



00551  
4

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

292543

**Producción, purificación y caracterización de una xilanasas de  
*Aspergillus* sp FP-470 y su aplicación en panificación**

**Tesis que para obtener el título de**

**Maestría en Ciencias Bioquímica**

**presenta:**

**Norma Angélica Camacho de la Rosa**

**Director de Tesis:**

**Dr. Guillermo Aguilar Osorio**



**México D.F.**

**2001**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
Facultad de Química  
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Producción, purificación y caracterización de una xilanasa de  
*Aspergillus* sp FP-470 y su aplicación en panificación**

Tesis que para obtener el grado de  
**Maestría en Ciencias**

presenta:

**Norma Angélica Camacho de la Rosa**

Director de Tesis:

Dr. Guillermo Aguilar Osorio

México, D. F.

2001

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Fisiología de Hongos Filamentosos del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química, de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Guillermo Aguilar Osorio y con el apoyo de CONACYT (proyecto IF-259).

Este trabajo fue aceptado como requisito para obtener el grado de **Maestría en Ciencias** por el siguiente jurado:

**PRESIDENTE:** Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

**PRIMER VOCAL:** Dr. Carlos Regalado

**SECRETARIO:** Dra. Amelia Farrés Gonzalez-Saravia

**SUPLENTE:** Dra. María del Carmen Montes Horcasitas

**SUPLENTE:** Dr. José Mariano García Garibay

**Asesor de tesis: Dr. Guillermo Aguilar Osorio**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas aquellas personas que de alguna manera me ayudaron en la realización de mis estudios de maestría, así como al **Laboratorio de Fisiología de Hongos Filamentosos** del Departamento de Biotecnología, de la Facultad de Química, de la UNAM.

A mi comité tutorial, **Dr. Agustín López-Munguía Canales, Dra. Amelia Farrés Gonzalez-Saravia** y al **Dr. Guillermo Aguilar**, por sus comentarios y sugerencias.

Al **Dr. Guillermo Aguilar Osorio** y a su **Téc. Academ. Blanca Trejo**, quienes con su entusiasmo por la investigación me ayudaron a realizar este trabajo.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, que gracias a ella puede realizar mis estudios profesionales y este posgrado.

A **Ana Moranchel** y **Adriana Monteón** por su gran amistad y muy especialmente a **Adriana** por la ayuda que de ella recibí para escribir esta tesis.

A los compañeros del laboratorio por los momentos compartidos y por permitir intercambiar ideas: **Berenice, Pablo, Isela** y **Marti**.

Agradezco a la coordinación de la maestría que me ayudaron todo el tiempo en los trámites escolares: **Dra Amelia Farrés** y **Leticia García**.

A **CONACYT** por el apoyo económico que recibí de la beca-crédito durante dos años.

## DEDICATORIA

Le dedico muy especialmente esta tesis a mi esposo **Alejandro Mancilla Toledo**, por su comprensión y amor. Por la paciencia que ha tenido desde que empezamos a caminar como uno solo, ya que siempre ha estado conmigo y me ha impulsado para culminar esta maestría.

A mi **futuro bebe. Hijo**, esto es para tí. Gracias por esperar.

A mis padres, **Celestino Camacho y Rosario de la Rosa**, por el cariño y por el apoyo moral recibido durante todos estos años. Por su espíritu de lucha que aún en la adversidad los ha sacado adelante. Gracias por su ejemplo para luchar en la vida.

A mis hermanos y sobrinos: **Lourdes, Teresa y César; Anahi, Gabriela, Teresa, Starkov, Rudin, Nancy, César y al pequeño Ricardo**.

## **Del oficio de pulir estrellas**

Cierta vez en el camino me encontré con tres pulidores de estrellas y preguntándoles por separado el porqué de su oficio, el primero contestó que lo hacía porque a diario se miraba en su reflejo.

El segundo respondió que lo desempeñaba porque ancestros de generación en generación lo habían hecho, como ahora él.

Y el tercero dijo: "Yo soy pulidor de estrellas porque he visto que a veces son la luz de alguien perdido en el camino, pero además, porque quiero ser un gran pulidor para cuando encuentre la mía."

**Emilio Rojas**



# CONTENIDO

## ANEXO

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. GENERALIDADES	
3.1 Xilanos. Interacciones, estructura y propiedades	5
3.2 Clasificación de las xilanasas	12
3.3 Presencia de las xilanasas	14
3.3.1 Microorganismos que producen xilanasas	15
3.3.2 Xilanasas en <i>Aspergilli</i>	16
3.3.3 Multiplicidad de xilanasas en los microorganismos	17
3.4 Inducción de las xilanasas	18
3.5 Regulación de las xilanasas	21
3.6 Aplicaciones de las xilanasas	22
3.7 Xilanasas y otras enzimas	28
4. ANTECEDENTES	29
5. OBJETIVOS	30
6. MATERIALES Y MÉTODOS	
6.1 Microorganismo	32
6.2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	32
6.3 Crecimiento celular	33
6.4 Azúcares reductores	33
6.5 Determinación de actividades enzimáticas	34
6.5.1 Actividad xilanolítica	34
6.5.2 Actividad amilolítica	34
6.5.3 Actividad exopectinolítica	34
6.5.4 Actividad endopectinolítica	34
6.6 Electroforesis	35
6.6.1 Condiciones desnaturizantes	35
6.6.2 Isoelectroenfoque	35
6.7 Actividad "in situ" (zimogramas)	35
6.7.1 Actividad xilanolítica	35
6.7.2 Actividad amilolítica	36
6.8 Purificación	36
6.8.1 Ultrafiltración	36

6.8.2	Cromatografía de intercambio aniónico	36
6.8.3	Cromatografía de intercambio catiónico	37
6.9	Caracterización de la xilanasa purificada	37
6.9.1	Determinación del pH y temperatura óptimos del ensayo	37
6.9.2	Determinación de la estabilidad frente al pH y la temperatura	37
6.9.3	Decaimiento térmico	38
6.9.4	Efecto de iones metálicos sobre la actividad de la xilanasa	38
6.9.5	Efecto de carbohidratos sobre la actividad de la xilanasa	38
6.9.6	Actividad de la xilanasa contra diferentes sustratos	38
6.9.7	Determinación de las constantes cinéticas, Km y Vmax	39
6.9.8	Evaluación de los productos de hidrólisis	39
6.10	Pruebas de panificación	39
6.10.1	Dosificación	39
6.10.2	Elaboración de panes	40
6.10.3	Volumen de panes	40
6.10.4	Evaluación sensorial de panes	40
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
7.1	Crecimiento y actividad xilanolítica de <i>Aspergillus</i> sp FP-470 en diferentes fuentes de xilanos.	42
7.2	Crecimiento y actividad xilanolítica de <i>Aspergillus</i> sp FP-470 cultivado en olote de maíz en un fermentador 14 L	51
7.3	Purificación de la xilanasa de <i>Aspergillus</i> sp FP-470	54
7.4	Caracterización bioquímica de la xilanasa purificada de <i>Aspergillus</i> sp FP-470	59
7.4.1	Determinación del pl	59
7.4.2	Efecto de la temperatura en la actividad y estabilidad de la xilanasa purificada	61
7.4.3	Decaimiento térmico	64
7.4.4	Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de la xilanasa purificada	66
7.4.5	Efecto de iones metálicos en la actividad	69
7.4.6	Efecto de carbohidratos en la actividad	72
7.4.7	Efecto de la actividad y selectividad de xil 222 sobre diferentes sustratos	73
7.4.8	Productos de hidrólisis	75
7.5	Aplicación de la xilanasa purificada en panificación	76
7.5.1	Muestras comerciales	76
7.5.2	Pruebas de panificación	78
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>83</b>
<b>9.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>84</b>

# ANEXO

## ABREVIATURAS

A.	<i>Aspergillus</i>
C1	Muestra comercial enzimática de <i>Trichoderma viride</i> (Enmex, México).
C2	Muestra comercial enzimática de <i>Bacillus sp.</i> (Enmex, México).
CM-Sepharosa	Carboximetil-sepharosa
DEAE-Celulosa	Dietilaminoetil-celulosa
Ea	Energía de activación
HCl	Ácido clorhídrico
KCl	Cloruro de potasio
kDa	Kilodaltons
Km	Constante de Michaelis
L	Litro
M	Molar
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloruro de sodio
ppm	Partes por millón
RBB	Azul brillante de remazol
Tris	2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3diol
Vmax	velocidad máxima
vvm	volumen de aire por minuto
xil22	Xilanasas purificadas en este trabajo, con peso molecular de 22 kDa.
μg	Microgramo
μmoles	Micromoles

## FIGURAS

- 1 Interacción de xilanos con otros componentes de la pared celular.
- 2 Representación esquemática de la estructura de los xilanos.
- 3 Actividades enzimáticas del sistema xilanolítico.
- 4 Dimerización del ácido ferúlico y su interacción con las proteínas.
- 5 Crecimiento de *Aspergillus* sp FP-470 cultivado en diferentes fuentes de xilanos.
- 6 Actividad xilanolítica de *Aspergillus* sp FP-470 en diferentes fuentes de xilanos.
- 7 Gel de poliacrilamida de proteínas extracelulares de *Aspergillus* sp. FP-470 producidas en diferentes fuentes de xilanos.
- 8 Crecimiento y producción de actividad xilanolítica de *Aspergillus* sp FP-470 cultivado en un fermentador de 14 L.
- 9 Cinética de producción de enzimas extracelulares de *Aspergillus* sp FP-470 cultivado en olote de maíz al 1% en un fermentador de 14 L.
- 10 Cromatograma de elución de la columna Resource "Q" del filtrado extracelular de *Aspergillus* sp FP-470.
- 11 Cromatograma de elución de la columna de Carboximetil-Sepharosa del pico I de Resource "Q".
- 12 Peso molecular de la xilanasa purificada de *Aspergillus* sp FP-470.
- 13 Isoelectroenfoque de xil22.
- 14 (a) Temperatura óptima del ensayo de la xilanasa purificada de *Aspergillus* sp FP-470.
- 15 Estabilidad térmica de la xilanasa de *Aspergillus* sp FP-470.
- 16 Decaimiento térmico de la xilanasa de *Aspergillus* sp FP-470 a 50 y 60°C.
- 17 pH óptimo del ensayo de la xilanasa de *Aspergillus* sp FP-470.

- 18 Estabilidad al pH de la xilanasa de *Aspergillus* sp FP-470.
- 19 Efecto de la concentración del KCl y NaCl sobre la actividad de la xilanasa.
- 20 Cromatografía en capa fina de los productos de hidrólisis sobre xilanos de abedul por la xilanasa purificada de *Aspergillus* sp FP-470.
- 21 Geles de poliacrilamida de las muestras comerciales.
- 22 Incremento de volumen en panes elaborados con el filtrado enzimático completo, xilanasa purificada y muestras comerciales.
- 23 Panes elaborados con el filtrado enzimático completo, la xilanasa purificada a diferentes dosis y las muestras comerciales.
- 24 Panes elaborados con la xilanasa purificada de *Aspergillus* sp a diferentes dosis.

## TABLAS

- 1 Porcentaje de polisacáridos de la pared celular de diferentes cereales (% Base Seca).
- 2 Propiedades fisicoquímicas de las  $\beta$ -1.4-xilanasas de diferentes microorganismos.
- 3 Composición química de olote de maíz.
- 4 Actividades enzimáticas producidas por *Aspergillus* sp FP-470 en diferentes fuentes de xilanos.
- 5 Composición química de olote de maíz.
- 6 Cuadro de purificación de la xilanasas purificada de *Aspergillus* sp FP-470.
- 7 Energías de activación de  $\beta$ (1-4) xilanasas del género *Aspergillus*.
- 8 Efecto de iones metálicos en la actividad de la xilanasas de *Aspergillus* sp FP-470.
- 9 Efecto de carbohidratos en la actividad de xil22.
- 10 Actividad y selectividad de la xilanasas de *Aspergillus* sp FP-470 sobre diferentes sustratos.
- 11 Características de las muestras enzimáticas comerciales.
- 12 Análisis sensorial de panes elaborados con el filtrado completo, la xilanasas purificada a diferentes dosis y las muestras comerciales.

## I. RESUMEN

En este trabajo se muestran los resultados del crecimiento y producción de la actividad xilanolítica de *Aspergillus* sp FP-470 en diferentes fuentes de xilanos; así como la purificación y caracterización bioquímica de una de las xilanasas de este microorganismo y su aplicación en panificación.

La cepa de *Aspergillus* sp FP-470 se cultivó en matraces de 500 ml en las diferentes fuentes de xilanos: xilanos de abedul, xilanos de avena, hemicelulosa, olote de maíz y salvado de trigo; la mayor actividad xilanolítica la produjo en olote de maíz. En todas las fuentes, el hongo secretó una xilanasa de 22 kDa. Además de esta, en olote se detectaron otras dos xilanasas de 36 y 60 kDa; así como la presencia de otras enzimas como amilasas, celulasas y pectinasas.

Posteriormente, *Aspergillus* sp FP-470 se creció en un bioreactor de 14 L en olote de maíz al 1%. En estas condiciones, el microorganismo presentó un crecimiento mayor del 28%, con respecto a su crecimiento en matraces de 500 ml; produjo el doble de la actividad xilanolítica y presentó el mismo perfil de xilanasas (22, 36 y 60 kDa). A partir de este filtrado se purificó la xilanasa de 22 kDa, alrededor de 30 veces, utilizando solamente dos pasos cromatográficos. En el primer paso se utilizó una columna Resource "Q". Mientras que en el segundo paso una resina de Carboximetil-Sepharosa.

La enzima de 22 kDa (xil22) presentó un pI de 8.9. Su pH y temperatura óptimos fueron de 5.5 y 60°C, respectivamente y fue estable en un rango de pH entre 5 y 10 durante 24 h a 25°C; mientras que a 4°C fue menos estable, sobre todo a pH's ácidos. Su estabilidad térmica aumentó en presencia de xilanos de abedul, glicerol y sorbitol al 10%. Su tiempo de vida media fue de 7.5 min a 60°C y de 210 min a 50°C. Xil22 presentó una energía de activación (Ea) de 60.80 kJ/mol. Los iones metálicos como el  $Zn^{2\oplus}$ ,  $Cu^{2\oplus}$ ,  $Co^{2\oplus}$  y  $Fe^{3\oplus}$  inhibieron a la enzima a una

concentración de 10 mM y su efecto fue más marcado a 20 mM. Su actividad disminuyó en presencia de xilosa, glucosa, arabinosa y galactosa. La  $K_m$  y  $V_{max}$  para el 4-O-metilglucuronoxilano fueron de 1.9 mg/ml 44  $\mu$ moles/min-mg de proteína, respectivamente. Para los xilanos de abedul fueron de 3.8 mg/ml y de 62  $\mu$ moles/min-mg de proteína. La xilanasa presentó un modo de acción endo y liberó arabinosa.

Para las pruebas de panificación se utilizaron el filtrado extracelular completo y la xilanasa purificada a dosis de 25 ppm a 200 ppm, las cuales se aplicaron a las masas de panificación. Con ambas muestras se logró incrementar el volumen del pan. El máximo incremento fue de 32% en relación al control (pan sin enzima) y fue producido con xil22 a una dosis de 25 ppm. En tanto, que los incrementos de volumen con el filtrado completo fueron de un 14%, en promedio. El máximo incremento con xil22 fue prácticamente el mismo para los panes elaborados con dos preparaciones enzimáticas comerciales, pero la dosis de estas últimas fue 8 veces mayor (200 ppm).



## 2. INTRODUCCIÓN

La hemicelulosa es el compuesto orgánico más abundante en la pared celular de las plantas, después de la celulosa. Constituye un recurso natural renovable. Está compuesta por xilanos, arabanos, galactanos, glucanos y mananos. Los xilanos son los que se encuentran en una mayor proporción en las maderas duras y en los cereales (de Vries, 1999). Las enzimas que degradan a los xilanos reciben el nombre de xilanasas y están constituidas por varias actividades enzimáticas, entre las que destacan las endoxilanasas,  $\beta$ -xilosidasas,  $\alpha$ -arabinosidasas,  $\alpha$ -glucuronidasas y estererasas (Gomes *et al.* 1994). Las fuentes de estas enzimas generalmente son microbianas, entre las que destacan los hongos filamentosos como el género *Aspergillus* que produce sistemas xilanolíticos complejos (Peij, 1999).

Las xilanasas tienen un gran potencial para aplicarse en la industria de la pulpa y el papel, en la textil y en la industria de los alimentos (Coughlan y Hazlewood, 1993). La primera aplicación comercial de las xilanasas fue en la industria papelera y ha sido considerada como una de las aplicaciones biotecnológicas más importantes. El uso de las xilanasas fúngicas permitió disminuir los compuestos clorados que se utilizan durante el blanqueo y le confirieron al papel una mejor calidad y brillantez que la lograda con tratamientos químicos tradicionales (Viikari, 1998).

Por otro lado, en la industria de la panificación el uso de las xilanasas cobra mayor importancia cada día. La hidrólisis de los xilanos de la harina da como resultado la modificación de las propiedades fisicoquímicas de la masa y el mejoramiento de la calidad del pan (Maat *et al.* 1992; Monfort *et al.* 1996; Monfort *et al.* 1997). Actualmente existen en el mercado preparaciones enzimáticas que se comercializan como aditivos para la panificación que además de contener xilanasas contienen otras enzimas como celulasas, amilasas, pectinasas, lipasas, etc. Esto

hace que se obtengan mejores rendimientos; sobre todo cuando se utilizan harinas de baja calidad panadera (Morales, 1999).

Cabe mencionar que para cada uso de las xilanasas se requieren de ciertas propiedades, como: la especificidad por el sustrato, la estabilidad a la temperatura y pH; así como de la capacidad de hidrolizar a los xilanos, entre otras. Por lo que uno de los objetivos de estudio en el campo de las xilanasas ha sido la búsqueda de enzimas que sean estables en condiciones extremas, en sistemas heterogéneos como las masas de panificación y que hidrolicen sustratos de origen agroindustrial. etc.

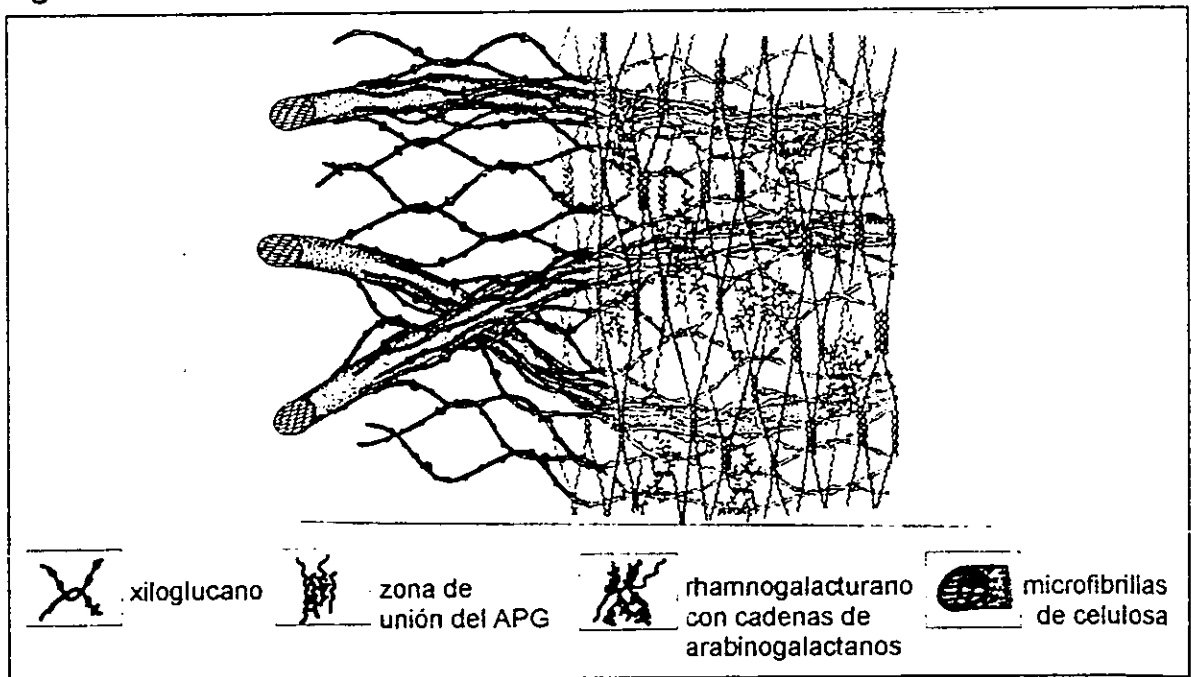
### 3. GENERALIDADES

#### 3.1 Xilanos. Interacciones, estructura y propiedades.

La hemicelulosa es una familia de polisacáridos no amiláceos que se encuentran en la pared celular de los vegetales. Está constituida por xilanos, arabanos, mananos y galactanos. Los xilanos se encuentran generalmente en la pared secundaria, donde tienen funciones estructurales pues confieren rigidez y flexibilidad a los tejidos. También están presentes en algunas paredes primarias donde participan en funciones asociadas al crecimiento. En las paredes de semillas y bulbos sirven como material de reserva (Biely *et al.* 1992).

Los xilanos interactúan con otros componentes estructurales, en particular, con las microfibrillas de celulosa, con pectina, con rhamnogalactanos y en la mayoría de los casos con lignina. Estas interacciones pueden ser covalentes o mediante puentes de hidrógeno, lo que hace que los tejidos presenten una gran resistencia mecánica y biológica. (Figura 1).

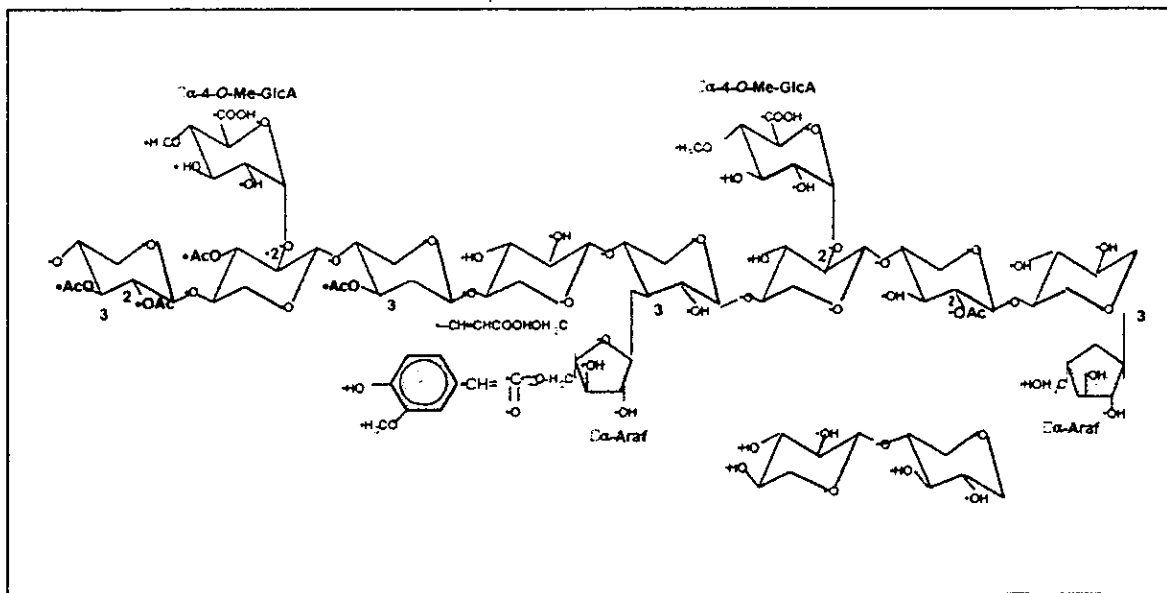
**Figura 1.** Interacción de xilanos con otros componentes de la pared celular.



Fuente: Parénicová, 1999.

Los xilanos están constituidos por cadenas de xilosa unidas por enlaces  $\beta(1\rightarrow4)$ . Esta estructura presenta diferentes ramificaciones laterales, como la arabinosa que se encuentra unida ya sea en forma sencilla, por enlaces  $\alpha(1\rightarrow2)$  y  $\alpha(1\rightarrow3)$ , como una pequeña cadena junto con una xilosa unida por un enlace  $\beta(1\rightarrow2)$  ó una galactosa en posición  $\beta(1\rightarrow5)$ ; esta última también puede estar unida a la xilosa mediante un enlace  $\beta(1\rightarrow4)$ . También puede presentar grupos acetilos unidos en la posición del carbono 2 ó 3 por uniones  $\alpha$ . El ácido glucurónico y su éter, el 4-O-metilo, están unidos mediante un enlace  $\alpha(1\rightarrow2)$  y por último, los residuos de los ácidos ferúlico y *p*-cumárico que se encuentran unidos a la arabinosa en el carbono 5 por un enlace éster (Joseleau, 1992; de Vries, 1999; Peij, 1999).

**Figura 2.** Representación esquemática de la estructura de los xilanos.



Los números indican las posiciones de los átomos de carbono de la xilosa, donde se encuentran las diferentes ramificaciones.

Fuente: Adaptado de Bastawde, 1992; Coughlan y Hazlewood, 1993; Sunna y Antranikian, 1997; de Vries, 1999.

Con base a la naturaleza de los sustituyentes de los xilanos se han considerado cuatro familias: los arabinoxilanos sustituidos por  $\alpha$ -arabinosa; los glucuronoxilanos sustituidos por el ácido  $\alpha$ -D-glucurónico, los glucuronoarabinoxilanos, en los cuales la  $\alpha$ -D-arabinosa y el ácido  $\alpha$ -D-glucurónico están presentes y por último los galactoglucuronoarabinoxilanos caracterizados por la presencia de  $\alpha$ -arabinosa, ácido glucurónico y residuos de  $\beta$ -D-galactopiranosil (Joseleau *et al.* 1992).

La presencia del tipo de xilanos varía de acuerdo al origen botánico de la planta, a su edad, a su estado de desarrollo y a su localización. En las maderas duras, por ejemplo, existe una mayor proporción de xilanos llamados glucuronoxilanos (acetil-4-O-metilglucuronoxilanos) formados por 70 residuos de xilosa y por cada 10 residuos presentan una ramificación terminal de ácido 4-O-metilglucurónico en la posición del carbono 2 de la xilosa. En algunas maderas duras se han encontrado residuos de ramnosa y ácido galacturónico (Sunna y Antranikian, 1997).

Los xilanos de maderas suaves están constituidos de glucuronoarabinoxilanos, también conocidos como arabino-4-O-metilglucuronoxilanos. Contienen ácido 4-O-metilglucurónico unido en la posición de C2 del residuo de xilosa. A diferencia de los xilanos de maderas duras, estos no contiene grupos acetilo y en su lugar presentan grupos de L-arabinofuranosa unidos en la posición 3 de la xilosa, mediante un enlace  $\alpha(1\rightarrow3)$ , además de ser más cortos y menos ramificados (Sunna y Antranikian, 1997).

El tipo de xilanos que predomina en plantas no leñosas son arabinoxilanos, en cereales, por ejemplo, son el mayor componente de la porción no amilácea. Contienen ácido glucurónico, grupos acetilo y una alta cantidad de compuestos fenólicos (Voragen *et al.* 1992; tabla 1).

El estudio de las propiedades químicas de los xilanos ha mostrado que en solución no reducen al reactivo de Fehling. Los xilanos acetilados son solubles en agua y pueden ser extraídos en ésta, son fácilmente hidrolizados por ácidos y son más

susceptibles a la degradación microbiana (Bastawde, 1992). Pero, tanto los grupos acetilos como el 4-O-metil-glucuronoxilano dificultan el acceso de las endoxilanasas, lo que ocasiona una hidrólisis incompleta (Puls *et al.* 1990). Los xilanos desacetilados son insolubles en agua y solubles en soluciones alcalinas; además de ser menos susceptibles a la degradación enzimática.

**Tabla 1.** Porcentaje de polisacáridos de la pared celular en diferentes cereales (% Base Seca).

Polisacárido	Trigo		Cebada	Centeno	Sorgo		Arroz
	Harina	Paja	Todo el grano menos el hollejo	Todo el grano	Todo el grano	Endospermo	Paja
Arabinogalactanos	0.3	0.2	0.6	0.1	0.1	-	--
Arabinoxilanos insolubles <sup>a</sup>	1.9 (76%) <sup>a</sup>	30 (90%) <sup>a</sup>	3-4 (86%) <sup>a</sup>	7.6-9.8 (70%) <sup>a</sup>	2.8 (90%) <sup>a</sup>	0.15 -	19.2 -
Compuestos fenólicos	+	+	+	+	++	++	-
Acido glucurónico	-	+	trazas	-	++	++	++
Grupos acetilos	-	trazas	+	-	++	-	-

<sup>a</sup>: porcentaje de la fracción insoluble.  
Fuente: Voragen *et al.* 1992.

Los xilanos son altamente hidrofílicos y absorben hasta 10 veces su peso en agua, por lo que desempeñan un papel muy importante en el procesamiento de los cereales y en las propiedades de productos que contiene un alto porcentaje de estos polisacáridos. Por ejemplo, en la elaboración de pan con harinas de alto contenido de xilanos se ven afectadas las propiedades reológicas de la masa, como la maleabilidad y la elasticidad, ya que los xilanos al absorber el agua impiden la hidratación completa del gluten e interfieren en la agregación de las moléculas de glutenina y provocan que se obtengan panes compactos que además se endurecen

más rápidamente (Roels *et al.* 1993; Fernández-Espinar *et al.* 1996; Monfort *et al.* 1996).

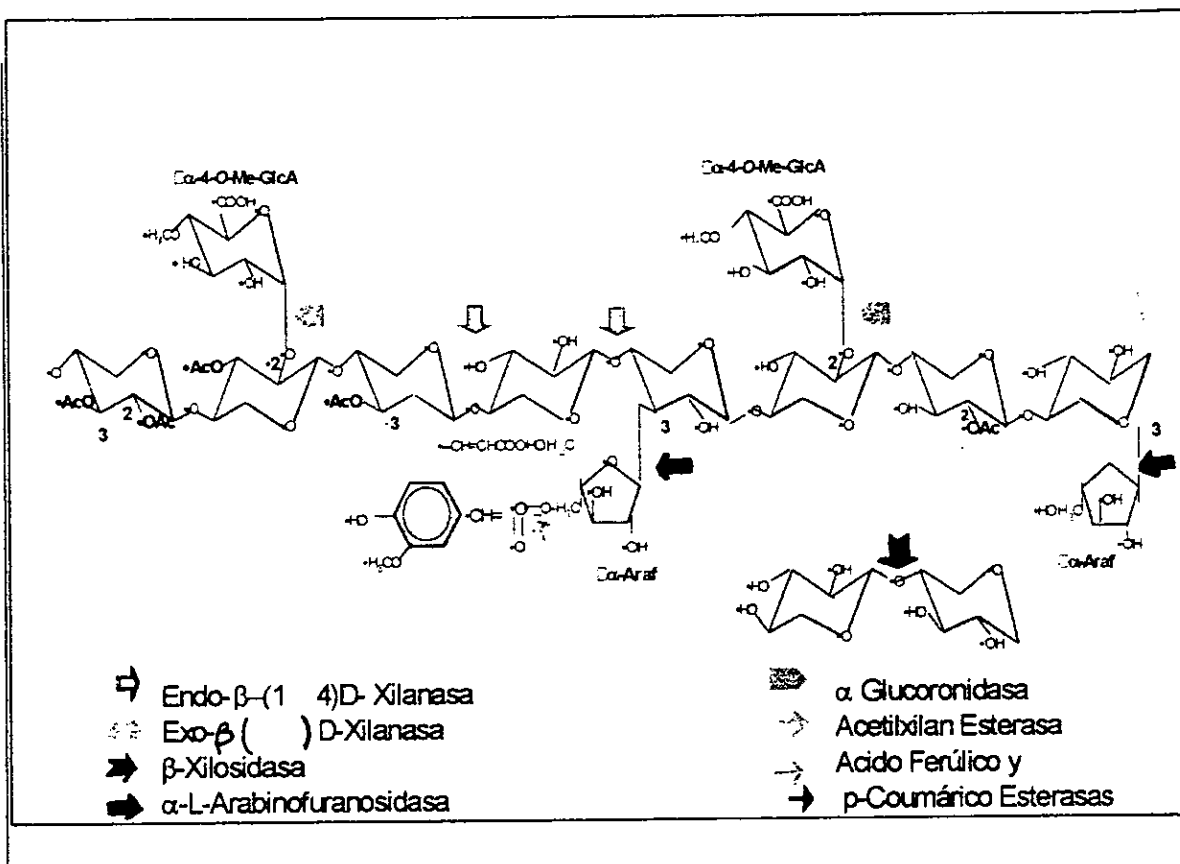
Lo mismo sucede durante la elaboración de productos fermentados, donde se utilizan granos de cereales, como cebada, cascarilla de arroz, salvado de trigo, etc. Su alto contenido de xilanos dificulta la accesibilidad de los microorganismos al almidón y a los azúcares de fácil fermentación, por lo que el proceso se retarda y se obtienen malos rendimientos. Los xilanos tampoco son deseables en algunas bebidas, como en la cerveza y en los vinos, ya que están asociados a la mala filtración del mosto y a la formación de turbiedad, lo que le resta calidad al producto final (Voragen *et al.* 1992; Picó *et al.* 1999).

En la industria del papel, los xilanos también presentan un efecto negativo, ya que al encontrarse fuertemente asociados a la lignina dificultan su eliminación en el blanqueo de la pulpa, lo que ocasiona que el producto no se obtenga con la blancura adecuada, por lo que se recurre al tratamiento químico usando grandes cantidades de compuestos que se desechan y contaminan el ambiente.

Por los problemas que estos polisacáridos causan surgió la necesidad de modificar sus propiedades, mediante tratamientos que resulten inocuos al ambiente y al ser humano, una de las alternativas es por medio de la hidrólisis enzimática.

Las enzimas que degradan a los xilanos son las xilanasas y debido a la heterogeneidad del sustrato forman un sistema enzimático complejo constituido por: exoxilanasas, endoxilanasas,  $\beta$ -xilosidasa,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa,  $\alpha$ -glucuronidasa y esterasas. (Figura 3).

Figura 3. Actividades enzimáticas del sistema xilanolítico.



Fuente: Sunna y Antranikian, 1997; Biely *et al.* 1992; Peij, 1999.

➤ **Exo- $\beta$ -(1→4)-D-Xilanasas [ $\beta$ -(1→4)-D-Xilano Xilohidrolasas].**

Estas enzimas actúan sobre el extremo no reductor del xilano, producen xilosa a partir de oligosacáridos cortos y largos; aunque en estos últimos, su afinidad es menor.

➤  **$\beta$ -Xilosidasas [ $\beta$ -D-Xilósido-Xilohidrolasas] (E.C.3.2.1.37).**

Esta enzima es una de las de mayor importancia, ya que hidroliza a la xilobiosa y xilooligosacáridos que pueden ser producto de la acción de la endoxilanasas, de manera que ambas enzimas pueden actuar sinérgicamente en la depolimerización del xilano. La  $\beta$ -xilosisada produce xilosa y algunas presentan actividad de transferasas (Poutanen y Puls, 1988; Stutzenberger y Bodine, 1998; de Vries, 1999).



►  **$\alpha$ -L-Arabinofuranosidasa y arabinoxilan arabinofuranohidrolasas [ $\alpha$ -L-arabinofuranósido arabinofurano hidrolasa] (E. C. 3.2.1.55).**

Actúan sobre el extremo no reductor del grupo  $\alpha$ -arabinofuranosil de los heteroxilanos que contienen  $\alpha$ -L-arabinosa, por lo que se considera una enzima de tipo exo, hidrolizan a los  $\alpha$ -L-arabinofuranósidos, arabinanos, arabinogalactanos y arabinoxilanos en las posiciones (1 $\rightarrow$ 3) y (1 $\rightarrow$ 5) de la xilosa; producen arabinosa principalmente (Saha y Bothast, 1998; Kaneko *et al.* 1998a y b; Renner y Breznak, 1998; Roche *et al.* 1994; Saha y Bothast 1998; Lounteri *et al.* 1995). Algunos autores han observado sinergismo entre endoxilanasas y arabinofuranosidasas para hidrolizar arabinoxilanos (Poutanen, 1988; Roche *et al.* 1994; Kaneko *et al.* 1998a y b). Las  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas han sido asociados con enzimas de hongos patógenos y con sistemas pectinolíticos (Poutanen, 1988).

►  **$\alpha$ -Glucuronidasa (E. C. 3.2.1).**

Las glucuronosidasas rompen uniones  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 2) del ácido glucurónico y xilosa produciendo ácido 4-O-metilglucurónico. Este tipo de actividad se presenta en 4-O-metilglucuronoxilanos con un grado de polimerización (GP) de más de 2.

► **Acetilxilan Esterasa (E. C. 3.1.1.6).**

Estas enzimas se reportaron por primera vez en 1985, ya que anteriormente no se contaba con el sustrato sintético para detectar este tipo de actividad (Biely *et al.* 1985a). La acetilxilan esterasa remueve grupos O-acetilos que se encuentran unidos al residuo de xilosa en posición del carbono dos (C2) y en carbono tres (C3) en acetilxilanos. Esta actividad produce ácido acético. En algunos microorganismos actúa sinérgicamente con endoxilanasas, ya que se ha observado que una vez que esta enzima actúa, la susceptibilidad del xilano a ser atacado por endoxilanasas aumenta y se producen xilooligómeros desacetilados, xilosa y ácido acético (Poutanen y Sudberg, 1988; Egaña *et al.* 1996; Degrassi *et al.* 1998).

➤ **Acido Ferúlico (E. C. 3.1.1.) y p-Cumárico Esterasas.**

La enzima ácido ferúlico esterasa rompe uniones éster que hay entre arabinosa y ácido ferúlico. De la misma manera, la ácido p-cumárico esterasa actúa rompiendo el enlace éster que existe entre la arabinosa y el ácido p-cumárico. Los productos de hidrólisis son entonces el ácido ferúlico y el p-cumárico, respectivamente (Tenkanen *et al.* 1991; Donaghy y Mckay, 1997; Koseki *et al.* 1998).

➤ **Endo xilanasas [ $\beta$ -(1-4)-D-Xila Xilano Hidrolasa] (E.C.3.2.1.8).**

Estas enzimas hidrolizan los enlaces glicosídicos  $\beta$ (1-4) del esqueleto de xilosa y producen grandes cantidades de xilooligosacáridos, lo que resulta en una disminución del grado de polimerización del sustrato. Estas enzimas no atacan al azar ya que el lugar del rompimiento está determinado por el tamaño del sustrato y por la presencia de sustituyentes.

### 3.2 Clasificación de las endoxilanasas

Bastawde (1992) dividió a las endoxilanasas en cuatro grupos de acuerdo a los productos de hidrólisis que liberan:

- a) No desramificantes (no liberadoras de arabinosa). Este tipo de endoxilanasas no rompen en puntos de ramificación  $\beta$ -(1→4), donde se une arabinosa. Producen solamente xilobiosa y xilosa.
- b) No desramificantes (no liberadoras de arabinosa). No rompen las ramificaciones en los puntos  $\alpha$ -(1→2) y  $\alpha$ (1→3). A diferencia de las anteriores producen mayor cantidad de xilooligosacáridos más grandes que la xilobiosa y no actúan sobre xilotriosa y xilobiosa
- c) Desramificantes (liberadoras de arabinosa). Rompen la cadena del polímero en puntos de ramificación y producen xilobiosa, xilosa y arabinosa en mayor cantidad.

d) Desramificantes (liberadoras de arabinosa). A diferencia de las anteriores producen xilooligosacáridos de tamaño intermedio y arabinosa.

Por otro lado, Wong *et al.* (1988) encontraron una relación interesante de endoxilanasas con algunas de sus propiedades fisicoquímicas, concretamente entre su peso molecular y su punto isoeléctrico. Dividieron a las endoxilanasas en dos grupos: el primero comprende aquellas de peso molecular menor de los 30 kDa con un pI alcalino (en un rango de pH de 8.5 a 10) y el segundo grupo corresponde a endoxilanasas con un peso molecular mayor de 45 kDa y pI ácido (en un rango de 4.5 a 7.0).

Otra forma de agrupar a las endoxilanasas se basa en la secuencia y número de aminoácidos que presentan en su dominio catalítico. La familia F (que corresponden a la familia 10 de las glicosidasas) abarca enzimas de bajo peso molecular de 185 a 234 residuos de aminoácidos, y la familia G (11 de las glicosidasas) son endoxilanasas de alto peso molecular, con 269 a 809 residuos de aminoácidos (Gilkes *et al.* 1991). Se ha observado que enzimas de una misma familia presentan semejanzas en su forma de hidrolizar a los xilanos. Las de la familia F tienen una mayor versatilidad catalítica, lo que sugiere que tienen sitios de unión más pequeños y presentan una mayor afinidad por  $\beta(1\rightarrow4)$  xilooligosacáridos lineales de cadena corta que enzimas de la familia G (Biely *et al.* 1997).

En años recientes se ha dado un importante progreso en el estudio de la arquitectura molecular de estas enzimas, lo que ha ayudado a aclarar sus mecanismos de hidrólisis y ha entendido con más detalle sus propiedades catalíticas. Algunas endoxilanasas se han purificado, cristalizado y analizado por cristalografía de Rayos-X y mediante mutagénesis de un sitio específico se ha logrado determinar qué aminoácidos participan en la catálisis hidrolítica de xilanos (Bedarkar *et al.* 1992; Gilbert y Hazlewood, 1993; Harris *et al.* 1997; Törrönen y Rouvinen, 1997). Tal es el caso de una  $\beta(1\rightarrow4)$ -endoxilanasas de *Aspergillus niger* que presentó una estructura tridimensional de dos hojas beta y en el centro cuatro ácidos glutámicos, lo cual ayudó a explicar molecularmente ¿por qué? esta enzima presentaba un pH óptimo ácido (Krengel y Dijkstra, 1996).

### 3.3 Presencia de las xilanasas

Las xilanasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. Su principal función es la degradación del material hemicelulolítico y participar así en el ciclo del carbono (He *et al.* 1993). Estas enzimas se han presentado en organismos como: bacterias, levaduras, hongos, algas marinas, protozoarios, caracoles, crustáceos, insectos y en semillas de plantas (Sunna y Antranikian, 1997).

La presencia de xilanasas en microorganismos es de vital importancia, generalmente, sirven para aprovechar compuestos de la materia orgánica muerta, fenómeno conocido como saprofitismo (Sánchez, 1960). También se han encontrado durante procesos de patogénesis, donde son secretadas junto con otras hidrolasas para degradar la pared celular de vegetales, como frutas y hortalizas. Todas estas enzimas producen ablandamiento, maceración de los tejidos con la consecuentemente podredumbre. Recientemente se ha encontrado que la interacción de xilanasas microbianas con tejidos de plantas induce la biosíntesis del etileno, el cual es un iniciador de los mecanismos de defensa en vegetales; lo que puede significar que estas enzimas regulan estadios de desarrollo en plantas (Biely *et al.* 1992).

En organismos más complejos, como caracoles, crustáceos e insectos; las xilanasas proporcionan energía. En los rumiantes, la presencia de microflora productora de xilanasas ayuda a un mejor aprovechamiento del forraje, el cual es rico en xilanos (Whitehead y Lee, 1991). Por su parte, las semillas producen xilanasas para hidrolizar la pared celular del pericarpio durante el proceso de germinación; los productos de tal hidrólisis también les sirve como una fuente alimenticia en este estadio.

### 3.3.1 Microorganismos que producen xilanasas

Existe así, una gran variedad de microorganismos que producen xilanasas. Las bacterias son de los más importantes, entre las que encontramos a: *Streptomyces lividans* (Biely *et al.* 1997), *Bacillus subtilis* ATCC 12711 (Poutanen *et al.* 1987), *Bacillus stearothermophilus* T-6 (Fishman *et al.* 1995), *Streptomyces cyneus* (Wang, 1993) y *Cellulomonas fimi* (Bedarkar *et al.* 1992), los cuales son organismos que habitan en el suelo. También se han encontrado en bacterias que habitan en el mar como *Alcaligenes* sp. XY234 (Araki *et al.* 1998) y en bacterias anaerobias, como *Clostridium* sp (De Blois y Wiegel, 1995) y *Bifidobacterium adolescentis* que se encuentran en el intestino del hombre (Van Laere *et al.* 1997) y en bacterias que habitan en el intestino de insectos herbívoros como *Aeromonas caviae* ME-1 y en la microflora de rumiantes *Ruminococcus*, *Butyrivibrio* (Rodríguez, 1994), *Fibrobacter succionogenes* (Hu, 1991) y *Bacteriodes ruminicola* (Whitehead y Lee, 1991).

Las xilanasas también son producidas por levaduras. Los géneros más estudiados han sido: *Trichosporum*, *Aureobasidium*, *Sacharomonospora* y *Criptococcus* (Rodríguez, 1994, Biely *et al.* 1981; Leathers *et al.* 1984).

Otro grupo de microorganismos importantes productores de xilanasas son los hongos filamentosos, los cuales degradan compuestos complejos como: celulosa, almidón, hemicelulosa, pectina, etc.; lo que hace que tengan una gran importancia en el reciclaje del carbono en la naturaleza. Este estilo de vida saprófito ha sido explotado por el hombre para producir enzimas de interés industrial y las xilanasas no han sido la excepción. Los géneros más estudiados son: *Penicillium* (Milagres y Prade, 1994; Gaspar *et al.* 1997), *Trichoderma* (Sunna y Antranikian, 1997; Wong y Sadler, 1992), *Humicola* (*Chrysosporium*) (Nandita, 1992), *Sclerotium* (Sachslehner *et al.* 1998) y *Aspergillus* (Fournier *et al.* 1985; Gouka *et al.* 1997). El género *Trichoderma* junto con *Aspergillus* son los de mayor interés; algunas especies de esto producen hasta cinco diferentes xilanasas con altos niveles de actividad xilanolítica (Royer y Nakas, 1989; Ken *et al.* 1992).

### 3.3.2 Xilanasas en Aspergilli

El género *Aspergillus* pertenece a la división Deuteromyceta también llamada grupo de los hongos imperfectos. Se llaman así porque aparentemente carecen de ciclo sexual (*A. niger*, *A. oryzae*, entre otras); mientras que otros, como, *Aspergillus nidulans* se han clasificado dentro de la división Ascomycota porque presentan ciclo sexual (Delgado, 1997; Parénicová, 1999). Muchas especies de este género se han utilizado en la investigación bioquímica y genética debido a su versatilidad para crecer en diferentes condiciones ambientales y por su fácil conservación en el laboratorio.

Los Aspergilli han sido usados en la industria para la producción de metabolitos (ácidos orgánicos, vitaminas, ácidos grasos y aminoácidos) y enzimas que son usadas en procesos de bioconversión. Desde 1917, *Aspergillus niger* se ha usado para la producción de ácido cítrico, el cual es un aditivo aceptado mundialmente con un amplio rango de aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética, entre otras. *A. niger* y *A. oryzae* son los más importantes productores de enzimas. El primero se ha explotado ampliamente en el área de los alimentos (panificación e industrialización del almidón) y bebidas (vinos, jugos, cervezas y destilados); mientras que *A. oryzae* se ha usado en la obtención de salsas orientales, como salsa de soya y miso. Como ambas especies se han usado por muchos años, la mayoría de sus productos han obtenido el estatus GRAS (Generally Regarded As Safe; Parénicová, 1999).

Por la gran importancia biotecnológica y económica de este género, su estudio en el campo de las xilanasas se ha enfocado a la producción y caracterización de cepas productoras, a la optimización de medios de cultivo que emplean fuentes de xilanos convencionales, como xilanos de abedul, avena, de árbol de haya, etc., y en fuentes de xilanos de origen agroindustrial: cascarilla de arroz, salvado de trigo, bagazo de caña, olote de maíz, desechos de papel, etc.; donde se han obtenido altos niveles de xilanasas (Royer y Nakas, 1989; Biswas *et al.* 1990; Riou *et al.* 1991; Bailey y Poutanen, 1989; Kadowaki *et al.* 1997; Gouka *et al.* 1997; Schmidt y

Schmidt, 1979; Leathers *et al.* 1984; Biswas *et al.* 1984; de Graaf *et al.* 1994; Gomes *et al.* 1994).

Por otro lado, se ha estudiado sobre las condiciones óptimas de producción de xilanasas y se ha encontrado que muchas cepas de *Aspergillus* producen mayor actividad xilanolítica entre 30 y 37°C; aunque pueden crecer a temperaturas más altas y producir una importante actividad; tal es el caso de *Aspergillus* sp FP-470 que se creció a 45°C y produjo una actividad xilanolítica mayor que a 37°C (Mendicuti *et al.* 1997). Así mismo, el pH es otra condición de crecimiento que influye en la producción de xilanasas y generalmente, *Aspergillus* presentan mayor actividad a pH's de 5 a 6.

Como ya se mencionó anteriormente, este género tiene la capacidad de producir varias endoxilanasas; así, la cepa de *Aspergillus niger* presentó cinco xilanasas cuando se creció en xilanos de avena a 37°C; dos de las cuales resultaron ser isoenzimas con pesos moleculares muy cercanos y pls de 8.6 y 9.0 (Frederick *et al.* 1985; Shei *et al.* 1985). De la misma manera, *Aspergillus nidulans* produjo dos endoxilanasas de 22 y 36 kDa en xilanos de avena a una temperatura de 37°C (Fernández-Espinar *et al.* 1992).

### **3.3.3 Multiplicidad de xilanasas en microorganismos**

¿Por qué los microorganismos producen múltiples endoxilanasas?- Esta pregunta ha sido planteada por muchos grupos de investigación, para lo cual han propuesto varias explicaciones. Una de éstas, es que, al parecer consiste es una estrategia de los microorganismos para hidrolizar a los xilanos de forma eficiente debido a que es un sustrato heterogéneo, por lo que es necesario la acción de varias enzimas y las endoxilanasas son de las más importantes. Otra explicación es que los microorganismos al producir varias endoxilanasas aprovechan mejor los xilanos, lo que les permite competir con otros organismos (Thakur *et al.* 1992). Por otro lado,

se ha encontrado que el sistema xilanolítico actúa de tal manera que el producto de una enzima puede servir como sustrato, inductor y/o represor para otras y que no todas las endoxilanasas se producen en la misma proporción, ya que para su función se necesitan en cantidades específicas (Wong *et al.* 1988).

También se han preguntado si las endoxilanasas provienen de un mismo gen y/o de diferentes genes; los resultados encontrados van en los dos sentidos, ya que en algunos casos como en *Aspergillus niger* son producidas por diferentes genes (Vries, 199; Gielkens, 1999; 1999) y en otros son producto de un mismo gen y sufren modificaciones postraduccionales como glicosilación y proteólisis, lo que da como resultado que las endoxilanasas tengan diferentes características al ser secretadas (Wong *et al.* 1988).

En la tabla 2 se muestran las propiedades de algunas  $\beta(1\rightarrow4)$ -endoxilanasas que se han purificado. Los valores de pI abarcan desde 4.0 hasta 11.5, mientras que los pesos moleculares se encuentran en un rango de 13.2 hasta 250 kDa (Sunna y Antranikian, 1997). El pH óptimo se encuentra entre 2 y 11 y su temperatura óptima de 30 a 80°C (Bastawde, 1992). La estabilidad a pH abarca desde 3 hasta 10 y de 40 a 70°C la estabilidad a temperatura; mientras que su máxima actividad se encuentran en un rango de 4.5 a 7 y la temperatura óptima entre 40-70°C. La mayoría de endoxilanasas del género *Aspergillus* son de bajo peso molecular.

### **3.4 Inducción de las xilanasas**

Si bien en muchos microorganismos las xilanasas son inducidas por la presencia de xilanos, en algunas bacterias, levaduras y hongos se producen de manera constitutiva, como en *Aerobasidium pullulans* que en ausencia de xilanos produjo una actividad xilanolítica importante y en *Trichoderma longibrachiatum* que presentó cantidades pequeñas de xilanasas cuando se creció en presencia de glucosa (Bastawde, 1992; Leathers *et al.* 1984; Royer y Nakas, 1989).



Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de  $\beta$ -1,4-endo-xilanasas de diferentes microorganismos.

Microorganismo	T.de. crecim. °C	Xilana sa	Peso Molec kDa	pl	Temp. Optima °C	pH óptimo	sustrato	Producto de hidrólisis	Modo de acción	Km mg/ml	Vmax $\frac{\mu\text{moles}}{\text{min} \cdot \text{mg}}$	Inhibidores	Referencia
<i>Aspergillus niger</i>	-	I	21	6.7	55	5	x. avena	X2,X1,GP3,4	-	-	-	Hg <sup>+2</sup>	Fournier <i>et al.</i> 1985
"	-	II	13	8.6	45	6	"	GP3,5, 2,4,6	-	-	-	Hg <sup>+2</sup> , Cu <sup>+</sup>	Shei <i>et al.</i> 1985
"	-	III	13	9.0	45	5.5	"	GP3,5,3,4,6	-	-	-	Hg <sup>+2</sup> , Cu <sup>+</sup>	Frederick <i>et al.</i> 1985.
"	-	IV	14	4.5	45	4.9	"	GP5,3,2,4,6	-	-	-	Hg <sup>+2</sup> , Cr <sup>+2</sup> , Cu <sup>+2</sup> , Mn <sup>+2</sup>	Frederick <i>et al.</i> 1985.
"	-	V	28	3.65	42	5	"	GO3,5,2,4,6	-	-	-	Hg <sup>+2</sup> , Ca <sup>+2</sup>	Fournier <i>et al.</i> 1985.
<i>Aspergillus niger</i>	-	I	50	-	4.0 - 6.5	-	"	A, X1, X2 oligosacár. x1	endo	-	-	-	Schmidt y Schmidt, 1979.
<i>Aspergillus fischeri</i> Fn1	-	-	31	-	60	6.0	x. avena abedul	-	-	4.88	588	AlCl <sub>3</sub> 10mM	Chandra y Chandra, 1996.
<i>Aspergillus nidulans</i>	37	-	22	6.4	62	5.5	x. avena	X4, X3X2	endo	4.2	710	Hg <sup>+2</sup> , Mn <sup>+2</sup> ,	Ferdz-Esp <i>et al.</i> 1993.
<i>Aspergillus ochraceus</i>	28	1	48	-	50	6.0	-	-	-	0.001	19.6	K <sup>+</sup> , Hg <sup>+2</sup>	Biswas <i>et al.</i> 1990.
<i>Aspergillus sp</i>	35	Xil I	26	7.2	50	5	-	-	-	-	-	-	Khana <i>et al.</i> 1995
<i>Aeromonas caviae</i> ME-1	-	Xil II	21	4.7	50	5	x. avena	xilobiosa	exo	2 en x abedul	182	-	Kilunga <i>et al.</i> 1994.
<i>Bacillus amylicuefaciens</i>	-	Xyl V	46	5.4	30-37	6.8	x. abedul	X2, X3 en x.avenay bagazo	endo	4.5	0.58mmol/min/mg	-	Breccia, 1998.
<i>Bacillu sp.</i>	35	Xyl A	23	-	70	9	-	-	-	-	-	Hg <sup>+2</sup> , Fe <sup>+2</sup> , Fe <sup>+3</sup> y Pb <sup>+2</sup>	Gessesse, 1998.
<i>Bacillu sp.</i>	55	Xyl B	48	-	75	9-10	-	-	-	-	-	Cu <sup>+2</sup> , Zn <sup>+2</sup> , Cd <sup>+2</sup> , Co <sup>+2</sup>	Marques, 1998.
<i>Bacillus sp. BP-23</i>	-	-	-	-	90	6-7.5	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus sp. BP-23</i>	-	Xyl A fam. F	32	9-3	50	5.5	x. abedul	X4, X2	-	10.49	42.02	Fe, Ag, Zn, Hg, N-bromosuccinimide	Blanco <i>et al.</i> 1995.
<i>Chaetomium</i>	50	I	26	-	70	5.4-6	x. haya	X2, X3, X4	endo.	0.55	58.8	-	Ganju <i>et al.</i> 1989.

Continuación de tabla 2

<i>Chaetomium thermophile</i>	50 celul micr	I II	26 7	- -	70 60	5.4-6 4.8- 6.5	x. haya	X2, X3, X4 X2	endo exo	0.55 0.01	58.8 5.26	-	Ganju <i>et al.</i> 1989.
<i>Humicola grises</i> var. <i>thermoidea</i>	45 paja de trigo	xil I xil II	13 95	- -	60 60	7.0 5.5	x. avena	xilooligosac áridos y tr xilosa	endo	0.002 0.0033	18.18 20	-	Thakur <i>et al.</i> 1992.
<i>Micrococcus</i> so Ar-135	32	-	56	-	55	7.5-9	x. avena	-	endo	-	-	Cu <sup>+2</sup> , Hg <sup>+2</sup>	Gessese y Mamo, 1998.
<i>Streptomyces</i> <i>chattanoogensis</i>	28 x. avena	-	48	9.0-	50	6	x. avena x. abedul	X2, X3, X4	endo	4.0 0.3	78.2 19.1	Hg <sup>+2</sup> , Cu <sup>+2</sup> , Ag <sup>+2</sup>	López-Frdz <i>et al.</i> 1998.
<i>Streptomyces</i> <i>cyaneus</i>	37 paja trig	xil I xil II	35.5 34	5.1 5.3	72 (10)	8.5	-	-	-	-	-	-	Wang <i>et al.</i> 1993
<i>Streptomyces</i> sp. A51	-	xyl I xyl II	22.8 33.1	8.6 8.9	50 50	5.6 5.4	x. avena	X3, X4	endo	-	-	-	He <i>et al.</i> 1993
<i>Thermotoga</i> <i>thermarum</i>	37 xilanos	endo I endo II	105 150	-	80 90-100	6 7	x. abedul	X2 y oligos X2	endo	0.36 0.24	1.18 19.5	4-O-metil -D-gluco ronoxil	Sunna <i>et al.</i> 1996.
<i>Trichoderma</i> <i>harzianum</i> E58	-	-	20.0 22 29	9.4 8.5 9.5	50 45-50 60-65	5.0 4.5-5 5.0	-	-	-	-	-	-	Wong y Sadler, 1992.
<i>Trichoderma</i> <i>reesei</i> QM 9414	-	-	8.5 11.7 14.4 20	10.3 8.6 6.6 9	- - - -	- - - 5.3	-	-	-	-	-	-	Wong y Sadler, 1992.

abreviaturas: x: xilanos; X1, xilosa; X2, xilobiosa; X3, xilotriosa; X4 xilotreosa; X5, Xilopentaosa. GP, grado de polimerización. tr, trazas.

En la mayoría de los hongos filamentosos como en *Trichoderma* y *Aspergillus*, las xilanasas son inducidas por xilanos, xilooligómeros, xilobiosa y xilosa. En *Aspergillus terreus*, *Aspergillus sydowii* y *Aspergillus nidulans* se ha encontrado que la D-xilosa, xilobiosa, xilotriosa y xilotetraosa son los mejores inductores.

Un grupo particular de inductores son isómeros posicionales de la  $\beta$ -xilobiosa. Varias evidencias han mostrado que son más poderosos que los compuestos naturales a pesar de que en algunos casos no se ha demostrado si son los verdaderos inductores (Coughlan y Hazlewood, 1993). Ejemplos de ellos son 1,4- $\beta$ -xilobiosa, 1,3- $\beta$ -xilobiosa y 1,2- $\beta$ -xilobiosa. Otros compuestos importantes en la inducción de xilanasas son heterodisacáridos de D-xilosa y D-glucosa. Se ha visto que el 2-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-D-xilosa es uno de los inductores más poderosos en *A. terreus* (Peij, 1999).

Recientemente se han hecho estudios con compuestos sintéticos, entre los que destacan el metil  $\beta$ -D-xilósido que en *A. niger* indujo la expresión de todo el sistema xilanolítico, mientras en *A. terreus*, *A. sydowii* MG49, *A. tubingensis*, *A. nidulans* y *A. tamarii* indujo únicamente la expresión de endoxilanasas (Simão, 1997; Peij, 1999). Por lo que la inducción de xilanasas en *Aspergillus* es debido a xilosa, pero existen diversos grupos de azúcares que contienen en su estructura xilosa y son capaces de inducir la expresión de estas enzimas (Peij, 1999).

### **3.5 Regulación de las xilanasas**

De manera general, la expresión de enzimas que degradan a polisacáridos esta controlada por la inducción de un activador transcripcional y por represión catabólica. La represión catabólica es un mecanismo de regulación global, en el cual la presencia de una fuente de carbono que es rápidamente metabolizable reprime la expresión de genes involucrados en la utilización de fuentes que son

menos metabolizables. Tal es el caso de la levadura *Thermoascus aurantiacus* que en xilanos de avena produjo niveles altos de xilanasas, pero en xilanos adicionados con glucosa no se detectó actividad xilanolítica, lo que significó que la producción de xilanasas se reprimió catabólicamente (Gomes et al. 1994).

De la misma manera, en el género *Aspergillus* la inducción de xilanasas esta regulada por represión catabólica, ya que cuando se hace crecer en xilanos más una fuente de carbono, como xilosa, glucosa ó lactosa, la actividad disminuye ó no se detecta. En *Aspergillus tubingensis* con un gene (*xlnA*) que codifica para una endoxilanasas de 19 kDa se encontró que la expresión del gene estuvo controlado a dos niveles: directamente por la represión transcripcional del gen e indirectamente por la represión de la expresión del activador transcripcional (de Graaf et al. 1994; Peij, 1999) .

### **3.6 Aplicaciones de las xilanasas**

El uso de xilanasas se ha incrementado en los últimos 10 años y actualmente representan un gran potencial para ser explotadas en diferentes procesos agrícolas que a continuación se mencionan:

► **Procesos textiles.** Las xilanasas se usan para eliminar residuos de xilanos que se encuentran adheridos a las microfibrillas de celulosa (Milagres y Prade, 1994). Es imprescindible que las preparaciones de xilanasas se encuentren libres de celulasas para no afectar fibras celulósicas, tanto en la obtención de fibras blandas de lino como de cáñamo (Wong et al. 1988). Estas enzimas, también se usan en el tratamiento de telas que requieren de un terminado especial.

► **Manejo de desechos de forraje y en dietas basadas en cereales.** El pretratamiento de forraje y de material celulósico con xilanasas ocasiona la hidrólisis de la pared celular con la subsecuente liberación de nutrientes que se encuentran atrapados por xilanos; esto permite una mejor absorción de nutrientes y

una mejoría en la consistencia, calidad nutricional y digestibilidad de alimentos para animales de granja (van Paridon *et al.* 1992). De la misma manera, el uso directo de xilanasas en dietas ricas en xilanos disminuye la viscosidad de los alimentos en el aparato digestivo, lo que permite una mejor digestión de nutrientes. Krenzel y Dijkstra (1996) reportaron que el uso de una endoxilanasasa de *Aspergillus niger* en dietas de pollos mejoró el crecimiento y redujo la cantidad de excremento. Lo cual tiene una gran importancia económica que se refleja en la disminución de los costos debido al mayor aprovechamiento del forraje.

➤ **Sacarificación del material hemicelulolítico.** La obtención de jarabes para consumo animal y humano ha sido otra alternativa del uso de xilanasas, que ayudadas de otros sistemas enzimáticos, como celulasas, degradan el material celulósico y hemicelulósico. La obtención de monosacáridos, en este caso, de xilosa se ha utilizado para producir etanol (Gilbert y Hazlewood, 1993).

➤ **Biodegradación de desechos agrícolas, industriales y municipales.** Las xilanasas se usan en la bioconversión de desechos; los productos de degradación enzimática son depositados en el suelo y son aprovechados por otros organismos, con lo cual se evita su erosión y se mantiene el balance en el ciclo del carbono de la biósfera (Himmel *et al.* 1999).

➤ **Industria del papel.** El pretratamiento de la pulpa con xilanasas mejora la resistencia de la pulpa a la tensión. En el blanqueo ayudan a liberar la lignina (que imparte el color oscuro) de las fibras celulósicas, por lo que se disminuye el uso de compuestos químicos (Clarke *et al.* 1997). La aplicación de las xilanasas en este tipo de procesos cobra cada día mayor importancia debido a las ventajas que representan para el ambiente (Montenecourt, 1981; Reid y Paice, 1994; Kulkarni *et al.* 1999).

➤ **Clarificación de jugos, cervezas y vinos.** Estas enzimas son usadas junto con pectinasas y celulasas en la elaboración de diferentes bebidas. En los jugos ayudan a mejorar una mejor liberación del mosto durante la maceración de la fruta, reducen la viscosidad y solubilizan las sustancias indeseables como restos de

tejidos (Aguilar, 1986). En la elaboración de cerveza, la aplicación de las xilanasas se hace durante la sacarificación para eliminar los xilanos que ocasionan turbiedad en el producto final (Debyser *et al.* 1998). En los vinos, el uso de levaduras con xilanasas recombinantes han mejorado el aroma y aumentan la calidad del producto terminado (Picó *et al.* 1999; Villanueva *et al.* 2000).

► **Panificación.** Las xilanasas se aplican junto con otras enzimas, como amilasas, lipasas, oxidasas y pectinasas (Eerlingen *et al.* 1994; Eynard *et al.* 1995; Monfort *et al.* 1996 y 1999, Schroder *et al.* 1999; Martín y Hosney, 1991). Las preparaciones comerciales se conocen como mejoradores de la masa. Se ha observado, que las xilanasas disminuyen la viscosidad de la masa y mejoran sus propiedades reológicas, como la maleabilidad y la elasticidad, mientras que en el pan se observa un aumento en el volumen, una mejor textura y un retardo en el proceso de envejecimiento (pérdida gradual de la humedad; Monfort *et al.* 1996). Al respecto, Maat *et al.* (1992) reportaron el efecto de diferentes xilanasas en panes elaborados con harinas de bajo contenido de gluten y encontraron que una endoxilanasas de *Aspergillus niger var awamori* de bajo peso molecular (184 a 211 aminoácidos) presentó un efecto positivo en el volumen del pan sin efectos colaterales indeseables. También observaron que no todas las endoxilanasas actúan de la misma manera, ya que algunas de estas enzimas provocan un ablandamiento excesivo en la masa y por tanto una compactación del pan.

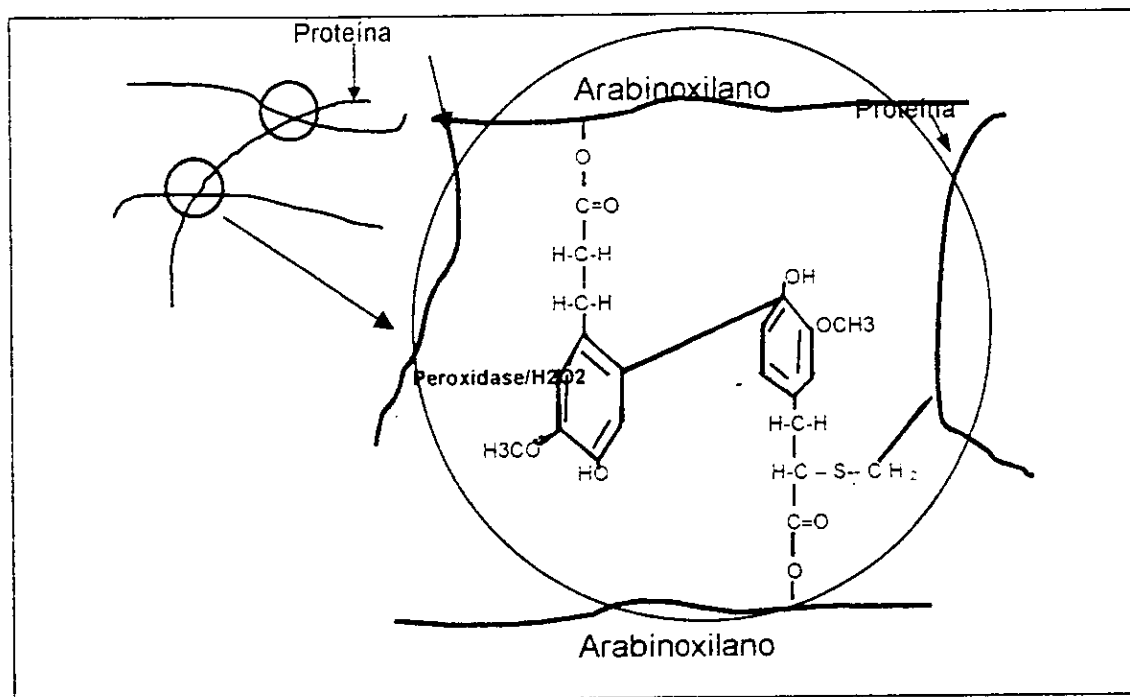
Las preparaciones enzimáticas comerciales, como ya se mencionó, contienen además de xilanasas, amilasas principalmente. La acción de ambas enzimas tiene un efecto sinérgico. Maat *et al.* (1992) reportaron que al usar una  $\alpha$ -amilasa junto con una endoxilanasas el volumen del pan aumentó un 17%, con respecto al control (pan sin enzima) y un 7% con respecto a la xilanasas sola. Así mismo, el uso de *Saccharomyces cerevisiae* transformada con un gen de  $\alpha$ -amilasa no presentó un efecto mejorador en el pan, pero al transformarla con genes de xilanasas y  $\alpha$ -amilasa, la calidad se mejoró con un aumento en el volumen del 31% y un retardo en el endurecimiento del pan.

Pese a la gran importancia que representa la aplicación de las xilanasas en la panificación, actualmente no se conoce con detalle como modifican la estructura y las propiedades de los xilanos en la masa. Una explicación es que, estas enzimas ayudan a la coagulación del gluten, ya que al hidrolizar a los xilanos eliminan el impedimento estérico que es ocasionado por la unión covalente de los xilanos con la proteína del gluten (Sarker *et al.* 1998).

Otro modelo que trata de explicar el comportamiento de los xilanos en la masa, menciona que se debe a la capacidad que tienen estos compuestos de formar geles a temperatura ambiente en presencia de agentes oxidantes. La gelificación puede ser afectada por la concentración de los xilanos, la concentración del oxidante, el pH, el contenido de cenizas y la presencia de compuestos orgánicos. Debido a que la gelificación se lleva a cabo en presencia de un oxidante, el fenómeno se denomina gelificación oxidativa. Las sustancias involucradas en este fenómeno son los arabinoxilanos que contienen ácido ferúlico. La gelificación ocurre debido a dos razones, por la dimerización del ácido ferúlico mediante una reacción de acoplamiento oxidativo que forma uniones intermoleculares y por la unión doble del carbono con el oxígeno, donde un radical tiol de una proteína se puede unir. Ambos tipos de uniones crean entidades de alto peso molecular que se entrecruzan e incrementan la viscosidad, lo que afecta las propiedades reológicas en la masa (Hoseney, 1984; figura 4).

No todos los oxidantes son capaces de inducir la gelificación oxidativa sino que la inhiben como el bromato de potasio y el ácido ascórbico. Estos oxidantes se usan en la panificación para aumentar la formación de enlaces disulfuro entre las proteínas del gluten, lo que resulta en una masa más tenaz y extensible. Sin embargo, el uso de bromatos a causado controversia ya que a altas concentraciones resulta ser un agente carcinogénico. Su uso está prohibido en Europa y Japón. En los países donde todavía se utiliza, su uso está fuertemente regulado (Serna, 1996). Por que el uso de xilanasas para reemplazar a los bromatos representa una alternativa, ya que estas enzimas inhiben la gelificación oxidativa.

Figura 4. Dimerización del ácido ferúlico y su interacción con las proteínas.



Fuente: Hosney, 1984; D'Appolonia y Schawarz, 1992.

Debido a la complejidad de la masa ha sido necesario implementar técnicas para estudiar el efecto de las xilanasas sobre este sistema. En estas, los xilanos de la harina de trigo se han extraído y sometido a tratamientos con xilanasas. Los resultados mostraron que los xilanos se solubilizaron con la consecuente disminución de la viscosidad, debido posiblemente a la acción directa de las xilanasas sobre los fragmentos insolubles de los xilanos que se encuentran principalmente en la pared celular (Scrøder *et al.* 1999; Morales, 1999).

También se estudió la asociación entre una arabinofuranosidasa y una endoxilanasas; para lo cual, los xilanos extraídos se pusieron en contacto con arabinofuranosidasa, la cual liberó los grupos laterales de arabinosa y dejó más sitios de unión disponibles para la endoxilanasas que al actuar, solubilizó en mayor proporción a los xilanos, que cuando se uso sola (Petit-Benvegnen *et al.* 1998). Es importante aclarar que estas investigaciones se han hecho en condiciones óptimas,



es decir, con exceso de agua y exposición directa de los xilanos a las enzimas. Sin embargo, en las masas los xilanos pueden estar parcialmente protegidos por otros compuestos ó encontrarse donde haya una menor disponibilidad de agua, por lo que los resultados generados en el primer caso no se pueden extrapolar al segundo caso (Rouau y Moreau, 1993; Wang *et al.* 1998; Loosveld *et al.* 1998).

► **Otras aplicaciones.** Por otro lado, otras de las aplicaciones de las xilanasas ha sido en el estudio de la estructura de polisacáridos de la pared celular en los vegetales, en la obtención de compuestos que ayudan a esclarecer sus mecanismos de acción, en la producción de protoplastos de hongos y plantas y para la obtención de anticuerpos (Wong *et al.* 1988; Wang *et al.* 1999).

En el campo de la medicina, las xilanasas recientemente han cobrado importancia. Sus productos de hidrólisis, como la xilobiosa, estimulan el desarrollo de las bacterias probióticas que se encuentran en el intestino del hombre, las cuales aportan múltiples beneficios a la salud. Este hallazgo es importante debido a que las bacterias probióticas se aislan difícilmente en el laboratorio y más complicado resulta hacerlas crecer debido a que son anaerobias (Jaskari *et al.* 1998; Jeong *et al.* 1998).

Las fuentes de xilanasas que se han usado en los procesos industriales pertenecen a los géneros de: *Bacillus*, *Celullomonas*, *Streptomyces*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Aspergillus* (Marques *et al.* 1998; Clarke *et al.* 1997; López Fernández *et al.* 1998; Wang *et al.* 1999; Maat *et al.* 1992; Monfort *et al.* 1996; van Paridon *et al.* 1992; Picó *et al.* 1999). En la industria alimentaria destaca el uso de xilanasas de *Aspergillus* que en diversos estudios no presentaron efectos adversos cuando se administraron en ratones por vía oral (Picó *et al.* 1999).

### 3.7 Xilanasas y otras enzimas.

En ciertas aplicaciones industriales se requiere de xilanasas libres de celulasas, pero debido a que tienen funciones parecidas en la naturaleza y ambas rompen enlaces  $\beta$ -1,4-glicosídicos (endoglucanasas) por un mecanismo similar, son pocas las excepciones en que los microorganismos que degradan los xilanos son invariablemente celulolíticos y en ocasiones secretan una mezcla compleja de celulasas y xilanasas, simultáneamente. Aunque existen endoglucanasas bifuncionales, es decir, enzimas que hidrolizan ambos tipos de polisacáridos (celulosa y xilanos: Coughlan y Hazlewood, 1993). Royer y Nakas (1989) propusieron que la producción de xilanasas y celulasas esta corregulada, es decir, que ambos tipos de enzimas son reguladas por los mismos compuestos.

En los desechos industriales es inevitable la presencia de varias actividades debido a su composición heterogénea. En los hongos fitopatógenos la capacidad de producir varios sistemas hidrolíticos en sustratos como xilanos, pectina cítrica, pectina de manzana, carboximetilcelulosa, entre otros compuestos, les da una gran ventaja para invadir a sus huéspedes, los cuales contienen en su pared celular polisacáridos como celulosa, pectina y hemicelulosa ó para adaptarse rápidamente a los cambios en los sustratos (Riou *et al.* 1991; Sachslehner *et al.* 1998).

En algunos casos, la presencia de otras enzimas en las preparaciones de las xilanasas es deseable, ya que se ha observado un efecto sinérgico. Por ejemplo, en la industria de los alimentos se requieren de pectinasas, celulasas y xilanasas para la clarificación de jugos y vinos; y de  $\alpha$ -amilasas, lipasas y xilanasas en la panificación (Wong *et al.* 1988; Maat *et al.* 1992; Monfort *et al.* 1996 y 1997; Aguilar, 1986).

## 4. ANTECEDENTES

La cepa de *Aspergillus* sp FP-470 fue aislada en nuestro laboratorio a partir de muestras de frutas en estado de descomposición. Este microorganismo fue seleccionado por su capacidad de producir una alta actividad xilanolítica cuando se hizo crecer en xilanos de abedul a una temperatura de 37 y 45°C. Ambos filtrados extracelulares fueron caracterizados. El pH y temperatura óptimos del filtrado producido a 37 °C fueron de 6.5 y 80°C, respectivamente. Mientras que los valores del filtrado de 45°C resultaron ser diferentes, con valores de 4.3 y 50°C. Ambos presentaron un amplio rango de estabilidad al pH entre 2.5 a 9.0. La termoestabilidad de los dos filtrados en presencia de sustrato (xilanos de abedul al 1%) se incrementó un 80-85%. Los iones como el Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> y K<sup>+</sup>, estimularon levemente la actividad en el filtrado de 37°C, mientras que para el filtrado de 45°C fueron los iones Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Mg<sup>+2</sup> y el Zn<sup>+2</sup> los que la aumentaron. En los dos filtrados se observó la presencia de varias endoxilanasas (Mendicuti *et al.* 1997).

Sin embargo, esta caracterización se hizo en los filtrados crudos, por lo que era necesario conocer las propiedades fisicoquímicas y bioquímicas de al menos una de las xilanasas que produce *Aspergillus* sp FP-470, para estudiar su efecto en panificación. Por lo que fue necesario fraccionarla y purificarla. Planteándose el siguiente proyecto:

➤ Producción, purificación y caracterización de una xilanasas de *Aspergillus* sp FP-470 y su aplicación en panificación.

## 5. OBJETIVOS

➤ Producir, purificar y caracterizar bioquímicamente una xilanasa de *Aspergillus* sp FP-470 y estudiar su efecto en pruebas de panificación.

### OBJETIVOS PARTICULARES

➤ Establecer la mejor fuente de xitanos en donde *Aspergillus* sp FP-470 produzca la mayor actividad xilanolítica.

➤ Determinar la presencia de otras actividades enzimáticas asociadas, como celulasas, amilasas y pectinasas.

➤ Evaluar la cinética de crecimiento y producción de las xilanasas de *Aspergillus* sp FP-470, en un bioreactor de 14 L.

➤ Aislar y purificar una xilanasa de *Aspergillus* sp FP-470.

➤ Caracterizar bioquímicamente la xilanasa purificada.

➤ Evaluar el efecto del filtrado extracelular completo y de la xilanasa purificada ambos *Aspergillus* sp FP-470 en el volumen y en las características sensoriales del pan y su comparación con muestras enzimáticas comerciales.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

**6.1 Microorganismo.** Se trabajó con una cepa del género *Aspergillus*, la cual fue aislada en el laboratorio a partir de frutas en estado de descomposición. La cepa se identificó como *Aspergillus* sp FP-470 se propagó en tubos inclinados de agar papa dextrosa (Bioxón, México). a 37°C y se conservó a temperatura ambiente.

**6.2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.** Para la producción de la actividad xilanólica *Aspergillus* sp FP-470 se cultivó en el siguiente medio basal:  $K_2HPO_4$  0.2%,  $KH_2PO_4$  0.2%,  $(NH_4)_2SO_4$  0.4% y extracto de levadura al 0.3%. Las fuentes de carbono que se utilizaron fueron: xilanos de abedul y avena (Sigma, Chem. Co), hemicelulosa (obtenida por extracción alcalina de olote de maíz), olote de maíz molido y salvado de trigo, todos al 1%. Los medios se ajustaron a pH de 5 y se esterilizaron a una temperatura de 121°C, durante 20 min.

Para evaluar la mejor fuente de xilanos en donde *Aspergillus* sp FP-470 produjo la mayor actividad xilanólica se realizaron fermentaciones en matraces Erlenmeyer de 500 ml con 200 ml de medio y se incubaron a 37°C en una agitadora recíproca de 1 pulg. de desplazamiento, marca New Brunswick Sci. con agitación de 100 golpes/min. Estos matraces se inocularon con una suspensión de esporas de la cepa en una concentración de  $1 \times 10^6$  esp/ml de medio.

Para evaluar la cinética de crecimiento y producción de las xilanasas de *Aspergillus* sp FP-470 y obtener una considerable cantidad de filtrado extracelular se realizó una fermentación en un bioreactor de 14 L, el cual se inoculó de la siguiente manera: la cepa de *Aspergillus* sp FP-470 se creció en un matraz Erlenmeyer de 500 ml con 100 ml de medio basal con olote de maíz al 1%, a pH inicial de 5.0 y se incubó a 37°C por 48 h, con una agitación de 100 r.p.m. De este matraz se tomaron 10 ml y se inocularon en un matraz Fembach de 3 L con 1 L de medio basal con olote de maíz al 1% (previamente esterilizado a una temperatura de 121°C, durante

20 min) y se incubó a 37°C, durante 24 h. El contenido de este matraz se inoculó en el bioreactor de 14 L, que contenía 9 L de medio basal (ver párrafo anterior) y olote de maíz al 1%, a pH inicial de 5.0. Las condiciones de crecimiento en el bioreactor fueron 37°C de incubación, 1 vvm de aireación y agitación de 200 r.p.m.

**6.3 Crecimiento celular.** El crecimiento del microorganismo en los medios de xilanos de abedu y xilanos de avena se determinó por peso seco. Mientras que en los medio de hemicelulosa, olote de maíz y salvado de trigo se realizó por proteína intracelular. Para determinar peso seco se tomaron 10 ml del caldo de fermentación, se filtró por una membrana Millipore de 5.0  $\mu\text{m}$ , previamente pesada. La biomasa retenida se secó en una estufa a 90°C, hasta peso constante y por diferencia se calculó el peso seco que se expresó en mg de biomasa por ml de medio (mg/ml). Para determinar proteína intracelular se centrifugaron 5 ml del caldo a 3,000 r.p.m. (en una centrifuga clínica marca SOL-BAT, México), durante 10 min. El sobrenadante se eliminó, mientras que el paquete celular se lavó dos veces en solución salina y se resuspendió en 2 ml de agua; se homogenizó y se tomaron 0.5 ml que se colocaron en un tubo eppendorf con un volumen equivalente de perlas de vidrio (Sigma Chem. Co). El tubo se colocó en hielo durante 1 min y se agitó vigorosamente en vortex, esta operación se repitió dos veces. Después se centrifugó en una microcentrifuga marca Beckman, se tomaron 0.3 ml del sobrenadante al cual se le determinó proteína por el método de Lowry (1951).

**6.4 Azúcares reductores.** La cuantificación de azúcares reductores se realizó a los filtrados extracelulares libres de células por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS; Miller, 1959). La mezcla de reacción contenía: 0.1 ml del filtrado enzimático, 0.9 ml de agua y 1 ml de DNS. Se colocó en un baño de agua en ebullición durante 5 min, a continuación se le agregaron 10 ml de agua destilada, se mezcló y se midió la absorbancia a 575 nm en un espectrofotómetro Spectronic 20 (Bausch and Lomb). Los resultados se extrapolaron en curvas patrón con: glucosa, xilosa y ácido galacturónico).

## 6.5 Determinación de actividades enzimáticas

**6.5.1 Actividad xilanolítica.** Se determinó mediante la producción de azúcares reductores, los cuales se cuantificaron por el método del DNS (Miller, 1959). Se utilizó como sustrato una solución de xilanos de abedul al 2%. La mezcla de reacción contenía 0.5 ml de sustrato, 0.4 ml de solución amortiguadora de acetatos 0.17 N pH de 5. Esta se preincubó a 50°C por 3 min e inmediatamente después se le agregó 0.1 ml del filtrado enzimático y se incubó por 10 min. La reacción se paró agregándole 1 ml del reactivo de DNS y se colocó en un baño en ebullición por 5 min. A la mezcla de reacción se le agregaron 10 ml de agua destilada, se mezclaron y se determinó la absorbancia a 575 nm. Una unidad de actividad xilanolítica se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un  $\mu\text{mol}$  de xilosa en el tiempo de incubación bajo las condiciones del ensayo.

**6.5.2 Actividad amilolítica.** Se midió con el método de tinción de yodo. La mezcla de reacción contenía 0.1 ml del filtrado enzimático y 0.8 ml de almidón soluble (marca Prolabo) al 1.2 %, disuelto en solución amortiguadora de acetatos 0.17 N pH 5.0. Se incubó a 40°C durante 10 min. Después de este tiempo se agregó 0.1 ml de ácido sulfúrico 2 N agitando vigorosamente. De esta mezcla se tomó 0.1 ml y se añadió en 2.4 ml de lugol al 25%, mezclándolos. Inmediatamente después se midió la absorbancia a 620 nm. Una unidad de actividad amilolítica se definió como la cantidad de enzima que permite la hidrólisis del almidón (mg) en 10 min, bajo las condiciones del ensayo.

**6.5.3 Actividad exopectinolítica.** Se evaluó por el método colorimétrico del DNS (Miller, 1959). Se utilizó como sustrato 0.5 ml de pectina al 1%, mezclados con 0.4 ml de solución amortiguadora de acetatos 0.17 N pH 5.0 y 0.1 ml de filtrado enzimático. La mezcla se incubó a 45°C, durante 20 min. Una unidad de actividad exopectinolítica se definió como la cantidad de enzima que catalizó la formación de 1.0  $\mu\text{mol}$  de ácido galacturónico en las condiciones del ensayo.

**6.5.4 Actividad endopectinolítica.** Se midió por el cambio de viscosidad de una solución de pectina al 1.0% pH 4.2, en un viscosímetro de Oswald (CANNON 200

651 IY) a una temperatura de 30°C. Una unidad de esta actividad se definió como la cantidad de enzima que redujo en un 50 % la viscosidad de la solución de pectina, en 10 min (Aguilar *et al.* 1993; Aguilar y Huitron, 1991).

## 6.6 Electroforesis

**6.6.1 Condiciones desnaturalizantes.** Las electroforesis se realizaron de acuerdo al método de Laemli (1970). En un gel concentrador al 4% de acrilamida y un gel separador del 7.5% ó 10%, ambos con 2.7% de bis-acrilamida (Bio-Rad laboratories). Se cargaron con 150 µg de proteína mezclados con solución amortiguadora con 4% de SDS (Bio-Rad laboratories), glicerol al 20%, 2-mercaptoetanol al 10% (Bio-Rad laboratories) y azul de bromofenol al 0.005% disueltos en solución amortiguadora de Tris-HCl 125 mM pH 6.8. Se corrió en una unidad SE-600 (Hoefer Sci. Ins. U. S. A.), a 30 mA, durante 2 a 3 h. Los geles elaborados en la unidad Migtly Small SE-245 (Hoefer Sci. Ins. U.S.A.) tardaron en correr de 45 a 90 min a 40 mA. LOs geles para detectar proteínas se tiñeron con una solución de azul de Coomasie R250 al 0.125 % (Bio-Rad), metanol al 50% y ácido acético al 10% durante 1 h. Después de este tiempo se destiñeron en una solución de ácido acético al 10%.

**6.6.2 Isoelectroenfoque.** Los geles se elaboraron por duplicado de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Hoefer Sci. Uns U.S.A) a una concentración final de acrilamida del 5 y 6.7% de anfolinas de marca SIGMA de pH 3-10. Se precorrieron durante 20 min a 20 watts; con el anolito (ácido acético 0.02 M) en la parte inferior y el catolito (NaOH 0.02M) en la parte superior. Posteriormente, se cargaron las muestras y la electroforesis se corrió a un voltaje límite de 2500 volts, durante 3.5 h. Uno de los geles se tiñó para proteínas, mientras que el otro se usó para detectar las proteínas con actividad xilanolítica.

## 6.7 Actividad "in situ" (zimogramas).

**6.7.1 Actividad xilanolítica.** Para determinar la actividad xilanolítica, los geles de poli-acrilamida se lavaron en solución amortiguadora de Tris-HCl 0.01M a pH 7.5 a



40°C, durante 1 h. En seguida se empalmó con un gel de agarosa al 1% y con xilanos acoplados con azul brillante de remazol (RBB-xilanos) al 0.4%. Ambos geles se incubaron a temperatura ambiente en una cámara húmeda durante una noche; transcurrido este tiempo los geles se separaron. El gel de agarosa se sumergió en una solución amortiguadora de acetatos y etanol (1:2) 1 h, para resaltar las zonas de hidrólisis y el gel de poliacrilamida se tiñó para proteínas (Mendicuti, 1996; Biely *et al.*, 1985a y b; Royer y Nakas, 1985).

**6.7.2 Actividad amilolítica.** El gel de acrilamida renaturalizado se sumergió en una solución de almidón soluble al 1.0 % disuelto en solución amortiguadora de acetatos 0.17 N pH 5 y se incubó durante 1 h a 37°C. La solución de almidón se drenó y se le añadió lugol para detectar las bandas con actividad amilolítica.

## **6.8 Purificación**

**6.8.1 Ultrafiltración.** El caldo de cultivo que se obtuvo en el bioreactor de 14 L se filtró por algodón para eliminar restos de olote y de biomasa de *Aspergillus* sp FP-470 y se denominó como filtrado extracelular completo. Este filtrado se concentró en un sistema de ultrafiltración marca Amicon, con una membrana PM10 permeable a moléculas de 10 kDa y se obtuvieron dos fracciones el permeado, que es lo que atraviesa la membrana y el retenido, que es lo que no pasa a través de la membrana.

**6.8.2 Cromatografía de intercambio aniónico.** El filtrado extracelular completo ultrafiltrado (retenido) se purificó usando un sistema de Cromatografía Líquida de Alta Resolución para separar proteínas (FPLC, Fast Performance Liquid Chromatography), marca Pharmacia LKB, con una columna de intercambio aniónico, Resource "Q" de 6 ml, marca Pharmacia LKB. La columna se lavó y se equilibró con una solución amortiguadora de Tris-HCl 20 mM pH 8.0 por 30 min, hasta que el pH de la solución amortiguadora fue el mismo a la entrada y a la salida de la columna. La muestra se eluyó con un gradiente de NaCl de 0.0 a 0.5 M. Se colectaron fracciones de 3 ml, a las cuales se les determinó absorbancia a 280nm y

actividad xilanolítica. Las fracciones con actividad xilanolítica se mezclaron, dializaron y liofilizaron para sus análisis posterior.

**6.8.3 Cromatografía de intercambio catiónico.** La fracción con mayor actividad del paso anterior se aplicó a una resina de intercambio catiónico débil de Carboximetil-Sepharosa. Esta resina se preparó de acuerdo a las especificaciones del fabricante y posteriormente se equilibró con una solución amortiguadora de acetatos 40 mM pH 5. La muestra se aplicó y se eluyó con un gradiente de NaCl de 0 a 1 M, se colectaron fracciones de 3 ml y se les midió absorbancia a 280 nm y actividad xilanolítica. Las fracciones con actividad xilanolítica se dializaron y liofilizaron para sus análisis subsiguientes.

## **6.9 Caracterización de la xilanasa purificada**

**6.9.1 Determinación del pH y temperatura óptimos del ensayo.** Para encontrar el pH óptimo de la enzima purificada se determinó la actividad a diferentes pH's (2.5 a 11). Las soluciones amortiguadoras que se utilizaron fueron: solución de glicina-HCl pH 2.5 a 3.4, solución de acetatos 3.5 a 5.5, solución de Tris-Maleatos 5.5 a 8.5 y solución de glicina-NaOH 8.5 a 11. Todos a una concentración 0.05 M. La mezcla de reacción contenía 0.5 ml de xilanos de abedul al 2%, 0.1 ml de la enzima y 0.4 ml de la solución amortiguadora a diferentes de pH's. Para determinar la temperatura óptima del ensayo la mezcla de reacción se incubó durante 10 min, a temperaturas desde 25 hasta 92°C; con la mezcla de reacción de 0.5 ml de xilanos de abedul al 2%, 0.4 ml de solución amortiguadora de acetatos 0.17 N pH 5 y 0.1 ml solución de enzima.

**6.9.2 Determinación de la estabilidad frente al pH y la temperatura.** Para determinar la estabilidad de la enzima frente al pH se usaron las mismas soluciones amortiguadoras que en el punto anterior. La enzima se colocó en cada una de las soluciones amortiguadoras a los diferentes pH's y se incubaron a dos temperaturas 4 y 25°C por 24 h. Después de este tiempo se tomó una alícuota de 0.1 ml y se midió la actividad xilanolítica residual, en las condiciones antes descritas. Para la

determinación de la temperatura sobre la estabilidad de la xilanasa, se colocaron tubos con la enzima en solución amortiguadora de acetatos 0.17N a pH 5. Cada tubo fue incubado durante 30 min a diferente temperatura (25 a 92°C). Después de esta incubación se les determinó la actividad xilanólítica a 50°C, según el método para la actividad xilanólítica y se comparó con un control sin tratamiento térmico. Por otro lado se evaluó el efecto de algunos compuestos sobre la estabilidad a la temperatura. Los compuestos que se usaron fueron xilanos de abedul al 1% y glicerol y sorbitol, ambos al 10%.

**6.9.3 Decaimiento térmico.** La enzima se colocó en dos tubos con solución amortiguadora de acetatos 20 mM pH 5 a dos temperaturas 50 y 60°C. De cada temperatura se tomó una muestra a diferentes tiempos y se determinó la actividad xilanólítica residual.

**6.9.4 Efecto de iones metálicos sobre la actividad de la xilanasa.** A la mezcla de reacción de 0.5 ml de xilanos de abedul y 0.4 ml de solución amortiguadora de acetatos 0.17 N pH 5, se adicionó el ión correspondiente a una concentración final de 10 y 20 mM. Posteriormente, se determinó la actividad xilanólítica (se calculó la actividad relativa comparada con el control, al cual no se le adicionó ningún ión).

**6.9.5 Efecto de carbohidratos sobre la actividad de la xilanasa.** La mezcla de reacción se incubó a 50°C durante 10 min a pH 5, en presencia de cada uno de los siguientes carbohidratos: arabinosa, celobiosa, galactosa, glucosa, xilosa, 4-O-metil-D-glucuronoxilano a una concentración final de 10 mM y se determinó la actividad residual.

**6.9.6 Actividad de la xilanasa contra diferentes sustratos.** Se evaluó la actividad xilanólítica con diferentes sustratos: xilanos de avena, hemicelulosa, lote de maíz, bagazo de caña, carboximetilcelulosa (Sigma Chem. Co), celulosa cristalina, papel filtro, almidón soluble, arabino-galactosa y 4-O-metil-D-glucuronoxilano, a una concentración del 2%. En todos los casos se utilizó la curva

patrón de la xilosa para calcular las unidades de actividad xilanolítica para referirla como la xilosa liberada.

**6.9.7 Determinación de las constantes cinéticas,  $K_m$  y  $V_{max}$ .** La actividad se midió usando el sistema de reacción y las condiciones ya mencionadas a diferentes concentraciones de los sustratos: xilanos abedul y avena, hemicelulosa y 4-O-metil-D-glucuronoxilano. Las constantes cinéticas se calcularon con la ecuación de doble recíprocos de Lineweaver-Burk.

**6.9.8 Evaluación de los productos de hidrólisis.** Para determinar los productos de hidrólisis de la enzima purificada se realizó una digestión enzimática: 5 ml de xilanos de abedul al 2%, 4 ml de solución amortiguadora de acetatos 0.17 N pH 5, se preincubaron durante 3 min a una temperatura de 50°C, inmediatamente se agregó 1 ml de la enzima y se tomaron 0.5 ml a diferentes tiempos. Las muestras se colocaron en un baño de hielo y se hirvieron posteriormente, para inactivar a la enzima. Se midieron los azúcares reductores en cada alícuota y se analizaron por cromatografía en capa fina, sobre una placa de sílica gel de 8X5 cm, con 0.25 mm de grosor (Kiesel 60, Merck, México). El eluyente que se utilizó fue n-butanol-acético-agua (2:1:1). Los azúcares estándar que se utilizaron fueron: xilosa y arabinosa. Las placas se revelaron con una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10% en metanol y se calentaron a 100°C durante 5 min.

## **6.10 Pruebas de Panificación.**

**6.10.1 Dosificación.** Las dosis de la enzima purificada y del filtrado completo (FC) se establecieron de acuerdo a los datos de Morales (1999). Tanto la xilanasa purificada como el filtrado completo se dosificaron en base a su actividad xilanolítica y se expresaron en partes por millón (ppm) de 25 a 200 ppm. Las muestras comerciales C1 y C2 se adicionaron a una concentración de 200 ppm, dosis recomendada por el fabricante para obtener un efecto positivo y se resuspendieron en una solución de glucosa al 10%.

**6.10.2 Elaboración de los panes.** Los panes se elaboraron de acuerdo al método 10-09 (AACC, 1983) con 100 g de harina de trigo tipo Victoria (con 11% de proteína y 2 a 3% de xilanos; Morales, 1999; Harinera Nacional S. A.), 4 g de leche en polvo, 3 g de manteca vegetal y 10 ml de una solución de azúcar, los cuales se colocaron y se mezclaron suavemente en una amasadora adicionándoles una solución de azúcar y sal al 5 y 1.5 %, respectivamente, además de levadura al 2% y agua (aproximadamente 10 ml). Las muestras enzimáticas se adicionaron en este punto ya masa se colocó en un molde metálico y se introdujo en una cámara de fermentación a  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ , con humedad controlada, durante 2 h aprox. Posteriormente, la masa se paso a través de unos rodillos y se colocó en un molde para pan de 7x12 cm, previamente engrasado con manteca vegetal y se volvió a colocar en la cámara durante 55 min. En seguida se introdujo en un horno eléctrico a  $220^{\circ}\text{C}$ , durante 25 min. El pan se desmoldó y se pesó.

**6.10.3 Volumen de los panes.** Se midió por el desplazamiento de la semilla de colza y se expresó en  $\text{cm}^3$

Volumen del pan $\text{cm}^3$	
10	> 815
9 ---	750 a 815
8 ---	676 a 749
7 ---	601 a 675
6 ---	600 a 500
5 --	< 500

Así mismo, se evaluó el incremento del volumen: comparado con el pan control pan control, al cual no se le adicionó muestra enzimática.

**6.10.4 Evaluación sensorial de los panes.** Los atributos sensoriales fueron evaluados por un panel de jueces entrenados 24 h después de la elaboración del

pan. Las características externas como: color de la costra y apariencia general se evaluaron con las siguientes escalas edónicas:

Color de la costra	Apariencia general
5 ---muy dorada	10 ----excelente
4 ----dorada	9 ----muy buena
3 ----ligeramente dorada	8-----buena
2 ---poco dorada	7-----regular
1 ----nada dorada	6-----suficiente
	5-----mala

Para las características internas, los panes se cortaron por la mitad de manera transversal y se evaluó la textura y el color de la miga acuerdo a la siguiente escala:

Textura de la miga	Color de la miga
10 ----excelente celdas pequeñas y uniformes.	10 ----blanco
9 -----muy buena presencia de algunas celdas grandes.	9 ----acremado
8 -----buena presencia de muchas celdas grandes.	8 ----amarillo cremado
7 -----regular celdas grandes y chicas con distribución no uniforme.	7 ----amarillo
6 ---pobre celdas grandes con desgarraduras.	6 ----café
5 -----mala celdas grandes con desgarraduras y compactación en algunas zonas.	5 ----café oscuro

## 7. RESULTADOS Y DISCUSION

### 7.1 Crecimiento y actividad xilanólítica de *Aspergillus* sp FP-470 en diferentes fuentes de xilanos

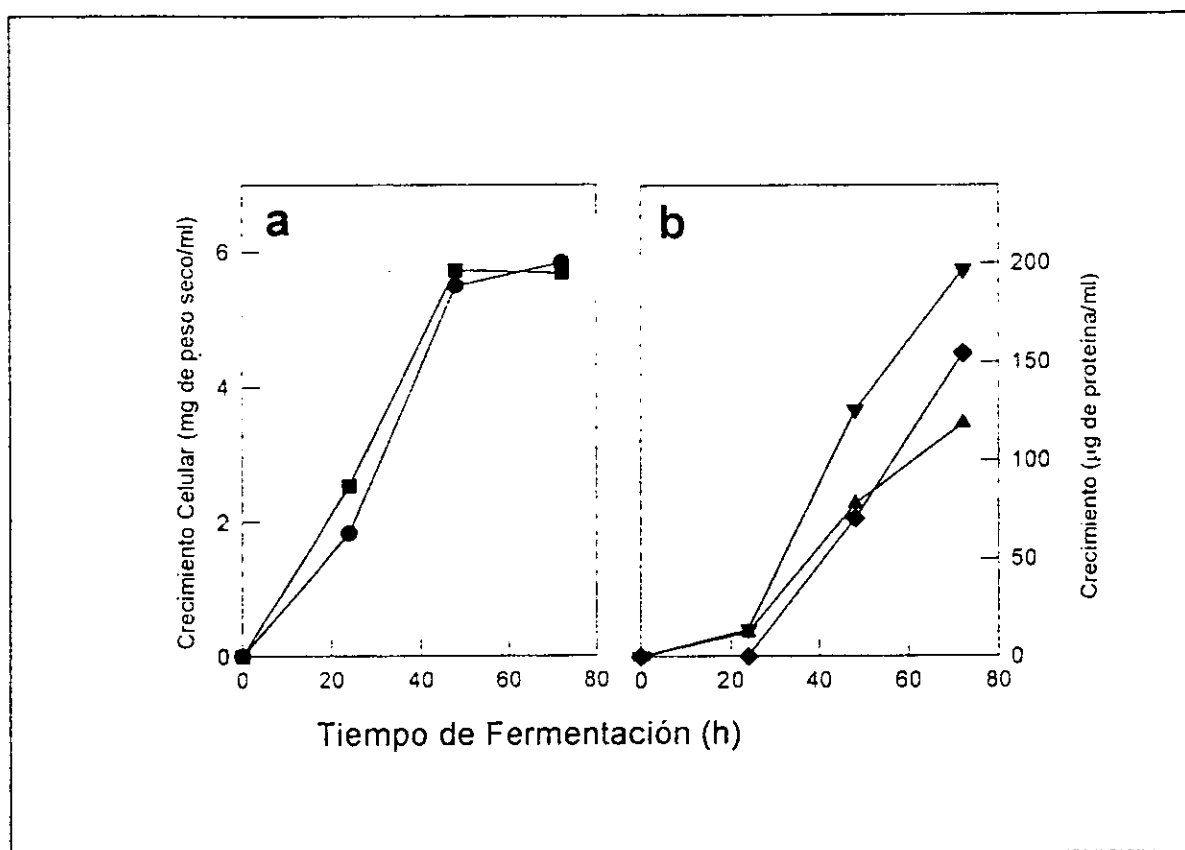
Para establecer en que fuente de xilanos *Aspergillus* sp FP-470 produjo la mayor actividad xilanolítica se realizaron fermentaciones en matraces Erlenmeyer de 500 ml, con 200 ml de medio de cultivo con: xilanos de abedul, xilanos de avena, hemicelulosa, olote de maíz y salvado de trigo.

En la figura 5a se observa el crecimiento de *Aspergillus* sp FP-470 en los medios con xilanos de abedul y xilanos de avena expresado como peso seco (mg/ml). En ambos casos, el crecimiento fue semejante y aumentó de manera logarítmica hasta las 48 h, con un valor máximo de 5.84 mg/ml para el primer caso y de 5.73 mg/ml, para el segundo caso. Después de este tiempo, el microorganismo entró en fase estacionaria.

En los medios con olote de maíz, hemicelulosa y salvado de trigo, el crecimiento de *Aspergillus* sp FP-470 se expresó como proteína intracelular ( $\mu\text{g/ml}$ ). Figura 5b. Esta manera de expresar el crecimiento lo hizo Hernández (1995) quién encontró una correlación lineal entre el peso seco (mg/ml) y la proteína intracelular ( $\mu\text{g/ml}$ ). Lo que permitió usar los datos de proteína intracelular para cuantificar crecimiento celular en medios con fuentes de carbono insolubles como olote de maíz, hemicelulosa, salvado de trigo, bagazo de caña, etc.; donde la biomasa no se puede separar de las partículas insolubles.

El crecimiento de *Aspergillus* sp FP-470 en las fuentes de xilanos insolubles presentó una fase lag que se prolongó hasta las 24 h de incubación, después del cual aumentó de manera logarítmica y se mantuvo así hasta las 72 h. El mayor

crecimiento se obtuvo en olote de maíz con un valor de 197  $\mu\text{g/ml}$ , seguido de salvado de trigo (154  $\mu\text{g/ml}$ ) y en hemicelulosa de 118  $\mu\text{g/ml}$ .



**Figura 5.** Crecimiento de *Aspergillus* sp FP-470 en diferentes fuentes de xilanos. **a)** Peso seco (mg/ml) en xilanos de abedul (●) y xilanos de avena (■). **b)** Proteína intracelular ( $\mu\text{g/ml}$ ) en hemicelulosa (▲), olote (▼) y salvado de trigo (◆). Cultivado en matraces Erlenmeyer de 500 ml a 37°C, 100 rpm, durante 72 h.

Al comparar el comportamiento en ambas gráficas se observó que *Aspergillus* sp FP-470 creció más rápido en xilanos de abedul y avena en las primeras horas y llegó a la fase estacionaria a las 42 h; mientras que en las fuentes insolubles el hongo empezó a crecer a las 24 h y en ninguno de los casos llegó a la fase estacionaria durante el periodo estudiado. El alargamiento de la fase lag en sustratos insolubles es similar a lo reportado por John *et al* (1979) para una cepa



de *Aspergillus niger* cultivada en xilanos insolubles, donde la fase lag se prolongó hasta las 30 h, aproximadamente.

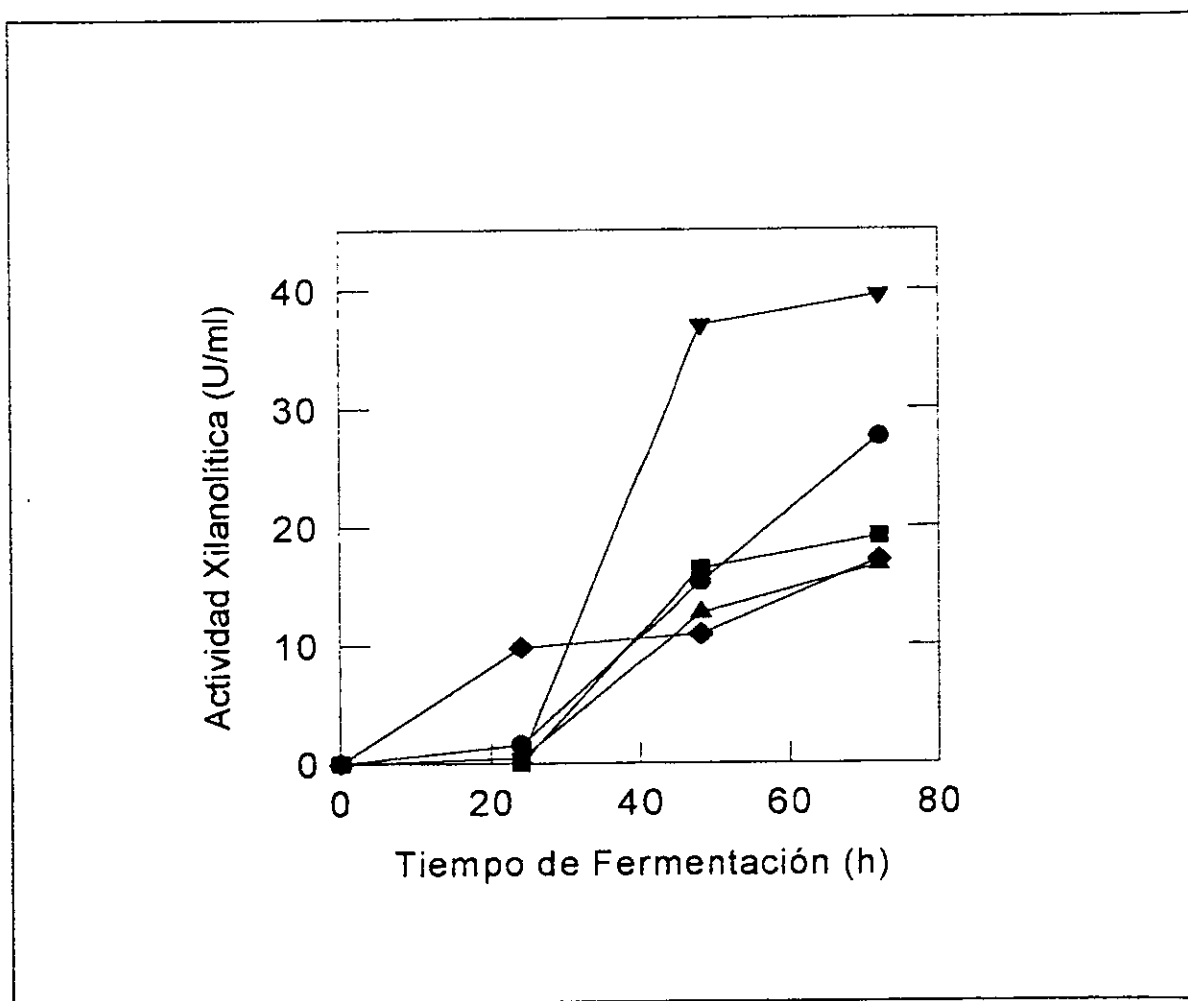
Los desechos agroindustriales representan una fuente de carbono compleja, en donde los xilanos no se encuentran en forma disponible, lo que dificulta el desarrollo rápido de los microorganismos, como seguramente ocurrió en los medios de cultivo con olote de maíz, hemicelulosa y salvado de trigo.

En todos los casos, el pH aumentó de 5.0 a 6.0 durante las primeras 24 h. Posteriormente, en los medios de xilanos de abedul y avena disminuyó a 5.6 a las 72 h; mientras que en los medios restantes aumentó a valores de 6.5.

Por otro lado, en los medios de xilanos de abedul y xilanos de avena se acumularon azúcares reductores a partir de las 48 h a una concentración de 0.12 mg/ml. En los medios con salvado de trigo y hemicelulosa la concentración fue inferior a 0.073 mg/ml y 0.040 mg/ml, respectivamente. En tanto que en el medio con olote de maíz no se detectaron azúcares reductores. La acumulación de estos, está relacionada con la capacidad de los microorganismos para degradar polisacáridos en azúcares más pequeños, los cuales generalmente aprovechan para crecer (Rodríguez, 1998). En este caso, *Aspergillus* sp FP-470 mostró esta capacidad con excepción del medio de olote. Sin embargo, se ha reportado que hongos filamentosos en compuestos insolubles extienden sus hifas sobre la superficie y secretan enzimas para degradarlos y obtener así azúcares sencillos que introducen rápidamente a la célula (Rodríguez, 1998). Lo que podría ser una causa de que no se detectaron azúcares reductores cuando se creció al hongo en el medio con olote de maíz.

La actividad xilanolítica que produjo *Aspergillus* sp FP-470 en las diferentes fuentes de xilanos se muestra en la figura 6. En todos los casos, a las 24 h, la actividad fue apenas detectable y aumentó de manera importante a las 48 h. La

mayor actividad que produjo el microorganismo fue en el medio con olote de maíz de 39.56 U/ml. seguido de xilanos de abedul con 27.62 U/ml, mientras que en xilanos de avena fue de 19.17 U/ml y en los medios de salvado de trigo y hemicelulosa la actividad fue de 17 U/ml.



**Figura 6.** Actividad xilanolítica de *Aspergillus* sp FP-470 en diferentes fuentes de xilanos. Xilanos de abedul (●), xilanos de avena (■), hemicelulosa (▲), olote (▼) y salvado de trigo (◆). Cultivado en matraces Erlenmeyer de 500 ml a 37°C, 100 rpm, durante 72 h.

El olote de maíz es un desecho agroindustrial que se utilizó sin ningún tratamiento previo, a diferencia de los otros que fueron extraídos mediante procesos químicos, lo que podría ser la causa de que en este medio *Aspergillus* sp. FP-470 produjo la

mayor actividad. También, el olote de maíz contiene otros polisacáridos como celulosa, pectina, almidón, lignina y otros compuestos que posiblemente ayudaron a que el microorganismo produjera una mayor actividad. (Tabla 3).

**Tabla 3.** Composición química de olote de maíz.

Compuesto	Porcentaje (%)
Celulosa	41.2
Hemicelulosa	36.0
xilanos	30.0 <sup>1</sup>
Pectina	3.1
Lignina	06.1
Almidón	2-3

<sup>1</sup> referido al porcentaje total.  
Fuente: Watson y Ramstad, 1987.

La hemicelulosa fue extraída por hidrólisis alcalina del olote de maíz, lo cual ocasionó modificaciones químicas como desacetilaciones y reacciones de saponificación que pudieron influir en la producción de la actividad xilanólítica de *Aspergillus* sp FP-470, que resultó ser la mitad con respecto a la actividad en olote de maíz.

En el salvado de trigo la actividad de *Aspergillus* sp FP-470 fue tal solo del 45%, con respecto al medio con olote. Este desecho agroindustrial contiene cerca del 90% de xilanos insolubles, una gran cantidad de grupos fenólicos y ácido urónico, los cuales, según Voragen *et al* (1992) presentan mayor resistencia al ataque microbiano.

Los xilanos de abedul provienen de madera dura que contiene un porcentaje mayor de xilanos solubles que de insolubles 80 y 19%, respectivamente. Mientras que xilanos de avena que se obtienen de la cascarilla del grano de avena contienen igual porcentaje de xilanos solubles e insolubles (50.4 y 49%; He *et al.* 1993).

La mayor actividad que produjo *Aspergillus* sp FP-470 en xilanos de abedul concuerda con los resultados obtenidos por Angelo *et al.* (1997) para una cepa de *Aspergillus* sp, donde en xilanos de abedul produjo 15% más de actividad que en xilanos de avena. Aunque Fernández-Espinar *et al.* (1992) encontraron mayor producción xilanólítica en xilanos de avena en una cepa del mismo género.

Gomes *et al* (1994) plantearon que las fuentes insolubles son mejores inductores de xilanasas, ya que no ejercen represión catabólica por la presencia de sustancias solubles. Retomando esta aseveración se puede inferir que la acumulación gradual de azúcares reductores en xilanos de abedul, xilanos de avena y hemicelulosa a las 48 h de fermentación pudo influir en la síntesis de las xilanasas por *Aspergillus* sp FP-480. Kadowaki *et al* (1997) reportaron que *Aspergillus* sp produjo la mayor actividad en olote de maíz a partir de una concentración del 2%, ya que en xilanos de avena, por arriba de estas concentraciones se detectaron altos niveles de azúcares reductores en los medios, lo que también concuerda con el efecto que plantearon Gomes *et al* (1994).

Por otro lado, Bailey y Viikari (1993) encontraron que cepas de *A. oryzae* y *A. fumigatus* producen una mayor actividad cuando se cultivan en glucuronoxilanos acetilados del árbol de haya. Sin embargo, *A. fumigatus* produjo tan solo la mitad y en el sustrato sin tratamiento produjo los mismos niveles que en el sustrato desacetilado. Esto significa que no hay un comportamiento homogéneo que pueda ayudar a predecir en qué medida los hongos van a producir actividad xilanólítica en diferentes fuentes de xilanos.

Algunos autores han reportado que los desechos agroindustriales representan una buena fuente para producir xilanasas, ya que pueden reemplazar compuestos caros como vitaminas, aminoácidos, oligoelementos, etc. (Gomes *et al.* 1994; Montes, 1998; Degrassi *et al.* 1998; Kadowaki *et al.* 1997; (Milagres *et al.* 1994; Kitpreechavanich *et al.* 1984; Lee *et al.* 1998). Estos, también han sido usados

para producir otros sistemas enzimáticos como amilasas, pectinasas, celulasas, etc.

La producción de diversos sistemas enzimáticos en desechos agroindustriales es común. Sin embargo, en algunas aplicaciones de las xilanasas no es deseable la presencia de otras actividades enzimáticas; por lo que se determinó la presencia de actividades celulolítica, pectinolítica y amilolítica en los filtrados extracelulares de *Aspergillus* sp FP-470 que produjo en las fuentes de xilanos (tabla 4):

**Tabla 4.** Actividades enzimáticas producidas por *Aspergillus* sp FP-470 en diferentes fuentes de xilanos.

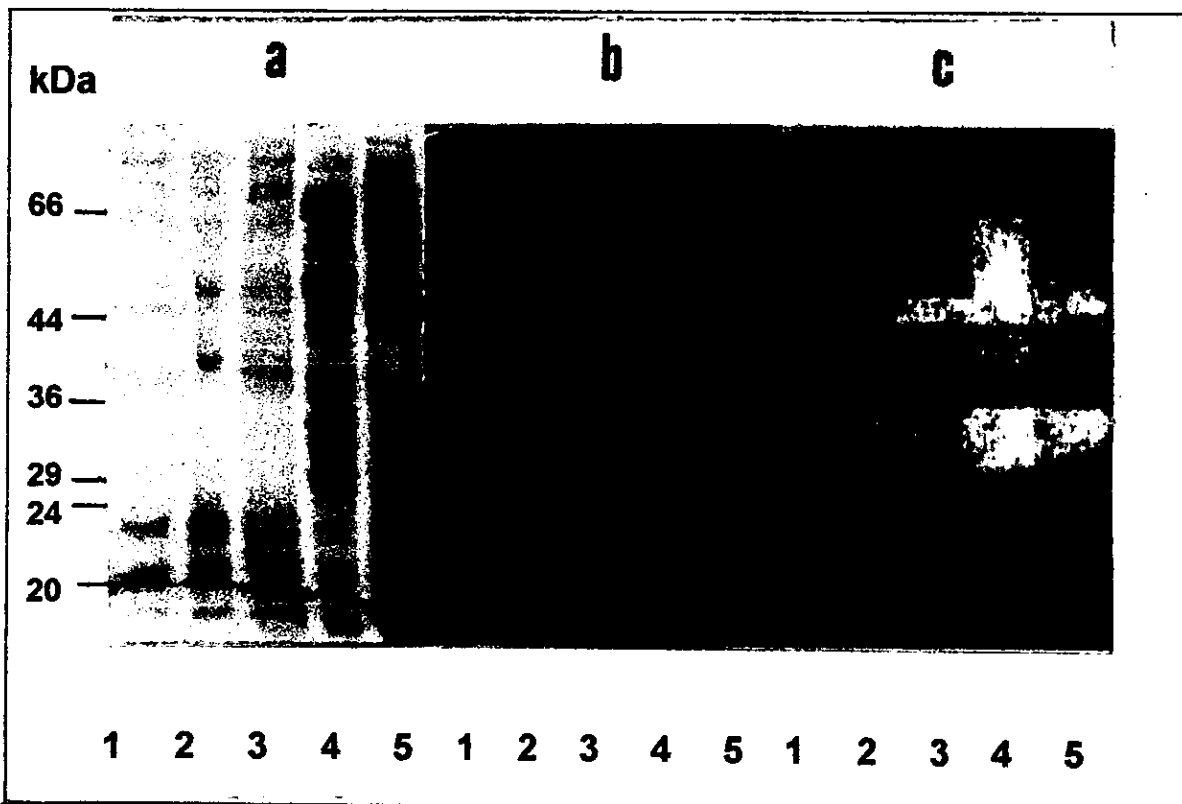
Fuente de xilanos	Xilanolítica U/ml	Celulolítica U/ml	Actividad		Amilolítica mg/ml
			Endo-pectinolítica U/ml	Exo-pectinolítica U/ml	
Xilanos de abedul	27.62	ND <sup>1</sup>	ND	ND	ND
Xilanos de avena	19.17	0.88	ND	1.84	ND
Hemicelulosa	16.67	1.89	ND	4.76	ND
Olote	39.56	7.31	0.22	9.67	1.4
Salvado de trigo	17.16	2.95	ND	5.10	ND

<sup>1</sup> ND: no detectada

El hongo no produjo actividad celulolítica en el medio con xilanos de abedul, mientras que en xilanos de avena la actividad fue apenas cuantificable (0.88 U/ml); en el medio con hemicelulosa fue 1.88 U/ml, en olote fue de 7.31 U/ml y en salvado de trigo de 2.95 U/ml. En los últimos dos casos, la actividad celulolítica que produjo *Aspergillus* sp FP-470 representó el 17.5%, con respecto a la actividad xilanolítica.

Por otro lado, este microorganismo produjo actividad pectinolítica y amilolítica, únicamente en el medio con olote de maíz a bajos niveles, con respecto a la actividad xilanolítica.

Para poder comparar el perfil de proteínas extracelulares de *Aspergillus* sp FP-470 que produjo en las fuentes de xilanos se realizó un gel de electroforesis en condiciones desnaturizantes (figura 7a). Los carriles que corresponden a filtrados del medio con xilanos de abedul, de avena y hemicelulosa presentaron un perfil de proteínas semejante en cuanto al número de bandas, mientras que en los medios de olote de maíz y salvado de trigo se observó un número mayor de bandas, resaltando algunas en la zona de 30, 40 y arriba de 60 kDa.



**Figura 7.** Gel de poliacrilamida de proteínas extracelulares de *Aspergillus* sp. FP-470 producidas en diferentes fuentes de xilanos. La cepa se incubó a 37°C, 100 rpm y pH 5. a) Gel de electroforesis de poliacrilamida al 10%, en condiciones desnaturizantes, b) gel acoplado de agarosa al 1%, con RBB-xilanos al 0.4%, para detectar actividad xilanolítica "in situ" y c) gel de poliacrilamida al 10%, sumergido en solución de almidón al 1%, para detectar actividad amilolítica "in situ", de los filtrados extracelulares línea 1, xilanos de abedul; 2, xilanos de avena; 3, hemicelulosa; 4, olote de maíz; 5, salvado de trigo.

El gel para RBB-xilanos se realizó para identificar bandas de proteína con actividad xilanólítica de los filtrados extracelulares de *Aspergillus* sp FP-470 (figura 7b). En todos los carriles se aprecia un halo de hidrólisis que corresponde a una proteína de 22 kDa. Cabe mencionar que una endoxilanasas de 22 kDa se sobreprodujo cuando se cultivó a *Aspergillus* sp FP-470 a una temperatura extrema de 45°C (Mendicuti *et al.* 1997). Los autores mencionaron que esta proteína podría ser esencial para el crecimiento e hidrólisis de xilanos en este microorganismo.

En el medio de olote (figura 7, carril 4) se observan otras zonas de hidrólisis, que corresponden a proteínas de 38, 54 y 70 kDa. aprox. Esto significa, que en esta fuente de carbono, la cepa presentó la capacidad de producir varias xilanasas, mientras que en otras (por medio de esta técnica) solamente se detectó una sola banda con actividad xilanólítica. El hecho de que los microorganismos produzcan varias xilanasas no es sorprendente considerando la heterogeneidad de los sustratos, ya que para la hidrólisis es necesaria la acción cooperativa de varias enzimas con actividad xilanólítica, tal como se ha observado en otros *Aspergillus* (Frederick *et al.* 1985; Khana *et al.* 1995; Sunna y Antranikian, 1997; Wong *et al.* 1988).

El gel acoplado de almidón se realizó para detectar bandas de proteínas con actividad amilolítica (figura 7c). En el carril que corresponde al filtrado de xilanos de avena se observa un halo de hidrólisis que corresponde a una proteína de 28 kDa, en hemicelulosa y salvado de trigo se observan dos halos a la altura de 34 y 45 kDa y en olote además de estas dos bandas se detectó una más de 48 kDa. En el filtrado de xilanos de abedul no se detectó actividad amilolítica.

Por lo que la composición de la fuente de carbono fue determinante en la producción de diferentes sistemas enzimáticos. *Aspergillus* sp FP-470 produjo varias xilanasas en olote de maíz, posiblemente por la heterogeneidad de esta fuente de fuente de carbono. El uso potencial de los filtrados extracelulares depende de las actividades enzimáticas que contienen, así como de la producción de xilanasas.

## **7.2 Crecimiento y actividad xilanolítica de *Aspergillus* sp FP-470 cultivado en olote de maíz en un fermentador de 14 L.**

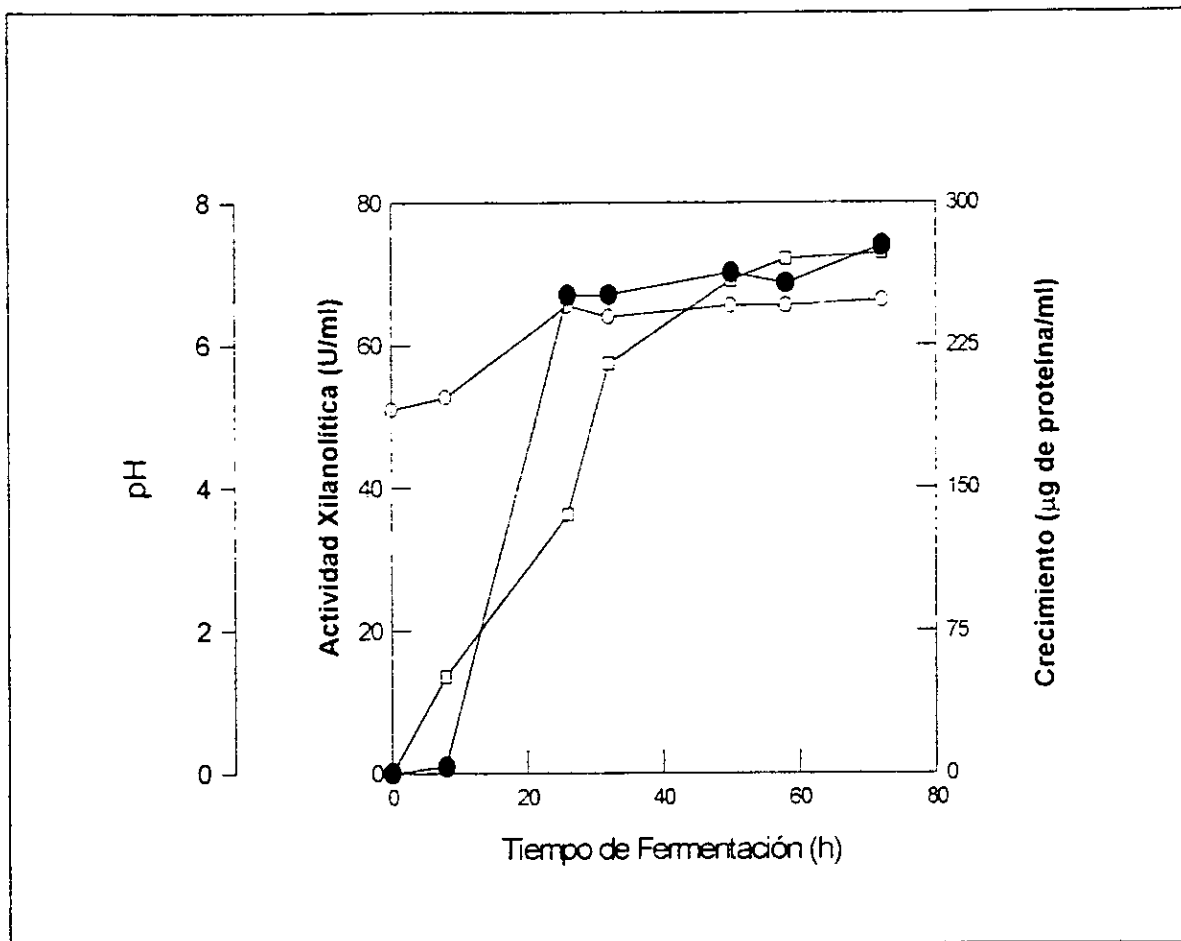
Una vez establecido que *Aspergillus* sp FP-470 creció y produjo la mayor actividad xilanolítica en olote de maíz se realizó una fermentación con esta fuente de carbono en un fermentador de 14 L, con la finalidad de obtener una cantidad considerable de filtrado extracelular de un solo lote para usarlo en la purificación.

En el transcurso de esta fermentación se observaron dos fases (figura 8). En la primera fase el crecimiento de *Aspergillus* sp FP-470 aumentó de manera exponencial hasta las 26 h de incubación a un valor de 260 mg/ml y el pH del medio se incrementó de 5.1 a 6.5. El microorganismo no produjo actividad xilanolítica en las primeras 8 h, pero a las 26 h aumentó a 70.13 U/ml.

En la segunda fase que comprendió de las 26 h a las 72 h, el crecimiento del hongo se detuvo; del mismo modo el pH y la actividad xilanolítica no se modificaron.

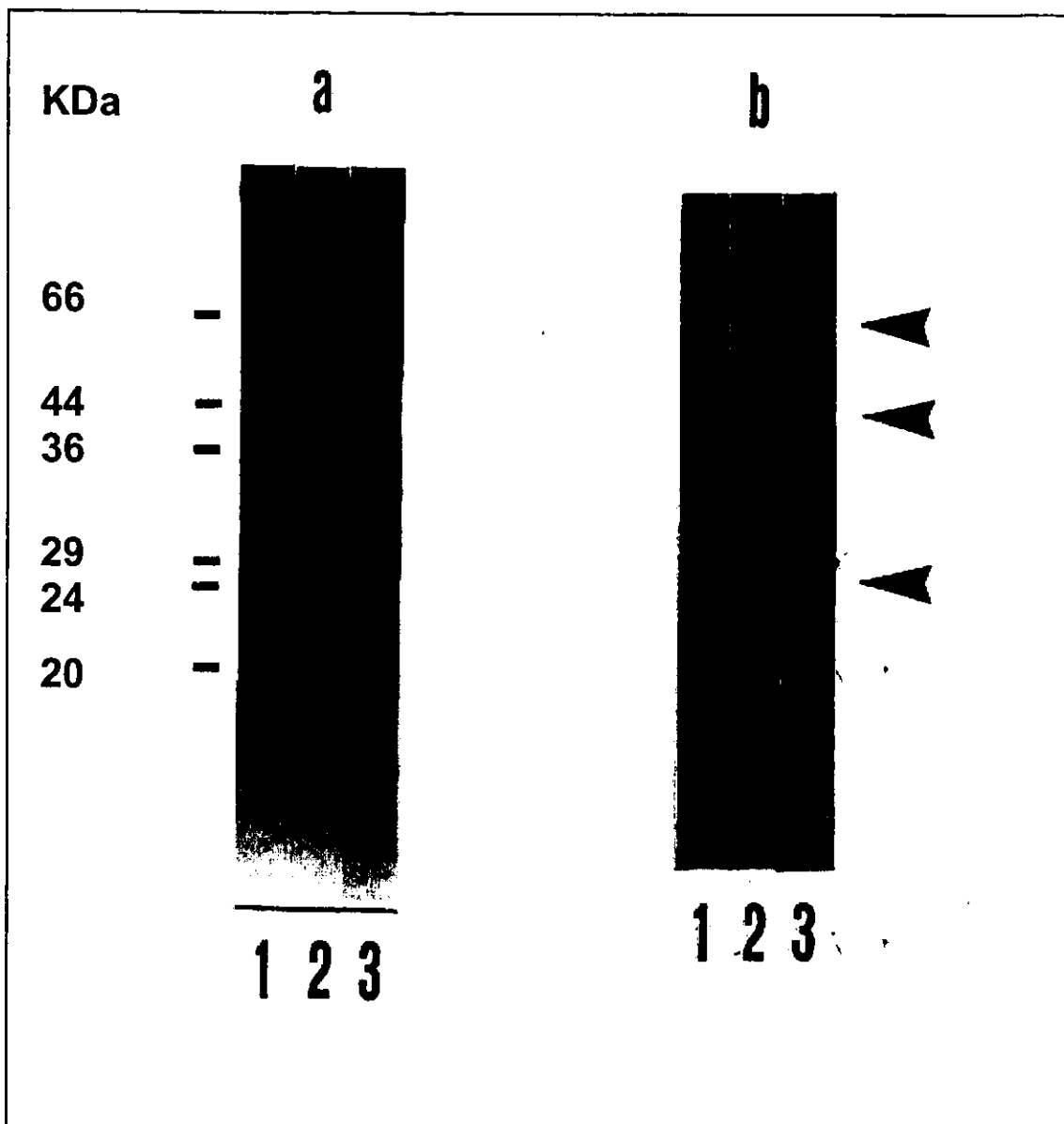
En el fermentador el microorganismo creció con más eficiencia, en tiempos más cortos y produjo una actividad xilanolítica casi del doble que la obtenida a nivel de matraz. Este tipo de comportamiento es semejante al que presentó la cepa de *Aspergillus niger* en un fermentador de 14 L, donde la producción de la actividad xilanolítica registró un importante incremento a partir de las 30 h de incubación y se detuvo a las 60 h aproximadamente (John *et al.* 1979). Por otro lado, estos resultados no concuerdan con lo reportado por Kadowaki *et al.* (1997), en donde el crecimiento y producción de la actividad xilanolítica de *Aspergillus* sp se incrementaron en tiempos más prolongados, alrededor de las 72 h.





**Figura 8.** Crecimiento y producción de actividad xilanólítica de *Aspergillus* sp FP-470 cultivado en olote de maíz al 1% en un fermentador de 14 L, a 37°C, 200 r p m, 1 vvm, durante 72 h. Crecimiento celular (□), actividad xilanólítica (●) y pH (○).

Con el fin de observar la aparición de las xilanasas que produce *Aspergillus* sp FP-470 en el fermentador se elaboraron geles de electroforesis en condiciones desnaturizantes y de actividad xilanólítica "in situ" del filtrado extracelular a diferentes tiempos (figura 9). En el gel de proteínas se observaron bandas a partir de las 26 h, las cuales se mantuvieron iguales el resto de la fermentación. De la misma manera, en el gel de actividad se observaron halos de hidrólisis a las 26 h de 22, 36 y 60 kDa (figura 9b). Estos pesos moleculares corresponden a las xilanasas de esta cepa cuando se creció en matraces de 500 ml (figura 7b, carril 4).



**Figura 9.** Cinética de producción de enzimas extracelulares de *Aspergillus* sp FP-470 cultivado en olote de maíz al 1% en un fermentador de 14 L, a 37°C, 200 r. p. m, 1 vvm, durante 72 h. (a) Gel de electroforesis de poliacrilamida al 12%, en condiciones desnaturizantes, (b) Gel acoplado de agarosa al 1%+RBB-xilanos al 0.4%, para detectar actividad xilanólítica "in situ" de los filtrados. Línea 1, t26 (26 horas, tiempo de incubación); 2, t50; 3, t72.

### 7.3 Purificación de la xilanasas de *Aspergillus* sp FP-470.

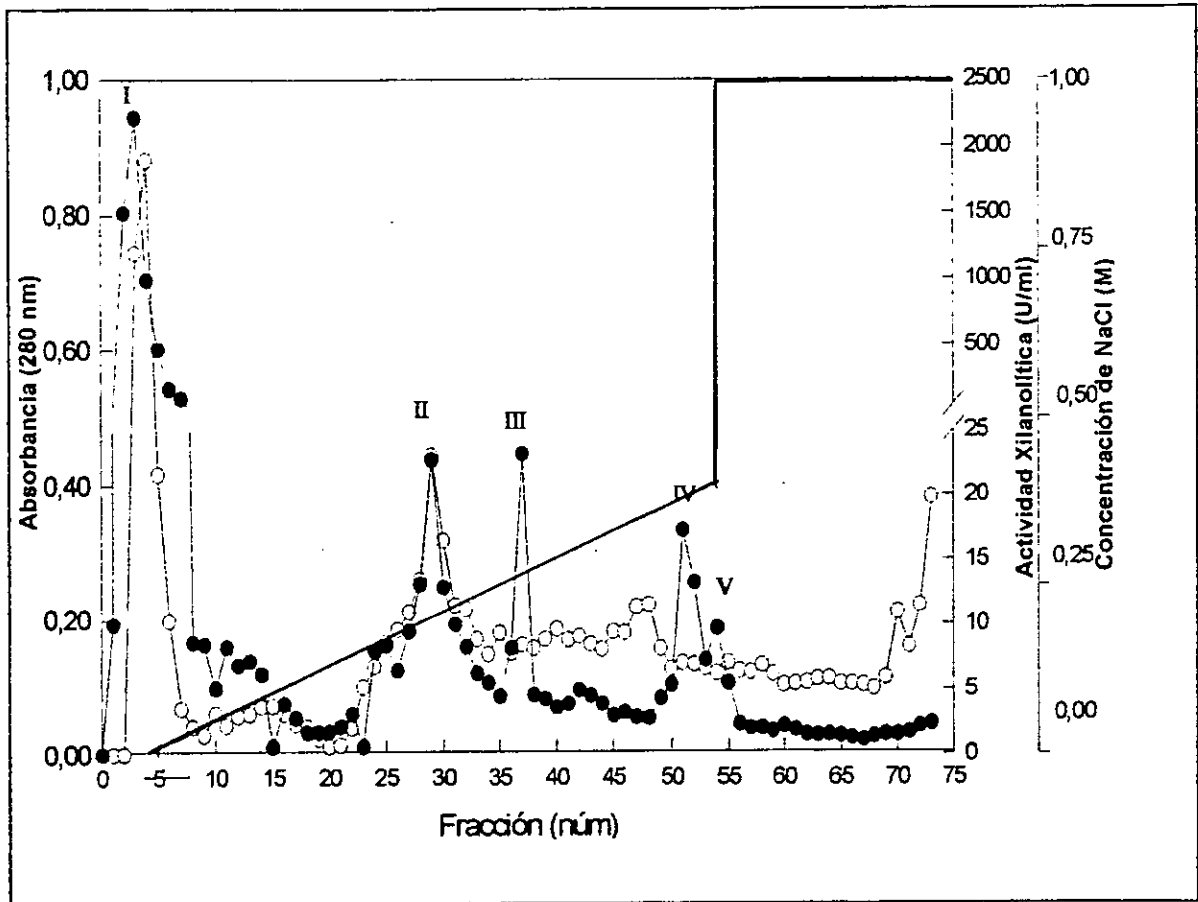
El filtrado extracelular que produjo *Aspergillus* sp FP-470 el fermentador con olote de maíz presentó varias xilanasas por lo que se procedió a fraccionarlo mediante diferentes pasos cromatográficos en un sistema FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography) con la finalidad de purificar al menos una xilanasas para caracterizarla bioquímicamente y estudiar su efecto en panificación.

El filtrado extracelular con actividad específica de 141.84 U/mg de proteína se concentró alrededor de 10 veces por ultrafiltración con una membrana PM10. Las fracciones que se obtuvieron se nombraron como: el retenido y el permeado. El permeado contenía el 4% de la actividad xilanolítica y el retenido el 96% (tabla 6).

Un mililitro del permeado se inyectó a una columna de intercambio aniónico, Resource "Q". La muestra se resolvió en cinco picos con actividad xilanolítica, los cuales se nombraron de acuerdo a su orden de elución (figura 10). El pico I eluyó al lavar la columna con solución amortiguadora de Tris-HCl 20 mM pH 7. Los otros picos eluyeron al aplicar el gradiente de NaCl; el pico II eluyó a una concentración de 0.15 M; el pico III a 0.18 M de NaCl y los picos IV y V eluyeron a una concentración de 0.24 y 0.34 M de NaCl, respectivamente.

Este orden de elución sugirió que las xilanasas del pico I que no se adsorbieron en la resina tenían una carga eléctrica de superficie parcial positiva y que las xilanasas que se absorbieron presentaron una carga parcial negativa (Orjuela, 1998). La elección de esta resina como primer paso cromatográfico fue debido a que el pico I retuvo el 64% de actividad y a la buena resolución que presentó (tabla 6). Posiblemente este pico ya no contenía muchas proteínas, ni todas las xilanasas de la muestra que se inyectó. Por lo que, las fracciones del pico I se mezclaron, dializaron, liofilizaron y se cargaron a una columna de intercambio catiónico,

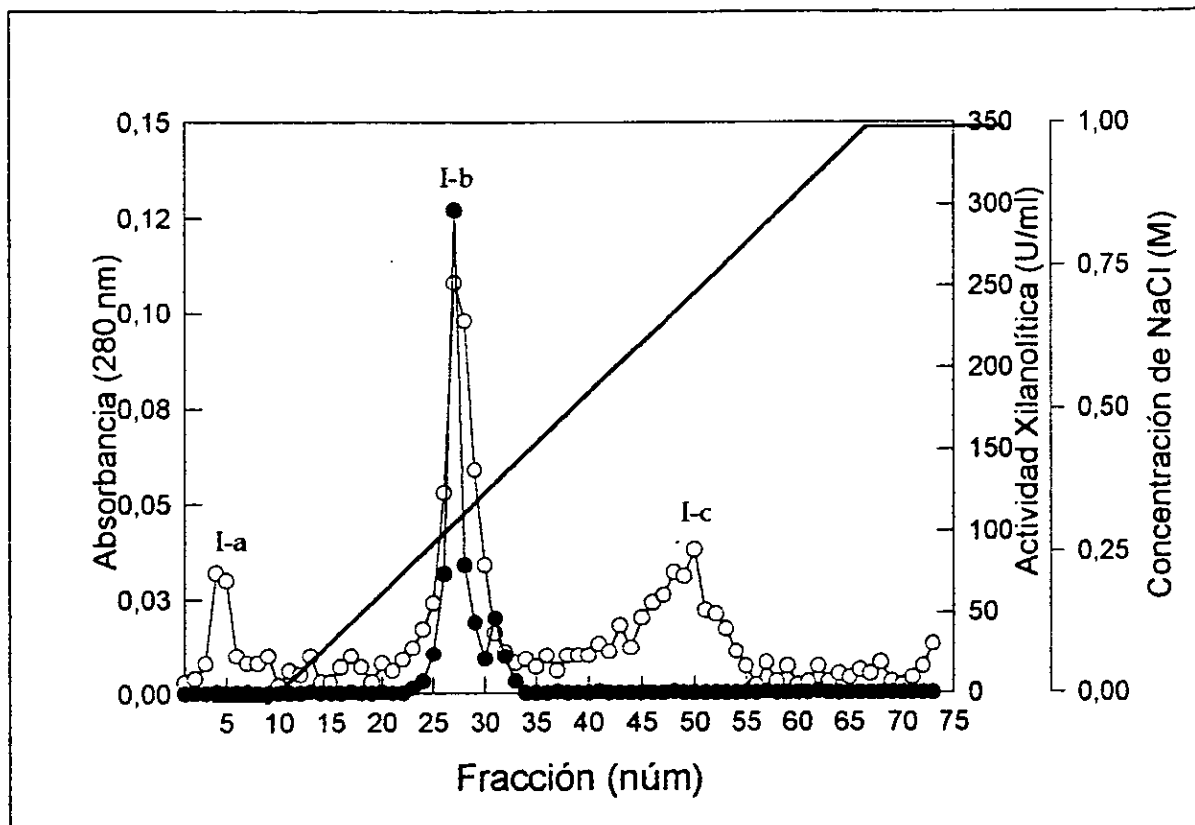
Carboximetil-Sepharosa (CM-Sepharosa), previamente equilibrada con una solución de amortiguadora de acetatos 20 mM a pH 5. Luego de aplicar la muestra, la columna se lavó y eluyó con un gradiente de NaCl de 0 a 1 M pH 5.



**Figura 10.** Cromatograma de elución de la columna Resource "Q" del filtrado extracelular de *Aspergillus* sp FP-470, cultivado en olote de maíz al 1% en el fermentador de 14 L, a 37°C, 200 r. p. m, 1 vvm y pH 5. La columna fue equilibrada con Tris-HCl 20 mM a pH 8, con un flujo de 1 ml/min y un gradiente de elución de NaCl de 0.0 a 0.5 M. Se colectaron fracciones de 3 ml. Absorbancia a 280 nm, ( O ) y actividad xilanólítica, ( ● ).

El cromatograma de la columna de CM-Sepharosa presentó tres picos de proteína a 280 nm. El pico I-b (se nombró de esta manera porque proviene del pico I de la columna Resource "Q") fue el que presentó actividad xilanólítica y eluyó a una concentración de 0.4 M de NaCl (figura 11).

**Figura 11.** Cromatograma de elución de la columna de Carboximetil-Sepharosa del pico I de Resource "Q". La resina se equilibró con una solución amortiguadora de acetatos 20 mM a pH 5, aplicando un gradiente NaCl de 0 a 1.0 M a pH 5. Densidad óptica a 280 nm, ( O ); actividad xilanólítica, (●).

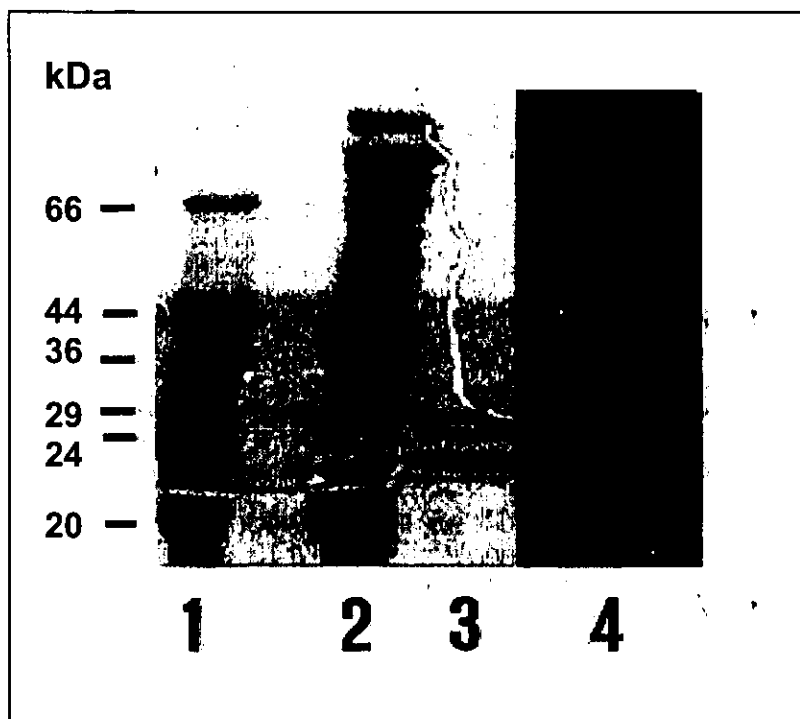


**Tabla 6.** Cuadro de purificación de la xilanasa purificada de *Aspergillus* sp FP-470.

Pasos	Actividad Total $U_{TOT}$	Proteína Total $mg_{TOT}$	Actividad Específica U/mg	Factor de Purificación	Porcentaje de Recuperación
Filtrado extracelular	820,000	5781.0	141.84	1	100
Concentrado <sup>1</sup>	795,300	471.81	1685.72	11.88	96
Resource "Q" Pico I	528,000	1.66	3178.52	22.4	64
CM-Sepharosa Pico I-b	327,000	0.731	447.02	31.53	40

<sup>1</sup>: retenido que se obtuvo por ultrafiltración.

De esta manera, se purificó una xilanasa de 22 kDa, alrededor de 31 veces y el porcentaje de recuperación de actividad fue de 40%. (figura 12, carril 3 y 4). Esta proteína se nombró como xil22 y su pureza se consideró aceptable para realizar la caracterización bioquímica.



**Figura 12.** Peso molecular de la xilanasa purificada de *Aspergillus* sp FP-470. El gel de poliacrilamida al 10% se corrió en condiciones desnaturalizantes. Línea 1, marcadores de peso molecular; 2, filtrado completo; 3, pico I-b, obtenido en la columna de CM-Sepharosa; 4, actividad xilanolítica "in situ" del pico I-b, en un gel de agarosa al 1% y RBB-xilanos al 0.4%.

Es importante destacar que *A. niger*, *A. nidulans* y *A. sp* también producen endoxilanasas con un peso molecular de 22 kDa (Ganju *et al.* 1989; van Paridon *et al.* 1992, Fernández-Espinar *et al.* 1993, Khanna *et al.* 1995). También se han purificado xilanasas con pesos moleculares muy cercanos como: *Streptomyces* sp A451 que produjo una endoxilanasas de 22.8 kDa (He *et al.* 1993), *Trichoderma harzianum* de 20-29 kDa (Wong *et al.* 1988), *Chaetomium thermophile* de 26 kDa (Ganju *et al.* 1989) y *Aeromonas caviae* de 20-33 kDa (Kilunga *et al.* 1994), *Bacillus* sp, cepa k-1 de 23 kDa (Ratanakhanokchai *et al.* 1999), entre otros.

De acuerdo a la clasificación hecha por Gilkes *et al* (1991), xil22 pertenece a la familia G (11). Diferentes xilanasas de esta familia se han usado en pruebas de blanqueo/biopulpeo y han incrementado la brillantez del papel (Clarke *et al.* 1997). En la elaboración de alimentos para animales de granja, el uso de una xilanasas de 22kDa (281 aminoácidos) logró reducir la viscosidad en alimentos ricos en xilanos e incrementó la absorción de los nutrientes. Así mismo, Maat *et al* (1992) describieron el efecto mejorador en panificación de una endoxilanasas de 211 residuos de aminoácidos (22 kDa) producida por *Aspergillus niger var. awamori*, ya que incrementó el volumen específico de los panes. Por lo que, xil22 se podría usar en alguno de estos procesos esperando buenos resultados.

Cabe mencionar que se intentaron usar otras resinas, como la G50-G150 de Sephadex, High S (Bio-Rad) y DEAE-Sepharosa (Pharmacia), pero no se obtuvieron buenos resultados. En algunos casos, la muestra se adherió fuertemente a la resina, lo que hizo casi imposible desadsorberla con actividad, aún al aplicar el gradiente de NaCl 1M. En otros casos, la resina se compactó al contacto con la muestra y al aplicarle el flujo poco a poco se tapaba. Estos problemas posiblemente se deban a la naturaleza de los soportes que están fabricados con derivados de celulosa como Sephadex, Sepharosa, etc; que al entrar en contacto con xilanasas pierden sus propiedades mecánicas (Wang *et al.* 1993; Nordberg *et al.* 1998).

## 7.4 Caracterización bioquímica de la xilanasa purificada de *Aspergillus* sp FP-470.

La caracterización bioquímica de xil22 se realizó para conocer algunas de sus propiedades, como pI, pH y temperatura óptimos, estabilidad con diferentes iones, etc., para su mejor manipulación y establecer sus posibles usos potenciales en procesos industriales.

### 7.4.1 Determinación del pI

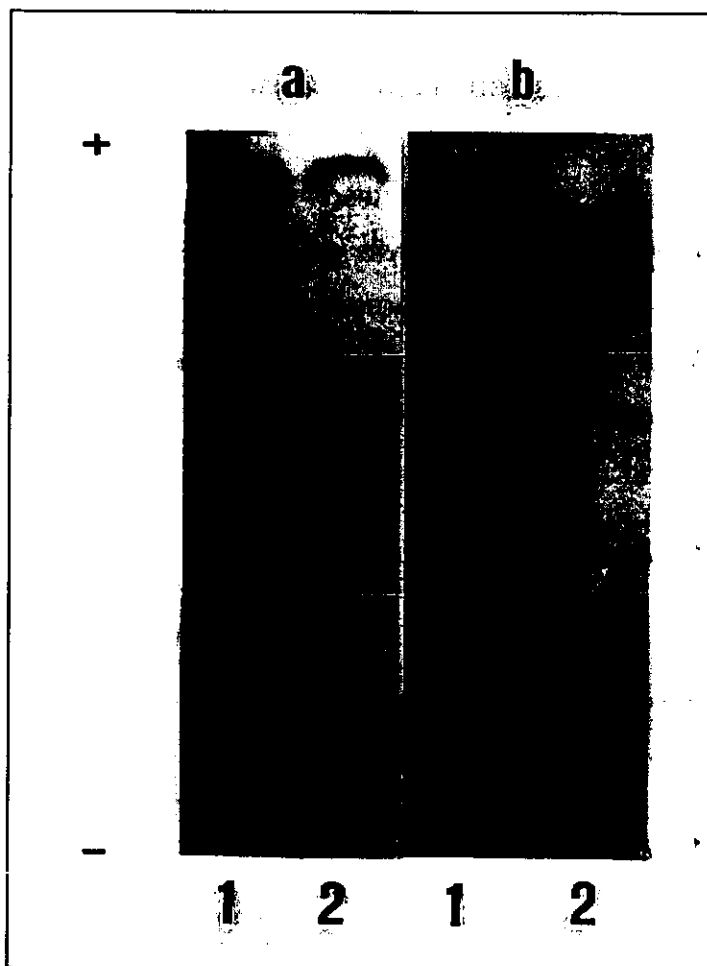
El pI de xil22 fue 8.9, aproximadamente (figura 13). La mayoría de las xilanasas presentan valores de pI que van de 4 hasta 10.5. Entre las xilanasas de pI básico encontramos a las de *Trichoderma viride* de pI 10.3 (Bailey *et al.* 1992), de *Fusarium oxysporum* de pI 9.5 y 8.45-8.7 (Christalopoulos *et al.* 1996) y *Aspergillus niger* de pI 8.6 y 9 (Fournier *et al.* 1985; tabla 6 y 7).

Wong *et al.* (1988) mencionaron que una de las finalidades de determinar el pI en las xilanasas es para comparar las diferentes xilanasas que produce un microorganismo con las de otro con pI semejantes como las de *T. harzianum* E58 de pI 9.5, 9.4 y 8.5 que podrían corresponder a xilanasas que produce *T. reesei* con pI de 10.3, 8.6 y 8.5. También clasificaron a las endoxilanasas de acuerdo a la relación de su pI y peso molecular. De acuerdo a esta clasificación xil22 caería dentro de la categoría de xilanasas básicas/ peso molecular bajo (8.9/22). El objetivo de esta clasificación es para identificar y predecir las funciones que cada categoría realiza en la hidrólisis de xilanos. Por ejemplo, la endoxilanasas de *Aspergillus* de 26 kDa/7.2 (Khana *et al.* 1995), dos de *Fusarium oxysporum* 20.8/9.5 y 23.5/8.45-8.7 (Cristalopoulos *et al.* 1996) y otra de *Aspergillus niger* 13/8.6 y 13/9.0 (Fournier *et al.* 1985) hidrolizan oligosacáridos de cadena larga con un GP de 4, producen xilobiosa en menor proporción, se unen a la celulosa cristalina pero no a los xilanos insolubles, rompen preferencialmente las uniones



internas glicosídicas por lo que presenta un modo de acción endo y ninguna actúa contra xilotriosa.

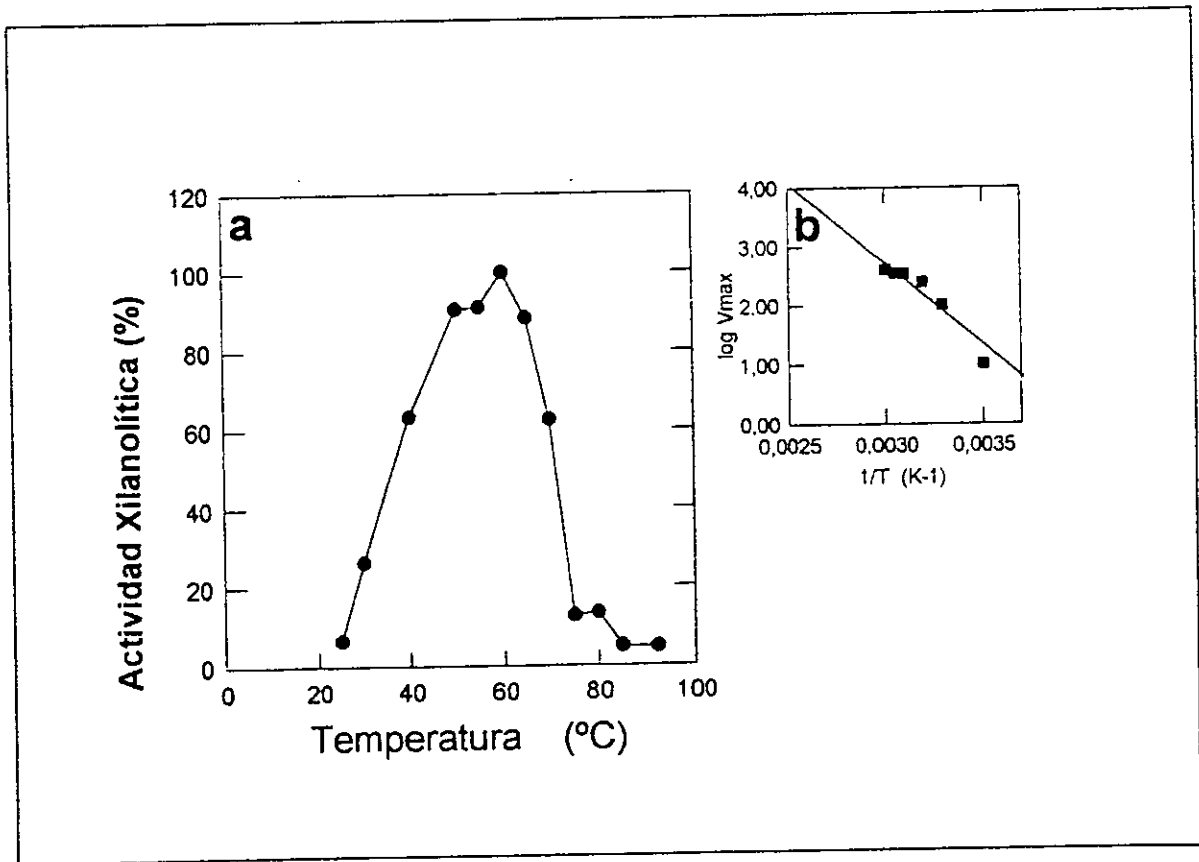
Por otro lado, se ha observado que las enzimas se unen a su sustrato específica ó inespecíficamente, lo que depende de diversas interacciones como: fuerzas electrostáticas, hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, etc. Se ha encontrado que dos xilanasas de *Aspergillus oryzae* se unen en forma diferente a xilanos insolubles dependiendo de su pl. La xilanasas con pl 6.9 se unió más rápido que la xilanasas que mostró un pl de 4.9. Esta característica se ha observado en otras endoxilanasas de pl básico. La enzima xil22 pertenece entonces a xilanasas de bajo peso molecular y pl básico, por lo que podría presentar un comportamiento hidrolítico similar, así como un modo de acción endo.



**Figura 13.** Isoelectroenfoque de xil22. (a) Gel de poliacrilamida al 10%, se corrió en condiciones nativas. (b) Gel Acoplado de Agarosa al 1% + RRB-xilanos al 0.4%. Línea 1, filtrado completo; 2, xil22.

### 7.4.2 Efecto de la temperatura en la actividad y estabilidad de la xilanasa purificada

Para llevar a cabo reacciones con xil22 es preferible hacerlo en sus condiciones óptimas de incubación. Del mismo modo, es importante saber la estabilidad de la enzima a diferentes temperaturas de incubación para determinar las mejores condiciones de almacenamiento. Al evaluar la temperatura óptima del ensayo de xil22 se encontró que fue de 60°C. A 25°C se obtuvo la temperatura más baja que fue el 13%, con respecto a la máxima actividad. A 80°C presentó solo el 7%, mientras que a 92°C no presentó actividad xilanolítica (figura 14). De acuerdo a la gráfica se puede considerar como la región de actividad óptima del ensayo entre 50 y 60°C.



**Figura 14. (a)** Temperatura óptima del ensayo de la xilanasa purificada de *Aspergillus* sp FP-470. La determinación se realizó en solución amortiguadora de acetatos 0.17 N a pH 5.0, incubando en las temperaturas indicadas y usando el método de azúcares reductores con DNS. El 100% de la actividad xilanolítica corresponde al 388 U/ml. **(b)** Gráfica de la ecuación de Arrhenius para calcular la energía de activación. Los valores de la ecuación de la recta fueron:  $y = -3180.65x + 12.31$ .  $R^2 = 0.96$ .

La mayoría de las xilanasas de microorganismos mesofílicos como éste presentan su máxima actividad entre 40 y 65°C, por ejemplo, las xilanasas de *Aspergillus niger* (van Paridon *et al.* 1992), *Aspergillus nidulans* (Fernández-Espinar *et al.* 1993), *Trichoderma harzianum* E58 (Sunna y Antranikian, 1997) y *Bacillus* sp k-1 (Ratanakhanokchai *et al.* 1999) que coinciden con una temperatura óptima de 60°C.

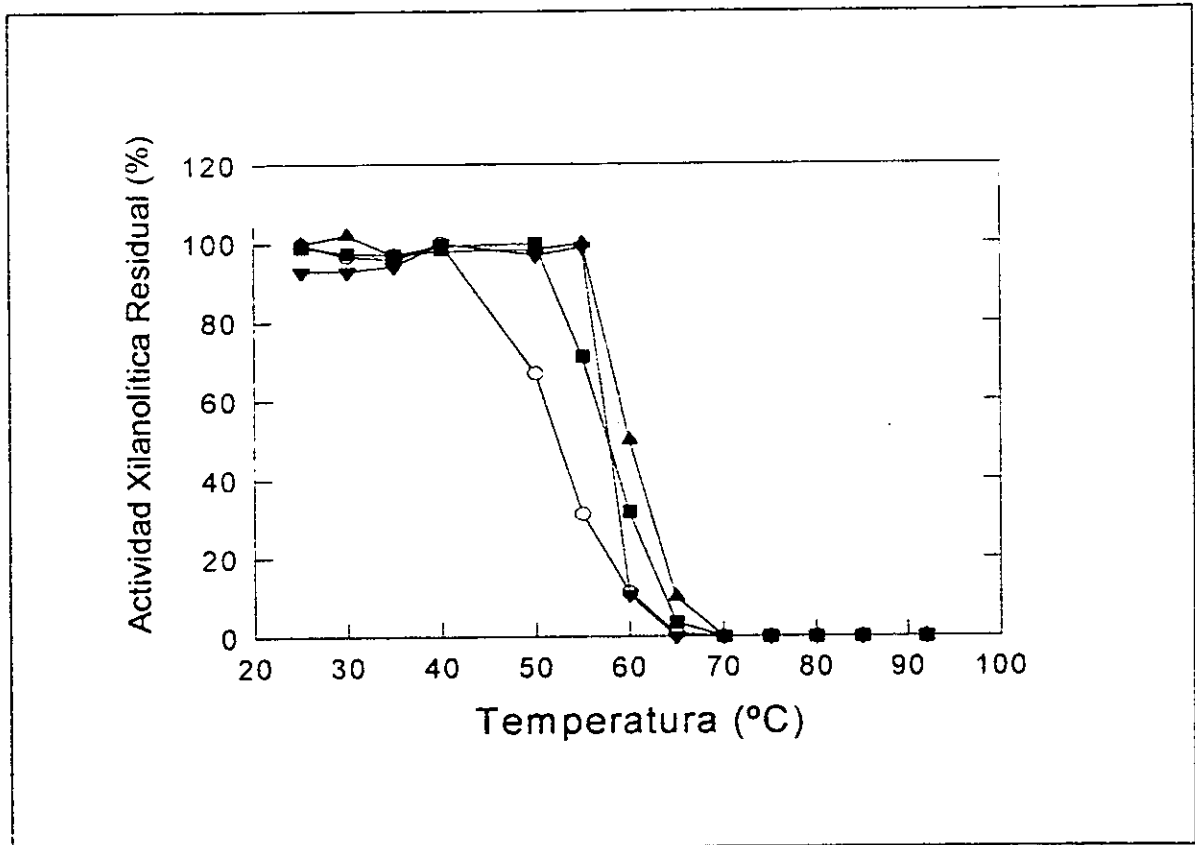
A partir de la curva de temperatura óptima se calculó el valor de la energía de activación ( $E_a$ ) de acuerdo con la ecuación de Arrhenius (figura 14b). El valor de la  $E_a$  fue 60.80 kJ/mol en el intervalo de 20 a los 60°C. Algunas xilanasas del género *Aspergillus* presentan valores de  $E_a$  en un amplio rango que va de 10 hasta 460 kJ/mol (tabla 7).

**Tabla 7.** Energías de activación de  $\beta(1-4)$  xilanasas del género *Aspergillus*

Microorganismo	xilanasas	Sustrato en donde se realizó la determinación	Energía de activación kJ/mol	Referencia
<i>A. niger</i>	pl 4.5	xilanos de haya	33.1	Shei <i>et al.</i> 1985.
<i>A. niger</i>	pl 4.5	xilanos de haya	460 l	Shei <i>et al.</i> 1985.
<i>A. niger</i>	pl 8.6	xilanos de haya	30.4l	Shei <i>et al.</i> 1985.
<i>A. niger</i>	pl 9.0	xilanos de haya	38.80	Frederick <i>et al.</i> 1985.
<i>A. niger</i>	24 kDa	xilanos de avena	9.6	Fndez-Espinar <i>et al.</i> 1996
<i>A. ochraceus</i>	48 kDa	desechos agrícolas	45±2	Biswas <i>et al.</i> 1990.
<b><i>Aspergillus</i> sp FP-470</b>	<b>22</b>	<b>xilanos de abedul</b>	<b>60.80</b>	<b>Este trabajo.</b>

Se estudió la estabilidad térmica de xil22 dentro de un rango de 25 a 80°C (figura 15). Entre 25 y 40°C conservó el 100% de la actividad, a 50°C disminuyó hasta un 35% y a 65°C perdió totalmente su actividad. Este comportamiento de estabilidad a

la temperatura de xil22 es similar a xilanasas de *Micrococcus*, que a 40°C fue muy estable pero a 45°C perdió el 20% y a 50°C perdió el 60% de su actividad (Gessesse y Mamo, 1998). Las xilanasas de *Aspergillus*, generalmente, presentan baja estabilidad térmica, como en este caso, que a partir de los 45°C empiezan a desnaturalizarse, con la consecuente pérdida de su actividad (Fernández Espinar *et al.* 1993).



**Figura 15.** Estabilidad térmica de la xilanasas de *Aspergillus* sp FP-470. La enzima fue incubada a diferentes temperaturas (25-90°C), durante 30 min. en solución amortiguadora de acetatos 0.17 N pH 5 y se determinó la actividad residual (xil22 sola, O ). De la misma manera se procedió cuando se evaluó el efecto del xilanos de abedul al 1%, (■); glicerol al 10%, (▲) y sorbitol al 10% (▼).

Los datos de estabilidad de la xilanasas de *Aspergillus* sp FP-470 permiten saber que la enzima es estable a temperatura ambiente y no hay riesgos de que pierda su actividad si se manipula por abajo de los 40°C durante periodos prolongados.

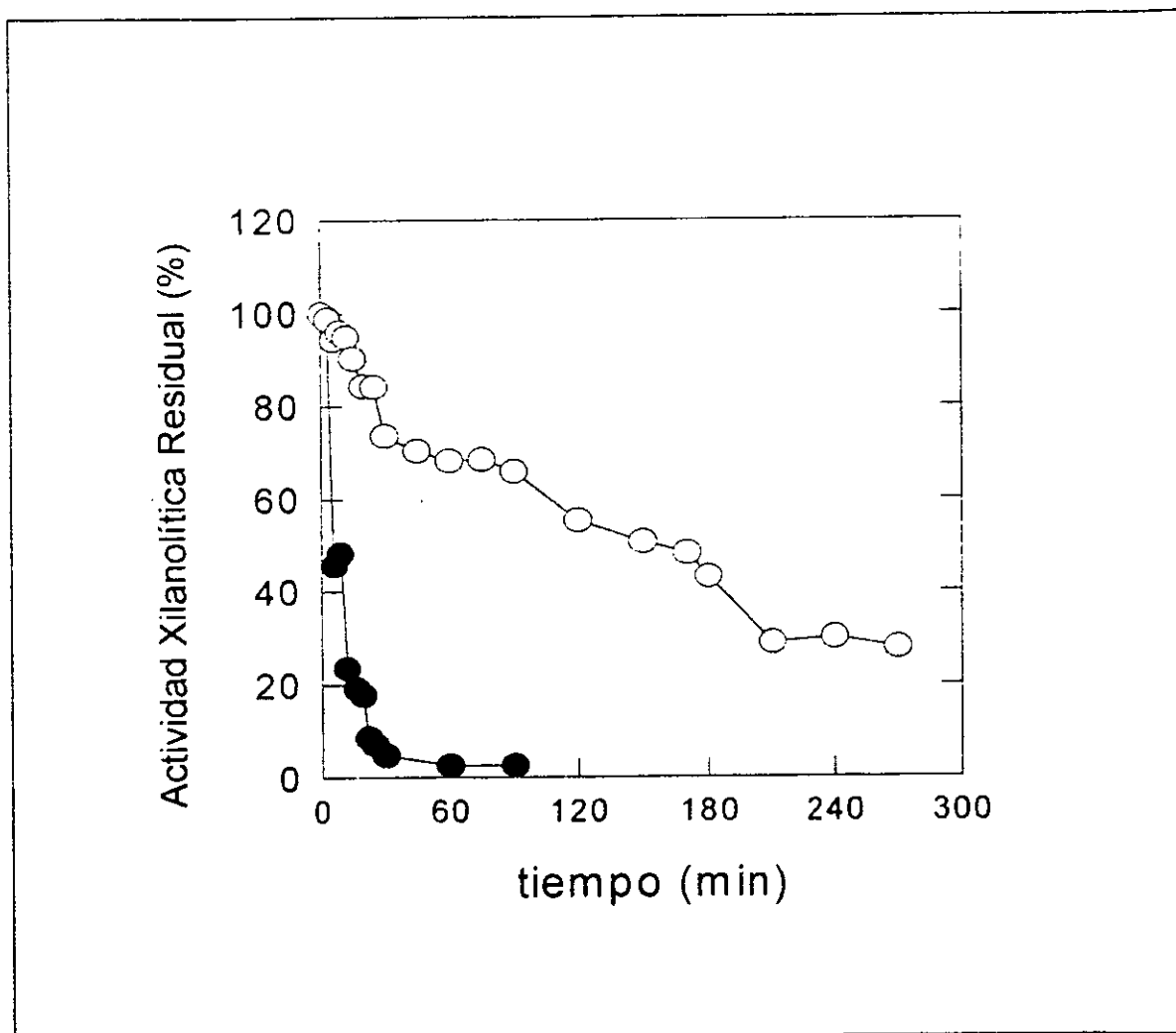
En algunos procesos industriales como en la elaboración de cerveza, se requiere de enzimas estables a 72°C (temperatura a la cual se lleva a cabo la sacarificación del mosto). Por otro lado, en la industria de la pulpa y del papel, también se requieren de enzimas termoestables, ya que la deslignificación se lleva a cabo a temperaturas de 70 a 80°C. Por esto, xilanasas de baja estabilidad térmica no son útiles para estas aplicaciones. Este problema se ha solucionado con la adición de termoprotectores como los mismos xilanos y el glicerol; observándose que la estabilidad aumenta sustancialmente al someter a las xilanasas a altas temperaturas (Angelo *et al.* 1997; Chandra y Chandra. 1996). Mendicuti *et al.* (1997) reportaron que xilanos de abedul incrementaron la estabilidad de las xilanasas de *Aspergillus sp FP-470* en un 80 a 85%. Por lo que se evaluó el efecto de xilanos de abedul al 1%, glicerol y sorbitol al 10%, que podrían funcionar como protectores y mantener la estabilidad de xil22 (figura 15).

Los resultados muestran que la estabilidad térmica aumentó en presencia de xilanos de abedul, ya que mantuvo el 100% de actividad a 55°C y sin protector sólo retuvo el 30%. Con glicerol y sorbitol mantuvo el 100% de su actividad hasta los 50°C y sin protector mantuvo el 70%. Por lo que en los casos en que se utilizó un protector, la estabilidad térmica de xil22 se conservó a temperaturas más altas. El aumento de estabilidad en presencia de algunos compuestos se debe posiblemente a la protección del sitio catalítico de la enzima, lo que ocasiona que la actividad se retenga a al aumentar la temperatura.

#### **7.4.3 Decaimiento térmico**

El decaimiento térmico de xil22 a 60°C fue muy drástico, ya que a los 6 min de incubación perdió cerca del 50% de su actividad (figura 16); este tipo de comportamiento se denomina de primer orden (Fernández-Espinar *et al.* 1993; Frederick *et al.* 1985). El tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) fue de 7.5 min y mantuvo el 14% de la actividad a los 25 min de incubación y tan solo el 5% a los 90 min.

En la curva que corresponde a 50°C se observan tres pendientes que podrían deberse a la desnaturalización gradual de la enzima debido a la ruptura de los enlaces no covalentes, se descarta la posibilidad que sea por la acción de proteasas, ya que no se encontraron en la muestra de xil22.



**Figura 16.** Decaimiento térmico de xil22 de *Aspergillus* sp FP-470 a 50 y 60°C. La enzima se incubó en solución amortiguadora de acetatos 0.17 N a pH 5 durante los diferentes tiempos y se le determinó la actividad xilanolítica residual. 50°C (○) y 60°C (●).

La primera pendiente fue la más pronunciada (abarca de 0 a 30 min), donde xil22 enzima pierdo el 30% de su actividad. En la segunda pendiente (45 a 180 min), la enzima perdió otro 39% de su actividad; y en la tercera pendiente la actividad el

decaimiento se mantuvo constante y perdió en total el 70% de su actividad. La vida media de la enzima en estas condiciones fue de 130 min, aproximadamente. Este valor fue 20 veces mayor al  $t_{1/2}$ , a 60°C. Fernández-Espinar *et al* (1993) observaron un comportamiento similar en una xilanasa de *Aspergillus* sp. la cual se inactivo a los 6 min. cuando se incubó a su temperatura óptima de 62°C. A 50 y 55°C también se incrementó el  $t_{1/2}$ , siendo de 40.6 y 2 h, respectivamente. Así también, dos de las xilanasas que produce *Aspergillus* sp también se inactivaron en un tiempo de 15 y 7 min a 60°C (Khana *et al.* 1995).

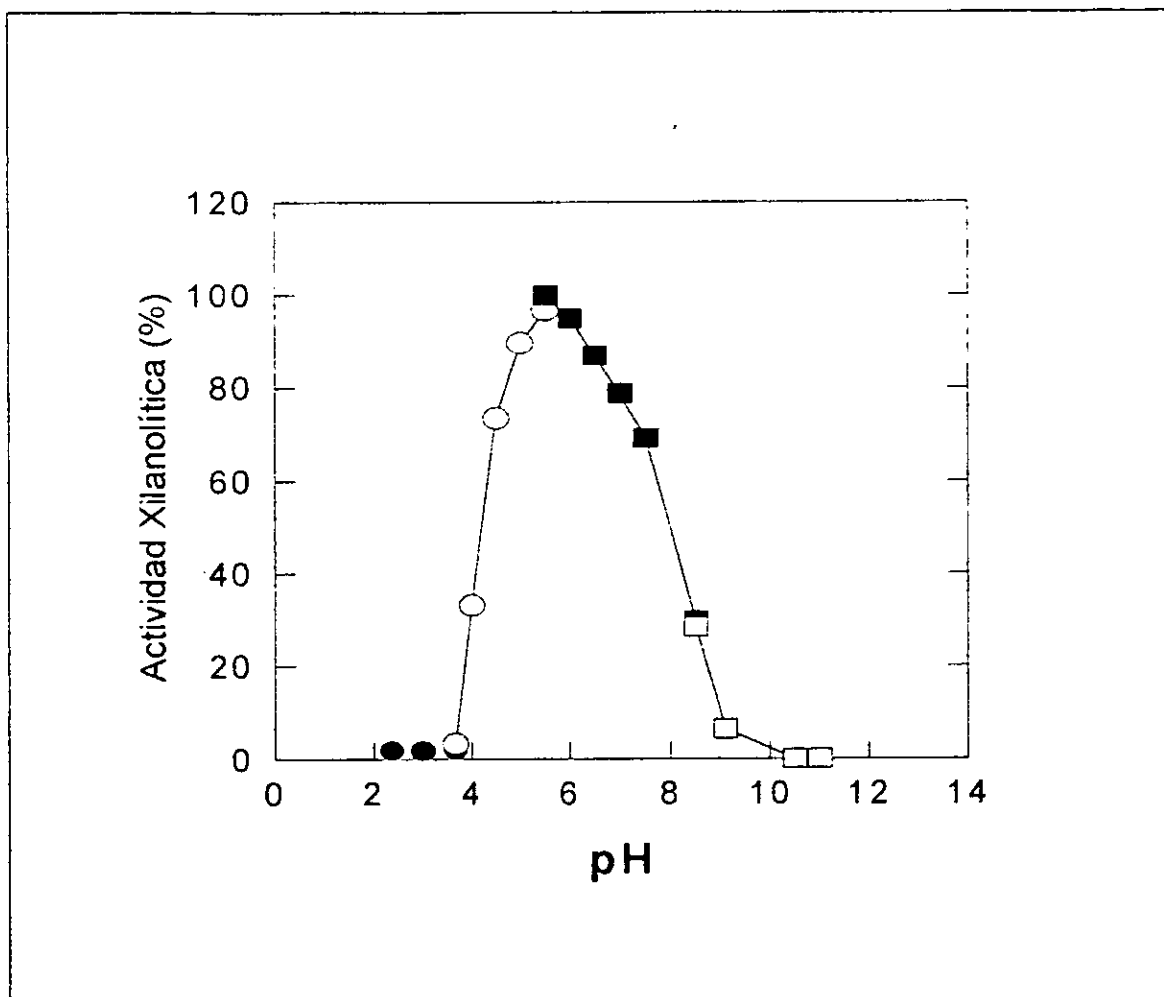
En la industria de la panificación se han usado enzimas con una temperatura óptima de 45°C (Monfort y *et al.* 1996) y 60°C (Fernández Espinar *et al.* 1996 y 1993). La xilanasa reportada por Fernández-Espinar *et al* (1996) retuvo el 15% de su actividad a 70°C y se inactivo a los 6 min. de incubación a su temperatura óptima (60°C). Se ha observado que la desnaturalización de enzimas para panificación empieza entre 54-70°C y se inactivan completamente a 94°C (Debyser *et al.* 1998; Martin y Hosenev, 1991). Aparentemente, para esta aplicación no son necesarias enzimas con una gran estabilidad térmica ni con una temperatura óptima alta. Xil22 no presenta alguna desventaja al respecto y se podría usar durante el proceso y mantenerse activa.

#### **7.4.4 Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de la xilanasa purificada.**

De la misma manera que la temperatura, el pH óptimo es una característica importante para conocer las condiciones óptimas de reacción de la enzima. Así mismo, su estabilidad a diferentes valores de pH permite saber en que rango la enzima se puede manejar sin que pierda su actividad.

Al evaluar el pH óptimo del ensayo de la xilanasa se observó que la máxima actividad fue a pH de 5.5, abajo de este valor se presentó el 80% de actividad, y a

pH entre 6.0 y 7.0 retuvo el 95%, aprox. Fuera de estos valores, la actividad de xil22 disminuyó el 70% (figura 17). Esta enzima se puede manejar dentro de un rango de pH 5 a 7.5 sin que pierda más del 50% de su actividad.

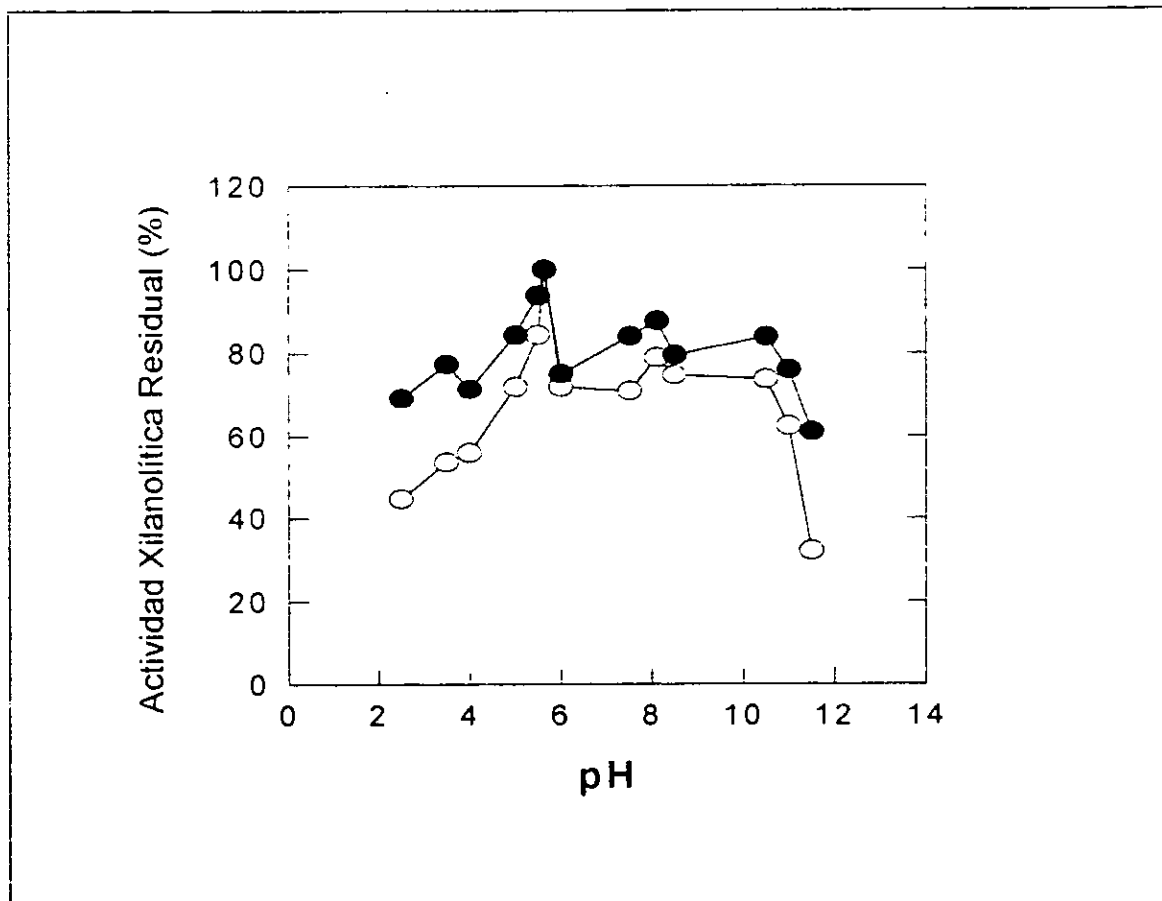


**Figura 17.** pH óptimo de actividad de la xilanasa de *Aspergillus* sp FP-470. La enzima se incubó a diferentes pHs de 2.5 hasta 11 a 60°C, durante 10 min. Los amortiguadores que se utilizaron fueron: glicina-HCl de 2.5 a 3.5 (●); acetatos de 3.5 a 5.5 (○); Tris-maleatos 5.5 a 8.5 (■); glicina-NaOH 8.5 a 11 (□), a una concentración de 0.05 M.

La mayoría de xilanasas de origen fúngal presentan un pH óptimo entre 4.0 y 6.5. Así, xilanasas de *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus* sp, *Bacillus* BP-23 y *Micrococcus* sp AR-135 presentaron el mismo valor de pH óptimo de 5.5 (Fernández-Espinar et al. 1993; Ratakhonokchai et al. 1999; Blanco et al. 1995; Gessesse y Mamo, 1998).



El efecto del pH sobre la estabilidad de la enzima se realizó incubándola a 4 y 25°C por 24 h. a los diferentes pH; después de este tiempo se midió la actividad residual. En la figura 18 se observa que a 4°C la enzima presentó más del 50% de su actividad en un rango de 5 a 10.5 unidades de pH. La estabilidad fue mayor cuando se incubó a 25°C y conservó el 80% de su actividad en todo los pH's que se probaron.



**Figura 18.** Estabilidad al pH de la xilanasas de *Aspergillus* sp FP-470. La enzima se expuso a diferentes pH en un rango de 2.3 a 11.5, en las soluciones amortiguadoras que se mencionan en el párrafo de pH óptimo, a dos temperaturas 4 y 25°C, durante 24 h. Después de este tiempo se midió la actividad residual.

Una xilanasas de *A. fumigatus* presentó el mismo comportamiento en un rango de 4 a 12 unidades de pH (Kitpreechavanich *et al.* 1984); así una de *A. ochraceus* hiperxilanolítica en un rango de 5 a 10 (Biswas *et al.* 1990). Las enzimas xilanolíticas con actividad, estabilidad a temperaturas y pH alcalino son requeridas

para la aplicación de algunos procesos industriales: en el blanqueo de la pulpa, ayudan a disminuir la cantidad de ácido necesario para la hidrólisis de los desechos agroindustriales (ya que los xilanos son solubles a pH alcalinos), en la obtención de azúcares fermentables y en su bioconversión (Breen y Singleton, 1999; Gessesse y Gashe, 1997, Gessesse y Mamo, 1998). Sin embargo en otras aplicaciones, como en la elaboración de dietas para animales de granja el uso de xilanasas alcali-tolerantes no son de gran utilidad, ya que se requieren enzimas capaces de actuar a pH ácido, alrededor de 3, debido a que la digestión se lleva a cabo en condiciones ácidas (Krengel y Dijkstra, 1996; van Paridon *et al.* 1992). Xil22 no podría usarse en ninguno de los dos casos ya que es estable a pH 4.5 y pH 8.5, pero con muy poca actividad.

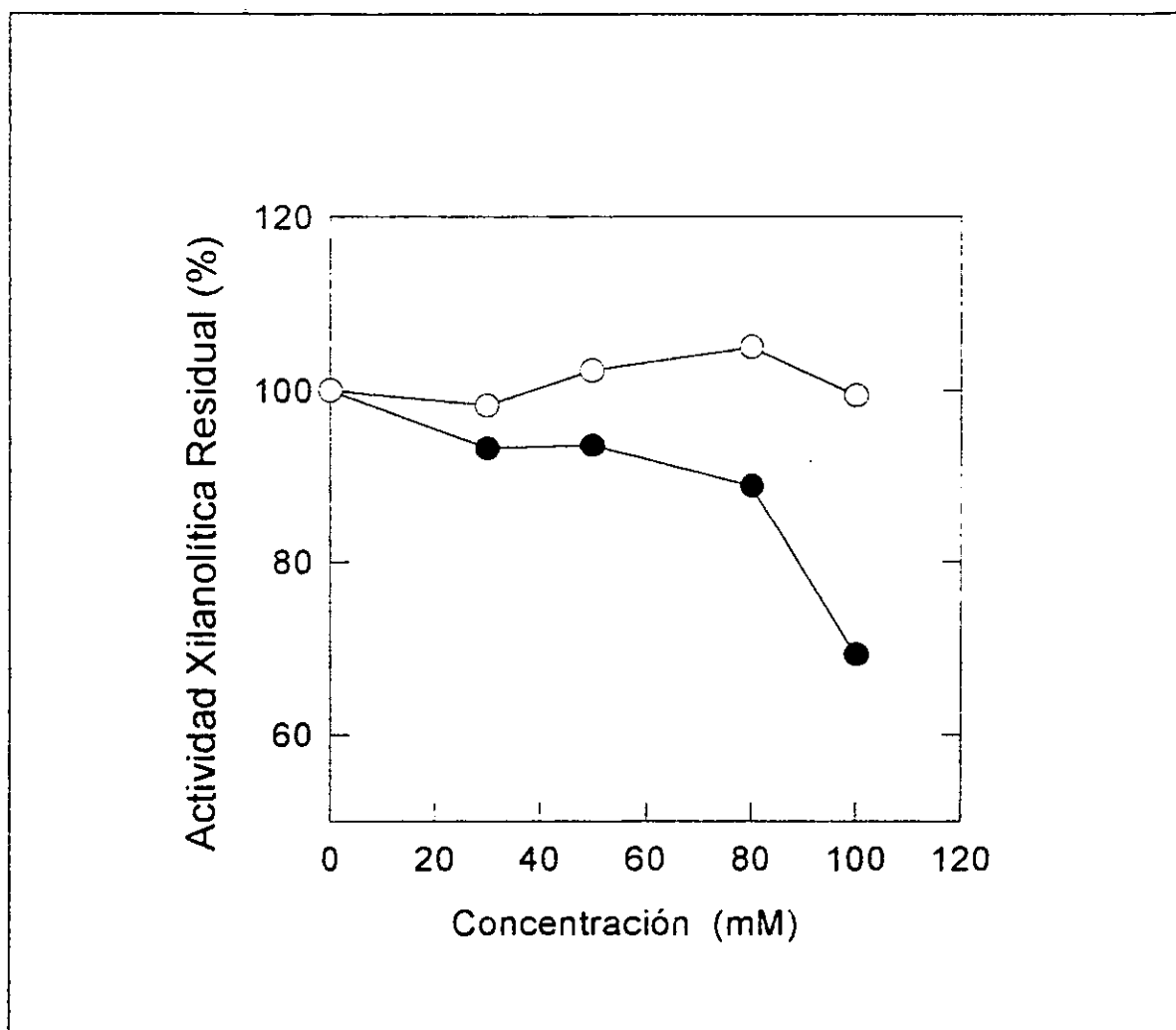
En la panificación se han usado enzimas xilanolíticas con una estabilidad de 4 a 9 unidades de pH; así por ejemplo, la endoxilanasas de *Aspergillus* sp retuvo el 90% de su actividad a pH de 5- 6.7 y presentó un efecto mejorador en panes (Fernández-Espinar *et al.* 1993; Monfort *et al.* 1996). Una de las enzimas caracterizadas y aplicadas en panificación fue la lipasa recombinante de *G. candidum* con pH óptimo de 8.5 y estabilidad a pH 5-9 del 20 al 40% (Monfort *et al.* 1999). Por estos antecedentes, xil22 sí podría usarse para esta aplicación ya que no se requieren enzimas con una gran versatilidad al pH, sino que se mantengan estables a pH cercanos a la neutralidad.

#### **7.4.5 Efecto de iones metálicos en la actividad**

Muchos compuestos, entre los que destacan los iones metálicos se encuentran en forma natural y pueden presentar diversos efectos sobre las xilanasas, desde negativo pronunciado, inhibiendo completamente la actividad; positivo, incrementando la actividad; hasta necesario, funcionando como cofactores, que se utilizan para que las enzimas lleven a cabo su función (Bastawde, 1992). Enseguida se presenta el efecto del KCl y del NaCl sobre la actividad de xil22

(figura 19). El KCl presentó un aumento del 10% a concentraciones de 50 a 100mM sobre la actividad de xil22. Por su parte, el NaCl disminuyó la actividad un 10% de 10 a 80mM y el 30% a 100 mM.

El efecto positivo del KCl, ha sido reportado en xilanasas de *Aspergillus ochraceus* en concentraciones semejantes (Biswas *et al.* 1990; Chandra y Chandra, 1996).



**Figura 19.** Efecto de la concentración de KCl y NaCl sobre la actividad de la xilanasa. A la mezcla de reacción de 0.5 ml de xilanos de abedul, 0.4 ml de solución amortiguadora de acetatos 0.17 N a pH 5, se le adicionó el ión correspondiente a las diferentes concentraciones de 10 a 100 mM, enseguida se le añadió 0.1 ml de la enzima y se determinó la actividad residual. KCl (○) y NaCl (●)

Con respecto al NaCl, su efecto inhibitorio es claro, posiblemente fue debido a la fuerza iónica que ejerció sobre la xilanasa, lo cual resulta importante ya que en algunas aplicaciones es común adicionar sales. Por ejemplo, en las masas de

panificación, el NaCl se utiliza como agente saborizante para contrarrestar el sabor dulce de los edulcorantes. Fortalece el gluten por que modifica la fuerza iónica de las proteínas. También baja ligeramente la actividad del agua ( $A_w$ ), por lo que sirve como agente conservador. Las cantidades generalmente utilizadas varían de 10-20 mg (Serna, 1996). La concentración de 100 mM equivale a 5.44 mg (que representa la mitad del uso recomendado). Por lo que se esperaría que a 10 mg (nivel mínimo usado), la actividad de la enzima se vea afectada al usarla en la panificación, lo que se debe de considerar al momento de la formulación del pan.

Se probaron también sales divalentes (tabla 8). La xilanasa en presencia de  $Ba^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  a una concentración de 10 mM conservó su actividad en un 82, 78 y 64%, respectivamente. Este efecto negativo fue más marcado cuando se probaron concentraciones de 20 mM. La enzima resultó con una actividad residual de 60, 60 y 35%, respectivamente.

**Tabla 8.** Efecto de los iones metálicos en la actividad de la xilanasa de *Aspergillus* sp FP-470.

Ión	Actividad Residual %	
	[10mM] <sup>1</sup>	[20mM]
Control	100	100
$Ba^{2+}$	82	60
$Mg^{2+}$	78	60
$Ca^{2+}$	64	35
$Zn^{2+}$	22	0
$Co^{2+}$	27	0
$Cu^{2+}$	0	0
$Fe^{3+}$	35	0

La actividad residual de xil22 en presencia del  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  y  $Fe^{3+}$  a 10 mM disminuyó a un 22, 27 0 y 35%, mientras que a una concentración de 20 mM el efecto fue más severo e inactivaron totalmente a la enzima. Resumiendo, xil22 no

necesitó de ninguno de los iones probados como cofactor. El efecto negativo sobre la actividad de xil22 fue más severo al aumentar la concentración del ión.

Los resultados de la tabla 8 son similares a los obtenidos con xilanasas de *Aspergillus*, *Bacillus* y *Micrococcus*, donde el  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  a 1 mM inhibieron la actividad un 26, 17, 10 y 84%, respectivamente y en *Micrococcus* en 99%, 40%, 57% (Frederick et al. 1985; Gessesse, 1998; Gessese y Mamo, 1998).

#### 7.4.6 Efecto de carbohidratos en la actividad de xil22

Algunas enzimas se inhiben ó activan por la acumulación de sus productos de hidrólisis. En xilanasas se conoce poco al respecto, uno de los casos que se han estudiado reveló que xilanasas de *Sporotrichum dimorphosporums* fueron afectadas por xilobiosa y por su análogo no hidrolizable, la 4-tioxilobiosa. Esto sugirió que las xilanasas son reguladas por pequeños fragmentos producto de la hidrólisis de xilanos mediante un mecanismo alostérico (Biely et al. 1992). En la tabla 9 se muestra la actividad relativa de xil22 en presencia de algunos azúcares.

**Tabla 9.** Efecto de carbohidratos en la actividad de xil22.

Sustrato	Actividad Relativa %
Xilano	100
Xilano+ramnosa	99.20
Xilano+celobiosa	84.30
Xilano+galactosa	50.90
Xilano+arabinosa	47.50
Xilano+glucosa	42.20
Xilano+xilosa	37.70

La mezcla de reacción se incubó a 50°C durante 10 min. a pH 5, en presencia de cada uno los carbohidratos a una concentración final de 10 mM y se determinó la actividad residual.

Estos resultados mostraron claramente que monosacáridos de polisacáridos que son constituyentes de la pared celular en vegetales como xilanos y  $\beta$ -glucanos

inhibieron la actividad de xil22 cerca del 50%. lo que sugiere que esta enzima puede ser regulable por sus productos de hidrólisis. Este tipo de efecto es común en complejos enzimáticos semejantes, ya que productos de hidrólisis de cierta enzima pueden inhibir y/o activar a otras enzimas del mismo sistema enzimático.

#### **7.4.7 Efecto de la actividad y selectividad de xil22 sobre diferentes sustratos**

Una propiedad de interés en las xilanasas es su acción contra diferentes sustratos (tabla 10). Xil22 presentó una mayor actividad xilanolítica en xilanos de abedul, xilanos de avena, 4-O-metil-D-glucuronoxilano y hemicelulosa. En olote obtuvo la menor actividad. En sustratos con celulosa (carboximetilcelulosa, celulosa microcristalina, papel filtro) no presentó actividad xilanolítica, lo que significa que xil22 no tiene la capacidad de degradar a la celulosa; así como tampoco al almidón ni al arabino-galactano.

La ausencia de actividad en sustratos con celulosa, le confiere a xil22 aplicaciones potenciales en la industria del papel y en la textil, donde se requieren xilanasas sin actividad contra materiales celulósicos (Clarke *et al.* 1997). Las constantes cinéticas de xil22 se determinaron en sustratos donde presentó actividad. La Km de xil22 para el 4-O-metil-D-glucuronoxilano fue la menor (1.9 mg/ml), lo que significa que esta enzima presentó mayor afinidad a este sustrato. Los valores de Km para otras xilanasas abarcan un amplio rango que va desde 0.24 a 20 mg/ml (Sunna *et al.* 1996).

La xilanasas purificada (xil22) tuvo una Km menor en xilanos de abedul, con respecto a la de xilanos de avena y hemicelulosa. Generalmente, para el primer caso, los valores de Km se encuentran entre 2 y 5 mg/ml, mientras que para el segundo caso se han determinado de 4 a 17 mg/ml (Breccia *et al.* 1998; Chandra y Chandra, 1996; Kilunga *et al.* 1994), aunque se encontró que una xilanasas de *Fusarium* presentó una Km fue de 1 mg/ml (Aiconada y Martínez, 1994). Al comparar las velocidades en estos sustratos, se observó que esta enzima fue más activa contra el 4-O-metil-D-glucuronoxilano, seguido de xilanos de abedul, de avena y por último de hemicelulosa.

**Tabla 10.** Actividad y selectividad de xil22 sobre diferentes sustratos.

Sustrato	Actividad relativa %	Km mg/ml	Vmax $\mu$ moles/min-mg de proteína
Xilanos de abedul	100	3.80	62
Xilanos de avena	95.54	10	44
4-O-metil-D-glucuronoxilano	74.27	1.90	44
Hemicelulosa	22.60	18	17.5
Olote	4.82	0	0
Carboximetilcelulosa	0	-	-
Celulosa cristalina	0	-	-
Almidón soluble	0	-	-
Papel filtro (avicel)	0	-	-
Arabino-galactano	0	-	-

La actividad xilanolítica o poder reductor se determinó poniendo en contacto a la xilanasas en cada sustrato al 2%, en solución amortiguadora de acetatos 0.17 N a pH 5, se incubó durante 10 min y se determinaron los azúcares reductores mediante el reactivo de DNS. Se utilizó una curva patrón de xilosa para calcular las unidades de actividad. Las constantes cinéticas se calcularon mediante el método gráfico de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk.

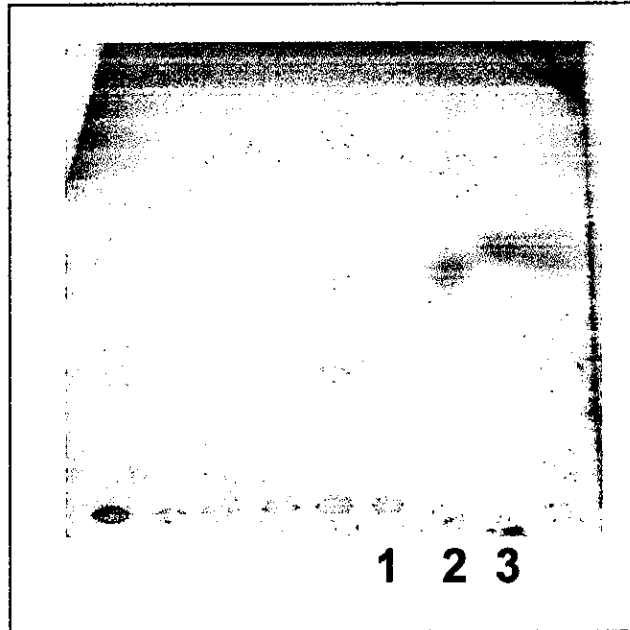
Muchas xilanasas purificadas muestran preferencia por xilanos solubles (4-O-metil-D-glucuronoxilano, xilanos de abedul, xilanos de avena; Fernández-Espinar *et al.* 1993; Sunna *et al.* 1996). El 4-O-metil-glucuronoxilano no contiene grupos laterales (acético y/o arabinosa), por lo que no presenta sitios ramificados que son un obstáculo espacial para la formación del complejo enzima-sustrato durante la catálisis (Gorbacheva y Radionova, 1977a y b).

Por otro lado, xilanos de abedul provienen de madera dura, contienen un grado de acetilación del 3% (Tenkanen y Poutanen, 1992) y un porcentaje mayor de xilanos solubles que de insolubles, 80 y 19%, respectivamente. Mientras que xilanos de avena, que se obtienen de la cascarilla del grano de avena son menos acetilados (1%) y contienen igual porcentaje de xilanos solubles e insolubles, 50.4 y 49% (He *et al.* 1993).

Las constantes cinéticas mostraron que la selectividad y actividad catalítica de xil22 dependió de la estructura y solubilidad del sustrato, ya que al ser menos ramificado y más soluble fue más susceptible de ser hidrolizado por esta enzima.

#### 7.4.8 Productos de hidrólisis

Así como resulta importante saber la preferencia de la xilanasas sobre diferentes sustratos, es importante identificar los productos de hidrólisis para identificar su modo de acción. La enzima purificada de *Aspergillus* sp FP-470 se incubó en su medio de reacción (ver Materiales y Métodos) y los productos de hidrólisis se identificaron en cromatografía en capa fina (figura 20).



**Figura 20.** Cromatografía en capa fina de los productos de hidrólisis sobre xilanos de abedul por la xilanasas purificada de *Aspergillus* sp FP-470. La enzima purificada se incubó con xilanos de abedul al 2% en solución amortiguadora de acetatos 0.17 N a pH 5 y 50°C; durante 330 min. Carril 1, productos de hidrólisis de la enzima purificada; 2, arabinosa; 3, xilosa.

La enzima purificada hidrolizó xilanos de abedul en xilooligosacáridos (de cadena), sin llegar a producir xilosa, lo que sugiere un modo de acción endo. Por otro lado, en la cromatografía se observa la presencia de arabinosa, por lo que xil22 es una xilanasas desramificante liberadora de arabinosa. Las xilanasas tipo endo han mostrado ser las más adecuadas en la panificación, ya que reducen la viscosidad de la masa y ayudan a la hidratación del gluten, por lo que aumentan el volumen del pan (Maat *et al.* 1992; Monfort *et al.* 1996).



## 7.5 Aplicación de la xilanasa purificada en panificación

La aplicación de xilanasas en panificación se ha hecho, pero no en todos los casos se han obtenido buenos resultados, debido a que no todas las xilanasas actúan de la misma manera, por lo que se evaluó el efecto de xil22 en la panificación xil22, así como del filtrado extracelular completo de *Aspergillus* sp FP-470 y se comparó con el efecto de dos muestras enzimáticas comerciales.

### 7.5.1 Muestras comerciales

Como primer paso se analizaron las características de las muestras comerciales. (Tabla 11).

**Tabla 11.** Características de las muestras enzimáticas comerciales.

Muestra	Características físicas	Proteína mg/ml	Actividad				
			Xilanolítica U/ml	Celulolítica <sup>1</sup> U/ml	Amilolítica U/ml	Pectinolítica U/ml	Xilanolít. Específica
C1 <i>Trichoderma viride</i>	Polvo fino acremado Soluble en agua	0.65	17.60	4.2	11	2.0	27.10 U/mg de proteína
C2 <i>Bacillus</i> sp	Polvo fino blanco. Soluble parcialmente en agua	0.24	2.54	0.0	257	0.0	1.28 U/ mg de proteína

C1 y C2 fueron proporcionadas por Enmex, México. microorganismo del cual proviene.

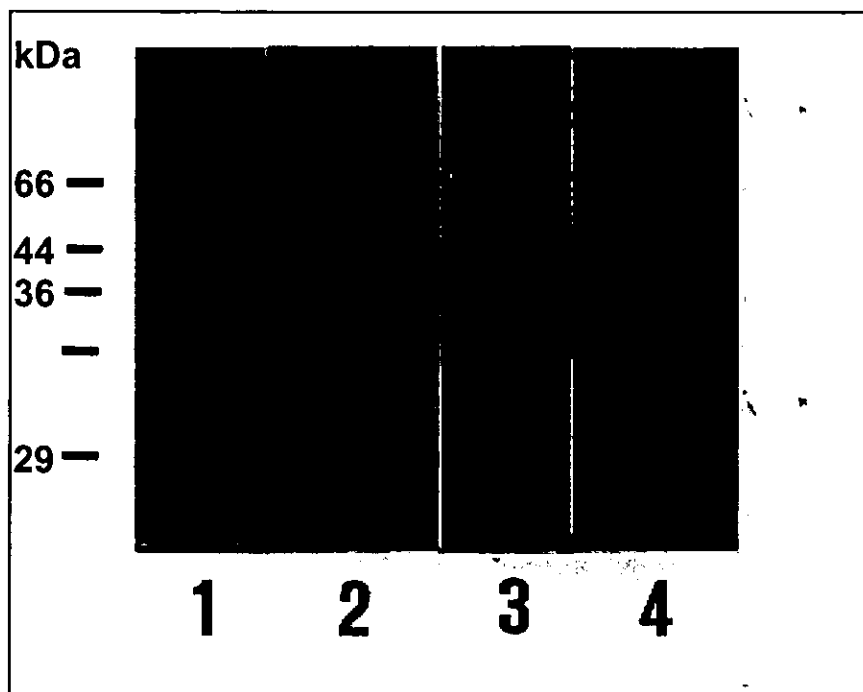
<sup>1</sup> para la actividad celulolítica se utilizó carboximetil-celulosa como sustrato.

Nota: los datos son referidos a una solución al 2% en agua, lo que equivale a 20 mg/ml.

La muestra C1 presentó una actividad xilanolítica considerable, también presentó actividad celulolítica, amilolítica y pectinolítica. La actividad celulolítica fue el 24%, con respecto a la actividad xilanolítica. La muestra C2 presentó básicamente actividad amilolítica y poca actividad xilanolítica.

Para observar el peso molecular de las xilanasas y amilasas de estas muestras comerciales se elaboraron los geles de proteínas y los de actividad "in situ". (Figura 21).

El perfil de proteínas de C1 presentó un mayor número de bandas, entre las que sobresalen proteínas de 32, 57 y 62 kDa. La proteína de 32 kDa mostró un halo de hidrólisis en el gel de rojo congo (gel no mostrado) y la de 57 kDa presentó actividad amilolítica (figura 21, carril 3). Por su parte, en la muestra C2 se observó una gran banda que abarcó entre 40 y 50 kDa (con un peso molecular promedio de 45 kDa) y otras mayores de 70 kDa (en ambas zonas se observó actividad amilolítica, carril 4).



**Figura 21.** Geles de poliacrilamida de proteínas de las muestras comerciales. Línea 1, Gel de electroforesis de poliacrilamida al 10%, en condiciones desnaturalizantes de C1, 2; C2; 3, gel de poliacrilamida al 10%, sumergido en solución de almidón al 1%, para detectar actividad amilolítica "in situ" de C1 y 4 ,de C2.

Por lo que, la muestra comercial C1 contiene diferentes actividades enzimáticas. Esta diversidad de actividades es deseable, ya que incrementan su efecto debido al efecto sinérgico de las diferentes enzimas. Los mejoradores de panificación que

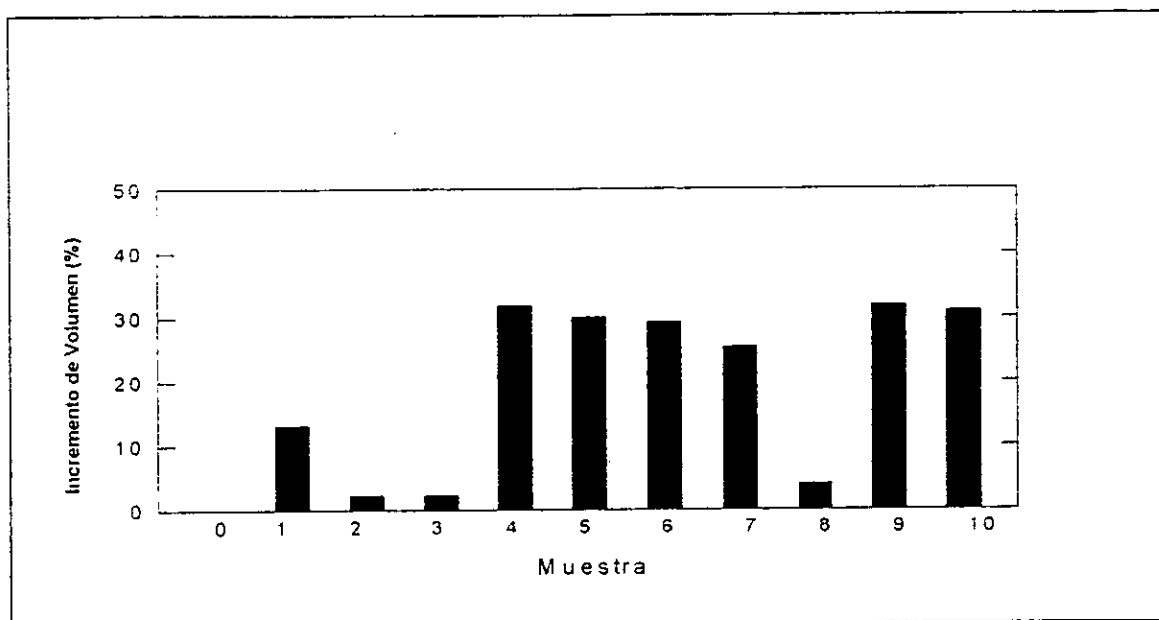
se comercializan contienen varias actividades con diferentes efectos. Por ejemplo, la  $\alpha$ -amilasa retarda el proceso de envejecimiento del pan, ya que produce dextrinas de tamaño intermedio que retienen agua e impiden la unión del almidón y las proteínas, lo que hace que se contraiga menos (Martín *et al.* 1991). Al usarse  $\alpha$ -amilasas y xilanasas se ha observado un efecto mejor. También la asociación de lipasas y xilanasas presenta un efecto sinérgico. En ocasiones, la dosis de xilanasas se limita, ya que puede ocasionar un ablandamiento excesivo de la masa, pero al usarse en combinación con lipasa no se obtiene ablandamiento excesivo, por lo que el volumen del pan se incrementa, que cuando se usa únicamente xilanasas (Qi Si y Hansen, 1995). Las lipasas actúan hidrolizando a los glicolípidos (que se encuentran unidos por puentes de hidrógenos e interacciones hidrofóbicas a las proteínas del gluten) y provocan la liberación de proteínas, lo que permite una mejor agregación del gluten con aumento en el volumen del pan. Por otro lado, se ha incrementado el uso de otras enzimas, como oxidasas que son agentes oxidantes que usan para sustituir al bromato de potasio (que en algunos países ya está prohibido debido a que es tóxico, Shrøder *et al.* 1999; Morales, 1999; Serna, 1996).

#### **7.4.2 Pruebas de panificación**

Para evaluar el efecto de xil22, del filtrado completo y de las muestras comerciales en panificación se realizó una prueba de dosis/respuesta. Las dosis que se probaron fueron de 25 a 200 ppm. Los panes se elaboraron de acuerdo al método de AACC (AACC, 1993) con 100 g de harina, se midió su volumen y se analizaron sensorialmente (ver Materiales y Métodos).

En la figura 22 se observa que el volumen del pan se incrementó con las diferentes muestras enzimáticas con respecto al control (pan sin enzima). En los panes que se elaboraron con el filtrado completo, el máximo incremento fue del 13.13% a una dosis 50 ppm. Para dosis mayores el incremento fue menor, alrededor del 2.5%. Cuando se agregó xil22 el máximo incremento fue 32% a una dosis de 25 ppm. De

igual manera que en el filtrado completo, el incremento fue menor al aumentar la concentración de enzima que se añadió, ya que a 200 ppm fue tan solo del 14%. Los panes elaborados con las muestras comerciales obtuvieron un incremento del 31%, lo que coincidió con el obtenido con xil22 a 25 ppm, pero en el primer caso, la dosis fue de 200 ppm.



**Figura 22.** Incremento de volumen en panes elaborados con el enzimático completo, la xilanasa purificada y las muestras comerciales. 0, control, 1, filtrado completo a 50ppm, 2, filtrado completo a 100 ppm; 3, filtrado completo a 150 ppm; 4, xil22 a 25 ppm; 5, xil22 a 50 ppm, 6, xil22 a 100 ppm, 7, xil22 a 150 ppm; 8, xil22 a 200 ppm; 9, C1 a 200 ppm y 10, C2 a 200 ppm.

Además de evaluar el incremento se midió el volumen del pan. Los panes elaborados con xil22 a 25, 50 y 100 ppm y las muestras comerciales obtuvieron una calificación de 9 (750-815 cm<sup>3</sup>). Los panes elaborados con el filtrado completo con dosis de 50 ppm y xil22 a 150 y 200 ppm, tienen una calificación de 7 y el testigo de 6 (600-500 cm<sup>3</sup>). Por lo que el volumen del pan se mejoró al agregarle las muestras enzimáticas a dosis bajas y no a altas. Este efecto fue descrito por Monfort *et al.* (1996) y Qi Si y Hansen (1995), donde mencionan que el uso de las

xilanasas o dosis altas produce un excesivo ablandamiento de las masas con una disminución en el volumen del pan.

El análisis sensorial de los panes mostró que el color de la corteza resultó ser igual al control a dosis bajas; sin embargo, el pan elaborado con C2 obtuvo una calificación de 5 (muy dorado), debido a que esta muestra contiene amilasas, las cuales liberan azúcares durante la fermentación y reaccionan con las proteínas (reacción de Maillard) por lo que se desarrolló un color más intenso (tabla 12 y figura 23a).

**Tabla 12.** Análisis sensorial de panes elaborados con el filtrado completo, la xilanasas purificada a diferentes dosis y las muestras comerciales.

Muestra	Dosis ppm	Color de la corteza <sup>1</sup>	Color de la miga <sup>2</sup>	Textura de la miga <sup>3</sup>	Apariencia general <sup>4</sup>
Control	0	3	8	6	6
Filtrado completo*	50	3	8	6	8
	100	3	8	7	8
	150	3	9	6	7
Xil22	25	3	9	9	9
	50	3	9	9	9
	100	3	9	8	9
	150	4	8	8	8
	200	4	7	7	7
C1	200	3	9	7	9
C2	200	5	8	8	8

<sup>1</sup> 5; muy dorado, 4, dorada; 3, ligeramente dorada. <sup>2</sup> 9, cremado; 8, amarillo crema; 7, crema

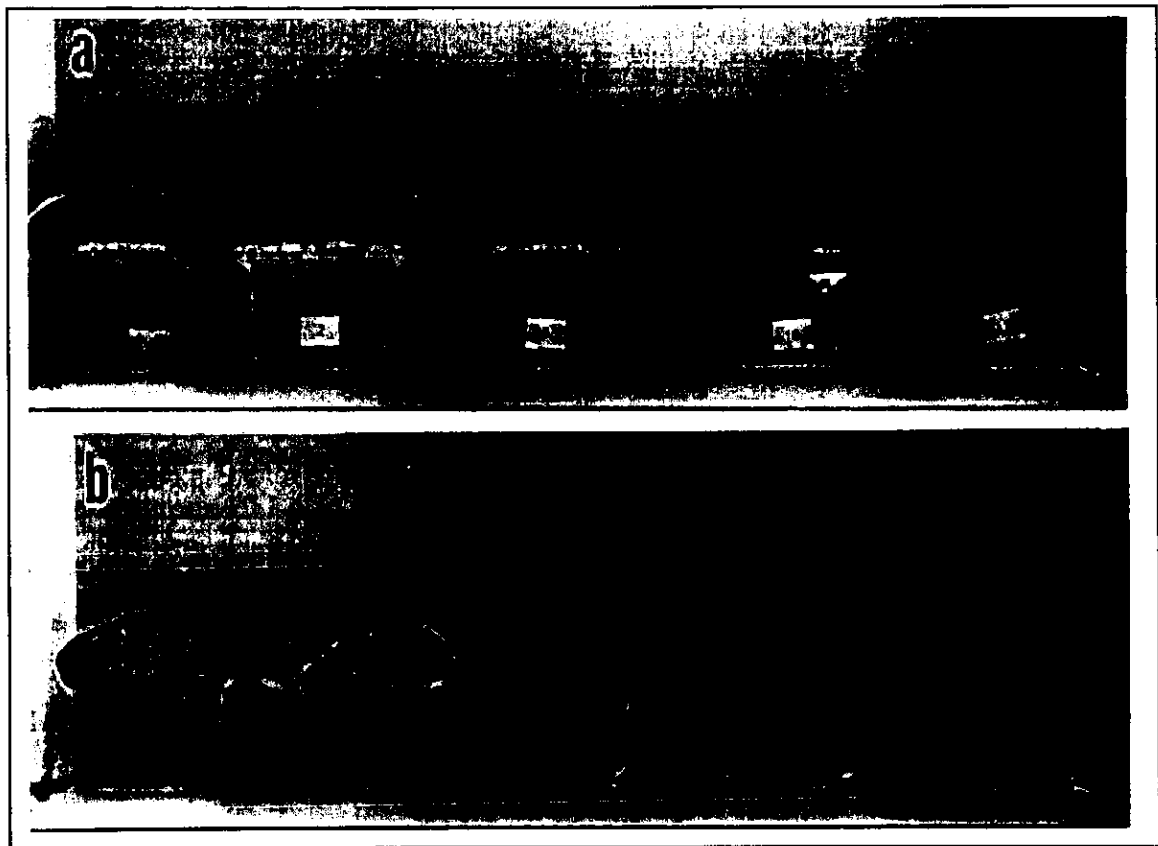
<sup>3</sup> 9, muy buena; 8, buena; 7, regular; 6 pobre. <sup>4</sup> 9, muy buena; 8, muy buena; 7, regular; 6, suficiente.

\*de *Aspergillus* sp FP-470 cultivado en olote de maíz en un fermentador de 14 L a 37°C.

En cuanto al color de la miga, los panes con mejor calificación fueron los elaborados con C1 y xil22 a 25, 50 y 100 ppm con un valor de 9 que corresponde a

un color cremado. Los panes con el filtrado completo obtuvieron una calificación de 8, al igual que el testigo y C2 que corresponde aun color amarillo.

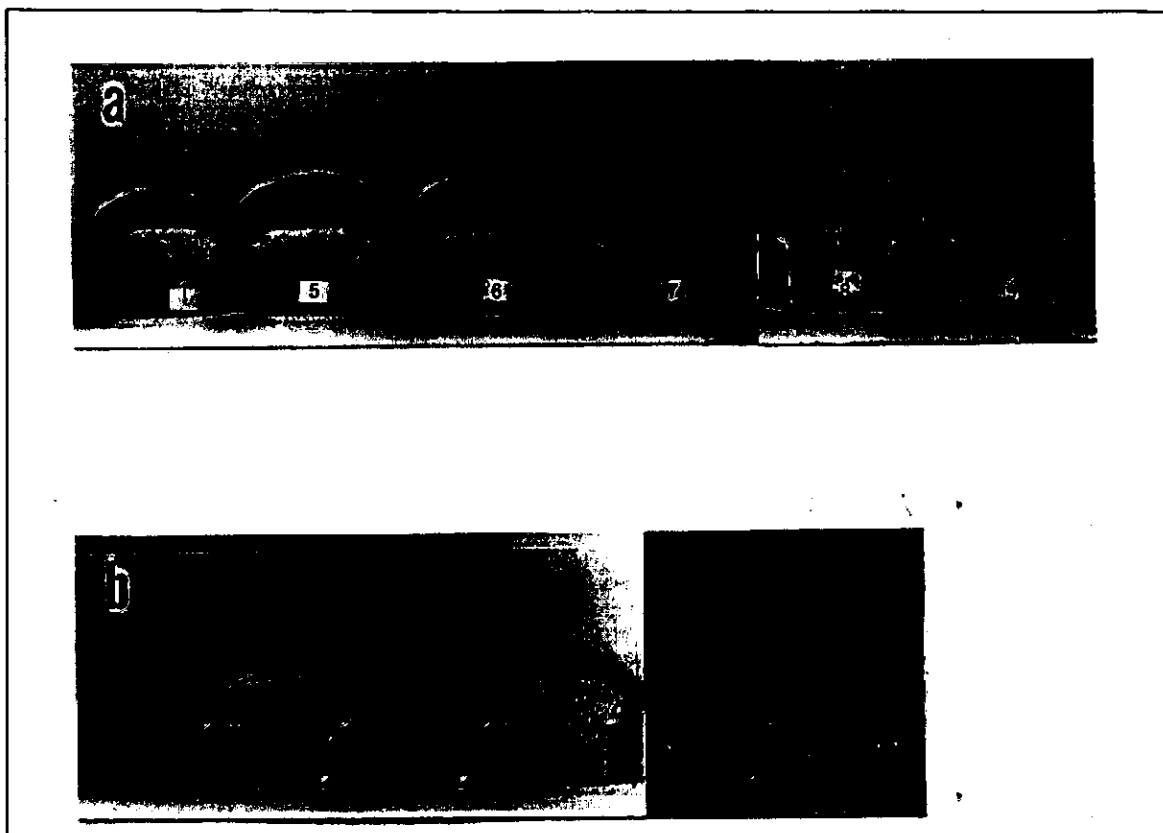
La textura de la miga es un atributo sensorial importante ya que esta relacionada con el volumen del pan. Al comparar las diferentes panes se observó que la más homogénea se obtuvo con el filtrado completo y con xil22 con una calificación de 9. Para C1 la calificación fue de 7 (regular) y para C2, de 8 (buena).



**Figura 23.** Panes elaborados con el filtrado completo de *Aspergillus* sp FP-470, la xilanasa purificada y las muestras comerciales. Los panes se elaboraron de acuerdo a la técnica 10-09 (AACC, 1983) con 100 g de harina tipo Victoria que contenía 11% de proteína y 2-3% de xilanos (Morales, 1999). (a) Apariencia general; (b) Textura y color de la miga. 1 control; 2, filtrado crudo a 50 ppm; 5, xil22 a 25 ppm, 10, C1 a 200 ppm y 11, C2 a 200 ppm.

Las pruebas de panificación mostraron que los panes elaborados con xil22 a bajas concentraciones fueron de mejor calidad y al compararlos con los panes de las muestras comerciales, la calidad es la misma con respecto al volumen, pero mayor

en otras propiedades sensoriales (Figura 24): Por lo que no solamente se debe de tomar en cuenta el incremento del volumen, sino tan bien es importante tomar en cuenta la evaluación sensorial para determinar la calidad global del pan.



**Figura 24.** Panes elaborados con la xilanasa purificada de *Aspergillus* sp a diferentes dosis. Los panes se elaboraron de acuerdo a la técnica 10-09 (AACC, 1983) con 100 g de harina tipo Victoria que contenía 11% de proteína y 2-3% de xilanos (Morales, 1999). (a) Apariencia general; (b) Textura y color de la miga. 1, Control; 5, 25 ppm; 6, 50 ppm, 7, 100 ppm, 8, 150 ppm y 9, 200 ppm.

La enzima purificada de *Aspergillus* sp FP-470, la cual es una endoxilanasas liberadora de arabinosa, posiblemente eliminó de manera más eficiente que las otras muestras enzimáticas empleadas, las interacciones de los xilanos y el gluten lo que se impidió la agregación de las moléculas de gluteína, las cuales son las que forman la red que permite la distribución y difusión del CO<sub>2</sub> durante la fermentación de la masa (principio en el cual se basa la panificación). Por lo que al eliminar el efecto estérico de los xilanos se dió una buena distribución del CO<sub>2</sub> con la consecuente homogeneidad de la miga y un mayor incremento en el volumen del pan.

## 8. CONCLUSIONES

- La cepa de *Aspergillus* sp FP-470 es capaz de crecer y producir actividad xilanólítica, enriquecidas de otras actividades importantes a nivel industrial en desechos agroindustriales económicos
  
- Bajo condiciones controladas como las del fermentador permiten que *Aspergillus* sp FP-470 crezca y produzca con más eficiencia xilanasas y en tiempos cortos.
  
- El uso de técnicas cromatográficas como el intercambio iónico, permitió purificar una xilanasas alrededor de 30 veces y recuperar la actividad en un 40%, para su posterior caracterización y aplicación.
- La caracterización bioquímica de la enzima purificada permitió establecer sus posibles usos potenciales.
  
- La enzima xil22 corresponde a una xilanasas básica/bajo peso molecular (8.9/22), la cual podría tener funciones parecidas a xilanasas de otros microorganismos que posean estas características.
  
- La enzima purificada de *Aspergillus* sp FP-470, la cual es una endoxilanasas liberadora de arabinosa, posiblemente eliminó de manera más eficiente que las otras muestras enzimáticas empleadas, las interacciones de los xilanos y el gluten lo que se impidió la agregación de las moléculas de gluteína, las cuales son las que forman la red que permite la distribución y difusión del CO<sub>2</sub> durante la fermentación de la masa (principio en el cual se basa la panificación). Por lo que al eliminar el efecto estérico de los xilanos se dió una buena distribución del CO<sub>2</sub> con la consecuente homogeneidad de la miga y un mayor incremento en el volumen del pan.
  
- No solamente es importante tomar como referencia el incremento ó el volumen obtenido en el pan, sino también son imprescindibles las características sensoriales para determinar la calidad global del mismo.



## 9. Bibliografía

AACC. 1983. Approved Methods. American Association of Cereal Chemists. 8<sup>th</sup> edition. St. Paul, Minnesota. USA.

Aguilar, G. 1986. Aplicación del cultivo alimentado en la producción de pectinasas extracelulares de *Aspergillus* sp. y estimulación por adición de ácido galacturónico y glucosa. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM.

Alconada, T. and Martínez, M. 1994. Purification and characterization of an extracellular endo-1,4- $\beta$ -xylanase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. FEMS Microb. Lett. **118**, 305-310.

Angelo, R., Aguirre, C., Curotto, E., Esposito, E., Fontana, J., Baron, M., Milagres, A. and Durán, N. 1997. Stability and chemical modification of xylanase from *Aspergillus* sp. (2M1 strain). Biotechnol. Appl. Biochem. **25**, 19-27.

Araki, T., Inaue, N. and Morishita, T. 1998. Purification and characterization of  $\beta$ -1,3-xylanase from a marine bacterium, *Alcaligenes* sp. xy-234. J. Gen. Appl. Microbiol. **44**, 269-274.

Bailey, M. and Poutanen K. 1989. Production of xylanolytic enzymes by strains of *Aspergillus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **30**, 5-10.

Bailey, M. and Viikari, L. 1993. Production of xylanases by *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus oryzae* on xylan-based media. World J. Microbiol. Biotechnol. **9**, 80-84.

Bailey, M., Biely, P. and Poutanen, K. 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. J. Biotechnol. **23**, 257-270.

Bastawde, K. 1992. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. World J. Microbiol. Biotechnol. **8**, 353-368.

Bedarkar, S., Gilkes, N., Kilburn, D., Kwam, E., Rose, D., Miller Jr. R., Warren, A. and Withers, S. 1992. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the catalytic domain of Cex, an exo- $\beta$ -1,4-glucanase and  $\beta$ -1,4-xylanase from the bacterium *Cellulomonas fimi*. J. Mol. Biol. **228**, 693-695.

Biely, P., Kratky, Z. and Vrsanka, M. 1981a. Substrate-binding site of endo-1,4- $\beta$ -xylanase of the yeast *Cryptococcus albidus*. FEBS Lett. 558-564.

Biely, P., Markovic, O. and Mislovicova, D. 1985a. Sensitive Detection of Endo-1,4- $\beta$ -glucanases and Endo-1,4- $\beta$ -xylanases in Gels. Anal. Biochem **144**, 147-151.

Biely, P., Mislovicová, D. and Toman, R. 1985b. Solubles Chromogenics Substrate for the Assay od Endo-1,4- $\beta$ -xylanases and Endo-1,4- $\beta$ -glucanases. Anal. Biochem. **144**, 142-146.

Biely, P., Vrsanka, M. and Kratky, Z. 1981b. Mechanism of susbtrate digestion by endo-1,4- $\beta$ -xylanase of the yeast *Cryptococcus albidus*. FEBS Lett. 565-571.

- Biely, P., Vrsanka, M. and Kuřičár, S. 1992. Identification and mode of action of endo-(1-4)- $\beta$ -xylanase. In *Xylan and Xylanases. Progress in Biotechnology*. Ed. J. Visser. Elsevier Science Publishers B. V. Neetherlans. pp 81-95.
- Biely, P., Vrsanka, M., Tenkanen, M. and Kluepfel, D. 1997. Endo- $\beta$ -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *J. Biotechnol.* **57**, 151-166.
- Biswas, S., Jana, S. and Nanda, G. 1990. Production, Purification and Characterization of Xylanase from a Hiperxylanolytic Mutant of *Aspegillus ochraceus*. *Biotechnol. Bioeng.* **35**, 244-251.
- Blanco, A., Vidal, T., Colom, J. and Pastor, J. 1995. Purification and Properties of Xylanases a from alcali-tolerant *Bacillus* sp. strain BP-23. *Appl. Environ. Microb.* **61**, 4468-4470.
- Breen, A. and Singleton, FG. 1999. Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping. *Curr. Opinion Biotechnol.* **10**, 252-258.
- Breccia, J., Torto, N., Gorton, L., Siñeriz, F. and Hatti-Kaul, R. 1998. Specificity and mode of action of a thermostable xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens* on-line monitoring of hydrolysis products. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **60**, 31-40.
- Chandra, K. and Chandra T. 1996. Purification and characterization of xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fischeri* Fxn 1. *FEMS Microb. Lett.* **145**, 457-461.
- Chang, V. 1998. Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **74**, 135-159.
- Christalopoulos, P., Nerinckx, M., Kekos, D., Macris, B. and Claeysens, M. 1996. Purification and characterization of two low molecular mass alkaline xylanase from *Fusarium oxysporum* F3. *J. Biotechnol.* **51**, 181-189.
- Clarke, J. Rixon, J., Ciruela, A., Gilbert, H. and Hazlewood, P. 1997. Family-10 and Family-11 xylanases differ in their capacity to enhance the bleachability of hardwood and softwood paper pulps. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**, 1277-183.
- Coughlan, M. and Hazlewood, G. 1993.  $\beta$ -1,4-D-Xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **12**, 259-289.
- De Blois, S. and Wiegel, J. 1995. Celulolytic vestiges of the xylanase activity in a new strictly xylanolytic, thermophilic *Clostridium* sp. *Biotechnol. Lett.* **17**, 89-94.
- Delgado, L. 1997. Efecto del pH sobre la producción de pectinasas en *Aspergillus* sp FP-180. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM.
- de Graaff, L., van de Broeck, H., van Ooijen, A., Visser, J. 1994. Regulation of the xylanase-encoding xlnA gene of *Aspergillus tubigensis*. *Mol. Microbiol.* **12**, 479-490.
- Debyser, W., Delvaux, F. and Delcour, A. J. 1998. Activity of Arabinoxylan Hydrolyzing Enzymes during Mashing with Barley Malt or Barley Malt and Unmalted Wheat. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 4836-4841.

- Degrassi, G., Okeke, B., Bruschi, C. and Venturi, V. 1998. Purification and Characterization of an Acetyl Xylan Esterase from *Bacillus pumillus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 789-792.
- de Vries, R. P. 1999. Accessory enzymes from *Aspergillus* involved in xylan and pectin degradation. Thesis. Landbouwniversiteit Wageningen. Netherlands. pp 2-22.
- Donagy, J. and McKay, M. A. 1997. Purification and characterization of a ferulil esterase from fungus *Penicillium expansum*. *J. Appl. Microb.* **83**, 713-726.
- Eerlingen, R., Van Haeseendonck, I., De Paepe, G. and Delcour, J. 1994. Enzyme-Resistant Strach. III. The Quality of Straight-Dough Bread Containing Varying Levels of Enzyme-Resistant Strach. *Cereal Chem.* **71**, 165-170.
- Egaña, L., Gutiérrez, R., Caputo, V., Peirano, A., Steiner, J. and Eyzaguirre J. 1996. Purification and characterization of two acetyl xylan esterase from *Penicillium purpurogenum*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **24**, 33-39.
- Eynard, L., Guerrieri, N. and Cerletti, P. 1995. Modification of starch during bakin: studied through reactivity with amyloglucosidase. *J. Cereal Chem.* **72**, 594-597.
- Fernández-Espinar, M., Piñaga F., Sanz, P., Ramón, D. and Vallés, S. 1993. Purification and characterization of a neutral endoxylanase from *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **113**, 223-228.
- Fernández-Espinar, M., Ramón, D., Piñaga, F. and Vallés, S. 1992. Xylanase production by *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **91**, 91-96.
- Fernández-Espinar, M., Vallés, S., Piñaga, F., Pérez-González, J. and Ramón, D. 1996. Construcción of an *Aspergillus nidulans* multicopy transformant for the xlnB gene and its use in purifying the minor X<sub>24</sub> xylanase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 338-341.
- Fishman, A., Berk, Z. and Shoham, Y. 1995. Large-scale purification of xylanase T-6. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 88-93.
- Foumier, R., Frederich, M., Frederich, R. and Reilly, P. 1985. Purification and characterization on Endo-xylanases from *Aspergillus niger*. III. An enzymes Active of pl 3.65. *Biotechnol. Bioeng.* **27**, 539-546.
- Frederick, M., Kiand, C., Frederich, R. and Reilly, P. 1985. Purification and craacterziattion on Endo-xylanases from *Aspergillus niger*. I. Two Isozymes Active on Xylan Backbones near Branch Points. *Biotechnol. Bioeng.* **27**, 525-532.
- Ganju, R., Vithayathil, P. and Murthy, S. 1989. Purification and characterization of two xylanase from *Chaetomium thermophile* var. *coprophile*. *Can. J. Microbiol.* **35**, 836-842.
- Gaspar, A., Cosson, T., Roques, C. and Thonart, PH. 1997. Study on the production of a xylanolytic complex from *Penicillium canescens* 10-10c. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **67**, 45-58.
- Gessesse, A. 1998. Purification and Propierties of two thermostable alkaline xylanase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3533-3535.

- Gessesse, A. and Gashe, A. B. 1997. Production of xylanase by an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolated from an alkaline soda lake. *J. Appl. Microb.* **83**, 402-406.
- Gessesse, A. and Mamo. 1998. Purification and characterization of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Micrococcus* sp AR-135. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 210-214.
- Gielkens, M.M. 1999. A molecular analysis of (hemi-)cellulose degradation by *Aspergillus*. Thesis. Wageningen University. Netherlands.
- Gilbert, H. and Hazlewood, G. 1993. Bacterial cellulases and xylanases. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 187-194.
- Gilkes, R. N., Henrissat, B., Kilburn, C. D., Miles, Jr. and Warren, J. 1991. Domains in Microbiology  $\beta$ -1,4- Glycanases: Sequence Conservation, Function, and Enzyme Families. *Microbiol. Rev.* **55**, 303-315.
- Gomes, D., Gomes, J. and Steiner, W. 1994. Factors influencing the induction of endo-xylanase by *Thermoascus aurantiacus*. *J. Biotechnol.* **33**, 87-94.
- Gorbacheva, I. and Radionova, N. 1977a. I. Purification and characterization of endo-1,4- $\beta$ -xylanase from *Aspergillus niger* str.14. *Biochim. Biophys. Acta.* **484**, 79-93.
- Gorbacheva, I. and Radionova, N. 1977b. II. Action pattern of endo-1,4- $\beta$ -xylanases from *Aspergillus niger* str. 14 on xylan and xylooligosaccharides. *Biochim. Biophys. Acta.* **484**, 94-102.
- Gosalbes, M., Pérez-González, J., González, R. and Navarro, A. 1991. Two  $\beta$ -Glycanase Genes are Clustered in *Bacillus polymyxa*: Molecular Cloning, Expression, and Sequence Analysis of Genes Encoding a Xylanase and an Endo- $\beta$ -(1,3) (1,4)-Glucanase. *J. Bacteriol.* **173**, 7705-7710.
- Gouka, J. R., Punt, R. and van den Hondel, C. 1997. Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**, 1-11.
- Harris, G. W., Pickersgill, R. W., Debeire, C., Touzel, J. P., Breton, C. and Perez, S. 1997. Structural basis of the properties of an industrially relevant thermophilic xylanase. *Proteins.* **29**, 77-86.
- He, H. and Hosney, R. 1992. Effect of the Quality of Wheat Flour Protein on Bread Loaf Volume. *Cereal Chem.* **69**, 17-19.
- He, L., Bickerstaff, G., Paterson, A. and Buswell, A. 1993. Purification and partial characterization of two xylanases that differ in hydrolysis of soluble and insoluble xylan fractions. *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 13-18.
- Hernández, A. M. 1995. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Himmel, M. E., Ruth, M. F. and Wyman, C. E. 1999. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 358-364.

- Hosehey, R. 1984. Functional Properties of Pentosans in Baked Foods. *Food Technol.* **38**, January, 114-117.
- Hu, Y.J. 1991 Cloning of a xylanase gene from *Fibrobacter succionogenes* 135 and its expression in *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* **37**, 554-561.
- Jaskari, J., Kontula, P., Siitonen, A., Jousimies-Somer, H., Mattila-Sandholm, T. and Poutanen, K. 1998. Oat  $\beta$ -glucan and xylan hydrolysates as selective substrates for *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**, 175-181.
- Jeong, k., Park, I., Kim, M. and Kim, S. 1998. High level expression of an endoxylanase gene from *Bacillus* sp. in *Bacillus subtilis* DB104 for the production of xylobiose from xylan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 113-118.
- John, M., Schmidt, B. and Schmidt J. 1979. Purification and some properties of five endo-1,4- $\beta$ -D-xylanases and a  $\beta$ -D-xylosidase produced by a strain of *Aspergillus niger*. *Can. J. Biochem.* **57**, 125-133.
- Joseleau, P. 1992. Chemical structure of xylans and their interaction in the plant cell walls. In *Xylan and xylanases. Progress in Biotechnology.* Ed. J. Visser. Elsevier Science Publishers B. V. Neetherlans. pp 81-95.
- Kadowaki, M., Souza, C., Simao, R. and Peralta, R. 1997. Xylanase Production by *Aspergillus tamaris*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **66**, 97-105.
- Kaneko, S., Arimoto M., Ohba, M., Kobayashi, H., Ishii T., Kusakabe, I. 1998a. Purification and Substrate Specificities of Two  $\alpha$ -L-Aranibofuranosidases from *Aspergillus awamori* IFO. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4021-4027.
- Kaneko, S., Ischi, T., Kobayashi, H. and Kusakabe, I. 1998b. Substrate Specificities of  $\alpha$ -Arabinofuranosidases Produced by Two Species of *Aspergillus niger*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 695-699.
- Ken, J., Wong, Y. and Sadler, J. 1992. *Trichoderma* xylanase, their properties and application. In *Xylan and xylanases. Progress in Biotechnology.* Ed. J. Visser. Elsevier Science Publishers B. V. Neetherlans. pp 171-185.
- Khanna, P., Sindari, S. and Kumar, J. 1995. Production, isolation and partial purification of xylanases from an *Aspergillus* sp. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 242-243.
- Kilunga, B., Suzuki, T., Horitsu, H., Kawai, K. and Takamizawa, K. 1994. Purification and characterization of *Aeromonas caviae* ME-1 Xylanase V, which produces exclusively xylobiose from xylan. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 531-535.
- Kitpreechavanich, V., Hayashi, M. and Nagai, S. 1984. Production of xylan-degrading enzymes by thermophilic fungi, *Aspergillus fumigatus* and *Humicola lanuginosa*. *J. Ferment. Technol.* **62**, 63-69.
- Koseki, T., Furuse, S., Iwano, K. and Matsuzawa, H. 1998. Purification and characterization of a Feruloyl esterase from *Aspergillus awamori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 2032-2034.

Krengel, U. and Dijkstra, M. B. 1996. Three-dimensional Structure of Endo-1,4- $\beta$ -xylanase I from *Aspergillus niger*: Molecular Basis for its Low pH Optimum. *J. Mol. Biol.* **263**, 70-78.

Kulkarni, N., Shendye, A. and Rao, M. 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanase. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**, 411-456.

Laemli, V. K. 1970. Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-685.

Leathers, T., Kurtzma, C. and Detroy, R. 1984. Overproduction and Regulation of Xylanase in *Aerobasidium pullulans* and *Cryptococcus albidus*. pp 2-24.

Lee, B., Pometto, A., Demirci, A. and Hinz, P. 1998. Media Evaluation for the Production of Microbiol Enzymes. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 4775-4778.

Loosveld, A., Maes, C., Grobet, P. and Delcour, J. 1998. Quantative and Qualitative Study of Arabinogalactan-Peptide during Bread Making. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 5026-5030.

Lowry, O., Rosebrowgh, N., Fair, N. and Randall, R. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **93**, 265-275.

Luonteri, E., Siika, M., Tenkanen, M. and Viikari, L. 1995. Purification and characterization of three  $\alpha$ -arabinosidases from *Aspergillus terreus*. *J. Biotechnol.* **39**, 279-291.

Maat, R., Roza, M., Verbakel, J., Stam, M.J., Santos da Silva, M., Bosse, M.R., Egmod, M. R. and Hageman, M. 1992. Xylanases an their application in bakery. In Xylan and xylanases. Progress in Biotechnology. Ed. J. Visser. Elsevier Science Publishers B. V. Neetherlans. pp 348-360.

Marques, s., Alves, L., Ribiero, S., Birio, F. M. and Amaral-Collaco, M. T. 1998. Characterización of a thermotolerant and alkalotolerant xylanase from a *Bacillus* sp. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **73**, 159-173.

Martín, M. and Hoseney, R. 1991. A mechanism of bread firming. II. Role of strach hydrolyzing Enzymes. *Cereal Chem.* **68**, 503-507.

McCleary, B. 1992. Measuremnet of endo-1,4- $\beta$ -D-Xylanase. In Xylan and xylanases. Progress in Biotechnology. Ed. J. Visser. Elsevier Science Publishers B. V. Neetherlans. pp 161-169.

Mendicuti, L. 1996. Comparación de los sistemas xilanólicos producidos a 37 y 45°C por *Aspergillus* sp. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.

Mendicuti, L., Trejo-Aguilar, B. and Aguilar, G. 1997. Thermostable xylanase produced at 37°C and 45°C by a thermotolerant *Aspergillus* strain. *FEMS Microb. Lett.* **146**, 97-102.

Milagres, A. and Prade, R. 1994. Production of xylanases from *Penicillium janthinellum* and its use in the recovery of cellulosic textile fibers. *Enzyme Microb. Technol.* **16**, 627-631.

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

- Miller, L. 1959. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
- Monfort, A., Blasco, A., Prieto, J. and Sanz, P. 1996. Combined expresion of *Aspergillus nidulans* endoxylanase X24 and *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amilase in Industrial Bakers yeasts and their use in bread making. *Appl. Env. Microbiol.* **62**, 3712-3715.
- Monfort, A., Blasco, A., Prieto, J. and Sanz, P. 1997. Construction of bakers yeast strains that secrete different xylanolytic enzymes and their use in bread making. *J. Cereal Sci.* **26**, 195-199.
- Monfort, A., Blasco, A., Sanz, P. and Prieto, J. 1999. Expresión of P1P1 and P1p2 genes from *Geotrichum* Species in Baker,s Yeast Starins and their Application to the Bread-Making. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 803-808.
- Montenecourt, 1981. *Comprehensive Biotechnology. The Principles, applications and regulantions of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicinal.* Ed Murray, Moo-Young. *The Principles. of Biotechnology: Enzymes Consideration. Assay of Industrial Microbiol Enzymes.* pp 330-351.
- Montes, M. 1998. Asilamiento, purificación y caracterización de las xilanasas de *Cellulomonas flavigena*. Tesis de doctorado. CINVESTAV-IPN.
- Morales, Pablo. 1999. Utilización de xilanasas de *Aspergillus* sp FP-470 para el mejoramiento de la calidad de panes elaborados con harinas de bajo potencial de panificación. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM.
- Nordberg, K., Bartonek, R. and Holst, O. 1998. Evidence for substrate binding of a recombinant thermostable xylanase originating from *Rhodothermus marinus*. *FEMS Microbiol. Letters.* **168**, 1-7.
- Orguela, Dairo J. H. 1998. DNA polimerasa 1 de maíz. Caracterización y estudio de composición. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM. pp 23-25.
- Parénicová, L. 1999. Pectinase of *Aspergillus niger*. A molecular and biochemical characterization. Thesis. Wageningen University. Netherlands. pp 2-14.
- Paridon van, A. P., Boonman, J., Selten, G., Geerse, C., Barug, D., de Bot, P. and Hemke, G. 1992. The Application of fungal Endoxylanase in Poultry Diets. In *Xylan and xylanases. Progress in Biotechnology.* Ed. J. Visser. Elsevier Science Publishers B. V. Neetherlans. pp 81-95.
- Peij, N. van. 2000. Transcriptional regulation of the xylanolitic enzyme sistem of *Aspergillus*. Thesis. Landbouwniversiteit Wageningen. Netherlands. pp 1-30.
- Petit-Benvegnen, D. M., Sauinier, L. and Rouau, X. 1998. Solubilization of Arabinoxylans from Isolated Water-Unextractibles Pentosans and Wheat Flour Doughs by Cell-Wall-Degrading Enzymes. *Cereal Chem.* **75**, 551-556.
- Picó, Y., Fémández, M., Rodríguez, R., Almudevér, J., Mañes, J., Font, G., Marín, R., Carda, C. and Ramón, D. 1999. Toxicological Assessment of Recombinant Xylanase X<sub>22</sub> in Wine. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1597-1602.

- Puls, J., Tenkanen, M. and Poutanen, K. 1990. Synergism in the hydrolysis of acetyl-4-O-methyl-Glucuronoxylan by xylanase, acetyl xylan esterase and  $\alpha$ -glucuronidase. Institute of Wood Chemistry. Leuchnerstr. 91 D.2050 Hamburg 80. pp 245-250
- Poutanen, K. 1988. An  $\alpha$ -arabinofuranosidase of *Trichoderma reesei*. J. Biotechnol. 7, 271-282.
- Poutanen, K. and Sudberg, M. 1988. An acetyl esterase of *Trichoderma reesei* and its role in the hydrolysis of acetyl xyans. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28, 419-424.
- Poutanen, K., Rättö, M., Puls, J. and Viikari. 1987. Evaluation of different microbial xylanolytic systems. J. Biotechnol. 7, 49-60.
- Poutanen, K. and Puls, J. 1988. Characteristics of *Trichoderma reesei*  $\beta$ -xylosidase and its use in the hydrolysis of solubilized xyans. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28, 425-432.
- Qi Si, J. and Hansen, T. 1995. The effect of lipase. Novo A-06394. Congress Spain, AIQS. pp 15.
- Ratanakhanokchai, K., Lay, K. and Tanticharoen, M. 1999. Purification and Properties of a Xylan-Binding Endoxylanase from Alcalophilic *Bacillus* sp. Strain K-1. Appl. Environ. Microbiol. 65, 695-697.
- Reid, I. and Paice, M. 1994. Biological bleaching of Kraft pulps by white-rot fungi and their enzymes. FEMS Microb. Lett. 13, 369-376.
- Renner, M. and Breznak, J. 1998. Purification and properties of Arfl, an  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase from *Cytophaga xylanolytica*. Appl. Environ. Microbiol. 64, 43-52.
- Riou, C., Freyssinet, G. and Fevre Michel. 1991. Production of Cell wall-degrading Enzymes by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. Appl. Environ. Microbiol. 57, 1478-1484.
- Roche, N., Desgranges, C. and Durand, A. 1994. Study on the solid-state production of a thermostable  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase of *Thermoascus aurantiacus* on sugar beet pulp. J. Biotechnol. 38, 43-50.
- Rodríguez, O. 1994. Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y producción de actividad xilanolítica extracelular en *Streptomyces* sp CH-M-1035. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Rodríguez, B. 1998. Algunos inductores de pectinasas en *Aspergillus* sp. FP-180. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM.
- Roels, S., Cleemput, G., Vandewalle, X., Nys, M. and Delcour, J. 1993. Bread Volume Potential of Variable-Quality Flours with Constant Protein Level as Determined by Factors Governing Mixing Time and Baking Absorption Levels. Cereal Chem. 70, 318-323.
- Rouau, X. and Moreau, D. 1993. Modification of some physicochemical properties of wheat flour pentosans by an enzyme complex recommended for baking. Cereal Chem. 70, 626-632.



- Royer, J.C. and Nakas, J.P. 1989. Xylanase production by *Trichoderma longibrachiatum*. *Enzyme Microb. Technol.* **11**, 405-410.
- Royer, J.C. and Nakas, J.P. 1990. Simple, Sensitive Zymogram Technique for Detection of Xylanase Activity in Polycrylamide Gels. *Appl. Environ. Microbiol.* **11**, 1516-1516.
- Sachslehner, A., Nidetzky, B., Kulbe, K. and Haltrich. 1998. Induction of Mannanase, Xylanase, and Endoglucanase Activities in *Sclerotium rolfsii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 594-600.
- Saha, B. and Bothast, R. 1998. Purification and characterization of a novel thermostable  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase from a color-variant strain of *Aureobasidium pullulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 216-220.
- Saha, B. and Bothast, R. 1999. Pretreatment and enzymatic saccharification of corn fiber. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **76**, 65-77.
- Sánchez, A. M. 1960. *Principios de Microbiología Industrial*. Editorial Química, S. A. México. pp 421.
- Sarker, K. D., Wilde, P. and Clark, D. 1998. Enhancement of Protein Foam Stability by Formation of Wheat Arabinoxylan-Protein Crosslinks. *Cereal Chem.* **57**, 493-499.
- Schmidt, M. J., Shimidt, J. 1979. Purification and some properties of five endo-1,4-beta-D-xylanase and a beta-D-xylosidase produced by a strain of *Aspergillus niger*. *Can. J. Biochem.* **57**, 125-134.
- Schrøder, M., Borch, S., Zargahi, M. and Rouau, X. 1999. Production of Substrate for Galactose Oxidase by Depolymerization of an Arabinogalactano-Peptide from Wheat Flour. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1483-1488.
- Serna, S. 1996. *Química del Almacenamiento e Industrialización de los Cereales*. Ed. AGT. Zaragoza, España. pp 229-245.
- Shei, J., Fratzke, A., Frederich, M., Frederick, J. and Reilly, P. 1985. Purification and characterization on Endo-xylanases from *Aspergillus niger*. II. An enzyme of pl 4.5. *Biotechnol. Bioeng.* **27**, 533-538.
- Simão, R., Souza, C. and Peralta, R. 1997. Induction of xylanase in *Aspergillus tamarii* by methyl  $\beta$ -D-xylosido. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**, 267-271.
- Stutzenberger, F. and Bodine, AB. 1998. Thermostable b-xylosidase from *Thermospora curvata*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 55-60.
- Sunna, A. and Antranikian, G. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* **17**, 30-67.
- Sunna, A., Puls, J. and Antranikian, G. 1996. Purification and characterization of two thermostables endo-1,4- $\beta$ -D-xylanase from *Thermotoga thermarum*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **24**, 177-185.

- Tenkanen, M., Poutanen, K. 1992. Significance of xylanase in degradation of xylans. In Xylans and xylanases. Progress in Biotechnology. Edited by J. Visser *et al.* Elsevier Science Publishers B. V. Neetherlans. pp 203-205.
- Tenkanen, M., Schuseil, J., Puls, J. and Poutanen, K. 1991. Production, purification and characterization of an esterase liberating phenolic acids from lignocellulosics. J. Biotechnol. **18**, 69-84.
- Thakur, I., Rana, B. and Johri, B. 1992. Multiplicity of xylanase in *Humicola grisea* var. *Thermoidea*. In Xylan and xylanases. Progress in Biotechnology. Edited by J. Visser. Elsevier Science Publishers B. V. Neetherlans. pp 511-522.
- Törrönen, A. and Rouvinen, J. 1997. Structural and functional properties of low molecular weight endo-1,4- $\beta$ -xylanases. J. Biotechnol. **57**, 137-149.
- Van Laere, M. K., Gedman, G., Voragen, J. A. 1997. A new arabinofuranohydrolase from *Bifidobacterium adolescentis* able to remove arabinosyl residues from double-substitute xylose units in arabinoxylan. Appl. Microbiol. Biotechnol. **47**, 231-235.
- Viikari, L., Ranua, M., Kantelinen, A., Linko, M. and Sundquist, J. 1996. Bleaching with enzymes. Proceedings of the 3<sup>rd</sup>. International Conferences on Biotechnology in Pulp and Paper Industry. Stockholm. pp 67-69.
- Villanueva, A., Ramón, D., Vallés, S., Lluch, M. A. and MacCabe, A. 2000. Heterologous expression in *Aspergillus nidulans* of a *Trichoderma longibrachiatum* endoglucanase of enological relevance. J. Agric. Food Chem. **48**, 951-957.
- Voragen, A., Gruppen, H., Verbruggen, M. and Viëtor, R. 1992. Characterization of cereal Arabinoxylans. In Xylan and xylanases. Progress in Biotechnology. Ed. J. Visser. Elsevier Science Publishers B. V. Neetherlans. pp 52-67.
- Wang, G., Maruardt, R., Xiao, H. and Zhang, Z. 1999. Development of a 96-Well Enzyme-Linked Solid-Phase Assay for  $\beta$ -Glucanase and Xylanase. J. Agric. Food Chem. **47**, 1262-1267.
- Wang, L., Miller, R. and Hosney, C.R. 1998. Effects of (1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Glucans of Wheat Flour on Breadmaking. Cereal Chem. **75**, 629-633.
- Wang, P., Clark, M. and Broda, P. 1993. Xylanase from *Streptomyces cyaneus*: their production, purification and characterization. J. Gen. Microbiol. **139**, 1987-1993.
- Watson, S. and Ramstad, P. 1987. CORN. Chemistry and Technology. American Association of Cereal Chemists, In. Sta Paul. Minnesota. USA. pp 575-590.
- Whitehead, T. and Lee, D. 1991. Cloning and comparison of xylanase genes from ruminal and colonic bacteroides species. Current Microbiol. **23**, 15-19.
- Wong, K., Tan, L. and Saddler, J. 1988. Multiplicity of  $\beta$ -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. Microbiol. Rev. **52**, 305-317.
- Wong, K. and Sadler, J. 1992. *Trichoderma* xylanases, their properties and application. In Xylan and xylanases. Progress in Biotechnology. Ed. J. Visser. Elsevier Science Publishers B. V. Neetherlans. pp 81-95.