fisicoquímicos que afectan la producción de celulosas y xilanasas por *Aureobasidium* sp. Tesis Maestría UNAMIIB.
2. Anné, J. y Mellaert, L. 1993 *Streptomyces lividans* as host for heterologous protein production; FEMS Microbiology Letters, 114:121-128.
3. Aspinall, G. O. 1959 Structural Chemistry of the hemiceluloses. Advances in Carbohydrate Chemistry 14, 429-468.
4. Atkins, T. 1992 Three-dimensional structure, interactions and properties of xylans, en: Xylans and Xylanases. Editado por Visser, J., Beldman, G., Kuster van Somersen, M. A. y Voragen, A.G., Elsevier, Amsterdam. pp. 235-246.
5. Bachmann L. y McCarthy 1991 Purification and cooperative activity of enzymes constituting the xylan-dregrading system of *Thermomonospora fusca*. Appl. Environ. Microbiol. 57(8):2121-2130.
6. Ball, A.S. y McCarthy, A. J. 1989 Production and properties of xylanases from actinomycetes. Journal of Applied Bacteriology 66:439-444.
7. Ball, S. y McCarthy, A. 1988 Saccharification of Straw by Actinomycete enzymes J. General Microbiology 134:2139-2147.
8. Bastawde, B., Puntambekar, S. y Gokhale, V. 1994 Optimization of cellulase-free xylanase production by a novel yeast strain. J. Industrial Microbiology, 13:220-224
9. Bastawde, K. B. 1992 Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. World Journal Microbiology and Biotechnology 8:353-368
10. Bastawde, K., Tabatabai, L., Meagher, M., Srinivasan, M., Vartak, H., Rele, M., Reilly, P. 1991 Catalytic Properties and Partial Amino Acid Sequence of an Actinomycete Endo-(1,4)- β -D-Xylanase from *Chainia* Species. En: Enzymes in Biomass Conversion, Leatham, G. y Himmel, (Eds) M. Ed. American Chemical Society, p.417-425.
11. Biely, P., Vrsanska, M. y Kratky, Z. 1980 Xylan- Degrading enzymes of the yeast *Cryptococcus albidus* Identification and cellular localization. Eur. J. Biochem. 108:313-321.
12. Biely, P. 1985 Microbial xylanolytic systems, Trends in Biotechnology, 3(11):286-290.
13. Biely, P., Mackenzie, C., Puls, J. y Schneider, H. 1986 Co-operativity of esterases and xylanases in the enzymatic degradation of acetyl xylan. Biotechnology 4:731-733.
14. Biely, P. 1993 Biochemical aspects of the production of microbial hemicelulases. En: Hemicelulose and Hemicelulases, editado por Coughlan, M. y Hazlewood, G. Portland press London and Chapel Hill pp. 29-51
15. Biely, P., Kluepfel, D., Morosoli, R. y Shareck, F. 1993 Mode of action of three endo- β -1,4-xylanases of *Streptomyces lividans* Biochimica et Biophysica Acta, 1162:246-254.
16. Biely, P., Vrsanska, M. y Kucár, S. 1992 Identification and mode of action of endo-(1-4)- β -xylanases. En Xylans and Xylanases, Editado por Visser et al. Elsevier, Amsterdam. pp. 81-95.
17. Buchert, J., Rana, M., Kantelinen, A. y Viikari, L. 1992 The role of two *Trichoderma reesei* xylanases in the bleaching of pine kraft pulp. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37:825-829.
18. Cooper, T., 1977 The tools of Biochemistry. Cap. 4 John Wile & Sons N.Y. pp. 136-167.
19. Copa-Patiño, L., Kim, Y. y Broda, P. 1993 Production and initial characterisation of the xylan-degrading system of *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40:69-76.
20. Coughlan, M., Tuohy, M., Filho, E., Puls, J., Claeysens, M., Vrsanská, M. y Hughes, M. 1993 Enzymological aspects of microbial hemicelulases with emphasis on fungal systems. En Hemicelulose and hemicelulases Editado por Coughlan y Hazlewood. Portland Press, London and Chapell Hill. pp. 53-84.

21. Coughlan, P. M. y Hazlewood, G. P. 1993 β -1,4-D- Xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications (Review). *Biotechnol. Appl. Biochem.* 17:259-289.
22. Da Silva, R., Yim, D. y Park, Y. 1994 Application of Thermostable Xylanases from *Humicola* sp. for Pulp Improvement. *Journal of Fermentation and Bioengineering.* 77(1):109-111.
23. Dahlberg, L., Holst, O. y Kristjansson, K. 1993 Thermostable xylanolytic enzymes from *Rhodothermus marinus* grown on xylan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40:63-68.
24. de Graff, H., Broeck, v., Ooijen, J. y Visser, J. 1992 Structure and regulation of a *Aspergillus* xilanase gene, en Xylans and Xylanases, editado por Visser, J., Beldman, G., Kuster van Someren, M. A. y Voragen, A.G., Elsevier, Amsterdam. pp. 235-246.
25. Dekker, H. y Richards, G., 1976 Hemicellulases, their occurrence, purification, properties, and mode of action. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 32:277-352.
26. Dey, D., Hinge, J., Shendye, A. y Rao, M. 1991 Purification and properties of extracellular endoxylanases from alkalophilic thermophilic *Bacillus* sp. *Can. J. Microbiol.* 38:436-442.
27. Domínguez, M., Gong, C. y Tsao, G. 1996 Pretreatment of Sugar Cane Bagasse Hemicellulose Hydrolysate for Xylitol Production by Yeast. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 57/58:49-56.
28. du Toit, Olivier, S. y van Biljon L., 1984 Sugar cane bagasse as a possible source of fermentable carbohydrates. I. Characterisation of bagasse with regard to monosaccharide, hemicellulose and amino acid composition, *Biotechnology and Bioengineering.* 26:1071-1078.
29. Enríquez, A. 1981 Growth of Cellulolytic Bacteria on Sugarcane Bagasse, *Biotechnology and Bioengineering*, XIII:1423-1429.
30. Eriksson, L. 1991 *Biotechnology: three approaches to reduce the environmental impact of the pulp and paper industry.* *Sci. Progress Oxford*, 75:175-189.
31. Esteban, R., Villanueva, R., Villa, G. 1982 β -D-xylanases of *Bacillus circulans* WL-12, *Can. J. Microbiol.* 28:733-739.
32. Fernández-Espinar, T., Piñaga, F., Sanz, P., Ramón, D. y Vallés, S. 1993 Purification and characterization of a neutral endoxylanase from *Aspergillus nidulans*, *FEMS Microbiology Letters*, 113:223-228.
33. Flores, M. E., Perea, M., Rodríguez, O., Malvárez, A., Huitrón, C. 1996a Physiological studies on induction and catabolite repression of β -xylosidase and endoxylanase in *Streptomyces* sp. CH-M-1035. *Journal of Biotechnology*, 49:179-187.
34. Flores, M. E., Pérez, R. y Huitrón, C. 1996b β -xilosidase and xilanase characterization and production from a new xylanolytic *Streptomyces* sp. CH-M-1035. *Letters in Applied Microbiology*, En Prensa.
35. Ghosh, M., Das, A., Mishra, A. y Nanda G. 1993 *Aspergillus sydowii* MG49 is a strong producer of thermostable xylanolytic enzymes. *Enzyme Microb. Technol* 15-August. 703-709.
36. Ghosh, M., y Nanda, G. 1994 Purification and some properties of a xylanase from *Aspergillus sydowii* MG49, *Appl. Environ. Microbiol.* 60(12):4620-4623.
37. Gilbert, M., Breuil, C., Yaguchi, M. y Saddler, N. 1992 Purification and characterization of a xylanase from the thermophilic ascomycete *Thielavia terrestris* 255B. *Applied Biochemistry and Biotechnology* Vol 34/35: 247-258.
38. Gomez de Segura, B., y Fevre, M. 1993 Purification and Characterization of Two 1,4- β - Xylan Endohydrolases from the Rumen Fungus *Neocallimastix frontalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 59 (11): 3654-3660.
39. Grabski, C. y Jeffries, W. 1991 Production, purification, and characterization of β -(1-4)-endoxylanase of *Streptomyces roseiscleroticus*, *Appl. Environ. Microbiology* 57(4):987-992.
40. Harris, E. y Angal, S. 1989 *Protein Purification Methods, A Practical Approach*, IRL, Press, Oxford, p. 155-156.
41. He, L. Bickerstaff, F., Paterson, A. y Buswell, A. 1993 Purification and partial characterization of two xylanases that differ in hydrolysis of soluble and insoluble xylan fractions. 15:13-18.

42. Huitrón, C., Saval, S. y Acuña, M. 1984 Production of Microbial Enzymes from Agroindustrial By-products. *Annals New York Academy Sciences* 434:110-113.
43. Ishaque, M. y Kluepfel, D. 1980 Cellulase complex of a mesophilic *Streptomyces* strain. *Can. J. Microbiol.* Vol. 26:183-189
44. John, M. y Schmidt, J. 1979 Purification and some properties of five endo 1-4-β-D-xylanase and a β-D-xylosidase produced by a strain of *Aspergillus niger*. *Can. J. Biochem.* 57:125-133.
45. Johnson, G. K., Harrison, B. A., Schneider, C. R. Mackenzie, C. R. Y Fontana, D. J. 1988 Xylan-hydrolysing enzymes from *Streptomyces* spp. *Enzyme. Microb. Technol.* July 10:403-409.
46. Joseleau, P., Comtat, J. y Ruel, K. 1992 Chemical structure of xylans and their interaction in the plant cell walls. en *Xylans and Xylanases*, editado por Visser, J., Beldman, G., Kuster van Someren, M. A. y Voragen, A.G. Elsevier, Amsterdam. pp. 235-246.
47. Keskar, S., Srinivasan, M. y Deshpande, V. 1989 Chemical modification of a xylanase from a thermotolerant *Streptomyces*, *Biochem. J.* 261:49-55.
48. Khandke, M. K., Vithayathil, P. J. y Murthy, S. K. 1989 Purification of xylanase, β-glucosidase, endocellulase, and exocellulase from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 274(2):491-500.
49. Khanna, S. y Gauri, 1993 Regulation, purification, and properties of xylanase from *Cellulomonas fimi*. *Enzyme Microb. Technol.*, Nov. 15:990-994.
50. Kilunga, B., Susuki, T., Horitsu, H., Kawai, K. y Takamizawa, K. 1994 Purification and characterization of *Aeromonas caviae* ME-1 Xylanase V, which produces exclusively xylobiose from xylan. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(2):531-535.
51. Kirk, K. y Chang, H. 1990 Overview of biotechnology in pulp and paper manufacture. En: *Biotechnology in Pulp and Paper Manufacture (Applications and fundamental investigations)*, editado por Kent Kirk y Hou-Min-Chang. Butterworth-Heinemann, U.S.A. p. 1-13.
52. Kluepfel, D., Shareck, F., Mondou y Morosoli, R. 1986 Characterization of a cellulase and xylanase activities of *Streptomyces lividans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24:230-234.
53. Kluepfel, D., Vats-Mehta, Aumont, F., Shareck, F. y Morosoli, R. 1990 Purification and characterization of a new xylanase (xylanase B) produced by *Streptomyces lividans* 66. *Biochem. J.* 267,45-50.
54. Kluepfel, D., Daigneault, N., Morosoli, R. y Shareck, F. 1992 Purification and characterization of a new xylanase (xylanase C) produced by *Streptomyces lividans* 66 *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36:626-631.
55. Kormelink, M., Searle-Van Leeuwen, F., Wood, M. y Voragen, G. 1991 Purification and characterization of a (1,4)-D-arabinoxylan arabinofuranohydrolase from *Aspergillus awamori*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35:753-758.
56. Kormelink, F. J., Searle-Van Leeuwen, M. J., Wood, T. M. y Voragen, A. G. 1993(a) Purification and characterization of three endo-(1,4)-β-xylanases and one β-xylosidase from *Aspergillus awamori*. *Journal of Biotechnology*; 27:249-265. a.
57. Kormelink, M., Lefebvre, B., Strozyk, F. y Voragen, J. 1993(b) Purification and characterization of an acetyl xylan esterase from *Aspergillus niger*. *J. Biotech.* 27:267-282. b.
58. Li, X., Zhang, Z., Dean, J., Eriksson, L. y Ljungdahl, 1993 Purification and characterization of a new xylanase (APX-II) from the fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(10):3212-3218.
59. Lowry, D., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., y Randall, R. J. 1951 Protein measurement with de Folin Fenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 256-275.
60. Mackenzie, C. R., Bilous, D. y Johnson, K. G. 1984 Purification and characterization of a exoglucanase from *Streptomyces flavogriseus*. *Can. J. Microbiol.* 30:1171-1178.
61. Maijala, P., Raudaskoski, M. y Viikari, L. 1995 Hemicellolytic enzymes in P- and S- strains of *Heterobasidium annosum*. *Microbiology*, 141:743-750.

62. Marui, M., Nakanishi, K. y Yasui, T. 1985 Purification and properties of three types of xylanases induced by methyl β -xiloside from *Streptomyces* sp. Agric. Biol. Chem., 49(12):3399-3406.
63. Maat J., Roza, M., Verbakel, J., Stam, H., da Silva, N., Base, M. y Egmond, M. 1992 En Xylans and Xylanases, editado por Visser, J., Beldman, G., Kusters, van Somersen, M. y Voragen, A. Elsevier Amsterdam, pp. 349-360.
64. Matte, A. y Forsberg, W. 1992 Purification, characterization, and mode of action of endoxylanases 1 and 2 from *Fibrobacter succinogenes* S85. Appl. Environ. Microbiol. 58(1):157-168.
65. McCarthy, J., Peace, E., Broda, P. 1985 Studies on the extracellular xylanase activity of some thermophilic actinomycetes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 21:238-244.
66. McCarthy, J. 1987 Lignocellulose degrading actinomycetes. FEMS Microbiology Reviews 46: 145-163.
67. Miller, L. 1959 Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Anal Chem. 31,426-428.
68. Molina, O., Perotti de Gálvez, N., Frigerio, C. y Córdoba, P. 1984 Single Cell Protein Production from Bagasse pith pretreated with sodium hidroxide at room temperature. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20:335-339.
69. Moo-Young, M., Morcira, R., Daugulis, J. y Robinson, W. 1979 Bioconversion of agricultural wastes into animal feed and fuel Gas. Biotechnology and Bioengineering Sym. 8:205-218.
70. Morosoli, R., Bertrand, J. L., Mondou, F., Shareck, F. y Kluepfel, D. 1986 Purification and properties of a xylanase from *Streptomyces lividans*. Biochem. J. 239:587-592.
71. Nakajima, T., Tsukamoto, K., Toshiyuki, W., Kainuma, K. y Matsuda, K. 1984 Purification and some properties of an endo-1-4- β D-xylanase from *Streptomyces* sp. J. Ferment. Technol., 62(3):269-276.
72. Nakamishi, K. y Yasui, T. 1980 Production of xylanase by *Streptomyces* sp. Using Non-metabolizable inducer. Agric. Biol. Chem. 44(11):2729-2730.
73. Nanmori, T., Watanabe, T., Shinke, R., Kohno, A. y Kawamura, Y. 1990 Purification and properties of thermostable xylanase and β -xylosidase produced by a newly isolated *Bacillus stearothermophilus* strain. J. Bacteriol. 172(12): 6669-6672.
74. Ohkoshi, A., Kudo, T., Mase, T. y Horikoshi, K. 1985 Purification of Three Types of Xylanases from an Alkalophilic *Aeromonas* sp. Agric. Biol. Chem., 49(10):3037-3038.
75. Okeke, B. y Paterson, A. 1992 Simultaneous production and induction of cellulolytic enzymes in a *Streptomyces* sp., World Journal of Microbiology and Biotechnology 8:483-487.
76. Okeke, C. y Obi, C. 1992 Preliminary studies on a xylanase from an *Arthrographis* species. FEMS Microbiol. Lett. 96:43-48.
77. Patel, N. y Ray, M. 1994 Production and characterization of xylanase from a *Streptomyces* species grown on agricultural wastes. World Journal of Microbiology & Biotechnology 10:599.
78. Pavlov, C. L. y Alexander, P. B. 1993 Esterases of xylan-degrading microorganisms: Production, properties, and significance. Enzyme Microb. Technol. 15:460-475.
79. Pellerín, P., Gosselin, M., Lepoutre, J-P., Samain, E. y Debeire, P. 1991 Enzymic production of oligosaccharides from corn cob xylan. Enzyme Microb. Technol., Agosto 13.617-621.
80. Puls, J. y Schuseil, J. 1993 Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. En: Hemicellulose and Hemicellulases, editado por Coughlan, M. y Hazlewood, G. Portland London pp. 29-51
81. Puls, J., Schmidt, O. y Gronzov, C. 1987 α -Glucuronidase in two microbial xylanolytic systems. Enzyme Microb. Technol., 9:83-88.
82. Rapp, P. y Wagner, F. 1986 Production and properties of xylan degrading enzymes from *Cellulomonas uda*. Appl. Environ. Microbiol. 51(4):746-752.
83. Reilly, D. 1981 Xylanase, Structure and Function, Basic Life Sci. 18:1111-1129.

84. Ritschkoff, A. C., Buchert, J. y Viikari, L. 1994 Purification and Characterization of a Thermophilic Xylanase from the Brown-rot Fungus *Gloeophyllum trabeum*. Journal of Biotechnology 32: 67-74.
85. Roberto, C., Lacis, S., Barbosa, M. y de Mancilha M. 1991 Utilization of Sugar Cane Bagasse Hemicellulosic Hydrolysate by *Pichia stipitis* for the Production of Ethanol. Process Biochemistry 26:15-21
86. Rodríguez Zavala, O. 1994 Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y producción de actividad xilanolítica extracelular en *Streptomyces* sp. CH-M-1035. Tesis, licenciatura UNAM Fac. Química.
87. Rodríguez, H., Ponce, T., De la Torre, M. y Enríquez, A. 1991 Effect of oxygen and air flow on xylanolytic and cellulolytic activity from bacterial cultures grown on bagasse pith. Biotech. Lett. 13(8):563-566.
88. Scopes, R. 1982 Protein Purification, Principles and Practice. 2ª. Springer Verlag, N. Y.
89. Shao, W. y Wiegel, J. 1992 Purification and characterization of a Thermostable β -xylosidase from *Thermoanaerobacter ethanolicus*. J. Bacteriol. 174(18):5848-5853.
90. Slade, M., Hoj, B., Morrice, A. y Fincher, B. 1989 Purification and characterization of three (1-4)- β -D-xylan endohydrolases from germinated barley. FEBS Letts. 200:533-539.
91. Stutzenberger, F. 1994 Extracellular enzyme production by *Thermomonospora curvata* grown on bagasse. Journal of Industrial Microbiology, 13:35-42.
92. Stutzenberger, F. y Bodine, A. B. 1992 Xylanase production by *Thermomonospora curvata* J. Appl. Bacteriol. 72:504-511.
93. Tan, L., Wong, K., Yu, E. y Saddler, J. 1985 Purification and Characterization of Two D-xylanases from *Trichoderma harzianum*. Enzyme Microbiol. Technol. 7:425-435.
94. Teunissen, M. J., Hermans, H. M., Huis in't Veld, J. y Vogels, G. 1993 Purification and characterization of a complex-bound and a free β -1,4-endoxylanase from the culture fluid of the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2. Arch. Microbiol. 159:265-271.
95. Thompson, J. A. 1993 Molecular biology of xylan degradation FEMS Microbiology Reviews 104:65-82.
96. Tsujibo, H., Miyamoto, K., Kuda, T., Minami, K., Sakamoto, T. Hasegawa, T. e Inamori, Y. 1992 Purification, Properties, and Partial Amino Acid Sequences of Thermostable Xylanases from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. Appl. Environm. Microbiol. 58(1):371-375.
97. Tsujibo, H., Sakamoto, T., Nishino, N., Hasegawa, T., Inamori, Y. 1990 Purification and properties of three types of xylanases produced by an alkalophilic actinomycete. Journal of Applied Microbiology, 69,398-405.
98. Viet, N., Kamio, Y., Abe, N., Kaneko, J. e Izaki, K. 1991 Purification and properties of β -1,4-Xylanase from *Aeromonas caviae* W-61 Appl. Environ. Microbiol. 57:445-449.
99. Viet, N., Vetayasuporn, S., Kamio, Y., Abe, N., Kaneko, J. e Izaki, K. 1993 Purification and properties of β -1,4-Xylanases 2 and 3 from *Aeromonas caviae* W-61. Biosci. Biotech. Biochem. 57(10):1708-1712.
100. Viikari, L., Kantelinen, A., Ratto, M. y Sundquist, J. 1991 Enzymes in pulp and paper processing. Enzymes in Biomass Conversion. Editado por Leathan G., Himmel M. ACS Books advisory. pp. 112-117.
101. Wang, P., Clark, J. y Broda, P. 1993 Xylanases from *Streptomyces cyaneus*: their production, purification and characterization. J. General Microbiology 139:1987-1993.
102. Wilke, C., Yang, R., Sciamanna, A. y Freitas, R. 1981 Raw Materials Evaluation and Process Development Studies for Conversion of Biomass to sugars and ethanol, Biotechnology and Bioengineering, XIII:163-183.
103. Wong, K., Tan, L. y Saddler, J. 1988 Multiplicity of β -1,4-Xylanase in Microorganisms: Functions and Applications. Microbiological Reviews 52(3):305-317.
104. Wong, K. y Saddler, J. 1992 *Trichoderma* Xylanases their Properties and Applications Critical Reviews in Biotechnology 12(6):413-435.

105. **Wong, K. Y Saddler, J. 1993** Aplicaciones of hemicelulasas in the food, feed and pulp and paper industries. En: Hemicellulose and Hemicelulasas, editado por: Coughlan M. y Hazlewood, G. Portland London. Pp. 127-143.
106. **Woodward, J. 1984** Xylanases: Function, properties and applications, Topics in Enzyme and Ferm. Biotech. 8:10-27.
107. **Yamaura, I., Matsumoto, T., Funatsu, M. y Mukai, E. 1990** Purification and some properties of endo-1,3- β -D-xylanase from *Pseudomonas* sp. PT-5. Agric. Biol. Chem. 54(4):921-926.
108. **Zuleta Vargas, M. 1995** Obtención fermentativa de xilanasas extracelulares de *Streptomyces* sp. CH-M-1035 a partir de bagacillo de caña, xilanos y otros sacáridos purificados., Tesis Licenciatura UNAM Iztacala.

APENDICE I

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

1.- Medio A para propagación de *Streptomyces sp.* CH-M-1035.

Sales	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.14%
	KH ₂ PO ₄	0.20%
	Urea	0.03%
	Xilanos de avena	0.50%
	Agar	1.70%

El pH se ajusta a 6.5 con NaOH diluido y se esteriliza a una temperatura de 121°C por 20 min, excepto la urea ya que se degrada con el calor, por lo que ésta se esteriliza por filtro swinnex a través de una membrana de 0.22 µm de tamaño de poro. Esterilizada la urea se agrega al medio de cultivo cuando este está a una temperatura cercana a los 60°C agitando lentamente antes de vaciar el medio a las cajas petri.

2.- Medio B para la producción de xilanasas extracelulares en fermentador

Sales	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.14%
	KH ₂ PO ₄	0.20%
	Urea	0.03%
	Fuente de carbono	Variable

Se disuelven las sales en cinco litros de agua de la llave se agrega la fuente de carbono se disuelve y se ajusta el pH a 6.5 con NaOH diluido, se vacía en el fermentador y

se completa el volumen a 9.5 l. con agua de la llave, posteriormente se esteriliza en la misma jarra a una temperatura de 121°C por 20 min, excepto la urea ya que se degrada con el calor, por lo que se preparó una solución cien veces más concentrada que se esteriliza por filtro swinnex a través de una membrana de 0.22 µm de tamaño de poro. Esterilizada la urea se agrega al fermentador en condiciones asépticas cuando este alcanza la temperatura de cultivo.

3.- Medio C.- Medio Luria modificado para crecimiento del inóculo.

Triptona 1.0 %

Extracto de levadura 0.5 %

NaCl0.5 %

Los reactivos se disolvieron en agua destilada y se ajustó a pH de 7.0 con 1ml aproximadamente de sosa 1.0 N por cada litro de medio. Posteriormente el medio se esterilizó en autoclave a 120 °C por 20 min.

4.- Medio D.- Medio para la conservación del microorganismo.-

Extracto de levadura.....0.4%

Extracto de malta.....1.0%

Glicerol.....40.0%

Las sustancias se disuelven en agua destilada a la concentración indicada y el medio se esterilizó durante 20min a 120°C, posteriormente el medio se colocó en tubos estériles con tapa de rosca.

APENDICE II

PREPARACION DE REACTIVOS.-

REACTIVO DNS PARA CUANTIFICACION DE AZUCARES REDUCTORES.-

El reactivo se prepara agregando NaOH %, ácido 3,5-dinitrosalicílico 0.75%, tartrato de sodio y potasio 10.0%, fenol 0.54% y metabisulfito de sodio 0.59%. Estas sustancias se disuelven en agua destilada en el orden indicado y se afora al volumen necesario.

SOLUCION D PARA DETERMINACION DE PROTEINA POR Lowry.-

Sol. A.- Tartrato doble de sodio y potasio 2.0 %, Sol. B.- Sulfato de cobre pentahidratado 1%; Sol. C.- Carbonato de sodio 2.0 % en una solución de hidróxido de sodio 0.1N. La sol. D se prepara mezclando una parte de A, más una de B en 100ml de C.