

64
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**COMPOSICION ENZIMATICA DEL SISTEMA
CELULOLITICO EXTRACELULAR PRODUCIDO
POR EL HONGO AUREOBASIDIUM SP. SOBRE
BAGACILLO DE CAÑA DE AZUCAR**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ALEJANDRO GARCIA DE LOS SANTOS

MEXICO, D. F.

1988



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 está 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.

I N D I C E

<u>Resumen</u>	<u>Página</u>
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	5
a) Enzimas celulolíticas.	5
b) Fraccionamiento, purificación y caracterización de celulasas.	9
c) Efecto de la fuente de carbono sobre la producción de enzimas celulolíticas. .	10
d) Características del hongo levaduriforme <u>Aureobasidium</u> sp.	11
III. MATERIALES Y METODOS	15
a) Reactivos.	15
b) Microorganismo.	15
c) Obtención de un filtrado enzimático libre de células y sólidos en suspensión.	16
d) Determinación de las diferentes actividades enzimáticas.	16
e) Determinación de proteína.	18
f) Concentración del filtrado enzimático.	19
g) Fraccionamiento cromatográfico de las diferentes actividades enzimáticas. ...	19
h) Electroforesis.	19
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	23
V. CONCLUSIONES	35
VI. BIBLIOGRAFIA	37

R E S U M E N

El presente estudio tuvo como objetivo conocer la composición enzimática del sistema celulolítico extracelular producido por el hongo Aureobasidium sp. cuando es cultivado en bagacillo de caña nativo (sin pretratar) como única fuente de carbono, y comparar este patrón enzimático con el sistema celulolítico producido por el mismo microorganismo -- cuando es cultivado sobre celulosa microcristalina altamente purificada (avicel).

El fraccionamiento cromatográfico en DEAE-sephadex A-50 y electroforesis no desnaturizante en gel de poliacrilamida, demuestran que el sistema celulolítico producido en bagacillo de caña por este microorganismo está constituido al menos por tres tipos de celulasas , tres tipos de xilanasas y tres beta- glucosidasas.

Cuando este sistema celulolítico se comparó con el sistema enzimático producido en celulosa microcristalina se observó, que en bagacillo de caña se producen dos tipos de xilanasas y dos tipos de beta- glucosidasas las cuales no se producen cuando el microorganismo fué cultivado en celulosa microcristalina.

Estos resultados sugieren que debido a su composición enzimática, el sistema celulolítico producido en bagacillo de caña por el hongo Aureobasidium sp. esta mejor constituido para catalizar la bioconversión de desechos lignocelulósicos nativos a azúcares solubles fermentables.

INTRODUCCION

Una gran cantidad de biomasa vegetal constituida principalmente de celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina, es anualmente producida como resultado de la fotosíntesis. Gran parte de este material vegetal se acumula en forma de subproductos de la actividad agrícola y forestal (Dunlap y Chiang, 1980). Como ejemplo de estos subproductos lignocelulósicos encontramos los bagazos, pajas y rastrojos provenientes de la agricultura; cáscaras de frutas y verduras, pulpas y fibras generados por las agroindustrias, así como aserrín y birutas producidas durante la industrialización de los recursos forestales (Reese, et al., 1972).

Actualmente sólo algunos de estos subproductos tienen un mercado, pero la mayor parte son considerados materiales de desecho y el abandonar estos residuos en terrenos cercanos al sitio de producción ha sido la opción más barata, con el consiguiente efecto nocivo sobre el medio ambiente (Reese, et al., 1972; Dunlap y Chiang, 1980). De manera tradicional y empírica, se ha venido haciendo uso de estos materiales; en algunas ocasiones son quemados para utilizarse como combustible, pero este uso resulta muy poco eficiente debido al bajo valor calorífico que poseen estos materiales con respecto a otros combustibles derivados del petróleo. Un bajo porcentaje de estos materiales es usado directamente en la alimentación animal, con resultados poco satisfactorios debido a su baja digestibilidad y nulo contenido proteico. También estos materiales son utilizados como abono orgánico para el mejoramiento de suelos, pero el escaso contenido de nitrógeno aprovechable por las plantas ha limitado esta aplicación.

Los materiales lignocelulósicos de desecho constituyen un vasto recurso natural renovable, que debido a su composición y abundancia pueden ser utilizados como materia prima en diferentes procesos biotecnológicos. Por esta razón, desde hace varios años ha existido interés científico y tecnológico enfocado al uso racional y eficiente de este valioso recurso (Ghose y Ghosh, 1979).

En nuestro país, uno de los desechos lignocelulósicos más abundante es el bagacillo de caña, el cual es obtenido durante el proceso de extracción de azúcar en los ingenios. A diferencia del bagazo, el cual es utilizado para producir principalmente cartón y papel, el bagacillo de caña es subutilizado. Hasta ahora, las investigaciones dirigidas al aprovechamiento biotecnológico de este desecho se encuentran a nivel laboratorio y planta piloto, y se han centrado principalmente en usar este residuo para la producción de biomasa (proteína unicelular). Sin embargo, en nuestro laboratorio se han venido desarrollando, desde hace varios años, proyectos de investigación enfocados a la utilización de éste y otros materiales lignocelulósicos agroindustriales como sustrato de fermentación, para la -- obtención de enzimas microbianas de interés industrial, particularmente para la producción de celulasas y xilanasas (Huitrón, et al., 1984).

Estas enzimas son importantes debido a la aplicación directa que tienen en la industria textil, alimentaria y farmacéutica, pero el principal interés de las enzimas celulolíticas consiste en el uso que se les puede dar en la conversión de materiales lignocelulósicos de desecho en azúcares solubles de importancia industrial. Sin embargo, para poder llevar a cabo el desarrollo de esta biotecnología, es necesario disponer de --

preparaciones celulolíticas constituidas por una variedad de enzimas con capacidad para hidrolizar la celulosa y hemicelulosa tal como están presentes en los desechos lignocelulósicos, es decir, sin haber sido sometidas a ningún tratamiento químico o físico.

En virtud de esto, se aisló un hongo levaduriforme del género Aureobasidium, el cual se caracteriza por producir altos niveles de celulasas y xilanasas extracelulares cuando es crecido sobre celulosa microcristalina con un alto grado de pureza y composición homogénea (Gilbon, et al., 1981). Sin embargo, dado que este sustrato resultaría demasiado costoso al momento de producir celulasas a mayor escala, se ha venido utilizando el bagacillo de caña como sustrato inductor de estas enzimas en un medio de cultivo simple y económico de tipo industrial (Huitrón, et al., 1984).

Sería muy importante llegar a producir las celulasas a partir de bagacillo de caña, ya que utilizar un subproducto agroindustrial durante un proceso comercial a gran escala, abarataría uno de los principales costos durante la producción de estas enzimas, que es el concerniente a la fuente de carbono.

Además de esta ventaja, pensamos que mediante el uso de bagacillo de caña como sustrato inductor de celulasas en el hongo Aureobasidium sp., es posible inducir un sistema multienzimático en el cual se encuentre, además de las enzimas inducibles por celulosa microcristalina, otro tipo de actividades enzimáticas relacionadas con la hidrólisis de hemicelulosa, las cuales son capaces de contribuir con mayor eficiencia a catalizar la bioconversión de los materiales lignocelulósicos de desecho a azúcares fermentables. La composición enzimática, por lo tanto, es un aspecto relevante para la aplicación de las enzimas celulolíticas.

El presente trabajo tiene como finalidad conocer la composición enzimática del sistema celulolítico extracelular producido por el hongo Aureobasidium sp. cuando es cultivado en bagacillo de caña nativo sin pretratar como única fuente de carbono, y comparar este patrón enzimático con el sistema celulolítico producido por este mismo microorganismo cuando es cultivado en celulosa microcristalina, con el fin de conocer si existe una variación en la composición enzimática de los filtrados enzimáticos producidos por el mismo microorga-nismo en las dos fuentes de carbono.

ANTECEDENTES

a) Enzimas celulolíticas.

Se denomina celulasas al conjunto de enzimas que participan en la degradación de la celulosa hasta glucosa. Estas enzimas rompen los enlaces B-1,4 glucosídicos de la cadena de celulosa, rindiendo glucosa, celobiosa y otros oligosacáridos como productos de reacción.

La capacidad de producir enzimas celulolíticas está ampliamente distribuida entre los microorganismos, principalmente bacterias y hongos, los cuales utilizan la celulosa como fuente de carbono para su nutrición, hidrolizándola a pequeños azúcares capaces de atravesar la pared celular (Mandels y Weber, 1969; Goksoyr y Eriksen, 1980). Muchos microorganismos degradan celulosa por contacto directo con el sustrato, debido a que sus enzimas están integradas a la superficie celular. Sin embargo, muchas bacterias y hongos son capaces de crecer sobre celulosa mediante la secreción de actividad celulolítica al medio ambiente.

La actividad celulolítica es de gran importancia biológica, ya que es indispensable en el ciclo del carbono para la formación de bióxido de carbono, agua y humus a partir de materia orgánica vegetal en descomposición.

Desde el punto de vista práctico, dicha actividad enzimática tiene un gran potencial de ser utilizada. De hecho, las celulasas microbianas son actualmente producidas de manera comercial por fermentación, debido a la aplicación que tienen en

la industria farmacéutica y textil, así como en la transformación de alimentos (Toyama, 1969; Ghose y Pathank, 1973). Sin embargo, el principal interés a futuro que tiene la producción de enzimas celulolíticas, se centra en poder utilizarlas en un proceso de conversión a través del cual los materiales lignocelulósicos de desecho provenientes de la actividad agrícola y forestal sean transformados en azúcares solubles de fácil utilización en otros procesos de la industria biotecnológica (Mandels y Weber, 1969; Ghose y Ghosh, 1979).

La degradación de los materiales lignocelulósicos de desecho resulta ser un problema complejo, debido principalmente a que, además de celulosa, se encuentran otros componentes como hemicelulosa y lignina, por lo que se requiere producir preparaciones enzimáticas capaces de degradar los diferentes componentes de este sustrato (Ghose y Ghosh, 1979; Sprey y Lambert, 1983).

En las preparaciones enzimáticas de hongos productores de celulasas está bien establecido que al menos existen tres tipos de actividad celulolítica, las cuales se pueden clasificar, de acuerdo con la reacción que catalizan, de la siguiente manera (Lee y Fan, 1980; Gilbert y Tsao, 1983):

- 1) Endoglucanasas (1,4-B-D-glucan 4-giucanohidrolasa, EC 3.2.1.4). Este grupo de enzimas actúa de manera aleatoria en el rompimiento hidrolítico interno de la cadena de celulosa, principalmente en regiones de baja cristalinidad.
- 2) Exoglucanasas. Estas enzimas pueden ser de dos tipos: 1,4-B-D glucan celobiohidrolasas, EC 3.2.1.91,

las cuales liberan celobiosa de los extremos no reductores de la cadena de celulosa; 6 1,4-B-D-glucan glucohidrolasas EC 3.2.1.74, las cuales hidrolizan los extremos no reductores de la celulosa para rendir unidades de glucosa.

- 3) B-D-glucosidasas (beta-glucosidasas). Estas enzimas hidrolizan celobiosa y celooligocacáridos de cadena corta a glucosa.

Estos tres tipos de actividades constituyen un sistema enzimático indispensable para la degradación de celulosa organizada, la cual requiere de la acción sinérgica entre los componentes de dicho sistema enzimático para poder llevar a cabo una completa hidrólisis de celulosa (Wood y McCrae, 1978); Ghose y Bisaria, 1979; Henrissat, et al., 1985; Fujii y Shimizu, 1986).

El mecanismo de acción de las diferentes enzimas que componen el sistema celulasa ha sido intensamente investigado y ampliamente revisado por Lee y Fan, 1980; y por Gilbert y Tsao, 1983. El modelo más aceptado para la degradación enzimática de la celulosa propone que las enzimas de tipo endo-B-1,4-glucanasa, inician el ataque de manera aleatoria en las regiones de baja cristalinidad de la fibra de celulosa; los extremos formados por la acción de estas enzimas son degradados por las exo-B-1,4-glucancelobiohidrolasas, liberando celobiosa a partir del extremo no reductor. La celobiosa es posteriormente hidrolizada a glucosa por la acción de las B-glucosidasas. Este mecanismo fue planteado por Wood y McCrae en 1972 y parece funcionar de manera general para los sistemas celulolíticos de la mayoría de los microorganismos estudiados hasta la fecha.

Las celulasas son un sistema enzimático inducible y sujeto a represión catabólica en casi todos los microorganismos estudiados (Montenecourt, et al., 1981); también se puede asumir como una generalidad, que existen isoenzimas para cada una de las diferentes actividades enzimáticas presentes en los sistemas celulolíticos.

Además de celulasas, se ha observado la presencia de xilanasas formando parte de preparaciones celulolíticas. Estas enzimas son muy importantes en los procesos de bioconversión enzimática de desechos lignocelulósicos, ya que se encargan de hidrolizar los xilanos presentes en la porción de hemicelulosa contenida en estos desechos (Tangnu, et al., 1981; McKenzie y Williams, 1984; Hrmová, et al., 1984; Kyriacou, et al., 1987). Al igual que las celulasas, las xilanasas se encuentran constituidas como un sistema multienzimático que, aunque no ha recibido tanta atención como las celulasas, posee un potencial biotecnológico igualmente importante. Las xilanasas, junto con celulasas y pectinasas, son utilizadas para la clarificación de jugos, así como para la maceración de frutas y vegetales. Además, las preparaciones xilanolíticas libres de celulasas tienen aplicación directa en la industria del papel, ya que mediante el pretratamiento de la pulpa de celulosa con estas enzimas, es posible remover la hemicelulosa residual y facilitar la eliminación de lignina presente en la pulpa para producir papel (Biely, 1985; Potanen, et al., 1987).

A pesar de las múltiples investigaciones realizadas en torno al sistema celulolítico y a la aplicación de éste en el aprovechamiento de los materiales lignocelulósicos, hasta el momento no se ha logrado producir enzimas celulolíticas a bajo costo, las cuales puedan ser posteriormente integradas a un proceso de bioconversión enzimática económicamente viable a nivel industrial (Mandels, 1982; Doppelbauer, 1987).

Debido a esto, es necesario continuar realizando investigaciones básicas dirigidas a obtener un mayor conocimiento bioquímico y genético que permita contribuir, junto con otras líneas de investigación, a convertir la tecnología de celulasas para el aprovechamiento biotecnológico de los desechos agroindustriales en un proceso factible a gran escala.

b) Fraccionamiento, purificación y caracterización de celulasas.

Con el propósito de aumentar la eficiencia de sacarificación de los materiales lignocelulósicos de desecho mediante el uso de enzimas celulolíticas, en los últimos años se han estado llevando a cabo múltiples trabajos enfocados al fraccionamiento, purificación y caracterización de estas enzimas, con la finalidad de tener un mayor conocimiento bioquímico de cada uno de los componentes enzimáticos del sistema celulolítico, ya que se ha encontrado que en la medida que se conoce y caracteriza un sistema celulolítico es posible mejorar su aplicación en la hidrólisis de celulosa. Este ha sido el caso en el hongo Trichoderma viride, en el cual se encontró que su sistema celulolítico posee bajos niveles de B-glucosidasa, por lo cual es necesario complementar estas celulasas con B-glucosidasa de otra fuente, para que el sistema celulolítico de este microorganismo sea más eficiente en un proceso de hidrólisis de celulosa (Sternberg, 1977).

Las celulasas de un gran número de microorganismos, entre los que destacan Trichoderma viride (Berghen y Petterson, 1973); Trichoderma Koningii (Wood y Mc Crae, 1972); Trichoderma reesei (Tilbeurgh, et al., 1984; Bhikhabhai, et al., 1984; Kyriacou, et al., 1986); Fusarium solani (Wood, 1969, 1971); Sporotrichum pulverulentum (Eriksson y Petterson, 1975; Almin, et. al., 1975) y Talaromyces emersonii (Mc Hale y Morrison, 1986; Mc Hale, 1987), han sido sometidas a profundos estudios de fraccionamiento y purificación, utilizando diversos métodos para concentrar los filtrados celulolíticos, las más variadas técnicas cromatográficas y mediante el uso de diferentes sistemas de electroforesis y electroenfoque (Lee y Fan, 1980). Actualmente, muchos componentes enzimáticos han sido purificados a homogeneidad y ampliamente caracterizados en cuanto a su peso molecular,

punto isoeléctrico, secuencia de aminoácidos y especificidad de sustrato, lo cual ha permitido orientar las investigaciones hacia campos como la biología molecular y la ingeniería genética de celulasas (Jolift, et al., 1986; Knowles, et al., 1987; Teeri, et al., 1987), los que posiblemente tendrán un impacto aplicado en un futuro próximo.

c) Efecto de la fuente de carbono sobre la producción de enzimas celulolíticas.

En los trabajos que existen en relación a este tipo de estudios, se han comparado las actividades enzimáticas de sistemas celulolíticos inducidos en un mismo microorganismo por sustratos con alto grado de pureza y composición homogénea, como celulosa microcristalina, soforosa y lactosa; sin embargo, es muy poca la información referente al análisis de las actividades celulolíticas inducibles por sustratos heterogéneos nativos, como el bagacillo de caña y otros materiales lignocelulósicos. Casi todos los estudios dirigidos a analizar el efecto de la fuente de carbono sobre la producción de enzimas celulolíticas se centran únicamente en cuantificar estas actividades (Brown, et al., 1987; Lachke, et al., 1987), existiendo muy pocos datos acerca de cómo varía la composición de las enzimas que se encuentran en los filtrados celulolíticos así obtenidos.

A través del fraccionamiento, purificación y caracterización de sistemas celulolíticos, ha quedado de manifiesto que aunque un mismo microorganismo puede producir sistemas celulolíticos idénticos, independientemente de la fuente de carbono que se utilice como sustrato inductor (Gong, et al., 1979; Zhu, et al., 1982), ha sido reportado recientemente en la literatura que esto no ocurre para el hongo termofílico Talaromyces emersonii, en el cual se encontró que de las tres endoglucanasas que se producen cuando este microorganismo es crecido sobre celulosa microcristalina, sólo dos

de ellas aparecen cuando este microorganismo fue cultivado en lactosa como fuente de carbono (Mc Hale y Morrison, 1986; Mc Hale, 1987); sin embargo, este hecho ha sido poco estudiado en la mayoría de los microorganismos celulolíticos.

Si consideramos que una preparación enzimática capaz de hidrolizar eficientemente materiales celulósicos debe estar constituida por múltiples enzimas, las cuales son producidas en respuesta a las características propias del sustrato inductor, desarrollar trabajos de fraccionamiento enfocados a analizar la composición enzimática del sistema celulolítico producido en respuesta a la naturaleza del sustrato, resultan ser de importancia para planear la producción de sistemas enzimáticos más activos, ya que para llevar a cabo una exitosa sacarificación de materiales lignocelulósicos a azúcares fermentables, no sólo es importante caracterizar a los componentes que constituyen los filtrados con actividad celulolítica, sino también conocer el sustrato capaz de inducir el sistema celulolítico más eficiente para realizar este proceso (Knowles, et al., 1987).

d) Características del hongo levaduriforme *Aureobasidium* sp. utilizado en el presente trabajo.

En 1981 se reportó un microorganismo celulolítico verdadero, de tipo levaduriforme, que excreta celulasas capaces de degradar el papel filtro, cuando es crecido en celulosa microcristalina (Gilbon, et al., 1981).

Este microorganismo se aisló y seleccionó a partir de muestras de suelo de cañaveral en un ingenio azucarero en el Estado de Morelos, y fue identificado como un hongo levaduriforme perteneciente al género *Aureobasidium*. Cuando este microorganismo

es crecido en papa dextrosa agar, sus colonias son cremosas, anaranjadas y parecidas a una levadura; sin embargo, sus características morfológicas examinadas con microscopía de luz, mostraron la presencia de un verdadero micelio y blastosporas, lo cual lo ubica como un hongo deuteromiceto de los comúnmente conocidos como hongos levaduriformes. Estas y otras características taxonómicas fueron recientemente confirmadas por microscopía electrónica de barrido (Gilbon, et al., 1986). Dicho microorganismo produce celulasas y xilanasas extracelulares cuando es crecido en un medio de cultivo con celulosa microcristalina como única fuente de carbono, agua destilada, sales grado reactivo y elementos traza (Gilbon, et al., 1981).

Posteriores estudios han demostrado que cuando el hongo -- Aureobasidium sp. es crecido en un medio de cultivo con bagacillo de caña sin pretratamiento como única fuente de carbono, agua de la llave y sales grado industrial, se mantiene el mismo nivel de producción de celulasas y xilanasas que para el caso reportado con celulosa microcristalina (Huitrón, et al., 1984).

En la literatura han sido reportados otros microorganismos levaduriformes, como Aureobasidium pullulans (Leathers, 1986), Cryptococcus albidus (Biely, 1980) y Trichosporon cutaneum (Hrmová, 1984), los cuales se caracterizan por producir altos niveles de xilanasas extracelulares; sin embargo, ninguno de ellos produce actividad celulolítica capaz de degradar papel filtro.

El hongo Aureobasidium sp., que es un celulolítico verdadero, tiene características importantes que representan ventajas al momento de llevar la producción de celulasas a mayor escala:

- i) Crece con facilidad y produce celulasas en bagacillo de caña sin pretratamientos. Esto es un aspecto importante, ya que la mayoría de los microorganismos celulolíticos, para poder producir altos niveles de celulasas a partir de materiales lignocelulósicos, requieren que este sustrato haya sido pretratado con métodos físicos o químicos (Fan, et al., 1981; Lipinsky, 1979; Beardmore, et al., 1980).

- ii) Es un microorganismo con pocos requerimientos nutricionales para la producción de enzimas, ya que el medio de producción está constituido por bagacillo de caña, fuente inorgánica de nitrógeno y amortiguador de pH grado industrial, así como agua de la llave. A diferencia de lo que ocurre con Trichoderma viride, no es indispensable la adición de proteosa-peptona para la producción de actividad celulolítica.

- iii) En fermentación sumergida no forma pellets (esferas de micelio y sustrato), con lo cual se evitan limitaciones de crecimiento y producción de enzimas por una deficiente difusión y transferencia de nutrientes y oxígeno.

- iv) El crecimiento y la producción de las enzimas celulolíticas es igual a 29°C que a 37°C, lo cual representa una ventaja sobre otras cepas, ya que este hecho podría significar un ahorro de energía al escalar el proceso, debido a que no se necesitaría enfriar el medio de cultivo hasta 29°C.

Hasta ahora, los estudios realizados con el hongo Aureobasidium sp. han estado dirigidos principalmente a una mayor producción de enzimas celulolíticas en medios de cultivo simples y económicos de tipo industrial, con el fin de llevar la producción a una mayor escala. Sin embargo, actualmente se están llevando a cabo investigaciones encaminadas a obtener un mayor concimiento de las enzimas inducibles por bagacillo de caña y por celulosa microcristalina, con la finalidad de contribuir a la caracterización de este sistema enzimático, ya que esto nos permitirá posteriormente dirigir la producción y óptima aplicación de estas enzimas.

MATERIALES Y METODOS

REACTIVOS

Metanol, ácido acético glacial, ácido tricloroacético, dextrosa, ácido cítrico, citrato de sodio, metabisulfito de sodio, fenol, NaCl, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 (J. T. Baker, S.A. de C.V., México); albúmina sérica bovina, xilanos, ácido etilen diamin tetraacético (EDTA), P-nitrofenol (PNF), P-nitrofenol-B - D-glucósido (PNFG) (Sigma Chemical Co., E.U.A.); dodecil sulfato de sodio (SDS), azul de coomasie, acrilamida, biscrilamida, persulfato de amonio, temed, azul de bromofenol (Bio-Rad Laboratories, E.U.A.); ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Aldrich Chemical Co., E.U.A.); xilosa (E. Merck, Alemania); papel filtro No. 1 (Whatman Biochemicals LTD, Inglaterra); reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma de México, S.A.); 2 mercaptoetanol (J. T. Baker Chemical Co., E.U.A.); KH_2PO_4 , K_2HPO_4 (Droguería Cosmopolita, S.A., México); tartrato de sodio y potasio (Química Dinámica, S.A. de C.V., México). El bagacillo de caña se obtuvo del ingenio azucarero "Emiliano Zapata", ubicado en Zacatepec, Mor.

MICROORGANISMO

El hongo Aureobasidium sp. se aisló en nuestro laboratorio a partir de muestras de suelo de un ingenio azucarero y ha sido mantenido en papa dextrosa agar (Gilbon, et al., 1981).

Para la producción de enzimas celulolíticas el hongo se propagó en cajas de petri con papa-dextrosa-agar, incubándose 72 horas a 37°C hasta esporular. De este cultivo se realizó una suspensión de esporas, las cuales se propagaron en el medio de producción durante 24 horas. Con este cultivo se procedió a inocular el fermentador.

OBTENCION DE UN FILTRADO ENZIMATICO LIBRE DE CELULAS Y SOLIDOS EN SUSPENSION.

El lote de enzimas celulolíticas sometido a investigación fue producido en nuestro laboratorio por la Ing. María Elena Acuña, en un fermentador New Brunswick Labroferm Mod. FS-314 de 14 litros, con un medio de producción constituido por bagacillo de caña sin pretratar, sulfato de amonio, urea y fosfato de potasio monobásico, todos grado industrial, y agua de la llave.

La producción se llevó a cabo a 37°C, con una agitación de 200 rpm y un volumen de aire de 0.4 vvm durante 120 horas. Después de este tiempo se recuperó el caldo de fermentación y se dejó reposar en frío durante algunos minutos para que sedimentaran los sólidos.

El líquido así obtenido fue centrifugado dos veces a 10 mil rpm durante 10 minutos en una centrifuga Beckman refrigerada, Mod. J2-21. Posteriormente, todo el sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de 5 micrómetros, empleando un filtro Millipore; mediante este procedimiento se logró eliminar partículas finas de bagacillo que se mantenían en suspensión. De este modo se obtuvo un lote de 5 litros de filtrado enzimático.

DETERMINACION DE LAS DIFERENTES ACTIVIDADES ENZIMATICAS.

Determinación de la actividad celulolítica. Se llevó a cabo por el método reportado por Mandels, et al. (1976), que consiste en la cuantificación de los azúcares reductores producidos por la acción de las celulasas sobre 50 mg de papel filtro en una hora de reacción a 50°C. - -

El uso de papel filtro como sustrato de la enzima se debió a que se trata de una celulosa organizada, con lo que se manifiesta la presencia de endoglucanasas y exoglucanasas del sistema celulasa. El sistema de reacción estuvo compuesto por 50 mg de papel filtro Whatman No. 1 (una tira de 1 x 6 cm, doblada), 1.0 ml de amortiguador de citratos 0.075 M pH 4.8 y 0.5 ml de filtrado enzimático. Después de incubar 1 hora a 50°C, se detuvo la reacción adicionando 3.0 ml de reactivos DNS. Se calentó a ebullición en baño-María por 5 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se completó a un volumen de 20 ml con agua destilada; se agitó vigorosamente y se leyó densidad óptica a 550 nm en un colorímetro Spectronic 20 (Bausch & Lomb). La cantidad de azúcares reductores se calculó utilizando una curva estándar de glucosa (FIGURA 1a).

Preparación del Reactivo de DNS. Este reactivo contiene NaOH 1.4%; ácido 3,5-dinitrosalicílico 0.75%; tartrato doble de sodio y potasio 21.6%; Fenol 0.56%; metabisulfito de sodio 0.50%. Se adicionó cada compuesto en el orden indicado, en agua destilada; una vez que se disolvió completamente, se aforó y se mantuvo en frasco ámbar. El reactivo se mantiene estable al menos por 2 meses (Miller, 1959).

Determinación de la actividad de xilanasas. Se determinó utilizando xilanos como sustrato y cuantificando los azúcares reductores producidos. El sistema de reacción estuvo compuesto de 1.0 ml de xilanos al 0.7%, disueltos en amortiguador de citratos 0.075M pH 4.8 y 0.5 ml de filtrado enzimático. El sistema se incubó a 50°C por 15 minutos. Los azúcares reductores producidos se cuantificaron con el método del reactivo DNS, mediante una curva estándar de D-xilosa (FIGURA 1b)

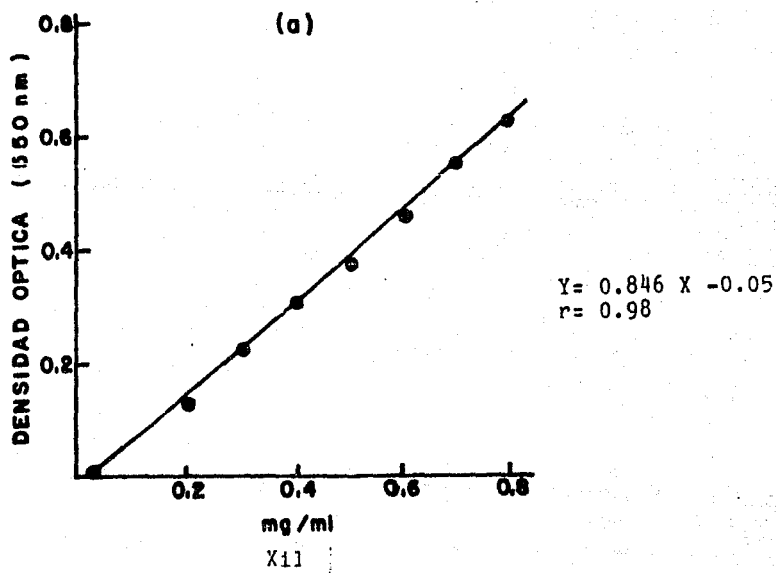
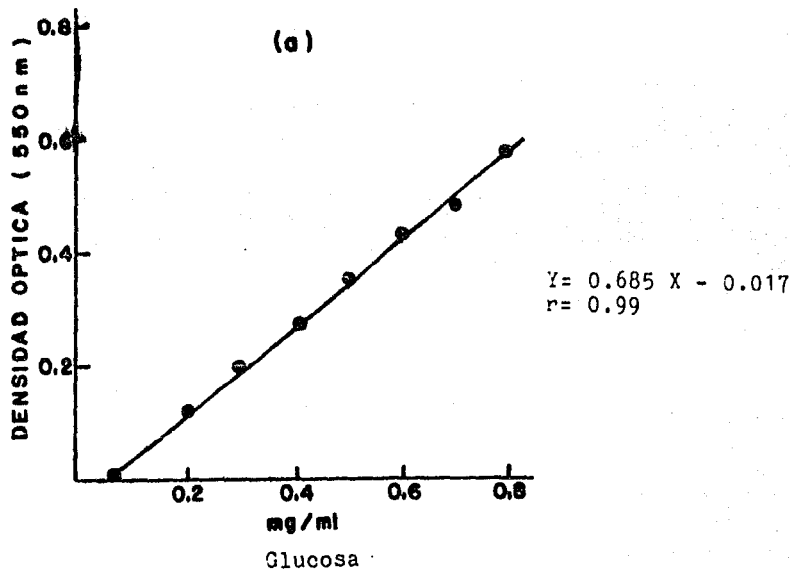


FIGURA 1.- Curva estándar de glucosa (a) ... xilosa (b).

Determinación de la actividad de B-glucosidasa. Esta actividad enzimática se determinó utilizando p-nitrofenol-B-, D-Glucósido (PNFG) como sustrato y cuantificando el p-nitrofenol liberado por la acción de la enzima (Sternberg, 1977). El sistema de reacción estuvo compuesto por 0.25 ml de PNFG 6.0 mM, disuelto en amortiguador de citratos 0.075 M pH 4.8, 0.25 ml de enzima y 0.5 ml del mismo amortiguador anterior. Se incubó por 10 minutos a 50°C. A los 10 minutos exactos se retiró una alícuota de 0.2 ml y se agregó a un tubo de ensayo que contenía 4.8 ml de Na₂CO₃ 0.1 M. El color desarrollado en este tubo se leyó a 420 nm. La cantidad de p-nitrofenol liberado se calculó mediante una curva estándar del mismo (FIGURA 2b).

DETERMINACION DE PROTEINA

Se realizó siguiendo una modificación del método reportado por Lowry, et al. (1951), utilizando una curva estándar de albúmina sérica bovina para su cuantificación (FIGURA 2a).

La determinación consiste en cuantificar el color desarrollado al reducirse el reactivo de Folin-Ciocalteu por el complejo cobre-proteína, de acuerdo con el siguiente método: a un volumen de 1.0 ml, el cual contiene la muestra de proteína y agua destilada, se adicionan 5.0 ml de reactivo E y se agita vigorosamente; se deja reposar a temperatura ambiente de 10 minutos y se agregan 0.5 ml de reactivo de Folin y se agita nuevamente. Después de 30 minutos se lee densidad óptica del color desarrollado a 590 nm.

Los reactivos se preparan de la siguiente manera:

- A) CuSO₄. 5H₂O al 1% en agua destilada.
- B) Tartrato de sodio y potasio al 2% en agua destilada.
- C) Carbonato de sodio al 2% en NaOH 0.1 N.
- D) 1A + 1B = 1D
- E) 1D + 50C = 1E

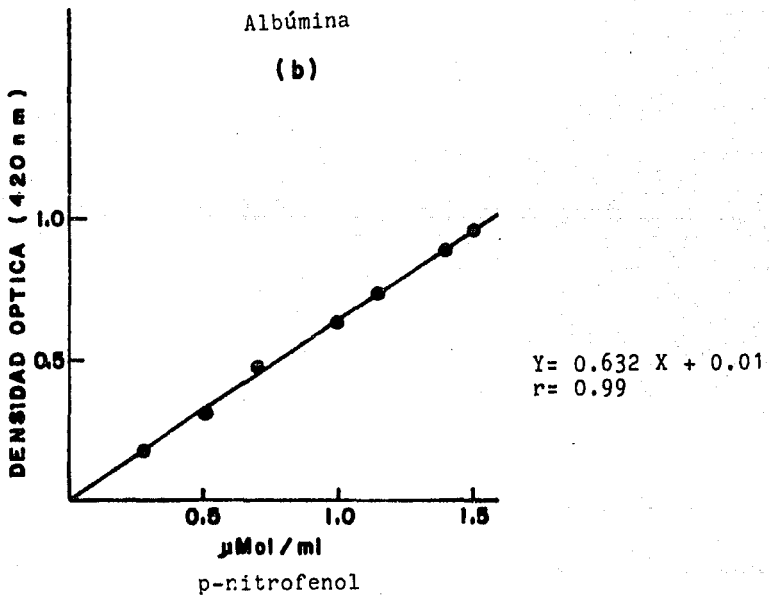
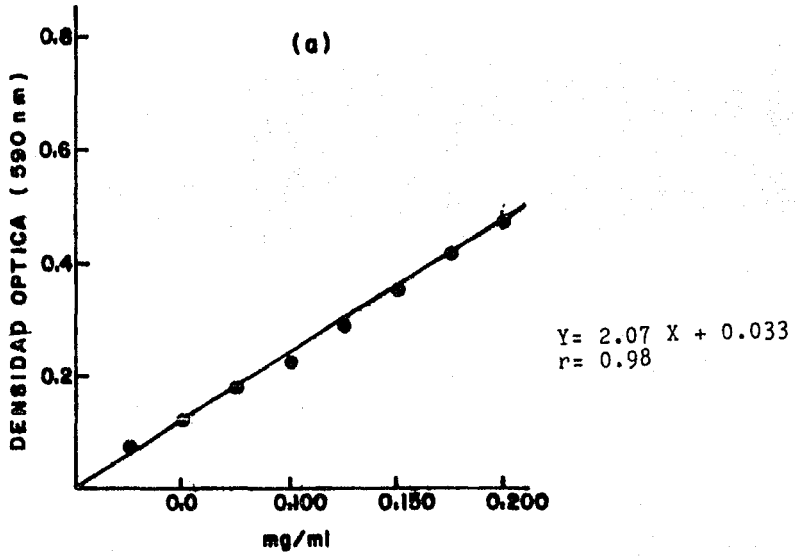


FIGURA 2.- Curva estándar de albúmina sérica bovina (a) y p-nitrofenol (b).

Reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:1 en agua destilada.

Debido a que muchos componentes del filtrado enzimático interfieren en el método de Lowry, para poder cuantificar proteína por este método a las muestras de filtrado enzimático original y concentrado por ultrafiltración fue necesario precipitarlas en frío con ácido tricloroacético (TCA) al 10% durante 24 horas, y posteriormente la proteína precipitada fue resuspendida en 1.0 ml de una solución de NaOH 0.1N (Tan, et al., 1984); de aquí se tomaron alícuotas y se siguió el procedimiento de Lowry anteriormente mencionado.

La cantidad de proteína presente en las fracciones eluidas de las columnas cromatográficas fue cuantificada directamente siguiendo el método de Lowry, sin necesidad de precipitarlas.

CONCENTRACION DEL FILTRADO ENZIMATICO.

Para poder llevar a cabo el fraccionamiento de la actividad enzimática fue necesario concentrar el lote de 5 litros de filtrado enzimático. La concentración se realizó en un equipo Pellicon Millipore de ultrafiltración por flujo tangencial. De este modo, el lote se concentró 5 veces, se dividió en volúmenes de 50 ml y fue almacenado en congelación a - 4°C.

FRACCIONAMIENTO DE LAS DIFERENTES ACTIVIDADES ENZIMATICAS.

Cromatografía de filtración en gel en Sephadex G-150.

Este gel se hidrató resuspendiéndolo en amortiguador de citratos 0.025 M pH 4.8, y posteriormente fue hervido durante

una hora en baño-María. Después de desgasificarlo al vacío, se empacó en una columna de 2.6 x 40 cm. Una vez equilibrada la columna con el amortiguador anterior, una muestra de filtrado enzimático concentrado, conteniendo 50 mg de proteína, fue liofilizado y resuspendido en 3.0 ml del mismo amortiguador anterior. Esta muestra se aplicó a la columna y posteriormente fue eluida con el mismo amortiguador de citratos a un flujo constante de 30 ml/h con una bomba peristáltica. Se recogieron fracciones de 12 ml con la ayuda de un colector automático de fracciones.

Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephadex A-50.

Este gel se hidrató resuspendiéndolo en amortiguador de fosfatos 0.01 M pH 6.8, e hirviéndolo en baño-María una hora. Después de desgasificarlo al vacío, se empacó en una columna de 2.6 x 40 cm. Una vez empacado, la columna fue equilibrada con el mismo amortiguador de fosfatos y se aplicó una muestra de filtrado enzimático liofilizado, conteniendo 60 mg de proteína, disuelta en 3.0 ml del amortiguador anterior.

La columna fue eluida por etapas, iniciando con amortiguador de fosfatos 0.01 M, pH 4.8; posteriormente se eluyó con fosfatos 0.075 M, pH 4.8, y finalmente con fosfatos 0.075 M, pH 4.8, al cual se agregó NaCl a una concentración de 0.2 M. Las fracciones fueron colectadas igual que en el caso anterior.

ELECTROFORESIS

Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.- Se llevó a cabo por la técnica reportada por Laemmli (1970) y requirió

de los siguientes pasos:

a) Preparación de la muestra. Una muestra de filtrado enzimático concentrado fue dializada contra agua a 4°C. Una vez dializada, se tomó una alícuota con una concentración conocida de proteína, la cual fue liofilizada y posteriormente resuspendida a una concentración de 2.0 microgramos/microlitros en una solución que contenía un mililitro de SDS al 10%, 100 microlitros de 2-mercapto etanol, 1.0 ml de glicerol, 1.0 ml de amortiguador tris-HCl 0.05 M, pH 6.8; 0.02 ml de azul de bromofenol al 0.05%; 4.7 ml de agua destilada y 1.0 ml de EDTA al 7.5%. La mezcla de proteína y solución se sometió a ebullición durante cinco minutos en baño-María. La cantidad de proteína aplicada al gel fue de 200 microgramos por carril en un volumen máximo de 150 microlitros.

b) Preparación del gel. El gel inferior contiene una concentración final de acrilamida al 12.5% y se preparó de la siguiente manera: 6.25 ml de acrilamida 30%; 1.55 ml de bisacrilamida 1%; 4.0 ml de amortiguador tris-HCl 1.5 M, pH 8.7; 0.15 ml de SDS 20%; 3.0 ml de agua, 50 microlitros de persulfato de amonio al 10%. Esta mezcla se desgasificó por dos minutos y se añadieron 10 microlitros de temed; se mezcló ligeramente e inmediatamente después se formó un gel de 14.0 x 8.0 x 0.075 cm.

El gel superior contiene una concentración final de acrilamida al 5% y fue preparado mezclando 0.84 ml de acrilamida al 30%; 1.3 ml de bisacrilamida al 1%; 0.63 ml de amortiguador tris-HCl 1.0 M, pH 6.8; 25 microlitros de SDS al 20%; 2.2 ml de agua y 50 microlitros de persulfato de amonio al 10%. Se desgasificó al vacío cinco minutos en agitación, y posteriormente

se añadieron 15 microlitros de temed a la mezcla. Con este gel se formaron los carriles y 1 cm del gel concentrador.

La electroforesis se corrió a 100 volts hasta que el colorante alcanzó la parte terminal del gel. El amortiguador empleado en la corrida electroforética contiene 60 gr de tris base, 28.8 g de glicina, 10 ml de SDS al 10%, todo mezclado y aforado a 2 litros de agua destilada.

c) Tinción del gel. Después de la electroforesis, el gel fue teñido durante 4 horas en una solución colorante que contiene azul de coomasie 0.06%; metanol 30%; ácido acético 10% y agua 60%. Después de este tiempo, se retira el gel de la solución de colorante, se enjuaga en agua destilada y se lava con ácido acético al 10% hasta la aparición clara de las bandas, quedando totalmente desteñido cuando la otra parte del gel está transparente. El colorante puede ser reutilizado durante varios meses, filtrándolo frecuentemente.

Electroforesis no desnaturalizante en gel de poliacrilamida.

Se llevó a cabo siguiendo la misma técnica mencionada anteriormente, pero sustituyendo el SDS y el 2 mercaptoetanol por agua en la misma proporción.

El gel inferior se preparó a una concentración de acrilamida de 7.5% y el gel superior al 5%. El sistema de amortiguado res utilizado fue el mismo que en el sistema de electroforesis mencionado anteriormente, excepto que se sustituyó el SDS por agua. Después de la electroforesis, el gel fue fijado en ácido tricloroacético al 12.5% durante 5 minutos; se enjuagó con agua destilada y se tiñó y destiñó siguiendo la misma técnica antes mencionada.

RESULTADOS Y DISCUSION

Para conocer la composición enzimática del filtrado celulolítico producido por el hongo Aureobasidium sp. a partir de bagacillo de caña, se planeó llevar a cabo un fraccionamiento cromatográfico de dicho sistema enzimático. Para esto, fue necesario en primer lugar concentrar el filtrado libre de células obtenido del fermentador, debido a que tanto la proteína como las actividades enzimáticas se encontraban diluidas y era necesario contar con muestras de mayor concentración de proteína para aplicarlas a las columnas cromatográficas.

Fue seleccionado para la concentración un método de ultrafiltración con un sistema de flujo tangencial, ya que por este método se pueden concentrar litros de filtrado enzimático en relativamente poco tiempo, y además las proteínas se mantienen en solución durante todo el proceso de concentración, con lo cual se obtienen bajos niveles de desnaturalización enzimática.

En la TABLA I podemos observar los valores de proteína del filtrado enzimático antes y después de ser concentrado por ultrafiltración. Como se puede notar, el filtrado celulolítico original se concentró en términos de volumen cinco veces, llevándolo de cinco litros a un litro en menos de una hora. De los 3,050 mg de proteína inicial, únicamente se recuperaron en la muestra concentrada 1,940 mg (64%); el resto de la proteína, o sea, 1,080 mg (35%), se detectó en la muestra filtrada.

Este 35% de proteína que atravesó la membrana de ultrafiltración podría ser el resultado de una ruptura de dicha membrana: sin embargo, parece no ser el caso, ya que como se puede ver en la TABLA I, esta proteína no mostró actividad celulolítica, lo cual hace suponer que se trata de proteínas filtrables diferentes, con pesos moleculares menores a 10,000, el cual es el límite de retención de la membrana.

TABLA I.- CONCENTRACION DEL FILTRADO CELULOLITICO DEL HONGO Aureobasidium sp. POR ULTRAFILTRACION.

	VOLUMEN (ml)	PROTEINA			CELULASAS		
		(mg/ml)	(mg totales)	(%)	(mg A.R./ml)	(mg A.R.totales)	(%)
MUESTRA ORIGINAL	5000	0.61	3050	100	0.72	3615	100
MUESTRA RETENIDA:							
- (Concentrada)	1000	1.94	1940	64	2.42	2420	66.9
- (Diluida 1:5)		0.38	1940	64	0.674	3354	92
MUESTRA FILTRADA	4000	0.27	1080	35	0.00	0.00	0.00

A.R.: Azúcares reductores, cuando se usa papel filtro como sustrato de reacción.

También en la TABLA I puede notarse que cuando a la muestra concentrada se le determinó la actividad de celulasas, ésta fue muy baja en relación al factor de concentración. Sin embargo, cuando se midió a una concentración de proteína si milar a la usada en el ensayo de la muestra original (dilución 1:5), se recuperó en un 92% la actividad. Esto nos indica que el proceso de ultrafiltración no fue un paso des naturalizante y que el comportamiento observado con la mues tra concentrada se debe probablemente a una limitación de sustrato susceptible a la hidrólisis en las condiciones de ensayo utilizadas. Este mismo efecto fue observado para las celulasas producidas a partir de celulosa microcristalina por este mismo microorganismo (Larios, 1981), así como durante la purificación de celulasas de Penicillium funiculosum (Wood y Mc Crae, 1980).

Otras actividades enzimáticas relacionadas con las celulasas y producidas por el hongo Aureobasidium sp. a partir de bagacillo de caña son xilanasas y B-glucosidasa; en la TABLA II podemos observar los valores para ambas actividades enzimáticas, las cuales fueron recuperadas en un 100% después de con centrar por ultrafiltración. Al igual que para las celulasas, la actividad enzimática real se obtuvo diluyendo cinco veces la muestra concentrada, y como se mencionó anteriormente, este tipo de actividades enzimáticas tampoco fueron detectadas en el volumen de proteína que atravesó la membrana (mues tra filtrada).

Una vez obtenido el filtrado celulolítico concentrado, se procedió a realizar el fraccionamiento cromatográfico de las diferentes actividades enzimáticas producidas por el hongo Aureobasidium sp. en el bagacillo de caña de azúcar como única fuente de carbono. Para ello se siguió el método utilizado para fraccionar a las celulasas producidas por este microorganismo en celulosa microcristalina.

TABLA II. DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS RELACIONADAS A CELULASAS DESPUES DE CONCENTRAR POR ULTRAFILTRACION

	<u>VOLUMEN</u> (ml)	<u>XILANASAS</u>			<u>B-GLUCOSIDASA</u>		
		(mg A.R./ml)	(mg A.R.totales)	(%)	(μ Mol PNF/ml)	(μ Mol PNF) (totales)	(%)
MUESTRA ORIGINAL	5000	4.36	21,800	100	1.93	9,650	100
MUESTRA RETENIDA:							
- (Concentrada)	1000	5.8	5,800	26.6	2.66	2,660	27.6
- (Diluida 1:5)		4.13	20,650	95	2.20	11,000	114
MUESTRA FILTRADA	4000	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

A.R.: Azúcares reductores, cuando se utilizaron xilanos como sustrato de reacción.
 PNF: p-nitrofenol, cuando se utilizó p-nitrofenol B-D-glucósido (PNFG) como sustrato de reacción.

El primer paso de fraccionamiento fue realizado por cromatografía de filtración en gel, utilizando Sephadex G-150. Como se puede observar en la FIGURA 3a, la proteína se logró fraccionar en tres picos claramente definidos; sin embargo, las diferentes actividades enzimáticas fueron eluidas en un solo pico.

Comparando este patrón cromatográfico con el obtenido por Larico (1981) para filtrados enzimáticos producidos por el hongo Aureobasidium a partir de celulosa microcristalina (FIGURA 3b), podemos notar que también en un solo pico se localizó toda la actividad enzimática, sólo que en este caso en el pico se encontró toda la proteína; además, las actividades enzimáticas fueron eluidas en las mismas fracciones en ambos casos.

Los valores de actividad enzimática y proteína de todas las fracciones juntas de cada pico cromatográfico se pueden observar en la TABLA III. Como se puede apreciar, ambos filtrados enzimáticos parten de una concentración similar de proteína, la cual fue recuperada en un 95% al final de la cromatografía. Las actividades enzimáticas localizadas en todo el pico II en ambos casos, también muestran porcentajes de recuperación cercanos al 90%.

Como se puede observar, las celulasas y actividades relacionadas de ambos filtrados enzimáticos mostraron el mismo patrón cromatográfico en Sephadex G-150; sin embargo, con estos resultados no se puede establecer una similitud entre los componentes enzimáticos de ambos sistemas celulolíticos, ya que es probable que el patrón cromatográfico obtenido no sea una consecuencia del peso molecular de las enzimas, sino una deficiente resolución de la columna cromatográfica utilizada.

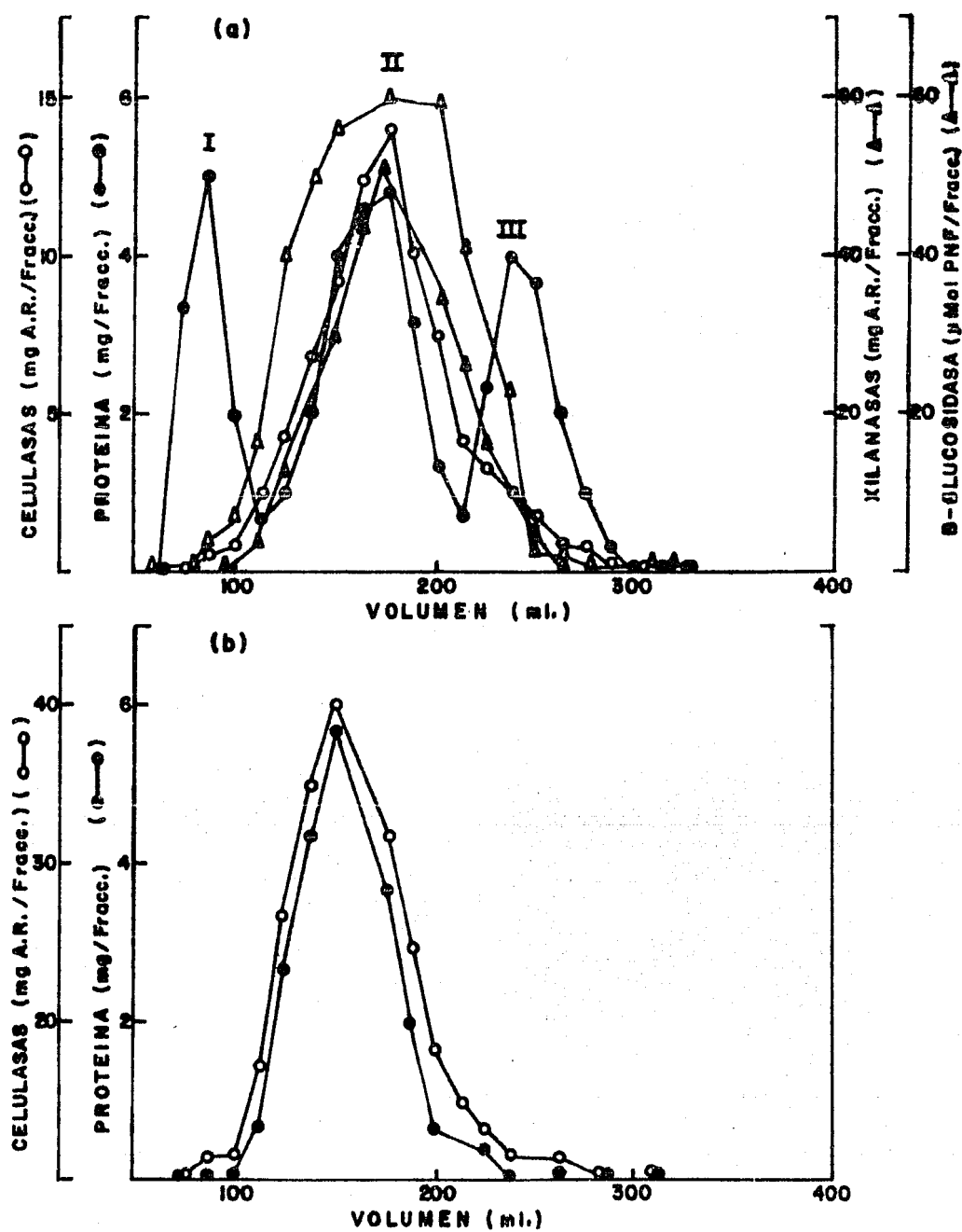


FIGURA 3.- Patrones cromatográficos de los filtrados enzimáticos producidos por el hongo *Aureobasidium* sp. a partir de bagacillo de caña (a) o a partir de celulosa microcristalina (b). Ambos filtrados enzimáticos fueron pasados a través de una columna de filtración en gel con Sephadex G-150.

TABLA III.- CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN GEL EN Sephadex G-150 DE LOS FILTRADOS ENZIMATICOS PRODUCIDOS POR EL HONGO *Aureobasidium* sp. EN BAGACILLO DE CAÑA (BC) Y EN CELULOSA MICROCRISTALINA (CM).

	PROTEINA TOTAL (mg)		CELULASAS (mg A.R. totales)		XILANASAS (mg A.R. totales)		B-GLUCOSIDASA (mMol PNF totales)	
	BC	CM	BC	CM	BC	CM	BC	CM
FILTRADO ENZIMATICO CONCENTRADO	52.0	60.0	90.0	282	556.0	N.D.	296.0	N.D.
PICO I	13.0	0.00	-	-	-	-	-	-
PICO II	22.0	56.5	82.6	241	512.0	N.D.	285	N.D.
PICO III	14.5	0.00	-	-	-	-	-	-
RECUPERACION	49.5 (95%)	56.5 (94%)	82.6 (92%)	241 (85.4)	512.0 (92%)	N.D.	285 (96%)	N.D.

N.D.: No se determinaron.

Cuando los filtrados enzimáticos producidos por el hongo Aureobasidium sp. en ambas fuentes de carbono fueron sometidos a electroforesis con SDS, se observó que las especies moleculares de ambos filtrados celulolíticos se distribuyeron en un rango de 14,000 a 66,000 daltons (FIGURA 4). Estos resultados hacen difícil pensar que proteínas con pesos moleculares tan diferentes pudieran ser eluidas en un número limitado de picos cromatográficos. Por lo tanto, pensamos que la columna cromatográfica utilizada no fue la más adecuada para fraccionar las celulasas producidas por este microorganismo.

Aunque la cromatografía de filtración en gel ha sido reportada para fraccionar con éxito las xilanasas de Aureobasidium pullulans (Leathers, 1986) y las celulasas de Streptomyces flavogriseus (MacKenzie, et al., 1984) y Schizophyllum commune (Desrochers, 1981), en base a nuestros resultados decidimos ahora fraccionar el filtrado enzimático por medio de cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephadex A-50.

Para el fraccionamiento en DEAE-Sephadex A-50, la muestra de filtrado enzimático concentrado se eluyó por etapas, fraccionándose en tres componentes (FIGURA 5). El componente I, el cual comprende las fracciones eluidas entre 70 y 220 ml, fue eluido con amortiguador de fosfatos pH 6.8 0.01M; en este componente detectamos dos picos de proteína. El primero de ellos, formado por las fracciones que van de un volumen de elución de 70 a 110 ml, presenta actividad de xilanasas y B-glucosidas; el segundo pico, constituido por las fracciones eluidas entre 120 y 220 ml, muestra actividad de celulasas, xilanasas y B-glucosidasa. El componente II fue eluido con amortiguador de fosfatos pH 6.8 0.075M; comprende las fracciones que fueron eluidas entre 300 y 400 ml y presenta un único pico simétrico de proteína, en el cual se volvieron a manifestar las celulasas, xilanasas y B-glucosidasa.

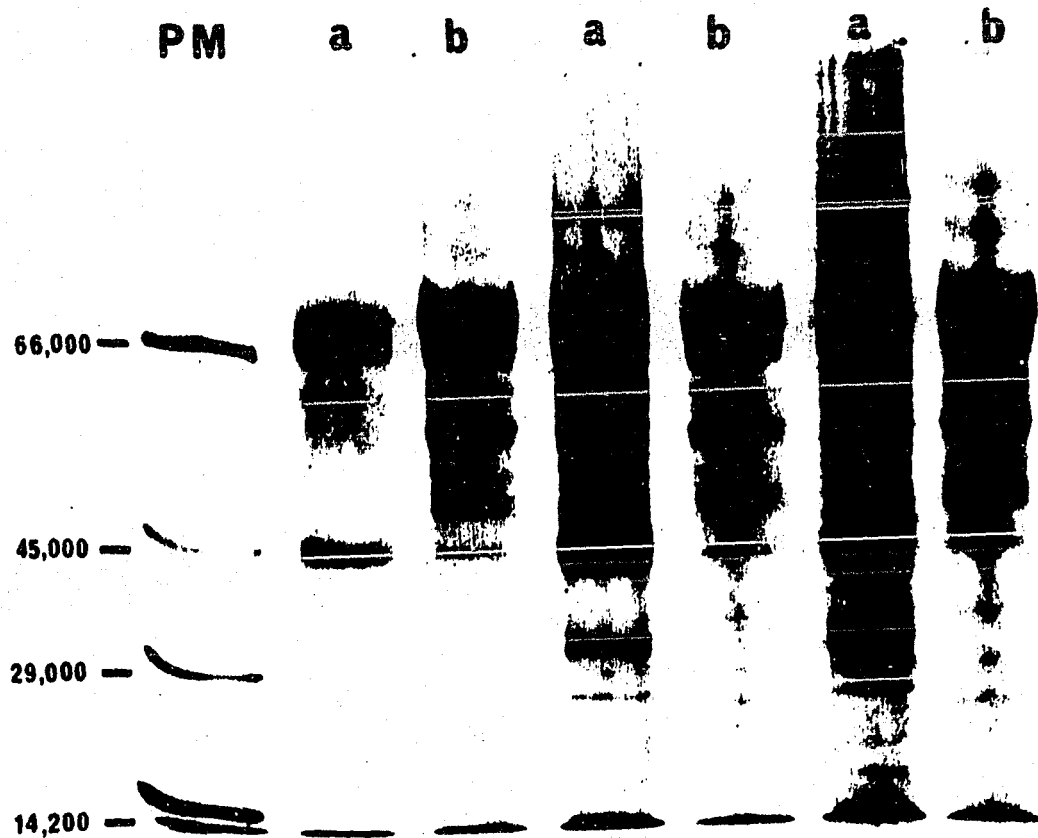


FIGURA 4.- Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de los filtrados enzimáticos producidos por el hongo *Aureobasidium* sp. a partir de bagacillo de caña (a) y celulosa microcristalina (b). PM: marcadores de peso molecular.

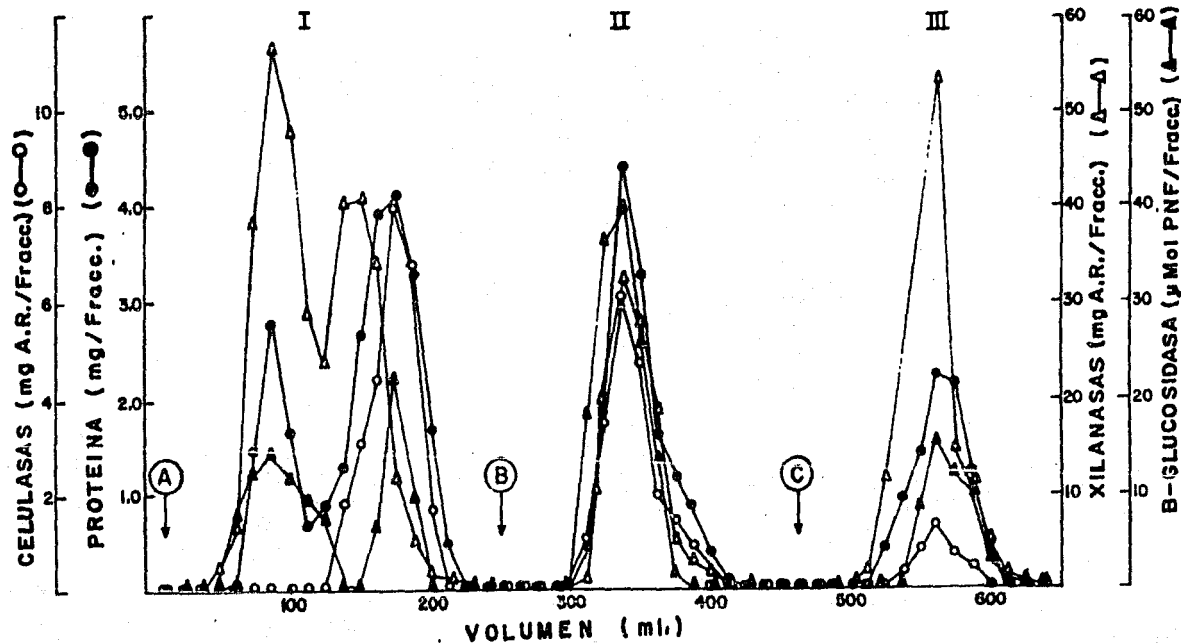


FIGURA 5.-

Fraccionamiento cromatográfico en DEAE-Sephadex A-50 del filtrado enzimático producido por el hongo *Aureobasidium* sp. sobre bagacillo de caña. El componente I fue eluido con amortiguador de fosfatos 0.01M pH 6.8 (A); para el componente II se cambió la concentración a 0.075M (B) y para el componente III al amortiguador anterior se le agregó 0.2M de NaCl.

Por último, se obtuvo el componente III cuando la columna fue eluida con amortiguador de fosfatos pH 6.8 0.075M, al cual se añadió 0.2M de NaCl. Este componente está formado por las fracciones de 500 a 600 ml y presenta un solo pico de proteína, en el cual se detectaron nuevamente tres tipos de actividad enzimática: celulasa, xilanasas y B-glucosidasa.

Como se puede apreciar en la TABLA IV, la proteína se recuperó en un 96% y las actividades enzimáticas de xilanasas y B-glucosidasa muestran valores de recuperación de 93 y 91%, respectivamente, lo cual indica que durante la cromatografía hubo poca pérdida de proteína y que las xilanasas y B-glucosidasas no se vieron afectadas en su actividad.

Por otro lado, la actividad enzimática de celulasas, al ser fraccionada en los tres picos, no se recupera totalmente con respecto al valor de la actividad del filtrado enzimático concentrado aplicado a la columna; esto era de esperarse, ya que al quedar separadas las enzimas celuloíticas después del fraccionamiento, no pudieron actuar de manera sinérgica en la degradación de una celulosa organizada, como lo es el papel filtro, y por consecuencia no alcanzan los mismos niveles de actividad.

Como se puede apreciar en los resultados anteriores (FIGURA 5, TABLA IV), en cada uno de los tres componentes obtenidos por cromatografía siempre están presentes tres tipos de actividades enzimáticas: celulasas, xilanasas y B-glucosidasa. Debido a esto, fue necesario demostrar que las actividades enzimáticas eluidas en diferentes picos, son en realidad enzimas diferentes y que no se trata de las mismas enzimas arrastradas a otro pico por un fraccionamiento defectuoso del filtrado enzimático. Para esto, se realizó una recromatografía de cada pico por separado, utilizando el mismo intercambiador iónico y usando las tres condiciones de elución descritas en

TABLA IV.- CROMATOGRAPIA DE INTERCAMBIO IONICO EN DEAE-Sefadex A-50 DEL FILTRADO ENZIMATICO PRODUCIDO POR EL HONGO Arachasidium sp. EN BAGACILLO DE CASA

	PROTEINA (mg)	RECUPERACION (%)	CELULASAS (mg A.R. totales)	RECUPERACION (%)	XILANASAS (mg A.R. totales)	RECUPERACION (%)	B-GLUCOSIDASA (mMol. PNP totales)	RECUPERACION (%)
FILTRADO ENZIMATICO CONCENTRADO	58.0	100.0	100.0	100.0	620.0	100.0	330.0	100.0
COMPONENTE I	27.8	48.0	29.5	29.5	381	61.4	108	32.7
COMPONENTE II	18.6	32.0	20.1	20.1	73.4	11.8	139.3	42.21
COMPONENTE III	9.4	16.2	4.5	4.5	125.0	20.2	54.0	16.4
RECUPERACION TOTAL	55.8	96.0	54.1	54.1	579.4	93.4	301.3	91.3

el experimento anterior. Con esto se observó que tanto la proteína como las diferentes actividades enzimáticas de cada pico mantuvieron su posición en el cromatograma, y además no se observaron otros picos de la misma actividad.

Estos resultados indican que las actividades enzimáticas que se eluyen en cada uno de los tres componentes cromatográficos son en realidad diferentes enzimas con la misma actividad. De lo anterior se desprende que el sistema celolítico extracelular producido por este microorganismo cuando es crecido en bagacillo de caña, posee cuando menos tres tipos de enzima para cada una de las actividades medidas.

Con la finalidad de conocer si existen diferencias entre las actividades enzimáticas producidas por el hongo Aureobasidium sp. cuando es crecido en bagacillo de caña y cuando es crecido en celulosa microcristalina, se procedió a comparar los patrones cromatográficos obtenidos en DEAE-Sephadex A-50 para ambos filtrados enzimáticos, ya que ambos fueron realizados bajo las mismas condiciones experimentales (Larios, et al., 1982).

En la FIGURA 6 se puede observar que el componente I de ambos filtrados enzimáticos presenta actividad de celulasas, xilanasas y B-glucosidasa. En los componentes II y III del filtrado enzimático producido en bagacillo de caña, la proteína eluida muestra actividad de celulasas, xilanasas y B-glucosidasa, a diferencia de lo que ocurre con el filtrado enzimático producido en celulosa microcristalina, en el cual para los componentes II y III únicamente se encontraron celulasas y no se detectaron xilanasas ni B-glucosidasas.

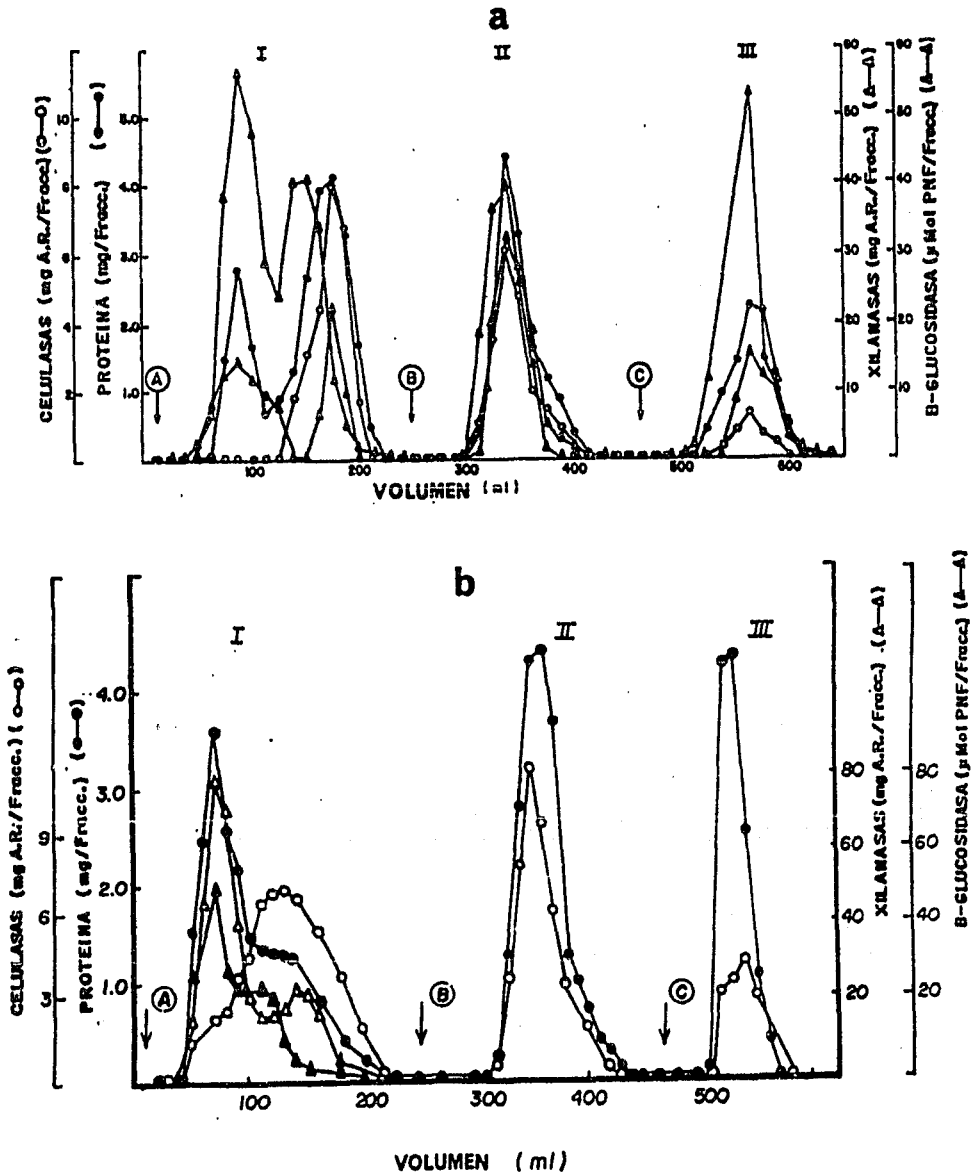


FIGURA 6.-

Patrones cromatográficos de los filtrados enzimáticos producidos por el hongo *Aureobasidium* sp. sobre bagacillo de caña (a) y celulosa microcristalina (b). Ambos filtrados enzimáticos fueron pasados a través de una columna de intercambio iónico en DEAE-Sephadex A-50, bajo las mismas condiciones experimentales. El componente I fue eluido con amortiguador de fosfatos 0.01M pH 6.8 (A); para el componente II se cambió la concentración a 0.075M (B) y para el componente III al amortiguador anterior se le agregó 0.2M de NaCl.

Como se aprecia en la TABLA V, los filtrados enzimáticos que fueron aplicados a la columna parten de una concentración similar de proteína; la recuperación total de proteína fue alta en ambos casos (99% y 96%) y la recuperación de actividades enzimáticas de xilanasas y B-glucosidasas fue de 92% y 98% para filtrados enzimáticos producidos en bagacillo de caña. Estos datos indican que la diferencia entre ambos patrones cromatográficos se debe a que la celulosa microcristalina, que es un sustrato homogéneo en su composición, no induce la biosíntesis de más de un tipo de xilanasas y B-glucosidasas, a diferencia de lo que ocurre en bagacillo de caña.

La aparente pérdida de actividad de celulasas observada en ambos filtrados enzimáticos después de ser fraccionados se debe, como se mencionó anteriormente, a que al quedar separados los componentes enzimáticos no pudieron actuar de manera sinérgica y por lo tanto no lograron expresar su actividad real. Este sinergismo enzimático ha sido reportado para la mayoría de los microorganismos celulolíticos (Wood y Mc Crae, 1978; Ghose and Bisaria, 1979; Fuji y Shimizu, 1986), incluyendo al hongo Aureobasidium sp., en el cual ha sido demostrado que cuando los picos cromatográficos se juntan en la proporción adecuada se recupera el total de la actividad enzimática sobre papel filtro (Larios, et al., 1983).

La cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephadex A-50 ha sido empleada frecuentemente en los trabajos de fraccionamiento y purificación de celulasas y xilanasas (Eriksson and Petterson, 1975; Wood, et al., 1980; Frederick, et al., 1985); además, también había sido utilizada con buenos resultados para fraccionar los filtrados enzimáticos producidos por el hongo Aureobasidium sp. en celulosa microcristalina (Larios, et al., 1982).

TABLA V.-

CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO EN DEAE-Sefadex A-50 DE LOS FILTRADOS ENZIMATICOS PRODUCIDOS POR EL HONGO *Aureobasidium* sp. EN CELULOSA MICRO-CRISTALINA (CM) Y EN BAGACILLO DE CANA (BC)

	PROTEINA TOTAL (mg)		RECUPERACION (%)		CELULASAS (mg A.R. totales)		RECUPERACION (%)		XILANASAS (mg A.R. totales)		RECUPERACION (%)		B-GLUCOSIDASA (mMol. PNF totales)		RECUPERACION (%)	
	CM	BC	CM	BC	CM	BC	CM	BC	CM	BC	CM	BC	CM	BC	CM	BC
FILTRADO ENZIMATICO CONCENTRADO	55	58	100	100	242	100.0	100	100	435.0	620	100	100	420.0	330.0	100	100
COMPONENTE I	22.8	27.8	41.4	48.0	84.5	29.5	34.8	29.5	400.0	381	92.0	61.4	415.0	108.0	98.8	32.7
COMPONENTE II	19.9	18.6	36.2	32.0	52.0	20.1	21.4	20.1	0.00	73.4	0.00	11.8	0.00	139.3	0.00	42.21
COMPONENTE III	12.0	9.4	21.9	16.2	20.0	4.5	8.25	4.5	0.00	125.0	0.00	20.2	0.00	54.0	0.00	16.4
RECUPERACION TOTAL	54.8	55.8	99.5	96.0	156.5	54.1	64.4	54.1	400.0	579.4	92.0	93.4	415.0	301.3	98.8	91.3

TABLA V.-

CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO EN DEAE-Sefadex A-50 DE LOS FILTRADOS ENZIMATICOS PRODUCIDOS POR EL HONGO *Aureobasidium* sp. EN CELULOSA MICRO-CRISTALINA (CM) Y EN BAGACILLO DE CANA (BC)

	PROTEINA TOTAL (mg)		RECUPERACION (%)		CELULASAS (mg A.R. totales)		RECUPERACION (%)		XILANASAS (mg A.R. totales)		RECUPERACION (%)		D-GLUCOSIDASA (mMol. PNF totales)		RECUPERACION (%)	
	CM	BC	CM	BC	CM	BC	CM	BC	CM	BC	CM	BC	CM	BC	CM	BC
FILTRADO ENZIMATICO CONCENTRADO	55	58	100	100	242	100.0	100	100	435.0	620	100	100	420.0	330.0	100	100
COMPONENTE I	22.8	27.8	41.4	48.0	84.5	29.5	34.8	29.5	400.0	381	92.0	61.4	415.0	108.0	98.8	32.7
COMPONENTE II	19.9	18.6	36.2	32.0	52.0	20.1	21.4	20.1	0.00	73.4	0.00	11.8	0.00	139.3	0.00	42.21
COMPONENTE III	12.0	9.4	21.9	16.2	20.0	4.5	8.25	4.5	0.00	125.0	0.00	20.2	0.00	54.0	0.00	16.4
RECUPERACION TOTAL	54.8	55.8	99.5	96.0	156.5	54.1	64.4	54.1	400.0	579.4	92.0	93.4	415.0	301.3	98.8	91.3

El método de análisis comparativo por cromatografía, ha sido también empleado con buenos resultados por Gong, et al., para comparar las endoglucanasas producidas por Trichoderma reesei en diferentes etapas de cultivo; por Araujo y D'Souza para caracterizar las enzimas celulolíticas producidas por Aspergillus terreus y su mutante UNG 1-40, así como por Leathers (1986) para analizar la proteína extracelular y las xilanasas producidas por variantes en color de Aureobasidium pullulans. Sin embargo, existen muy pocos trabajos en los que se analice de manera comparativa la composición enzimática de los filtrados celulolíticos producidos a partir de diferentes fuentes de carbono. Para el caso del hongo Trichoderma reesei, ha sido observado que la proteína extracelular producida en presencia de soforosa como fuente de carbono, exhibe un patrón electroforético en el cual no se observaron algunas de las proteínas producidas en celulosa (Sternberg y Mandels, 1979). En el hongo termofílico Talaromyces emersonii, se encontró que de las tres endoglucanasas que se producen cuando este microorganismo es crecido sobre celulosa, sólo dos de ellas aparecen en filtrados provenientes de medios de cultivo con lactosa como fuente de carbono (McHale y Morrison, 1986; McHale, 1987).

En nuestro trabajo hemos podido observar cómo a través del uso del bagacillo de caña es posible inducir un mayor número de xilanasas y B-glucosidasas en comparación con la celulosa microcristalina. Este efecto del bagacillo de caña de azúcar puede ser explicado en base a que este desecho agroindustrial es heterogéneo en su composición y contiene 30% de hemicelulosa además de celulosa. La hemicelulosa en el bagacillo de caña está formado principalmente (90%) por xilanos, que son polímeros lineales de xilosa con enlaces B-1,4 y múltiples ramificaciones de arabinosa, rhamnosa y ácidos urónicos.

Probablemente conforme el microorganismo va degradando este heteropolisacárido, se forman cierto tipo de inductores de enzimas, los cuales no se producen durante la degradación de celulosa microcristalina.

Como parte de la caracterización de los filtrados enzimáticos producidos en bagacillo de caña por el hongo Aureobasidium sp., se procedió a realizar una electroforesis en gel de poli-acrilamida en condiciones no desnaturalizantes, tanto del filtrado completo como de cada uno de los componentes cromatográficos obtenidos en DEAE-Sephadex A-50. Como se puede observar en la FIGURA 7d, los filtrados enzimáticos completos muestran cuatro bandas bien definidas de proteína y una zona de barrido (parte superior del gel) en la cual existen a su vez cuatro bandas de proteína, las cuales sólo fueron evidentes cuando se corrieron muestras con menor concentración de proteína. Esta zona de barrido corresponde a la proteína eluida en el componente I del intercambiador iónico (FIGURA 7a). El componente I del intercambiador iónico (FIGURA 7a). El componente II presenta dos bandas claramente definidas y una tercera banda muy discreta de proteína hacia la parte superior del gel (FIGURA 7b). El componente III (FIGURA 7c) presenta una evidente banda de proteína y hacia el final del gel aparece un ligero barrido y finalmente una banda muy delgada de proteína.

Como se puede apreciar, las bandas de proteína de cada uno de los tres componentes son diferentes entre sí, lo cual viene a corroborar que cada componente cromatográfico está constituido por enzimas diferentes con el mismo tipo de actividad. También se puede observar que la suma de bandas de proteína de los tres componentes es igual al número de bandas del filtrado enzimático no fraccionado utilizado como control.

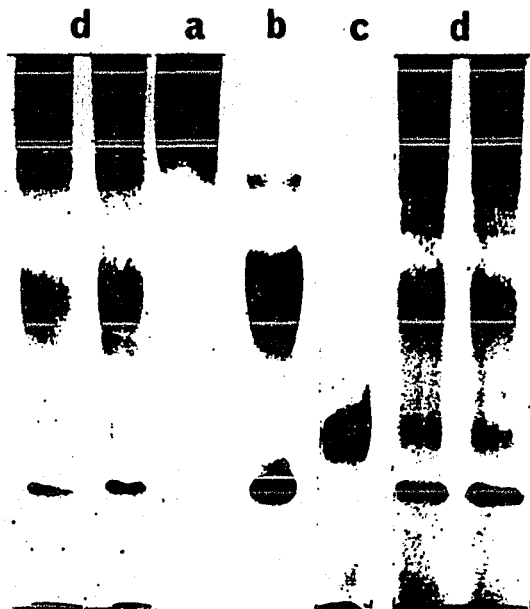


FIGURA 7.- Electroforesis no desnaturizante en gel de poliacrilamida del componente I(a), componente II(b) y componente III(c) obtenidos por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephadex A-50, comparados con el filtrado enzimático completo (d).

Por medio de este tipo de electroforesis pudimos saber que en cada componente cromatográfico existen al menos tres diferentes proteínas, las cuales son responsables de las actividades enzimáticas detectadas.

De los resultados obtenidos en este trabajo se desprende que el hongo Aureobasidium sp. está capacitado genéticamente para producir diversas isoenzimas necesarias para la degradación de materiales lignocelulósicos nativos (sin pretratamiento), pero hay una variación de la composición enzimática, dependiendo de la fuente de carbono que se adicione al medio de cultivo. Este comportamiento se pudo observar claramente cuando el microorganismo creció en bagacillo de caña nativo, en el cual se producen tres tipos de xilanasas y tres tipos de B-glucosidasas, a diferencia de lo que ocurre cuando es cultivado en celulosa microcristalina, donde sólo se produce un tipo de xilanasas y un tipo de B-glucosidasas.

Como se mencionó en los antecedentes, la variación en la composición enzimática de los filtrados celulolíticos producidos en diferentes fuentes de carbono por un mismo microorganismo ha sido poco estudiada, la mayor parte de los trabajos están dirigidos a analizar el efecto de la fuente de carbono sobre la producción de actividad, y en general se abocan a medir los niveles de actividad que se producen y no el tipo y proporción de las enzimas responsables de las actividades. Sin embargo, de acuerdo con estos resultados, se concluye que para el hongo Aureobasidium sp. la actividad celulolítica de los filtrados producidos en bagacillo y celulosa microcristalina no sólo depende de la variación en la concentración de las enzimas producidas, como en el caso de reacciones catalizadas por una sola enzima, sino también de la variación en los tipos de enzimas que constituyen los filtrados con actividad celulolítica.

El hecho de poder producir filtrados enzimáticos enriquecidos en xilanasas y B-glucosidasas mediante el uso de bagacillo de caña como fuente de carbono es muy importante, ya que con la presencia de múltiples xilanasas es posible aumentar la hidrólisis de la porción de hemicelulosa contenida en los desechos lignocelulósicos y de esta forma aumentar la superficie reactiva de la celulosa. La importancia de contar con múltiples B-glucosidasas radica en que estas enzimas hidrolizan celobiosa, que es un producto que cuando se acumula inhibe al sistema celulasa de muchos microorganismos.

Hay que recordar que la degradación de los materiales lignocelulósicos resulta ser un problema complejo debido principalmente a que además de celulosa se encuentran otros componentes como hemicelulosa y lignina, por lo tanto, una preparación celulolítica constituida por múltiples enzimas capaces de hidrolizar a estos componentes, permitirá llevar a cabo una mayor bioconversión de estos materiales sin necesidad de recurrir a la aplicación de costosos pretratamientos físicos y/o químicos.

Por lo tanto, estos resultados tienen una doble ventaja desde el punto de vista práctico, ya que las preparaciones celulolíticas pueden ser producidas a partir de bagacillo de caña, con lo cual se logra un ahorro en la fuente de carbono, pues el costo de los materiales lignocelulósicos de desecho sin pretratar tienen un costo menor que la pulpa de celulosa, la cual actualmente cuesta 450 dólares la tonelada (Doppelbauer, et al., 1987). Por otro lado, es posible aplicar las enzimas así obtenidas, directamente sobre materiales lignocelulósicos sin pretratar y lograr la hidrólisis de los principales componentes de estos sustratos.

Estos resultados deberán ser posteriormente ampliados con estudios sobre la caracterización bioquímica de los principales componentes enzimáticos responsables de la hidrólisis de celulosa y hemicelulosa, así como mediante experimentos en los cuales cada filtrado enzimático o mezcla de ambos sean utilizados para pruebas de sacarificación de materiales lignocelulósicos a tiempos largos de reacción y a mayor escala.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta investigación, se puede concluir lo siguiente:

- 1) El método de concentración por ultrafiltración con flujo tangencial resultó muy adecuado para concentrar el volumen de filtrado enzimático obtenido del fermentador, ya que cada una de las diferentes actividades enzimáticas pudo ser concentrada cinco veces en 45 minutos, prácticamente sin pérdida de actividad.
- 2) El filtrado enzimático del hongo Aureobasidium sp. producido en bagacillo de caña, pudo ser fraccionado por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephadex A-50. Este método nos permitió conocer que este filtrado enzimático está constituido al menos por tres tipos de celulasas, tres xilanasas y tres B-glucosidasas.
- 3) La electroforesis no desnaturizante en gel de poliacrilamida indica que el filtrado enzimático producido en bagacillo de caña contiene nueve bandas de proteína, y que cada uno de los tres componentes cromatográficos obtenidos en DEAE-Sephadex A-50 llevan tres bandas de proteína, diferentes unas de otras.
- 4) La comparación cromatográfica de los filtrados enzimáticos producidos en bagacillo de caña con los filtrados producidos en celulosa microcristalina, demuestra que existe una diferente composición enzimática entre ambos filtrados, específicamente por la presencia de otras dos xilanasas y dos B-glucosidasas

en los filtrados producidos en bagacillo, las cuales no se producen cuando el hongo Aureobasidium sp. fue cultivado en celulosa microcristalina.

Estos resultados claramente indican que existe una variación en la composición enzimática de los filtrados celulóliticos producidos por este microorganismo, dependiendo de la fuente de carbono en que sea cultivado.

Por otro lado, los datos de este trabajo resultan ser de interés práctico, ya que el sistema celulólitico producido en bagacillo de caña, además de tener un costo menor por ser producido en un desecho agroindustrial cuyo precio es sumamente bajo comparado con la celulosa microcristalina, está constituido por un mayor número de xilanasas y B-glucosidasas, con las cuales se favorece el aprovechamiento integral de los desechos lignocelulósicos, evitándose con esto el uso de costosos pretratamientos con los cuales se pretende aumentar la bioconversión enzimática de estos materiales a azúcares solubles fermentables.

LITERATURA CITADA

1. Almin, K., Eriksson, K. y Pettersson, B. Extracellular enzyme system utilized by the fungus Sporotrichum pulverulentum for the breakdown of cellulose. 2: Activities of the five endo-1,4-B-glucanases towards carboxy-methylcellulose. Eur. J. Biochem. 51: 207 (1975).
2. Araujo A. y D'Souza, J. Characterization of cellulolytic enzyme components from Aspergillus terreus and its mutant. J. Ferment. Technol. 64: 463 (1986).
3. Berghem, L. y Pettersson, L. The mechanism of enzymatic cellulose degradation. Purification of a cellulolytic enzyme from Trichoderma viride active on highly ordered cellulose. Eur. J. Biochem. 37: 21 (1973).
4. Bhikhabhai, R., Johansson, G. y Pettersson, G. Isolation of cellulolytic enzymes from Trichoderma reesei QM 9414. J. Applied. Biochem. 6: 336 (1984)
5. Biely, P. Microbial xylanolytic systems. Trends in Biotechnol. 3: 286 (1985)
6. Brown, J., Collins, S. y Wood, T.M. Development of a medium for high cellulase xylanase and B-glucosidase production by a mutant strain (NIG III/6) of the cellulolytic fungus Penicillium pinophilum. Enzyme Microb. Technol. 9: 355 (1987).
7. Desrochers, M., Jurasek, L. y Paice, M.G. High production of B-glucosidase in Schizophyllum commune: isolation of the enzyme and effect of the culture filtrate on cellulose hydrolysis. Appl. Environ. Microbiol. 41: 222 (1981)
8. Dooppelbauer, R., Esterbauer, H., Steiner, W., Lafferty, R.M. y Steinmüller, H. The use of lignocellulosic wastes for production of cellulase by Trichoderma reesei. Appl. Microbiol. Biotechnol. 26: 485 (1987).
9. Dunlap, E.C. y Lin-Chang, C. Cellulose degradation: a common link. En: "Utilization and recycle of agricultural wastes and residues". M. L. Schuler, Edt. CRC Press, USA. pp. 20-65 (1980).

10. Eriksson, K.E. y Pettersson, B. Extracellular enzyme system utilized by the fungus Sporotrichum pulverulentum for the breakdown of cellulose. 1: separation, purification and physico-chemical characterization of five endo-1,4- β -glucanases. Eur J. Biochem. 51: 193 (1975).
11. Frederick, M., Kiang, C.H., Frederick, J. y Reilly, P.J. Purification and characterization of endo-xylanases from Aspergillus niger. I: Two isoenzymes active on xylan backbones near branch points. Biotechnol. Bioeng. 27: 525 (1985).
12. Fujii, M. y Shimizu, M. Synergism of endoenzyme and exoenzyme on hydrolysis of soluble cellulose derivatives. Biotechnol. Bioeng. 28: 878 (1986).
13. Ghose, T.G. y Pathak, A.N. Cellulases. 2: Applications. Process Biochem. 20: 62 (1973).
14. Ghose, T.K. y Ghosh, P. Cellulase production and cellulose hydrolysis. Process Biochem. 14, (11) (1979).
15. Ghose, T.K. y Bisaria, U.S. studies on the mechanism of enzymatic hydrolysis of cellulosic substances. Biotech. Bioeng. 21: 131 (1979).
16. Gilbert, I.G. y Tsao, G.T. Interaction between solid substrate and enzymes in cellulose hydrolysis. En: "Annual report on fermentation processes". G.T. Tsao, Edt. Academic Press. USA, Vol. 6, pp. 323-357 (1983).
17. Gilbon, A., Larios, G. y Huitrón C. Aislamiento y selección de hongos productores de celulasas que degradan celulosa microcristalina. Rev. Tecnol. Aliment. 16, (3): 24 (1981).
18. Gilbon, A., Huitrón, C., González-Farías, F. y Ulloa, M. Scanning electron microscopy of a true cellulolytic strain of Aureobasidium grown on crystalline cellulose. Mycologia, 78, (5): 810 (1986).
19. Goksoyr, J. y Eriksen, J. Cellulases. Economic Microbiology. 5: 283 (1980).

20. Gong, C., Ladisch, M. y Tsao, G.T. Biosynthesis, purification and mode of action of cellulases of Trichoderma reesei. Adv. Chem. Ser. 181: 261 (1979).
21. Henrissat, B., Driuez, H., Viet, C. y Schtlein, M. Synergism of cellulases from Trichoderma reesei in the degradation of cellulose. Bio/Technology, 3: 722 (1985).
22. Hrnová, M., Biely, P., Vrsanská, M. y Petraková, E. Induction of cellulose and xylan degrading enzyme complex in the yeast Trichosporon cutaneum. Arch. Microbiol. 138: 371 (1984).
23. Huitrón, C., Saval, S. y Acuña, M.E. Production of microbial enzymes from agroindustrial by-products. Ann. of the N.Y. Acad. of Science. 434: 110 (1984).
24. Joliff, G., Béguin, P., Jy, M., Millet, J., Ryter, A., Potjak, R., y Aubert, J.P. Isolation, crystallization and properties of a new cellulase of Clostridium thermocellum overproduced in Escherichia coli. Bio/Technology. 4: 896 (1986).
25. Kim, J.H., Hosobuchi, M., Kishimoto, M., Seki, T., Yoshida, T. Taguchi, H. y Ryu, D.O. Cellulase production by a solid state culture system. Biotechnol. Bioeng. 27: 1445 (1985).
26. Knowles, J., Lehtovaara, P. y Teeri, T. Cellulase families and their genes. Trends in Biotechnol. 5: 255 (1987).
27. Kyriacou, A., MacKenzie, R. y Neufeld, R. Detection and characterization of the specific and non specific endoglucanases of Trichoderma reesei: evidence demonstrating endoglucanase activity by cellobiohydrolase II. Enzyme Microb. Technol. 9: 25 (1987).
28. Lachke, A.H., Srinivasan, M.C., Deshmukh, S.S. y Desphande, M.V. Strain selection criteria for Penicillium funiculosum in enzymic hydrolysis of lignocellulosic. Biotechnol. Letters. 9 (2): 147 (1987).
29. Laemli, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T 4. Nature. 22r: 680 (1970).

30. Larios, G. Aislamiento y caracterización de celulasas producidas por *Aureobasidium* sp. en celulosa microcristalina. Tesis para obtener el grado de Maestro en Investigación Biomédica Básica, Colegio de Ciencias y Humanidades, UNAM, 1981.
31. Larios, G., Gilbon, A., Lara, Y. y Huitrón, C. Extracellular cellulases produced by a yeast -like fungus. Enz. Engineering. 6: 353 (1982).
32. Larios, G., Gilbon, A. y Huitrón, C. Sistema celulolítico extracelular de *Aureobasidium* sp. En "Biotecnología de Enzimas". C. Huitrón Edt., UNAM, 1983.
33. Leathers, T.D. Color variants of *Aureobasidium pullulans* overproduce xylanase with extremely high specific activity. Appl. Environ. Microbiol. 52: 1026 (1986).
34. Lee, Y.H. y Fan, T.L. Properties and mode action of cellulase. Adv. Biochem. Eng. 17: 101 (1980).
35. Lipinsky, E.S. Hydrolysis of cellulose: mechanisms of enzymatic and acid catalysis. Adv. Chem. Ser. 181: 7 (1979).
36. Lowry, O.H., Rosenbrough, M.J., Farr, A.L. y Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 256 (1951).
37. MacKenzie, C.R. y Williams, R.E. Detection of cellulase and xylanase activity in isoelectric-focused gels using substrate agar gels supported on plastic film. Can. J. Microbiol. 30: 1522 (1984).
38. MacKenzie, C.R., Bilous, D. y Johnson, K. Purification and characterization of an exoglucanase from *Streptomyces flavogriseus*. Can. J. Microbiol. 30: 1171 (1984).
39. Mandels, M. y Weber, J. The cellulases production. Adv. Chem. Ser. 95: 391 (1969).
40. Mandels, M., Andreotti, R. y Roche, C. Measurement of saccharifying cellulase. Biotech. Bioeng. Symp. 6: 21 (1976).

41. Mandels, M. Cellulases. En: "Annual Reports on Fermentation Processes". G.T. Tsoo Edt., Academic Press, USA. Vol. 5, pp. 35 (1982).
42. McHale, A.P. y Morrison, J. Cellulase production during growth of Talaromyces emersonii CBS 814.70 on lactose containing media. Enz. Microb. Technol. 8: 749 (1986).
43. McHale, A.P. Production and characterization of monoclonal antibodies to the cellulases produced by Talaromyces emersonii CBS 814.70. Biochim. Biophys. Acta. 924: 147 (1987).
44. Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Analytic Chem. 31, (3): 426 (1959).
45. Monteneourt, B., Nhlapo, S., Trimiño-Vázquez, H., Cuskey, S. y Eveleigh, D. Regulatory controls in relation to over production of fungal cellulases. En: "Trends in the Biology of Fermentation for Fuels and Chemicals". A. Hollander Edt. Plenum Press. N.Y. 1981, pp. 35-55.
46. Reese, E.T., Mandels, M. y Weis, L.H. Cellulose as a novel energy source. Adv. Biochem. Eng. 2: 181 (1972).
- 4r. Sprey, B. y Lambert, C. Tritation curves of cellulases from Trichoderma reesei: demonstration of a cellulase-xylanase-B-glucosidase containing complex. FEMS Microbiol. Lett. 23: 21r (1983).
48. Sternberg, D. y Mandels, G.R. Induction of cellulolytic enzymes in Trichoderma reesei by sophorosa. J. Bacteriology. 139: r61 (1979).
49. Sternberg, D., Vijaya Kumar, P. y Reese, E.T. B-glucosidase: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. Can. J. Microbiol. 23: 139 (1977).
50. Tangnf, S., Blanch, H. y Wilke, D.R. Enhanced production of cellulase, hemicellulase and B-glucosidase by Trichoderma reesei (Rut C-30). Biotechnol. Bioeng. 23: 1837 (1981).

51. Teeri, T.T., Lehtovaara, P., Kauppinen, S., Salavuris, I. y Knowles, J. Homologous domains in Trichoderma reesei cellulolytic enzymes: gene sequence and expression of cellobiohydrolase II. Gene. 51: 43 (1987).
52. Tilbeurgh, H., Bhikhabhai, R., Pettersson, G.L. y Clayssens, M. Separation of endo and exo type cellulases using a new affinity chromatography method. FEBS Letters. 169: 215 (1984).
53. Toyama, N. Applications of cellulases in Japan. Adv. Chem. Ser. 95: 359 (1969).
54. Wood, T.M. The cellulase of Fusarium solani. Resolution of the enzyme complex. Biochem. J. 115: 457 (1969).
55. Wood, T.M. The cellulase of Fusarium solani. Purification and specificity of the B-1,4-Glucanase. Biochem. J. 121: 353 (1971).
56. Wood, T.M. y McCrae, S.I. The purification and properties of the C₁ component of Trichoderma koningii. Biochem. J. 128: 1183 (1972).
57. Wood, T.M. y McCrae, S.I. Hydrolysis of cellulose: mechanisms of enzymatic and acid catalysis. Adv. Chem. Ser. 181: 181 (1979).
58. Wood, T.M., McCrae, S.I. y Mac Farlane. The isolation, purification and properties of cellobiohydrolase component of Penicillium funiculosum. Biochem. J. 189: 5 (1980).
59. Zhi, Y., Wu, Y., Chen, W., Tan, C., Gao, J., Fei, J. y Shih, C. Induction and regulation of cellulase synthesis in Trichoderma pseudokoningii mutants EA₃-867 and N₂-78. Enzyme Microb. Technol. 4: 3 (1982).