

0032

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

186

**CARACTERIZACION ELECTROFORETICA DE LAS  
XILANASAS, CARBOXIMETILCELULASAS,  
PECTINASAS Y PROTEASAS DE *Streptomyces  
mexicanus.sp.nov.***

**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 :

**ALFREDO / SANCHEZ DE LA PAZ**



DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARIA ELENA GARCERAN CARRASCO



2003

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

A



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.

# PAGINACIÓN

# DISCONTINUA



**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:

"CARACTERIZACION ELECTROFORITICA DE LAS XILANASAS, CARBOXIMETILCELULASAS, PECTINASAS  
Y PROTEASAS DE *Streptomyces mexicanus*. sp. nov.

realizado por ALFREDO SANCHEZ DE LA PAZ

con número de cuenta 9409313-7 , quién cubrió los créditos de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

DRA. MARIA ELENA FLORES CARRASCO

Propietario

DR. CARLOS HUITRON VARGAS

Propietario

DR. PAVEL PETROSYAN

Suplente

M. EN C. SILVIA GUZMAN BELTRAN

Suplente

BIOL. SARA TERESA MENDEZ CRUZ

Consejo Departamental de BIOLOGIA

M. EN C. JUAN MANUEL RODRIGUEZ CHAVEZ

FACULTAD DE CIENCIAS



**El presente trabajo fue desarrollado en el laboratorio de la Dra. Maria Elena Flores Carrasco, del Depto. de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Maria Elena Flores Carrasco y bajo la supervisión técnica del Dr. Pavel Petrosyan.**

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

## AGRADECIMIENTOS

---

**A la Dra. María Elena Flores Carrasco** por todo el apoyo, cariño y confianza que me ha dado y que es para mí un ejemplo digno de admiración.

**Al Dr. Pavel Petrosyan** por todo su apoyo, amistad y confianza, quien ha sido para mí mas que un amigo y un ejemplo a seguir.

**Al Dr. Carlos Huitrón Vargas** por su amistad, apoyo y ayuda.

**A los miembros del jurado** por sus comentarios y sugerencias.

## AGRADECIMIENTOS

---

**A mi mamá Doro**, a quien quiero mucho y agradezco a Dios por haberme dado la mamá más buena del mundo porque siempre me ha impulsado a ir hacia delante e inculcado los principios éticos y morales.

**A mi papá Marcial** por todo el apoyo confianza, cariño y comprensión que por siempre me ha dado.

**A mi hermanita Dora** porque siempre estuvo a mi lado apoyandome y motivándome a seguir adelante.

**A mi sobrinita Cassandra "Abita"** por que fue el motor que me impulsó y motivó para que yo siguiera adelante.

## AGRADECIMIENTOS

---

**A la Sra. Guillermina "Doña Guille"** por todo su cariño, amistad y apoyo que siempre me ha dado.

**Al Sr. Eduardo** por todo su apoyo, amistad y cariño que me ha brindado.

## AGRADECIMIENTOS

---

**A todos mis maestros de la Facultad de Ciencias.**

**A todos mis amigos de la Facultad de Ciencias, Cinthya, Sara, Silvia, Gabriela, Ana Luisa, Anidia, Brenda, Arturo, Hírám, Hugo, Eduardo, Aldo, Ezequiel, Mario, Carina, Mónica, Lucy, Juan, Edgar, Leonardo, Jorge, Mariana, Walhea, Ernesto, Rodrigo, Carmen, Alma, Rocío, Blanca, Cesar, Felipe, Viviana, Paulina, Mónica y Tóshiko por todo su apoyo y amistad.**

**A mis amigos del Instituto de Investigaciones Biomédicas: Agustín, Andrea, Luz, Gabriela, Eduardo, Silvia, Nadín, Mónica, Bety, Yedany, Guillermo, Perla, Rosalva, Alejandra Evelin y Fermín por los momentos tan agradables que hemos pasado juntos.**

**Y a todas las personas que contribuyeron de alguna manera a hacer posible la elaboración de este trabajo.**

## INDICE GENERAL

Página

Indice de Tablas y Figuras.....	1
Abreviaturas.....	2
I.- Resumen.....	3
II.- Introducción.....	4
III.- Antecedentes	
Pectinasas.....	6
Proteasas.....	9
Carboximetilcelulasas.....	13
Xilanasas.....	15
IV.- Hipótesis.....	21
V.- Objetivos.....	21
VI.- Material y métodos	
Microorganismo.....	22
Producción de enzimas.....	22
Determinación de la actividad de las xilanasas.....	23
Determinación de la actividad de las pectinasas.....	23
Determinación de la actividad de las carboximetilcelulasas.....	23
Determinación de la actividad de las proteasas.....	23
Electroforesis de geles de poliacrilamida ND y SDS-PAGE.....	24
Zimograma para xilanasas.....	24
Zimograma para pectinasas.....	24
Zimograma paracarboximetilcelulasas.....	25
Zimograma para proteasas.....	25
Determinación de pH y temperatura óptimos.....	25
VII.- Resultados y discusión.....	27
VIII.- Conclusiones.....	37
IX.- Bibliografía.....	38

## TABLAS (T) Y FIGURAS (F)

T1.- Enzimas que intervienen en la degradación de sustancias pécticas.....	8
F1.- Mecanismos de degradación de la pectina.....	9
F2.- Mecanismos de hidrólisis por proteasas.....	11
T2.- Proteasas producidas por <i>Streptomyces</i> .....	12
T3.- Enzimas que intervienen en la degradación de la celulosa.....	13
F3.- Mecanismo de degradación de la celulosa.....	14
T4.- Enzimas que intervienen en la degradación del xilano.....	17
F4.- Mecanismos de degradación del xilano.....	18
T5.- Xilanasas producidas por <i>Streptomyces</i> y algunas de sus propiedades.....	19
T6.- Actividades de pectinasas, xilanasas, carboximetilcelulasas y proteasas en los filtrados de <i>Streptomyces mexicanus</i> .....	27
T7.- Resumen de temperatura y pH óptimos, volumen de muestra y tiempo de incubación para cada una de las actividades enzimáticas analizadas.....	28
F5.- Zimogramas en condiciones no desnaturizantes y desnaturizantes de xilanasas producidas por <i>Streptomyces mexicanus</i> .....	29
F6.- Zimogramas en condiciones no desnaturizantes y desnaturizantes de pectinasas producidas por <i>Streptomyces mexicanus</i> .....	30
F7.- Zimogramas en condiciones no desnaturizantes y desnaturizantes de carboximetilcelulasas producidas por <i>Streptomyces mexicanus</i> .....	32
F8.- Zimogramas en condiciones no desnaturizantes y desnaturizantes de proteasas producidas por <i>Streptomyces mexicanus</i> .....	31
T8.- Pesos moleculares de xilanasas, pectinasas, proteasas y carboximetil- Celulasas (CMCasas) detectadas en geles ND-PAGE.....	34
T9.- Pesos moleculares de xilanasas, pectinasas proteasas y CMCasas detectadas en geles SDS-PAGE.....	35

## **ABREVIATURAS**

ARN Ac. Ribonucleico

CMCasas Carboximetilcelulasas

DNS Ac. 3,5-dinitrosalicilico

Mr Peso Molecular aparente

ND No desnaturizante

ND-PAGE Electroforesis en poliacrilamida no desnaturizante

PM Peso Molecular

SDS Dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE Electroforesis en poliacrilamida desnaturizante

## I.- RESUMEN.

*Streptomyces mexicanus* sp. nov. es una especie aislada del suelo de una zona cañera del estado de Morelos, que produce un complejo xilanolítico cuando crece en un medio salino mínimo conteniendo bagacillo de caña como única fuente de carbono, el cual es un desecho agroindustrial de composición compleja. Con objeto de estudiar que otras enzimas hidrolíticas son producidas por *Streptomyces mexicanus* sp.nov. cuando se crece en bagacillo de caña, se llevó a cabo la detección de pectinasas, carboximetilcelulasas (CMCasas), xilanasas y proteasas extracelulares a través de zimogramas en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes y desnaturalizantes. Para lograr una buena detección de todas las isoenzimas correspondientes a las actividades mencionadas en los zimogramas, se optimizaron las condiciones de pH, temperatura y tiempo de incubación de los geles. Los resultados obtenidos mostraron que todas las isoenzimas se detectaron a un pH de 5.0, aunque las CMCasas y pectinasas presentaron una temperatura óptima para los zimogramas de 42°C, mientras las de las xilanasas y proteasas fueron de 50 y 37°C, respectivamente. Los filtrados de *S. mexicanus* sp.nov. crecido en bagacillo de caña por 48 horas mostraron la presencia para los zimogramas nativos, de 3 bandas de actividad de xilanasas, 3 de pectinasas, 5 de CMCasas y 5 de proteasas. En geles con SDS se observaron 4 bandas de actividad de xilanasas, 4 de pectinasas, 4 de CMCasas y 2 de proteasas. Los pesos moleculares de estas proteínas van de 10 a 265 kDa. Algunas de ellas tienen un peso molecular idéntico o muy similar, lo que sugiere que tienen el mismo peso o que una misma proteína podría presentar más de una actividad.

Estos resultados indican que *Streptomyces mexicanus* sp.nov. crecido en bagacillo de caña sintetiza varias isoenzimas de pectinasas, CMCasas y proteasas, además de las xilanasas. Debido a que la mayoría de estas enzimas son inducibles, su presencia en los filtrados obtenidos cuando se crece a este microorganismo en bagacillo, indican que este sustrato es capaz de actuar como inductor de todas ellas. Esta capacidad de producir diferentes enzimas hidrolíticas extracelulares y además varias isoenzimas de cada una de ellas, podría deberse a que este microorganismo se ha seleccionado naturalmente en lugares donde se cultiva, procesa y se ha acumulado el bagacillo de caña de azúcar por muchas décadas y por lo tanto se ha adaptado a utilizarlo eficientemente como fuente de carbono, lo que le podría significar una ventaja ecológica sobre los otros microorganismos presentes en el suelo.

## II.- INTRODUCCION.

---

Las enzimas son catalizadores biológicos que llevan a cabo la multitud de reacciones químicas que ocurren en los organismos. Ellas intervienen en procesos celulares como son la conversión de energía, digestión de alimentos y en la biosíntesis de numerosos compuestos químicos. Además las enzimas pueden ser producidas y utilizadas en una gran cantidad de procesos, como por ejemplo en la industria alimentaria y en la farmacéutica (García-Carreño *et al.*, 1993).

Las enzimas son producidas por diversos microorganismos, incluyendo a las bacterias, actinomicetos, hongos y levaduras. Cabe mencionar que los microorganismos productores de las diferentes enzimas hidrolíticas juegan un papel ecológico muy importante, ya que naturalmente se encuentran en el medio ambiente hidrolizando una gran variedad de polímeros orgánicos que por sí solos serían difícilmente degradados en la naturaleza. En este sentido, diversas enzimas como las celulasas y xilanasas se utilizan en el tratamiento de materiales de desecho o en procesos como el blanqueamiento del papel, evitando la contaminación por sustancias tóxicas (Subramanian y Prema, 2002).

Los *Streptomyces* se utilizan frecuentemente en procesos industriales debido a que son capaces de producir muchas enzimas hidrolíticas útiles, además de producir más del 60% de los antibióticos conocidos (García-Carreño *et al.*, 1993).

*Streptomyces mexicanus* sp.nov. es un microorganismo que pertenece a la familia *Streptomycetaceae*, del orden Actinomicetales. Fue aislado del suelo de una zona cañera en el Estado de Morelos y crece en un medio mínimo produciendo 4 xilanasas libres de celulasas, cuando se adicionan xilanos como única fuente de carbono (Petrosyan *et al.*, 2002). Esta característica de producción de varias isoenzimas es común en los microorganismos y es un fenómeno muy conocido (Wong y Sadler, 1988). Estas isoenzimas con actividad hidrolítica puede representarle al microorganismo muchas ventajas, sin embargo, la más importante es la que se encuentra relacionada con una mayor eficiencia en la hidrólisis de diversos polímeros complejos. Esta capacidad de producir varias enzimas con la misma actividad puede deberse a la presencia de múltiples genes o a un procesamiento postraduccional. En la

literatura existen muchos ejemplos en este sentido, incluyendo a *Aspergillus niger* 14 (John *et al.*, 1979) y *Trichoderma harzianum* que presentan 3  $\beta$ -xilosidasas (Tan *et al.*, 1987), a *Penicillium worthmanni* por presentar 4  $\beta$ -xilosidasas (Deleyn *et al.*, 1978), a *Thermoanaerobacterium* sp. (Lorenz y Wigel, 1997), *Thermotoga maritima* (Bronnenmeier *et al.*, 1995) y *Neocallimastix patriciarum* por presentar 2  $\beta$ -xilosidasas (Williams y Orpin, 1987) y a *Clostridium stercorarium* que sintetiza 6  $\beta$ -xilosidasas (Schwarz *et al.*, 1990).

Por otro lado, muchos microorganismos sintetizan proteínas que presentan más de una actividad hidrolítica, es decir son multifuncionales. Este fenómeno podría deberse a la inespecificidad de la enzima o bien por que dentro de su secuencia presenta varios dominios catalíticos que son capaces de unirse tanto a un sustrato como a otro. En este sentido podemos mencionar a *Bacteroides ovatus* (Whitehead *et al.*, 1995) y *Butyrivibrio fibrisolvens* (Utt *et al.*, 1991) que sintetizan a una proteína con actividades de  $\beta$ -xilosidasa y arabinofuranosidasa; a *Caldocellum saccharolyticum* (Luthi *et al.*, 1990) y *Trichoderma viride* (Ujile *et al.*, 1991) que presentan enzimas con actividades de  $\beta$ -xilosidasa y xilanasas. Por otro lado, *Streptomyces cyaneus* (Zhao *et al.*, 1997) produce una enzima con actividades de endoxilanasas y *p*-nitrofenil xilosidasa. Otro caso es el de *Clostridium stercorarium* el cual produce una proteína con actividades de  $\beta$ -xilosidasa y arabinosidasa (Sakka *et al.*, 1993).

Para establecer si un organismo produce isoenzimas para una actividad enzimática determinada se ha utilizado la técnica de electroforesis en poliacrilamida y la detección de la actividad por zimograma. De esta manera fue posible determinar que *Streptomyces mexicanus* sp.nov. produce varias xilanasas cuando se crece en xilanos comerciales (Petrosyan *et al.*, 2002). Con este antecedente y debido a que el bagacillo de caña es un polímero heterogéneo, se consideró interesante estudiar si *Streptomyces mexicanus* sp. nov. crecido en este sustrato producía pectinasas, carboximetilcelulasas y proteasas además de las xilanasas, a través de zimogramas y así poder establecer si existían también isoenzimas para estas actividades.

### III.- ANTECEDENTES

---

#### Pectinasas

Las sustancias pécticas son un grupo de polisacáridos que junto con la celulosa y la hemicelulosa son los compuestos más abundantes producidos por las plantas. Estas se encuentran en la lamela media de las células vegetales por lo que están involucradas en la adhesión celular y contribuyen a dar estructura y firmeza a los tejidos vegetales. Están constituidas por una cadena lineal de moléculas de ácido galacturónico unidas por enlaces  $\alpha,1-4$ , en donde los grupos carboxilo pueden estar parcial o totalmente esterificados con metanol. Dentro de las sustancias pécticas ha sido identificada la presencia de regiones no sustituidas que contienen exclusivamente unidades de ácido galacturónico metoxilado o no metoxilado, las cuales son más susceptibles a la acción pectinolítica y de regiones altamente sustituidas que son más difíciles de degradar. La L-ramnosa es el sustituyente más abundante de las sustancias pécticas y se encuentra en un 2-4% y está unida a las moléculas de galacturonato por enlaces  $\alpha,1-2$  (Solís, 1997).

Las enzimas pectinolíticas son un grupo de enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza, que se caracterizan por su capacidad para degradar pectina y sustancias relacionadas como el ácido poligalacturónico. Las podemos encontrar en frutas y vegetales, así como en bacterias, hongos y levaduras que son capaces de degradar sustancias pécticas de diversos orígenes. Estas enzimas son importantes desde el punto de vista biológico, ya que intervienen en el ciclo del carbono y en la patogénesis de plantas, en donde actúan como factores de virulencia (Van Buren, 1991). La aplicación práctica más importante de las pectinasas es en la industria alimentaria para la extracción y clarificación de jugos y en la elaboración de vinos (Voragen, 1989).

Existen varios tipos de enzimas pectinolíticas, las cuales se dividen en dos grupos, las pectinesterasas y las despolimerasas (Tabla 1). Las pectinesterasas (PE) actúan removiendo los grupos metoxilo presentes en el carboxilo del ácido polimetilgalacturónico, dando como producto final al ácido poligalacturónico y metanol.

Las despolimerasas rompen los enlaces  $\alpha$ ,1-4 de la cadena principal actuando en dos formas: por hidrólisis incorporando una molécula de agua a la pectina (polimetilgalacturonasas) y al ác. poligalacturónico (poligalacturonasas) y por  $\beta$ -eliminación formando un doble enlace entre los átomos de carbono 4 y 5 de la molécula del galacturonato en la pectina (polimetilgalacturonato liasas) y el ácido poligalacturónico (poligalacturonato liasas). Estas enzimas se clasifican como "exo" y "endo" de acuerdo a su sitio de acción, según actúan sobre el extremo no reductor de la molécula ó cuando actúan aleatoriamente dentro de la molécula polimérica. Otras enzimas que participan en la degradación de sustancias pécticas son las oligogalacturonasas y las oligogalacturonato liasas que actúan sobre dímeros y oligómeros. Todas estas enzimas forman entonces un complejo sistema multienzimático.

Existen otras enzimas accesorias que actúan sobre las sustancias pécticas favoreciendo la acción de las pectinasas. Schols *et al.* reportaron en 1990, la identificación de una ramnogalacturonasa que no es activa sobre el ácido poligalacturónico pero es capaz de degradar las regiones ramificadas dando lugar a tetrámeros de ácido poligalacturónico con ramnosa en el extremo no reductor. Estas enzimas se encuentran en diferentes proporciones en los organismos. Los hongos producen preferentemente poligalacturonasas y pectinesterasas (Aguilar *et al.*, 1986).

Muchas pectinasas extracelulares son sintetizadas en respuesta a la presencia de inductores, como la pectina o desechos agroindustriales que la contengan, los cuales son generalmente insolubles o por lo menos incapaces de ser transportados al interior de la célula, por lo que no pueden ser los inductores directos. Probablemente, los inductores son productos intermedios de la degradación de los primeros, de tal manera que un microorganismo puede producir cierta actividad pectinolítica preferencialmente sobre otras, dependiendo del tipo de inductor presente (Aguilar y Huitrón, 1990; Maldonado *et al.*, 1989).

Las endo-poligalacturonasas presentan valores de pH óptimos entre 4.0 y 6.0, mientras que las exo-poligalacturonasas poseen valores de pH óptimos alrededor de 5.0. La temperatura óptima para la actividad de las pectinasas se ha reportado que se

encuentra entre los 40 y 50°C. En la figura 1 se muestran algunas de las enzimas que participan en la degradación de la pectina.

**Tabla 1. Enzimas que participan en la degradación de las sustancias pécticas**  
(Kilara *et al.*, 1990; Kelly *et al.*, 1983).

ENZIMAS	MECANISMO DE ACCIÓN
<b>Despolimerizantes</b>	
1.- Actúan sobre la pectina	
a) Polimetilgalacturonasas (PMG)	
i) Endo-PMG	Hidrólisis
ii) Exo-PMG	Hidrólisis
b) Polimetilgalacturonato-liasas (PMGL)	
i) Endo-PMGL	Transeliminación
ii) Exo-PMGL	Transeliminación
2.- Actúan sobre ácido péctico	
a) Poligalacturonasas (PG)	
i) Endo-PG	Hidrólisis
ii) Exo-PG 1	Hidrólisis
iii) Exo-PG 2	Hidrólisis
b) Poligalacturonato-liasas (PGL)	
i) Endo-PGL	Transeliminación
ii) Exo-PGL	Transeliminación
3.- Actúan sobre oligo-D-galactosiduronatos	
i) Oligogalacturonasas (OG)	Hidrólisis
ii) Oligogalacturonato-liasas (OGL)	Transeliminación
<b>Pectinesterasas</b>	
a) Pectinmetilesterasas o pectinesterasas (PE)	Hidrólisis

Las pectinasas son producidas por una gran variedad de organismos como las bacterias, levaduras, hongos y plantas (Pilnik y Rombouts, 1981), sin embargo no

existe un organismo en la naturaleza capaz de producir todas las actividades pectinolíticas que se han reportado.

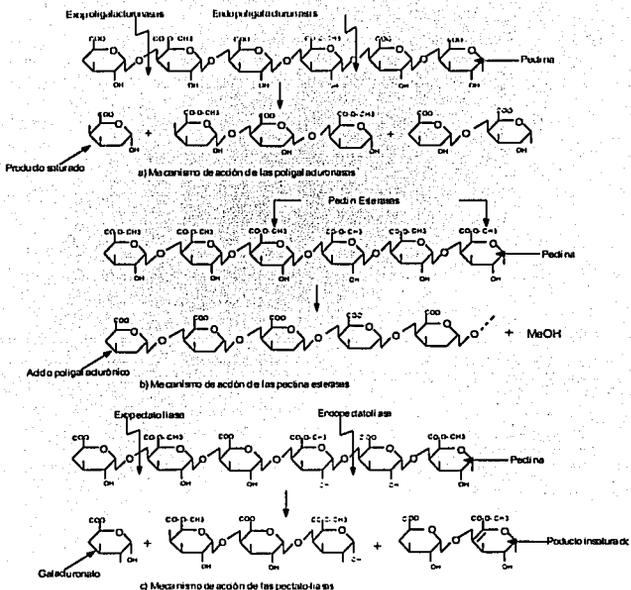


Figura 1. Mecanismos de degradación de la pectina

## Proteasas

Las proteínas son las macromoléculas que mas abundan en las células, de las que llegan a constituir la mitad de su peso seco. Están constituidas por cadenas

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

polipeptídicas muy largas que contienen entre 100 y 1000 unidades de residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos y pueden tener diversas funciones (Lehninger, 1993). Las enzimas encargadas de la degradación de las proteínas son las proteasas (Fig. 2).

En los organismos, la función básica de las proteasas es degradar ciertas proteínas cuando ya no son necesarias y poder reutilizar los aminoácidos resultantes para la síntesis de nuevas proteínas. De esta manera la actividad proteolítica se convierte en un mecanismo regulatorio que coadyuva a mantener los niveles de una proteína en cada momento. Sin embargo, investigaciones más recientes muestran que la proteólisis también juega papeles centrales en otros eventos de regulación post-traduccional. Por ejemplo, se tienen identificadas varias proteasas que intervienen en procesos específicos tales como la esporulación, la maduración de proteínas y la utilización de péptidos exógenos. Por otro lado, existen procesos bioquímicos en los que intervienen las proteasas, tales como la síntesis de proteínas, la inactivación catabólica, el crecimiento celular, la reparación del ADN, la degradación de proteínas defectuosas, la diferenciación morfológica y el desarrollo de micelio aéreo (Chávez Camarillo *et al.*, 1995; Kato *et al.*, 2002).

Las proteasas tienen muchas aplicaciones industriales. Esta versatilidad utilitaria es explicable por la gran diversidad de enzimas proteolíticas que se conocen, su muy variada especificidad y la posibilidad de contar con proteasas activas casi en cualquier intervalo de pH y temperatura. Las proteasas son de considerable valor comercial y se utilizan en la industria alimentaria como ablandadores de carne, en la industria de los detergentes, en el curtido de pieles y en la industria farmacéutica como ayuda digestiva (Peczynska-Czoch y Mordarski, 1988).

Respecto a su clasificación ha habido diversas propuestas, siendo una de ellas la de Hartley (1969), quien clasificó a las enzimas proteolíticas en cuatro grupos: serin-proteasas, tiol-proteasas, metaloproteasas y proteasas ácidas. Las primeras son sensibles al fosfato de fluordisopropilo (DFP) por tener un residuo de serina en su sitio activo; más del 40% de proteasas microbianas pertenecen a este grupo, las cuales por otra parte, frecuentemente son activas en una región de pH de 8 a 12, por lo cual también se denominan proteasas alcalinas. Las del segundo grupo tienen un residuo de

cisteína en su sitio activo y son muy sensibles a los agentes mercuriales como el para-cloromercuribenzoato; solamente unas pocas proteasas son de este tipo; presentan actividad a un pH entre 7.4 y 10. Las del tercer grupo son quelato-sensibles y tienen un átomo metálico (generalmente  $Zn^{2+}$ ) como un componente esencial para su actividad proteolítica. Estas son usualmente más activas a pH neutro (proteasas neutras). Las proteasas ácidas, como su nombre lo indica, son activas a pH ácido y tienen en su sitio activo un grupo carboxilato, generalmente de un residuo de aspartato (Hartley, 1969).

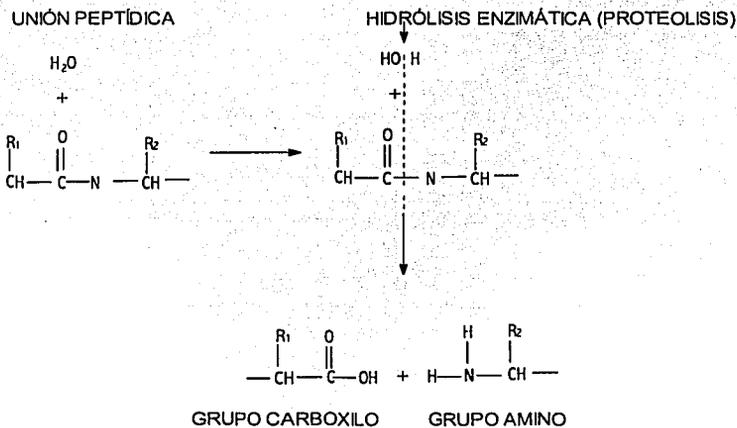


Figura 2. Mecanismos de hidrólisis por proteasas

En cuanto a la temperatura óptima de las proteasas, se ha reportado que se encuentra entre 37 y 50°C; hay que señalar que la mayoría soportan rangos amplios de temperatura.

La capacidad de producir una gran variedad de enzimas proteolíticas es un fenómeno bien conocido en los actinomicetos mesofílicos (Kim y Lee, 1995).

Actualmente existe interés en las proteasas derivadas de actinomicetos termofílicos incluyendo a los miembros del género *Thermoactinomyces* (*Micromonospora*), *Thermomonospora* y *Streptomyces*, aunque éstos no han sido completamente explotados como una fuente potencial no solo de proteasas termoestables sino de enzimas que actúen en un rango de pH muy amplio (Tabla 2).

Como la mayoría de las proteasas microbianas, las de los actinomicetos son excretadas en la fase de crecimiento logarítmica. Para propósitos comerciales, las proteasas son obtenidas rutinariamente como subproductos formados durante la biosíntesis de antibióticos (Pokorny y Vitale, 1980), como por ejemplo de los caldos de fermentación de *S. fradiae* (Morihara *et al.*, 1967), *S. griseus* (Trop y Birk, 1968) y *S. rimosus* (Pokorny *et al.*, 1979). Las preparaciones obtenidas son complejos enzimáticos que contienen una mezcla de endo- y exo-peptidasas. Las preparaciones comerciales son conocidas como Pronasa (*S. griseus*) o Fradiasa (*S. fradiae*). La pronasa es una mezcla de muchas proteasas y peptidasas, 10 de las cuales han sido purificadas a homogeneidad y caracterizadas (Awad *et al.*, 1972).

**Tabla 2.- Proteasas producidas por *Streptomyces*.**

Especie	pH Óptimo	T° Óptima (°C)	Peso Molecular (kDa)	Referencia
<i>S. thermovulgaris</i>	7	37	60	Yeoman <i>et al.</i> , 1997
	7	30	30	Yeoman <i>et al.</i> , 1997
	7	40	28	Yeoman <i>et al.</i> , 1997
	7	55	42	Yeoman <i>et al.</i> , 1997
<i>S. fradiae</i>	7	28		Eliaiah <i>et al.</i> , 1996
<i>S. coelicolor</i>	10	50-80		Taguchi <i>et al.</i> , 1995

## Carboximetilcelulasas

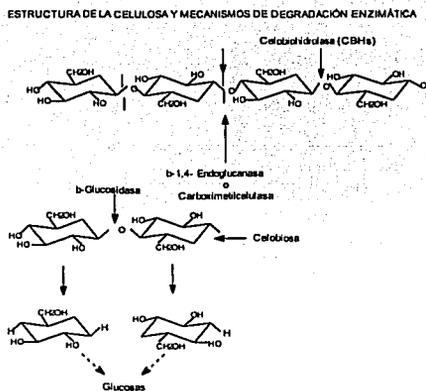
Las carboximetilcelulasas (CMCasas) o endo- $\beta$ -1,4 glucanasas son enzimas que actúan sobre la celulosa, el cual es el polímero natural más abundante en la naturaleza. La celulosa es un polímero muy sencillo que consta de cadenas de glucosa unidas entre sí por enlaces  $\beta$ -1,4. La celulosa se encuentra de dos formas; celulosa cristalina, la cual está formada por muchas cadenas de glucosa mediante un arreglo particularmente muy ordenado, en donde las cadenas se juntan paralelamente originando una estructura muy rígida. La celulosa amorfa o carboximetilcelulosa es la otra forma en que se encuentra este polímero, la que básicamente no tiene un arreglo particular, ya que como su nombre lo indica, no tiene una forma determinada. Estas características de la celulosa van a determinar si pueda o no ser despolimerizada por ciertas enzimas específicas (Fig. 3).

Se han encontrado tres tipos de enzimas que actúan sobre la celulosa y éstas son: celobiohidrolasas (CBHs, E.C. 3.2.1.91), carboximetilcelulosas o endo- $\beta$ -1,4 glucanasas (E.C. 3.2.1.6) y  $\beta$ -glucosidasas (E.C. 3.2.1.21) (Goedegebuur *et al.*, 2002; Tabla 3).

Enzima	Mecanismo de acción
Celobiohidrolasas	Rompe los enlaces $\beta$ -1,4 de la celulosa tanto cristalina como amorfa. La hidrólisis se lleva a cabo en forma azarosa.
Carboximetilcelulosa o Endo- $\beta$ -1,4 glucanasa	Al igual que la enzima anterior rompe los enlaces $\beta$ -1,4 de la celulosa amorfa (carboximetilcelulosa) originando celobiosa (dímeros de glucosa).
$\beta$ -glucosidasa	Enzima que actúa sobre la celobiosa, originando moléculas de glucosa libres.

**Tabla 3.- Enzimas que intervienen en la degradación de la celulosa.**

En los últimos años se les ha dado mucho interés a las carboximetilcelulasas, debido principalmente a la capacidad de convertir eficientemente la celulosa a azúcares libres, lo cual, ofrece un beneficio tanto a nivel ecológico como económico. Además, las carboximetilcelulasas principalmente se usan en la industria textil, de detergentes y la alimentaria (Bhat y Bhat, 1997).



**Fig. 3. Enzimas involucradas en la degradación de la celulosa.**

Entre los actinomicetos, algunas especies mesofílicas y termofílicas han sido estudiadas por su capacidad para degradar a la celulosa. Ciertas cepas de *Thermomonospora* han sido descritas como altamente celulolíticas (Stutzenberger, 1972; Hägerdal *et al.*, 1980; Waldron y Eveleigh, 1986). Este microorganismo produce múltiples endoglucanasa y exoglucanasa extracelulares con temperatura óptima entre 60-70°C y un pH óptimo cercano a 6.0 (Goodfellow

y Cross, 1984). Por otro lado, actinomicetos mesofílicos como *Streptomyces lividans* producen celulasas menos estables a la temperatura (Kluepfel *et al.*, 1986).

## Xilanasas

La hemicelulosa es un heteropolímero que contiene de dos a seis tipos de unidades de pentosas y hexosas; la distribución de estos carbohidratos es frecuentemente utilizada para la clasificación de los tipos de hemicelulosa. D-xilosa, D-manosa, D-glucosa, D-galactosa, L-arabinosa, ácido D-glucurónico, ácido 4-O-metil-D-glucurónico y ácido D-galacturónico son los principales azúcares constituyentes. El grado de polimerización de la hemicelulosa es comúnmente menor a 200 residuos de xilosa (Kulkarni *et al.*, 1999).

La importancia del xilano como fuente de reserva de carbono en la naturaleza está bien ejemplificada en la madera del abedul, donde representa alrededor del 35% de su peso seco. También es muy abundante en la madera de angiospermas constituyendo del 7 al 12% de su peso seco (Wong *et al.*, 1988).

El xilano es un heteropolisacárido que consiste en una cadena principal de residuos de D-xilosil unidos por enlaces  $\beta$ -1,4 (85-93% de la molécula), formando la cadena principal, la cual puede estar altamente ramificada. Los principales sustituyentes son residuos de acetil,  $\alpha$ -arabinosil y 4-O-metil-D-glucuronosil (Subramanian y Prema, 2002).

La hidrólisis de estos heteropolímeros complejos en moléculas simples resulta un tanto difícil. La degradación enzimática es uno de los métodos que más se emplean por presentar ventajas sobre otros, dada la especificidad en el sitio de ruptura; ésta es llevada a cabo por las enzimas xilanolíticas, las cuales están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Son producidas por numerosos organismos procariontes y eucariontes, entre los que se encuentran protozoarios, plantas, hongos y bacterias (Bastawde *et al.*, 1992). Entre estos últimos, los *Streptomyces* son un grupo de actinomicetos que son capaces de producir una gran variedad de xilanasas (Tabla 4).

La gran variedad de organismos que producen xilanasas esta dada por la gran abundancia de los xilanos en la naturaleza. Sin embargo, los organismos más ampliamente estudiados son las bacterias y hongos debido a que éstos son, por excelencia, los más ampliamente usados en diversos procesos industriales. Los ejemplos más claros los podemos encontrar en el uso de xilanasas en el biopulpeo y bioblanqueado de papel, en donde facilitan la liberación de lignina de la pulpa del papel y reduce el nivel de cloro usado como agente blanqueador. La importancia de las xilanasas no se limita a la industria del papel, ya que hay otras industrias en donde se pueden aplicar como en la bioconversión de desechos agrícolas a productos fermentativos, en la clarificación de jugos, mejoramiento de la consistencia de la cerveza, en el aumento de la digestibilidad de alimentos para animales y en el mejoramiento de harinas en panadería (Subramanian y Prema, 2002).

Como ya se mencionó anteriormente, los xilanos presentan estructuras variables y complejas, además resulta aún más complicada por su interacción con otros polímeros, por lo que es necesario un paquete enzimático complejo, para lograr una hidrólisis lo más completa posible. El modo de acción, cinética y otras propiedades de estos sistemas enzimáticos no están aún totalmente estudiados, sin embargo, en términos generales estas enzimas se clasifican principalmente en dos grupos: Endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas (1,4- $\beta$ -D-xilanxilanohidrolasa, E.C.3.2.1.8) y  $\beta$ -xilosidasas o xilobiasas (1,4, $\beta$ -D-xilan xilohidrolasa, E.C.3.2.1.37). Se han reportado también las exo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas (E.C.3.2.1.37), pero son muy raros los microorganismos que las producen. Los grupos laterales presentes en el xilano son liberados por la  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa (E.C.3.2.1.55),  $\alpha$ -D-glucuronidasa (E.C.3.2.1.1), galactosidasa y acetil-xilan-esterasas (E.C.3.1.1.6) (Tabla 4; Wong *et al.*, 1988).

Las xilanasas son proteínas con un rango de peso molecular que va desde los 8 a los 145 kDa. Wong *et al.* (1988) han clasificado a las xilanasas en dos grupos basándose en sus propiedades físicoquímicas, tales como peso molecular y punto isoeléctrico, más que en sus diferentes propiedades catalíticas. Un grupo consiste de las enzimas de alto peso molecular con bajos valores de pI (Familia 10 ó F), mientras que el otro incluye a las enzimas de bajo peso molecular con alto pI (Familia 11 ó G), sin embargo existen las excepciones.

La temperatura óptima de las endoxilanasas en los diferentes organismos varía entre 40 y 60°C, sin embargo las xilanasas fúngicas son más termoestables que las bacterianas. Existen algunas enzimas fúngicas que presentan termoestabilidad a una temperatura de hasta 80°C durante una hora. Con respecto al pH, las xilanasas de diferentes organismos son estables dentro de un rango que va de 4 a 7. El punto isoeléctrico (pI) que presentan las xilanasas se encuentra desde 3 hasta 10.

**Tabla 4 . Enzimas que intervienen en la degradación del xilano.**

Enzima	Mecanismo de acción
Endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas	Actúa cortando el polisacárido al azar produciendo grandes cantidades de xilooligosacáridos de longitud variable (Figura 4 ).
Exo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas	Esta enzima remueve las unidades de xilosa de los extremos no reductores de la cadena del xilano (Figura 4).
$\beta$ -xilosidasa o xilobiasa	Hidroliza disacáridos como xilobiosa y pequeños xilooligosacáridos pero con menos afinidad (Figura 4 ).
Acetil-xilan-esterasas	Hidrolizan el enlace entre el xilano y el grupo acetilo (Figura 4 ).
$\alpha$ -Arabinofuranosidasas	Hidrolizan los grupos terminales no reductores de $\alpha$ -L-arabinofuranosil (Figura 4 ).
$\alpha$ -D-Glucuronidasas	Hidrolizan el enlace $\alpha$ -1,2-glucosídico entre xilosa y el ac. D-glucurónico (Figura 4).

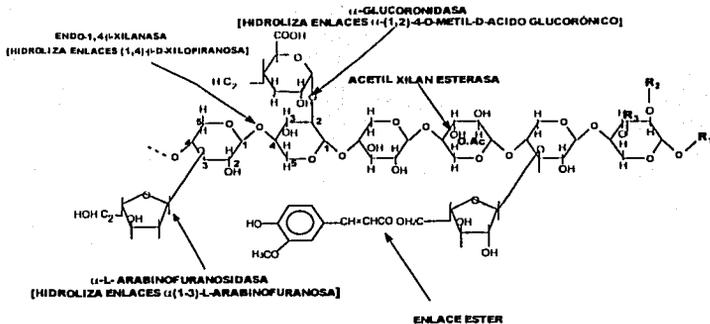


Figura 4. Enzimas que participan en la degradación del xilano.

Los actinomicetos y en especial los *Streptomyces* son un grupo de microorganismos en el que se han encontrado numerosas especies que son capaces de producir enzimas xilanolíticas (Tabla 5) pertenecientes a las dos familias antes mencionadas. Como se puede observar en la Tabla 5, existen algunas especies que producen más de una xilanasas; a este fenómeno se le llama multiplicidad, lo cual se cree que es debido a la estructura compleja del xilano y en el cual, los enlaces xilosídicos son diversos y por esta razón, la hidrólisis del xilano requiere la acción de múltiples xilanasas con diferentes especificidades que pueden ser producto de distintos genes, por diferente procesamiento del ARNm, por modificación postsecrecional de las xilanasas, por digestión proteolítica ó por modificación postraducciona que incluye la glicosilación y la autoagregación (Biely, 1985; Hazlewood y Gilbert, 1993).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 5. Xilanasas producidas por *Streptomyces* y algunas propiedades.**

Espece	pH Óptimo	Temperatura. Óptima (°C)	Peso Molecular (kDa)	Referencia
<i>S. chalaniogensis</i>	6.0	50	48	López <i>et al.</i> , 1998
<i>S. sp.</i>	5.5-6.0	55-60	40.5	Wong <i>et al.</i> , 1998
	5.5	55	44	Wong <i>et al.</i> , 1998
	5.0-6.0	60-65	25	Wong <i>et al.</i> , 1998
	5.5-6.5	60-65	50	Wong <i>et al.</i> , 1988
<i>S. exfoliatus</i>	5.5	50		Wong <i>et al.</i> , 1988
	7.0	55		Wong <i>et al.</i> , 1988
	5.5	55		Wong <i>et al.</i> , 1988
<i>S. flavogriseus</i>	5.5		24	Wong <i>et al.</i> , 1988
	5-7.5		42	Wong <i>et al.</i> , 1988
<i>S. lividans</i>	6.0	60	43	Morosoli <i>et al.</i> , 1986
	6.0	55	31	Morosoli <i>et al.</i> , 1992
	6.0	57	22	Morosoli <i>et al.</i> , 1997
<i>S. xylophagus</i>	6.2	55-60		Wong <i>et al.</i> , 1998
<i>S. sp.</i>	6.0	55	26.4	Elegir <i>et al.</i> , 1994
	6.0	60		Elegir <i>et al.</i> , 1994
<i>S. mexicanus</i> sp. nov.	5.0	50		Flores <i>et al.</i> , 1997
(CH-M-1035)			145 120 60 45	Petrosyan <i>et al.</i> , 2002

**Continuación de la tabla 5**

Especie	pH Óptimo	Temperatura. Óptima (°C)	Peso Molecular (kDa)	Referencia
<i>S. sp. EC. 10</i>	7-8	60	32	Lumba <i>et al.</i> , 1992
<i>S. sp. B-12-2</i>	6-7	55-60	40.5	Elegir <i>et al.</i> , 1994
<i>S. T7</i>	4.5-5.5	60	20	Kesker ,1992
<i>S. thermoviolaceus</i>	7	60-70	54	Tsujibo <i>et. al.</i> ,1992
<i>S. chattanoogensis</i>	6	50	48	López <i>et al.</i> ,1998
<i>S. veridisporus T7A</i>	7-8	65-70	59	Magnuson <i>et al.</i> ,1997
<i>S. sp. QG-11-3</i>	8.6	60		Beg <i>et al.</i> , 2000
<i>S.thermoviolaceus</i> OPC-520	7	60	33	Tsujibo <i>et al.</i> ,1992
	7	70	54	Tsujibo <i>et al.</i> ,1992
<i>S. olivaceoviridis</i> E-86	6	60	23	Kaneko <i>et al.</i> , 2000

***Streptomyces mexicanus.***

*Streptomyces mexicanus* sp. nov. es un microorganismo aislado del suelo de un ingenio localizado en el Estado de Morelos, que tiene como característica que produce xilanasas libres de celobiohidrolasas. Crece bien en un medio mínimo con xilanos o residuos lignocelulósicos como única fuente de carbono a temperaturas entre 37-45°C (Flores *et al.*, 1997). Las enzimas xilanolíticas producidas por este microorganismo son extracelulares y se ha encontrado que se inducen por los xilanos comerciales, bagacillo de caña, cáscara de limón, xilosa, arabinosa, ramnosa y sacarosa. Su síntesis es reprimida por glucosa, glicerol y ac. succínico (Flores *et al.*, 1996; Ramírez, 2003).

#### IV.- HIPÓTESIS

---

*Streptomyces mexicanus sp.nov.* produce diferentes enzimas hidrolíticas, como xilanasas, carboximetilcelulasas, pectinasas y proteasas cuando crece en un medio mínimo con bagacillo de caña, el cual es un sustrato heterogéneo.

#### V.- OBJETIVO GENERAL

---

Identificación de las pectinasas, carboximetilcelulasas, proteasas y xilanasas producidas por *Streptomyces mexicanus sp. nov.* crecido en bagacillo de caña como fuente de carbono a través de zimogramas .

#### VI.- OBJETIVOS PARTICULARES

- ◆ Establecer las condiciones de detección para las carboximetilcelulasas, xilanasas, pectinasas y proteasas en los geles de poliacrilamida, optimizando el pH y la temperatura para los zimogramas.
- ◆ Identificar por zimogramas a las carboximetilcelulasas, xilanasas, pectinasas y proteasas extracelulares que produce *Streptomyces mexicanus sp. nov.* cuando crece en bagacillo de caña como única fuente de carbono.
- ◆ Analizar si algunas de las enzimas presentan más de una actividad.
- ◆ Calcular los pesos moleculares de las diferentes enzimas hidrolíticas producidas por *Streptomyces mexicanus sp. nov.*
- ◆ Comparar los pesos moleculares de las diferentes enzimas hidrolíticas obtenidas.

## VII.- MATERIALES Y MÉTODOS.

### Microorganismo.

En el presente trabajo se utilizó *Streptomyces mexicanus* sp. nov. DSM41796 (Petrosyan *et al.*, 2003). La cepa se mantuvo como suspensión de esporas en glicerol al 40% a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

La esporulación se llevó a cabo en medio YEMES, el cual contenía por litro: 4 g de extracto de levadura, 10 g de extracto de malla, 4 g de sacarosa y 15 g de agar (pH 7.0). La propagación se realizó en un medio mínimo (MM) que contenía por litro 14 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 10 g de la fuente de carbono. El pH del medio se ajustó a 6.5 con NaOH 1 N y se esterilizó a  $120^{\circ}\text{C}$  por 20 min.

### Producción de enzimas.

Para la producción de las enzimas se inocularon 300 ml de medio completo YEMEG (YEMES pero contiene glucosa en lugar de sacarosa) contenidos en un matraz Fernbach con aproximadamente  $10^8$  esporas obtenidas recientemente. Se incubó con agitación a 200 rpm a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. El micelio obtenido (50 ml) se utilizó para inocular seis matraces Fernbach con 500 ml de MM conteniendo 1% (w/v) de bagacillo de caña, los cuales se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación de 200 rpm por 48 horas. Al cabo de este tiempo, se centrifugaron los cultivos por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  a 10,000 rpm en una centrífuga Sorvall. Se decantó el sobrenadante y se precipitaron las proteínas de los sobrenadantes con sulfato de amonio hasta un 95% de saturación. Las proteínas fueron recuperadas por centrifugación y se disolvieron en el mínimo volumen de buffer de acetatos 0.1 M, pH 5.2. Las proteínas se dializaron a través de membranas Spectra/Por (MWCO 6-8000) contra buffer de acetatos 0.02 M, pH 5.2 a  $4^{\circ}\text{C}$ , con tres cambios de buffer cada hora. La cuantificación de proteína se realizó por el método de Bradford. Alícuotas de 1 ml del dializado se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml y se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **Determinación de la actividad xilanolítica.**

La actividad de xilanasas se observó mediante la aparición de azúcares reductores por el método del DNS (Miller *et al.*, 1959). La mezcla de reacción que contenía 0.2 ml de xilano de birchwood al 0.375% (w/v) en buffer acetatos 0.1 M, pH 5.2 y 0-0.2 ml de la enzima, se incubó a 50°C de 0 a 90 segundos. Los valores de absorbancia se interpolaron en una curva estándar de xilosa de 0 a 1  $\mu\text{mol}$ .

#### **Determinación de la actividad pectinolítica.**

La actividad de pectinasas se realizó por la aparición de azúcares reductores de una solución de pectina cítrica de acuerdo a la técnica reportada por Aguilar y Huitrón (1986).

#### **Determinación de la actividad de carboximetilcelulasas.**

La actividad se determinó por la aparición de azúcares reductores, los cuales fueron cuantificados por el método de Miller *et al.* (1959). Se utilizó carboximetilcelulosa al 0.75% (w/v) en buffer acetatos 0.1 M, pH 5.2. La mezcla de reacción se incubó por 60 min.

#### **Determinación de la actividad de proteasas.**

La actividad de proteasas se determinó por la aparición de tirosina, la cual se cuantificó por el método de Lowry (Bollag *et al.*, 1996). Se utilizó caseína al 1% (w/v) en buffer de acetatos 0.1 M, pH 5.2. Se incubó por 10 min a 37°C.

## **Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes y no desnaturalizantes.**

Se prepararon geles al 8% (w/v) de poliacrilamida, tanto en condiciones no desnaturalizantes (ND-PAGE) como desnaturalizantes (SDS-PAGE) de acuerdo a la técnica reportada por Bollag *et al.* (1996).

Para preparar los geles se mezclaron 3.8 ml de H<sub>2</sub>O, 1 ml de xilano de avena (1% w/v en agua), 2.7 ml de acrilamida (30% w/v), 2.5 ml de buffer Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8 (para el gel desnaturalizante, el buffer contenía SDS al 0.4% w/v), 50 µl de persulfato de amonio y 7.5 µl de TEMED. El gel concentrador contenía 2.3 ml de H<sub>2</sub>O, 0.67 ml de acrilamida (30% w/v), 1 ml de buffer Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8, 30 µl de persulfato de amonio y 7.5 µl de TEMED. Los geles fueron de 1.5 mm y se corrieron a 100 mV (corriente constante) a 4°C.

### **Zimogramas para xilanasas.**

Inmediatamente después de la electroforesis, los geles se incubaron 60 minutos con agitación, a una temperatura de 50°C en buffer de acetatos 0.1 M, pH 5.2. Posteriormente se lavaron los geles con agua destilada por 10 minutos e inmediatamente se tñieron con una solución de rojo congo (1mg/ml) durante 10 minutos. Los geles se destñieron con NaCl 1M por 10 a 20 minutos. Por último se fijaron los geles con ácido acético al 5% (v/v) por 30 segundos y se lavaron con agua destilada.

### **Zimogramas para pectinasas.**

Se prepararon geles similares a los geles para xilanasas, con la única diferencia que se agregó pectina cítrica al 0.05% (w/v) como sustrato. El tiempo de incubación fue el mismo que para xilanasas lo mismo que el revelado, sólo que en vez de usar rojo congo se usó rojo de rutenio (1mg/ml) para tefir la pectina que se encontraba en el gel

y posteriormente se siguió con la técnica de revelado para xilanasas (Aguilar *et al.*, 1986).

#### **Zimogramas para carboximetilcelulasas.**

Se prepararon geles a la misma concentración de acrilamida adicionando carboximetilcelulosa al 0.1% (w/v). Para el revelado se siguió la misma técnica que para el zimograma de xilanasas (Manchenko *et al.*, 1994).

#### **Zimogramas para proteasas.**

Para la detección de proteasas se prepararon los geles de poliacrilamida al 8% y se corrió la electroforesis. Posteriormente se colocaron en una solución de caseína al 2% (w/v) en buffer acetatos 0.1 M, pH 5.2 a 4°C por 30 minutos. Después se incubaron los geles en el mismo buffer por un periodo de 90 minutos a 37°C. Por último los geles se lavaron con agua destilada y se tiñeron con una solución que contenía etanol al 40% (v/v), ácido acético al 10% (v/v) y azul brillante de Coomassie (1mg/ml) por cuatro horas a temperatura ambiente. Después de este tiempo, los geles se lavaron con agua y se fijaron con una solución de etanol al 40% (v/v)-ácido acético al 10% (v/v).

#### **Determinación de pH óptimo para cada una de las actividades enzimáticas.**

La determinación del pH óptimo de la hidrólisis de los distintos sustratos en los geles, se realizó mediante la incubación de los geles en diferentes buffers; citratos 0.1 M (pH 3.5), acetatos 0.1 M (pH 5 y 6), Tris/HCl 0.1 M (pH 7 y 7.5).

**Determinación de la temperatura óptima para cada una de las actividades enzimáticas.**

Los geles se incubaron a las temperaturas de 25°C, 30°C, 35°C, 37°C, 40°C, 45°C, 50°C y 60°C, por el tiempo requerido para cada una de las actividades al pH adecuado.

## VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con objeto de establecer si *Streptomyces mexicanus* sp. nov. produce otras enzimas hidrolíticas extracelulares, además de las xilanasas, cuando crece en el bagacillo de caña como fuente de carbono, se determinó la actividad de las pectinasas, carboximetilcelulasas, proteasas y xilanasas en los filtrados libres de células. Los resultados se muestran en la Tabla 6, donde se puede observar que la mayoría de ellas se producen en bajas cantidades, excepto xilanasas, lo que sugiere que de preferencia se están induciendo las proteínas con esta actividad, probablemente debido a que el contenido de pectina, de proteína y de celulosa amorfa es mucho menor que el de hemicelulosas.

**Tabla 6. Actividades de pectinasas, xilanasas, carboximetilcelulasas y proteasas en los filtrados de *Streptomyces mexicanus* sp. nov.**

Enzima	Actividad volumétrica* ( $\mu\text{moles ml}^{-1} \text{min}^{-1}$ )
Pectinasas	0.27
Xilanasas	3.50
Proteasas	0.56
Carboximetilcelulasas	0.37

\**S. mexicanus* sp. nov. fue crecido en MM con bagacillo de caña al 1% y las actividades fueron cuantificadas a las 48 horas de incubación de acuerdo a las condiciones descritas en Material y Métodos.

Para establecer cuántas y de que peso molecular son las pectinasas, proteasas, carboximetilcelulasas y xilanasas producidas por este microorganismo, se optimizaron

las temperaturas, pH's y tiempos de incubación de los geles para cada una de estas actividades enzimáticas para detectar a la mayoría de las Isoenzimas presentes en los filtrados libres de células. Esto se realizó incubando los geles a cada una de las temperaturas en un rango de 25 a 60°C y en los buffers en un rango de pH de 3.5 a 7.5. Los tiempos de incubación se variaron de 30 a 90 min. En la Tabla 7 se resumen las condiciones de detección en los zimogramas para cada una de las enzimas mencionadas.

De acuerdo a estos resultados, *S. mexicanus* sp.nov. es un microorganismo capaz de sintetizar una gran variedad de enzimas hidrolíticas extracelulares que degradan a diversos polímeros complejos presentes en la naturaleza y que pueden ser detectadas en los zimogramas.

**Tabla 7. Resumen de temperatura, pH, volúmen de muestra y tiempos de incubación óptimos para los zimogramas de cada una de las actividades enzimáticas analizadas.**

ENZIMA	T OPTIMA	pH OPTIMO	VOLUMEN DE MUESTRA	TIEMPO DE INCUBACION
CMC-asas	42°C	5	40µl	90 minutos
Pectinasas	42°C	5	80µl.	60 minutos
Proteasas	37°C	5	60µl	90 minutos
Xilanasas	50°C	5	40µl	60 minutos

Bajo estas condiciones se encontraron en los geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes tres bandas de actividad, las cuales corresponden a pesos moleculares aproximados de 120, 200 y 245 kDa. Así mismo se encontraron cuatro bandas de actividad de xilanasas en condiciones desnaturizantes, las cuales

corresponden a enzimas con pesos moleculares aproximados de 145, 120, 60 y 45 kDa (Fig. 5). Anteriormente se demostró que la proteína de 245 kDa está formada por las xilanasas de 145 kDa, de 60 kDa y probablemente alguna otra proteína sin actividad (Petrosyan *et al.*, 2002). La multiplicidad en la producción de xilanasas por diferentes microorganismos es un fenómeno bien establecido (Wong *et al.*, 1988), pero solo en algunos casos se ha podido determinar si estas xilanasas son producto de varios genes o se generan por el procesamiento de una o varias proteínas. En el caso de las xilanasas de *S. mexicanus* sp.nov. no se han podido amplificar por PCR el o los genes que codifican para estas enzimas, utilizando oligonucleótidos degenerados diseñados de acuerdo a las secuencias conservadas de las xilanasas (Morris *et al.*, 1999) y no se han obtenido resultados positivos. Esto indicaría que las proteínas con actividad xilanolítica de *S. mexicanus* sp.nov. no presentan estas regiones conservadas o son proteínas con otra actividad hidrolítica principal que son capaces de actuar sobre el xilano.

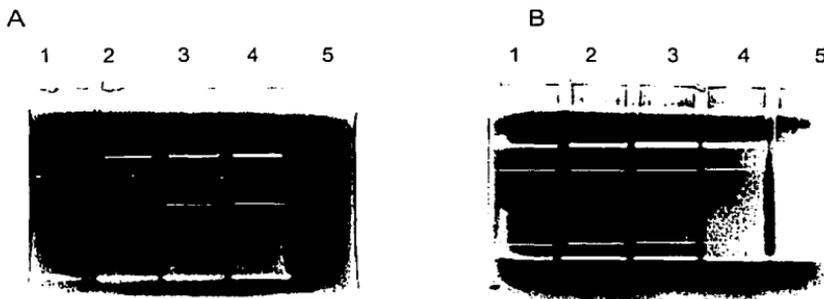


Figura 5.- Zimogramas en condiciones no desnaturalizantes (A) y desnaturalizantes (B) de las xilanasas producidas por *Streptomyces mexicanus* sp.nov. crecido en MM con bagacillo de caña al 1% bajo las condiciones descritas en Material y Métodos. Carril 1, 10 $\mu$ l; carril 2, 20 $\mu$ l; carril 3, 40 $\mu$ l; carril 4, 60 $\mu$ l y carril 5, 100  $\mu$ l (última cantidad de muestra sólo para B).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La temperatura y pH óptimos para la detección de las pectinasas en los zimogramas fueron de 42°C y 5.0 respectivamente, con un tiempo óptimo de incubación de 60 minutos. Bajo estas condiciones, se encontraron tres bandas de actividad pectinolítica en condiciones no desnaturizantes y cuatro en condiciones desnaturizantes. Estas bandas de actividad corresponden a proteínas con pesos moleculares aproximados de 215, 245 y 265 kDa para el primer caso y 70, 85, 90 y 97 kDa para el segundo (Fig. 6). Debido a que las proteínas de alto peso molecular no aparecen en los geles con SDS, se puede sugerir que éstas son complejos que están formados por proteínas de menor peso molecular, las cuales se separaron por la presencia del detergente, tal como ocurre en las xilanasas.



Figura 6. Zimogramas en condiciones no desnaturizantes (A) y desnaturizantes (B) de las pectinasas producidas por *Streptomyces mexicanus* sp. nov. crecido en MM con bagacillo de caña al 1%, bajo las condiciones descritas en Material y Métodos. Carril 1, 10 $\mu$ l; carril 2, 20 $\mu$ l, carril 3, 40 $\mu$ l; carril 4, 60 $\mu$ l y carril 5, 100  $\mu$ l.

La temperatura óptima de las carboximetilcelulasas fue de 42 °C y su pH fue de 5.0, con un tiempo de incubación de 90 minutos. Para estas actividades se encontraron 5 bandas de actividad en condiciones no desnaturizantes, las cuales presentan pesos moleculares aproximados de 85, 105, 135, 160 y 190 kDa. Bajo condiciones desnaturizantes se encontraron cuatro bandas de actividad, las cuales corresponden a pesos moleculares aproximados de 55, 70, 115 y 138 kDa (Fig. 7).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Nuevamente se encontró que *S. mexicanus* sp.nov. produce proteínas que parecen ser complejos que pueden incluir varias proteínas. Este punto se discutirá después ampliamente. Hay que mencionar que en la mayoría de las figuras que se están presentando de los geles hubo necesidad de remarcar las bandas de actividad, porque en la fotografía no se alcanzan a observar aunque en el gel original sí se detectaban.

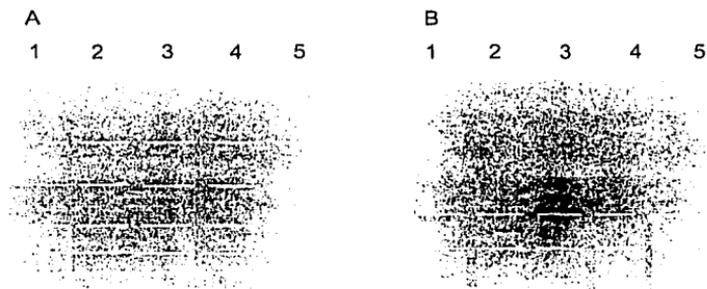


Figura 7. Zimogramas en condiciones no desnaturalizantes (A) y desnaturalizantes (B) de las carboximetilcelulasas producidas por *Streptomyces mexicanus* sp.nov. crecido en MM con bagacillo de caña al 1% bajo las condiciones descritas en Material y Métodos. Carril 1, 10 $\mu$ l; carril 2, 20 $\mu$ l; carril 3, 40 $\mu$ l; carril 4, 60 $\mu$ l y carril 5, 100  $\mu$ l (última cantidad de muestra sólo para B).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

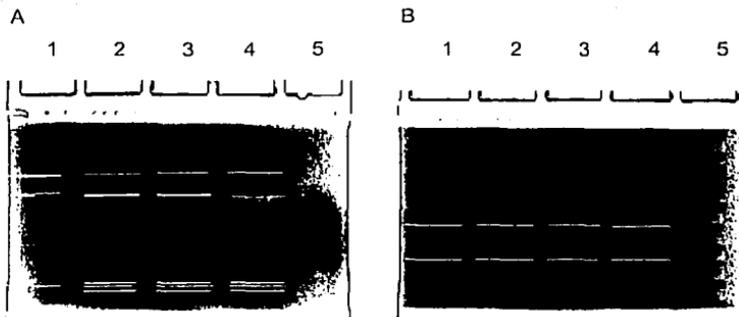


Figura 8. Zimograma en condiciones no desnaturalizantes (A) y en condiciones desnaturalizantes (B) de las proteasas producidas por *Streptomyces mexicanus* sp. nov. crecido en MM con bagacillo de caña al 1% bajo las condiciones descritas en Material y Métodos. Carril 1, 10µl; carril 2, 20µl; carril 3, 40µl y carril 4, 60µl del filtrado.

Por último, los zimogramas para las proteasas presentaron una temperatura óptima de 37°C y un pH de 5.0, con un tiempo de incubación de 90 minutos. En los geles corridos bajo condiciones no desnaturalizantes se encontraron cinco bandas de actividad, las cuales corresponden a pesos moleculares aproximados de 10, 13, 14, 190 y 260 kDa. Por otro lado en condiciones desnaturalizantes se encontraron sólo dos bandas de actividad que corresponderían a pesos moleculares aproximados de 59 y 117 kDa (Fig. 8). Estos resultados sugieren que la actividad de las proteasas de bajo peso molecular es sensible al SDS, ya que no se observaron bajo condiciones desnaturalizantes y por otro lado, las proteasas con pesos moleculares de 190 y 260 nuevamente parecen ser complejos multiméricos que se disgregan en proteínas más pequeñas al estar en presencia del detergente.

En la tabla 8 se muestran los pesos moleculares aparentes (Mr) correspondientes a cada una de las actividades hidrolíticas presentes en los zimogramas bajo condiciones no desnaturalizantes. Se puede observar que el complejo multienzimático de 245 kDa presenta actividad tanto de xilanasas como de pectinasas.

De igual manera la pectinasa de 265kDa podría tener actividad de proteasa (260 kDa) y la de 190 kDa podría también tener actividad de proteasa y de CMCasa. Estos resultados sugieren que *S. mexicanus* sp.nov. produce complejos multienzimáticos que están compuestos por proteínas con diferentes actividades, lo cual podría explicar porqué en un trabajo anterior se detectó un complejo de 245 kDa formado por las xilanasas de 145 y 60 kDa, cuya suma de pesos moleculares no corresponde al peso del complejo. Un punto importante que hay que enfatizar es el hecho de que estos complejos de alto peso molecular se descomponen en sus subunidades, al separar las proteínas en los geles desnaturizantes.

Este tipo de complejos se han descrito en otros microorganismos, como en *Piromyces* sp. cepa E2 (Teunissen et al., 1993), *Butyrivibrio fibrisolvens* H17c (Lin y Thomson, 1991) y *Clostridium thermocellum*, en donde se encontró que en una estructura muy compleja conocida como celulosoma se encontraron 18 diferentes enzimas que participaban en la unión y degradación de materiales celulósicos y polímeros asociados a la hemicelulosa, y dentro de estas se observaron 3 celulasas, 7 carboximetilcelulasas, 1 exoglucanasa, 1 lliquenasa o laminarinasa I, 1 quitinasa y 5 xilanasas (Fontes et al., 1995 y Bayer et al., 1998). Como se puede observar no existe algún actinomiceto reportado que produzca complejos que incluyan varias actividades enzimáticas para la utilización de fuentes de carbono complejas.

En la tabla 9 se muestran los pesos moleculares correspondientes a cada una de las actividades hidrolíticas presentes en los zimogramas bajo condiciones desnaturizantes. En esta tabla se puede observar que muchas proteínas presentan valores de peso molecular muy cercanos.

Esto podría deberse a que son proteínas que presentan un peso molecular idéntico o semejante o podría ser que una misma proteína presente más de una actividad, como son los casos de una xilanasas, una proteasa y una CMCasa que presentan valores de peso molecular muy parecidos (120, 115 y 115 kDa, respectivamente) y el de proteínas con actividad de pectinasa y CMCasa de 70 kDa.(Tabla 9).

XILANASAS PM (kDa)	PECTINASAS PM (kDa)	PROTEASAS PM (kDa)	CMC-ASAS PM (kDa)
	265	260	
245	245		
200	215		
		190	190 160
120			135
			105 85
		15 13 10	

**Tabla 8. Pesos moleculares de xilanasas, pectinasas, proteasas y CMCasas detectadas en geles ND-PAGE producidas durante el crecimiento de *Streptomyces mexicanus* sp. nov. en el medio mínimo con bagacillo de caña al 1%, como se describe en material y métodos.**

XILANASAS PM (kDa)	PECTINASAS PM (kDa)	PROTEASAS PM (kDa)	CMC-ASAS PM (kDa)
145			138
120		115	115
	97		
	90		
	85		
	70		70
60		60	55
45			

**Tabla 9. Pesos moleculares de xilanasas, pectinasas, CMCasas y proteasas detectadas en geles SDS-PAGE producidas durante el crecimiento de *Streptomyces mexicanus* sp. nov. en medio mínimo con bagacillo de caña al 1%, como se describe en material y métodos.**

En la literatura se han reportado proteínas, en las cuales un polipéptido es capaz de presentar dos o más actividades enzimáticas. En este sentido, Sakka *et al.* (1993) reportaron la presencia en *Clostridium stercorarium* de una  $\beta$ -xilosidasa que además presenta actividad de arabinofuranosidasa. Por otro lado, *Trichoderma reesei* sintetiza una proteína multifuncional de 100 kDa, que tiene una actividad principal de  $\beta$ -xilosidasa, pero también es capaz de hidrolizar xilano formando xilosa como único

producto final, por lo que es considerada como una  $\beta$ -D-xilán xilohidrolasa; la enzima también exhibe actividad de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa (Herrmann *et al.*, 1997).

Otros ejemplos de enzimas bifuncionales son el de la xilanasas/ $\beta$ -xilosidasa producida por *Caldocellum saccharolyticum* (Lüthi *et al.*, 1990) y el de una xilanasas/celulasa de *Ruminococcus flavefaciens* 17 (Flint *et al.*, 1993). Otro caso interesante es el de una proteína de *Neocallimastix patriciarum* que presenta actividad de endoglucanasa, celobiohidrolasa y xilanasas en un solo dominio funcional (Xue *et al.*, 1992).

De acuerdo a la literatura, las enzimas del filtrado de *S. mexicanus* sp. nov. que comparten el mismo peso molecular, podrían ser la misma proteína con actividad bi- o multifuncional. Así se tiene la proteína de 120 kDa con actividad de xilanasas que tiene un peso similar a una CMCasa y una proteasa de 115 kDa; de igual manera se encontró una pectinasa de 70 kDa y una CMCasa de 70 kDa. Por otro lado se encontró una xilanasas de 60 kDa y una proteasa de 60 kDa. Estas enzimas podrían ser la misma pero presentando diferentes actividades.

## IX.- CONCLUSIONES

- \* *Streptomyces mexicanus* sp. nov. es un microorganismo que produce varias xilanasas, pectinasas, carboximetilcelulasas y proteasas cuando crece en un medio mínimo con bagacillo de caña como única fuente de carbono.
- \* *Streptomyces mexicanus* sp. nov. produce pectinasas, xilanasas, proteasas y carboximetilcelulasas con un pH óptimo de detección en los zimogramas de 5.0. Las carboximetilcelulasas y las pectinasas presentan una temperatura óptima de detección de 42°C, mientras que las actividades de xilanasas y proteasas fueron óptimas a 50°C y 37°C respectivamente.
- \* En zimogramas nativos se detectaron 3 bandas de actividad de xilanasas (PM 120, 200 y 245 kDa), 3 de pectinasas (PM 215, 245 y 265), 5 bandas de carboximetilcelulasas (PM 85, 105, 135, 160 y 190) y 5 bandas de proteasas (PM 10, 13, 15, 190 y 260 kDa).
- \* En geles con SDS se observaron 4 bandas con actividad de xilanasas (PM 145, 120, 60 y 45 kDa), 4 de pectinasas (PM 97, 90, 85 y 70 kDa), 4 de carboximetilcelulasas (PM 138, 115, 70 y 55 kDa) y 2 de proteasas (PM 115 y 60 kDa).
- \* Las proteínas de 265, 260, 245, 215, 200, 190 y 160 kDa son complejos formados por dos ó más polipéptidos.

## X.- BIBLIOGRAFÍA

---

Aguilar G & Huitrón C. 1990. Constitutive exo-pectinase produced by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 on different carbon sources. *Biotechnol. Lett.* **12**: 655-60.

Aguilar G, Trejo BA, García JM & Huitrón C. 1986. Influence of pH on endo- and exo-pectinase production by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. *Can. J. Microbiol.* **37**: 912-17.

Arthín F, Shareck F, Kluepfel D & Morosoll L. 1994. Effect of disruption of xylanase-encoding genes on the xylanolytic system of *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* **176**: 4924-30.

Awad W, Ochoa M & Toomey T. 1972. Self purification of two serine endopeptidases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **69**: 2561-65.

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

Bayer E, Shiman L, Shoham Y & Lameds R. 1998. Cellulosomes-Structure and Ultrastructure. *J. Struct. Biol.* **124**: 221-34.

Beg Q, Saxena R & Gupta R. 2002. De-repression and subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mojavensis* under fed-batch operations. *Proc. Biochem.* **37**: 1103-09.

Bhat M. & Bhat S. 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnol. Adv.* **15**: 583-620.

Biely P. 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* **52**: 305-46.

Bollag DM, Rozycki MD & Edelstein SJ. (editors) Protein methods, 2nd ed, Wiley-Liss, NY, USA.

Bronnenmeier K, Kern A, Liebl W & Staudenbauer WL. 1995. Purification of *Thermotoga maritima* enzymes for the degradation of cellulosic materials. Appl. Environ. Microbiol. **61**:1399-407

Chávez Camarillo GM. 1995. Estudios de la X-prolil dipeptidil aminopeptidasa en levaduras. Tesis Doctoral Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN.

Deleyn F, Claeysens M, Van Beeumen J & De Bruyne CK. 1978. Purification and properties of beta-xylosidase from *Penicillium wortmanni*. Can. J. Biochem. **56**: 43-50.

Elegir G, Szakacs G & Jeffries T. 1994. Purification, characterization and substrate specificities of multiple xylanases from *Streptomyces* sp. Strain B-12-2. Appl. Environ. Microbiol. **60**: 2609-15.

Ellaiah P, Srinivasulu B. 1996. Production of extracellular protease by *Streptomyces fradiae*. Hindustan Antibiot Bull. **38**: 41-7.

Flint H, Martin J, McPherson C, Daniel A & Zhang J. 1993. A bifunctional enzyme, with separate xylanase and  $\beta(1,3-1,4)$ -glucanase domains, encoded by the *xynD* gene of *Ruminococcus flavefaciens*. J. Bacteriol. **175**: 2943-51.

Flores ME, Pérez R & Hulttrón C. 1997.  $\beta$ -Xylosidase and xylanase characterization and production by *Streptomyces* sp. CH-M-1035. Lett. Appl. Microbiol. **24**: 410-416.

Fontes C, Hazlewood G, Morag E, Hall J, Hirst B & Gilbert H. 1995. Evidence for a general role for non-catalytic thermostabilizing domains in xylanases from thermophilic bacteria. J. Biochem. **307**: 151-158.

García-Carreño F, Dimes L & Haard N. 1993. Substrate-Gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.* **214**: 65-69.

Goodfellow M & Cross T. 1984. Classification. The Biology of Actinomycetes. Goodfellow M, Mordarski M. & Williams S. ( eds), pp. 7-164. Academic Press.

Goedegebuur F, Fowler T, Phillips J, Van der Kley P, Van Solingen P, Dankmeyer L & Power S. 2002. Cloning and relational analysis of 15 novel fungal endoglucanases from family 12 glycosyl hydrolase. *Current Genet.* **41**: 89-98.

Hagerdal B, Ferchak J & Pye E. 1980. Saccharification of cellulose by the cellulolytic enzyme system of *Thermomonospora* species. *Biotechnol. Bioengin.* **22**: 1515-1526.

Hartley B.S. 1969. Proteolytic enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* **29**:45-50.

Hazlewood G & Gilbert H. 1993. Molecular biology of hemicellulases. En: Hemicelluloses and Hemicellulases. Coughlan M. and Hazlewood G., (eds.), pp. 103, Portland Press.

Herrmann M, Vrsanka M, Jurickova M, Hirsch J, Biely P & Kubicek C. 1997. The  $\beta$ -xylosidase of *Trichoderma reesei* is a multifunctional  $\beta$ -D-xylan xylohydrolase. *J. Biochem.* **321**: 375-381.

John M, Schmidt B & Schmidt J. 1979. Purification and some properties of five endo-1,4-beta-D-xylanases and a beta-D-xylosidase produced by a strain of *Aspergillus niger*. *Can. J. Biochem.* **57**:125-34.

Kaneko S, Kuno A, Muramatsu M, Iwamatsu S, Kusakabe L & Hayasi K. 2000. Purification and characterization of a family Gly beta-xylanase from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. *Biosci Biotechnol Biochem.* **64**: 447-51.

Kato J, Suzuki A, Yamazaki H, Ohnishi Y & Horinouchi S. 2002. Control by A-Factor of a metalloendopeptidase Gene Involved in Aerial Mycelium Formation in *Streptomyces griseus*. J. Bacteriol. **184**: 6016-25.

Kesker S, Rao M, Deshpande V. 1992. Characterization and sequencing of an active-site cysteine-containing peptide from the xylanase of a thermotolerant *Streptomyces T7*. Biochem J. **281**: 601-5.

Kim I & Lee K. 1995. Physiological roles of leupeptin and extracellular proteases in mycelium development of *Streptomyces exfoliatus* SMF13. Microbiology. **141**:1017-25.

Kluepfel D, Shareck F, Mondou F & Morosoli R. 1986. Characterization of cellulase and xylanase activities of *Streptomyces lividans*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **24**:230-34.

Kulkarni N, Shendye A & Rao M. 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. FEMS Microbiol. Rev. **23**: 411-56.

Lehninger A, Nelson D & Cox M. 1993. Principles of Biochemistry. 2a. Worth Publishers. USA. 1013p.

Lin L & Thomson J. 1991. An analysis of the extracellular xylanases and cellulases of *Butyrivibrio fibrisolvens* H17c. FEMS Microbiol. Lett. **84**:197-204.

López -Hernández C & Rodríguez J. 1998, Application of the affinity binding of xylanases to oat-spelt xylan in purification of the endoxylanase CM-2 from *Streptomyces chattanoogensis* CECT 3336, Appl. Microbiol. Biotechnol. **50**: 284-87.

Lorenz W & Wiegel J. 1997. Isolation, analysis, and expression of two genes from *Thermoanaerobacterium* sp. strain JW/SL YS485: a beta-xylosidase and a novel acetyl xylan esterase with cephalosporin C deacetylase activity. J. Bacteriol. **179**:5436-41.

Lumba F, Penninckx M. 1992. Characterization of multiple forms of  $\beta$ -xylanase produced by a *Streptomyces* sp. growing on lignocellulose. Appl. Microbiol. Biotechnol. **36**: 733-38.

Lüthi E, Love D, McNulty J, Wallace C, Caughey P, Saul D & Bergquist P. 1990. Cloning, sequence analysis and expression of genes encoding xylan-degrading enzymes from the thermophile "*Caldocellum saccharolyticum*". Appl. Environ. Microbiol. **56**: 1017-24.

Magnuson T & Crawford D. 1997. Purification and characterization of an alkaline xylanase from *Streptomyces viridosporus* T7A. Enzyme Microb. Technol. **21**:160-4.

Maldonado M, Strasser de Saad A & Callieri D. 1989. Catabolite repression of the synthesis of inducible polygalacturonase and pectinesterase by *Aspergillus niger* sp. Curr. Microbiol. **18**:303-6.

Manchenko G. 1994. Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. CRC Press.

Miller L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Anal. Chem. **3**: 426-8.

Morihara K, Oka T & Tsuzuki H. 1967. Multiple proteolytic enzymes of *Streptomyces fradiae* production, isolation and preliminary characterisation. Biochem. Biophys. Acta. **139**:382-7.

Morosoli R, Roy C & Yaguchi M. 1986. Isolation and partial primary sequence of a xylanase from the *Cryptococcus albidus*. Biochem. Biophys. Acta. **870**: 473-8.

Morris D, Moreland D, Ford M, Thomas J & Berquist P. 1999. Family 10 and 11 xylanase genes from *Caldicellulosiruptor* sp. strain Rt69B.1. Extremophiles **3**: 103-11.

Petrosyan P, Luz-Madrigal A, Huitrón C & Flores ME. 2002. Characterization of a xylanolytic complex from *Streptomyces sp.* Biotechnol. Lett. **24**: 1473-6.

Pilnik W & Rombouts F. 1981. Pectic enzymes in fruit and vegetable juice manufacture. En: Enzymes in food processing. Nagodwithana G. (Editor). Pp. 363-9; Academic Press.

Peczynska-Czoch W & Mordarski M. 1988. Actinomycete enzymes. En: Actinomycetes in Biotechnology. Goodfellow M., Williams, S. and Mordarski M. (Editores), pp. 219-83, Academic Press.

Pokorny M & Vitale L. 1980. Enzymes as by-products during biosynthesis of antibiotics. En: Trends in Enzymology: Industrial and Clinical Enzymology. Vitale L. & V. Simeon (Editores). Pergamon Press. pp. 13-25.

Pokorny M, Vitale L, Turk V, Renko M & Zuvanic J. 1979. *Streptomyces rimosus* extracellular proteases: Characterisation and evaluation of various crude preparations. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **8**:81-90.

Ramírez AL. 2003. Efecto de la fuente de carbono sobre la biosíntesis de las endoxilanasas de *Streptomyces mexicanus*. Tesis de Licenciatura en Biología, Fac. de Ciencias, UNAM.

Sakka K, Yoshikawa K, Kojima Y, Karita S, Ohmiya K & Shimada K. 1993. Nucleotide sequence of the *Clostridium stercoararium xylA* gene encoding a bifunctional protein with  $\beta$ -D-xylosidase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase activities, and properties of the translated product. Biosci. Biotech. Biochem. **57**:268-72.

Schols H, Geraeds C, Searle-van L, Kormelink F & Voragen A. 1990. Rhamnogalacturonase: a novel enzyme that degrade the hairy regions of pectins. Carbohydr. Res. **206**:105-15.

Schwarz WH, Adelsberger H, Jauris S, Hertel C, Funk B & Staudenbauer WL. 1990. Xylan degradation by the thermophile *Clostridium stercorarium*: cloning and expression of xylanase, beta-D-xylosidase, and alpha-L-arabinofuranosidase genes in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **16**:368-74.

Solis, S. 1997. Obtención y caracterización de híbridos por fusión de protoplastos entre cepas de *Aspergillus* productoras de pectinasas. Tesis de doctorado en Investigación Biomédica Básica, UNAM.

Stutzenberger F. 1972. Cellulolytic activity of *Thermomonospora curvata*: Optimal conditions, partial purification and products of the cellulose. *Appl. Microbiol.* **24**:83-90.

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

Taguchi S, Suzuki M, Kojima S, Miura K & Momose H. 1995. *Streptomyces* serin protease (SAM-P20): recombinant production, characterization and interaction with endogenous protease inhibitor. *J. Bacteriol.* **177**:6638-43.

Tan LU, Mayers P, Illing M & Saddler JN. 1987. The copurification of beta-glucosidase, beta-xylosidase, and 1,3-beta-glucanase in two separate enzyme complexes isolated from *Trichoderma harzianum* E58. *Biochem. Cell Biol.* **65**:822-32.

Teunissen M, Hermans J, Huis J & Vogels G. 1993. Purification and characterization of a complex-bound and a free  $\beta$ -1,4- endoxylanase from the culture fluid of the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2. *Arch. Microbiol.* **159**: 265-271.

Trop M & Birk Y. 1968. The trypsin-like enzyme from *Streptomyces griseus* (pronase). *J. Biochem.* **109**:475-6.

Tsujiho H, Miyamoto K, Kuda T, Minami K, Sakamoto T, Hasegawa T & Inamori Y. 1992. Purification, properties and partial amino acid sequences of thermostable xylanases from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. Appl. Environ. Microbiol. 58:371-5.

Ujile M, Roy C & Yaguchi M. 1991. Low-molecular-weight xylanase from *Trichoderma viride*. Appl. Environ. Microbiol. 57:1860-2.

Ult E, Hedl C, Keshav K, Ingram L. 1991. Sequencing and expression of the *Butyrivibrio fibrisolvens* xyl B gene encoding a novel bifunctional protein with beta-D-xylosidase and alpha-L-arabinofuranosidase activities. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1227-34.

Van Buren J. 1991. Function of pectin in plant tissue structure and firmness. In: The Chemistry and Technology of Pectin. Reginal W. (Editor). Pp. 1-36, Academic Press.

Voragen A. 1989. Food Enzymes: Prospects and Limitations. En: Food Science. Basic Research for Technological progress. Proceedings of the Symposium in honor of Professor Pilnik, J., Rosszen F., Rombouts S. & Voragen A., (Eds.), pp. 59-81, Wageningen, Holanda.

Waldron C & Eveleigh D. 1986. Saccharification of celluloses by *Microbispora bispora*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24:487-92.

Williams AG & Orpin CG. 1987. Glycoside hydrolase enzymes present in the zoospore and vegetative growth stages of the rumen fungi *Neocallimastix patriciarum*, *Pirimonas communis*, and an unidentified isolate, grown on a range of carbohydrates. Can. J. Microbiol. 33:427-34.

Whithread T. 1995. Nucleotide sequences of xylan-inducible xylanase and xylosidase/arabinosidase genes from *Bacteroides ovatus* V975. Biochem. Biophys. Acta. 1244: 239-41.

Wong K, Tan L & Saddler J. 1998. Multiplicity of  $\beta$ -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiol. Rev.* **52**: 305-17.

Xue G, Gobius K & Orpin C. 1992. A novel polysaccharide hydrolase cDNA (*cel D*) from *Neocallimastix patriciarum* encoding three multi-functional catalytic domains with high endoglucanase, cellobiohydrolase and xylanase activities. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 2397-2403.

Yeoman K & Edwards C. 1997. Purification and Characterization of the protease enzymes of *Streptomyces thermovulgaris* grown in rapemeal-derived media. *J. Appl. Microbiol.* **82**:149-56.

Zhao Y, Chany C, Sims P & Sinnott M. 1997. Definition of the substrate specificity of the 'sensing' xylanase of *Streptomyces cyaneus* using xylooligosaccharide and cellooligosaccharide glycosides of 3,4-dinitrophenol. *J Biotechnol.* **16**:181-90.