



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE LA
BIOSINTESIS DE LAS ENDOXILANASAS DE
Streptomyces mexicanus sp. nov.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A

ANA LUISA RAMIREZ NUÑEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MA. ELENA FLORES CARRASCO



2004





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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Ramírez Núñez Ana
Luisa

FECHA: 11-Feb-2004

FIRMA: [Signature]

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Efecto de la fuente de carbono sobre la biosíntesis de las endoxilasas de **Streptomyces mexicanus** sp. nov."

realizado por Ana Luisa Ramírez Núñez

con número de cuenta 9339319-7 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario Dra. Ma. Elena Flores Carrasco.

[Signature]

Propietario Dr. Carlos Huitrón Vargas.

[Signature]

Propietario Dr. Pavel Petrosyan.

[Signature]

Suplente Biol. Silvia Gúzman Beltrán

[Signature]

Suplente Biol. Sara Teresa Méndez Cruz

[Signature]

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Consejo Departamental de Biología

[Signature]
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, bajo la dirección de la Dra. María Elena Flores Carrasco.

Este trabajo fue apoyado por el CONACYT a través del proyecto 34866-B

AGRADECIMIENTOS

A mis padres David Fco. Ramírez y Felicitas Núñez por su comprensión y apoyo en la realización de mis estudios.

Por el apoyo moral y consejos de mis hermanas: Diana, Lina y Carolina.

A la Dra. Ma. Elena Flores Carrasco por su amistad, ayuda y valiosos consejos en la realización de esta tesis.

Al Dr. Pavel Petrosyan, por su apoyo y amable disposición para resolver mis dudas.

Por su ayuda en la aportación de reactivos, el Dr. Carlos Huitrón y la Q.F.B. Rosalba Ruiz.

A mis compañeros de la carrera por su aliento y consejos.

A la señora Guillermina y el señor Eduardo por su atención y amable disposición en el laboratorio.

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	1
ABREVIATURAS.....	3
1. RESUMEN.....	4
2. INTRODUCCIÓN.....	5
3. ANTECEDENTES.....	7
3.1 Hemicelulosas	7
3.1.1 Xilano	8
3.2 Bagazo	10
3.3 Xilanasas	13
3.4 Regulación de la síntesis de las xilanasas	16
3.4.1 Inducción	16
3.4.2 Represión catabólica	19
3.4.2.1 Sistema PTS	21
3.5 Metabolismo de arabinosa, xilosa, sacarosa y ramnosa	25
3.5.1 Metabolismo de arabinosa	25
3.5.2 Metabolismo de xilosa	26
3.5.3 Metabolismo de sacarosa	27
3.5.4 Metabolismo de ramnosa	28
3.6 Estreptomicetos	30
3.6.1 <i>Streptomyces mexicanus</i> sp. nov.	31
4. HIPÓTESIS.....	32
5. OBJETIVOS.....	32
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
6.1 Microorganismo	33
6.2 Reactivos	33
6.3 Condiciones de cultivo	33
6.4 Obtención de enzimas	33
6.5 Ensayo enzimático	34
6.6 Cuantificación de proteína	34
6.7 Crecimiento de micelio	34
6.8 Preparación de medios	35
6.9 Electroforesis en poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y nativas	35
6.10 RBB-xilano.....	36

7. RESULTADOS	37
7.1 Inducción de las xilanasas de <i>S. mexicanus</i> sp. nov.	37
7.2 Represión de las xilanasas de <i>S. mexicanus</i> sp. nov.	43
8. DISCUSIÓN	48
9. CONCLUSIONES	51
10. BIBLIOGRAFÍA	52

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS**Página**

Tabla 1. Características generales de las familias 10 y 11 de las xilanasas	14
Tabla 2. Producción de las xilanasas por <i>S. mexicanus</i> sp. nov. crecido en diferentes fuentes de carbono.....	38
Tabla 3. Efecto de la fuente de carbono sobre la producción de las xilanasas por <i>S. mexicanus</i> sp. nov.	45
Figura 1. Modelo de la pared celular vegetal primaria	7
Figura 2. Estructura del xilano	9
Figura 3. Estructura de los tipos representativos de xilano en la naturaleza	11
Figura 4. Modelo hipotético de la regulación de los genes de xilanasas	18
Figura 5. PTS en <i>Escherichia coli</i>	23
Figura 6. Metabolismo de Arabinosa	26
Figura 7. Metabolismo de Xilosa	27
Figura 8. Metabolismo de Sacarosa	28
Figura 9. Metabolismo de Ramnosa	29
Figura 10. Morfología de <i>Streptomyces</i> spp.	30
Figura 11. Crecimiento de <i>Streptomyces mexicanus</i> sp. nov. en los azúcares inductores	38
Figura 12. Zimograma ND de los filtrados de 48 horas obtenidos en condiciones de inducción	39
Figura 13. Zimograma SDS de los filtrados de 48 horas obtenidos en condiciones de inducción	40
Figura 14. Electroforesis ND de las muestras de 48 horas obtenidas en condiciones de inducción y tñido para proteínas	41
Figura 15. Electroforesis SDS de las muestras de 48 horas obtenidas en condiciones de inducción tñido para proteínas	42

Figura 16. Electroforesis ND en presencia de RBB-xilano de las muestras obtenidas a las 48 horas en condiciones de inducción y teñido para proteínas.....	42
Figura 17. Electroforesis SDS en presencia de RBB-xilano de las muestras obtenidas a las 48 horas en condiciones de inducción y teñido para proteínas	43
Figura 18. Crecimiento de <i>S. mexicanus</i> sp. nov. en MM bajo condiciones de represión	44
Figura 19. Zimograma ND de los filtrados obtenidos a las 36 horas bajo condiciones de represión	45
Figura 20. Zimograma SDS de los filtrados obtenidos a las 36 horas bajo condiciones de represión	46
Figura 21. Electroforesis ND de las muestras concentradas y dializadas obtenidas bajo condiciones de represión y teñido para proteínas	47
Figura 22. Electroforesis SDS de las muestras concentradas y dializadas obtenidas bajo condiciones de represión y teñido para proteínas	47

INDICE DE ABREVIATURAS

Ara	arabinosa
Rha	ramnosa
Glc	glucosa
Gly	glicerol
RC	represión catabólica
PTS	sistema de transporte de fosfotransferasa
PEP	fosfoenol piruvato
FBF	fructosa 1,6-bifosfato
HPr	proteína estable al calor (heat-stable protein)
cAMP	AMP cíclico
CcpA	proteína de control catabólico
CRP o CAP	proteína receptora del AMPc
CREs	elementos de respuesta a catabolito

1. RESUMEN

El creciente interés en las últimas décadas por el empleo de fuentes baratas de energía (desechos agroindustriales), así como la disminución de sustancias contaminantes en el proceso de bioblanqueado del papel mediante el empleo de enzimas xilanolíticas, han motivado la búsqueda en una amplia gama de microorganismos que abarca bacterias, hongos y plantas. Siendo aquellas provenientes de microorganismos termófilos y mesófilos las de mayor importancia por cubrir los requerimientos del proceso industrial.

De estos microorganismos, los actinomicetos han emergido como una fuente importante de enzimas xilanolíticas que incluyen algunos miembros del género *Streptomyces*, los cuales producen endoxilanasas para la hidrólisis efectiva de heteropolisacáridos. Pocos estreptomicetos son capaces de producir estas enzimas libres de celulasas degradadoras de celulosa nativa o microcristalina, lo que representa una ventaja en su potencial empleo en la industria del bioblanqueado del papel.

Streptomyces mexicanus sp. nov. es un actinomiceto, libre de actividad celulolítica, que produce cuatro enzimas xilanolíticas extracelulares X_{145} , X_{120} , X_{60} y X_{45} . La actividad total de xilanasas es inducida en presencia de fuentes complejas de carbono y xilanos comerciales, así como por arabinosa, sacarosa y xilosa. Sin embargo, no se ha establecido si existe una diferencia en la regulación de la inducción de las diferentes xilanasas en *S. mexicanus* sp. nov.

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la presencia de L-arabinosa, sacarosa y ramnosa induce la síntesis de las xilanasas X_{240} y X_{120} . En este último azúcar se induce la síntesis de otras proteínas con actividad xilanolítica de aproximadamente 130 y 110 kDa. En geles bajo condiciones desnaturalizantes, se observó la presencia de las xilanasas X_{145} , X_{120} , X_{60} y X_{45} en todas las fuentes de carbono, excepto en xilosa que solo induce la síntesis de la X_{145} , X_{60} y X_{45} .

Al igual que la mayoría de los microorganismos, la síntesis de las xilanasas de *Streptomyces mexicanus* sp. nov. también está sujeta a represión catabólica por glucosa, además de otras fuentes de carbono como glicerol y xilosa.

2. INTRODUCCIÓN

Las paredes celulares de las plantas representan el mayor reservorio de carbono en la naturaleza, ya que éstas se encuentran constituidas principalmente por polímeros de: celulosa, hemicelulosa y lignina, los cuales pueden ser incorporados al ciclo del carbono mediante su degradación individual por diferentes microorganismos.

La hemicelulosa, segundo polisacárido más abundante en la naturaleza está constituido por glucanos, mananos, arabinanos y xilanos (Biely, 1993); de los cuales el xilano es el polímero predominante en la estructura de las hemicelulosas y por lo tanto el componente que se encuentra en mayor proporción en las paredes secundarias de las plantas. Éste consiste de una cadena principal de residuos de xilosa (xilosil) unidos por enlaces β -1,4. Esta cadena altamente polimerizada y ramificada puede contener residuos de L-arabinosa, ácido glucurónico, ácido ferúlico y acetilo entre otros, cuya frecuencia y composición depende de la fuente del xilano (Thomson, 1993; Joseleau *et al.*, 1992).

Debido a su heterogeneidad, la hidrólisis enzimática del xilano se lleva a cabo mediante la acción concertada de varias enzimas, dentro de las cuales, principalmente participan las endo- β -1,4-xilanasas (EC 3.2.1.8; endo-1,4- β -xilan xilanohidrolasa), que catalizan la hidrólisis de los enlaces β -1,4-D-xilosídicos para la producción de xilooligosacáridos, los cuales pueden actuar como potentes inductores de las xilanasas (Coughlan y Hazlewood, 1993).

El uso de las xilanasas se ha incrementado en los últimos años, convirtiéndose en un grupo importante de enzimas para la industria, debido a su empleo en diversas ramas como en el mejoramiento del forraje, en la extracción de goma de fibras (lino, yute, cáñamo), en la bioconversión de la lignocelulosa (material de desecho agroindustrial) a productos fermentativos; teniendo su mayor impacto en el bioblanqueado del papel (Beg *et al.*, 2001).

A pesar de este interés y los usos potenciales de las xilanasas, poco trabajo se ha realizado en la regulación individual de los genes involucrados en la biosíntesis de las enzimas xilanolíticas de los estreptomicetos (Subramaniyan y Prema, 2002), debido principalmente a que los genes expresados en huéspedes heterólogos no reflejan necesariamente la situación real del microorganismo de donde provienen; además de que la producción de diversas isoenzimas que degradan sustratos complejos, hace difícil caracterizar este fenómeno ejercido sobre las xilanasas (Whitehead y Hespell, 1990; Kulkarni *et al.*, 1999).

S. mexicanus sp. nov. es capaz de crecer tanto en fuentes de carbono simples (arabinosa, fructosa, xilosa) como complejas (xilano de birchwood, larchwood, avena), mostrando preferencia por las complejas (Flores *et al.*, 1996).

En trabajos previos se ha observado que la producción total de las xilanasas se afecta negativamente por la presencia de glucosa, glicerol y xilosa (Flores *et al.*, 1996).

Recientemente se separaron cuatro distintas xilanasas por electroforesis SDS-PAGE, con pesos moleculares aproximados de 145, 120, 60 y 45 kDa (Petrosyan *et al.*, 2002). Debido a que el efecto represor por la fuente de carbono se observó sobre la actividad total de xilanasas de *S. mexicanus* sp. nov., en el presente trabajo se estudió el efecto de represión catabólica e inducción por diferentes fuentes de carbono de cada una de las distintas xilanasas producidas por *S. mexicanus* sp. nov. crecido en bagacillo de caña.

3. ANTECEDENTES

3.1 Hemicelulosas.

La hemicelulosa, también conocida como poliosa, segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, es un polímero de reserva en semillas y es uno de los componentes estructurales más abundante en las paredes secundarias de las plantas (Pérez-Avalos *et al.*, 1996). En las paredes celulares se encuentra asociado con otros polímeros como son la celulosa y la lignina (Fig. 1). Estos tres polímeros, celulosa (fibras insolubles de β -1,4 glucano), hemicelulosa (polisacárido no celulósico) y lignina (estructura compleja de fenoles), constituyen el reservorio más grande de carbono en las paredes vegetales (Kosugi *et al.*, 2001).

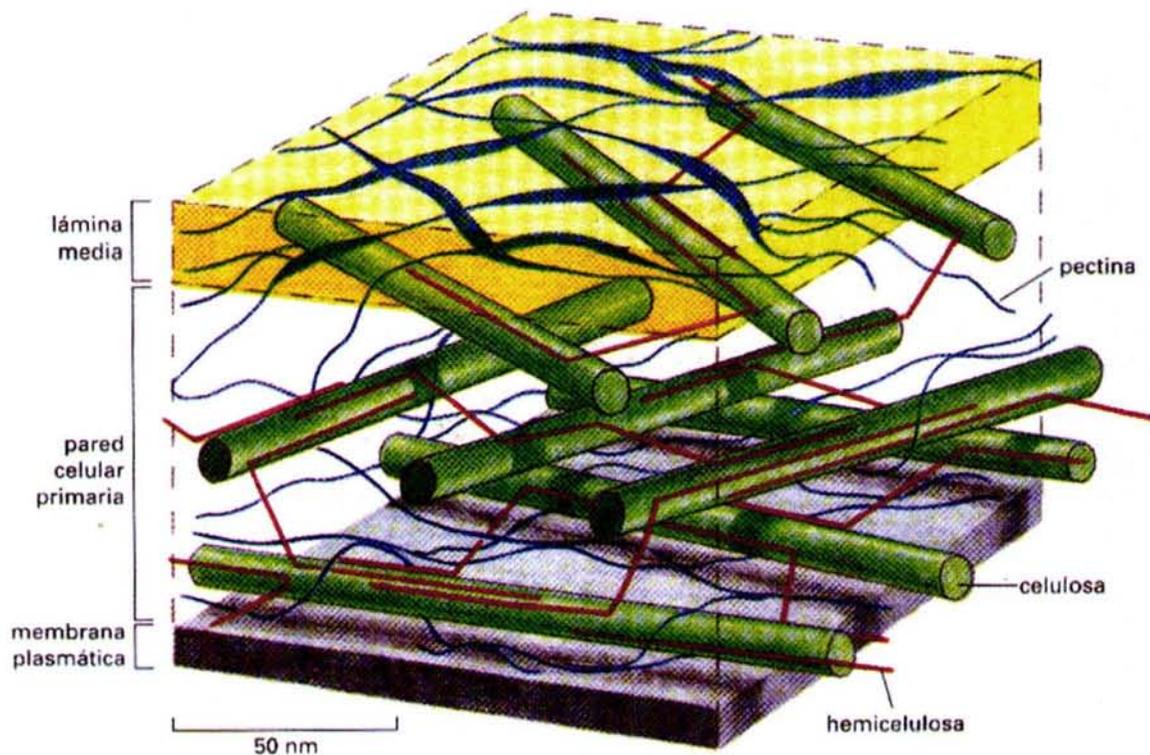


FIGURA 1. Modelo de una pared celular vegetal primaria que muestra las dos mayores redes de polisacáridos (celulosa en verde y hemicelulosa en rojo). (Alberts *et al.*, 1996).

En las paredes primarias de las plantas la hemicelulosa se asocia principalmente con pectinas y proteínas, mientras que en las paredes secundarias se asocia con lignina. Esta estrecha asociación (celulosa, hemicelulosa y lignina), funciona como una barrera mecánica contra la presión osmótica de las células vegetales y de defensa contra microorganismos patógenos. Esta composición heterogénea hace difícil su degradación y por lo tanto su incorporación rápida al ciclo del carbono (Trigo, 1994; De Vries, 1998; Tate III, 2000).

Las hemicelulosas no tienen una composición química homogénea ya que están constituidas por xilanos, arabinanos, galactanos, glucanos y mananos que además contribuyen a la textura de los tejidos vegetales (Fernández, 1994). Su composición varía entre las especies y depende del estado de diferenciación de la célula vegetal (Puls, 1992). Así, la hemicelulosa más abundante en la madera dura (dicotiledóneas) está parcialmente acetilada, en las maderas blandas o suaves (gimnospermas) se encuentran galactoglucomanos parcialmente acetilados y en las monocotiledóneas (maíz) predominan cadenas cortas de ácido glucurónico y residuos de arabinofuranosa. Aunque también se han aislado homoxilanos (contienen solo residuos de xilosa) de tallos del tabaco (Eda *et al.*, 1976), del pasto esparto (Chanda *et al.*, 1950) y de algas (Dekker y Richards, 1976), estos xilanos son poco comunes (Thomson, 1993 y Collins *et al.*, 2002).

La hemicelulosa constituye un 15 a 30 % de las paredes celulares en maderas duras, un 7-10% en maderas blandas y un 30% en las plantas anuales (caña, cáñamo, bambú, yute, etc.) (Collins, *et al.*, 2002). De todos los componentes de la hemicelulosa los xilanos son los más abundantes.

3.1.1 Xilano.

Los xilanos, son moléculas heterogéneas que consisten, en promedio, de 150 a 200 (Fig. 2) residuos de xilosa unidos mediante enlaces β -1,4. El xilano resulta ser el polisacárido renovable más abundante en la naturaleza (después de la celulosa), ya que constituye cerca del 20 al 30% del peso seco de los tejidos leñosos.

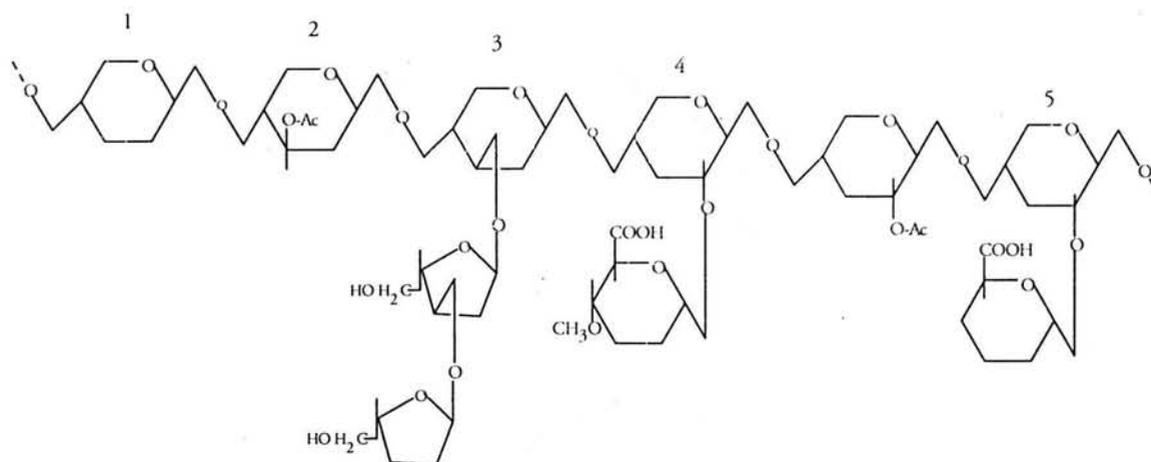


FIGURA 2. Estructura del xilano. 1. Xilosa; 2. Acetil xilosa; 3. α -L-arabinofuranosa; 4. 4-*O*-metil-D-ácido glucurónico; 5. Ácido D-glucurónico. (Thomson , 1993).

Este heteropolisacárido presenta gran variación en su composición y estructura que depende de su procedencia. Así, tenemos que el xilano de las maderas duras, con un alto grado de polimerización (cerca de 200 residuos de xilopiranosas) presenta cada siete residuos de la cadena principal de xilopiranosas, ácido 4-*O*-metilglucurónico unidos en el C₂ de la xilosa; aproximadamente cada 10 residuos tiene grupos acetil unidos al C₂ y C₃ ó en ambos, por lo cual también se le conoce como acetilmetilglucuronoxilano o xiloglucano (Coughlan y Hazlewood, 1993).

En las maderas blandas donde el grado de polimerización es >120-150 residuos de xilopiranosas, cada 7 residuos tienen sustituyentes de 4-*O*-metil ácido glucurónico en el C₂ y cada 8 ó 9 residuos se encuentra α -L-arabinofuranosa en el C₃; también es conocido como arabino-4-*O*-metilglucuronoxilano (Coughlan y Hazlewood, 1993).

El xilano de las gramíneas (pastos), con un grado de polimerización de 70 residuos de xilopiranosas, es también un arabino-4-*O*-metilglucuronoxilano, pero a diferencia del de las maderas suaves, éste se encuentra altamente ramificado cada 7 residuos con unidades de L-arabinofuranosil probablemente unidos en el C₂. Además pueden contener grupos *O*-acetil unidos en el C₂ o C₃, así como ácido fenólico y ácido *p*-cumárico.

La heterogeneidad de estas estructuras (Fig. 3) requiere la acción de varias enzimas hidrolíticas; dentro de las cuales las enzimas más importantes involucradas en la degradación del xilano son las endo-1,4- β -D-xilanasas (EC 3.2.1.8; 1,4- β -D-xilan xilanhidrolasa), las cuales actúan sobre la cadena principal hidrolizando los enlaces β -1,4 de los xilanos, arabinoxilanos y 4-metoxi-glucuronoxilanos (Lee *et al.*, 1993; De Vries, 2001).

3.2 Bagazo

Una fuente barata, accesible y renovable para el crecimiento de microorganismos productores de xilanasas, es el bagacillo de caña, el cual ha mostrado ser un excelente inductor no solo de xilanasas sino también de celulasas (Stutzenberger, 1994).

La industria azucarera tiene en México una gran importancia, tanto por el volumen de producción como por la cantidad y mano de obra que emplea (Quintero, 1990); la cual constituye la principal industria agrícola del país, ya que representa el 0.2% del producto interno bruto, generando cerca de 382 mil empleos directos y 1.9 millones de empleos indirectos (Madrid, 2001).

México es el octavo productor de azúcar en el mundo con una cosecha anual de caña en promedio de 5 millones de toneladas aproximadamente (Amorín, 2002), por lo que el bagazo de caña es un desecho agrícola importante en México (Bustos *et al.*, 2003), ya que su producción es 35 veces mayor que la del azúcar (Quintero, 1990).

El bagazo de caña o bagacillo, después de la extracción de la sacarosa, consiste de un 46-49% de celulosa, 25-27% de hemicelulosa y 20-22% de lignina (Stutzenberger, 1994) y un 9 % de sílice, grasas, ceras y cenizas (Berman *et al.*, 1972). Una parte es empleada directamente como combustible y forraje (Stutzenberger, 1994), mientras que la mayor parte es considerada como desecho agrícola (Simkovic y Laszlo, 1997; Martin *et al.*, 2002).

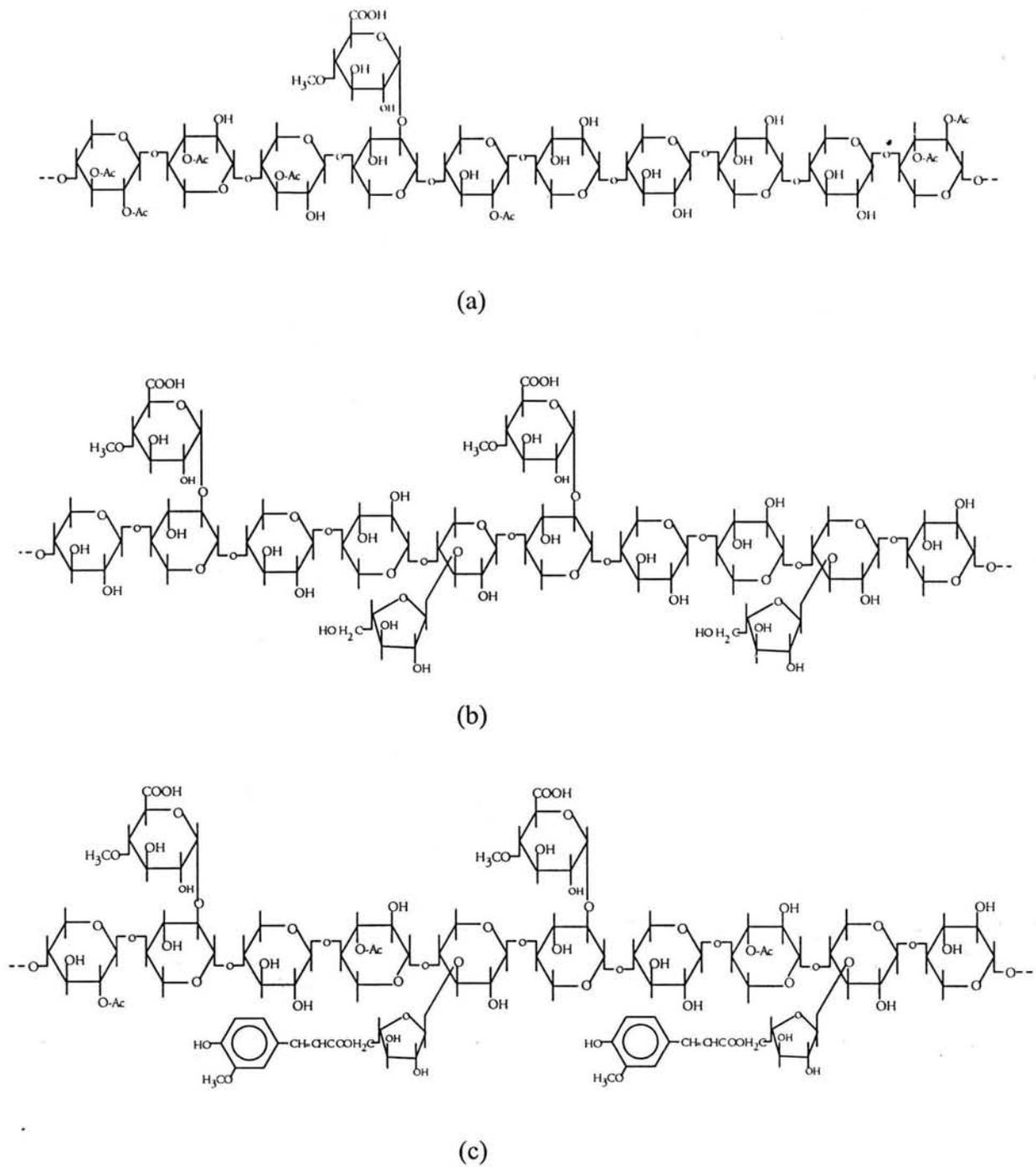


FIGURA 3. Composición típica de: (a) xilano de maderas duras (O-acetil-4-O-metilglucuronoxilano), (b) xilano de maderas blandas (arabino-4-O-metilglucuronoxilano), (c) xilano de gramíneas (arabino-4-O-metilglucuronoxilano). (Coughlan y Hazlewood , 1993).

Debido a que es una fuente rica de almacenamiento de carbono y además de ser altamente disponible y barato, el bagazo de caña tiene usos potenciales en la obtención de azúcares fermentables para la producción de energéticos como el etanol (Neureiter *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2002), en la remoción de tintes en aguas de desecho de la industria textil (Laszlo, 1996 y 1998; Baes *et al.*, 2002; Mohan y Singh, 2002; Orlando, 2002), en la obtención de xilosa y xilitol (Silva *et al.*, 2000; Bustos *et al.*, 2003), como sustrato para el cultivo de hongos como *Pleurotus ostreatus* etc. (Verma y Madamwar, 2002); por lo que hay una creciente investigación y desarrollo tecnológicos en proceso para mejorar y desarrollar nuevos procedimientos y lograr una obtención energética redituable.

Debido principalmente a la gran obtención de azúcares fermentables a partir del bagazo de caña, los estudios se han enfocado en el mejoramiento de métodos para su aprovechamiento como son la extracción alcalina, la hidrólisis ácida y el empleo de enzimas de microorganismos mesófilos y recientemente de termófilos (Stutzenberger, 1994; Kurakake *et al.*, 2001; Matin *et al.*, 2002; Bustos *et al.*, 2003; Haki y Rakshit, 2003).

Aunque los pre-tratamientos químicos del bagazo (Martín *et al.*, 2002), pueden incrementar la bioconversión, su elevado costo asociado en la recuperación de los químicos empleados hacen del empleo de enzimas una alternativa económicamente más factible (Stutzenberger, 1994; Ponce-Noyola y de la Torre, 2001).

Estudios indican que hay una gran variedad de microorganismos con la capacidad de biodegradar polímeros de alto peso molecular y tan heterogéneos como el bagazo. El empleo de éste, como única fuente de carbono para la producción de enzimas extracelulares termoestables, ha sido probada en hongos filamentosos, en levaduras como *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, (Pessoa *et al.*, 1997; Carvalho y Silva, 2002), en bacterias como *Bacillus termoalkalophilus* y *Cellulomonas flavigena* (Ponce-Noyola y de la Torre, 2001; Mayorga-Reyes *et al.*, 2002; Rajaram y Varma, 1990; Sridevi y Ajit, 1990) y en algunos actinomicetos como *Thermomonospora curvata* (Stutzenberger, 1994), el cual es un excelente productor de xilanasas.

El creciente interés por evitar la contaminación y el rápido crecimiento de la población, hará sin duda que los desperdicios celulósicos desempeñen un papel importante en la producción de biomasa, puesto que estos desechos agrícolas pueden servir como una fuente abundante y barata (Quintero, 1990).

3.3 Xilanasas.

Aunado a la amplia diversidad de estructuras del xilano, se encuentra la variedad de xilanasas con actividades hidrolíticas, propiedades fisicoquímicas y estructuras diferentes. Las xilanasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. La producción de xilanasas ha sido reportada en bacterias aerobias, anaerobias, mesófilas y termófilas (Gilbert, 1993; Sunna *et al.*, 1996), en hongos (Sunna y Antranikian, 1997), en actinomicetos (Ball y McCarthy 1989; Beg *et al.*, 2001), en levaduras (Hrmová *et al.*, 1984; Liu *et al.*, 1999) y en algunas plantas (Wu *et al.*, 2002). Son producidas principalmente por bacterias y hongos, por lo cual la mayoría de los estudios se han desarrollado en estos organismos (Biely, 1985; Lee *et al.*, 1993).

Estas enzimas generalmente son extracelulares, aunque algunas pueden estar asociadas a la célula. Sus pesos moleculares (M_r) van desde 11 000 a 85 000 daltones y su punto isoeléctrico (pI) de 3.6 a 10.3 (Coughlan y Hazlewood, 1993). Wong *et al.* (1988) clasificaron a las xilanasas con base a sus características fisicoquímicas (peso molecular y punto isoeléctrico), más que en sus propiedades catalíticas y notaron que muchas xilanasas tienen un patrón de peso molecular alto con pI bajo (proteínas ácidas) y otras con bajo peso molecular con pI alto (proteínas básicas), formando dos familias: la familia 10 (antes denominada F) y la familia 11 (antes G), correspondiendo las de alto peso molecular (>30 kDa) y bajo pI a la familia 10, mientras que las de bajo peso molecular (<30 kDa) y alto pI a la familia 11. Sin embargo hay excepciones a la regla, como es en la familia 8 donde las xilanasas tienen tanto peso molecular y pI altos (Collins *et al.*, 2002; Törrönen *et al.*, 1997). Las características de ambas familias se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Características generales de las familias 10 y 11 de las xilanasas.

FAMILIA 10	FAMILIA 11
- Masa molecular alta (>30 kDa)	- Masa molecular baja (< 30 kDa)
- pI ácido	- pI básico
- Estructura α/β (aproximadamente el 40% de su estructura secundaria es α - hélice)	- Estructura β (entre un 3-5% de su estructura es α -hélice)
- Pueden poseer otras actividades catalíticas (como actividad de endoglucanasa)	
- Hidrolizan los heteroxilanos eficientemente	- No hidrolizan los heteroxilanos eficientemente
- Versátiles catalíticamente	- Más específicas para la hidrólisis de xilano
- Baja especificidad por el sustrato (pueden hidrolizar otros enlaces como el β -1,3)	- Altamente específicas por el sustrato
- Requieren 2 residuos xilopiranosil no sustituidos para hidrolizar el sustrato	- Requieren 3 residuos no sustituidos para la hidrólisis del sustrato
- Retienen la configuración anomérica	- Retienen la configuración anomérica
- Mecanismo de doble desplazamiento	- Mecanismo de doble desplazamiento

(Subramaniyan y Prema, 2002; Georis *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 1998; Biely *et al.*, 1997; Törrönen *et al.*, 1997).

Otros sistemas de clasificación han sido propuestos como el de Henrissat (1991), que basándose en la homología de sus secuencias, trata de integrar sus características estructurales con sus características mecánicas. Hasta la fecha se han identificado 87

familias (Collins *et al.*, 2002). Así mismo, Sapag *et al.* (2002) a partir del análisis de las secuencias, clasifican a las xilanasas bacterianas en tres grupos: A, B y C. El grupo A contiene a los producidos por miembros de las familias *Actinomycetae* y *Bacillaceae*, los cuales son aerobios estrictos y Gram positivos. El grupo B y C contienen enzimas principalmente de bacterias anaerobias Gram positivas que usualmente habitan en el rumen (*Fibrobacter succinogenes*, *Butyrivibrio fibrisolvens*), mientras que las xilanasas de bacterias Gram negativas se encuentran en el subgrupo Ic del grupo I (Ascomicetos y basidiomicetos), porque se asemejan a las xilanasas fúngicas de 20 kDa y pH básico (Subramaniyan y Prema, 2002).

Otro carácter unificador en los primeros reportes sobre xilanasas es el énfasis que se hacía en sus implicaciones en la patogenicidad en plantas por parte de los organismos invasores. Solo a partir de 1980, su gran impacto ha sido probado en el área del bioblanqueado del papel; lo que ha llevado a su aplicación, no solo en la manufactura del papel, sino también en la extracción de aceites y pigmentos, en la mejora de la textura y volumen de cereales, en la mejora del forraje (para ganado vacuno, cerdos y pollos), en la extracción de goma de fibras como el rayón, lino, cáñamo y yute, en la obtención de combustible (etanol) a partir de desechos agroindustriales, en la clarificación de jugos y vinos; pero principalmente en el bioblanqueado de la pulpa del papel (Wong *et al.*, 1988; Biely, 1991; Thomson, 1993; Coughlan y Hazlewood, 1993; Subramaniyan y Prema, 2002).

Las enzimas, cuyas características fisicoquímicas las hacen más adecuadas para su empleo industrial han provenido de organismos termófilos y mesófilos principalmente; puesto que las bacterias termófilas tienen una temperatura óptima entre 65° - 80° C, además de su estabilidad a las condiciones alcalinas. Así mismo, el empleo de enzimas altamente termoestables, ofrece muchas ventajas en el manejo industrial puesto que se disminuye el grado de contaminación en el proceso.

Considerando temperatura, pH y termoestabilidad enzimática en los procesos industriales, la fuente de xilanasas generalmente empleada es de hongos filamentosos

(*Trichoderma reesei*, *Aspergillus sp.*, etc.) y bacterias termófilas (*Bacillus sp.*, *Thermonoanaerobacterium sp.*, *Thermomonospora fusca*, *Thermotoga sp.*, etc.). Sin embargo, los actinomicetos son un grupo que ha cobrado importancia y entre estos principalmente los estreptomicetos como una fuente importante de enzimas (Flores *et al.*, 1997, Kulkarni *et al.*, 1999).

3.4 Regulación de la síntesis de las xilanasas.

3.4.1 Inducción

Los organismos necesitan responder rápidamente a los cambios de su ambiente, ya que fluctuaciones en el suministro de nutrientes puede ocurrir en cualquier momento y su supervivencia depende de la habilidad para cambiar su asimilación de un sustrato a otro (Lehninger *et al.*, 1995; Lewin, 2000; Imriškova 2002).

Así, una bacteria evita la síntesis de enzimas de una vía metabólica en ausencia del sustrato pero está lista para producir las enzimas si éste aparece. La síntesis de enzimas en respuesta a la aparición de un sustrato específico es llamado inducción, la cual hace posible la economía del uso de energía metabólica, ya que se tendrán enzimas inducibles solamente cuando se necesiten. La inducción está ampliamente distribuida en bacterias y también ocurre en eucariontes unicelulares (levaduras) y vertebrados (Lewin , 2000).

Las xilanasas son enzimas generalmente inducibles, producidas en medios con xilano puro o residuos ricos en xilano (Beg *et al.*, 2001). Sin embargo, en algunos casos, puede haber síntesis constitutiva de éstas (Lachke, 1988; Matsuo y Yasui, 1988; Capalash *et al.*, 1991; Subramaniyan y Prema, 2002; Khanna y Gauri, 1993; Khasin *et al.*, 1993; Lindner *et al.*, 1994; Segura *et al.*, 1996). En general, se ha reportado que las xilanasas bacterianas son inducidas por xilano, xilosa y arabinosa, así como por sustratos celulósicos (Leathers *et al.*, 1986; Dobberstein y Emei, 1989; Kuhad *et al.*, 1998; Kesker, 1992; Puchart *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 2000; Beg *et al.*, 2001).

Se conocen inductores más potentes que el inductor natural para la síntesis de las xilanasas como los isómeros posicionales de la xilobiosa (Biely y Petráková, 1984; Hrmová 1989; Thomson, 1993) y aminoácidos (Ikura y Horikoshi, 1987), que incrementan la producción de las enzimas en bacterias. Por lo que es posible que otros compuestos activos puedan estar involucrados en la síntesis de las éstas (Coughlan y Hazlewood, 1993).

Los genes bacterianos que codifican para las enzimas que degradan el xilano se han encontrado adyacentes a los correspondientes a las celulasas (Kulkarni *et al.*, 1999; Oloni *et al.*, 2002), por lo que en un grupo de microorganismos, la producción de xilanasas generalmente está asociada a la síntesis de celulasas (Coughlan y Hazlewood, 1993). Sin embargo, en algunos hongos y bacterias esta síntesis asociada puede tener una inducción independiente, por lo cual, no hay un modelo uniforme de la regulación de la síntesis de las xilanasas en los microorganismos, y por lo tanto hasta ahora no ha sido completamente entendida (Biely, 1993; Coughlan y Hazlewood, 1993; Kulkarni *et al.*, 1999; Beg *et al.*, 2001). Por otro lado, esta síntesis asociada dificulta el estudio de la regulación de la síntesis de las xilanasas (Coughlan y Hazlewood, 1993) y por esto, se ha recurrido a modelos donde solo exista la síntesis de las xilanasas. Pocos microorganismos son capaces de producir xilanasas libres de celulasas (Flores *et al.*, 1997; Beg *et al.*, 2001), dentro de éstos encontramos algunos miembros del género *Streptomyces*. En organismos que producen más de una xilanasas, su regulación puede diferir, ya que pueden ser producidas primeramente por la inducción de xilano, y posteriormente por celulosa como en el caso de *Trichoderma reesei* (Coughlan y Hazlewood, 1993).

Poco trabajo se ha realizado en la expresión individual de los genes que codifican para las enzimas xilanolíticas; aunque se han expresado en huéspedes heterólogos, esto no es necesariamente un fiel reflejo de la situación real del organismo original; además de que los estudios sobre la regulación génica en organismos que producen múltiples xilanasas, son difíciles de determinar a nivel bioquímico (Rodríguez *et al.*, 1985; Béguin y Aubert, 1994; Thomson, 1993; Ponce-Noyola y de la Torre, 2001).

Generalmente se acepta que la inducción de la biosíntesis de las xilanasas ocurre por fragmentos de bajo peso molecular del xilano, formados por la acción de enzimas sintetizadas constitutivamente, ya sean extracelulares o unidas a la superficie de la célula (Sternberg y Mandels, 1979; Bastawade, 1992; Coughlan y Hazlewood, 1993; Wang *et al.*, 1992; Zhao *et al.*, 1997; Kulkarni *et al.*, 1999; Ratanakhanokchai *et al.*, 2002). Puesto que el heteropolisacárido administrado de manera soluble o insoluble es incapaz de penetrar en la célula y llevar a cabo la señalización de las enzimas correspondientes para su asimilación, los productos de su hidrólisis como la xilosa, xilobiosa, xilotriosa y oligosacáridos pueden entrar fácilmente y ser empleados como inductores y como fuente de energía para el crecimiento del organismo. Éstos pueden estimular la producción de las xilanasas para lo cual varias hipótesis se han planteado al respecto (Fig. 4; Wang *et al.*, 1992, Gomes *et al.*, 1994; Zhao *et al.*, 1997).

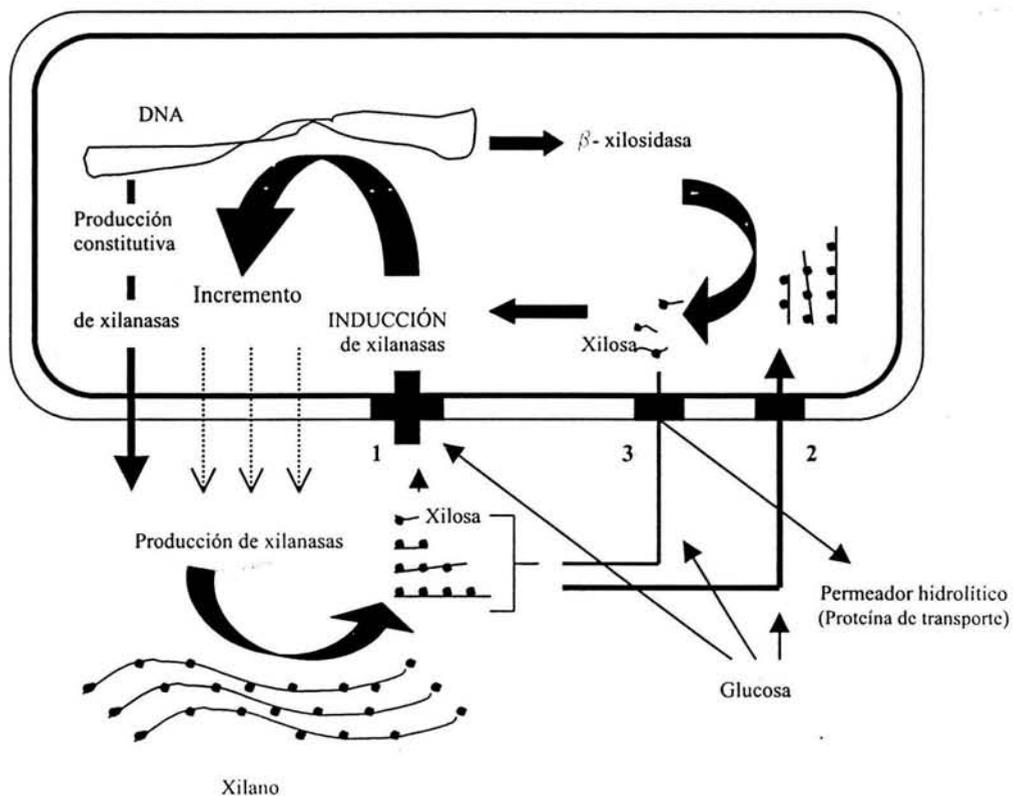


FIGURA 4. Modelo hipotético de la regulación de los genes de las xilanasas en bacterias, basado en los reportes de Wang *et al.*, 1992; Zao *et al.*, 1997 y Gomes *et al.*, 1994. (1) Los monómeros de xilosa pueden ser fácilmente transportados a través de la membrana celular, lo cual, induce e incrementa la síntesis de

xilanasas. (2) La acción de una producción constitutiva de xilanasas, da como resultado la producción de xilooligosacáridos por ejemplo xilotriosa y su transporte hacia la célula incrementa la síntesis. (3) El permeador hidrolítico puede transportar xilooligómeros mediante un transporte acoplado con la hidrólisis de estos (Subramaniyan y Prema , 2002).

En este modelo, la xilosa puede ser transportada por sistemas específicos e inducir la síntesis de xilanasas, mientras que las moléculas más grandes (xilooligómeros) tienen dos posibilidades: puede que sean transportados directamente al interior de la célula y ahí ser hidrolizados por otras enzimas (β -xilosidasas) y generar xilosa o bien, que estos xilooligosacáridos sean hidrolizados a monómeros durante su transporte a través de la membrana por una permeasa hidrolítica con acción $\text{exo-}\beta$ -1,4; ambas posibilidades provocan un incremento en la síntesis de xilanasas. Ambas vías tienen como resultado la formación de moléculas del inductor (xilosa u otras moléculas), las cuales incrementan la producción de las xilanasas. Sin embargo, en algunos casos se ha documentado que la xilosa reprime la producción de xilanasas, por lo cual el inductor puede ser otro compuesto derivado de la hidrólisis del xilano o depender de la concentración de xilosa (Rajaram y Varma, 1990).

3.4.2 Represión catabólica.

Se denomina represión a la disminución en la producción (expresión génica) de alguna enzima en respuesta a una señal molecular (Lewin, 2000).

La regulación mediada por algunas fuentes de carbono rápidamente asimilables como la glucosa, evita la expresión de otros genes necesarios para la utilización de alguna fuente de carbono alterna a la glucosa, a este fenómeno se le conoce como represión catabólica (RC) (Coughlan y Hazlewood 1993; Thomson, 1993; Hindle y Smith 1994; Saier *et al.*, 1995; Flores *et al.*, 1996; Kulkarni *et al.*, 1999; Imriškova 2002; Beg *et al.*, 2001; Subramaniyan y Prema, 2002; Rodríguez *et al.*, 2003).

Debido a que la glucosa es la fuente de energía celular preferida por su papel central en el metabolismo, el mecanismo regulador de la represión catabólica permite mantener reprimidos los genes implicados en el catabolismo de azúcares secundarios como arabinosa, lactosa, etc., en presencia de glucosa (Hindle y Smith, 1994; Lewin, 2000), evitando la producción de intermediarios metabólicos superfluos (Magasanick, 1961). Dependiendo del nutriente que la causa es el nombre que recibe; así se ha reportado represión catabólica por carbono (RC), por nitrógeno (RN), por fósforo (RP), etc. (Imriškova, 2002).

La RC se presenta en bacterias y microorganismos eucariontes y ha sido ampliamente estudiada en bacterias entéricas, principalmente en *E. coli* (Hindle y Smith, 1994). Varios sistemas de RC han sido identificados aunque poco comprendidos (Saier, 1992). Sin embargo, es claro que la RC de cualquier organismo es comúnmente ejercida por dos o más mecanismos reguladores, los cuales actúan en concierto para reprimir la transcripción de los genes de alguna vía metabólica (Hindle y Smith, 1994).

La represión catabólica por glucosa es un fenómeno observado en la biosíntesis de las xilanasas (Flores *et al.*, 1996; Kulkarni *et al.*, 1999). La represión catabólica de los genes de las xilanasas parece estar controlado por represión directa a nivel de la transcripción de los genes (Saier, 1992; De Graff *et al.*, 1994; De Vries, 1999; Kulkarni *et al.*, 1999; Imriškova 2000; Subramaniyan, 2002), y por exclusión del inductor a nivel de su transportador (permeasa) en la membrana celular (Subramaniyan *et al.*, 2002).

A pesar de que el fenómeno regulatorio de la represión catabólica por fuente de carbono fue descubierto en 1961 (Saier, 1992), a la fecha son pocos los mecanismos elucidados en procariontes, siendo en *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* los únicos bien establecidos (Saier *et al.*, 1995; Hindle y Smith, 1994; Liu *et al.*, 1998; Imriškova, 2002).

La RC en organismos Gram negativos, como *Escherichia coli*, se lleva a cabo por la unión de la proteína represora catabólica (CRP o CAP) asociado con el AMP cíclico (cAMP), en el promotor de los genes u operones sensibles a RC del DNA. Mientras que la represión catabólica en organismos Gram positivos (*Bacillus subtilis*) se lleva a cabo por la

unión de la proteína represora CcpA (catabolite control protein) junto con la HPr (heat stable protein), en secuencias específicas del DNA denominadas CRE (catabolite responsive element), evitando la transcripción de los genes sensibles a RC (Cho *et al.*, 1998).

En el género *Streptomyces*, el mecanismo de RC controla la expresión de otros genes como los involucrados en el transporte y empleo de fuentes alternas a la glucosa, en la síntesis de metabolitos secundarios y enzimas extracelulares (Parche *et al.*, 1999; Kamionka *et al.*, 2002). Aunque se conoce poco sobre el mecanismo de represión catabólica en miembros del género *Streptomyces* hay diferencias importantes con respecto al mecanismo de represión catabólica en *E. coli*. (Ingram *et al.*, 1995; Delic *et al.*, 1992).

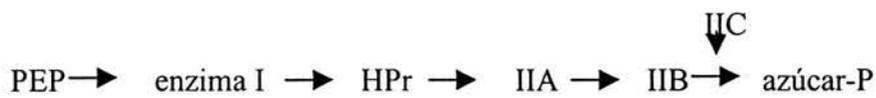
Por otro lado, en los microorganismos xilanolíticos, la represión por producto final (xilosa) ha sido observado en *Cryptococcus albidus* (Coughlan y Hazlewood, 1993) y en *Bacillus thermoalkalophilus* (Subramaniyan y Prema, 2002). Sin embargo, la xilosa no siempre reprime la síntesis, sino por el contrario actúa como inductor de las xilanasas en un amplio rango de bacterias (Subramaniyan y Prema, 2002); lo que implica un cambio en la expresión de los genes, que no solamente responden a las fuentes de carbono disponibles sino también a cambios morfológicos, producción de metabolitos secundarios y condiciones de estrés (Kamionka *et al.*, 2002).

3.7 Sistema PTS

El sistema de fosfotransferasa (PTS) es un complejo enzimático de transporte de carbohidratos a través de la membrana. Se encuentra en muchos organismos Gram positivos y Gram negativos (Deutscher *et al.*, 2002), le sirve al microorganismo como un sistema de quimiorrecepción y participa en diversos mecanismos regulatorios (Imriškova, 2002; Saier *et al.*, 1995). Desde su descubrimiento a principios de los años sesenta en *Escherichia coli* (Kunding *et al.*, 1964), la apreciación de su complejidad ha aumentado y a la fecha se conocen más de 20 carbohidratos diferentes que son transportados por este sistema (Postma *et al.*, 1993).

El sistema PTS generalmente consiste de dos enzimas solubles citosólicas, la enzima I (EI) y la proteína estable al calor (heat-stable protein, HPr); así como de un conjunto de enzimas específicas a cada carbohidrato (las enzimas II), las cuales son el sistema de transporte (permeasas) (Fig 5; Saier *et al.*, 1995; Postma *et al.*, 1993).

Cada permeasa contiene al menos tres dominios proteicos denominados, enzimas IIA (EIIA), IIB (EIIB) y IIC (Postma *et al.*, 1993; Saier y Reizer 1992; Deutscher *et al.*, 2002). Estas proteínas comprenden una cadena de fosforiltransferasas, que utilizan el fosfoenolpiruvato (PEP) como fuente de energía para el transporte y emplean el grupo fosfato para fosforilar el carbohidrato para su asimilación como sigue:



En este esquema las enzimas I, HPr, IIA y IIB son fosforiltransferasas de PTS, mientras que IIC es la permeasa que cataliza el transporte del azúcar a través de la membrana, así como la transferencia del grupo fosfato de la enzima fosforilada IIB al azúcar entrante (Saier *et al.*, 1995).

En *E. coli* este sistema controla el metabolismo de carbono, modulando la actividad de las permeasas de los carbohidratos que no son transportados por el sistema PTS (como simportes de azúcar-H⁺, azúcar-Na⁺) y de transportadores dependientes de ATP. Permitiendo a la célula utilizar los carbohidratos que son substratos de PTS preferentemente sobre los carbohidratos transportados por otros sistemas (Saier *et al.*, 1995; Imriškova, 2002).

Además de este papel en la regulación del transporte de carbohidratos, el sistema PTS de *E. coli* regula la expresión de los genes indirectamente a través de la adenilato ciclasa, enzima sintetizadora de AMP cíclico (cAMP). La concentración citoplasmática de cAMP y la proteína receptora de cAMP (CRP) modulan la expresión de cientos de operones catabólicos, cuya transcripción se activa únicamente si el complejo cAMP-CRP se une al DNA (Saier *et al.*, 1995; Imriškova, 2002).

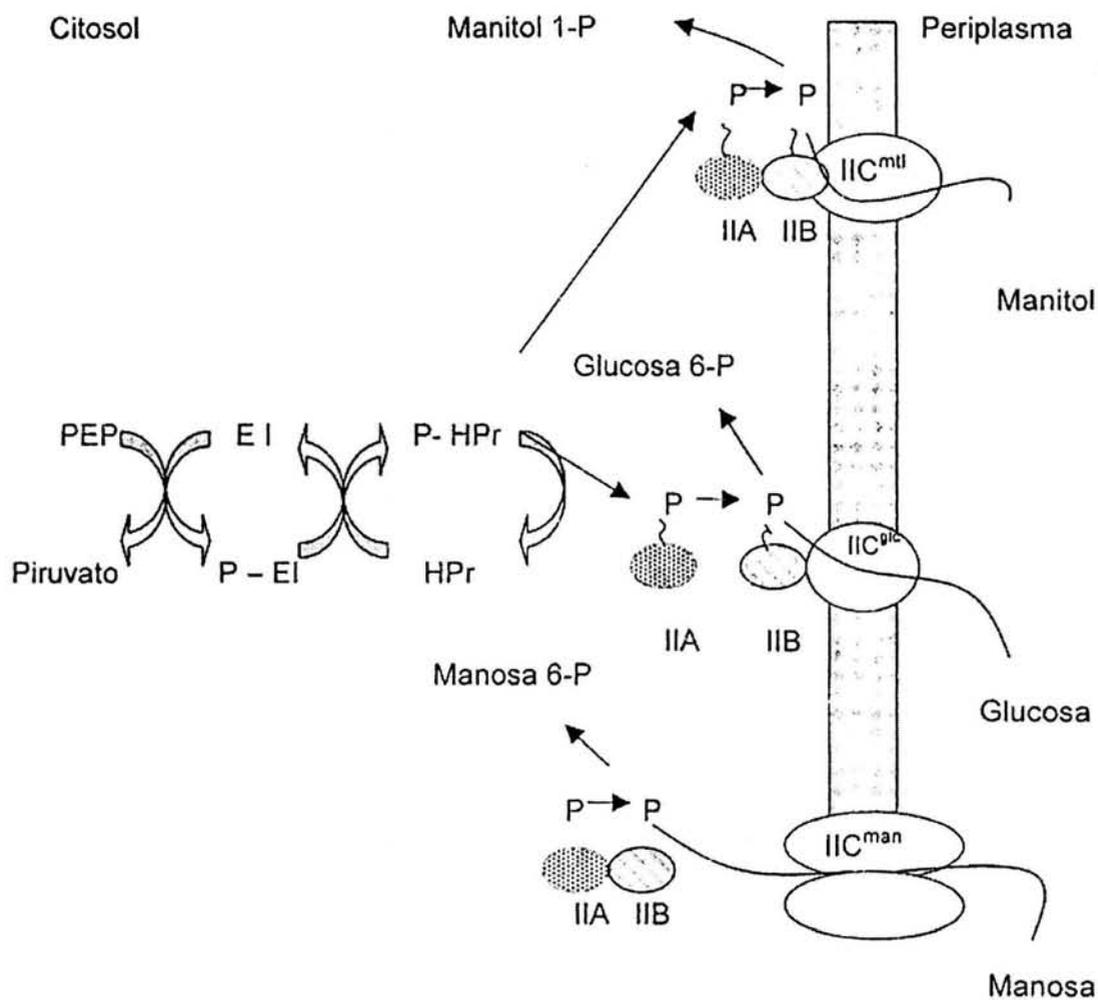


FIGURA 5. Sistema de PTS en *E. coli*. Las enzimas I, HPr, IIA y IIB son las fosfotransferasas y la IIC es una permeasa que cataliza la translocación del carbohidrato al citoplasma. Solo se muestran las enzimas IIC específicas para manitol (mtl), glucosa (glc) y manosa (man) (Postma *et al.*, 1993).

La enzima IIA específica para la translocación de la glucosa (IIA^{glc}), parece ser el efector alostérico que controla el mecanismo de RC, al unirse en su forma desfosforilada a algunas permeasas de otros carbohidratos (manitol, manosa, etc.) o a otras enzimas catabólicas. La enzima IIA, es reversiblemente fosforilada por la enzima I y HPr empleando PEP (Imriškova 2002; Saier *et al.*, 1995). En presencia de glucosa, la enzima IIA^{glc} se desfosforila transfiriendo el grupo fosfato a la enzima IIBC membranal y posteriormente a la glucosa, produciendo así glucosa-6-P. La IIA^{glc} desfosforilada inhibe alostéricamente la actividad de las permeasas de otros azúcares o enzimas catabólicas y

además desactiva a la adenilato ciclasa (Imriškova, 2002; Rosana-Ani *et al.*, 1999). La desactivación de esta enzima reduce la concentración de cAMP en el citosol e inhibe así la transcripción de los genes sensibles a represión catabólica (Saier *et al.*, 1995).

Organismos Gram positivos con bajo contenido en G-C como *Bacillus subtilis*, no sintetizan cAMP y carecen de CRP; consecuentemente el mecanismo de represión catabólica es diferente (Saier *et al.*, 1995). La regulación del empleo de las fuentes de carbono también esta mediada por el sistema PTS, aunque el mecanismo es diferente al de *E. coli*. La evidencia sugiere que la represión catabólica en *Bacillus subtilis*, está mediada por un factor de transcripción denominado proteína CcpA (proteína de control catabólico), homóloga a otras proteínas represoras en *E. coli* (Saier *et al.*, 1995). En este caso, la glucosa u otra fuente de carbono rápidamente metabolizable genera intermediarios metabólicos como la fructosa 1,6-bifosfato (FBF), el cual activa una HPr(Ser) cinasa y la enzima activada fosforila a HPr(Ser). La HPr (Ser-P) activa a CcpA uniéndose a ella e induce una conformación que tiene alta afinidad por secuencias en *cis*, conocidas como elementos de respuesta a catabolitos (CREs), localizadas en las regiones reguladoras de operones sensibles a RC. De esta manera el complejo FBF-HPr(Ser-P)-CcpA unido a las CREs inhibe el inicio de la transcripción (Imriškova, 2002).

Mientras que en bacterias Gram positivas con bajo contenido de G-C se han vislumbrado los posibles mecanismos involucrados en la regulación del metabolismo del carbono, no así en bacterias Gram positivas con alto contenido en G-C donde el metabolismo de carbono y su regulación es muy pobremente entendido (Nothaft, 2003).

En el género *Streptomyces* el sistema PTS fue reportado por primera vez en *S. coelicolor* en 1995 (Titgemeyer *et al.*, 1995). Los estudios realizados en *S. coelicolor* demostraron que los niveles de cAMP no varían con el cambio de la fuente de carbono (Hodgson, 1994) y no se ha identificado alguna proteína cinasa que sea capaz de fosforilar a la enzima HPr, esto sugiere que el mecanismo de RC en el género *Streptomyces* es diferente al que existe en *E. coli* y *B. subtilis* (Angell *et al.*, 1994; Nothaft *et al.*, 2003). En los estreptomicetos posiblemente la enzima glucosa cinasa dependiente de ATP tenga un

papel clave en la regulación de la RC (Hindle y Smith, 1994, Ingram *et al.*, 1995, Imriškova, 2002).

A diferencia de lo que se presenta en *E. coli*, el AMP cíclico parece no tener un papel importante en la represión por catabolito en *Streptomyces coelicolor* (Hodgson, 1982; Angell *et al.*, 1992; Delic *et al.*, 1992) y el sistema de transporte fosfotransferasa no está presente en *Streptomyces aureofaciens* (Novotna y Hostalek, 1985). Sin embargo en muchas especies de *Streptomyces* se requiere la glucosa cinasa para la represión por catabolito de algunos genes sujetos a RC (Ingram *et al.*, 1995). Además, datos recientes indican que especies de estreptomicetos poseen un PTS para intermediarios metabólicos (FBF), y no poseen el específico para glucosa (Nothaft, 2003), por lo cual el mecanismo de RC en el género *Streptomyces* no está claramente dilucidado.

3.5 Metabolismo de arabinosa, xilosa, sacarosa y ramnosa.

3.5.1 Metabolismo de Arabinosa.

Generalmente la mayoría de los azúcares presentes en los organismos se encuentran en su forma D, mientras que algunos se encuentran en la naturaleza en su forma L como es el caso de L-arabinosa (Lehninger, 1995).

La vía metabólica de la arabinosa, es una vía relevante para los microorganismos lignocelulósicos puesto que la L-arabinosa es uno de los principales componentes de estos materiales (Richard *et al.*, 2002).

La vía catabólica de la L-arabinosa en bacterias (*E. coli* y *B. subtilis*), después de entrar a la célula consiste de las enzimas L-arabinosa isomerasa (EC 5.3.1.4), ribulocinasa (EC 2.7.1.16) y la ribulosa fosfato 4-epimerasa (EC 5.1.3.4), las cuales convierten secuencialmente a la L-arabinosa en L-ribulosa, L-ribulosa-5-fosfato, y D-xilulosa-5-fosfato (Fig 6). La D-xilulosa-5-fosfato es posteriormente catabolizada a través de la vía de las pentosas (Sá-Nogueira y Mota, 1997; Kim *et al.*, 2002).

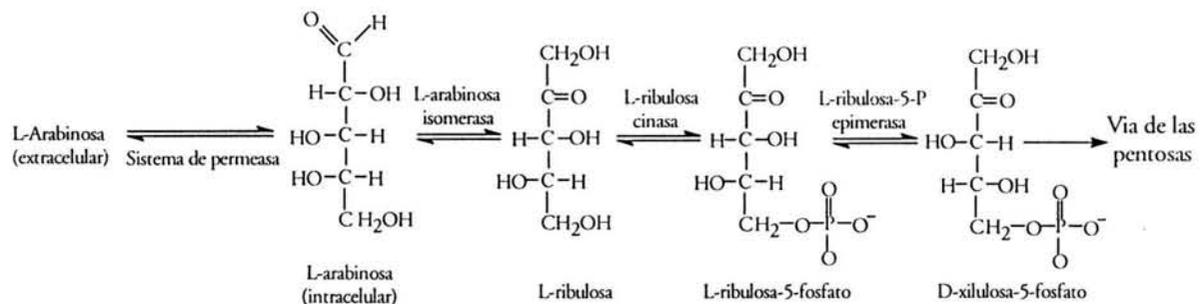


FIG. 6. Metabolismo de la L-arabinosa (Lehninger, 1995).

La síntesis de las tres enzimas responsables del catabolismo de la L-arabinosa han mostrado ser inducibles por L-arabinosa, y la actividad de la isomerasa se mostró que está sujeta a represión catabólica por glucosa y glicerol (Sá-Nogueira *et al.*, 1997).

3.5.2 Metabolismo de Xilosa

La D-xilosa es abundante en la naturaleza y muchas bacterias la emplean como fuente de carbono. Después de su transporte ya sea por un sistema simporte D-xilosa-H⁺ o D-xilosa-Na⁺ en *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus megaterium*, *Lactobacillus brevis*, *B. subtilis* o en otros microorganismos por un sistema de alta afinidad a la xilosa dependiente de ATP (Chaillou *et al.*, 1998 y 1999; Gárdonyi *et al.*, 2003), es metabolizada por dos enzimas intracelulares: D-xilosa isomerasa y la D-xilulosa cinasa. En hongos la D-xilulosa es subsecuentemente fosforilada por una xilulocinasa para formar D-xilulosa 5-fosfato, el cual es un metabolito de la vía de las pentosas (Fig. 7; Richard *et al.*, 2002; Johansson *et al.*, 2001).

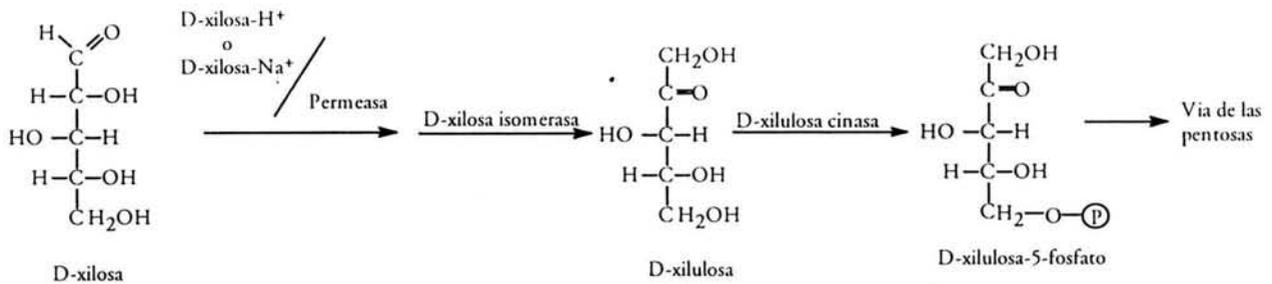


FIG. 7. Metabolismo de xilosa (Chaillou *et al.*, 1999; Richard *et al.*, 2002).

3.5.3 Metabolismo de la Sacarosa.

El disacárido sacarosa (azúcar de caña), funciona comúnmente como azúcar de reserva en semillas (Lehninger 1995). Su transporte en *E. coli* (no común), está ligado al sistema simporte azúcar-H⁺ (Muiry *et al.*, 1993). El disacárido es hidrolizado a sus componentes D-glucosa y D-fructosa por una sacarasa o invertasa. La D-glucosa es transformada a glucosa 6-P por una hexocinasa para ser catabolizada en la glucólisis, mientras que la D-fructosa puede ser fosforilada por la hexocinasa y transformarse en fructosa-6-P para incorporarse en la glucólisis. Sin embargo, generalmente entra en la glucólisis por una ruta diferente, donde la fructocinasa cataliza la fosforilación de la fructosa en el C-1 no en C-6, formando fructosa-1-fosfato, donde a continuación se hidroliza por la fructosa-1-fosfato aldolasa para formar gliceraldehído y dihidroxiacetona fosfato y ambos incorporarse en la glucólisis mediante su transformación en gliceraldehído-3-fosfato por las enzimas correspondientes, triosa cinasa y la triosa fosfato isomerasa, respectivamente (Fig. 8; Lehninger, 1995).

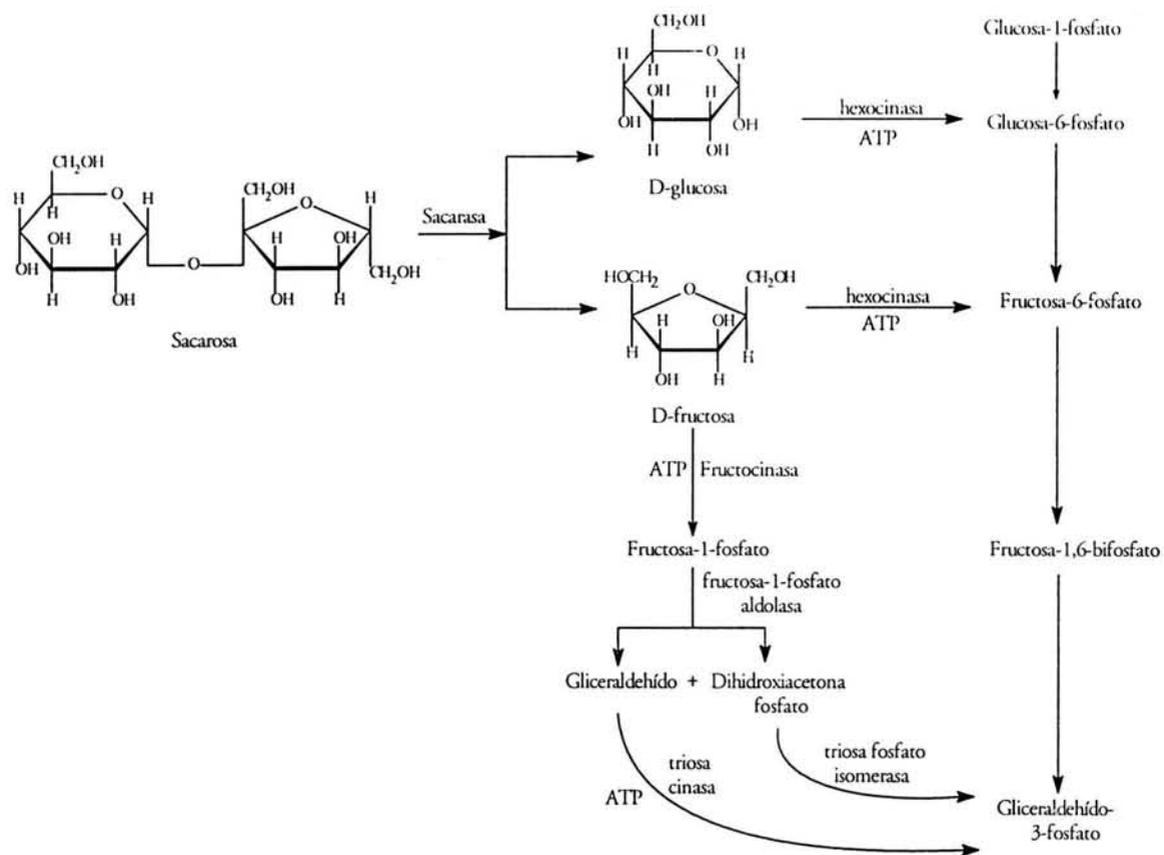


FIG. 8. Metabolismo de sacarosa (Lehninger, 1995).

3.5.4 Metabolismo de Ramnosa

E. coli y otras enterobacterias crecen en L-ramnosa como única fuente de carbono (Cooper, 1986; Lin, 1987). El transporte de L-ramnosa al igual que el de sacarosa se encuentra acoplado al gradiente electroquímico de protones (H^+) en la membrana (Nichols, 1982) y es seguido de su metabolismo por las enzimas citoplásmicas L-ramnosa isomerasa, L-ramnulosa cinasa y L-ramnulosa-1-fosfato aldolasa (Muiry *et al.*, 1993).

A partir de L-ramnulosa-1-fosfato se forman dihidroxiacetona fosfato y L-lactaldehído. La dihidroxiacetona formada es transformada a gliceraldehído 3-P y posteriormente a piruvato para formar acetilCoA y ser empleada en el ciclo de Krebs (Lehninger, 1995). El lactaldehído formado sigue dos vías dependiendo de la disponibilidad

de oxígeno. Bajo condiciones aerobias el aldehído es oxidado a L-lactato en una reacción irreversible catalizada por el NAD-lactaldehído deshidrogenasa y el L-lactato es posteriormente oxidado a piruvato por la deshidrogenasa. En condiciones anaerobias el L-lactaldehído es reducido a L-1,2-propanediol por la propanediol oxidoreductasa, donde el NADH es oxidado a NAD⁺ y el L-1,2-propanediol es excretado como producto de la fermentación (Fig. 9; Baldoma y Aguilar, 1988).

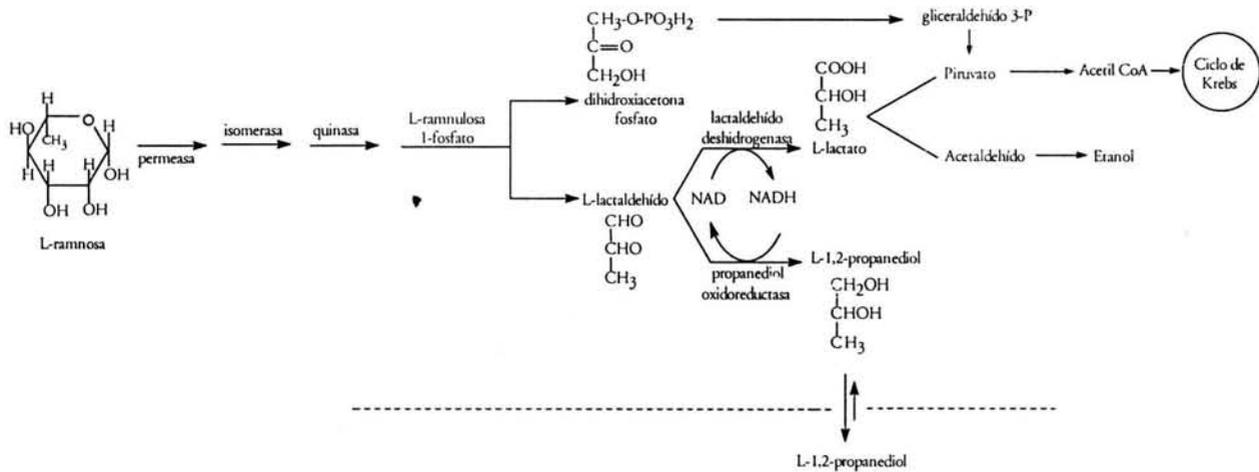


FIG. 9. Metabolismo de L-ramnosa (Baldoma y Aguilar, 1988)

3.6 Estreptomicetos.

Los actinomicetos (gr. *actis*, rayo y *mykes*, hongo) son un grupo de bacterias aerobias Gram positivas, forman filamentos o “hifas” que normalmente se fragmentan produciendo esporas y que presentan un alto contenido de G+C (69-78%) en su genoma (Gusek y Kinsella 1992; Lim *et al.*, 1998; Prescott *et al.*, 1999).

Los actinomicetos son habitantes del suelo ampliamente distribuidos en la naturaleza y pueden degradar grandes cantidades de compuestos orgánicos, por lo que son extremadamente importantes en la mineralización de la materia orgánica (carbono); además son productores de la mayoría de los antibióticos y pocos son patógenos para el hombre, animales y plantas. El género *Streptomyces* (Fig. 10) a menudo denominados estreptomicetos (gr. *streptos*, doblado o torcido y *myces*, hongo) es uno de los 102 constituyentes del grupo de los actinomicetos (Gusek y Kinsella, 1992; Hodgson, 2000; Ingraham *et al.*, 2000; Imriškova, 2002).



FIG 10. Micrografía electrónica de barrido de *Streptomyces* sp. Barra= 2 μ m.

(Prescott *et al.*, 1999)

Los estreptomicetos son los causantes del olor a “tierra mojada” ya que producen sustancias volátiles denominadas geosminas (Schrader y Blevins, 2001); pero son mejor conocidos por su capacidad de síntesis de una vasta cantidad de antibióticos (anfotericina B, cloramfenicol, eritromicina, neomicina, nistatina, estreptomicina, tetraciclinas, etc.). Debido a que son los habitantes del suelo más abundantes, son importantes en la degradación de pectina, lignina, quitina, queratina y compuestos aromáticos (Prescott *et al.*, 1999).

3.6.1 *Streptomyces mexicanus*.

Streptomyces mexicanus sp. nov. (anteriormente denominado *Streptomyces* sp. CH-M-1035; Flores *et al.*, 1996; Petrosyan *et al.*, 2003), es también un habitante del suelo, capaz de tener actividad xilanolítica libre de celulasas, haciéndolo muy atractivo para su empleo en el bioblanqueado del papel (Flores *et al.*, 1997). Las xilanasas producidas por este microorganismo son extracelulares y su síntesis se inicia desde las primeras horas de la fermentación. Presentan un pH y una temperatura óptimos de 5.0 y 60° C (Flores *et al.*, 1997).

En *S. mexicanus* sp. nov., la síntesis de las xilanasas en conjunto, es inducida por xilanos comerciales como el xilano de avena, de abedul y de lárice, así como por el bagacillo de caña y la cáscara de limón. Además la xilosa, la L-arabinosa y la sacarosa adicionadas al medio de cultivo como únicas fuentes de carbono permiten la síntesis de las xilanasas aunque en menor proporción que los compuestos poliméricos. Por otro lado, se ha demostrado que la adición al 1% de glucosa, glicerol, xilosa y de ácido succínico impiden la síntesis de las xilanasas (Flores *et al.*, 1996).

Actualmente se ha establecido por zimogramas que *S. mexicanus* sp. nov., produce principalmente cuatro diferentes xilanasas de pesos moleculares de 145, 120, 60 y 45 kDa (denominadas X₁₄₅, X₁₂₀, X₆₀ y X₄₅ respectivamente), aunque en ciertas condiciones pueden aparecer otras bandas menores. Las xilanasas de 145 y 60 kDa forman parte de una proteína de mayor peso molecular (240 kDa) que se observa en las electroforesis de poliacrilamida bajo condiciones no desnaturizantes (Petrosyan *et al.*, 2002).

4. HIPÓTESIS.

Los azúcares monoméricos y diméricos afectan la producción de las diferentes xilanasas sintetizadas por *Streptomyces mexicanus* sp. nov.

5. OBJETIVOS.

- ◆ Establecer la inducción de las diferentes xilanasas producidas por *S. mexicanus* sp. nov. por la adición de xilosa, sacarosa, ramnosa y arabinosa a través de zimogramas.

- ◆ Establecer el efecto negativo de glucosa, xilosa y glicerol sobre la síntesis de cada una de las diferentes xilanasas producidas por *S. mexicanus* sp. nov. a través de zimogramas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MICROORGANISMO.

Streptomyces mexicanus sp. nov. DSM 41796^T fue aislado de una muestra de suelo colectada de un campo de cultivo de caña de azúcar en el estado de Morelos (Flores *et al.*, 1997). Este microorganismo fue mantenido como suspensión de esporas en medio completo YEME (Hopwood *et al.*, 1985) con glicerol al 40% a -20°C .

6.2 REACTIVOS

El bagacillo fue obtenido de un ingenio del Estado de Morelos. La glucosa, xilosa, sacarosa, ramnosa, L-arabinosa y glicerol se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (USA). Así como el xilano de birchwood, el xilano de avena y el RBB-xilano (4-*O*-metil-D-glucorono-D-xilano-remazol azul brillante, xilano-RBB). Los extractos de levadura y de malta fueron obtenidos de Difco (USA).

6.3 CONDICIONES DE CULTIVO.

Para la producción de xilanasas, *S. mexicanus* fue cultivado en 500 ml de medio mínimo (KH_2PO_4 2 g L⁻¹, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4 g L⁻¹, pH 6.5), con la fuente de carbono respectiva contenidos en un matraz Fernbach e inoculados con 50 ml de micelio precrecido en medio completo YEME (Hopwood *et al.*, 1985). Para la inducción de las enzimas se adicionaron la xilosa, la sacarosa, la ramnosa y la arabinosa en lugar del bagacillo de caña a una concentración de 10 g L⁻¹. Para los experimentos de represión se adicionó glucosa, xilosa y glicerol a una concentración de 10 g L⁻¹ además de 10 g L⁻¹ del bagacillo de caña.

6.4 OBTENCIÓN DE ENZIMAS.

Los matraces se incubaron a 37°C con agitación de 200 rpm y se tomaron muestras en función del tiempo, las cuales se centrifugaron a 10 000 rpm a 4°C por 10 min. Se decantó el sobrenadante al cual se adicionó sulfato de amonio hasta un 95% de saturación.

Se separó el precipitado por centrifugación a 15 000 rpm a 4° C por 30 min y se resuspendió en el mínimo volumen de amortiguador de acetatos 0.1 M pH 5.0. Posteriormente se dializó en membranas Spectra/Por de 6-7000 D de tamaño de poro. En el dializado se midió la actividad xilanolítica total (método de Miller), contenido de proteína (método de Bradford) y se realizaron zimogramas en condiciones no desnaturalizantes (ND) al 6% y desnaturalizantes (SDS) al 8%, así como geles para tinción de proteínas (método del nitrato de plata) (Simon, 1996) y zimogramas con xilano-RBB.

6.5 ENSAYO ENZIMÁTICO.

La actividad de xilanasas se midió por la aparición de azúcares reductores, los cuales se cuantificaron por el método de Miller (1959). El ensayo de xilanasas contiene 200 µl de xilano de birchwood al 0.375 % (w/v) en amortiguador de acetatos 0.1M, pH 5.0 y 200 µl de enzima (50 y 100 µl), en un volumen total de 400 µl (variando solamente la cantidad de amortiguador y enzima). La mezcla se incubó a 50° C por 30, 60 y 90 seg y se paró la reacción con 1 ml del reactivo de DNS. Se colocaron los tubos en agua a ebullición (baño María) por 5 minutos, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se leyeron a 550 nm en un espectrofotómetro Shimadzu. Los valores obtenidos se interpolaron en una curva estándar de xilosa de 0 a 2 µmoles.

6.6 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA.

Para la determinación de proteína, se utilizó la técnica de Bradford (1976) con albúmina sérica bovina como estándar.

6.7 CUANTIFICACIÓN DE CRECIMIENTO DE MICELIO.

Para cuantificar el crecimiento de *S. mexicanus* sp. nov. se tomaron alícuotas de 5 ml de cada una de las fuentes de carbono, se centrifugaron a 3 000 rpm por 5 min y se decantó el

sobrenadante; el pellet fue diluido a (1:1) y (5:1) en agua destilada, para posteriormente leer a 540 nm en un espectrofotómetro Shimadzu.

6.8 PREPARACIÓN DE MEDIOS

A. CON REPRESORES:

Medio mínimo (MM) + las diferentes fuentes de carbono:

MM + bagacillo 1% (control)
MM + bagacillo 1% + glicerol 1% (v/v)
MM + bagacillo 1% + glucosa 1% (w/v)
MM + bagacillo 1% + xilosa 1% (w/v)

B. CON INDUCTORES:

MM + Arabinosa 1% (w/v)
MM + Sacarosa 1% (w/v)
MM + Rhamnosa 1% (w/v)
MM + Xilosa 1% (w/v)

6.9 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES Y NATIVAS.

Se prepararon los geles de poliacrilamida al 6% en condiciones no desnaturizantes y al 8% en condiciones desnaturizantes de acuerdo a la técnica reportada por Bollag *et al.* (1996) incluyendo xilano de avena al 0.1% (w/v), se corrieron a 120 V a 4° C, por 4 h. Después de correr la electroforesis, los geles ND al 6% y SDS al 8% se incubaron con agitación a 50° C en amortiguador de acetatos 0.1M pH 5.0 por 30-60 min. Posteriormente se lavaron con agua por 10 min, se tiñeron con Rojo Congo (1 mg mL^{-1}), se lavaron con cloruro de sodio 1 M y finalmente se colocaron en una solución de ácido acético al 5% (v/v). Las bandas de actividad de las xilanasas se observan como zonas claras sobre un fondo azul oscuro (Lee *et al.*, 1993).

6.10 RBB-xilano.

Para poder asignar bandas de actividad con bandas de proteína, los geles se prepararon con 0.2% (w/v) del xilano-remazol azul brillante (RBB-xilano). Al finalizar la electroforesis se incubaron los geles a 50° C en amortiguador de acetatos 0.1M, pH 5.0 con agitación suave hasta que se observaran las zonas de clarificación correspondientes a las xilanasas, las cuales se marcan con una espátula. Posteriormente se tiñeron las proteínas por el método de nitrato de plata (Bollag *et al.*, 1996). El RBB-xilano al 0.2% (w/v) fue disuelto en agua destilada y calentado a 60°-70°C, antes de mezclarse con la poliacrilamida (Biely *et al.*, 1985).

7. RESULTADOS

7.1 Inducción de las xilanasas de *Streptomyces mexicanus* sp. nov.

Streptomyces mexicanus es un microorganismo productor de un complejo multienzimático con actividad xilanolítica y se ha observado que la actividad total de xilanasas se induce por la presencia de diferentes azúcares de bajo peso molecular (Flores *et al.*, 1996). Como ya se mencionó anteriormente son cuatro las principales xilanasas con pesos moleculares de 145, 120, 60 y 45 kDa (denominadas X₁₄₅, X₁₂₀, X₆₀ y X₄₅ respectivamente), las cuales se pueden separar por electroforesis en poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE; Petrosyan *et al.*, 2002). Con objeto de establecer si existen diferencias en la inducción de las distintas xilanasas, *S. mexicanus* sp. nov. fue crecido en medio en medio mínimo con xilosa, ramnosa, L-arabinosa, y sacarosa como únicas fuentes de carbono, las xilanasas sintetizadas fueron separadas por ND- y SDS-PAGE.

En principio se observó que este microorganismo fue capaz de crecer en todas las fuentes de carbono mencionadas pero con diferentes velocidades de crecimiento. *S. mexicanus* sp. nov. creció exponencialmente durante las primeras 24 horas en estas fuentes de carbono, a excepción de la sacarosa donde sigue creciendo hasta las 48 horas (Fig. 11). La mayor cantidad de biomasa se obtuvo en bagacillo de caña y arabinosa, mientras que en xilosa y ramnosa el crecimiento fue intermedio y el más bajo se obtuvo en sacarosa.

La producción de xilanasas se muestra en la tabla 2, donde se puede observar que la mayor producción se obtuvo a las 48 horas en todas las condiciones utilizadas y la mayor inducción ocurrió en bagacillo de caña que es un residuo que contiene xilano, después en arabinosa, ramnosa y xilosa; en sacarosa no se detecta actividad xilanolítica, probablemente por una baja cantidad de enzima producida. Debido a que obteníamos actividades muy bajas en los filtrados obtenidos del cultivo de *S. mexicanus* sp. nov. crecido en los azúcares monoméricos, era difícil detectar las bandas de actividad en las electroforesis, por ello, se decidió concentrar la proteína por precipitación con sulfato de amonio, cuantificar la actividad y correr los geles ajustando la alícuota por actividad en los zimogramas y por proteína en los geles de tinción para proteína.

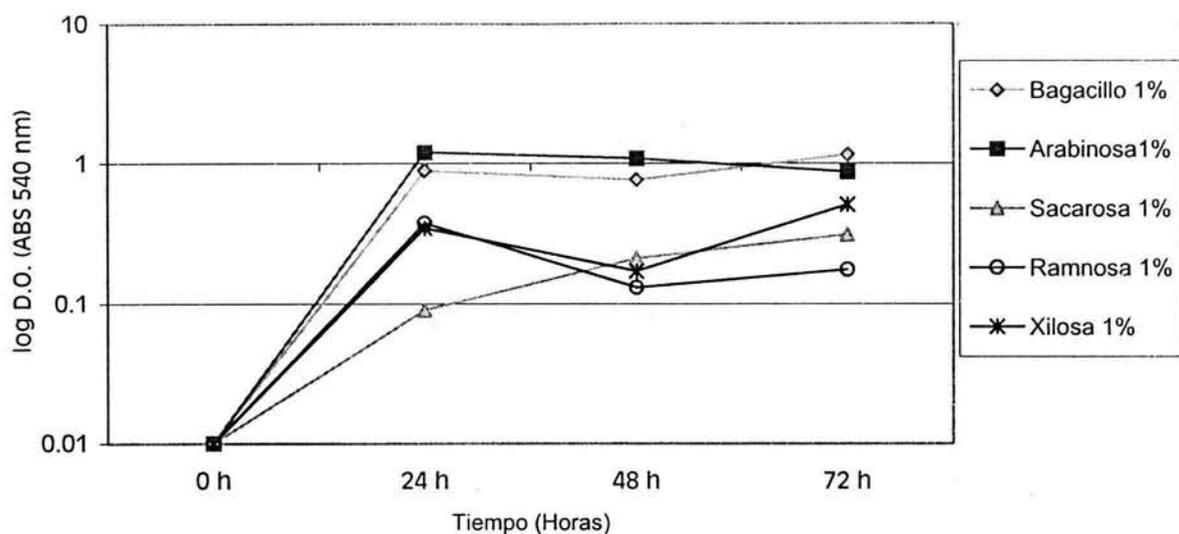


FIG. 11. Perfiles de crecimiento de *S. mexicanus* sp. nov. en MM con las fuentes de carbono indicadas. Crecimiento de micelio en inductores de xilanasas. Las condiciones utilizadas fueron las descritas en materiales y métodos.

TABLA 2. Producción de las xilanasas por *S. mexicanus* sp. nov. crecido en diferentes fuentes de carbono.

Fuente de carbono	Actividad volumétrica ($\mu\text{moles ml}^{-1} \text{min}^{-1}$)		
	24 h	48 h	72 h
Control (Bagacillo de caña 1%)	1.3	3.6	2.8
L-arabinosa 1%	0.57	0.83	1.26
Ramnosa 1%	0	1.2	0
Sacarosa 1%	0	0	0
Xilosa 1%	0.58	0.46	0.54

*El microorganismo fue cultivado de acuerdo a las condiciones establecidas en material y métodos.

En la figura 12 se presenta el zimograma en condiciones nativas (ND) de las muestras concentradas para cada uno de los filtrados obtenidos y se puede observar que en todos los azúcares a excepción de xilosa, se obtuvieron las xilanasas X₂₄₀ y X₁₂₀, aunque en ramnosa la intensidad de la banda de X₁₂₀ es mayor que en las otras condiciones con respecto a la X₂₄₀. En xilosa se observó únicamente la banda correspondiente a la X₂₄₀.

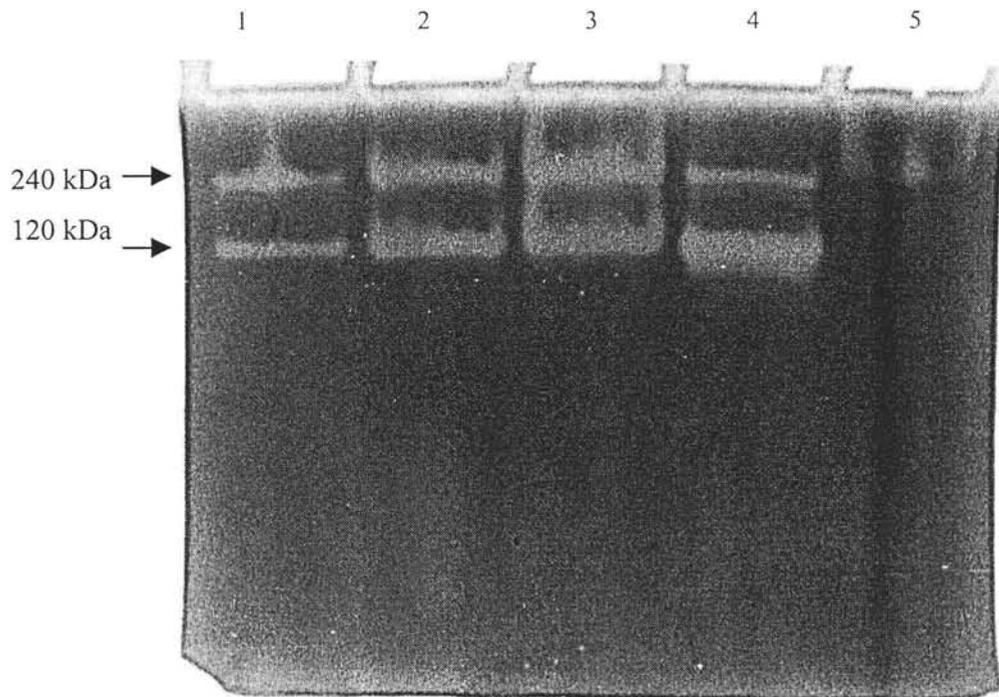


FIG. 12. Zimograma ND de las xilanasas producidas a las 48 horas por *S. mexicanus* sp. nov. cultivado en las diferentes fuentes de carbono. Carril 1, bagacillo de caña; carril 2, arabinosa; carril 3, sacarosa; carril 4, ramnosa y carril 5, xilosa.

En el zimograma en condiciones desnaturizantes (SDS; Fig. 13), se observaron principalmente las bandas de actividad correspondientes a las xilanasas X₁₄₅, X₁₂₀, X₆₀ y X₄₅ en el control con bagacillo, en arabinosa, sacarosa y ramnosa. En xilosa, únicamente se observaron las bandas de 145, 60 y 45 kDa muy tenues. En estas condiciones desnaturizantes se obtuvieron además otras bandas de actividad de 130 y 110 kDa aproximadamente, que pudieran ser proteínas generadas por proteólisis o son xilanasas que se producen pero en muy baja cantidad y al tener las muestras concentradas se pueden detectar. Aún así se presentan con diferente intensidad dependiendo de la fuente de carbono

utilizada. Hay que mencionar que en las fotografías de los geles no se logró el mayor contraste y por lo tanto no se distinguen claramente las bandas.

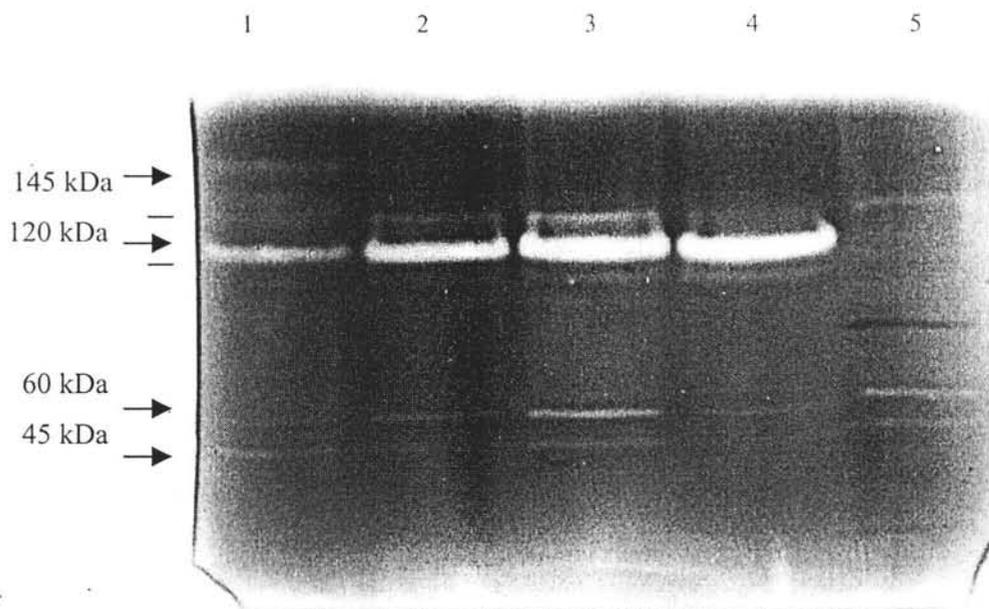


FIG. 13. Zimograma SDS de las xilanasas producidas a las 48 horas por *S. mexicanus* sp. nov. cultivado en las diferentes fuentes de carbono. Carril 1, bagacillo de caña; carril 2, arabinosa; carril 3, sacarosa; carril 4, ramnosa y carril 5, xilosa.

Las mismas muestras se corrieron en geles de poliacrilamida nativo y con SDS a la misma concentración para teñirlos para proteína por el método de nitrato de plata. Los resultados se muestran en las figuras 14 y 15 para los geles no desnaturizantes y con SDS, respectivamente y se puede observar que en cada una de las fuentes de carbono se sintetizan diferentes proteínas, siendo en xilosa, la fuente de carbono en la que menos se producen, aunque hay algunas proteínas que se observan en todas las condiciones. En los geles con SDS, tal como se esperaba no se observan las proteínas de mayor peso molecular y se observan otras bandas, siendo otra vez los patrones característicos para cada una de las fuentes de carbono.

Ya que en estas condiciones fue difícil asignar bandas de actividad con bandas de proteínas se prepararon geles con xilano remazol azul brillante, el cual permite observar bandas de actividad de xilanasas como zonas de clarificación sobre fondo azul, las cuales se

marcaron y a su vez se pueden teñir estos mismos geles con la técnica de plata. Los resultados se muestran en las figuras 16 y 17. Como se puede observar para la X_{240} no se logra detectar la banda de proteína bajo estas condiciones, mientras que para la X_{120} sí se detecta la proteína correspondiente. Es importante remarcar que en xilosa no se observa ni zona de actividad ni proteína para esta xilanasas, lo que podría sugerir que no se está sintetizando esta enzima en este azúcar.

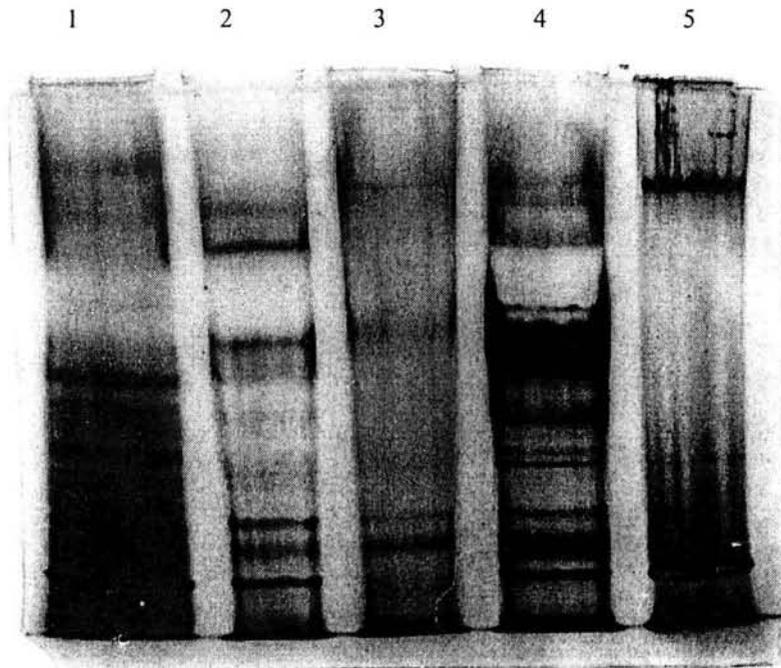


FIG. 14. Patrones de proteínas en ND-PAGE teñidas por el método de nitrato de plata, producidas a las 48 horas por *S. mexicanus* sp. nov. en cada una de las fuentes de carbono utilizadas al 1 %. Carril 1, bagacillo de caña; carril 2, arabinosa; carril 3, sacarosa; carril 4, ramnosa y carril 5, xilosa.

En los geles con SDS nuevamente se marcaron las zonas de clarificación correspondientes a las xilanasas sintetizadas y en este caso sí se detectaron las proteínas que presentan esta actividad (Fig. 17). También se puede observar que las bandas de proteína asignadas a cada una de las xilanasas varían en intensidad en los diferentes azúcares, correlacionando esto con la producción total de xilanasas.

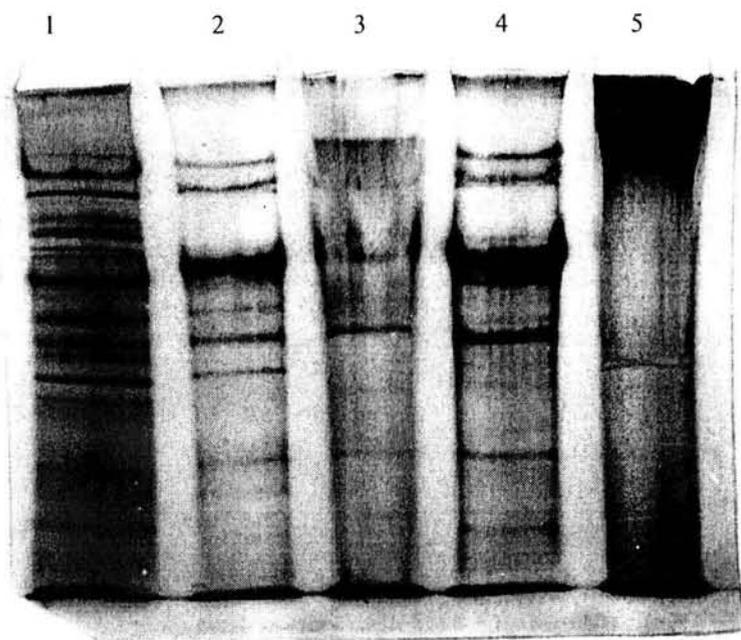


FIG. 15. Patrones de proteínas en SDS-PAGE teñidas por el método de nitrato de plata, producidas a las 48 horas por *S. mexicanus* sp. nov. en presencia de los diferentes azúcares utilizados al 1%. Carril 1, bagacillo de caña; carril 2, arabinosa; carril 3, sacarosa; carril 4, ramnosa y carril 5, xilosa.

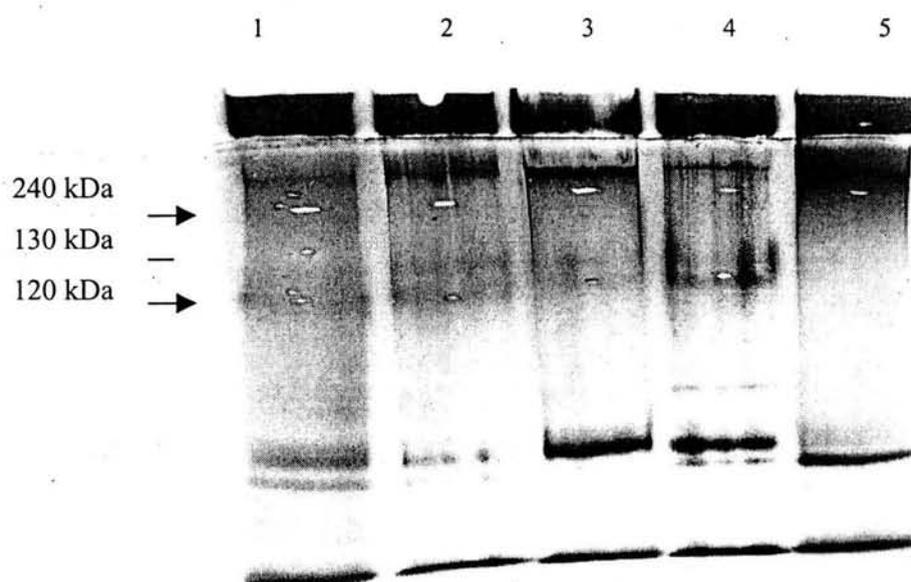


FIG. 16. Patrones de proteínas en ND-PAGE con RBB-xilano y tenidos por el método de nitrato de plata, producidas a las 48 horas por *S. mexicanus* sp. nov. en presencia de los diferentes azúcares utilizados al 1%. Carril 1, bagacillo de caña; carril 2, arabinosa; carril 3, sacarosa; carril 4, ramnosa y carril 5, xilosa.

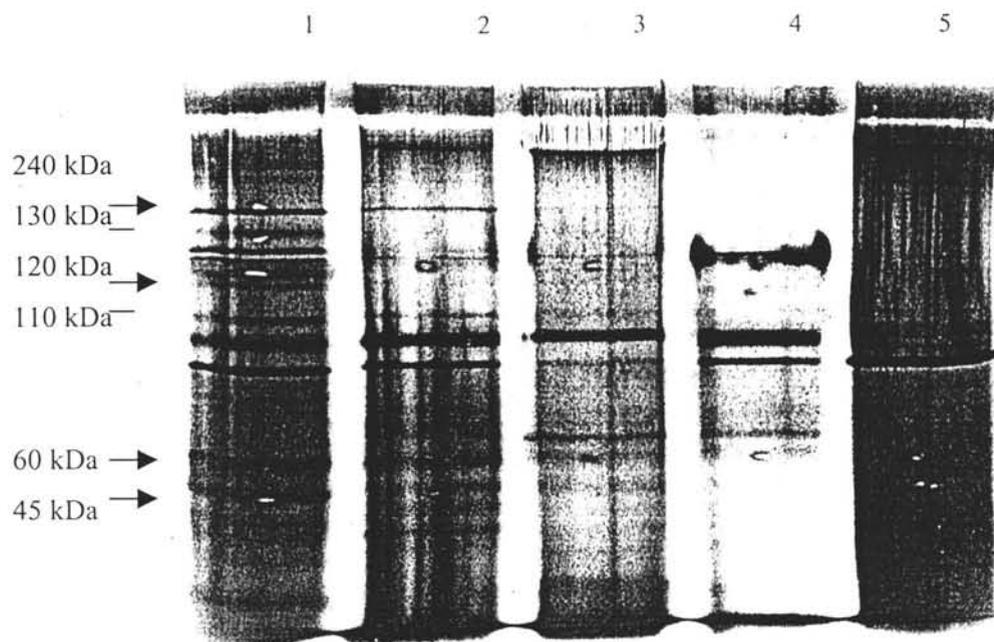


FIG. 17. Patrones de proteínas en SDS-PAGE con RBB-xilano y teñidos por el método de nitrato de plata, producidas a las 48 horas por *S. mexicanus* sp. nov. en presencia de los diferentes azúcares utilizados al 1%. Carril 1, bagacillo de caña; carril 2, arabinosa; carril 3, sacarosa; carril 4, ramnosa y carril 5, xilosa.

7.2 Represión de las xilanasas de *Streptomyces mexicanus*

La síntesis de las enzimas catabólicas son sensibles a represión por glucosa y otros azúcares presentes en el medio de cultivo, así como por el producto final de la reacción, por lo que se consideró importante establecer si todas las xilanasas producidas por *S. mexicanus* sp. nov. eran afectadas negativamente por la glucosa, glicerol y xilosa.

En la figura 18 se muestran los perfiles de crecimiento de este microorganismo en medio mínimo con bagacillo de caña al 1% adicionado de los posibles azúcares represores y se puede observar que en bagacillo solo, bagacillo con glucosa o con glicerol, el crecimiento fue exponencial durante las primeras 24 horas, mientras que en bagacillo con xilosa, esta fase se extiende hasta las 48 horas. Comparando la biomasa obtenida en los azúcares solos (Fig. 11) con éstos se observa que hay mayor crecimiento en las mezclas debido a la presencia del bagacillo, tal y como se esperaba, ya que este microorganismo utiliza mejor los xilanos que los azúcares libres.

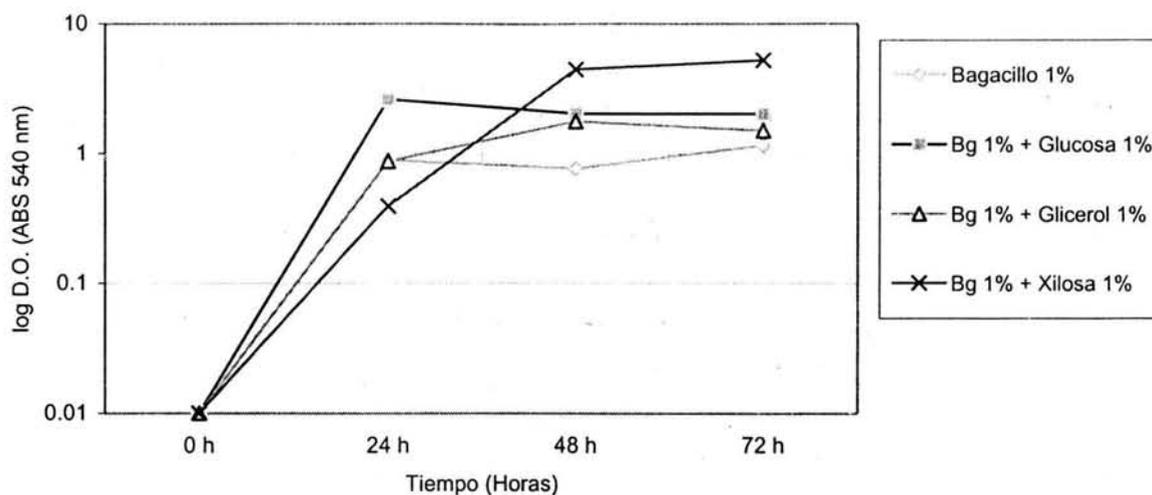


FIG. 18. Perfiles de crecimiento de *S. mexicanus* sp. nov. en medio mínimo con bagacillo de caña al 1% y en presencia de glucosa 1%, glicerol 1% y xilosa 1%. Las condiciones utilizadas fueron las descritas en Material y Métodos.

Al cuantificar la actividad total de las xilanasas en los filtrados obtenidos se observó que la producción de las enzimas disminuyó 10 veces o más en presencia de glucosa, glicerol o xilosa. Estos resultados sugieren que existe represión por estos azúcares sobre la síntesis de las xilanasas, siendo mayor el efecto del glicerol.

Para establecer si el efecto negativo ejercido por estos azúcares se llevaba a cabo sobre todas las xilanasas, las proteínas de los filtrados se concentraron por precipitación con sulfato de amonio y se corrieron los geles nativos y con SDS. Los resultados se muestran en las figuras 19 y 20 y se puede observar que no se detectan bandas de actividad en ninguno de los azúcares a excepción del control que contiene únicamente bagacillo de caña.

En los geles teñidos para proteína se observa que en presencia de los azúcares no se detecta la producción de proteínas extracelulares, lo que indica que la síntesis de todas estas se reprime bajo estas condiciones de crecimiento de *S. mexicanus* sp. nov.

Tabla 3. Efecto de la fuente de carbono sobre la producción de las xilanasas por *S. mexicanus* sp. nov.*

Fuente de carbono	Actividad volumétrica ($\mu\text{moles ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$)		
	24 h	48 h	72 h
Control (Bagacillo de caña 1%)	1.8	3.6	2.8
Bg + Glucosa 1%	0	0.4	0.73
Bg + Glicerol 1%	0	0	0
Bg + Xilosa 1%	0	0.35	0.2

*Las condiciones utilizadas fueron las descritas en Material y Métodos.

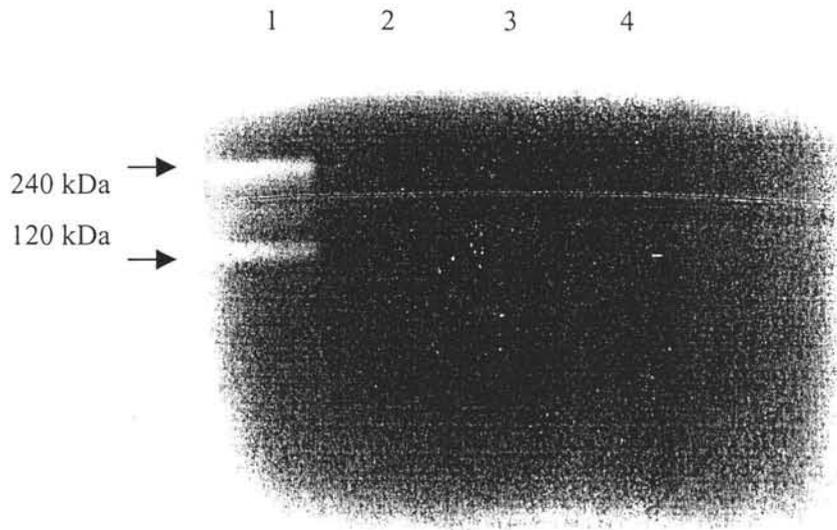


FIG. 19. Zimograma ND de las xilanasas producidas a las 36 h por *S. mexicanus* sp. nov. crecido en presencia de bagacillo de caña (carril 1), bagacillo de caña con glucosa (carril 3) y xilosa (carril 4). Las condiciones para la electroforesis utilizadas fueron las descritas en Material y Métodos.

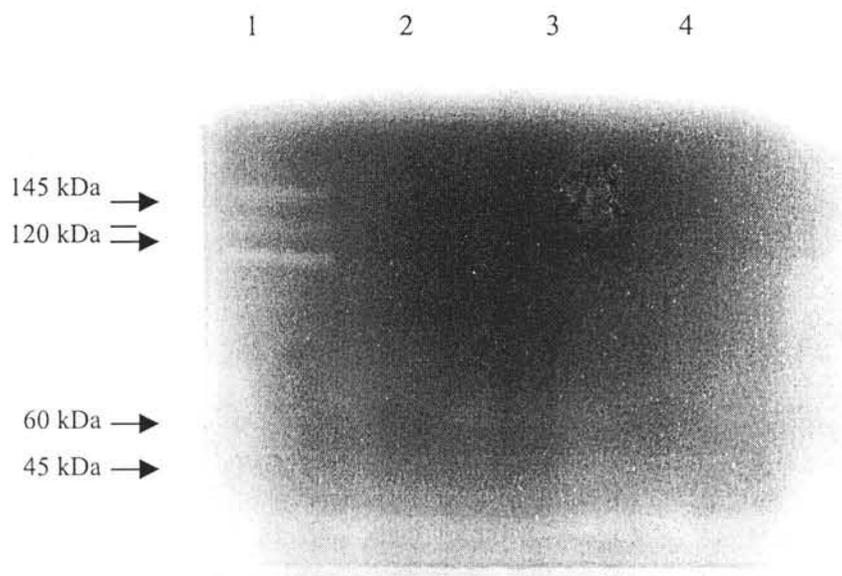


FIG. 20. Zimograma SDS de las xilanasas producidas a las 36 h por *S. mexicanus* sp. nov. crecido en presencia de bagacillo de caña (carril 1), bagacillo de caña con glucosa (carril 2), con glicerol (carril 3) y xilosa (carril 4). Las condiciones para la electroforesis utilizadas fueron las descritas en Material y Métodos.

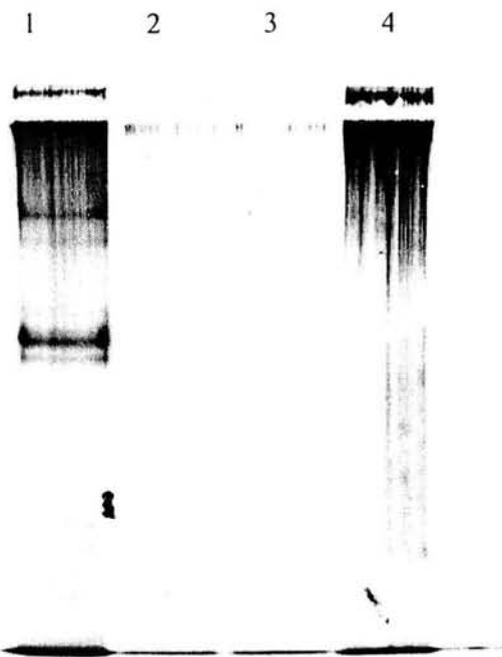


FIG. 21. Patrones de proteínas en ND-PAGE producidas a las 36 h por *S. mexicanus* sp. nov. crecido en presencia de bagacillo de caña (carril 1), bagacillo con glucosa (carril 2), con glicerol (carril 3) y con xilosa (carril 4). Las condiciones para la electroforesis fueron descritas en Material y Métodos.

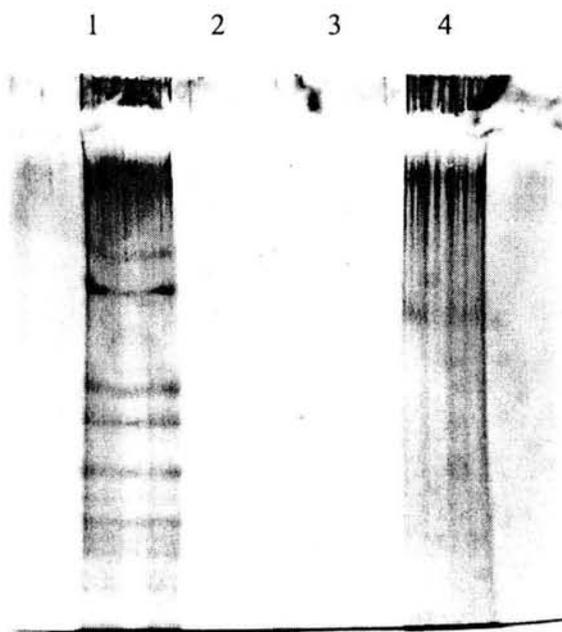


FIG. 22. Patrones de proteínas en SDS-PAGE producidas a las 36 h por *S. mexicanus* sp. nov. crecido en presencia de bagacillo de caña (carril 1), bagacillo de caña con glucosa (carril 2), con glicerol (carril 3) y con xilosa (carril 4). Las condiciones para la electroforesis utilizadas fueron descritas en Material y Métodos.

DISCUSIÓN

Streptomyces mexicanus es un actinomiceto aislado del suelo que fue seleccionado por su producción de xilanasas libres de celulasas. Al crecer este microorganismo en diferentes fuentes de carbono se pudo observar que crece mejor en sustratos poliméricos que en azúcares libres, quizá debido a la adaptación que tuvo *S. mexicanus* al evolucionar en suelo rico en bagacillo de caña.

Está ampliamente establecido que las xilanasas se inducen por la presencia de xilanos o residuos que lo contengan, sin embargo no se ha establecido el tipo de moléculas que actúan como inductores reales ya que el xilano como tal no puede entrar a la célula. Algunos azúcares que pudieran actuar como inductores son la xilosa, la xilobiosa e isómeros de la xilobiosa. En nuestro caso, la síntesis de las xilanasas se induce por arabinosa, sacarosa, ramnosa, además de xilosa, lo que puede indicar que otras moléculas que se generan durante la hidrólisis del xilano también pueden actuar como inductores, ya sea directamente o formando otras moléculas.

La inducción por xilosa de la síntesis de las xilanasas es un fenómeno que no está reportado en los actinomicetos, pero ha sido encontrado en *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus sydowii* MG49 y en *Cryptococcus flavus* (Leathers *et al.*, 1986; Ghosh y Nanda, 1994; Yasui *et al.*, 1984).

Se ha reportado previamente que la xilosa puede tener un doble efecto sobre la producción de todas las xilanasas en *S. mexicanus* sp. nov. cuando se adiciona como única fuente de carbono, ya que actúa como inductor de la actividad xilanolítica total, mientras que cuando se adiciona además del xilano de abedul afecta negativamente la producción total de las xilanasas (Flores *et al.*, 1996).

La represión por xilosa sobre la síntesis de las xilanasas ha sido reportada en *Streptomyces flavogriseus* y *Thermomonospora curvata* (Srivastava *et al.*, 1991; Stutzenberger y Bodine, 1992), aunque no se estudió el efecto inductor en estos microorganismos.

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la xilosa induce únicamente a las xilanasas X₁₄₅, X₆₀ y X₄₅, lo que sugiere que la diferencia en actividad total encontrada entre la producción obtenida en xilosa y en bagacillo de caña se puede deber a la presencia de la xilanasas X₁₂₀ en este último.

La inducción de las xilanasas por arabinosa se ha descrito en *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* (Lee *et al.*, 1993) y en *Cellulomonas flavigena* (Pérez-Avalos *et al.*, 1996), y hasta donde sabemos no existen reportes de este fenómeno en *Streptomyces*. En *S. mexicanus* sp. nov., la arabinosa induce las cuatro xilanasas producidas por este actinomiceto.

Ramnosa es un azúcar que puede generarse durante la degradación de ciertos tipos de xilano y por esta razón podría estar induciendo la síntesis de las xilanasas, mientras que la sacarosa es una molécula que no tiene relación alguna con la molécula de xilano, puesto que tiene enlaces β -2,1, cuando los enlaces entre las xilosas en el xilano son β -1,4 donde actúan las xilanasas, por lo que no tenemos explicación a la inducción de las xilanasas en *S. mexicanus* sp. nov. por este azúcar, ni existe tampoco en la literatura evidencia de los posibles mecanismos del efecto inductor de la sacarosa.

La represión catabólica por glucosa es un fenómeno ampliamente estudiado en bacterias Gram negativas (Saier *et al.*, 1995). En *Streptomyces mexicanus* sp. nov., la síntesis de todas las xilanasas producidas por este microorganismo es reprimida por glucosa. Este efecto es más general en *S. mexicanus* sp. nov., ya que la glucosa afecta también la síntesis de las pectinasas, proteasas y carboximetilcelulasas en este microorganismo (Sánchez, 2003).

La represión por glicerol es un fenómeno menos estudiado y a la fecha no se ha establecido como se lleva a cabo. Sin embargo, se ha reportado que la síntesis de la amilasa en *Streptomyces kanamyceticus* también está regulada por este compuesto (Flores *et al.*, 1993) así como la síntesis de celulasas en *Trichoderma reesei* (Montenecourt y Eveleigh, 1977) y de pectinasas en *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 (Solís *et al.*, 1990).

Es importante enfatizar que la glucosa, xilosa y glicerol ejercen un efecto negativo en la síntesis de prácticamente todas las proteínas extracelulares producidas por *S. mexicanus* sp. nov., lo que sugiere que estos fenómenos regulatorios se ejercen de manera general sobre las enzimas catabólicas en este actinomiceto.

9. CONCLUSIONES

- ◆ Las xilanasas de 145, 120, 60 y 45 kDa son inducidas por arabinosa, sacarosa y ramnosa en *Streptomyces mexicanus* sp. nov.
- ◆ Las xilanasas de 145, 60 y 45 kDa son inducidas por xilosa como única fuente de carbono en *Streptomyces mexicanus* sp. nov.
- ◆ La xilanasas de 120 kDa se sintetiza en mayor proporción en ramnosa.
- ◆ La ausencia de la banda de actividad de la X₁₂₀ en xilosa como única fuente de carbono en el medio, provoca que la actividad total disminuya en más de un 50 %.
- ◆ Todas las xilanasas producidas por *Streptomyces mexicanus* sp. nov. son reprimidas por glucosa, glicerol y xilosa adicionados al medio conteniendo bagacillo de caña.
- ◆ Todas las proteínas extracelulares producidas por *Streptomyces mexicanus* sp. nov. son reprimidas por glucosa, xilosa y glicerol.

10. BIBLIOGRAFÍA

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J. 1993. En: Adhesión celular, uniones celulares y matriz extracelular. Omega, Barcelona, p. 1017-1081.

Amorín, C. (2002): *Las consecuencias del TLC*. La insignia: Agosto, 16. p. 22-23. México, D.F.

Angell, S., Schwartz, E., Bib, J.M. (1992). The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2): its nucleotide sequence, transcriptional analysis and role in glucose repression. *Mol. Microbiol.* 6, 2833-2844.

Baes, A.U., Orlando, U.S., Nishijima, W. (2002). Preparation of agricultural residue anion exchangers and its nitrate maximum adsorption capacity. *Chemosph.* 48, 1041-1046.

Baldoma, L., Aguilar, J. (1988). Metabolism of L-fucose and L-rhamnose in *Escherichia coli*: Aerobic-anaerobic regulation of L-lactaldehyde dissimilation. *J. Bacteriol.* 170, 416-421.

Ball, A.S., MacCarthy, A.J. (1989). Production and properties of xylanases from actinomycetes. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 439-444.

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

Béguin, P. y Aubert, J.P. (1994). The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 25-58.

Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 326-338.

Berman, G.A., Murashigue, K.H. (1972). "Synthetic carbohydrate". NASA. Contrato NGR-05 -020 -409. Universidad de Stanford.

Biely, P., Vršanská, M., Tenkanen, M. (1997). Endo- β -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *J. Biotechnol.* 57, 151-166.

Biely, P. (1993). Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases. En: Hemicellulose and Hemicellulases. (Coughlan, M and Hazlewood, G., eds.) Portland Press Ltd., Great Britain, pp. 29-48.

Biely, P. (1991). Biotechnological potential and production of xylanolytic systems free of cellulases. *ACS Symp. Ser.* 460, 408-416.

Biely, P. (1985). Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* 3, 286-290.

- Biely, P., Markovic, O., Mislovicova, D. (1985). Sensitive detection of endo-1,4- β -glucanases and endo-1,4- β -xylanases in gels. *Anal. Biochem.* 144, 147-151.
- Biely, P. y Petr kov, E. (1984). Novel inducers of the xylan-degrading enzyme system of *Cryptococcus albidus*. *J. Bacteriol.* 160, 403-412.
- Bollag D.M., Rozycki M.D., Edelstein, S.J. (1996). *Protein Methods*, 2nd edn, New York: Wiley-Liss.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Bustos, J., Ramírez, A., Vázquez, M. (2003). Hydrolisis of sugarcane bagasse with hydrochloric acid. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 104, 51-68.
- Capalash, N., Gupta, K.G., Sharma, P. (1991). Factors influencing the induction of endoxylanase by *Thermoascus aurantiacus*. *J. Biotechnol.* 33, 87-93.
- Carvalho, W., Silva, S., (2002). Metabolic Behavior of immobilized *Candida guilliermondii* cells during batch xylitol production from sugarcane bagasse acid hydrolyzate. *Biotechnol. Bioeng.* 79, 165-169.
- Collins, T., Meuwis, M.A., Stals, I. (2002). A novel family 8 xylanase, functional and physicochemical characterization. *J. Biol. Chem.* 277, 35133- 35139.
- Cooper, R. (1986). Carbohydrate metabolism. En: *Cultured Cells* (Morgan, M.J., ed.) Plenum Press, New York, pp. 461-491.
- Coughlan, M.P., Hazlewood, P.G. (1993). β -1,4-D-xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 17, 259-289.
- Chaillou, S., Pouwels, P., Postma, P. (1999). Transport of D-xylose in *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*: Evidence for a mechanism of facilitated diffusion via the phosphoenolpyruvate: mannose phosphotransferase system. *J. Bacteriol.* 181, 4768-4773.
- Chaillou, S., Postma, P., Pouwels, P. (1998). Functional expression in *Lactobacillus plantarum* of *xylP* encoding the isoprimeverose transporter of *Lactobacillus pentosus*. *J. Bacteriol.* 180, 4011-4014.
- Chanda , S.K., Hirst, E.L., Jones, J.K.N., Percival, E.G.V. (1950). The constitution of xylan from esparto grass (*Stipa tenacissima*) *J. Chem. Soc.* 50, 1287-1289.

- Cho, S. G., C., Choi, Y.J. (1998). Catabolite Repression of the *Bacillus stearothermophilus* β -Xylosidase Gene (xyl A) in *Bacillus subtilis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 8, 21-27.
- De Graff, L.H., Van der Broek, H.C., Van Oojien, A.J.J. (1994). Regulation of the xylanase encoding xlnA gene of *Aspergillus tubigensis*. *Mol. Microbiol.* 12, 479-490.
- Dekker, R.F.H., Richards, G.N. (1976). Hemicellulases: their occurrence, purification, properties and mode of action. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 32, 277-352.
- Delic, I., Robbins, P., Westpheling, J. (1992). Direct repeat sequences are implicated in the regulation of two *Streptomyces* chitinase promoters that are subject to carbon catabolite control. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 1885-1889.
- Deutscher, J., Galinier, A., Martin-Verstraete, I. (2002). Carbohydrate uptake and metabolism. En: *Bacillus subtilis* and its closets relatives from genes to cells. (Sonenshein, A., Hoch, J., and Losik, J., eds.) ASM Press, Washington, DC., pp. 129-145.
- De Vries, R.P., Visser, J. (2001). *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 497-522.
- De Vries, R.P., Visser, J. (1999). Catabolite repression of the xylanase gene (xynA) expression in *Bacillus stearothermophilus* No. 236 and *B. subtilis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 8, 21-27.
- De Vries, R.P., Poulsen, C.H., Madrid, S. (1998). *aguA*, the gene encoding an extracellular α -glucuronidase from *Aspergillus tubigensis*, is specifically induced on xylose and not on glucuronic acid. *J. Bacteriol.* 180, 243-249.
- Dobberstein, J. Emei, C.C. (1989). B-Xylanase produced by *Aureobasidium pullulans* CBS 58475. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32, 262-268.
- Eda, S., Ohnishi, A., Kato, K. (1976). Xylan isolated from the stalks of *Nicotiana tabacum*. *Agric. Biol. Chem.* 40, 359-364.
- Flores, M.E., Pérez, R., Huitrón, C. (1997). β - Xylosidase and xilanase characterization and production by *Streptomyces* sp. CH-M-1035. *Lett. in Appl. Microbiol.* 24, 410-416.
- Flores, M.E., Perea, M., Rodríguez, O., Malvárez, A., Huitrón, C. (1996). Physiological studies on induction and catabolite repression of β - xylosidase and endoxylanase in *Streptomyces* sp. CH-M-1035. *J. Biotechnol.* 49, 179-187.
- Flores, M. E., Ponce, E., Rubio, M. (1993). Glucose and glycerol repression of α - amylase in *Streptomyces kanamiceticus* and isolation of deregulated mutants. *Biotechnol. Lett.* 15, 595-600.

- Fernández, E.M., Piñaga, F., De Graff, L. (1994). Purification, characterization and regulation of the synthesis of an *Aspergillus nidulans* acidic xylanase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42, 555-562.
- Gárdonyi, M., Österberg, M., Rodrigues, C. (2003). High capacity xylose transport in *Candida intermedia* PYCC 4715. *FEMS Yeast Research* 3, 45-52.
- Georis, J., Giannotta, F., Lamotte-Brasseur, J. (1999). Sequence, overproduction and purification of the family 11 endo- β -1,4-xylanase encoded by the *xy11* gene of *Streptomyces* sp. S38. *Gen.* 237: 123-133.
- Ghosh, M., Nanda, G. (1994). Purification and some properties of xylanase from *Aspergillus sydowii* MG 49. *Environ. Microbiol.* 60, 4620-4623.
- Gilbert, H.J., Hazlewood, G.P. (1993). Bacterial cellulases and xylanases. *J. Gen. Microbiol.* 139, 187-194.
- Gomes, D.J., Gomes, J., Steiner, W. (1994). Factors influencing the induction of endo-xylanase by *Thermoascus aurantiacus*. *J. Biotechnol.* 33, 87-93.
- Gupta, N., Reddy, V.S. Maiti, S., y Gosh, A. (2000). Cloning, expression, and sequence analysis of the gene encoding the alkali-stable, thermostable endoxylanase from alkalophilic, mesophilic *Bacillus* sp. Strain NG27, *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2631.
- Gusek, T., Kinsella, J. (1992). Review of the *Streptomyces lividans* / a vector pIJ702 system for gene cloning. *Crit. Rev. Microbiol.* 18, 247-260.
- Haki, G.D., Rakshit, S.K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Biores. Technol.* 89, 17-34.
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hidrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280, 309-316.
- Hindle, Z., Smith, P. (1994). Substrate induction and catabolite repression of the *Streptomyces coelicolor* glycerol operon are mediated through the GylR protein. *Molec. Microbiol.* 12(5):737-745.
- Hodgson, D.A. (2000). Primary metabolism and its control in streptomycetes, a most unusual group of bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 42, 47-238.
- Hodgson, D.A. (1994). General physiology and carbon metabolism. In *Streptomyces: Handbook of Biotechnology*. Wellington, E.M.H., and Hodgson, D.A. (eds.). London: Plenum Press, in press.

Hodgson, D.A. (1982). Glucose repression of carbon source uptake in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose. *J. Gen. Microbiol.* 128, 2417-2430.

Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F. (1985). Genetic manipulation of *Streptomyces*. A laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich.

Hrmová, M., Biely, P., Vrsánská. (1984). Induction of cellulose and xylan degrading enzyme complex in the yeast *Trichosporon cutaneum*. *Arch. Microbiol.* 138, 371-376.

Hrmová, M., Biely, P., Vrnaská, M. (1989). Cellulase and xylan degrading enzymes of *Aspergillus terreus* and *Aspergillus niger*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 11, 610-616.

Ikura, Y., Horikoshi, K. (1987). Stimulatory effect of certain amino acids on xylanase production by alcalophilic *Bacillus* sp. *Agric. Biol. Chem.* 51, 3143-3145.

Imriškova, I.: Purificación y caracterización de glucosa cinasa de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* y de *Streptomyces coelicolor*. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México: 2002. 75 p. Tesis que para obtener el grado de Doctora en Ciencias.

Ingram, C., Delic, I., Westpheling, J. (1995). *ccrA1*: A mutation in *Streptomyces coelicolor* that affects the control of catabolite repression. *J. Bacteriol.* 177, 3579-3586.

Ingraham, J., Ingraham, K. (2000). The Prokaryotes. En: Introduction to Microbiology. Brooks/Cole (Thomson Learning), Canada. pp. 294-297.

Joseleau, J., Comptat, J., Ruel, K. (1992). Chemical structure of xylans and their interaction in the plant cell walls. In: Visser, J., Beldman, G., Kusters-Van Someren, M.A., Voragen, A.G.J. (Eds.), Xylans and Xylanases. Elsevier, Amsterdam, pp. 1-15.

Johansson, B., Christensson, C., Hobbey, T. (2001). Xylulokinase overexpression in two strains of *Saccharomyces cerevisiae* also expressing xylose reductase and xylitol dehydrogenase and its effect on fermentation of xylose and lignocellulosic hydrolysate. *Appl. Environm. Microbiol.* 67, 4249-4255.

Kamionka, A., Stephan, P., Nothaft, H. (2002) The phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* IIA^{Crr} exhibits properties that resemble transport and inducer exclusion function of enzyme IIA^{Glucose} of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 269, 2143-2150.

Khanna, S., Gauri (1993). Regulation, purification, and properties of xylanase from *Cellulomonas fimi*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 15, 990-995.

Khasin, A., Alchanati, I., Shoham, Y. (1993). Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1725-1730.

- Kesker, S.S. (1992). High activity xylanase from thermotolerant *Streptomyces* T7, cultural conditions and enzyme properties. *Biotechnol. Lett.* 14, 481-486.
- Kim, B.J., Lee, Y.H., Lee, H.S. (2002). Cloning, expression and characterization of L-arabinose isomerase from *Thermotoga neapolitana*: bioconversion of D-galactose to D-tagatose using the enzyme. *FEMS Microbiol. Lett.* 212, 121-126.
- Kosugi, A., Murashima, K., Doi, R. (2001). Characterization of xylanolytic enzymes in *Clostridium cellulovorans*: expression of xylanase activity dependent on growth substrates. *J. Bacteriol.* 183, 7037-7043.
- Kuhad, R.C., Manchanda, M., Singh, A. (1998). Optimization of xylanase production by a hyper-xylanolytic mutant strain of *Fusarium oxysporum*. *Process Biochem.* 33, 641-647.
- Kulkarni, N., Shendye, A., Rao, M. (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 23, 411-456.
- Kunding, W., Ghosh, S., Roseman, S. (1964). Phosphate bound to histidine in a protein as an intermediate in a novel phosphotransferase system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 52, 1067-1074.
- Kurakae, M., Kisaka W., Ouchi K. (2001). Pretreatment with ammonia water for enzymatic hydrolysis of corn husk, bagasse, and switchgrass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 90, 251-9.
- Lachke, A.H. (1988). 1,4- β -D-Xylan xylanohidrolase of *Sclerotium rolfsii*. *Methods Enzymol.* 160, 679-684.
- Laszlo, J.A. (1998). Biodegradability of quaternized, crosslinked sugarcane bagasse. *J. Environ. Polym. Degradation* 6, 73-78.
- Laszlo, J.A. (1996). Preparing an ion exchange resin from sugarcane bagasse for removal of reactive dye from wastewater. *Text. Chem. Col.* 28, 13-17.
- Leathers, T.D., Detroy, R.W., Bothast, R.J. (1986). Induction and glucose repression of xylanase from a color variant strain of *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnol. Lett.* 8, 867-872.
- Lee, Y.E., Lowe, S.E., Zeikus, G. (1993). Regulation and characterization of xylanolytic enzymes of *Thermonoanaerobacterium saccharoliticum* B6A-RI. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 763-771.
- Lenhinger, A., Nelson, D., Cox, M. (1995). Regulación de la expresión génica. En: Principios de Bioquímica. Ediciones Omega, Barcelona, 941-962.
- Lewin, B. (2000). The operon. En: Genes VIII. Oxford University Press, USA, 213-306.

- Lim, D. (1998). Prokaryotes: The Bacteria and the Archea. En: Microbiology. WCB McGraw-Hill, San Francisco.
- Lin, E. (1987). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Vol 1 (Neidhardt, F., ed.) ASM, Washington, pp. 244-284.
- Lindner, C., Stülke, J., Hecker, M. (1994). Regulation of xylanolytic enzymes in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 140, 753-757.
- Liu, W., Lu, Y., Ma, G. (1999). Induction and glucose repression of endo- β -xylanase in the yeast *Trichosporon cutaneum* SL 409. *Process. Biochem.* 34, 67-72.
- Liu, X.M., Taber, H.W. (1998). Catabolite regulation of the *Bacillus subtilis* ctaBCDEF gene cluster. *J. Bacteriol.* 180, 6154-6163.
- Madrid, E. (2001). *El porqué de la crisis azucarera*. Reforma. Julio, 30. p. 30. México, D.F.
- Magazanick, K.B. (1961). Catabolite repression. Cold Spring Harbor. Symp Quant Biol. 26, 249-256.
- Martín, C., Galbe, M., Nilvebrant, N.O. (2002). Comparison of the fermentability of enzymatic hydrolyzates of sugarcane bagasse pretreated by steam explosion using different impregnating agents. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98-100, 699-716.
- Matsuo, M. and Yasui, T. (1988). β -Xylosidases of several fungi. *Methods Enzymol.* 160, 684-695.
- Mayorga-Reyes, L., Morales, T., Salgado, L. (2002). *Cellulomonas flavigena*: characterization of an endo-1,4-xylanase tightly induced by sugarcane bagasse. *FEMS Microbiol. Lett.* 214, 205-209.
- Miller, L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 246-428.
- Mohan, D. and Singh, K. (2002). Single- and multi-component adsorption of cadmium and zinc using activated carbon derived from bagasse- an agricultural waste. *Water Res.* 36, 2304-18.
- Montenecourt, B.S., Eveleigh, D.E. (1977). Preparation of mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulase production. *Appl. Environ. Microbiol.* 34, 777-782.
- Muiry, J., Gunn, T., McDonald, T. (1993). Proton-linked L-rhamnose transport, and its comparison with L-fucose transport in Enterobacteriaceae. *Biochem. J.* 290, 833-842.

Neureiter, M., Danner, H., Thomasser, C. (2002) Dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98-100, 49-58.

Nichols, D. (1982). *Bioenergetics: an introduction to the Chemiosmotic Theory*. Academic Press, London.

Nothaft, H., Parche, S., Kamionka, A. (2003). In vivo analysis of HPr reveals a fructose-specific phosphotransferase system that confers high-affinity uptake in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 185:929-937.

Novotna, J., Hostalek, Z. (1985). Phosphorylation of hexoses in *Streptomyces aureofaciens*: evidence that the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system is not operative. *FEMS Microbiol. Lett.* 28, 347-350.

Oloni, S., Olusoji, O. (2002). Regulatory mutations affecting the synthesis of cellulase in *Bacillus pumilus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 487-491.

Orlando, U., Baes A., Nishijima, W. (2002). A new procedure to produce lignocellulosic anion exchangers from agricultural waste materials. *Bioresour. Technol.* 83, 195-198.

Parche, S., Schmidt, R., Titgemeyer, F. (1999). The phosphotransferase system (PTS) of *Streptomyces coelicolor* identification and biochemical analysis of a histidine phosphocarrier protein HPr encoded by the gene *pstH*. *Eur. J. Biochem.* 265, 308-317.

Pérez- Avalos, O., Noyola, P., Magaña, P. (1996). Induction of xylanase and β -xylosidase in *Cellulomonas flavigena* growing on different carbon sources. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46, 405-409.

Pessoa, J., Mancilha, I.M., Sato, S. (1997). Evaluation of sugar cane hemicellulose hydrolizate for cultivation of yeasts and filamentous fungi. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 18, 360-363.

Petrosyan, P., García-Varela, M., Luz-Madrigal, A., Huitrón, C., y Flores, M.E. (2003). *Streptomyces mexicanus* sp. nov., a xylanolytic micro-organism from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 269-273.

Petrosyan, P., Luz-Madrigal, A., Huitrón, C. y Flores, M. (2002). Characterization of a xylanolytic complex from *Streptomyces* sp. *Biotechnol. Letts.* 24, 1473-1476.

Ponce-Noyola, T., De la Torre, M. (2001). Regulation of cellulases and xylanases from a derepressed mutant of *Cellulomonas flavigena* growing on sugar-cane bagasse in continuous culture. *Biores. Technol.* 78, 285-291.

Postma, P., Lengeler, J., Jacobson, G. (1993). Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* 57, 543-594.

Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, A.D. (1999). Microbiology. WCB Mc-Graw-Hill. New York.

Puls, J., Schuseil, J. (1992). Chemistry of Hemicelluloses: relationships between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. En: Hemicellulose and Hemicellulases. (Coughlan, M and Hazlewood, G., eds.) Portland Press Ltd., Great Britain, pp. 1-27.

Puchart, V., Katapodis, P., Biely, P. (1999). Production of xylanases, mannanases, and pectinases by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 24, 355-361.

Quintero, R. (1990). Producción de proteína microbiana a partir de la caña de azúcar y sus subproductos. En: Ingeniería Bioquímica teoría y aplicaciones. Alambra Mexicana. México. pp 175-181.

Rajaram, S., Varma, A. (1990). Production and characterization of xylanase from *Bacillus thermoalkalophilus* grown on agricultural wastes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34, 141-144.

Ratanakhanokchai, K., Noiguang, P., Lay, K. (2002). Two extracellular endoxylanases from alkaliphilic *Bacillus firmus* differ in their synthesis. *Biotechnol. Letts.* 24, 1487-1490.

Richard, P., Putkonen, M., Väänänen, J. (2002). The missing link in the fungal L-arabinose catabolic pathway, identification of the L-xylulose reductase gene. *Biochem.* 41, 6432-6437.

Rodríguez, C., Sanz, P., Gancedo, C. (2003). New Mutations of *Saccharomyces cerevisiae* that partially relieve both glucose and galactose repression activate the protein kinase Snf1. *FEMS Yeast Res.* 3, 77-84.

Rodríguez, H., Enríquez, A., Volfová, O. (1985). The localization and activity of *Cellulomonas* xylanase on sugar cane bagasse pith. *Can. J. Microbiol.* 31, 754-756.

Rosana-Ani, L., Skarlatos, P., Dahl, M.K. (1999). Putative contribution of glucose kinase from *Bacillus subtilis* to carbon catabolite repression (CCR): a link between enzymatic regulation and CCR? *FEMS Microbiol. Lett.* 171, 89-96.

Saier, H., Chauvaux, S., Deutscher, J. (1995). Protein phosphorylation and regulation of carbon metabolism in Gram-negative versus Gram.-positive bacteria. *TIBS.* 20, 267-271.

Saier, M. Jr., Reizer, J. (1992). Proposed uniform nomenclature for the proteins and protein domains of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *J. Bacteriol.* 174, 1433-1438.

Sá-Nogueira, I., Mota, J. (1997). Negative regulation of L-arabinose metabolism in *Bacillus subtilis*: characterization of the *araR* (*araC*) gene. *J. Bacteriol.* 179, 1598-1608.

Sánchez, A. (2003). Caracterización electroforética de las xilanasas, carboximetilcelulasas, pectinasas y proteasas de *Streptomyces mexicanus* sp. nov. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. 53 p. Tesis para obtener el grado de Biólogo.

Sapag, A., Wouters, J., Lambert, C. (2002). The endoxylanases from family 11: computer analysis of protein sequences reveals important structural and phylogenetic relationships. *J. Biotechnol.* 95,109-131.

Scharader, K., Blevins, W. (2001). Effects of carbon source, phosphorus concentration, and several micronutrients on biomass and geosmin production by *Streptomyces halstedii*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 26, 241-247.

Segura, D., González, R., Rodríguez, R. (1996). *Streptomyces* mutants insensitive to glucose repression showed deregulation of primary and secondary metabolism. *Asia. Pac. J. Biol. Biotechnol.* 4, 30-36.

Silva, S.S., Ramos, R.M., Rodrigues, D.C. (2000). Downstream processing for xylitol recovery from fermented sugar cane bagasse hydrolysate using aluminium polychloride. *Z. Naturforsch.* 55, 10-15.

Simkovic, I., Laszlo, JA. (1997). Preparation of ion exchangers from bagasse by crosslinking with epichlorohydrin-NH₄OH or epichlorohydrin-imidazole. *J. Appl. Polym. Sci.* 64, 2561-2566.

Simon, R. (1996). Protein purification techniques. Oxford University Press, New York.

Solis, S., Flores, M. E., C. Huitrón. (1990). *Biotechnol. Letts.* 12, 751-756.

Sridevi, R., Ajit, V. (1990). Production and characterization of xylanase from *Bacillus thermoalkalophilus* grown on agricultural wastes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34, 141-144.

Srivastava, R., Ali, S.S., Srivastava, B.S. (1991). Cloning of xylanase gene of *Streptomyces flavogriseus* in *Escherichia coli* and bacteriophage induced lysis for the release of cloned enzyme. *FEMS Microbiol. Lett.* 78, 201-206.

Sternberg, D., Mandels G. (1979). Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose. *J. Bacteriol.* 139, 761-769.

Subramaniyan, S., Prema, P. (2002). Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzimology, Molecular Biology, and Application. *Crit. Rev. Biotechnol.* 22, 33-64.

- Sunna, A., Antranikian, A. (1997). Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* 17, 39-67.
- Sunna, A., Puls, J., Antranikian, A. (1996). Purification and characterization of two thermostable endo-1,4- β -D-xylanases from *Thermotoga thermarum*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 24, 177-185.
- Stutzenberger, F. (1994). Extracellular enzyme production by *Thermomonospora curvata* grown on bagasse. *J. Indust. Microbiol.* 13, 35-42.
- Stutzenberger, F.J., Bodine, A.B. (1992). Xylanase production by *Thermomonospora curvata*. *J. Appl. Biotechnol.* 72, 509-511.
- Tate III, R. (2000). The Carbon Cycle. En: Soil Microbiology. John Wiley and Sons, New York, pp. 281-313.
- Thomson, J.A. (1993). Molecular biology of xylan degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 101, 65-82.
- Titgemeyer, F., Walkenhorst, J., Reizer, J. (1995). Identification and characterization of phosphoenolpyruvate: fructose phosphotransferase systems in three *Streptomyces* species. *Microbiol.* 141, 51-58.
- Törrönen, A., Rouvinen, J. (1997). Structural and functional properties of low molecular weight endo-1,4- β -xylanases. *J. Biotechnol.* 57:137-149.
- Trigo, C., Ball, A. (1994). Production of extracellular enzymes during the solubilization of straw by *Thermomonospora fusca* BD25. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41, 366-372.
- Verma, P., Madamwar, D. (2002). Production of lignolytic enzymes for dye decolorization by cocultivation of white-rot fungi *Pleurotus ostreatus* and *Phanerochaete chrysosporum* under solid-state fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 102-103, 109-118.
- Wang, P., Ali, S., Mason, J. (1992). Xylanases from *Streptomyces cyaneus*, En: *Xylans and Xylanases*. (Visser, J., Kusters-van Someran, M. A., and Voragen, A. G. J. eds.) Elsevier Science Publishers, Amsterdam BV, pp. 225-232.
- Whitehead, T., Hespell, R. (1990). Heterologous expression of the *Bacteroides ruminicola* xylanase gene in *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides uniformis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 66, 61-66.
- Wong, K. K. Y., Tan, L. U.L., Saddler, J.N. (1988). Multiplicity of xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiol. Rev.* 52, 305-317.

Wu, S.H., Suen, D.F., Chang, H. (2002). Maize tapetum xylanase is synthesized as a precursor, processed and activated by serine protease, and deposited on the pollen. *J. Biol. Chem.* 277, 49055-49064.

Yasui, T., Nguyen, B.T., Nakanishi, K. (1984). Inducers for xylanase production by *Cryptococcus flavus*. *J. Ferment. Technol.* 62, 353-359.

Zhao, Y., Chany II, C.J., Sims, P. (1997). Definition of the substrate specificity of the 'sensing' xylanase of *Streptomyces cyaneus* using xylooligosaccharide and cellobiosaccharide glycosides of 3,4-dinitrophenol. *J. Biotechnol.* 33, 87-92.