



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
QUÍMICO BIOLÓGICAS

**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**ESTUDIO DE UN AISLADO FÚNGICO CON  
ACTIVIDAD XILANOLÍTICA**

**TESIS**

Para la obtención del grado de

**Doctora en Ciencias Biológicas  
Opción en Biología Experimental**

Presenta

**M.C. Mariana Alvarez Navarrete**

Director de tesis:

Co-director de tesis:

**Rodolfo López Gómez**

Doctor en Ciencias en Biotecnología de Plantas

**Mauro Manuel Martínez Pacheco**

Doctor en Ciencias en Biología Experimental

Morelia, Michoacán, Febrero de 2015

## CONTENIDO

|  |    |
|--|----|
| <b>RESUMEN</b> .....   | iv |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | v  |
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....  | 6  |
| <b>MARCO TEÓRICO</b> .....                                       | 7  |
| Composición y estructura química de las xilanas.....             | 8  |
| Bioquímica de la degradación de las xilanas .....                | 10 |
| Complejo xilanolítico.....                                       | 10 |
| Endo-1,4- $\beta$ -xilanasas .....                               | 11 |
| $\beta$ -D-xilosidasas .....                                     | 12 |
| Acetilxilan esterasas .....                                      | 12 |
| $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas .....                           | 13 |
| $\alpha$ -glucuronidasas.....                                    | 13 |
| Esterasas del ácido ferúlico y del ácido <i>p</i> -cumárico..... | 13 |
| Enzimas clave en la hidrólisis de las xilanas.....               | 14 |
| Sinergismo entre las enzimas del complejo xilanolítico .....     | 14 |
| Multiplicidad de las xilanasas y dominios múltiples .....        | 15 |
| Clasificación de las xilanasas.....                              | 16 |
| Familias de xilanasas.....                                       | 17 |
| Regulación de la biosíntesis de xilanasas.....                   | 18 |
| El mercado de las enzimas .....                                  | 19 |
| Aplicaciones industriales de las xilanasas .....                 | 21 |
| <i>Alimento animal</i> .....                                     | 21 |
| <i>Manufactura de pan, alimentos y bebidas</i> .....             | 22 |
| <i>Elaboración de suplementos alimenticios</i> .....             | 23 |
| <i>Productos químicos y farmacéuticos</i> .....                  | 23 |
| <i>Textiles</i> .....  | 24 |
| <i>Pulpa de celulosa y papel</i> .....                           | 24 |
| <i>Biotecnología y patología de plantas</i> .....                | 25 |
| <i>Tratamiento de desechos agrícolas</i> .....                   | 26 |
| <i>Producción de surfactantes</i> .....                          | 26 |
| Microorganismos xilanolíticos .....                              | 26 |

|  |    |
|--|----|
| Hongos xilanolíticos y su estilos de vida.....                     | 26 |
| <i>Hongos mesofílicos</i> .....                                    | 27 |
| <i>Hongos anaeróbicos del rúmen</i> .....                          | 27 |
| <i>Hongos termofílicos</i> .....                                   | 27 |
| <i>Hongos fitopatógenos</i> .....                                  | 28 |
| Fuentes microbianas para la producción comercial de xilanasas..... | 32 |
| <b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....                            | 34 |
| <b>JUSTIFICACIÓN</b> .....   | 35 |
| <b>HIPÓTESIS</b> .....   | 35 |
| <b>OBJETIVO GENERAL</b> .....                                      | 35 |
| <b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....                                 | 35 |
| <b>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL</b> .....                       | 36 |
| <b>RESULTADOS</b> .....  | 37 |
| <b>DISCUSIÓN GENERAL</b> .....                                     | 56 |
| <b>CONCLUSIONES GENERALES</b> .....                                | 61 |
| <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS GENERALES</b> .....                  | 61 |

## RESUMEN

Actualmente, las xilanasas se utilizan ampliamente en diversos sectores industriales. Sin embargo, el costo de las enzimas es un factor limitante para dar paso a su uso extensivo. Los hongos son organismos reconocidos por su gran capacidad de síntesis y secreción de enzimas con alta actividad. Una gran diversidad de especies fúngicas permanece sin identificar y estudiar. El objetivo de esta investigación fue estudiar un hongo aislado a partir de una colección obtenida de distintos ecosistemas que posea un complejo xilanolítico extracelular con potencial biotecnológico. El escrutinio se realizó a partir de ciento tres aislados fúngicos de ecosistemas frutícolas, hortícolas y forestales de distintas regiones de México. Un aislado fúngico, obtenido de cultivos de frijol de Zacatecas e identificado molecularmente como *Fusarium solani*, fue seleccionado por su actividad celulolítica ausente y por su capacidad para producir xilanasas en medio sólido y en cultivo líquido. La producción de holocelulasas (xilanasas,  $\beta$ -xilosidasas y celuloasas) por *F. solani* se optimizó mediante un diseño central compuesto y se comparó con *Aspergillus* sp. Las variables estudiadas fueron la concentración de tres fuentes de carbono (xilana de madera de haya, restrojo de maíz y olote de maíz), la concentración de tres fuentes de nitrógeno (extracto de levadura, sulfato de amonio y urea) y el tiempo de fermentación. *F. solani* produce actividad xilanolítica significativa en las tres fuentes de carbono con medios de cultivo semisólidos. En contraste, celulasas y  $\beta$ -xilosidasas no tuvieron un patrón de producción definido. Después de la optimización, *F. solani* produjo actividad xilanolítica significativa cuando xilana de madera de haya se utilizó como fuente de carbono, pero en rastrojo de maíz y olote de maíz fue deficiente. En las condiciones de cultivo óptimas, *F. solani* produce niveles bajos de  $\beta$ -xilosidasas y celulasas con las tres fuentes de carbono. Al contrastar la actividad holocelulolítica de *F. solani* con *Aspergillus* sp., la producción de enzimas fue comparable en orden de magnitud y en algunos tratamientos *F. solani* fue superior a *Aspergillus* sp. Las propiedades bioquímicas de una xilanasa enriquecida se investigaron, a partir del complejo xilanolítico extracelular de *F. solani*. La xilanasa fue enriquecida mediante precipitación con sulfato de amonio, ultrafiltración y cromatografía de intercambio iónico. En base a la zona clara de degradación observada por zimografía, el peso molecular aparente de la xilanasa es de 20.8 kD. Los valores de temperatura y pH para la actividad óptima de la xilanasa fueron 47.2 °C y 5.68, respectivamente. A 40 °C retuvo el 70 % de su actividad después de 23 h de incubación. Esta xilanasa mostró una gran especificidad hacia la xilana de madera de haya y xilana de madera de abedul, y una insensibilidad hacia el resto de los polisacáridos evaluados. El EDTA y los iones  $\text{Ag}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  fueron los inhibidores más efectivos. Esta xilanasa está libre de actividad celulolítica, que es una propiedad deseable para su uso en la recuperación de fibras de celulosa en procesos con condiciones de operación moderadas.

Palabras clave: aislado fúngico, *Fusarium solani*, xilanasa,  $\beta$ -xilosidasa, celulasa.

## ABSTRACT

Currently, xylanases are widely used in diverse industrial fields. However, the cost of enzymes is a limiting factor for their extensive use. Fungi are recognized for their great capacity of synthesis and secretion of enzyme with high activity. A wide variety of fungal species are unidentified and no studied. The objective of this research was to study a fungus isolated from a collection obtained from different ecosystems that possesses an extracellular xylanolytic complex with biotechnological potential. The screening was performed from one hundred and three fungal isolates of orchard, horticultural and forestry ecosystems from different regions of Mexico. A fungal isolate obtained from Zacatecas bean crops and molecularly identified as *Fusarium solani*, was selected for its ability to produce xylanase on solid medium and in liquid culture, and for cellulolytic activity absent. Holocellulases production (xylanases,  $\beta$ -xylosidases and cellulases) by *F. solani* was optimized through a central composite design and compared with *Aspergillus* sp. The variables studied were the concentration of three carbon sources (beechwood xylan, corn stover and corn cob), concentration of three nitrogen sources (yeast extract, ammonium sulfate and urea) and fermentation time. *F. solani* produces significant xylanolytic activity in the three carbon sources with semisolid culture media. In contrast, cellulases and  $\beta$ -xylosidases did not have a defined pattern of production. After optimization, *F. solani* produced a significant xylanolytic activity when beechwood xylan was used as carbon source, but with corn stover and corn cob, it was deficient. In optimal culture conditions, *F. solani* produces low levels of  $\beta$ -xylosidases and cellulases with the three carbon sources. In order of magnitude, the holocellulolytic enzyme production from *F. solani* and *Aspergillus* sp. was comparable, and in some treatments, *F. solani* was superior to *Aspergillus* sp. The biochemical properties of an enriched xylanase were investigated, from an extracellular xylanolytic complex of *F. solani*. Xylanase was enriched by precipitation with ammonium sulfate, ultrafiltration and ion exchange chromatography. Based on the degradation cleared zone observed by zymography, the xylanase apparent molecular weight is 20.8 kD. The temperature and pH values for optimal xylanolytic activity were 47.2 °C y 5.68, respectively. Xylanase retained 70 % of its activity at 40 °C after 23 h of incubation and it showed a great specificity toward beechwood xylan and birchwood xylan, and no sensibility toward the rest of polysaccharides evaluated. EDTA and  $\text{Ag}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  ions were the most effective inhibitors. This enzyme is free of cellulolytic activity, a desirable property for its use in cellulose fiber recovering processes with mild operational conditions.

Keywords: fungal isolate, *Fusarium solani*, xylanase,  $\beta$ -xylosidase, cellulase.

## INTRODUCCIÓN

La biomasa lignocelulósica es la fuente de carbono más grande sobre la tierra. Está compuesta principalmente de lignina, celulosa y hemicelulosas. La xilana contenida en la fracción hemicelulósica es el segundo polisacárido más abundante sobre la tierra después de la celulosa y es, por lo tanto, una de las principales reservas de carbono reducido, ya que se producen aproximadamente  $10^{10}$  toneladas métricas de este polímero al año. Además, la xilana y la celulosa representan más del 50 % de la biomasa de las plantas. En consecuencia, ambos polímeros juntos constituyen la fuente de carbono orgánica más abundante de la tierra. La lignocelulosa es una fuente potencial de energía contenida en los enlaces químicos de los polisacáridos que la conforman.

Las xilanasas microbianas forman un complejo enzimático que cataliza la hidrólisis de la xilana a xilo-oligómeros, xilobiosa y xilosa. Estas enzimas tienen diversas aplicaciones en las industrias de alimentos, pulpa de celulosa y papel, textil y química, en el tratamiento de residuos lignocelulósicos agrícolas, agroindustriales y municipales. Los hongos filamentosos son especialmente interesantes debido a que secretan estas enzimas al medio, en niveles significativamente mayores comparados con levaduras y bacterias. En la vasta diversidad microbiana, un gran número de especies de hongos existen aún sin estudiar.

El desarrollo de tecnología para el aprovechamiento de la energía almacenada en los materiales lignocelulósicos es una enorme y atractiva área de oportunidad. La producción y uso de enzimas xilanolíticas en la industria de la transformación de la biomasa ha sido abordada con ahínco en las últimas décadas. Un reto en este sector es disminuir el costo y aumentar el rendimiento de la producción de enzimas xilanolíticas y celulolíticas, ya que el valor de las enzimas representa aproximadamente el 50 % del costo total de los procesos de hidrólisis. Además, el descubrimiento y desarrollo de nuevas enzimas xilanolíticas es un paso clave hacia una despolimerización más eficiente de los polisacáridos hasta azúcares para la producción de biocombustibles y otros bioproductos.

En el presente trabajo de investigación se abordaron dos estrategias para lograr una producción más eficiente de enzimas xilanolíticas: el escrutinio de hongos filamentosos con actividad xilanolítica interesante a partir de diferentes ecosistemas y el estudio de factores asociados a la producción de estas enzimas acoplado a la optimización del proceso fermentativo.

*Fusarium solani*, un aislado silvestre de cultivos de frijol, fue seleccionado por su capacidad para producir xilanasas extracelulares. Las condiciones de cultivo se estudiaron para optimizar la producción de xilanasas por *F. solani*, con el uso de xilana de madera de haya, rastrojo de maíz y olote de maíz como fuentes de carbono.

En la última parte de este trabajo se estudiaron las propiedades bioquímicas de una xilanasas enriquecida que está implicadas en el complejo xilanolítico extracelular de *F. solani*, para comprender los mecanismo a través de los cuales este hongo coloniza los sustratos lignocelulósicos y se alimenta de ellos para sobrevivir.

## MARCO TEÓRICO

### La xilana en la pared celular de las plantas

La lignocelulosa constituye la fuente de biomasa más grande sobre la tierra y está compuesta principalmente de lignina, celulosa y hemicelulosa (Mountfort y Asher, 1989; Degefu *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2011). La composición varía ampliamente dependiendo de la especie de la planta, su edad, tiempo de cosecha y las condiciones o etapa de crecimiento (Jeffries y Jin, 2000).

A diferencia de la celulosa, las xilanas constituyen un grupo de polímeros estructurales complejos llamados de manera colectiva “hemicelulosas” (Uffen, 1997). Las xilanas son los componentes principales de las hemicelulosas y a su vez las hemicelulosas o xilanas son los principales heteropolisacáridos estructurales de las plantas, pues representan cerca del 35 % de su peso (Mountfort y Asher, 1989; Hespell y Whitehead, 1990; Degefu *et al.*, 1995; Uffen, 1997; Kimura *et al.*, 2000; Min *et al.*, 2002; Inmaculada *et al.*, 2005; Collins *et al.*, 2005). La xilana es el segundo polisacárido más abundante sobre la tierra después de la celulosa (Polizeli *et al.*, 2005; Collins *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2011), y es por lo tanto, la principal reserva de carbono reducido en el ambiente, ya que se producen aproximadamente  $10^{10}$  toneladas métricas de este polímero al año. Además, la xilana y la celulosa representan más del 50 % de toda la biomasa de las plantas. En consecuencia, ambos polímeros juntos constituyen la fuente de carbono orgánica más abundante de la tierra. Son productos de la fotosíntesis y, como tales, son una inagotable fuente de carbono (Uffen, 1997).

El contenido de energía de la xilana y la celulosa, en base a estimaciones de la biomasa total en plantas, equivale a casi 640 mil millones de toneladas de combustible. Como componentes principales de la biomasa de las plantas, las xilanas tienen un papel importante en la nutrición de los animales rumiantes y de los insectos, donde estos polímeros son bioconvertidos a pequeñas moléculas digeribles (Uffen, 1997).

Dentro de la estructura de la pared celular, la lignina, la celulosa y la hemicelulosa, interactúan a través de enlaces covalentes y no covalentes, en donde la xilana se encuentra en la interfase entre la lignina y la colección de fibras de celulosa (Beg *et al.*, 2001) y se ha propuesto que es importante para la cohesión de las fibras y la integridad de las paredes celulares de las plantas (Collins *et al.*, 2005). Estos compuestos están presentes en la pared celular y entre la lamela de las células de las plantas (Polizeli *et al.*, 2005).

De acuerdo con su estructura química y las sustituciones de los grupos laterales, las xilanas están intercaladas, entrecruzadas y ligadas covalentemente en varios puntos con la gran cubierta de lignina, mientras producen una cobertura alrededor de las cadenas subyacentes de celulosa a través de puentes de hidrógeno (Uffen, 1997; Beg *et al.*, 2001).

La adhesión entre la celulosa y la matriz de hemicelulosas es de naturaleza no covalente, a través de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo y fuerzas de Van der Waals entre los anillos de los azúcares apilados unos sobre otros. Las hemicelulosas también pueden quedar atrapadas durante la formación de la microfibrilla de celulosa. Dicho atrapamiento tiene influencia en la cristalinidad de la microfibrilla y en la fuerza de las interacciones entre la celulosa y la matriz de hemicelulosas. Las cadenas de xilana son como sogas adhesivas que unen las microfibrillas unas con otras, pero también pueden servir como relleno en los espacios para prevenir el contacto directo y la adhesión de las microfibrillas de celulosa unas con otras (Cosgrove, 1997).

La capa de xilana enlazada covalentemente con la lignina y su interacción no covalente con la celulosa son importantes en el mantenimiento de la integridad de la celulosa *in situ* y ayuda a proteger las fibras contra la degradación por celulasas (Uffen, 1997). Las xilanas también están unidas a las pectinas y otros polisacáridos para aumentar la resistencia de la pared celular (Chaiyaso *et al.*, 2011).

### Composición y estructura química de las xilanas

El término de hemicelulosas incluye un amplio intervalo de polisacáridos no celulósicos, que se encuentran en varias proporciones, formados por monosacáridos tales como D-xilosa, D-manosa, D-glucosa, L-arabinosa, D-galactosa, ácido D-glucurónico y ácido D-galacturónico (Lee *et al.*, 2011). Las distintas clases de hemicelulosas son nombradas de acuerdo con el azúcar principal. Por lo tanto, cuando un polímero es hidrolizado y produce xilosa, es una xilana; de la misma manera, las hemicelulosas incluyen mananas, glucanas, arabinanas y galactanas. En la naturaleza, las hemicelulosas de la madera difícilmente están compuestas por un solo tipo de azúcar. Normalmente son estructuras complejas conformadas por más de un polímero, los más comunes son las glucuronoxilanas, arabinoglucuronoxilanas, glucomananas, arabinogalactanas y galactoglucomananas (Hespell y Whitehead, 1990; Beg *et al.*, 2001; Polizeli *et al.*, 2005).

La cantidad de cada componente varía de una especie a otra (Kirk y Cullen, 1998). Por lo tanto, las hemicelulosas no son compuestos químicos bien definidos, pues tienen propiedades peculiares (Hespell y Whitehead, 1990; Polizeli *et al.*, 2005). La xilana de la madera existe como *O*-acetil-4-*O*-metilglucuronoxilana en maderas nobles y como arabino-4-*O*-metilglucuronoxilana en maderas blandas, mientras que las xilanas de pastos y plantas anuales son típicamente arabinoxilanas (Beg *et al.*, 2001; Collins *et al.*, 2005). La glucomanana es la principal hemicelulosa de las gimnospermas (maderas blandas). En estas plantas, la manosa representa cerca del 10 % del peso seco total (Jeffries y Jin, 2000).

Los polímeros más abundantes son las xilanas, compuestos de unidades de D-xilosa unidas por un enlace  $\beta$ -1,4, con varios niveles de polimerización (Hespell y Whitehead, 1990; Uffen, 1997; van Peij *et al.*, 1998; Min *et al.*, 2002). El grado de polimerización en las xilanas es variable, por ejemplo, las xilanas de maderas nobles y maderas blandas generalmente consisten de 150–200 y 70–130 residuos de  $\beta$ -xilopiranosas, respectivamente. La xilana de las maderas nobles, la *O*-acetil-4-*O*-metilglucuronoxilana, se compone de al menos 70 residuos de  $\beta$ -xilopiranosas (Beg *et al.*, 2001; Collins *et al.*, 2005).

La xilosa es el componente principal de las hemicelulosas y es el segundo azúcar más abundante, encontrada en los residuos agrícolas y silvícolas de las angiospermas, se obtiene por hidrólisis ácida o enzimática de la xilana. En angiospermas leñosas (maderas nobles), la D-xilosa representa cerca del 17 % del peso seco total, pero en angiospermas de plantas herbáceas, tales como los residuos de cultivos agrícolas, puede representar más del 31 % (Jeffries y Jin, 2000).

Con frecuencia, las xilanas están altamente ramificadas, lo que depende de la planta y de su estado de desarrollo, de manera particular aquellas encontradas en la hierba. Dos de los azúcares laterales más comunes son la L-arabinofuranosa con enlace  $\alpha$ -1,3 y el ácido glucurónico con enlace  $\alpha$ -1,2. Estos azúcares laterales pueden tener sustituciones tales como grupos 4-*O*-metilo en los ácidos glucurónicos y fenoles (asociados con la lignina) con enlaces 5-*O*-éster (ácido ferúlico o ácido *p*-cumárico) en las L-arabinosas (Hespell y Whitehead, 1990; Uffen, 1997; van Peij *et al.*, 1998; Kirk y Cullen, 1998; Collins *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2011).

Las xilanas que contienen un número significativo de residuos de ácido 4-*O*-metil- $\alpha$ -D-glucopiranosil urónico (MeGlcA) y/o ácido D-glucopiranosil urónico (GlcA) unidos a la cadena de xilana, comúnmente se denominan glucuronoxilanas (GX). Las GX predominan en las angiospermas (20–35 %), pero son menos abundantes en las gimnospermas (8–14 %). En las angiospermas, la estructura de las GX consiste de residuos  $\beta$ -(1→4)-D-xilopiranosil lineales que están sustituidos de forma aleatoria por MeGlcA y/o GlcA con enlaces  $\alpha$ -(1→2) (Chong *et al.*, 2011). Las xilanas de la hierba frecuentemente tienen grupos acetilo unidos por enlaces éster. Los grupos acetilo normalmente se encuentran en las posiciones 2-*O*- y 3-*O*- del enlace de la xilosa y en la posición 5-*O*- de la cadena lateral de la L-arabinosa (Beg *et al.*, 2001). Las GX de las angiospermas están altamente acetiladas en las posiciones *O*-2 y/o *O*-3. En contraste, las GX de las gimnospermas no están acetiladas, pero contienen un pequeño número de residuos L-arabinofuranosilo (*Araf*) unidos por un enlace  $\alpha$ -(1→3) a la cadena de xilana; estas GX son, por lo tanto, llamadas arabinoglucuronoxilanas (AGX). La mayoría de las xilanas en el endospermo de las monocotiledóneas contienen residuos de L-*Araf* en las posiciones *O*-3 y/o *O*-2 de los residuos xilopiranosil de la cadena, pero no contienen residuos de MeGlcA. Sin embargo, en algunos estudios se han reportado pequeñas cantidades de MeGlcA y/o GlcA unidos por enlace  $\alpha$ -(1→2) en arabinoxilanas endosperómicas. Las estructuras de las AGX no endosperómicas contienen MeGlcA y/o GlcA que están unidos por enlaces  $\alpha$ -(1→2) a la arabinoxilana monosustituida (Chong *et al.*, 2011).

La xilana de las maderas nobles, la *O*-acetil-4-*O*-metilglucuronoxilana, tiene un ácido 4-*O*-metilglucurónico cada diez residuos de xilosa, unido en la posición 2 de la xilosa. Las xilanas de las maderas nobles están altamente acetiladas (por ejemplo, la xilana de abedul contiene más de 1 mol de ácido acético por 2 moles de xilosa). La acetilación es más frecuente en la posición del C-3 que en el C-2. La presencia de los grupos acetilo es responsable de la solubilidad parcial de la xilana en agua. Estos grupos acetilo son removidos fácilmente cuando la xilana es sometida a extracción alcalina. Las xilanas de las maderas blandas, las arabino-4-*O*-metilglucuroxilanas, tienen un mayor contenido de ácido 4-*O*-metilglucurónico que las xilanas de las maderas nobles. Los residuos de ácido 4-*O*-metilglucurónico están unidos en la posición del C-2. Las xilanas de las maderas blandas no están acetiladas, y en lugar de grupos acetilo tienen unidades de  $\alpha$ -L-arabinofuranosa unidas por enlaces  $\alpha$ -1,3-glicosídicos en la posición C-3 de la xilosa. Los sustituyentes arabinosil están presentes en casi el 12 % de los residuos de xilosa. La proporción de  $\beta$ -D-xilopiranososa, ácido 4-*O*-metil- $\alpha$ -D-glucurónico y L-arabinofuranosa es 100:20:13. Las xilanas de las maderas blandas están menos ramificadas (Beg *et al.*, 2001).

La fracción de hemicelulosa de la fibra de maíz es una arabinoxilana, comúnmente llamada como goma de fibra de maíz (CFG). Esta es considerada una de las hemicelulosas más complejas y recalcitrantes. Está compuesta de 42–48 % de xilana y 29–31 % de arabinana. La hemicelulosa de la fibra de maíz está compuesta de dos fracciones, la hemicelulosa A y la hemicelulosa B. La hemicelulosa A representa menos del 10 % (w/w) del total de la fracción de la hemicelulosa y es desechada en la mayoría de los procesos de extracción de hemicelulosa de la fibra de maíz. La hemicelulosa A es insoluble en agua a pH ácido, mientras que la hemicelulosa B permanece soluble bajo estas condiciones. Por lo tanto, el fraccionamiento de la hemicelulosa A del total de la hemicelulosa es simple y puede llevarse a cabo fácilmente. La CFG está compuesta por unidades de xilosa unidas por enlaces  $\beta$ -1,4, que forman la cadena de la xilana. Esta constituye cerca de la mitad de la masa de la CFG (en base seca). Normalmente cerca del 80 % de la cadena de la xilana de la CFG está sustituida principalmente con arabinosa. Las cadenas de xilana están entrecruzadas unas con otras por puentes diferúlico. Para formar el puente diferúlico, dos residuos de ácido ferúlico (cada uno como sustituyente de cadenas diferentes de xilana) forman

un enlace éster uno con otro. Las fibras de celulosa, junto con las proteínas estructurales, embebidas en el entramado formado por las xilanas entrecruzadas, forman la pared celular de la fibra de maíz. Las proteínas están asociadas con la hemicelulosa, incluso la CFG purificada puede contener más del 5 % de proteína (Nghiem *et al.*, 2011).

También se han reportado xilanas lineales no sustituidas (homoxilanas). Este tipo de xilanas no están ampliamente distribuidas en la naturaleza y se han aislado de pasto de esparto, tallos de tabaco y cáscara de semilla guar. Las xilanas con enlaces  $\beta$ -1,3 se han reportado en ciertas algas marinas. Los enlaces combinados  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,4 de las xilanas se han encontrado en algas marinas como *Palmeria palmata* (Beg *et al.*, 2001; Collins *et al.*, 2005).

Las hemicelulosas son polisacáridos solubles en álcalis, que precipitan a partir de soluciones acuosas por alcohol y más fácilmente hidrolizados por ácidos minerales en comparación con la celulosa (Uffen, 1997).

### Bioquímica de la degradación de las xilanas

Las xilanas son químicamente complejas y debido a su composición heterogénea, se requiere un conjunto complejo de enzimas para hidrolizar y metabolizar estos polisacáridos (Hespell y Whitehead, 1990; de Vries, 1999; Ruiz-Roldán *et al.*, 1999; Min *et al.*, 2002; Polizeli *et al.*, 2005; Inmaculada *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2011).

Las xilanasas son glicosidasas (*O*-glicósido hidrolasas, EC 3.2.1.x) que catalizan la hidrólisis del enlace 1,4- $\beta$ -D-xilosídico de las xilanas. Son un grupo extenso de enzimas, involucradas en la producción de xilosa, una fuente primaria de carbono para el metabolismo celular (Collins *et al.*, 2005). Estas enzimas son producidas principalmente por microorganismos y participan en el rompimiento de las paredes celulares de las plantas junto con otras enzimas que hidrolizan polisacáridos y también digieren la xilana durante la germinación de algunas semillas (*e.g.* en el malteado del grano de cebada). Los nichos ecológicos de estos microorganismos son diversos y están ampliamente distribuidos; normalmente son ambientes donde el material de las plantas se acumula y se deteriora, como el rúmen de los rumiantes (Collins *et al.*, 2005). También, las xilanasas se encuentran en las algas marinas, protozoos, crustáceos, insectos, caracoles y semillas de plantas terrestres (Polizeli *et al.*, 2005).

### Complejo xilanolítico

Las enzimas necesarias durante el proceso cooperativo de rompimiento de la xilana son la endo-1,4- $\beta$ -xilanasas (1,4-D-xilan xilohidrolasa; EC 3.2.1.8), que rompe los enlaces glicosídicos internos de la cadena de 1,4- $\beta$ -D-xilana y tiene una función crucial en la hidrólisis de la xilana (Degefu *et al.*, 2001) y la  $\beta$ -D-xilosidasa (EC 3.2.1.37), que hidroliza la xilobiosa y otros xilooligosacáridos cortos como resultado de la acción de la endoxilanasas, para liberar xilosa del extremo no reductor (Collins *et al.*, 2005).

Los hongos, levaduras y bacterias con actividad xilanolítica, además de las enzimas que hidrolizan el enlace de la xilana para producir xilosa, xilobiosa, xilotriosa y otros xilooligosacáridos cortos, también tienen un conjunto de enzimas auxiliares que hidrolizan los grupos ramificados de este polímero, llamadas enzimas desramificadoras, tales como la  $\alpha$ -D-glucuronidasa (EC 3.2.1.139),  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55), acetilxilan esterasa (EC 3.1.1.72), arabinoxilan arabinofuranohidrolasa,  $\beta$ -glucuronidasa (EC 3.2.1.139), feruloil esterasa (EC 3.1.1.73) y *p*-cumaroil esterasa (EC 3.1.1.-) (Collins *et al.*, 2005). La acción combinada de

todas estas enzimas mejora la eficiencia del metabolismo de este polímero (Hespell y Whitehead, 1990; Uffen, 1997; van Peij *et al.*, 1998; Kirk y Cullen, 1998; Lee *et al.*, 2011) (Tabla 1).

Los sistemas xilanolíticos completos, que incluyen todas estas actividades, están ampliamente distribuidos entre hongos, actinomicetos y bacterias. Algunos de los productores de enzimas xilanolíticas más importantes se incluyen en los géneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Streptomyces*, *Phanerochaete*, *Chytridiomyces*, *Ruminococcus*, *Fibrobacter*, *Clostridium* y *Bacillus* (Collins *et al.*, 2005).

### Endo-1,4- $\beta$ -xilanasas

Su nombre oficial es endo-1,4- $\beta$ -xilanasas, pero los sinónimos utilizados comúnmente incluyen: xilanasas, endoxilanasas, 1,4- $\beta$ -D-xilano-xilanolidasas, endo-1,4- $\beta$ -D-xilanasas,  $\beta$ -1,4-xilanasas y  $\beta$ -xilanasas (Collins *et al.*, 2005).

**Tabla 1.** Principales hemicelulasas y su clasificación (Degefu *et al.*, 2001; Howard *et al.*, 2003; Collins *et al.*, 2005).

| Enzimas                              | Modo de acción/sustrato   | Número EC | Familia de glicósido hidrolasas (GH) |
|--------------------------------------|---|-----------|--------------------------------------|
| <b>Principales</b>                   |   |           |                                      |
| Endo- $\beta$ -1,4-xilanasas         | Rompe enlaces glicosídicos internos de la cadena de $\beta$ -1,4- D-xilano / $\beta$ -1,4- D-xilano   | 3.2.1.8   | 5, 8, 10, 11, 43                     |
| Exo- $\beta$ -1,4-xilosidasas        | Hidroliza la xilobiosa y xilooligosacáridos cortos, libera xilosa del extremo no reductor / $\beta$ -1,4-xilooligómeros, xilobiosa  | 3.2.1.37  | 3, 39, 43, 52, 54                    |
| Endo- $\beta$ -1,4-mananasas         | Rompe enlaces internos de la cadena de 1,4- $\beta$ -manano y libera $\beta$ -1,4-manano-oligómeros cortos / $\beta$ -1,4-manano  | 3.2.1.78  | 5, 26                                |
| Exo- $\beta$ -1,4-manosidasas        | Hidroliza manobiosa y manooligómeros cortos, libera manosa / $\beta$ -1,4-manooligómeros, manobiosa   | 3.2.1.25  | 1, 2, 5                              |
| Endo-galactanasas                    | Rompe enlaces internos de la cadena de 1,4- $\beta$ -galactano / $\beta$ -1,4-galactano   | 3.2.1.89  | 53                                   |
| $\alpha$ -galactosidasas             | Hidroliza galactooligómeros cortos, libera galactosa / $\alpha$ -galactopiranosas (1 $\rightarrow$ 6) manooligómeros  | 3.2.1.22  | 4, 27, 36, 57                        |
| <b>Auxiliares o desramificadoras</b> |   |           |                                      |
| Endo- $\alpha$ -1,5-arabinanasas     | Rompe cadenas ramificadas de los $\alpha$ -1,5-arabinanos, libera arabinosa / $\alpha$ -1,5-arabinano   | 3.2.1.99  | 43                                   |
| $\beta$ -glucosidasas                | Hidroliza celobiosa y celooligosacáridos cortos, libera glucosa / $\beta$ -glucopiranosas (1 $\rightarrow$ 4) manopiranosas   | 3.2.1.21  | 1, 3                                 |
| $\alpha$ -D-glucuronidasas           | Hidroliza el enlace $\alpha$ -1,2-glicosídico del ácido 4-O-metil-D-glucurónico de las cadenas laterales de las xilanas / ácido 4-O-metil- $\alpha$ -glucurónico (1 $\rightarrow$ 2) xilooligómeros | 3.2.1.139 | 67                                   |
| $\beta$ -glucuronidasas              | Rompe cadenas laterales de metilglucuronato   | 3.2.1.139 | 67                                   |
| $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas     | Rompe cadenas ramificadas de las $\alpha$ -L-arabinosil xilanas, libera arabinosa / $\alpha$ -arabinofuranosil (1 $\rightarrow$ 2) ó (1 $\rightarrow$ 3) xilooligómeros, $\alpha$ -1,5-arabinano    | 3.2.1.55  | 3,43,51,54,62                        |
| Acetil xilano esterasa               | Rompe cadenas laterales de acetilo / 2- ó 3-O-acetil xilano   | 3.1.1.72  | CE 1, 2, 3, 4, 5, 6                  |
| Acetil manano esterasa               | Libera unidades laterales de manosa / 2- ó 3-O-acetil manano  | 3.1.1.6   | CE 1                                 |
| Feruloil esterasa                    | Rompe enlaces éster de cadenas laterales y libera ácido ferúlico / 2- ó 3-O-acetil manano   | 3.2.1.73  | CE 1                                 |
| <i>p</i> -cumaroil esterasa          | Rompe enlaces éster de cadenas laterales y libera ácido <i>p</i> -cumárico / 2- ó 3-O-acetil manano   | 3.2.1.73  | CE 1                                 |

Las endo-1,4- $\beta$ -xilanasas (1,4- $\beta$ -D-xilano xilanolidasas; EC 3.2.1.8) rompen los enlaces glicosídicos de la cadena de xilano, lo que da como resultado una reducción en el grado de polimerización del sustrato (Degefu *et al.*, 2001). La xilano no es lisada de manera aleatoria, ya

que los enlaces seleccionados para la hidrólisis dependen de la naturaleza de la molécula, por ejemplo de la longitud de la cadena, el grado de ramificación y la presencia de sustituyentes. Inicialmente, los  $\beta$ -D-xilopiranosil oligómeros son los principales productos de hidrólisis, pero en la última etapa, se pueden producir pequeñas moléculas como mono-, di- y trisacáridos de  $\beta$ -D-xilopiranosilo (Polizeli *et al.*, 2005).

Varias maneras de clasificar a las endoxilanasas se han propuesto y dos son las más utilizadas. Una es de acuerdo con los productos finales de la reacción: enzimas no desramificadoras, que no hidrolizan los puntos de los grupos 1,3- $\alpha$ -L-arabinofuranosilo de la cadena lateral de las arabinoxilanas, y por lo tanto no liberan arabinosa. Otra es por la intervención de las enzimas desramificadoras, que hidrolizan éstas cadenas laterales y liberan arabinosa. Cada uno de estos tipos de enzimas se encuentran de manera separada en varias especies de hongos. Sin embargo, algunos hongos son capaces de producir ambos tipos de xilanasas, lo que da como resultado una eficiente hidrólisis de la xilana. Una correspondencia entre las clases de endoxilanasas microbianas y sus propiedades fisicoquímicas se sugiere, tales como el peso molecular (PM) y el punto isoeléctrico (pI). Estas enzimas se dividen en dos grupos: enzimas básicas con PM <30 kDa y endoxilanasas ácidas, con PM >30 kDa. Esta relación solo se aplica para cerca del 70 % de las endoxilanasas conocidas, por lo que se propone una clasificación de las endoxilanasas en varias familias de las glicosidasas (Polizeli *et al.*, 2005).

### **$\beta$ -D-xilosidasas**

Las  $\beta$ -D-xilosidasas (1,4- $\beta$ -D-xilan xilohidrolasas; EC 3.2.1.37) se pueden clasificar de acuerdo a su afinidad relativa hacia la xilobiosa y xilooligosacáridos más grandes. Las xilobiasas y las exo-1,4- $\beta$ -xilanasas son entidades distintas, pero son tratadas como xilosidasas, que hidrolizan pequeños xilooligosacáridos y xilobiosa, y liberan residuos de  $\beta$ -D-xilopiranosilo del extremo no reductor (Chaiyaso *et al.*, 2011). Las  $\beta$ -D-xilosidasas purificadas normalmente no hidrolizan la xilana; su mejor sustrato es la xilobiosa y su afinidad por los xilooligosacáridos es inversamente proporcional a su grado de polimerización. Las  $\beta$ -D-xilosidasas pueden romper sustratos artificiales tales como el *p*-nitrofenil- y *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosido.

También, en hongos se ha detectado la actividad de transxilosilación, lo que da como resultado productos de mayor PM que los sustratos originales. Las  $\beta$ -D-xilosidasas tienen una función importante después de que la xilana ha sufrido un número de hidrólisis sucesivas por las xilanasas. Esta reacción conduce a la acumulación de oligómeros cortos de  $\beta$ -D-xilopiranosilo, que pueden inhibir a las endoxilanasas, es entonces cuando las  $\beta$ -D-xilosidasas hidrolizan estos productos, eliminan la causa de inhibición e incrementan la eficiencia en la hidrólisis de la xilana. En hongos filamentosos, las  $\beta$ -D-xilosidasas pueden estar retenidas dentro del micelio (intracelulares) o ser liberadas al medio de crecimiento (extracelulares). Por ejemplo, las  $\beta$ -D-xilosidasas de *Humicola grisea* var. *Thermoidea* y de *Aspergillus* sp., se purificarón a partir del extracto celular y del medio de cultivo, respectivamente. Sin embargo, aquéllas producidas por bacterias y levaduras, están principalmente asociadas a la célula. Las  $\beta$ -D-xilosidasas fúngicas son frecuentemente glicoproteínas monoméricas, pero algunas poseen dos o tres subunidades. Generalmente estas proteínas tienen PMs relativamente elevados, entre 60 y 360 kDa (Polizeli *et al.*, 2005).

### **Acetilxilan esterasas**

Las acetilxilan esterasas (EC 3.1.1.6) remueven los grupos *O*-acetilo de las posiciones 2 y/o 3 de los residuos de  $\beta$ -D-xilopiranosilo de la acetilxilana. Estas enzimas fueron las últimas en

descubrirse, probablemente porque la extracción alcalina empleada para xilanas altamente acetiladas, como aquéllas de las maderas nobles, tiende a eliminar los grupos acetilo de la xilana. La acetilación de la xilana tiene una función importante, al impedir la hidrólisis de la xilana, ya que los grupos laterales acetilo pueden interferir con las enzimas próximas que rompen la cadena, por impedimento estérico. Por lo tanto, la eliminación de estos grupos facilita la acción de las endoxilanasas (Polizeli *et al.*, 2005).

### **$\alpha$ -L-arabinofuranosidasas**

Las  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas (AFasa; EC 3.2.1.55) catalizan la hidrólisis de los residuos arabinofuranosilo  $\alpha$ -L-1-2 y  $\alpha$ -L-1-3 unidos a las unidades de xilosa de las hemicelulosas, tales como la arabinoxilana y otros polisacáridos que contienen L-arabinosa. Son enzimas clave involucradas en la degradación de la lignocelulosa, pues remueven las cadenas laterales de las hemicelulosas (Lee *et al.*, 2011).

Dos tipos de arabinofuranosidasas o arabinasas existen con distintos modos de acción: exo- $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55), que degrada *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranósidos y arabinanas ramificadas, y endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinasa (EC 3.2.1.99), que sólo hidroliza arabinanas lineales. La mayoría de las arabinasas investigadas son de tipo exo (Polizeli *et al.*, 2005).

### **$\alpha$ -glucuronidasas**

Las  $\alpha$ -glucuronidasas (EC 3.2.1.139) hidrolizan los enlaces  $\alpha$ -1,2 entre los residuos de ácido glucurónico y las unidades de la cadena de  $\beta$ -D-xilopiranosilo encontradas en la glucuronoxilana. Algunos microorganismos exhiben su actividad máxima solo en presencia de sustratos cortos de glucuronoxilana. Sin embargo, la especificidad por sustrato varía con la fuente microbiana y algunas glucuronidasas pueden hidrolizar el polímero intacto. Sin embargo, los grupos acetilo cercanos a los sustituyentes de glucuronosilo pueden impedir parcialmente la actividad de las  $\alpha$ -glucuronidasas (Polizeli *et al.*, 2005).

Casi todas las  $\alpha$ -glucuronidasas microbianas caracterizadas a nivel de proteína pertenecen a la familia GH67. Estas enzimas solo actúan en los MeGlcA unidos por enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2) en el extremo no reductor de los residuos xilopiranosilo en xilooligosacáridos cortos. Por lo tanto, esta acción requiere la cooperación de endoxilanasas y  $\beta$ -xilosidasas para la liberación eficiente de MeGlcA/GlcA a partir de la GX polimérica (Chong *et al.*, 2011).

### **Esterasas del ácido ferúlico y del ácido *p*-cumárico**

Las esterases del ácido ferúlico y del ácido *p*-cumárico (EC 3.2.1.73) lisan los enlaces éster de la xilana; la primera lisa entre la arabinosa y los grupos laterales de ácido ferúlico, mientras que la segunda lisa entre la arabinosa y el ácido *p*-cumárico.

La hidrólisis de la *O*-acetilglucuronoxilana requiere cuatro enzimas diferentes: endo-1,4- $\beta$ -xilanasas (endoxilanasas), acetil esterasa,  $\beta$ -glucuronidasa y  $\beta$ -xilosidasa. Los hongos poseen un conjunto de endoxilanasas con especificidades diferentes, esta multiplicidad probablemente refleja la complejidad de las xilanas. En la hidrólisis completa de los *O*-acetilgalactoglucomananas están involucradas cinco tipos de enzimas. El principal enlace del polímero es lisado por las endomananasas, que liberan fragmentos oligoméricos. La acetilmanan esterasa remueve los grupos acetilo. La  $\beta$ -galactosidasa remueve los residuos sustituyentes de galactosa, similar a la acción de la arabinosidasa y la glucuronidasa en el caso de las xilanas. Finalmente, la  $\beta$ -

manosidasa y la  $\beta$ -glucosidasa lisan los enlaces  $\beta$ -1,4 de los oligómeros liberados por las endomananasas. Aunque estudios limitados existen acerca de estas enzimas en hongos de podredumbre blanca, estos organismos tienen sistemas efectivos de degradación de glucomananas (Kirk y Cullen, 1998).

### Enzimas clave en la hidrólisis de las xilanas

La enzima más importante de este sistema para la biodegradación de la xilana es la endo-1, 4- $\beta$ -xilanasas, pues libera xilo-oligosacáridos largos y cortos a partir de varios sustratos (Biely *et al.*, 1997; Inmaculada *et al.*, 2005; Assamoi *et al.*, 2008 y Liu *et al.*, 2010). Los componentes que han sido estudiados de forma extensiva en estos sistemas enzimáticos son las endoxilanasas y las  $\beta$ -xilosidasas. La esterasa del ácido ferúlico, la esterasa del ácido *p*-cumárico, la acetilxilan esterasa y la  $\alpha$ -glucuronidasa fueron descubiertas a finales de la década de los 80's, probablemente debido a la dificultad para obtener sustratos adecuados. Estas enzimas están presentes en hongos y bacterias, pero hasta ahora, un número limitado se purificó y analizó en base a sus propiedades fisicoquímicas (Polizeli *et al.*, 2005). Aunque, algunas xilanasas frecuentemente exhiben actividad de celulasa (Sae-Lee y Boonmee, 2014).

### Sinergismo entre las enzimas del complejo xilanolítico

Los efectos sinérgicos y cooperativos entre las enzimas degradadoras de xilanas aumenta la susceptibilidad de la xilana heteropolimérica para ser atacada por las endoxilanasas. Por ejemplo, la adición de acetilxilan estererasas a la xilana da como resultado la liberación de ácido acético y una xilana menos acetilada, lo que permite una mayor accesibilidad a las endoxilanasas. Por otro lado, los pequeños polímeros acetilados, producidos por la endoxilanasas, son los sustratos preferidos de las estererasas. Por lo tanto, la acción sinérgica entre las acetilxilan estererasas y las endoxilanasas da como resultado una degradación eficiente de la xilana acetilada. Los sustratos complejos, tales como el salvado de trigo, que contienen grandes cantidades de arabinoxilanas, no pueden ser degradados fácilmente por las endoxilanasas sin ser tratados previamente con  $\alpha$ -arabinofuranosidasas. Tales enzimas, en asociación con las endoxilanasas, aumentan la sacarificación de la arabinoxilana. Como se mencionó arriba, las  $\beta$ -xilosidasas son responsables de la remoción de los xilooligosacáridos, los productos de inhibición de las xilanasas, esto permite una hidrólisis eficiente de la xilana. Por lo tanto, para propósitos biotecnológicos, el microorganismo ideal será aquél que produzca una cantidad adecuada de cada una de las enzimas del complejo xilanolítico.

Durante la degradación de los dos principales polímeros de la hemicelulosa de la madera (glucuronoxilanas y galactoglucomananas), las hidrolasas específicas actúan en sinergismo para completar la conversión de estos polímeros hasta azúcares monoméricos y ácido acético (Kirk y Cullen, 1998).

La hidrólisis de la xilana requiere la acción de múltiples xilanasas diferentes con especificidades similares. La multiplicidad de las enzimas xilanolíticas se reporta en varios microorganismos tales como *Streptomyces* sp., *Penicillium purpurogenum*, *Melanocarpus albomyces* IIS 68, *Cellulomonas* sp. N.C.I.M 2353 y *Aeromonas caviae* W-61. La producción de un sistema multienzimático de xilanasas, en el que cada enzima tiene una función especial, es una estrategia de los microorganismos para lograr una hidrólisis efectiva de la xilana. Durante la hidrólisis de la xilana, un sinergismo se observa entre enzimas que actúan sobre la cadena de la 1,4- $\beta$ -D-xilana ( $\beta$ -1,4-endoxilanasas) y enzimas que cortan las cadenas laterales ( $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas, acetilxilan esterasa y  $\beta$ -glucuronidasa). El actinomiceto termófilico *Thermomonospora fusca* posee un

sistema multienzimático con actividades de endoxilanasas,  $\beta$ -xilosidasas,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas y acetil esterasas. Las  $\beta$ -xilosidasas aumentan la hidrólisis de la xilana iniciada por las endoxilanasas, cuando se remueve el producto de inhibición de las endoxilanasas. De manera similar, la adición de  $\alpha$ -arabinofuranosidasas a las endoxilanasas aumenta la sacarificación de la arabinoxilana (Beg *et al.*, 2001).

Lee *et al.* (2011) estudiaron el efecto sinérgico de una  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa (ARF) de *Penicillium* sp. LYG 0704 con una xilanasa (XynT) de *Bacillus alcalophilus* sobre xilana de avena a pH 5.0 y 37 °C. La combinación de la ARF con la XynT condujo al aumento en un 67 % en la eficiencia de producción de azúcares reductores a partir de xilana de avena en comparación con la XynT sola.

### **Multiplicidad de las xilanasas y dominios múltiples**

Los microorganismos xilanolíticos a menudo sintetizan grupos múltiples de enzimas diferentes, lo que mejora la eficiencia de la degradación de la xilana (Hernández *et al.*, 2008). Además de la producción de una variedad de enzimas xilanolíticas, muchos microorganismos producen xilanasas múltiples. Estas enzimas pueden tener diversas propiedades fisicoquímicas, estructura, actividad específica, rendimiento y especificidad, lo que aumenta de ese modo la eficiencia, el grado de hidrólisis y la diversidad y complejidad de las enzimas. Ejemplos típicos de microorganismos que producen isoenzimas xilanolíticas incluyen a *Aspergillus niger*, que produce quince xilanasas extracelulares y *Trichoderma viride*, que secreta trece. Esta multiplicidad puede ser el resultado de redundancia genética, pero también se reportan casos de procesamiento post-transcripcional diferencial.

Los genes de estas isoenzimas pueden encontrarse como copias policistrónicas o no policistrónicas múltiples. En algunos casos varias xilanasas se expresan como productos de distintos genes. Por ejemplo, los genes de xilanasa,  $\beta$ -xilosidasa y acetil esterasa de *Caldocellum saccharolyticum* (ahora conocido como *Caldocellulosiruptor saccharolyticus*) son policistrónicos, mientras que el gen *XynC* de *Fibrobacter succinogenes* S85 codifica para dos diferentes dominios catalíticos de xilanasa. Por otra parte, además de los dominios catalíticos múltiples, muchas xilanasas también se caracterizan por la presencia de varios dominios suplementarios. Algunos ejemplos incluyen los dominios de unión a la xilana, dominios de unión a la celulosa, dominios *dockerin* (implicados en unir a complejos multidominio producidos por ciertos microorganismos, por ejemplo, *Clostridium thermocellum*), dominios termoestabilizantes y dominios para los que todavía no se ha elucidado una función. Estos dominios se pueden plegar y funcionar de manera independiente y normalmente están separados por segmentos cortos de empalme enriquecidos en aminoácidos hidroxilados. La mayoría de las xilanasas se secretan al medio extracelular, ya que el gran tamaño del sustrato no permite su penetración hacia la célula. De hecho, la producción de xilanasas es inducida por medio de los productos de su propia acción. Las pequeñas cantidades de enzima producidas constitutivamente liberan xilooligómeros que pueden ser transportados hacia la célula, donde son degradados adicionalmente por las  $\beta$ -xilosidasas o por xilanasas intracelulares, donde inducen la síntesis de más xilanasas (Collins *et al.*, 2005).

Los hongos y las bacterias producen una multiplicidad de enzimas que pueden pertenecer a la misma clase funcional y las cuales, algunas veces, al igual que las celulasas, exhiben una amplia especificidad sobre los polímeros de las plantas (Uffen, 1997).

En algunos casos se han separado tres o más actividades enzimáticas diferentes a partir de un solo cultivo. Una diversidad de factores puede ser responsable de las formas múltiples frecuentemente detectadas para las endoxilasas. Estos incluyen procesamiento diferencial de mRNA, modificaciones post-traduccionales, tales como la glicosilación, auto-agregación y la digestión proteolítica. Distintos alelos de un gen pueden expresar endoxilasas múltiples, incluso pueden expresarse en genes completamente separados (Polizeli *et al.*, 2005). Los hongos filamentosos son conocidos por producir xilasas múltiples (Riou *et al.*, 1991; Kimura *et al.*, 2000). En hongos patógenos también se han reportado xilasas múltiples (Degefu *et al.*, 1995).

Al igual que muchas otras enzimas polisacárido-hidrolasas, las xilasas contienen estructuras multidominio compuestas de un dominio catalítico asociado con dominios no catalíticos discretos llamados módulos de unión a carbohidrato (CBMs). Las principales funciones de los CBMs son facilitar la asociación de las enzimas con los sustratos, aumentar su actividad degradativa, mediar la interacción proteína-proteína y anclar la enzima a la superficie celular. Al igual que las familias de dominios catalíticos, los CBMs también se agrupan en un número de familias distintas. Actualmente, 51 familias de CBMs se han identificado y caracterizado *e.g.* una xilasa de *T. reesei* tiene forma elipsoidal y carece de CBMs (Kirk y Cullen, 1998; Hernández *et al.*, 2008).

### Clasificación de las xilasas

La heterogeneidad y complejidad de la xilana ha dado como resultado una abundante diversidad de xilasas con diferentes especificidades, secuencias primarias y plegamientos, y por lo tanto exhibe limitaciones en la clasificación de estas enzimas sólo por la especificidad hacia el sustrato. Wong *et al.* (1988) clasificaron a las xilasas en base a sus propiedades fisicoquímicas y propusieron dos grupos: aquellos con un bajo peso molecular (<30 kDa) y pI básico, y aquellas con un elevado peso molecular (>30 kDa) y pI ácido. Sin embargo, varias excepciones a este patrón se han encontrado y aproximadamente el 30 % de las xilasas actualmente identificadas, en particular las xilasas fúngicas: no pueden ser clasificadas por este sistema. Más tarde, un sistema de clasificación más completo se introdujo, que permitió la clasificación no sólo de las xilasas, sino de las glicosidasas en general (EC 3.2.1.x), y el cual ahora se ha convertido el medio estándar para la clasificación de estas enzimas. Este sistema se basa solo en la comparación de la estructura primaria de los dominios catalíticos y agrupa a las enzimas en familias de secuencias relacionadas. La clasificación inicial agrupaba a las celulasas y xilasas en 6 familias (A-F), la cual fue actualizada a 77 familias en 1999 (1-77) y continúa creciendo a medida que se identifican nuevas secuencias de glicosidasas. Actualmente, 96 familias de glicosido hidrolasas existen. A medida que la estructura y el mecanismo molecular de una enzima están relacionados con su estructura primaria, este sistema de clasificación refleja sus características estructurales y mecánicas. Las enzimas de una familia particular tienen una estructura tridimensional y mecanismo molecular similares. También, un modo de acción similar sobre sustratos pequeños, solubles y sintéticos se sugiere que pueden tener. Además, la evolución divergente ha dado como resultado que miembros de algunas familias tengan estructuras tridimensionales relacionadas, y por lo tanto, el agrupamiento de familias en niveles jerárquicos superiores conocidos como clanes, se ha introducido. Actualmente, 14 clanes diferentes se proponen (GH-A a GH-N). La mayoría de los clanes abarcan de 2 a 3 familias, aparte del clan GH-A, que incluye 17 familias. En este sistema de clasificación, las xilasas están confinadas normalmente en las familias 10 (anteriormente F) y 11 (anteriormente G). Una investigación en bases de datos apropiadas que utilizan el número de clasificación de enzimas EC 3.2.1.8 indicó que las enzimas con actividad de xilasa se encuentran también en las familias 5, 7, 8, 16, 26, 43, 52 y 62. Sin embargo, una revisión más cercana de la literatura disponible,

muestra que sólo aquellas secuencias clasificadas en las familias 5, 7, 8, 10, 11 y 43 contienen dominios catalíticos verdaderamente distintos con actividad demostrada de endo-1,4- $\beta$ -xilanasas. Aquellas secuencias reportadas para las familias 16, 52 y 62 parecen ser enzimas bifuncionales que contienen dos dominios catalíticos; un dominio para la familia 10 u 11, así como un segundo dominio para glicosidasas. Por ejemplo, una enzima de *Ruminococcus flavefaciens* contiene un amino terminal de la familia 11 de las xilanasas y un carboxilo terminal de la familia 16 de las liquenasas y por lo tanto es clasificada en ambas familias, 11 y 16. Además, aquellas enzimas clasificadas en la familia 26 no parecen ser endo-1,4- $\beta$ -xilanasas, pero sí endo-1,3- $\beta$ -xilanasas. Por lo tanto, el punto de vista actual de que las enzimas con actividad de xilanasas están restringidas únicamente a las familias 10 y 11 no es completamente correcto y deberá expandirse para incluirlas en las familias 5, 7, 8 y 43.

### Familias de xilanasas

Las glicósido hidrolasas (GH) y enzimas relacionadas se pueden clasificar en base a la similitud de su secuencia de aminoácidos utilizando análisis de grupos hidrofóbicos, en lugar de la simple especificidad por sustrato. Este método de clasificación es para todos los miembros de una familia que poseen un mecanismo catalítico conservado, aunque pueden actuar en diferentes sustratos. La base de datos CAZy (Carbohydrate Active enzyme, <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY>) mantiene y actualiza la información de las GH y su clasificación mediante las secuencias de sus aminoácidos. Actualmente existen 91 familias de GH definidas estructuralmente, 65 familias de glicosiltransferasas, 13 familias de polisacárido liasas, 13 familias de carbohidrato estererasas y 32 familias de módulos de unión a carbohidratos (Krause *et al.*, 2003).

Las xilanasas se pueden clasificar en una de dos familias, familia 10 y familia 11 de las glicósido hidrolasas, anteriormente denominadas F y G, respectivamente (Hernández *et al.*, 2008).

Las xilanasas de ambas familias se encuentran en bacterias y eucariotes, y se sugiere que tienen funciones fisiológicas diferentes. Si éstas fueran familias de moléculas hermanas parálogas, esto apuntaría al menos a un evento temprano en la duplicación de las xilanasas en la evolución de la vida, antes de la separación entre las cadenas basales putativas de vida, las Eubacterias (Arqueas+Eucariotes). Sin embargo, estas dos familias de xilanasas parecen tener orígenes evolutivos diferentes a partir de otras endoglucanasas, por ejemplo, la familia 10 está más relacionada con la familia 5 y la familia 11 está más relacionada con la familia 12. Parece más prudente sugerir que la familia 11 está más modificada que la familia 10 en relación a una xilanasas original, más versátil. A pesar de que la caracterización de las familias 10 y 11 de las xilanasas es grandemente fenética, cada familia parece corresponder a cadenas bien definidas. Las estructuras de las moléculas de ambas familias se determinaron y compararon. Las xilanasas de la familia 10 tienen dominios catalítico (que es un dominio túnel TIM) y de unión al sustrato. Las endoglucanasas de las familias 5, 7, 8 y 43 también tienen un tipo, aunque menos importante, de actividad sobre las xilanasas. La familia 10 de las xilanasas encontradas en especies de grupos diferentes de bacterias y eucariotes no son tan diferentes unas con otras, aunque se caracterizó un número de subfamilias. Sin embargo, la familia 11, incluye xilanasas específicas y de bajo MW que puede variar considerablemente entre grupos, con diferentes valores de pI, termoestabilidad, perfiles de pH, estructura y propiedades catalíticas. Esto dio como resultado una clasificación adicional de las xilanasas en clases tales como A, B, C, D, 1, 2, 3, I, II y III. Esto implica que las interferencias filogenéticas hechas cuando se utiliza la familia 11 de las xilanasas, se tiene que considerar el alto riesgo de usar moléculas parálogas, con resultados potencialmente desastrosos en términos de interferencias filogenéticas correctas. Al menos diez subfamilias de xilanasas existen, algunas de las cuales están limitadas a hongos (xilanasas Ia, Ib, Ic, II, IIIa, IIIb,

IV), y otras a bacterias (A, B, C). Algunos géneros de hongos y bacterias muestran más de una subfamilia de xilanasas. Una interpretación es que puede ocurrir la duplicidad de las xilanasas de la familia 11 antes de la divergencia entre las Eubacterias y (Arquea+Eucaria), tanto que una familia 11 estaría presente en el mismo genoma. Sin embargo, es posible que los problemas en la clasificación de las xilanasas puedan ser debido a “ruido” en el análisis, el resultado de problemas de alineación y/o asociación de especies basadas en algoritmos que no generan reconstrucciones filogenéticas confiables. El razonamiento filogenético en biología aplicada es particularmente importante ya que permite una búsqueda eficiente de cadenas que comparten características de interés económico. En el estudio de xilanasas, esto se refiere a la búsqueda, en las cadenas apropiadas, de nuevas especies con propiedades extremofílicas y de proteínas homólogas con mejor eficiencia en un sentido aplicado (Polizeli *et al.*, 2005).

Recientemente, las propiedades estructurales y funcionales de varias xilanasas se estudian a detalle, la mayoría de estas xilanasas microbianas se incluyen en las familias 10 (anteriormente F) y 11 (anteriormente G) de las glicosido hidrolasas (Inmaculada *et al.*, 2005). En base a las similitudes en la secuencia de amino ácidos, la mayoría de las endo-xilanasas se clasifica en las familias 10 y 11 de las glicosido hidrolasas (GH); mientras que otras xilanasas se clasifican en las familias 5, 8 y 43 de las GH (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>) (Liu *et al.*, 2010). La familia GH10 contiene enzimas de plantas, hongos y bacterias mientras que la familia GH11, no relacionada estructuralmente, sólo incluye enzimas fúngicas y bacterianas (Lafond *et al.*, 2011).

### Regulación de la biosíntesis de xilanasas

Las xilanasas son normalmente enzimas inducibles, secretadas en medios que contienen xilana pura o residuos ricos en xilana. Sin embargo, la producción constitutiva de xilanasas se reporta. La inducción de xilanasas por otros compuestos se investigó, tales como L-sorbose, varios xilooligosacáridos, xilosa y residuos lignocelulósicos. Varios reportes demuestran la inducción de xilanasas por las lignocelulosas, tales como salvado de trigo, paja de arroz, mazorcas de maíz y bagazo de caña. En algunos casos, los azúcares fácilmente metabolizables, tales como la glucosa y/o xilosa, son supresores de la síntesis de xilanasas. También, el aumento en la producción de xilanasas en presencia de aminoácidos se demostró. Asimismo, la zeolita sintética que contiene calcio (CaA) a una concentración de 0.5 %, indujo al doble la producción de xilanasas en *Bacillus* sp. NCL 87-6-10.

Gupta *et al.* (2001) reportaron una producción mejorada de xilanasas por *Staphylococcus* sp. SG-13 en un medio bifásico que contuvo en la capa inferior al agar mezclado con salvado de trigo y otros sólidos. La regulación de la secreción de xilanasas por los microorganismos todavía no se comprende completamente, ya que la xilana no puede entrar a las células microbianas. La inducción de la producción de xilanasas se estimula por fragmentos de xilana de bajo peso molecular, que son producidos en el medio por pequeñas cantidades de enzimas producidas constitutivamente (Beg *et al.*, 2001).

Los residuos  $\beta$ -D-xilopiranosil también pueden actuar como inductores del complejo xilanolítico, pero en algunos microorganismos esto puede conducir a una represión catabólica de las endoxilanasas. Otro compuesto frecuentemente utilizado como un potente inductor es el  $\beta$ -metil xilósido, un análogo estructural de la xilobiosa no metabolizable que se puede producir a bajo costo. También, la inducción de los sistemas xilanolíticos por otros compuestos sintéticos, tales como el 2-O- $\beta$ -D-xilopiranosil D-xilosa (Xil $\beta$ 1-2Xil), 3-O- $\beta$ -D-xilopiranosil D-xilosa (Xil $\beta$ 1-3Xil) y 2-O- $\beta$ -D-glucopiranosil D-xilosa (Glc $\beta$ 1-2Xil) se ha descrito. Las xilobiosas, que son homodisacáridos (Xil $\beta$ 1-2Xil y Xil $\beta$ 1-3Xil), son inductores potentes de las endo-1,4- $\beta$ -xilanasas,

pero fallan en inducir una enzima del complejo celulolítico, la endo-1,4- $\beta$ -glucanasa, mientras que ocurre lo contrario con el heterosacárido Glc $\beta$ 1-2Xil. Tales sustratos sintéticos sirven como inductores híbridos, que promueven la síntesis de ambos complejos enzimáticos. Los resultados de estos estudios sugieren la existencia de sistemas reguladores separados para la síntesis de celulasas y xilanasas.

Las xilanasas específicas son sintetizadas cuando los microorganismos son cultivados en xilana, mientras que en celulosa, los organismos producen celulasas en asociación con xilanasas, quizá debido a que el sustrato celulósico contiene trazas de hemicelulosas. En la industria textil y del papel, es importante que sea posible obtener xilanasas libres de actividad de celulasa, ya que es necesario extraer la hemicelulosa de las fibras naturales, sin dañar la celulosa. Los polisacáridos, tales como la xilana, son conocidos como inductores de la actividad de complejos enzimáticos en microorganismos. Este efecto fue cuestionado por muchos investigadores por algún tiempo, ya que estas macromoléculas no podían hacer contacto con los sitios dentro de la célula, para así influenciar la regulación de la expresión de los genes.

Para que ocurra la inducción de las enzimas xilanolíticas, debe haber contacto físico entre parte de la maquinaria reguladora de la célula y el inductor; lo que sugiere la existencia de algunos sitios de reconocimiento en la superficie de la célula. Las xilanasas constitutivas, con niveles de actividad relativamente bajos, se supone que son responsables de la hidrólisis inicial de la xilana, produciendo pequeños oligosacáridos  $\beta$ -D-xilopiranosil tales como la xilobiosa y xilotriosa, entre otros. Algunos autores luego consideran a la xilobiosa formada como el verdadero inductor de la síntesis de endoxilanasas. Con ayuda de las  $\beta$ -xilósido permeasas, estos oligosacáridos son transportados dentro de la célula, donde activan la expresión de los genes de los sistemas xilanolíticos. La actividad de las permeasa inducida en las células disminuye en presencia de glucosa, pero es muy eficiente en presencia de los inductores xilanolíticos. En los hongos filamentosos, la represión por carbono catabólico es mediada por la proteína CREA (represor transcripcional) (Polizeli *et al.*, 2005).

La represión en la producción de xilanasas por glucosa o sacarosa se observó en hongos filamentosos, así como en bacterias. Ésta es conocida como represión catabólica mediada por el gen *CreA*. En bacterias y hongos se ha demostrado que la producción de xilanasas es inducible, y el mecanismo de inducción es complejo; un inductor para la producción de xilanasas en una especie puede ser un inhibidor en otras especies. En un estudio realizado por Min *et al.* (2002), las xilanasas fueron inducidas por celulosa de forma tan efectiva como con xilana.

De acuerdo con Chimtong *et al.* (2011), la actividad de xilanasas más elevada se observó durante la fase exponencial de crecimiento de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* y permaneció casi constante durante la fase de crecimiento estacionario y luego disminuyó rápidamente.

En *Aspergillus*, el gen *CreA* es responsable de la represión catabólica por carbono, en la cual no se expresan enzimas clave en presencia de fuentes de carbono fácilmente metabolizables (*e.g.* glucosa y fructosa). En las endoxilanasas y las  $\beta$ -xilosidasas de *A. nidulans* y *A. flavus* se demostró que estas enzimas son reprimidas por el gen *CreA* (Mellon *et al.*, 2011).

## El mercado de las enzimas

En los últimos años, el uso de las enzimas adquirió gran relevancia en aplicaciones de la industria alimentaria, farmacéutica, de detergentes, panadería y papelera. Los procesos catalizados por

enzimas en la industria son cada día más numerosos, ya que presentan ventajas frente a catalizadores no biológicos (Montes y Magaña, 2002). La producción mundial de enzimas presentó un abrupto crecimiento en las ventas a finales de los sesenta, pasando de menos de 10 hasta casi 150 millones de dólares anuales, volviendo a disminuir unos años más tarde a casi 50 millones de dólares, para reiniciar el crecimiento hacia finales de los setenta. Esta situación se debe al *boom* que tuvieron las enzimas proteolíticas en el mercado de los detergentes y su disminución ante los problemas de índole toxicológico generados, antes de desarrollar la presentación libre de polvos. El tamaño del mercado actual de las enzimas es difícil de estimar, por razones de índole comercial y también por el hecho de que en varios procesos las enzimas son producidas y consumidas por la misma empresa. Es el caso de los procesos enzimáticos de producción de aminoácidos y de algunas compañías productoras de jarabes glucosados y fructosados. Sin embargo, la producción y consumo de enzimas crece a un ritmo de 5 % anual, habiéndose producido 80,000 toneladas de productos enzimáticos en 1985; es decir, unas 4,000 toneladas de proteínas al año. El valor del mercado está en el intervalo de los 500 y 600 millones de dólares. Es impactante el hecho de que, de más de dos mil enzimas registradas sólo unas 60 sean producidas comercialmente y que de éstas sólo cinco cubran más del 80 % del mercado. Por otro lado, más de la mitad del mercado lo ocupan Dinamarca y Holanda, con las compañías Novo y Gist Brocades, respectivamente. Otras compañías de importancia son Miles Laboratories (ahora Solvay), Pfizer, Rohm and Haas, Amano, etc. En Japón, la producción de enzimas es una de las áreas más avanzadas, siendo prácticamente los líderes en la producción de enzimas en medio sólido. Novo Industries estableció una planta en Brasil y, actualmente, en México la compañía Enmex produce las principales enzimas con tecnología de Miles Lab., y Pfizer produce amilasas y proteasas (García *et al.*, 2004).

Las enzimas más producidas a nivel mundial son las proteasas bacterianas, seguidas por las amiloglicosidasas y amilasas bacterianas (García *et al.*, 2004; London South Bank University, 2004). De acuerdo con Bhosale *et al.* (1996), la D-xilosa isomerasa, comúnmente referida como glucosa isomerasa (GI), es una de las tres enzimas de mayor valor en tonelaje, siendo la amilasa y la proteasa las otras dos más importantes. La GI es una de las enzimas industriales más importantes hoy en día (Deshpande y Rao, 2006) y podría ser la más importante de todas las enzimas industriales del futuro. Actualmente, la GI es la enzima inmovilizada más comercializada en el mundo (Saha y Demirjian, 2001). En orden de importancia, las enzimas industriales se utilizan a gran escala principalmente en detergentes, textiles, bebidas (cervecería), lácteos, producción de pulpa y papel, hidrólisis de almidón, panadería y alimento para animales (Nierstrasz y Warmoeskerken, 2003).

El mercado de las enzimas en México es uno de los importantes, por el volumen y los costos que generan las importaciones y exportaciones de estos productos. El mercado de enzimas microbianas en México se estima en 17 millones de dólares anuales (García *et al.*, 2004). En el periodo del 2005 al 2008, las preparaciones enzimáticas que más se importaron y exportaron en México fueron amilasas, proteasas, mezclas de proteasas y amilasas, celulasas, peptidasas y fibrinucleasas. Las importaciones totales de preparaciones enzimáticas fueron de 6,962,331; 8,294,819; 8,044,859 y 4,893,247 kilogramos, en 2005, 2006, 2007 y 2008, respectivamente, y las exportaciones totales fueron de 2,099,280; 2,471,404; 3,810,108 y 3,336,999 kilogramos, en 2005, 2006, 2007 y 2008, respectivamente, de acuerdo con datos del Sistema de Información Arancelaria Vía Internet (SIAVI) de la Secretaría de Economía (2009).

Es importante considerar que el costo en la producción de enzimas es uno de los factores principales que determinan su uso a escala industrial (Beg *et al.*, 2001).

## Aplicaciones industriales de las xilanasas

En la última década, el uso de las enzimas xilanolíticas microbianas como catalizadores ha atraído gran atención, de manera particular debido a su potencial biotecnológico en varios procesos industriales (Assamoi *et al.*, 2008). Las xilanasas tienen un potencial enorme para aumentar la producción de varios productos útiles de forma más económica (Beg *et al.*, 2001). Por ello, las xilanasas constituyen uno de los grupos de enzimas industriales más importantes (Garg *et al.*, 2011).

Los productos finales de la degradación de la xilana de importancia considerable en aplicaciones comerciales son el furfural y el xilitol. La xilana se puede convertir en unidades de  $\beta$ -D-xilopiranosil y sus oligosacáridos a través de dos tipos de hidrólisis: ácida o enzimática. La hidrólisis ácida se prefiere con frecuencia debido a que es rápida, pero es acompañada de la formación de compuestos tóxicos que pueden impedir la fermentación microbiana subsecuente. Además, en un proceso largo, esto puede conducir a la corrosión del equipo metálico que está en contacto con el ácido. Recientemente, algunas compañías industriales mostraron interés en el desarrollo de procesos enzimáticos eficientes en lugar de la hidrólisis ácida en el tratamiento del material que contiene hemicelulosa. Las xilanasas comerciales son producidas industrialmente, por ejemplo, en Japón, Finlandia, Alemania, República de Irlanda, Dinamarca, Canadá y Estados Unidos de América. Los microorganismos utilizados para obtener estas enzimas son *Aspergillus niger*, *Trichoderma* sp. y *Humicola insolens*. Sin embargo, las xilanasas comerciales también se pueden obtener a partir de bacterias. Las xilanasas comenzaron a utilizarse en 1980s, inicialmente en la preparación de alimento para animales y más tarde en las industrias de alimentos, textil y del papel. Actualmente, las xilanasas y las celulasas, junto con las pectinasas, representan el 20 % del mercado mundial de las enzimas (Polizeli *et al.*, 2005).

Las enzimas degradadoras de la xilana atraen la atención debido a sus variadas aplicaciones industriales, incluyendo el preblanqueo de pulpa de papel, producción de xilooligosacáridos, modificación de cereales comestibles, para mejorar la digestibilidad de alimento animal y la bioconversión de materiales lignocelulósicos y desechos agrícolas a productos fermentables (Chimtung *et al.*, 2011; Garg *et al.*, 2011).

El desarrollo de métodos biotecnológicos para la conversión de xilosa a acetato, propionato, lactato o succinato, utilizando tecnologías de fermentación microbiana, proporcionaría una fuente totalmente renovable de materias primas para las industrias química y farmacéutica. Con el acetato, hidrógeno y dióxido de carbono (a partir de la mineralización de polímeros), los reactores de bacterias metanogénicas podrían utilizarse para producir suministros inagotables de metano como una fuente de combustible no contaminante (Uffen, 1997).

### **Alimento animal**

El uso de enzimas para la producción de alimento animal es un sector importante de la agroindustria (Inmaculada *et al.*, 2005; Tsai y Huang, 2008; Mellon *et al.*, 2011; Chaiyaso *et al.*, 2011), con una producción mundial anual que excede las 600 millones de toneladas y una facturación de más de 50 mil millones de dólares. Las xilanasas son utilizadas en alimentación animal junto con las glucanasas, pectinasas, celulasas, proteasas, amilasas, fitasas, galactosidasas y lipasas. Estas enzimas hidrolizan a las arabinoxilanas de los ingredientes del alimento, reduciendo la viscosidad del material sin tratar (Beg *et al.*, 2001). La arabinoxilana encontrada en las paredes celulares de los granos tiene un efecto anti-nutritivo en las aves de corral. Cuando tales componentes están presentes en forma soluble, pueden aumentar la viscosidad del

alimento ingerido, interfiriendo con la movilidad y absorción de otros componentes. Si las xilanasas se añaden al alimento que contiene derivados de maíz y sorgo, los cuales son alimentos de baja viscosidad, se puede mejorar la digestión de los nutrientes en la parte inicial del tracto digestivo, dando como resultado un mejor uso de energía. La acción conjunta de estas enzimas produce una mezcla alimenticia fácilmente digerible. Las aves de corral jóvenes y los cerdos producen enzimas endógenas en cantidades pequeñas comparadas con los adultos, de modo que los suplementos alimenticios que contienen enzimas exógenas deberían mejorar su rendimiento como ganado. Más aún, este tipo de dieta reduce la cantidad de residuos no deseados en los excrementos (fósforo, nitrógeno, cobre y zinc), un efecto que podría tener una función importante en la reducción de la contaminación ambiental (Polizeli *et al.*, 2005).

### **Manufactura de pan, alimentos y bebidas**

Las  $\beta$ -1,4-xilanasas tienen un gran uso comercial en alimentos. Por ejemplo en la elaboración de pan, junto con las  $\alpha$ -amilasas, amilasas del malteado, glucosa oxidasa y proteasas (Inmaculada *et al.*, 2005; Tsai y Huang, 2008; Mellon *et al.*, 2011). Las xilanasas, como las otras hemicelulasas, lisan la hemicelulosa de la harina de trigo, ayudan en la redistribución del agua y dejan la masa suave y fácil de amasar. Durante el proceso de horneado del pan, retardan la formación de migajas, permitiendo a la masa crecer. Con el uso de xilanasas, hay un aumento en el volumen del pan, mayor absorción de agua y mejor resistencia a la fermentación (Beg *et al.*, 2001). También, para la salud sería efecto benéfico una mayor cantidad de arabinoxilooligosacáridos en el pan. En la elaboración de biscochos o galletas, de galletas integrales cremosas ligeras y mejorar su textura, palatabilidad y uniformidad de las láminas se recomienda el uso de xilanasas (Polizeli *et al.*, 2005). Las industrias de los jugos y del vino conforman una buena parte del mercado de las enzimas. La producción de jugos de frutas y vegetales requiere métodos de extracción, aclarado y estabilización. En 1930s, cuando comenzó la manufactura de jugos de frutas cítricas, los rendimientos eran bajos y se tenían problemas en la filtración del jugo, debido a su turbidez. El aumento en el conocimiento de los constituyentes químicos de las frutas y el uso de enzimas microbianas ayudó a resolver estos problemas (Lafond *et al.*, 2011). Hoy en día, las xilanasas, en conjunto con las celulasas, amilasas y pectinasas, conducen a mayores rendimientos de jugo por medio de la licuefacción de la fruta y de los vegetales, estabilización de la pulpa de la fruta, aumento en la recuperación de aromas, aceites esenciales, vitaminas, sales minerales, colorantes comestibles, pigmentos, etc., reducción de la viscosidad, hidrólisis de sustancias que dificultan el aclarado físico o químico del jugo, o que pueden causar turbidez en el concentrado (Beg *et al.*, 2001). Las xilanasas, en combinación con las endoglucanasas, también se usan en procesos de separación de gluten a partir del almidón de trigo o gluten de otros cereales del almidón, pues tienen lugar en la hidrólisis de la arabinoxilana y del almidón (Lafond *et al.*, 2011). Estas enzimas también se utilizan en la extracción del mucílago del grano de café y en la extracción de aceites de plantas (Beg *et al.*, 2001). Las principales propiedades deseables en las xilanasas para su uso en la industria de alimentos son elevada estabilidad y actividad óptima a pH ácido. Con los avances en las técnicas de biología molecular se están descubriendo otros usos de las xilanasas. Recientemente, se produjo una levadura recombinante del vino con el gen de la xilanasas de *Aspergillus nidulans*, *xlnA*, dando como resultado un vino con un aroma más pronunciado de lo convencional. Durante la manufactura de cerveza, la pared celular de la cebada es hidrolizada liberando cadenas largas de arabinoxilanas, las cuales aumentan la viscosidad de la cerveza, traduciéndose en una apariencia "turbia". Por lo tanto, las xilanasas son utilizadas para hidrolizar las arabinoxilanas a oligosacáridos más pequeños, disminuyendo la viscosidad de la cerveza y consecuentemente eliminando su aspecto turbio (Polizeli *et al.*, 2005). También sirven para extraer más azúcares fermentables de la cebada para la elaboración de cerveza (Lafond *et al.*, 2011).

La  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa y la  $\beta$ -D-glucopiranosidasa se han empleado en el procesamiento de alimentos para aromar mostos, vinos y jugos de frutas (Beg *et al.*, 2001).

Las xilanasas tolerantes a la sal, derivadas de bacterias que viven en ambientes marinos o salinos, tienen usos potenciales en aplicaciones industriales, tales como en el procesamiento de mariscos y alimentos con un alto contenido de sal. En el horneado, las xilanasas tolerantes a la sal combinadas con sal tienen el potencial de aumentar la resistencia de la masa y añadir sabor a los productos horneados (Hung *et al.*, 2011).

### ***Elaboración de suplementos alimenticios***

Recientemente, las aplicaciones potenciales de las xilanasas en la bioconversión de materiales hemicelulósicos a xilo-oligosacáridos (XOS) han ganado popularidad en comparación con la hidrólisis ácida, que no es factible ambientalmente. Los XOS han demostrado tener un efecto benéfico en la salud humana al reducir el nivel de colesterol y lesiones precancerosas, mejora la disponibilidad biológica del calcio y exhiben un efecto positivo en la microbiota del intestino. El último efecto positivo puede ser debido al aumento en la producción de diferentes moléculas prebióticas como ácidos grasos de cadena corta conocidos por promover el crecimiento de bacterias benéficas como *Lactobacillus* o *Bifidobacteria* y disminuyen el pH fecal. Además, de los efectos benéficos para la salud, los XOS son moderadamente dulces y estables en un amplio intervalo de pH y temperaturas y tienen características organolépticas que los hacen adecuados para incorporarlos en alimentos (Lafond *et al.*, 2011).

### ***Productos químicos y farmacéuticos***

Las xilanasas y la xilana son poco usadas en la industria farmacéutica. Las xilanasas son añadidas algunas veces en combinación con un complejo de enzimas (hemicelulasas y proteasas, entre otras) como suplementos alimenticios o para tratar la baja digestión, pero son pocos los productos medicinales que pueden encontrarse con estas formulaciones. Los productos de la hidrólisis de la xilana, tales como los residuos de  $\beta$ -D-xilopiranosilo, se pueden convertir en combustibles líquidos (etanol), solventes y endulzantes artificiales bajos en calorías (Inmaculada *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2008; Chaiyaso *et al.*, 2011). La hidrólisis enzimática de la biomasa lignocelulósica se estudia extensivamente para la producción de etanol (Lee *et al.*, 2011). Las primeras etapas son la deslignificación de la hemicelulosa, rica en xilana, seguida por una hidrólisis con xilanasas y hemicelulasas, para producir azúcares, tales como unidades de  $\beta$ -D-xilopiranosil. Enseguida, los productos son fermentados, principalmente por levaduras (*Pichia stipitis* y *Candida shehatae*), para producir xilitol o etanol (Polizeli *et al.*, 2005).

Entre los azúcares utilizados en la producción de alcohol etílico, los residuos  $\beta$ -D-xilopiranosil representan entre el 5 y 20 %. El xilitol es un polialcohol con un poder edulcorante comparable al de la sacarosa. Es un endulzante no cariogénico, adecuado para individuos con diabetes y obesidad y es recomendado para la prevención de osteoporosis e infecciones respiratorias, desórdenes en el metabolismo de lípidos, lesiones renales y parenterales. En el mercado se pueden encontrar una variedad de productos comerciales que contienen xilitol, tales como las gomas de mascar. Aunque la hidrólisis enzimática de la xilana es un método prometedor para obtener unidades de  $\beta$ -D-xilopiranosil, actualmente el xilitol comercial es producido a gran escala por catálisis química. Este proceso es costoso, principalmente debido a que la xilosa tiene que ser inicialmente purificada en varias etapas. Además de esto, las reacciones químicas frecuentemente generan productos secundarios tóxicos para la fermentación; por ejemplo, en la

descomposición del material lignocelulósico, además de la liberación de azúcares, estos productos pueden formarse a partir de la degradación de la glucosa (hidroximetilfurfural), xilosa (furfural) y lignina (compuestos aromáticos y fenólicos y aldehídos). Las sustancias liberadas a partir de la estructura de la lignocelulosa, tales como ácido acético y material extraíble (ej. terpenos y sus derivados, tropolones y compuestos fenólicos tales como los flavonoides, estilbenos, quinonas, lignanos y taninos), o a partir del equipo (fierro, cromo, níquel y cobre), pueden ser inhibidores potentes de la actividad microbiana. El desarrollo de tecnología más apropiada para la producción de xilitol ha generado gran expectativa por su amplio uso en las industrias de alimentos, farmacéutica y odontológica (Polizeli *et al.*, 2005). El interés industrial en la xilana y su complejo enzimático hidrolítico se basa en su uso para la producción de xilitol (Hernández *et al.*, 2008).

Las xilanasas, en sinergismo con otras enzimas, tales como las mananasas, ligninasas, xilosidasas, glucanasas, glucosidasas, etc., se pueden utilizar para la generación de combustibles biológicos, tales como el etanol y xilitol, a partir de biomasa lignocelulósica. El proceso biológico para la producción de etanol como combustible requiere la deslignificación de la lignocelulosa para liberar la celulosa y hemicelulosa de su complejo con la lignina, seguido de una despolimerización de las cadenas de carbohidratos (celulosa y hemicelulosa) para producir azúcares libres, y finalmente la fermentación de la mezcla de las pentosas y hexosas para producir etanol (Beg *et al.*, 2001).

Aunque la hidrólisis enzimática de las xilanas tiene beneficios ambientales y también minimiza la generación de subproductos que pueden inhibir la fermentación microbiana, todavía representa un desafío económico (Lee *et al.*, 2011).

### ***Textiles***

El complejo xilanolítico puede utilizarse en la industria textil (Chaiyaso *et al.*, 2011) para procesar fibras de plantas, tales como arpillera o lino. Para este propósito, las xilanasas deben estar libres de enzimas celulolíticas. Un proceso consiste en incubar tallos de *ramee* seca (pasto de China) con xilanasas para liberar de manera intacta las largas fibras de celulosa. Después de usar este método, no hay necesidad de usar la etapa fuerte de blanqueo, ya que la lignina no sufre oxidación, lo que podría conducir a un oscurecimiento de las fibras. Relativamente, poca investigación se realiza sobre la preparación enzimática de fibras textiles, y esto todavía parece ser un mercado prometedor que demanda el desarrollo de nuevas técnicas (Polizeli *et al.*, 2005).

### ***Pulpa de celulosa y papel***

En la última mitad del siglo XX hubo una expansión sin precedentes en el conocimiento del uso de microorganismos, sus productos metabólicos y sus enzimas en una gran área de la investigación básica y sus aplicaciones industriales potenciales. En las dos últimas décadas se comenzó a utilizar comercialmente las enzimas microbianas en la industria de la pulpa y del papel (Beg *et al.*, 2001). La principal aplicación industrial de las xilanasas es en el blanqueo de la pulpa de celulosa (Min *et al.*, 2002; Inmaculada *et al.*, 2005; Tsai y Huang, 2008; Mellon *et al.*, 2011). Desde entonces, las peroxidasas eran aplicadas para la degradación de la lignina. Actualmente, en muchos países, incluyendo Brasil, el proceso químico, en lugar de la hidrólisis enzimática, es empleado en la manufactura de papel. El método acostumbrado es conocido como el proceso Kraft, el nombre significa fuerza en lengua alemana. Tres especies de eucalipto (*E. grandis*, *E. saligna* y *E. urophylla*) son particularmente favorecidas como materia prima. La principal ventaja del proceso Kraft es la posibilidad de recuperar los productos químicos del licor

negro. Sin embargo, no todas las industrias recuperan el hidróxido de sodio y otros materiales orgánicos presentes en el licor negro. Por otro lado, las desventajas son los altos costos iniciales, el fuerte olor de los gases emitidos por el proceso, el bajo rendimiento (40–50 %) y el alto costo de blanqueo. En el proceso Kraft los reactivos contaminantes son utilizados en grandes cantidades. El uso de cloro da como resultado la producción de compuestos organoclorados a partir de la degradación de los productos de la lignina, los cuales son altamente tóxicos y mutagénicos (Saul *et al.*, 1995), requiriendo el tratamiento de efluentes de las plantas manufactureras de papel. Las regulaciones ambientales restringieron el uso de compuestos de cloro en el proceso de blanqueo en las industrias del papel y celulosa, especialmente en Europa Occidental y Norte América. Especial atención se puso en el uso de xilanasas en el pre-blanqueo, lo que podría reducir la cantidad de compuestos clorados utilizados (por encima del 30 %), de modo que se lograría una reducción del 15–20 % en compuestos organoclorados en los efluentes (Saul *et al.*, 1995; Chaiyaso *et al.*, 2011). El uso de xilanasas podría conducir al reemplazo de 5–7 kg de dióxido de cloro por tonelada de pulpa Kraft y una reducción promedio de 2–4 unidades en el número kappa, que es una medida del contenido de lignina en la pulpa de celulosa (Polizeli *et al.*, 2005). Garg *et al.* (2011) investigaron el potencial de las xilanasas libres de celulasas de *Bacillus pumilus* ASH en el bio-blanqueo de pulpa de paja de trigo. El uso de xilanasas redujo en un 20 y 17 % el consumo de cloro y dióxido de cloro comparado con el control. Un aumento significativo se obtuvo en el brillo de la pulpa, blancura y mejora en varias de sus propiedades.

Las xilanasas empleadas en la tecnología del papel no necesitan ser purificadas, pero deben ser activas a altas temperaturas y pH alcalino, y no deben contener enzimas celulolíticas para preservar las fibras de celulosa (Garg *et al.*, 2011). Algunas xilanasas frecuentemente exhiben actividad de celulasa (Sae-Lee y Boonmee, 2014), lo que da como resultado una pérdida de celulosa, una degradación de la calidad de la pulpa y un aumento en los costos de tratamiento de efluentes. En el proceso de blanqueo, se ha estudiado la eficiencia de las xilanasas de *Streptomyces thermoviolaceus*, *S. roseiscleroticus*, *Streptomyces* sp., *S. galbus*, *Bacillus* sp., *B. pumilus*, *B. circulans*, *Aspergillus kawachii*, *A. oryzae*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *Chaetomium cellulolyticum*, *Thermomyces lanuginosus*, *Trichoderma reesei*, *Acrophilophora nainiana* y *Humicola grisea*. Dos hipótesis existen acerca de la función de las xilanasas en el blanqueo de la pulpa de celulosa. En la primera, las xilanasas actuarían sobre la xilana precipitada en la lignina. Esta xilana es precipitada debido al descenso del pH al final de la etapa de cocimiento. Su remoción por acción de las xilanasas deja a la lignina más expuesta a los compuestos empleados en el blanqueo de la pulpa de celulosa. La segunda hipótesis se basa en la habilidad de la lignina para formar complejos con los polisacáridos como la xilana, y en el hecho de que algunos de los enlaces resistentes a los álcalis no se hidrolizan durante el proceso Kraft. Las xilanasas actúan rompiendo los puentes restantes entre la lignina y la xilana, abriendo la estructura de la pulpa de celulosa y conduciendo a la fragmentación de la xilana y la subsecuente extracción de los fragmentos. El tratamiento con xilanasas da como resultado una pulpa más permeable a la extracción química de la lignina café residual y de la lignina de las fibras (Polizeli *et al.*, 2005).

### ***Biotechnología y patología de plantas***

Las xilanasas microbianas han recibido atención considerable en la biotecnología y patología de plantas. Los estudios orientados a la fitopatología se han dirigido principalmente a la habilidad de las xilanasas para degradar las paredes celulares de las plantas y, en ciertas ocasiones, para inducir respuestas de defensa de las plantas (Inmaculada *et al.*, 2005).

El tratamiento de células de plantas con xilanasas puede inducir la glicosilación y la acilación de grasas de los fitoesteroides. El tratamiento de una suspensión de células de tabaco (*Nicotiana tabacum* CV. KY 14) con una endoxilanasas purificada de *Trichoderma viride* dio como resultado un aumento de trece veces en los niveles de glicósidos de esterol acilados y provocó la síntesis de fitoalexinas. Algunas xilanasas se pueden utilizar para mejorar la maceración de la pared celular para la producción de protoplastos de plantas. Se demostró una aplicación de un gen truncado de xilanasas de *Clostridium thermocellum* en la rizosecreción en plantas de tabaco transgénicas (Beg *et al.*, 2001).

### **Tratamiento de desechos agrícolas**

La xilana está presente en grandes cantidades en los desechos de las industrias agrícola y de alimentos. Por lo tanto, las xilanasas son utilizadas para la conversión de la xilana a xilosa en aguas residuales (Beg *et al.*, 2001).

### **Producción de surfactantes**

Los alquil glicósidos son de los candidatos más prometedores para los nuevos surfactantes. Comercialmente, son producidos a partir de azúcares monoméricos tales como la D-glucosa y un alcohol graso. Pero la glicosilación directa utilizando polisacáridos es más factible para su producción industrial, debido a que se pueden omitir la hidrólisis del polisacárido y las etapas subsecuentes. Por lo tanto, el uso de xilanasas en este proceso ofrece una oportunidad que supone un reto. Recientemente, se utilizaron las xilanasas de *Aureobasidium pullulans* para la transglicosilación directa de la xilana, 1-octanal y 2-etil hexanol a octil- $\beta$ -D-xilobiósido, xilósido y 2-etilhexil- $\beta$ -D-xilobiósido, respectivamente (Beg *et al.*, 2001).

### **Microorganismos xilanolíticos**

Las xilanasas son producidas por diferentes microorganismos, incluyendo bacterias, hongos y actinomicetos (Garg *et al.*, 2011). Las xilanasas son encontradas en abundancia en organismos saprófitos y fitopatógenos, tales como bacterias, hongos micorrízicos y algunas levaduras (Hernández *et al.*, 2008).

### **Hongos xilanolíticos y su estilos de vida**

Entre las fuentes microbianas, los hongos filamentosos son especialmente interesantes, ya que secretan estas enzimas al medio y sus niveles son elevados en comparación con levaduras y bacterias, además son de fácil cultivo (Min *et al.*, 2002; Polizeli *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2010). En bacterias, las xilanasas no sólo se producen en niveles de actividad más bajos que en hongos, sino que también están restringidas a los espacios intracelulares o periplásmico. Además, las enzimas expresadas en bacterias no están sujetas a modificaciones post-transcripcionales, tales como la glicosilación (Polizeli *et al.*, 2005).

Los hongos filamentosos, particularmente las especies de *Aspergillus* y *Trichoderma*, son bien conocidos por ser productores eficientes de enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas (van Peij *et al.*, 1998).

Algunos de estos microbios son saprófitos, habitantes del suelo o del agua, algunos crecen de forma anaeróbica, mientras que otros lo hacen aeróbicamente, algunos crecen a temperatura ambiente (mesófilos) mientras que otros crecen de forma termofílica, algunos son huéspedes de

animales rumiantes o de los intestinos de insectos que comen madera y otros son patógenos de plantas (Degefu *et al.*, 2001).

Van Gool *et al.* (2011) realizaron un estudio de producción de enzimas xilanolíticas en matraces de fermentación y observaron que ningún hongo produjo todas las enzimas necesarias para degradar totalmente los sustratos estudiados. Algunos hongos produjeron niveles significativos de xilanasas activas contra xilana lineal, pero no pudieron degradar xilanas complejas. Otros hongos que produjeron niveles relativamente bajos de xilanasas secretaron muchas enzimas accesorias útiles.

La investigación de microorganismos que utilizan la xilana y de sus sistemas enzimáticos involucrados se está volviendo más relevante en términos ecológicos y económicos (Polizeli *et al.*, 2005).

### **Hongos mesofílicos**

Entre los hongos mesofílicos, los géneros *Aspergillus* y *Trichoderma* son pre-eminentes en la producción de xilanasas (Polizeli *et al.*, 2005).

En condiciones de crecimiento mesofílico, se reportó la actividad xilanolítica en una amplia variedad de géneros y diferentes especies de hongos filamentosos y levaduras. Por ejemplo, la degradación de la xilana ocurre en ciertas cepas de *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *Neurospora crassa*, *Trichoderma harzianum*, *T. reesei*, *Trichoderma viride*, *Penicillium janthinellum*, *P. wortmanni*, *P. capsulatum*, *Pichia stipitis*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida shehatae* y *Fusarium oxysporum* (Uffen, 1997) (Tabla 2).

### **Hongos anaeróbicos del rúmen**

Varios reportes sugieren que los hongos anaeróbicos ocupan un nicho único en el ecosistema de los rumiantes y son los colonizadores iniciales de los sustratos lignocelulósicos. Los hongos anaeróbicos pueden proliferar y sobrevivir en un ecosistema extensivamente colonizado por bacterias y protozoos fibrolíticos y esto puede relacionarse con su habilidad de penetrar y degradar tejidos de plantas que normalmente no son accesibles para otros microorganismos del rumen. Aunque la investigación sugiere una función importante de los hongos anaeróbicos en la degradación y subsecuente fermentación de sustratos particulados en el rumen, existen pocos estudios sobre la producción y actividad de las enzimas fibrolíticas de estos organismos (Lowe *et al.*, 1987a; Lowe *et al.*, 1987b).

Mi *et al.* (2009) analizaron los genes funcionales del hongo *Neocallimastix frontalis* para elucidar el metabolismo de los carbohidratos. Cuatro tipos de hemicelulasas se aislaron, tales como mananasas, xilosa isomerasas, xilana esterasas y xilanasas, así como cinco  $\beta$ -glucosidasas, con al menos tres diferentes estructuras de dominio conservadas, y diez celulasas, con al menos cinco diferentes estructuras de dominio conservadas.

### **Hongos termofílicos**

En años recientes, se realiza un gran esfuerzo en el aislamiento de microorganismos termofílicos e incluso de extremofílicos, ya que producen enzimas de mayor estabilidad. Los hongos termofílicos que degradan xilanas incluyen a *Chaetomium thermophile*, *Humicola insolens*, *H. lanuginosa*, *H. grisea*, *Melanocarpus albomyces*, *Paecylomyces variotii*, *Talaromyces*

*byssochlamydoides*, *T. emersonii*, *Thermomyces lanuginosus* y *Thermoascus aurantiacus* y *Sporotrichium thermophile* (Uffen, 1997; Polizeli *et al.*, 2005).

Las xilanasas de estos hongos poseen temperaturas óptimas entre 60 y 80°C y son muy estables en este intervalo. Estas enzimas normalmente son glicoproteínas y la mayoría muestra la actividad más elevada a pH ácido (4.5–6.5). Existen en multiplicidad de formas y la mayoría tiene PM variables en el intervalo de 6–38 kDa. Muchas endoxilanasas de termófilos conservan un grado de homología estructural con aquéllas de los mesófilos. Se ha intentado explicar la termoestabilidad observada en las enzimas de los termófilos en relación a sus puentes disulfuro adicionales, residuos de prolina en el extremo N-terminal, que causan una reducción en la libertad conformacional, puentes salinos y presencia de cadenas laterales hidrofóbicas. Otras modificaciones menores responsables del aumento de la estabilidad térmica de las xilanasas son: (1) una mayor proporción de treonina/serina; (2) un número aumentado de residuos cargados, especialmente arginina, dando como resultado un incremento en las interacciones polares; y (3) estabilización mejorada de estructuras secundarias involucrando un mayor número de residuos en las ramificaciones beta, y estabilización de la región de la alfa hélice. Algunas xilanasas mejoran su estabilidad compactando la estructura de la proteína con un mayor número de pares iónicos o residuos aromáticos en la superficie de la proteína, dando como resultado mayores interacciones. Sin embargo, no se ha llegado a una conclusión definitiva, ya que un fenómeno visto en un microorganismo puede no ocurrir en otro.

El gen *xynA* de *Thermomyces lanuginosus*, un hongo termofílico, codifica para una endoxilanasas termoestable GF11. Esta xilanasas está libre de actividad de celulasa e hidroliza xilana para producir xilosa y xilooligosacáridos (Le *et al.*, 2011).

### **Hongos fitopatógenos**

La mayoría de los microorganismos (patógenos y saprófitos) asociados a las plantas que rompen las paredes celulares poseen la capacidad genética de producir enzimas para la degradación de los principales polisacáridos estructurales de la pared celular (celulosa, xilana y pectina). En particular, los patógenos de plantas tienen una relación íntima con sus huéspedes, requiriendo penetrar la pared celular y colonizar los tejidos vivos de sus huéspedes. Muchos hongos patógenos matan activamente, degradan los tejidos de las plantas y utilizan los carbohidratos liberados para su crecimiento y reproducción. Los patógenos de plantas pueden producir diferentes cantidades de enzimas específicas degradadoras de la pared celular dependiendo del tipo de planta, monocotiledóneas o dicotiledóneas, y de su capacidad de crecimiento en las paredes celulares de estas dos clases de plantas. Entre los patógenos de plantas con capacidad de degradar paredes celulares, los patógenos de monocotiledóneas se adaptan mejor para la degradación de paredes celulares de monocotiledóneas, mientras los patógenos de dicotiledóneas se adaptan para la degradación de paredes celulares de dicotiledóneas, lo que refleja la preferencia por sus huéspedes. En los géneros *Colletotrichum* y *Fusarium* están incluidas algunas especies patógenas de monocotiledóneas y otras especies patógenas de dicotiledóneas. Se ha demostrado que las especies patógenas efectúan una mayor hidrólisis que las especies no patógenas para todos los sustratos estudiados, excepto para el xiloglucano de tamarindo y la xilana de abedul (King *et al.*, 2011).

Muchos, quizá la mayoría de los microorganismos patógenos de plantas, producen enzimas degradadoras de xilana (Wegener *et al.*, 1999). Las endoxilanasas microbianas son componentes del arsenal de ataque de los fitopatógenos y del sistema de defensa de las plantas, respectivamente (Beliën *et al.*, 2006).

Los patógenos de plantas producen una variedad de enzimas capaces de degradar los componentes de las paredes celulares de las plantas. Los hongos frecuentemente secretan varias formas moleculares de hidrolasas que atacan el mismo sustrato pero difieren en su punto isoeléctrico y peso molecular. Se han encontrado diferencias entre las isoenzimas producidas por hongos fitopatógenos en cultivos y aquellas producidas en tejidos infectados. Esta multiplicidad confiere flexibilidad, lo que aumenta la eficiencia del complejo hidrolítico. Entre los grupos de patógenos de plantas económicamente importantes, *Sclerotinia sclerotiorum* es un hongo fitopatogénico ubicuo que ataca un amplio intervalo de plantas. Las proteínas extracelulares secretadas por este hongo pueden macerar los tejidos y degradar los componentes de las paredes celulares. Por lo tanto, debe contener todas las enzimas correspondientes a los tipos de enlaces glicosídicos presentes en los polisacáridos de las paredes celulares. El crecimiento de *S. sclerotiorum* en varios polisacáridos utilizados como única fuente de carbono demostró que el hongo secreta enzimas que convierten los sustratos celulósicos, pectinolíticos y hemicelulolíticos en azúcares sencillos asimilables. Inespecificidad en las glicosido hidrolasas de *T. reesei* y de *Neurospora crassa* se ha observado, por ejemplo, las  $\beta$ -xilosidasas exhiben actividades de  $\alpha$ -arabinosidasa y de  $\beta$ -glucosidasa, respectivamente. La especificidad cruzada de las enzimas por sustrato puede aumentar la adaptabilidad del fitopatógeno, pero la evidencia de identidades separadas y funciones de diferentes formas enzimáticas requiere del estudio de enzimas purificadas (Riou *et al.*, 1991).

Las xilanasas de microorganismos patógenos de plantas son consideradas como el principal factor de virulencia (Min *et al.*, 2002).

*Fusarium oxysporum* es una especie ubicua compleja, originaria del suelo, proveniente de aislados saprófitos y patógenos. Las formas fitopatógenas de *F. oxysporum* penetran las raíces de las plantas huéspedes y crecen a través de la corteza en los vasos del xilema donde afectan la capacidad de conducir el agua en la planta y producen marchitamiento. La degradación de la pared celular de las plantas puede ser crucial para la patogénesis en enfermedades de marchitamiento, ya que inicialmente el patógeno requiere ingresar en el xilema del huésped y a partir de ahí nutrirse de éste. Por lo tanto, las enzimas fúngicas extracelulares que degradan la pared celular de las plantas pueden tener una función primordial en las diferentes fases de las enfermedades de marchitamiento. Inmaculada *et al.* (2005) estudiaron y compararon la habilidad de dos razas fúngicas (0 y 5) de *F. oxysporum* f. sp. ciceris de producir xilanasas extracelulares, las cuales se diferenciaron por su virulencia. Ambas razas, 0 y 5 tuvieron una capacidad comparable de producir xilanasas extracelulares cuando crecieron en xilana o pared celular de garbanzo como fuentes de carbono. *F. oxysporum* f. sp. ciceris puede secretar formas múltiples de xilanasas ácidas, neutrales y alcalinas. Estas especies fúngicas tuvieron un elevado potencial de producir un amplio arreglo de actividades xilanolíticas cuya expresión parece estar condicionada por factores ambientales.

Para infectar una planta, muchos patógenos tienen que disolver las barreras potenciales y obtener sus nutrientes. Varios patógenos fúngicos de cereales son conocidos por producir xilanasas y utilizar la pared celular de los cereales como fuente de carbono. Algunos estudios también han demostrado que el nivel incrementado de actividad xilanolítica está asociado con el desarrollo de lesiones en huéspedes de cereales infectados con hongos. De hecho, se ha encontrado que las xilanasas de una preparación comercial de *Trichoderma viride* son tóxicas para los cultivos celulares de arroz. Por otro lado, las xilanasas fúngicas activan las respuestas de defensa del huésped, así como la necrosis del tejido y pérdida de electrolitos, biosíntesis de etileno y síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis. Las evidencias anteriores

sugieren que las xilanasas pueden tener una función importante en la patogénesis de plantas, pero son muy limitados los esfuerzos realizados por técnicas de genética molecular para determinar la función directa de las xilanasas. El número de xilanasas purificadas a partir de patógenos de plantas también es muy limitado. A partir de la información disponible a la fecha, la función de las xilanasas en la patogénesis todavía no es conocida claramente y requiere investigación adicional. El patógeno de maíz, *Helminthosporium turcicum*, produce niveles elevados de actividad xilanolítica cuando crece en un medio con paredes celulares de maíz. La transformación genética del patógeno puede ayudar a determinar la función de esta xilanasas en la patogénesis (Degefu *et al.*, 1995).

Las bacterias y hongos patógenos de plantas producen enzimas degradadoras de xilanas, pero todavía no se cuenta con suficientes evidencias de la función de la mayoría de estas enzimas en la penetración del patógeno, invasión y adquisición de nutrientes. El principal obstáculo para responder esta pregunta es la redundancia enzimática, ya que la mayoría de los microorganismos, incluyendo los patógenos de plantas, producen enzimas múltiples degradadoras de xilanas (Wegener *et al.*, 1999).

La adaptación enzimática de los patógenos de cereales para producir predominantemente xilanasas puede ser el reflejo de su compatibilidad básica establecida con sus huéspedes monocotiledóneas. Otras evidencias sugieren que las xilanasas fúngicas pueden ser los componentes bioquímicos clave en la patogénesis. En el arroz, las xilanasas fúngicas ocasionaron la muerte de las células cultivadas y en tabaco provocaron respuestas de defensa, tales como necrosis del tejido, pérdida de electrolitos y biosíntesis de etileno. Sin embargo, estas evidencias son circunstanciales y no se ha logrado demostrar que las xilanasas son factores importantes en la patogénesis fúngica (Degefu *et al.*, 2001).

De todos los métodos empleados para demostrar la función de las xilanasas en el proceso de patogénesis, la interrupción de genes blanco es la aproximación más directa y rigurosa. Este método se ha utilizado para caracterizar los genes de xilanasas de al menos dos patógenos de cereales importantes, *Cochliobolus carbonum* y *Magnaporthe grisea*. La interrupción de los genes de xilanasas a partir de estos hongos causó una pérdida significativa en la actividad xilanolítica, pero falló en producir fenotipos no patógenos. Las enzimas fúngicas degradadoras de paredes celulares forman sistemas complejos donde varias de tales enzimas son secretadas durante la infección. Por lo tanto, si se interrumpe la producción de una enzima, ésta puede ser complementada por la actividad de otras enzimas secretadas (Wegener *et al.*, 1999). Está surgiendo nuevo entendimiento sobre la función de las enzimas degradadoras de paredes celulares, al utilizar la interrupción de genes y el análisis citológicos junto con estudios de expresión de genes. Para que las xilanasas sean consideradas factores de patogenicidad deben ser expresadas durante la penetración e invasión de la planta huésped. Por consiguiente, la transcripción de genes de xilanasas en todas las etapas de infección sugiere que la degradación de la xilana puede estar involucrada en el proceso de enfermedad (Degefu *et al.*, 2001).

Los hongos patógenos de plantas infectan a sus huéspedes penetrando la capa celular exterior e invadiendo diferentes tejidos de las plantas. Durante la infección, el patógeno encuentra varios polímeros que constituyen los componentes estructurales de la pared celular. No obstante, una variedad de estudios sugiere que las xilanasas pueden tener un papel importante en otras interacciones planta-patógeno. La presencia de xilanasas en *Fusarium oxysporum* se reportó, pero no se investigó su producción durante la infección y su rol en la patogenicidad. El principal rol probable de las xilanasas en la patogenicidad fúngica de plantas es la degradación de las paredes celulares durante la colonización del huésped. La secreción de enzimas líticas es, tras

reflexionar mucho, el principal mecanismo por el que *F. oxysporum* perturba el desarrollo de las barreras físicas primarias e induce las defensas estructurales del huésped. Las xilanasas son parte del arsenal de las enzimas degradadoras de la pared celular producidas por *F. oxysporum*, pero actualmente se desconoce su papel en la patogenicidad. Es posible que el gen *xyl3* de *F. oxysporum* tenga un papel activo durante la infección de la planta y el establecimiento de la enfermedad (Ruiz-Roldán *et al.*, 1999).

*Aspergillus flavus* es un patógeno oportunista de un gran número de cultivos de oleaginosas y es de importancia agronómica debido a la producción de la aflatoxina B1 (micotoxina), un potente carcinógeno. La invasión de las plantas por *A. flavus* es posible gracias a la producción de un gran arreglo de enzimas hidrolíticas, que ayudan a la captura de nutrientes y a la penetración de los tejidos del huésped. Mellon *et al.* (2011) observaron que *Aspergillus flavus* K49 secreta al menos dos xilanasas cuando se somete a crecimiento en un medio con xilano de alerce como única fuente de carbono. La proteína de bajo peso molecular relacionada con la mayor actividad xilanolítica fue denominada XlnA. La XlnA puede ser altamente móvil (difundible), factor importante en la degradación de la hemicelulosa de la pared de las plantas con actividad significativa durante la infección de las plantas.

Después de la senescencia de las plantas, los hongos patógenos pueden continuar colonizando e invernando en el tejido muerto, y muchos patógenos de plantas también son saprófitos competitivos. La producción de CWDE está relacionada con el estilo de vida de los hongos, patógenos o saprófitos. La variabilidad en la actividad de las CWDE puede estar relacionada con la virulencia del aislado. En un estudio de ocho aislados de *Mycosphaerella graminicola*, varios componentes de patogenicidad se correlacionaron positivamente con la producción de xilanasas y pectinasas *in vitro*, lo que implica que las CWDE pueden ser factores clave de patogenicidad. La habilidad del hongo para colonizar exitosamente los tejidos mesófilos de plantas también se correlacionó fuertemente con la producción de endo-beta-1,4 xilanasas (King *et al.*, 2011).

**Tabla 2.** Hongos productores de xilanasas.

| Microorganismo                     | Phylum     | Enzima                               | pH óptimo          | Temp. óptima (°C) | Referencia                      |
|------------------------------------|------------|--------------------------------------|--------------------|-------------------|---------------------------------|
| <b>Hongos mesófilos</b>            |            |                                      |                    |                   |                                 |
| <i>Aspergillus flavus</i> K49      | Ascomycota | Endo-1,4- $\beta$ -xilanasas (XlnA)  | N.R.               | N.R.              | Mellon <i>et al.</i> (2011)     |
| <i>Aspergillus niger</i> C3486     | Ascomycota | Xilanasas                            | 5.5                | 55                | Yang <i>et al.</i> (2010)       |
| <i>Aspergillus terreus</i> UL 4209 | Ascomycota | Xilanasas                            | 6.0                | 35                | Chidi <i>et al.</i> (2008)      |
| <i>Aspergillus versicolor</i>      | Ascomycota | XYI                                  | 7                  | 70                | Salama <i>et al.</i> (2008)     |
|                                    |            | XYII                                 | 10                 | 50                |                                 |
|                                    |            | XYIII                                | 10                 | 70                |                                 |
| <i>Aspergillus terreus</i>         | Ascomycota | Xilanasas                            | 5.5                | 60                | Pal <i>et al.</i> (2006)        |
| <i>Aspergillus caespitosus</i>     | Ascomycota | <i>xyl I</i> ; <i>xyl II</i>         | 6.5–7.0<br>5.5–6.5 | 50–55             | Sandrim <i>et al.</i> (2005)    |
| <i>Aspergillus niger</i>           | Ascomycota | 2 xilanasas                          | 3.5<br>8.5         | 50<br>80          | Raghukumar <i>et al.</i> (2004) |
| <i>Aspergillus awamori</i>         | Ascomycota | Endoxilanasas<br>$\beta$ -xilosidasa | N.R.               | 60<br>55          | Solórzano <i>et al.</i> (2000)  |
| <i>Aspergillus oryzae</i>          | Ascomycota | Xilanasas XynG2                      | 6.0                | 58                | Kimura <i>et al.</i> (2000)     |
| <i>Trichoderma harzianum</i>       | Ascomycota | Xilanasas                            | 5.0                | 30                | Sanghvi <i>et al.</i> (2010)    |
| <i>Trichoderma reesei</i>          | Ascomycota | Xilanasas                            | 8.1                | N.R.              | Widjaja <i>et al.</i> (2009)    |
| <i>Trichoderma SY</i>              | Ascomycota | Xilanasas                            | 5.5                | 50                | Min <i>et al.</i> (2002)        |

## Estudio de un aislado fúngico con actividad xilanolítica

|  |                       |                                      |            |          |   |
|--|-----------------------|--------------------------------------|------------|----------|---|
| <i>Fomitopsis pinicola</i>                         | Basidiomycota         | Xilanasa                             | 4.5        | 70       | Shin <i>et al.</i> (2010)                 |
| <i>Termitomyces</i> sp.                            | Basidiomycota         | Xilanasa                             | 5.6        | 65-70    | Faulet <i>et al.</i> (2006)               |
| <i>Marasmius</i> sp. BCC7928                       | Basidiomycota         | Xilanasa                             | 4-8        | 90       | Ratanachomsri <i>et al.</i> (2006)        |
| <i>Ceriporiopsis subvermispora</i>                 | Basidiomycota         | Endo-(1,4)- $\beta$ -xilanasa        | 5.0        | 60       | Milagres <i>et al.</i> (2005)             |
| <b>Hongos termófilos</b>                           |                       |                                      |            |          |   |
| <i>Rhizomucor miehei</i>                           | Zygomycota            | Xilanasa                             | 5.0 - 6.5  | 75       | Fawzi (2011)                              |
| <i>Talaromyces thermophilus</i>                    | Ascomycota            | Xilanasa                             | 4.0 - 10.0 | 75       | Maalej <i>et al.</i> (2009)               |
| <i>Thermomyces lanuginosus</i>                     | Ascomycota            | Xilanasa mutante<br>Xilanasa nativa  | 8.1<br>7.3 | 70<br>65 | Bokhari <i>et al.</i> (2009)              |
| <i>Thermomyces lanuginosus</i><br>CBS 288.54       | Ascomycota            | Xilanasa                             | 7.0-7.5    | 70-75    | Li <i>et al.</i> (2005)                   |
| <i>Humicola grisea</i> var.<br><i>thermoidea</i>   | Ascomycota            | Xilanasa (X2)                        | 4.5-6.5    | 55-60    | Lucena-Neto y<br>Ferreira-Filho<br>(2004) |
| <b>Hongos fitopatógenos</b>                        |                       |                                      |            |          |   |
| <i>Fusarium</i> sp. y <i>Sclerotinia</i><br>sp.    | Ascomycota            |                                      | N. R.      | N. R.    | King <i>et al.</i> (2011)                 |
| <i>Fusarium oxysporum</i><br>f. sp. <i>Ciceris</i> | Ascomycota            | Endo- $\beta$ -(1,4)-xilanasa        | 5.5        | 55       | Inmaculada <i>et al.</i><br>(2005)        |
| <i>Botrytis cinerea</i>                            | Ascomycota            | Xilanasa                             | N.R.       | N.R.     | Brutus <i>et al.</i> (2005)               |
| <b>Hongos del rúmen</b>                            |                       |                                      |            |          |   |
| <i>Neocallimastix</i> sp.                          | Neocallimastigomycota | Xilanasa (Xyn1B)                     | 6.5        | 50       | Comlekcioglu <i>et al.</i><br>(2010)      |
| <i>Neocallimastix frontalis</i>                    | Neocallimastigomycota | Mananasa; Xilan esterasa<br>Xilanasa | N.R.       | N.R.     | Mi <i>et al.</i> (2009)                   |
| <i>Neocallimastix patriciarum</i>                  | Neocallimastigomycota | Xilanasa (XynS20)                    | 6.0        | 45       | Liu <i>et al.</i> (2008)                  |
| <i>Neocallimastix frontalis</i>                    | Neocallimastigomycota | Xilanasa heteróloga                  | N.R.       | N.R.     | Tsay y Huang (2008)                       |
| <b>Hongos saprófitos</b>                           |                       |                                      |            |          |   |
| <i>Penicillium</i> sp. LYG 0704                    | Ascomycota            | $\alpha$ -L-arabinofurano-sidasa     | 5.0-6.0    | 50       | Lee <i>et al.</i> (2011)                  |
| <i>Penicillium funiculosum</i>                     | Ascomycota            | Xilanasa (XynD)                      | 5.0        | 80       | Lafond <i>et al.</i> (2011)               |
| <i>Penicillium</i> sp. CGMCC 1669                  | Ascomycota            | Xilanasa heteróloga                  | 4.5        | 40       | Liu <i>et al.</i> (2010)                  |
| <i>Laetiporus sulphureus</i>                       | Basidiomycota         | Xilanasa                             | 3.0        | 80       | Lee <i>et al.</i> (2009)                  |

N.R. No reportado.

### Fuentes microbianas para la producción comercial de xilanasas

Aunque son muchos los microorganismos que poseen actividad xilanolítica, las cepas reportadas para la producción comercial de xilanasas incluyen a *Trichoderma reesei*, *Thermomyces lanuginosus*, *Aureobasidium pullulans*, *Bacillus subtilis* y *Streptomyces lividans*. En la última década, se evaluaron un número de enzimas microbianas pro sus aplicaciones potenciales en varias industrias. Varios productos comerciales se comercializaron exitosamente alrededor del mundo en los últimos años (Beg *et al.*, 2001).

Varios aspectos impulsan a la investigación sobre el estudio de las características bioquímicas, regulatorias y moleculares de los sistemas xilanolíticos. Para que las xilanasas tengan un rol significativo a escala industrial, requerirán ser consistentemente efectivas bajo varias condiciones de operación. Actualmente, la investigación se está dirigiendo hacia el descubrimiento de enzimas que sean más robustas respecto a su cinética a diferentes valores de pH y temperatura. Las técnicas utilizadas incluyen ingeniería de proteínas para la identificación

de residuos del sitio activo mediante modificación química, cristalografía de rayos X y mutagénesis dirigida. Las estimaciones realizadas sobre los costos y el mejoramiento de la economía del proceso son factores clave en el éxito comercial de cualquier tecnología, en este caso, el costo en la producción de enzimas es uno de los factores principales que determinan su uso a escala industrial (Beg *et al.* 2001).

Muchos investigadores intentan desarrollar tecnologías para aumentar la eficiencia del proceso, tales como el cultivo, para reducir el costo de la producción de las enzimas, mejorar su actividad y estabilidad, y promover interacciones sinérgicas entre las enzimas que hidrolizan la lignocelulosa, para así reducir el consumo de enzimas y, por lo tanto, minimizar el costo de procesamiento (Lee *et al.*, 2011). Para aplicaciones comerciales, las xilanasas deben producirse de forma acelerada y en grandes cantidades a partir de sustratos simples y económicos (Hernández *et al.*, 2008).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad se generan grandes cantidades de desechos lignocelulósicos debido a las prácticas forestales y agrícolas, industrias de pulpa de papel, industrias de la madera y agroindustrias, que representan un problema de contaminación ambiental. Lamentablemente, muchos de los desechos lignocelulósicos con frecuencia son dispuestos para quemarse, lo cual no se limita solo a los países desarrollados, sino que se considera un fenómeno global.

Los desechos agrícolas y agroindustriales, tales como bagazo de caña, salvado de trigo, cáscara de arroz, paja de maíz, mazorca de maíz, cáscaras de frutas y semillas, efluentes de la industria papelería y bagazo de naranja, aumenta como resultado de la industrialización, convirtiéndose en un problema de contaminación ambiental, considerando, por otro lado, el espacio requerido para su disposición. Sin embargo, estos residuos son una fuente alternativa para el crecimiento microbiano con el propósito de producir biomasa o enzimas.

La mayor parte de la investigación y el desarrollo se dirige hacia el uso de la fracción de la celulosa para la producción de combustibles líquidos u otros productos químicos. Sin embargo, se pueden obtener otros productos de valor agregado a partir de las hemicelulosas, lo que mejoraría significativamente la economía de los procesos. Por ejemplo, la bioconversión de los residuos lignocelulósicos a sacáridos fermentables para la producción de bioetanol, es difícil desde el punto de vista tecnológico.

A la fecha, se clonaron y expresaron genes de xilanasas de varios hongos. Sin embargo, el uso de xilanasas fúngicas todavía es limitado por los bajos rendimientos y altos costos de producción. En algunos hongos se reportan actividades elevadas de xilanasas, pero la presencia de cantidades considerables de celulasas y pH óptimos ácidos, hacen a estas enzimas inadecuadas para ser utilizadas en la industria de la pulpa de papel. Existen pocos reportes de xilanasas fúngicas con actividad celulolítica despreciable.

El uso de xilanasas de organismos mesofílicos puede ser una desventaja, una vez que estas enzimas sufren desnaturalización a temperaturas mayores de 55 °C, dando como resultado una baja eficiencia de hidrólisis, demandando grandes cantidades de enzima y un aumento en el costo. Por lo tanto, se necesita identificar y explorar xilanasas deseables con excelentes propiedades, elevada actividad específica y elevados rendimientos. A nivel mundial existe una demanda creciente en el uso de enzimas para su aplicación en diversos sectores industriales.

## **JUSTIFICACIÓN**

Un considerable interés industrial existe sobre la xilana y su complejo hidrolítico, debido a que el carbono presente en esta fracción puede ser aprovechado y a la complejidad de estos heteropolisacáridos.

Para reducir los costos de producción de xilanasas, se propone explorar sistemas xilanolíticos fúngicos con elevada actividad específica, tener niveles de expresión elevados o modificar factores asociados a su producción.

Es importante explorar y seleccionar hongos que produzcan complejos xilanolíticos con rendimientos elevados, ya que menos del 1 % de los microbios potenciales en la biósfera ha sido identificado.

## **HIPÓTESIS**

La producción de un complejo xilanolítico extracelular fúngico aumenta al modificar factores asociados a su cultivo.

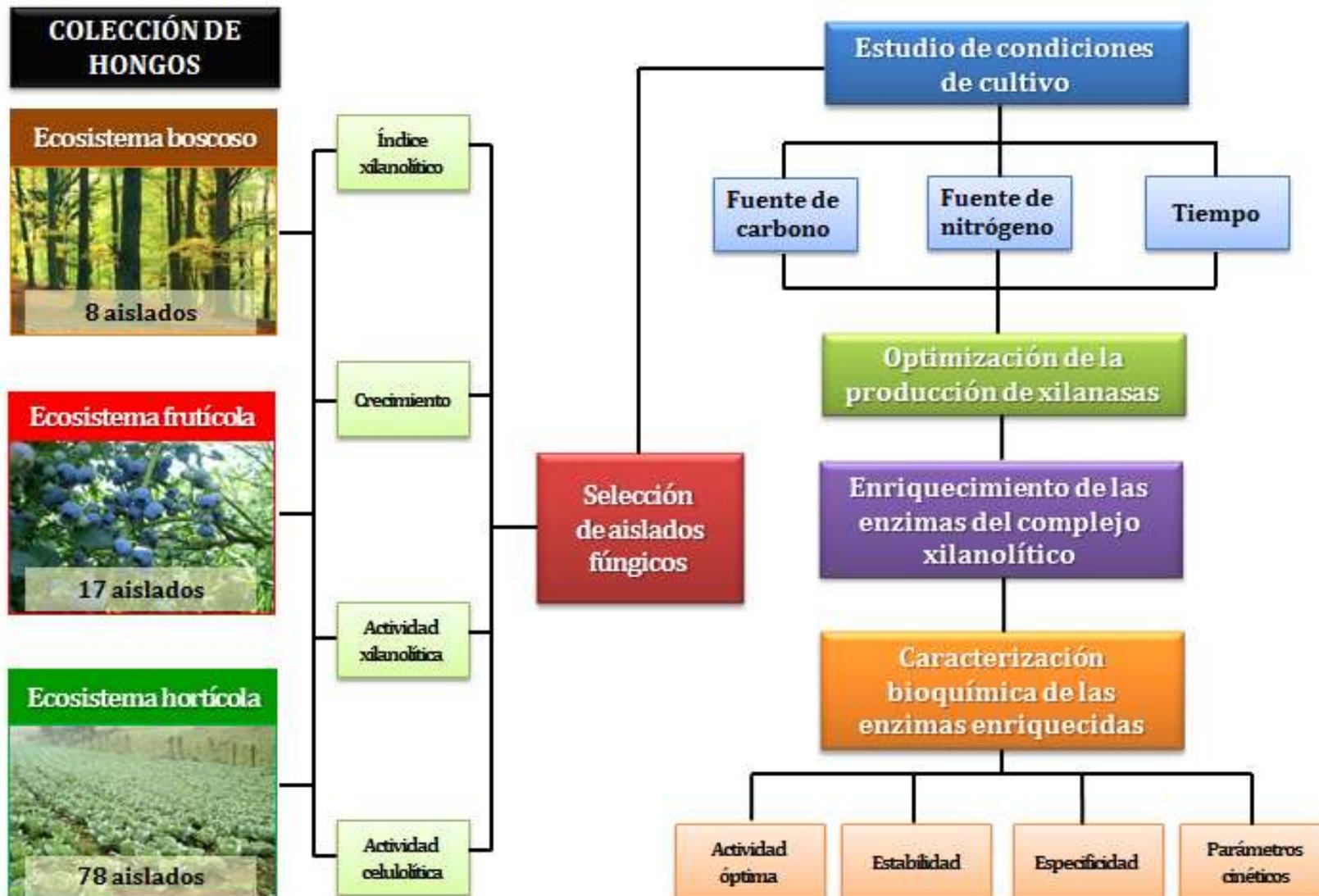
## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar un hongo aislado a partir de una colección obtenida de distintos ecosistemas que posea un complejo xilanolítico extracelular con potencial biotecnológico.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Seleccionar un aislado fúngico con actividad xilanolítica.
2. Establecer las condiciones de cultivo óptimas para la producción de un complejo xilanolítico fúngico extracelular.
3. Caracterizar bioquímicamente las enzimas del complejo xilanolítico.

### ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL



## RESULTADOS

### SELECTION AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF FUNGAL ISOLATES THAT PRODUCE XYLANOLYTIC ENZYMES (Artículo aceptado)

Mariana Alvarez-Navarrete<sup>1</sup>, Georgina E. Reyna López<sup>2</sup>, Alberto Flores García<sup>1</sup>, Rodolfo López  
Gómez<sup>1</sup>, Mauro Manuel Martínez-Pacheco<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de  
Hidalgo, Morelia, Michoacán, México

<sup>2</sup>División de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México

Article type: Full-length paper (research article)

Status of article: new

Corresponding author: Mauro Manuel Martínez-Pacheco

e-mail: mpacheco@umich.mx

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas

Ed. B-3, Ciudad Universitaria

Francisco J. Mújica s/n.

Col. Felicitas del Río, CP. 58060

Phone number: 52 (443) 3 26 57 88 ext. 118

Fax number: 52 (443) 3 26 57 88

## ABSTRACT

Xylan is a heteropolysaccharide and its complete hydrolysis involves a complex set of xylanolytic enzymes. The fungal xylanases have been widely used in the holocellulose industry for obtaining byproducts or its elimination. The aim of this work was to select and identify filamentous fungi from different ecosystems that produce extracellular xylanases with biotechnological potential. One hundred and three fungal isolates were obtained from orchard, horticultural, and forest ecosystems. The ability of fungi to degrade xylan was measured by quantifying their xylanolytic indexes after growth on solid culture media and their extracellular xylanolytic and cellulolytic activities after submerged fermentation. All fungal isolates grew on solid medium supplemented with xylan as the sole carbon source, but only 44 % of isolates showed xylanolytic indexes greater than 1.0. In submerged fermentation, 39 % of fungi tested did not exhibit any cellulolytic activity. Filamentous fungi were chosen from correspondence analysis and were identified by molecular tools using internal transcribed spacers (ITS). One of the nine isolates selected belongs to *Phoma* genus and the rest to *Fusarium* genus. *F. solani* (isolate 59) showed the highest xylanolytic index ( $0.964 \pm 0.042$ ), rapid growth on solid medium ( $1.233 \pm 0.050$  cm/day), significant xylanolytic activity ( $3.823 \pm 0.210$  U/mg), and a total deficiency of cellulolytic activity when compared to the rest of fungal isolates. In zymogram, a clear zone was observed, which demonstrated that *F. solani* possess at least one xylanase. *F. solani* was selected for its ability to produce extracellular xylanases with biotechnological potential.

**Key words:** fungal isolate, xylanolytic index, submerged fermentation, xylanase, cellulase, fungal identification

## INTRODUCTION

Microbial xylanases form an enzyme complex that catalyzes xylan hydrolysis to xylan oligomers, xylobiose and xylose. Filamentous fungi are especially interesting because they secrete these enzymes to the medium in significantly higher levels compared to yeasts and bacteria. It is generally known that the key enzyme of the xylanolytic system is endo-1,4- $\beta$ -xylanase (1,4-D-xylan xylohydrolase; EC 3.2.1.8) which cleaves internal glycosidic bonds from 1,4- $\beta$ -D-xylan chains. Xylanases have been widely used in treatment of lignocellulosic materials from agricultural, agro-industrial, and municipal residues (Khandeparker and Numan, 2008). Locally, the commercial imbalance between export and import of enzymes exhibits a biotechnological opportunity area (SIAVI, 2013) where it is possible to compete with an optimal process to produce xylanases based in the fermentation of agroindustrial wastes with native microorganisms. Commercial xylanase preparations are not equally effective in the hydrolysis of any lignocellulosic material that has been industrially processed. Consequently, there is a significant industrial competition to generate technological developments that include xylanases in the comprehensive utilization of lignocellulosic biomass and also to obtain products of commercial interest (Dhiman et al., 2008). The competition gets tougher because the complexity and variability of cell wall polysaccharides is now very well recognized.

Interestingly, the cost of enzymes in the industry is very high. They represent a significant percentage of the total cost of lignocellulosic materials in the hydrolysis processes. Therefore, the research efforts have been greatly focused on reducing the cost of enzyme production (Klein-Marcuschamer et al., 2012). The approaches to achieve this goal are several, but the exploration of organisms with new enzymes combined with factors related with production, such as selection of suitable substrates, modification of culture conditions, recycling enzymes, and process redesign is fairly current.

Several studies have been conducted to search for filamentous fungi from different ecosystems that produce efficient xylanolytic complexes. Such is the case of fungi associated with plants (pathogenic and nonpathogenic), waste degrading fungi with xylanase extracts that lack of any protease activity, soil fungi, and marine fungi (obligate and facultative, able to produce cellulase-free thermostable xylanase, and active at alkaline pH) (Raghukumar et al., 2004; Chipeta et al., 2005; King et al., 2011).

This research field is actively seeking efficient xylanolytic enzymes to be used in industrial applications. Only a small percentage of fungal species has been studied for their biological diversity and an even a smaller percentage has been investigated in relation to the xylanase production.

In the abundant fungal diversity in existence, it is possible to isolate and culture a large number of species that remain to be studied. A reliable taxonomy is crucial for biodiversity assessment and habitat categorization based upon the type of species. The criteria used to delimit and identify species of plant pathogenic fungi have changed over time. The most dramatic changes are due to the fact that modern molecular tools have been developed more recently. Nowadays, multi-gene sequencing and phylogenetic analysis have become routine procedures to identify new fungal species, specifically those that lack distinctive morphological characters (Cai et al., 2011). Molecular identification through fungal DNA sequences has become an integrated essential part of fungal ecology research during the last 15-20 years and has provided new insights into the diversity and ecology of many and different fungal groups. The aim of this work was to select and identify filamentous fungi from several ecosystems that could produce extracellular xylanases with biotechnological potential.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Collection of fungal isolates**

One hundred and three fungal isolates were obtained from soil samples and plant debris from orchard (16 %), horticultural (76 %), and forest ecosystems (8 %). The orchard ecosystems were specifically avocado, lemon and macadamia; located at 19°25'00"N, 102°04'00"W. The horticultural ecosystems were beans, corn, garlic, sorghum, and wheat fields from several regions located at 22° 35'00"N, 102° 15'00"W. The forest ecosystems were located at 20°18'0"N, 101°10'59"W. Fungi had a progressive numeric key (1 to 103). Thirty-seven fungal isolates are already characterized by classic taxonomical tools.

### **Fungal culture**

Maintenance of fungal monosporic isolates and non sporulating fungi (*mycelia sterilia*) was done by spores or segments of young colony on potato dextrose agar medium (PDA). The basal medium (BM) had the following composition per liter: 5 g C<sub>4</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (ammonium tartrate), 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1 g yeast extract, 0.001 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O and 16 g agar. Two carbon sources were used, 4 g/L of dextrose for fungal propagation and 40 g/L of xylan (Sigma) for xylanolytic index determination. They were incubated in the dark at room temperature until use.

### **Determination of xylanolytic index (XI)**

The BM supplemented with birch wood xylan was inoculated with three propagules (5x5 mm) spaced at the same distance, from BM plates with dextrose previously cultured with the fungus. Petri plates were incubated in the dark at room temperature until fungal colony diameter was at

2 cm. Then, they were stained with iodine solution ( $I_2$ , 0.125 % w/v and KI, 0.25 % w/v in aqueous solution) for 5 min with gentle agitation. Then, the iodine solution was removed by washing the plate surface two times with tri-distilled water. The complete hydrolysis of xylan around the colonies appeared as an opaque yellow area against a blue/reddish or purple color for degraded xylan (Pointing, 1999). The xylan degradation diameter divided by colony diameter was represented by XI. The XI of fungal isolates was determined after measuring colony growth diameter and xylan degradation diameter by means of the image processor ImageJ from NIH. XI mean value was calculated from six replicates.

### **Xylanase production by fermentation in submerged culture**

Xylanase production was carried out in submerged fermentations. The medium composition per liter of deionized water was the following: 1.4 g  $(NH_4)_2SO_4$ , 2.0 g  $KH_2PO_4$ , 0.1 g urea, 0.3 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.3 g  $CaCl_2$ , 5.0 mg  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1.56 mg  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 2.0 mg  $CoCl_2$ , 1.4 mg  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 10 g beech wood xylan (Sigma), 3 g dextrose, 100  $\mu L$  vitamins solution (MEM Vitamins Solution 1000x, Sigma Cell Culture). The culture medium was sterilized by autoclave, at 121 °C for 15 min. The medium had a final pH of 5.5. The inoculation was carried out with four propagules of 5x5 mm of each fungal isolate previously grown in BM. Liquid culture media were incubated at room temperature and agitation of 150 rpm. The fermentations were performed in triplicate. After 48 h of fermentation, the supernatant was separated from mycelium by filtration using filter paper and was centrifuged at 5,000 rpm for 3 min. The supernatant was used to quantify xylanolytic and cellulolytic activities, and extracellular protein.

### **Enzymatic assays**

Endo- $\beta$ -1,4-xylanase activity was measured following a modified method of Bailey et al. (1992). The reaction mixture containing 0.6 mL of 1 % (w/v) suspension of birch wood xylan in 0.05 M sodium citrate buffer (pH 5.0) and 0.6 mL of enzyme properly diluted (3 to 50  $\mu g/mL$  of protein) was incubated at 50 °C for 30 min. The reaction was stopped by boiling the samples in a water bath during 5 minutes. Then, the samples were centrifuged at 5,000 rpm for 3 min.

Endo- $\beta$ -1,4-glucanase activity was measured following a modified method of Ghose (1987). Aliquots of 0.5 mL of enzyme properly diluted (3 to 50  $\mu g/mL$  of protein) were added to 0.5 mL of 1 % (w/v) CMC prepared in 0.05 M sodium citrate buffer (pH 5.0), the samples were mixed thoroughly and incubated at 50 °C for 30 min.

One unit (U) of endo- $\beta$ -1,4-xylanase and endo- $\beta$ -1,4-glucanase activity was defined as the amount of enzyme releasing 1  $\mu mol$  of reducing sugars per minute when xylose or glucose were used as standards, respectively.

### **Quantification of reducing sugars**

An aliquot of one milliliter of the enzymatic reaction mixture was used to quantify the reducing sugars with the DNS reagent. The samples were incubated in boiling water bath for 15 min. The reducing sugars released were quantified at 540 nm in a UV-Visible spectrophotometer (Cary 50 Bio, Varian).

### **Protein quantification**

The extracellular protein from fermentation supernatants was quantified by the Lowry method (Lowry et al., 1951). Bovine serum albumin (BSA) was used as standard. Each assay was performed in duplicate.

### **Molecular identification of fungal species**

#### **Genomic DNA extraction**

Genomic DNA extraction was carried out by the modified method of Lin et al. (2001). Fungal isolates were cultured and grown on cellophane membrane placed on PDA medium surface at 25 °C for fifteen days. The mycelium was separated from cellophane membrane and ground with liquid nitrogen to fine powder. A sample of 150 mg of powdered mycelium was placed into an Eppendorf tube and was mixed thoroughly with 600  $\mu$ L of DNA extraction buffer, which contained 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM EDTA (pH 8.0), 500 mM NaCl, 2 % (w/v) SDS, 2 % (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol, and 1 % (w/v) of PVP. The samples were incubated at 65 °C for 15 min. Then, they were centrifuged at 12,000 rpm for 10 min. The supernatant was transferred to another tube and 5  $\mu$ L of RNAase A (Sigma) were added to the mixture. The reaction mixture was incubated at 37 °C for 10 min. After incubation, an equal volume of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (50:49:1) mixture was added and mixed thoroughly. Then, the samples were centrifuged at 12,000 rpm for 3 min. The supernatant was transferred to another tube and an equal volume of cold isopropanol was added to precipitate DNA. The samples were incubated at -80 °C for 1 h. After this time, they were centrifuged at 12,000 rpm for 10 min. The supernatant was discarded. The DNA pellet was washed with 70 % (v/v) cold ethanol, dried, and re-suspended in deionized water. Genomic DNA samples were visualized in 1.0 % (w/v) agarose gel stained with ethidium bromide through a Transiluminator white/UV model LMW-20 UVP®.

#### **Species-specific PCR**

The oligonucleotides pair ITS1 and ITS4, which were specific to identify selected fungal isolates, were used in the PCR assays. *Forward primer* (ITS1): TCCGTAGGTGAACCTGCGG and *reverse primer* (ITS4): TCCTCCGCTTATTGATATGC. The reaction mixture was prepared in a total volume of 25  $\mu$ l with a final concentration of 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl and 0.2 mM of each dNTP. For each reaction, 0.04 U/ $\mu$ L of *Taq* 5U polymerase (Invitrogen), 0.2  $\mu$ M of each primer, and 1  $\mu$ L of fungal template DNA were used. The reaction was performed in a Techne C-512 PCR system thermal cycler (Barloworld Scientific) using the following PCR conditions: denaturation at 95 °C for 8 min, 35 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, annealing at 50 °C for 20 s, extension at 72 °C for 1 min, final extension at 72 °C for 5 min, and followed by cooling at 4 °C until recovery of the samples (Carbone and Kohn, 1999). Amplification products were visualized in 1.0 % agarose gels stained with ethidium bromide in a Transiluminator 3UV™ model LMS-20E UVP and analyzed by the program Quantity One version 4.2.1.

#### **DNA sequencing and analysis**

A standard PCR reaction was used to amplify the ITS ribosomal gene region of samples. The primer pair ITS1 and ITS4 was used in a PCR reaction with an annealing at 50 °C. After amplification, the products were directly sequenced using a sequencer 3730xl (Applied Biosystems, Macrogen Inc.). All sequencing products were edited and analyzed with the software

BioEdit version 7.1.3.0. Then, they were used as a query to search for similarities using the BLAST network services at the National Centre for Biotechnology Information (NCBI).

## **Visual demonstration of fungal xylanases**

### **Extracellular protein preparation**

After submerged fermentation, the supernatant was separated from mycelium by filtration through a filter paper and then with a 0.45  $\mu\text{m}$  membrane. The filtrate was centrifuged at 3,600 rpm for 15 min. The clarified protein extract was frozen at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 24 h and dried in lyophilization equipment (Labconco Freeze Dry System/LYPH LOCK® 4.5) at  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $50 \times 10^{-3}$  Mbar of vacuum pressure. The protein was used in the electrophoretic assays.

### **Polyacrylamide gel electrophoresis**

A polyacrylamide gel electrophoresis was done in denaturing conditions (SDS-PAGE). A discontinuous gel was prepared with 4% stacking gel and 17% resolving gel, containing 0.015 % (w/v) birch wood xylan. Concentrated protein was applied (11  $\mu\text{g}$ ) to the gel. The following molecular weight standards (Bio-Rad) were used (daltons): triose phosphate isomerase (26,625), myoglobin (16,950),  $\alpha$ -lactalbumin (14,437), aprotinin (6,512), insulin B chain (3,496), and bacitracin (1,423). The electrophoresis was carried out at 110 V for 1.6 h in an ice bath.

### **Zymogram analysis**

After electrophoresis, the gel was stained according to the modified method of Khucharoenphaisan et al. (2010). The gel was rinsed in 50 mM sodium citrate buffer (pH 5.0) during 1 h at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  and incubated in the same buffer at  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  during 72 h. The gel was washed several times with deionized water and was stained for xylanase activity in Congo red dissolution (0.1%, w/v) for 30 min at room temperature. Finally, it was washed with 1 M NaCl to remove excess of dye and fixed with 0.5% (v/v) acetic acid.

### **Silver stain**

The gel was incubated during 1 h in a methanol, acetic acid, and deionized water mixture (40:10:50, v/v), to fix the proteins. The gel was washed for 24 h with several changes of deionized water and incubated in 0.02 % (w/v) sodium thiosulfate dissolution for 1 min. The gel was washed again for three times with deionized water for 60 s and incubated in 0.1 % (w/v) silver nitrate dissolution with 0.02 % (v/v) formaldehyde at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 20 min. The gel was washed three times with deionized water for 60 s and placed in a new staining tray of silver nitrate. The gel bands were developed in 3 % (w/v) sodium carbonate dissolution with 0.05 % (v/v) formaldehyde. This developer dissolution was changed immediately as soon as it turned yellow. Finally, the gel was washed with deionized water for 20 s and the staining was terminated with 5 % (v/v) acetic acid for 5 min.

## Data analysis

### Correspondence analysis

Correspondence analysis was employed to study the association or dependence level among fungal isolates and their response to culture conditions. The categorical variables such as fungal growth on solid medium (FG), xylanolytic index (XI), xylanolytic activity (XA), and cellulolytic activity (CA) were recorded to facilitate the selection of the best fungal isolates. The growth of fungal isolates on solid medium was determined by calculating the ratio of colony diameter divided by the time of incubation. The categorical variables were organized in a two-way matrix. The variables FG, XI, XA, and CA were assigned to columns, and fungal isolates to rows. The mean of values was used for the statistical analysis. The distance between points in a bi-dimensional space indicates a level of similarity or affinity between categorical variables. The smaller the distance between categorical variables translates into the greater similarity.

### Statistical analysis

The confidence interval was used to compare between XI mean values of all fungi, with 95 % of confidence to represent a statistically significant difference. In correspondence analysis, the difference between observed and expected frequencies was used to compare categorical variables. The observed frequency must be greater than the expected frequency to confirm that affinity between categorical variables exists, by considering the hypothesis of independence among variables. The more similar is the numerical value of the difference between frequencies, the higher affinity or dependency. Data were analyzed by using the software Statistica version 8.

## RESULTS

### Profile of xylanolytic and cellulolytic activities of fungal isolates

The one hundred three fungal isolates were cultivated with xylan as the sole carbon source. In solid medium, two groups of fungi were classified upon their XI (Figure 1A). Sixty fungal isolates, those with the highest XI, were analyzed together in the first fungal work group to find additional classification parameters. After submerged fermentation process, the xylanolytic and cellulolytic activities were measured. The xylanolytic activity values were graphed from high to low (Figure 1B).

**Figure 1.** Fungal isolates with the major (greatest) enzymatic activity in the first and second steps of selection.

In these conditions of experimental assay, two groups of fungi were highlighted. One of them exhibited just xylanolytic activity and other group both xylanolytic and cellulolytic activities. Thirty nine percent of fungi studied showed no cellulolytic activity (Table 1).

**Table 1.** First selection of sixty fungal isolates with the greatest XI.

### Selection of the fungal group to study the xylanolytic and cellulolytic activities

Fungal isolates were grouped based on identification of systematic relations between the values of the variables FG, XI, XA, and CA (Figure 2). Fungi were distributed in several zones within a Cartesian plane in correspondence to variable of major weight by means of a correspondence analysis. A group of fungi was located near of FG and XI because it showed significant similarity. Another group of fungi located between the XI and XA highlights because exhibits considerable

XI and xylanolytic activity. The isolate 60 was located very close to CA which was consistent with the outstanding cellulolytic activity that showed in liquid medium. However, the behavior of isolates 56, 59, and 60 was different from the rest of the group. But they showed great similarities among themselves. A strong association was observed between the XI and FG parameters. Behavioral patterns were sought by comparing fungal isolates for selection from a group with similar characteristics (Figure 2). A group of fungi was selected based on its proximity to the XA variable. The numbers in blue correspond to fungal isolates with the highest affinity. Most fungal isolates of this group belongs to horticultural ecosystems, except 13 and 20 that were from orchard ecosystems. The fungal isolates 41, 44, 48, 49, 58, 59, 71, 84, 86, 87, 89, 90 and 91 were obtained from the same geographical region.

**Figure 2.** Distribution and grouping of the sixty fungal isolates from first selection step in function of categorical variables XI, FG, XA and CA based on a correspondence analysis.

Statistically, those variables in which observed frequencies were higher than expected frequencies (OF-EF) were similar in accord to the hypothesis of independence among variables. In Table 2, fungal isolates 13, 41, 58, 59, 71, 84, 86, 87, and 91 stand out because they showed the highest OF-EF value and for having the greatest contribution to the total activity displayed by the group of fungal isolates.

**Table 2.** Second selection of fungal isolates with the highest affinity pattern based on correspondence analysis.

### Molecular identification of xylanolytic fungi

Based on the above criteria, these fungal isolates were selected for molecular identification. Selected fungal isolates were tested with the species-specific primers ITS1 and ITS4. All isolates yielded PCR products by using this primer pair. Eight of the nine selected isolates were species from *Fusarium* genus (Table 3).

**Table 3.** Identification of the nine selected fungi based on sequencing of the ITS ribosomal gene region (MegaBLAST, NCBI).

*F. solani* strains (59 and 87) had the best xylanolytic/cellulolytic activities ratio but numerically isolate 59 was the best, relative to xylanolytic activity (Table 4).

**Table 4.** Fungal isolates with the greatest xylanolytic activity/cellulolytic activity ratio. Accession numbers provided by GenBank (NCBI) for new identified fungal isolates.

### Zymogram analysis

Xylanolytic activity of *F. solani* was recorded in electrophoresis gel after separation under denaturing conditions. The zymogram analysis was performed to visualize the specific activity and the number of enzymes responsible of the observed activity (multiplicity of xylanases). Figure 3 shows the stained gels after electrophoresis. Lane 1 shows molecular weight markers, lanes 2 and 3 show the extracellular protein profile and zymogram of xylanolytic activity from *F. solani* (isolate 59) revealed with silver nitrate and Congo red, respectively. The zymogram shows one well defined clear area, which was the result of enzyme hydrolysis of xylan and it matched with a band observed in the silver stained gel with a molecular weight of 19 kD.

**Figure 3.** Electrophoresis gels.

## DISCUSSION

A scrutiny in several steps was done with fungi collected from different ecosystems to obtain a small group of fungal producers with interesting xylanolytic activity. All of them grew on solid

medium with xylan as a sole carbon source. Sixty isolates were selected in the first fungal group, in which, twenty seven fungal isolates showed an  $XI \geq 1.0$ . In reference to the isolation place, fifty four fungal isolates came from horticultural, four from forest, and two from orchard ecosystems. Two groups of fungi are highlighted based upon their extracellular enzymes production. The first group is distinguished by displaying only xylanolytic activity in the experimental conditions used. Motta et al. (2013) mentioned that selective production of xylanase may be possible using only xylan as the carbon source, since the mechanisms that govern the formation of extracellular enzymes with regards to the carbon sources present in the medium are influenced by the availability of precursors for enzyme synthesis. Another fungal group is characterized by producing both xylanolytic and cellulolytic activities. Fungal xylanases are generally associated with cellulases (Steiner et al., 1987), e.g. species of *Aspergillus*, *Thermomyces*, *Myceliophthora*, *Thermomucor* and *Candida* cultured on medium containing corn straw and cardboard as carbon sources under solid state fermentation (Moretti et al., 2012). In filamentous fungi, the production of plant cell wall degrading enzymes (cellulases, hemicellulases, ligninases, and pectinases) is mainly regulated at transcriptional level. Genes are induced in the presence of polymers, molecules derived from polymers, or other inductors. There is a significant crosstalk about the induced expression of genes encoding for different classes of enzymes. For example, in some fungi with specific growth conditions, the same compounds may cause expression of both, cellulases and hemicellulases. Additionally, the coordinated transcriptional regulation by the activator XlnR has been demonstrated at various levels in the extracellular production of xylanases and cellulases (Van Peij et al., 1998; Aro et al., 2005).

A second screening was performed with the sixty fungal isolates by using variables to discriminate and to select a second fungal group.

A strong association between categorical variables XI and FG is observed. It means that the fungal growth depends on nutrients type and its ability to secrete xylanolytic enzymes to degrade xylan present in the culture medium. Fungal group among variables XI and XA stands out for its ability to produce extracellular xylanases in both, solid or liquid media. Fungal isolates 56, 59, and 60 do not have similar behavioral pattern to the rest of the group. These fungi are more distantly related to the rest of fungal isolates, which reveals that the mechanisms and components of the genomic inventory for regulation of plant cell wall-degrading enzymes are diverse in different fungi (Glass et al., 2013).

The identification of selected xylanolytic fungal isolates was done with molecular tools by using the ITS ribosomal gene region (Summerell et al., 2010). One of them is identified as *Phoma herbarum*, which was isolated from avocado trees. The remaining eight fungal isolates are species of *Fusarium* genus which were isolated from bean crop fields. Species belonging to the *Phoma* genus and related coelomycetes are often encountered as virulent plant pathogens (Aveskamp et al., 2008). *P. herbarum* is a cosmopolitan fungus and it has gained global attention in recent years for its ability to produce many functional chemicals with potent activity (Goldring et al., 2006). Also, it causes severe diseases in a variety of hosts including plants and vertebrates (Faisal et al., 2007; Tullio et al., 2010). However, there are a few reports about the xylanolytic activity of *Phoma* species (Bradner et al., 1999; Yang et al., 2005; Bezerra et al., 2012).

The *Fusarium* genus clusters more than 80 fungal species with considerable differences in their biology, ecology, and economic significance. This genus is well known in agriculture and forestry for the adverse effects of its phytopathogenic species and also for their contaminant mycotoxins that may affect the vertebrate health (Silvestro et al., 2013). The surviving on these habitats implies that *Fusarium* sp. would be a useful resource for obtaining extracellular enzymes. However, information about the enzyme production abilities of *Fusarium* sp. has not often been reported.

*F. tricinctum* is a food contaminant that produces toxic metabolites. Its widely distribution in crops and plant products is well known. This fungus is frequently isolated from mouldy grains such as corn and rice. Also, it is the causative agent of drowning and root rot of wheat (Bamburg et al., 1969). The effect of *F. tricinctum* goes beyond plants and its products. In vertebrates, it causes mycotoxicosis after ingestion. In recent years, the study of *F. tricinctum* has been focused on the purification and bioactivity analysis of toxigenic and antimicrobial substances produced by this fungus.

It has been shown that these cereal pathogens produce more xylanases than other cell wall degrading enzymes. This feature may be related to the composition of graminaceous crops and grasses, as the arabino-xylan accounts for up to 40 % of the cell walls. The presence of xylanases in several *Fusarium* species has been reported (Beliën et al., 2007). However, we do not know about previous reports of the *Fusarium tricinctum* xylanolytic activity.

The fungal isolate 59 was selected in this study for their ability to produce high extracellular xylanolytic activity in both, solid and liquid cultures, and by the lack of cellulolytic activity. This fungus was identified as *Fusarium solani*. It is a promising organism to study the nutritional factors to improve the production of extracellular xylanases. Actually, there are already a few reports on the efficient production of xylanase by *Fusarium solani*, among them, the optimization of enzyme production (Obruca et al., 2012).

Zymogram analysis revealed the presence of xylanase activity indicated by a clear hydrolysis zone observed in the stained gel with Congo red. In the zymogram method, the multiplicity of xylanases in *F. solani* is totally missing; in spite of the fact that several studies have reported the presence of multiple xylanases in filamentous fungi by the same method, zymography (Raghukumar et al., 2004).

The relative molecular weight corresponding to this enzyme is estimated as 19 kD. Several authors report that endoxylanases have low molecular weight (Mellon et al., 2011). However, more studies are needed to determine other biochemical features of *F. solani* enzymes, such as pI, thermostability, substrate specificity, and size of oligosaccharides produced as by-products. Further studies are necessary in order to confirm that the electrophoretic signal is indeed a single enzyme. Nevertheless, the enzyme multiplicity has been reported in other fungi as *Aspergillus* sp., *A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. niger*, and *A. fumigatus* (De Souza et al., 2011).

In fungal life style exists determinant factors for production of extracellular lytic enzymes, such as, the composition and structure of cell wall, since it differs among plant lineages. Also, the type of polysaccharides which constitute the hemicellulose fraction varies between plants. Fungi associated with plants, saprophytes or plant pathogens that inhabit these ecosystems have the ability to secrete specific hydrolytic enzymes to degrade these hetero polysaccharides. Some lignocellulosic materials from horticultural crops contain a higher percentage of hemicelluloses than those of orchard and forest crops. Such is the case of barley straw that contains 28 to 30% of hemicelluloses, an amount significantly higher than the amount present in pine wood which is only 8.8% (Jørgensen et al., 2007). Because of this biological ability, most of the best selected fungi come from horticultural ecosystems.

Fungal growth on xylan, in a lower nitrogen/carbon ratio and without cellulose contamination, is a strategy for producing xylanolytic systems free of cellulases. Also, the results obtained in the present study contribute to the knowledge of the ability of *P. herbarum*, *F. tricinctum*, and *F. solani* to lyse hemicelluloses into assimilable monomers. Therefore, these fungi are promising microorganisms that can help us to design a production method to obtain extracellular xylanases in large quantities, particularly the isolate 59, identified as *F. solani*, which was selected for its ability to produce extracellular xylanases with biotechnological potential.

**Acknowledgments:** This work was financially supported by the UMSNH. MAN was scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT (México).

## REFERENCES

1. Aro N, Pakula T and Penttilä M (2005). Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 719–739.
2. Aveskamp MM, De Gruyter J and Crous PW (2008). Biology and recent developments in the systematics of *Phoma*, a complex genus of major quarantine significance. *Fungal Divers.* 31: 1-18.
3. Bailey MJ, Biely P and Poutanen K (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnol.* 23: 257–271.
4. Bamberg JR, Strong FM and Smalley EB (1969). Toxins from moldy cereals. *J. Agr. Food Chem.* 17: 443-450.
5. Beliën T, Van Campenhout S, Van Acker M, Robben J, et al. (2007). Mutational analysis of endoxylanases XylA and XylB from the phytopathogen *Fusarium graminearum* reveals comprehensive insights into their inhibitor insensitivity. *Appl. Environ. Microb.* 73: 4602–4608.
6. Bezerra JDP, Santos MGS, Svedese VM, Lima DMM, et al. (2012). Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) preliminary screening for enzyme production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 1989–1995.
7. Bradner JR, Sidhu RK, Gillings M and Nevalainen KM (1999) Hemicellulase activity of antarctic microfungi. *J. Appl. Microbiol.* 87: 366–370.
8. Cai L, Giraud T, Zhang N, Begerow D, et al. (2011). The evolution of species concepts and species recognition criteria in plant pathogenic fungi. *Fungal Divers.* 50: 121–133.
9. Carbone I and Kohn LM (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia.* 91: 553–556.
10. Chipeta ZA, Du Preez JC, Szakacs G and Christopher L (2005). Xylanase production by fungal strains on spent sulphite liquor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69: 71–78.
11. De Souza W, de Gouvea PF, Savoldi M, Malavazi I, et al. (2011). Transcriptome analysis of *Aspergillus niger* grown on sugarcane bagasse. *Biotechnol. Biofuels.* 4: 40. doi:10.1186/1754-6834-4-40.
12. Dhiman SS, Sharma J and Battan B (2008). Industrial applications and future prospects of microbial xylanases: Review. *Bioresources.* 3: 1377-1402.
13. Faisal M, Elsayed E, Fitzgerald SD, Silva V, et al. (2007). Outbreaks of phaeohiphomycosis in the chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) caused by *Phoma herbarum*. *Mycopathologia.* 163: 41-48.
14. Ghose TK (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* 59: 257-268.
15. Glass NL, Schmoll M, Cate JHD and Coradetti S (2013). Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 67: 477-498.
16. Goldring WPD and Pattenden G (2006). The phomactins: A novel group of terpenoid platelet activating factor antagonists related biogenetically to the taxanes [J]. *Acc. Chem. Res.* 39: 354-361.
17. Jørgensen H, Kristensen JB and Felby C (2007). Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: Challenges and opportunities. *Biofuel. Bioprod. Bior.* 1: 119–134.
18. Khandeparker R and Numan MT (2008). Bifunctional xylanases and their potential use in biotechnology. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 35: 635–644.

19. Khucharoenphaisan K, Tokuyama S and Kitpreechavanich V (2010). Purification and characterization of a high-thermostable  $\beta$ -xylanase from newly isolated *Thermomyces lanuginosus* THKU-49. *Mycoscience*. 51: 405–410.
20. King BC, Waxman KD, Nenni NV, Walker LP, et al. (2011). Arsenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi. *Biotechnol. Biofuels*. 4: 4. doi:10.1186/1754-6834-4-4.
21. Klein-Marcuschamer D, Oleskowicz-Popiel P, Simmons BA and Blanch HW (2012). The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. *Biotechnol. Bioeng*. 109: 1083–1087.
22. Lin RC, Ding ZS, Li LB and Kuang TY (2001). A rapid and efficient DNA miniprep suitable for screening transgenic plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 19: 379a-379e.
23. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
24. Mellon JE, Cotty PJ, Callicott KA and Abbas H (2011). Identification of a major xylanase from *Aspergillus flavus* as a 14-kD protein. *Mycopathologia*. 172: 299-305.
25. Moretti MMS, Bocchini-Martins DA, Da Silva R, Rodrigues A, et al. (2012). Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. *Braz. J. Microbiol.* 43: 1062-1071.
26. Motta FL, Andrade CCP and Santana MHA (2013). Sustainable degradation of lignocellulosic biomass - techniques, applications and commercialization. In: A review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications (Chandel AK and Da Silva SS, eds.). DOI: 10.5772/1490.
27. Obruca S, Marova I, Matouskova P, Haronikova A, et al. (2012). Production of lignocellulose-degrading enzymes employing *Fusarium solani* F-552. *Folia Microbiol.* 57: 221–227.
28. Pointing SB (1999). Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. *Fungal Divers.* 2: 17-33.
29. Raghukumar C, Muraleedharan U, Gaud VR and Mishra R (2004). Xylanases of marine fungi of potential use for biobleaching of paper pulp. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 31: 433-441.
30. SIAVI. Sistema de Información Arancelaria Vía Internet de la Secretaría de Economía. Available at [<http://200.77.231.38/>]. Accessed September 5, 2013.
31. Silvestro LB, Stenglein SA, Forjan H, Dinolfo MI, et al. (2013). Occurrence and distribution of soil *Fusarium* species under wheat crop in zero tillage. *Span. J. Agric. Res.* 11: 72-79.
32. Steiner W, Lafferty RM, Gomes I and Esterbauer H (1987). Studies on a wild type strain of *Schizophyllum commune*: Cellulase and xylanase production and formation of the extracellular polysaccharide schizophyllan. *Biotechnol. Bioeng.* 30: 169-178.
33. Summerell BA, Laurence MH, Liew ECY and Leslie JF (2010). Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. *Fungal Divers.* 44: 3-13.
34. Tullio V, Banche G, Allizond V, Roana J, et al. (2010): Non-dermatophyte moulds as skin and nail foot mycosis agents: *Phoma herbarum*, *Chaetomium globosum* and *Microascus cinereus*. *Fungal boil.* 114: 345–349.
35. Van Peij NNME, Gielkens MMC, De Vries RP, Visser J, et al. (1998). The transcriptional activator XlnR regulates both xylanolytic and endoglucanase gene expression in *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microb.* 64: 3615-3619.
36. Yang XB, Gao XD, Han F, Xu BS, et al. (2005). Purification, characterization and enzymatic degradation of YCP, a polysaccharide from marine filamentous fungus *Phoma herbarum* YS4108. *Biochimie.* 87: 747-754.

**TABLES**

**Table 1.** First selection of sixty fungal isolates with the greatest XI.

| <b>Isolated No.</b> | <b>Ecosystem</b> | <b>XI</b>     | <b>Xylanolytic activity (U/mg)</b> | <b>Cellulolytic activity (U/mg)</b> |
|---------------------|------------------|---------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| 63                  | 3                | 1.232 ± 0.023 | 0.178 ± 0.030                      | 0.000 ± 0.000                       |
| 64                  | 3                | 1.143 ± 0.037 | 0.162 ± 0.016                      | 0.000 ± 0.000                       |
| 71                  | 3                | 1.133 ± 0.023 | 1.944 ± 0.004                      | 0.311 ± 0.074                       |
| 20                  | 2                | 1.110 ± 0.109 | 0.944 ± 0.178                      | 0.294 ± 0.106                       |
| 72                  | 3                | 1.100 ± 0.045 | 0.969 ± 0.162                      | 0.401 ± 0.184                       |
| 75                  | 3                | 1.099 ± 0.035 | 0.682 ± 0.101                      | 0.912 ± 0.432                       |
| 58                  | 3                | 1.097 ± 0.029 | 1.529 ± 0.199                      | 0.252 ± 0.117                       |
| 5                   | 1                | 1.096 ± 0.055 | 0.719 ± 0.318                      | 0.126 ± 0.108                       |
| 29                  | 3                | 1.080 ± 0.033 | 0.054 ± 0.015                      | 0.000 ± 0.000                       |
| 30                  | 3                | 1.078 ± 0.033 | 0.128 ± 0.095                      | 0.000 ± 0.000                       |
| 56                  | 3                | 1.074 ± 0.028 | 4.593 ± 0.934                      | 2.129 ± 0.278                       |
| 7                   | 1                | 1.069 ± 0.059 | 1.185 ± 0.169                      | 0.234 ± 0.014                       |
| 13                  | 2                | 1.065 ± 0.018 | 2.127 ± 0.091                      | 0.908 ± 0.194                       |
| 99                  | 3                | 1.043 ± 0.019 | 0.576 ± 0.247                      | 0.354 ± 0.228                       |
| 74                  | 3                | 1.033 ± 0.035 | 0.955 ± 0.019                      | 0.298 ± 0.216                       |
| 73                  | 3                | 1.033 ± 0.021 | 1.583 ± 0.522                      | 1.035 ± 0.201                       |
| 101                 | 3                | 1.028 ± 0.023 | 0.312 ± 0.075                      | 0.000 ± 0.000                       |
| 61                  | 3                | 1.026 ± 0.052 | 0.021 ± 0.001                      | 0.052 ± 0.002                       |
| 95                  | 3                | 1.022 ± 0.022 | 0.984 ± 0.007                      | 0.353 ± 0.063                       |
| 46                  | 3                | 1.022 ± 0.020 | 1.198 ± 0.404                      | 0.609 ± 0.220                       |
| 98                  | 3                | 1.022 ± 0.027 | 0.542 ± 0.301                      | 0.000 ± 0.000                       |
| 68                  | 3                | 1.021 ± 0.033 | 0.215 ± 0.063                      | 0.000 ± 0.000                       |
| 65                  | 3                | 1.017 ± 0.027 | 0.102 ± 0.021                      | 0.000 ± 0.000                       |
| 35                  | 3                | 1.016 ± 0.044 | 0.104 ± 0.034                      | 0.000 ± 0.000                       |
| 97                  | 3                | 1.012 ± 0.022 | 0.814 ± 0.223                      | 0.049 ± 0.021                       |
| 66                  | 3                | 1.007 ± 0.023 | 0.188 ± 0.069                      | 0.000 ± 0.000                       |
| 89                  | 3                | 1.003 ± 0.011 | 1.354 ± 0.145                      | 0.217 ± 0.040                       |
| 79                  | 3                | 0.999 ± 0.023 | 0.649 ± 0.466                      | 0.139 ± 0.041                       |
| 44                  | 3                | 0.997 ± 0.046 | 1.454 ± 0.064                      | 0.337 ± 0.232                       |
| 48                  | 3                | 0.994 ± 0.019 | 1.426 ± 0.047                      | 0.567 ± 0.198                       |
| 91                  | 3                | 0.994 ± 0.021 | 1.685 ± 0.111                      | 0.382 ± 0.307                       |

## Estudio de un aislado fúngico con actividad xilanolítica

|    |   |               |               |               |
|----|---|---------------|---------------|---------------|
| 60 | 3 | 0.993 ± 0.041 | 3.106 ± 0.012 | 9.192 ± 0.243 |
| 82 | 3 | 0.991 ± 0.039 | 0.710 ± 0.103 | 0.232 ± 0.068 |
| 42 | 3 | 0.990 ± 0.041 | 0.432 ± 0.268 | 0.000 ± 0.000 |
| 83 | 3 | 0.979 ± 0.045 | 0.898 ± 0.228 | 0.134 ± 0.098 |
| 70 | 3 | 0.975 ± 0.040 | 0.324 ± 0.030 | 0.000 ± 0.000 |
| 78 | 3 | 0.975 ± 0.045 | 0.533 ± 0.304 | 0.000 ± 0.000 |
| 93 | 3 | 0.974 ± 0.030 | 0.629 ± 0.284 | 0.451 ± 0.117 |
| 2  | 1 | 0.974 ± 0.020 | 0.159 ± 0.009 | 0.000 ± 0.000 |
| 47 | 3 | 0.971 ± 0.022 | 0.598 ± 0.356 | 0.000 ± 0.000 |
| 96 | 3 | 0.968 ± 0.036 | 0.736 ± 0.164 | 0.363 ± 0.302 |
| 51 | 3 | 0.968 ± 0.037 | 0.917 ± 0.059 | 0.443 ± 0.100 |
| 31 | 3 | 0.967 ± 0.027 | 0.895 ± 0.190 | 0.282 ± 0.182 |
| 59 | 3 | 0.964 ± 0.042 | 3.823 ± 0.210 | 0.000 ± 0.000 |
| 84 | 3 | 0.963 ± 0.017 | 1.841 ± 0.709 | 0.136 ± 0.083 |
| 41 | 3 | 0.962 ± 0.097 | 1.206 ± 0.241 | 0.150 ± 0.106 |
| 49 | 3 | 0.957 ± 0.039 | 1.338 ± 0.081 | 0.000 ± 0.000 |
| 80 | 3 | 0.956 ± 0.018 | 0.955 ± 0.048 | 0.197 ± 0.030 |
| 90 | 3 | 0.956 ± 0.016 | 1.412 ± 0.206 | 0.268 ± 0.018 |
| 67 | 3 | 0.955 ± 0.024 | 0.210 ± 0.091 | 0.000 ± 0.000 |
| 81 | 3 | 0.955 ± 0.022 | 0.815 ± 0.125 | 0.288 ± 0.055 |
| 94 | 3 | 0.955 ± 0.046 | 0.762 ± 0.138 | 0.528 ± 0.160 |
| 4  | 1 | 0.953 ± 0.054 | 0.339 ± 0.224 | 0.000 ± 0.000 |
| 92 | 3 | 0.952 ± 0.022 | 0.391 ± 0.064 | 0.165 ± 0.114 |
| 77 | 3 | 0.951 ± 0.024 | 0.927 ± 0.133 | 0.000 ± 0.000 |
| 76 | 3 | 0.942 ± 0.020 | 1.102 ± 0.106 | 0.534 ± 0.113 |
| 86 | 3 | 0.941 ± 0.024 | 1.968 ± 0.558 | 0.285 ± 0.209 |
| 69 | 3 | 0.939 ± 0.033 | 0.222 ± 0.038 | 0.000 ± 0.000 |
| 87 | 3 | 0.933 ± 0.020 | 1.851 ± 0.155 | 0.000 ± 0.000 |
| 28 | 3 | 0.921 ± 0.059 | 0.191 ± 0.019 | 0.000 ± 0.000 |

XI ± confidence interval [=2.201\*SD/√11], 95 %, n=2. Enzymatic activity ± standard deviation. (1) Forestry ecosystem, (2) fruit ecosystem, (3) horticultural ecosystem.

**Table 2.** Second selection of fungal isolates with the highest affinity pattern based on correspondence analysis.

| Fungal isolate number | OF-EF <sup>a</sup> | Contribution to $\chi^2$ | Percentage of xylanolytic activity <sup>b</sup> |
|-----------------------|--------------------|--------------------------|---|
| 71                    | 0.7649             | 0.4962                   | 3.31  |
| 20                    | 0.1334             | 0.0219                   | 1.61  |
| 58                    | 0.4404             | 0.1780                   | 2.61  |
| 56                    | 2.1644             | 1.9285                   | 7.83  |
| 13                    | 0.5024             | 0.1554                   | 3.63  |
| 89                    | 0.2194             | 0.0424                   | 2.31  |
| 44                    | 0.3719             | 0.1278                   | 2.48  |
| 48                    | 0.2837             | 0.0704                   | 2.43  |
| 91                    | 0.5323             | 0.2458                   | 2.87  |
| 60                    | -0.9978            | 0.2426                   | 5.29  |
| 59                    | 2.1193             | 2.6358                   | 6.52  |
| 84                    | 0.6415             | 0.3431                   | 3.14  |
| 41                    | 0.3713             | 0.1652                   | 2.06  |
| 49                    | 0.3597             | 0.1322                   | 2.28  |
| 90                    | 0.2951             | 0.0780                   | 2.41  |
| 86                    | 0.7094             | 0.3997                   | 3.35  |
| 87                    | 0.7063             | 0.4357                   | 3.16  |

<sup>a</sup>OF-EF: Observed Frequency minus Expected Frequency.

<sup>b</sup>Calculated from total xylanolytic activity from group of sixty fungal isolates with the greatest XI [(xylanolytic activity of fungal isolated/xylanolytic activity of fungal population)x100%].

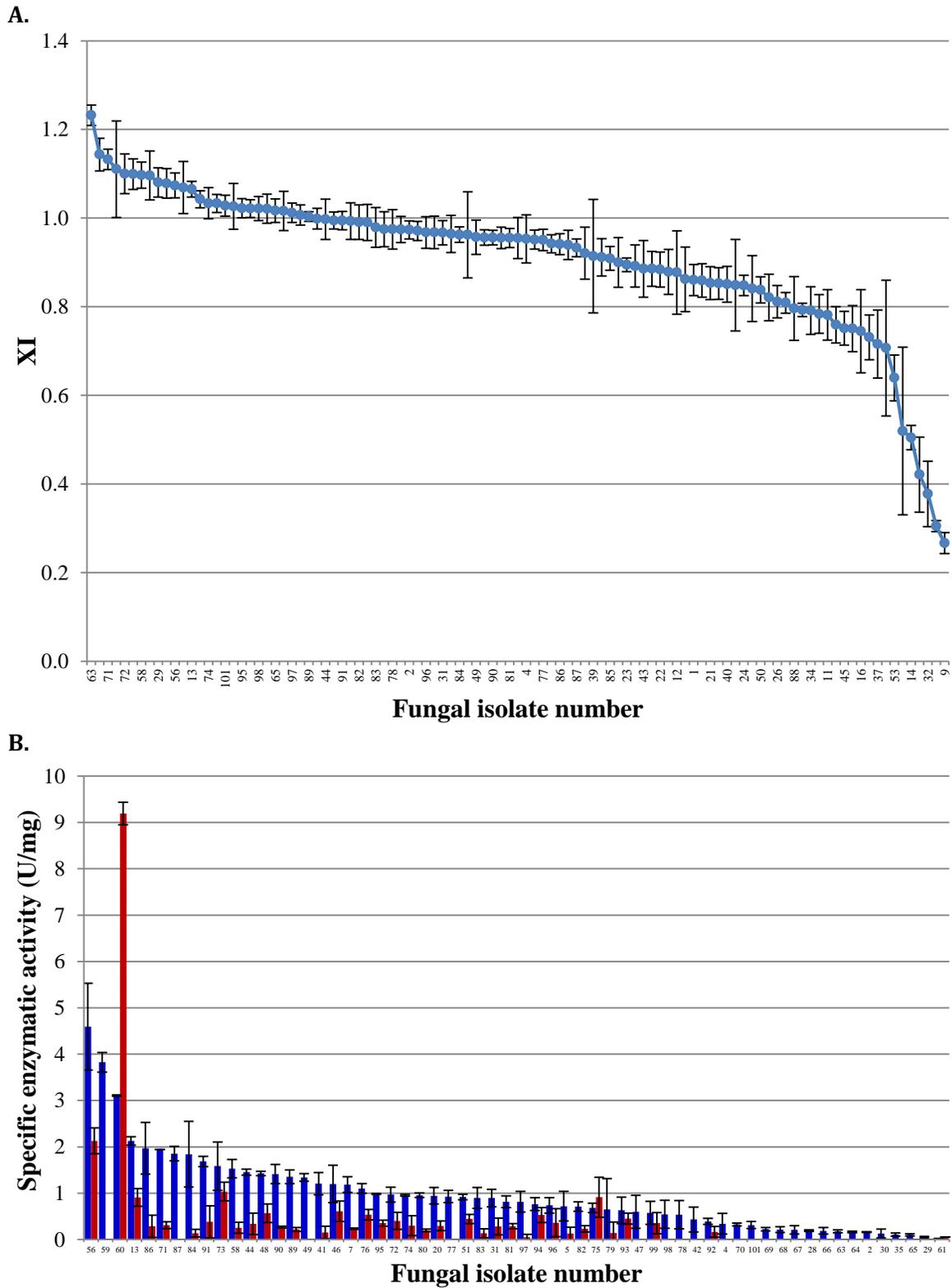
**Table 3.** Identification of the nine selected fungi based on sequencing of the ITS ribosomal gene region (MegaBLAST, NCBI).

| Fungal isolate | Sequence based identification | Sequence with best match (access number) | Identity (%) |
|----------------|-------------------------------|--|--------------|
| 13             | <i>Phoma herbarum</i>         | JQ936331.1                               | 99           |
| 41             | <i>Fusarium tricinctum</i>    | GU441584.1                               | 100          |
| 58             | <i>Fusarium tricinctum</i>    | KF010839.1                               | 100          |
| 59             | <i>Fusarium solani</i>        | KJ584550.1                               | 100          |
| 71             | <i>Fusarium sp.</i>           | HM486951.1                               | 100          |
| 84             | <i>Fusarium solani</i>        | KJ584550.1                               | 100          |
| 86             | <i>Fusarium solani</i>        | KF494125.1                               | 100          |
| 87             | <i>Fusarium solani</i>        | KF494125.1                               | 100          |
| 91             | <i>Fusarium tricinctum</i>    | HM486932.1                               | 100          |

**Table 4.** Fungal isolates with the greatest xylanolytic activity/cellulolytic activity ratio. Accession numbers provided by GenBank (NCBI) for new identified fungal isolates.

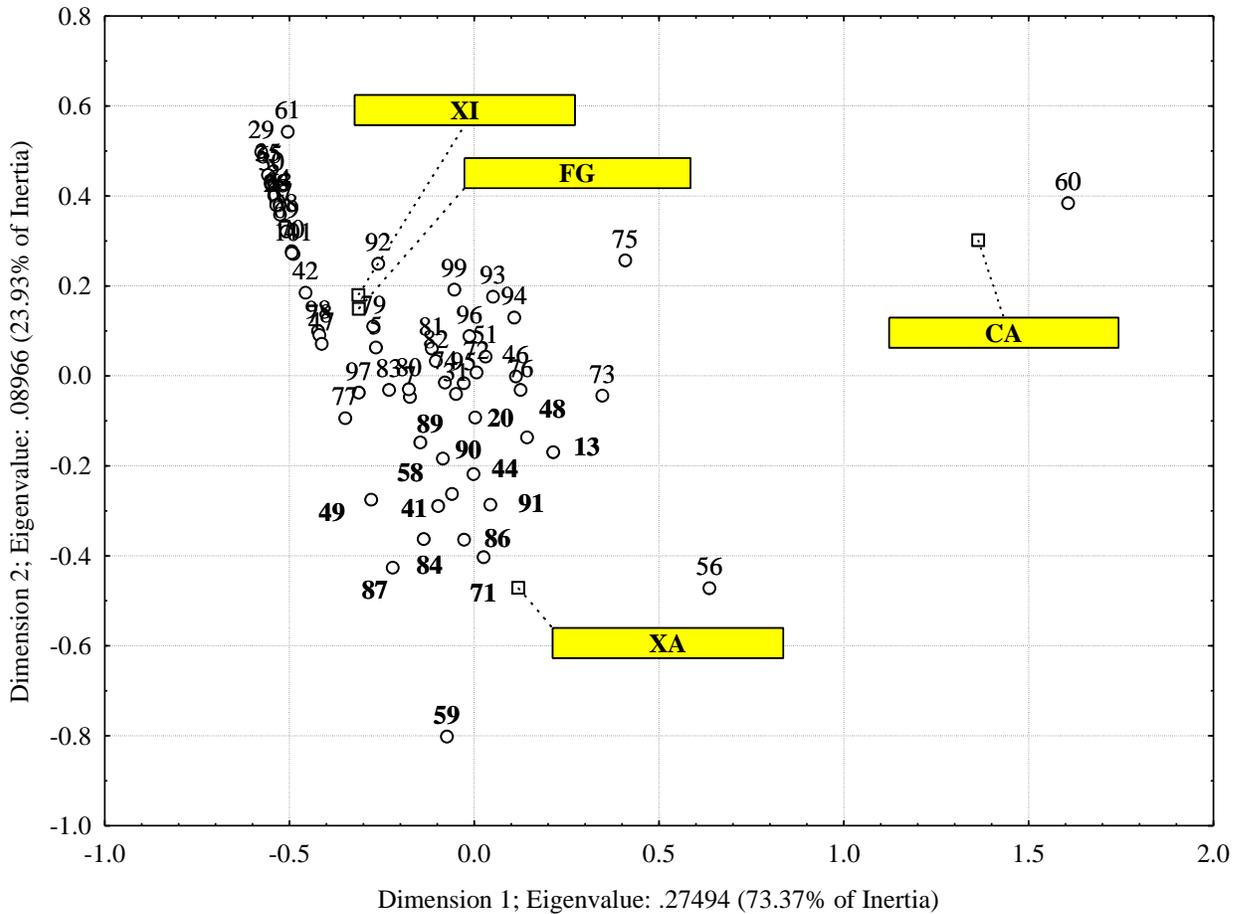
| <b>Fungal isolate</b>      | <b>Accession number</b> | <b>Xylanolytic activity<br/>/cellulolytic activity ratio</b> |
|----------------------------|-------------------------|--|
| <i>Phoma herbarum</i>      | KP144996                | 2.34   |
| <i>Fusarium tricinctum</i> | KP137448                | 8.04   |
| <i>Fusarium tricinctum</i> | KP137447                | 6.07   |
| <i>Fusarium solani</i>     | KP137443                | ∞  |
| <i>Fusarium sp.</i>        | KP137445                | 6.25   |
| <i>Fusarium solani</i>     | KP137441                | 13.54  |
| <i>Fusarium solani</i>     | KP137444                | 6.91   |
| <i>Fusarium solani</i>     | KP137446                | ∞  |
| <i>Fusarium tricinctum</i> | KP137442                | 4.41   |

FIGURES

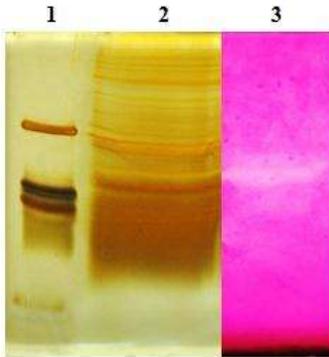


**Figure 1.** Fungal isolates with the major enzymatic activity in the first and second steps of selection. (A) XI profile of one hundred and three fungal isolates. XI mean  $\pm$  confidence interval

[ $=2.201 \cdot SD / \sqrt{11}$ ] 95%, N = 2). (B) Profile of xylanolytic and cellulolytic activity of sixty fungal isolates with the greatest XI. ■ Xylanolytic activity (U/mg) ■ Cellulolytic activity (U/mg). Enzymatic activity  $\pm$  SD, N = 3.

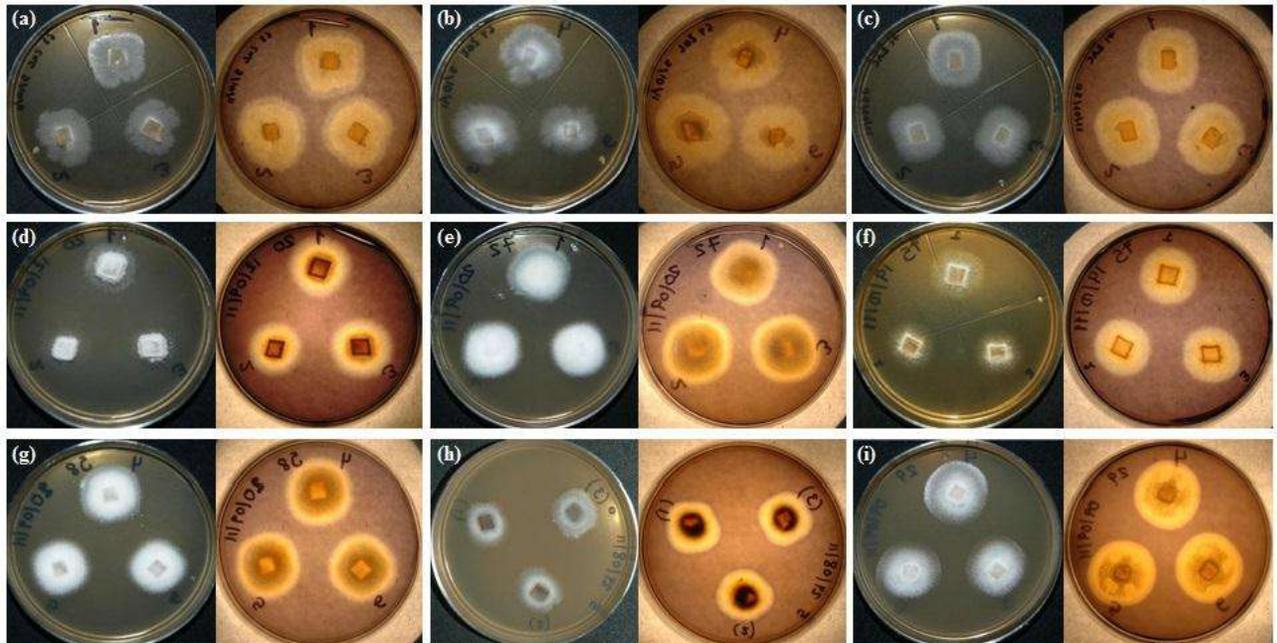


**Figure 2.** Distribution and grouping of the sixty fungal isolates from first selection step in function of categorical variables XI, FG, XA and CA based on a correspondence analysis. Points represent the relative position of each categorical variable. 2D plot of row and column coordinates; dimension: 1 x 2; input table: (rows x columns): 60 x 4; standardization: row and column profiles (Statistica version 8). ○ Fungal isolate, □ Response variable.

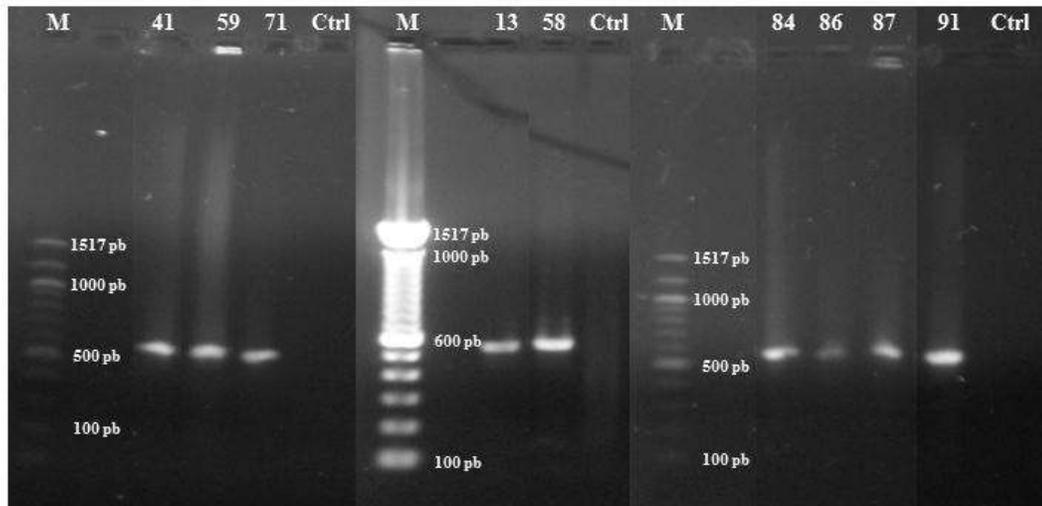


**Figure 3.** Electrophoresis gels. Lane 1, molecular weight markers (Da): triose phosphate isomerase (26,625), myoglobin (16,950),  $\alpha$ -lactalbumin (14,437), aprotinin (6512), insulin B chain (3496) and bacitracin (1423); lanes 2 and 3, extracellular protein and zymogram xylanase activity of isolate 59, revealed with silver nitrate and Congo red, respectively.

**Supplementary information:**



**Figure 1S.** Fungal isolates with the greatest XI. (a) Isolate 63; (b) isolate 64; (c) isolate 71; (d) isolate 20 (*Phomopsis viticola* 5480); (e) isolate 72; (f) isolate 75; (g) isolate 58; (h) isolate 5 (*Alternaria* sp.); (i) isolate 29, (*Fusarium solani* Ch8p4-1).



**Figure 2S.** Amplified products from PCR. M molecular size marker, numbers indicate the DNA sample of fungal isolate, Ctrl is load control.

## DISCUSIÓN GENERAL

En el reino Fungi se encuentran nichos diversos y entre los grupos de eucariotas más abundantes sobre la biósfera terrestre. Sin embargo, un gran número de especies fúngicas faltan por estudiar. En esta gran biodiversidad fúngica se acumula un gran potencial biotecnológico por explorar. Los hongos tienen amplio uso en el sector farmacéutico, agrícola y biotecnológico, son reconocidos por ser excelentes productores de enzimas extracelulares (Gherbawy y Voigt, 2011). Debido a esta cualidad son utilizados industrialmente para la producción de cocteles enzimáticos de pectinasas, celulasas, lacasas, quitinasas, proteasas y xilanasas.

Actualmente, las xilanasas son utilizadas en el manejo de residuos lignocelulósicos para transformar la xilana a combustibles renovables y productos químicos, en las industrias de alimentos, agro-fibras, papel y pulpa de celulosa, donde estas enzimas contribuyen a reducir el impacto ambiental de dichos procesos. Los oligosacáridos producidos por acción de las xilanasas son utilizados como aditivos funcionales de los alimentos o como edulcorantes alternativos con propiedades benéficas (Motta *et al.*, 2013). Sin embargo, el costo de producción de las xilanasas es elevado, por lo que un esfuerzo significativo en investigación se requiere para reducir dicho costo y hacer rentables económicamente a los procesos de transformación de los materiales lignocelulósicos.

La búsqueda de hongos filamentosos con enzimas xilanolíticas estables y activas es fundamental, por lo que la primera fase de nuestra investigación consistió en un escrutinio de ciento tres aislados fúngicos, obtenidos de distintas regiones de México, con actividad xilanolítica interesante. Varios grupos de hongos se obtuvieron en función del crecimiento en medio sólido, índice xilanolítico y actividad xilanolítica y celulolítica. Un grupo de hongos destacó por su habilidad para producir actividad xilanolítica en medio sólido y líquido, los cuales fueron seleccionados para los estudios posteriores. Sin embargo, en el resto de los grupos de hongos filamentosos se encierra conocimiento aún sin descubrir. Es el caso de aquellos aislados fúngicos con índices xilanolíticos grandes pero con poca actividad xilanolítica en medio líquido. Un tema por abordar es descubrir la causa del gran índice xilanolítico producido por estos hongos, conocer si las enzimas xilanolíticas tienen gran capacidad de difusión, alta actividad catalítica o si

son secretadas en grandes cantidades. Estudios de mejoramiento de la actividad xilanolítica por fermentación en estado sólido, mediante el uso de diferentes materiales ricos en hemicelulosas, son una alternativa para descubrir el potencial biotecnológico de estos aislados fúngicos.

En esta fase de exploración, aislados fúngicos con capacidad de producir xilanasas extracelulares sin actividad celulolítica se identificaron, lo que representa una ventaja para el uso de sus extractos enzimáticos en el tratamiento de materiales lignocelulósicos para la recuperación de fibras de celulosa y su reciclaje. Además, dos hongos filamentosos se distinguieron del resto de los aislados fúngicos por exhibir gran actividad xilanolítica acompañada de actividad celulolítica significativa. Esta actividad enzimática dual puede aprovecharse para alcanzar una conversión eficiente de los polisacáridos presentes en la biomasa lignocelulósica a monosacáridos fermentables para la producción de bioetanol u otros productos de interés comercial. La cuestión es conocer la identidad de ambos aislados fúngicos y saber si su capacidad de producción enzimática se mantiene o aumenta al utilizar diversos materiales lignocelulósicos complejos en diferentes condiciones fermentativas.

La posibilidad de la existencia de aislados fúngicos, en estos grupos caracterizados, que sean excelentes productores de xilanasas u otras enzimas líticas, permanece desconocida.

Los hongos filamentosos son particularmente interesantes debido a su fácil cultivo y su importante producción de enzimas extracelulares con gran potencial industrial. Sin embargo, la optimización de las condiciones de cultivo puede mejorar la viabilidad económica de los procesos fermentativos para la producción de xilanasas. Es por ello que la segunda fase de nuestra investigación consistió en estudiar factores de fermentación con efecto en la actividad holocelulolítica de *Fusarium solani*, un aislado fúngico seleccionado por su capacidad de producción de enzimas xilanolíticas, y compararlo con *Aspergillus* sp., considerado un estándar de oro en la producción de enzimas líticas. Además de las variables estudiadas, la búsqueda de inductores de la actividad xilanolítica, tales como monosacáridos u otras sustancias químicas, es una alternativa para mejorar la producción de xilanasas por *F. solani*.

Estudios de regulación de la expresión de genes implicados en la síntesis de xilanasas son de gran utilidad para analizar el nivel de participación de las enzimas principales y enzimas accesorias del complejo xilanolítico y también para aumentar la producción de estas enzimas por *F. solani*. El uso de inductores y otras sustancias contribuirá en la comprensión de los mecanismos de regulación que este hongo utiliza para degradar los materiales lignocelulósicos.

Los surfactantes, como el Tween 80, tienen un efecto estimulante en la producción y liberación de enzimas como celulasas, fitasas, amilasas y lignasas, en cultivo sumergido o fermentación en medio sólido (Liu *et al.*, 2011). Estudiar el efecto de estas sustancias en la producción de xilanasas por *F. solani* es un tema interesante, para evaluar si la actividad enzimática aumenta.

Otra manera de aumentar la actividad xilanolítica de *F. solani* es con el escalamiento del proceso fermentativo y con un mayor control de variables, como la humedad y el área de contacto en el caso de SSF, o la agitación, aireación y pH para SbmF.

El costo de la fuente de carbono tiene una fuerte influencia en la economía de los procesos de producción de xilanasas, por lo que los subproductos agrícolas hemicelulósicos, tales como el rastrojo y el olote de maíz son materiales abundantes en nuestro país y representan una oportunidad para obtener productos de valor agregado, como el etanol, la proteína celular y las

enzimas industriales. El uso de sustratos alternativos puede contribuir en la reducción de costos de producción de las xilanasas fúngicas y además abatir los problemas de contaminación causados por estos residuos. Otras fuentes de biomasa lignocelulósica ricas en hemicelulosas que se pueden considerar como sustratos para la producción de xilanasas son la paja y el salvado de trigo, paja de arroz, bagazo de caña y bagazo de agave.

Las enzimas accesorias o desramificadoras de los complejos xilanolíticos de hongos tienen una función importante en la despolimerización eficiente de las hemicelulosas, aunque se producen en menor cantidad comparadas con xilanasas y  $\beta$ -xilosidasas. Una manera de inducir la síntesis de estas enzimas accesorias es mediante el uso de materiales lignocelulósicos complejos como sustratos de las fermentaciones.

Un aspecto interesante por revelar es si la actividad xilanolítica mostrada por *F. solani* en los diferentes tratamientos se debe a la actividad sinérgica de las xilanasas con diversos tipos de enzimas desramificadoras implicadas en su complejo xilanolítico o si se debe exclusivamente a las xilanasas principales sintetizadas en cantidades significativas. Estudios de cuantificación de la actividad de enzimas auxiliares y el análisis de su nivel de cooperación en la hidrólisis de los materiales lignocelulósicos son una perspectiva por abordar en futuras investigaciones.

En esta fase de optimización, la producción simultánea de xilanasas y celulasas por *F. solani* se observó en algunos tratamientos. La obtención y aplicación de preparaciones enzimáticas con actividad xilanolítica y celulolítica para la sacarificación de polisacáridos a partir de la biomasa lignocelulósica resultaría en una conversión más eficiente de estas fuentes de carbono y en un mayor aprovechamiento de la energía contenida en estas fuentes renovables. Qing y Wyman (2011) observaron que celulasas comerciales fueron inhibidas por xilana y xilo-oligómeros. Al suplementar esta preparación enzimática comercial con xilanasas y  $\beta$ -xilosidasas mejoraron la conversión de la celulosa y hemicelulosas de biomasa pretratada, ya que el efecto inhibitorio fue menor con xilosa. La obtención de diferentes mezclas enzimáticas para encontrar la proporción adecuada de enzimas que catalicen la hidrólisis eficiente de los polímeros de la lignocelulosa es un punto que se debe tener en cuenta para el desarrollo de tecnologías atractivas en el procesamiento de estos materiales.

*F. solani* no produjo la actividad holocelulolítica esperada al verificar experimentalmente las condiciones óptimas teóricas, cuando rastrojo y olote de maíz se utilizaron como fuentes de carbono, por lo que se propone explorar condiciones cercanas a las establecidas en los mejores tratamientos experimentales.

El tamaño de partícula de los sustratos es una variable que podría tener influencia en el crecimiento fúngico y en la producción y secreción de enzimas xilanolíticas. En esta fase de nuestra investigación, un solo tamaño de partícula se estudió. El uso de sustratos con menor tamaño de partícula puede favorecer el acceso a los nutrientes aunque con tamaños de partícula excesivamente pequeños podría ocurrir una aglomeración entre las partículas (Zamudio-Jaramillo *et al.*, 2014), fenómeno que dificultaría la transferencia de masa durante la fermentación. Otros métodos de pretratamiento físico o químico de estos materiales, como la exposición a altas temperaturas o el tratamiento con ácidos fuertes, se proponen como alternativas para ocasionar el hinchamiento de las fibras de los polisacáridos y facilitar su degradación por el hongo.

En el proceso de optimización para la producción de holocelulasas se observó que *F. solani* es deficiente en la producción de  $\beta$ -xilosidasas. Una opción para compensar esta deficiencia es mezclar las preparaciones enzimáticas de *F. solani* con cocteles enriquecidos en actividad de  $\beta$ -xilosidasas de otros organismos. Otra alternativa es la manipulación genética de este organismo para sobre-expresar genes que codifican para  $\beta$ -xilosidasas de forma homóloga o heteróloga. La levadura metilotrófica *Pichia pastoris* es una de las herramientas estándar utilizadas en biología molecular y tiene un gran potencial en fermentaciones a gran escala como medio de producción de proteínas recombinantes (Cregg *et al.*, 2000).

*F. solani* es un hongo filamentoso ubicuo, principalmente distribuido en suelo como saprobio o asociado a las plantas, en cultivos agrícolas y campos forestales como agente fitopatógeno.

Como fitopatógenos de plantas, las especies de *Fusarium*, en principio dirigen su ataque hacia la pared celular de las plantas al producir enzimas clave asociadas a su hidrólisis (Bakri *et al.*, 2012), entre las que destacan las xilanasas. A estas enzimas se les relaciona con las fases iniciales de patogénesis y es posible que debido a ello *F. solani* secreta al medio xilanasas con actividad significativa (King *et al.*, 2011).

Las xilanasas son enzimas importantes en la industria, ya que tienen diversas aplicaciones. Por lo anterior, es crucial adquirir conocimiento acerca de su estructura y función.

A partir de un extracto enzimático de *F. solani* obtenido por fermentación de la xilana de madera de haya en SSF, una señal electroforética principal con actividad xilanolítica se identificó, con un peso molecular aparente de 19 kD. Sin embargo, en el complejo xilanolítico de algunos hongos está presente más de una enzima (isoenzimas) con actividad xilanolítica (Saraswat y Bisaria, 2000).

En la tercera fase de esta investigación, xilanasas extracelulares del complejo xilanolítico de *F. solani* se enriquecieron y caracterizaron, para conocer más acerca de la constitución y función de su maquinaria catalítica. *F. solani*, al igual que otros hongos filamentosos, posee en su complejo xilanolítico más de una xilanasas extracelular, ya que en todas las fracciones obtenidas por precipitación con sulfato de amonio se detectó actividad xilanolítica. Las fracciones del 25 y 30 % de saturación se seleccionaron por su significativa actividad xilanolítica y se juntaron para re-fraccionar y enriquecer aún más estas muestras. Sin embargo, en las fracciones del 60-90 % de saturación están presentes enzimas xilanolíticas con gran actividad, que todavía no se caracterizan. Un enriquecimiento adicional de estas fracciones mediante varios pasos de purificación es necesario para caracterizar las demás enzimas del complejo xilanolítico.

A partir de la ultrafiltración se obtuvieron tres fracciones con proteínas de distintos pesos moleculares. En esta investigación se seleccionó la fracción de 10-50 kD, aunque en la mayoría de los extractos ultrafiltrados se detectó actividad xilanolítica en la fracción mayor a 50 kD, y en algunos casos también se recuperó actividad enzimática en la fracción menor a 10 kD. Estos resultados refuerzan la hipótesis sobre la multiplicidad de enzimas xilanolíticas en *F. solani* y conducen a la formulación de nuevas preguntas científicas y al origen de nuevas vías de investigación para elucidar la identidad de los demás constituyentes de su complejo enzimático. Para su caracterización, también estas fracciones de ultrafiltración deben enriquecerse mediante varios pasos de purificación.

Numerosos reportes existen acerca de xilanasas fúngicas purificadas, con pesos moleculares pequeños. Sin embargo, es poco frecuente encontrar enzimas con pesos moleculares cercanos a 10 kD o inferiores (e Silva *et al.*, 1999). Un tema interesante sería estudiar estas fracciones, ya que enzimas con bajo peso molecular tienen la capacidad de difundirse con mayor facilidad a través de los poros de los materiales lignocelulósicos, romper enlaces en regiones inaccesibles y así desestabilizar la gran red de polisacáridos de la pared celular, lo que podría representar una ventaja y reducir la intensidad del pretratamiento de los materiales lignocelulósicos por métodos químicos o físicos. Estrategias adecuadas de purificación deben plantearse para no comprometer el rendimiento y recuperar de manera eficiente estas pequeñas enzimas para su estudio posterior, como el enfoque isoelectrico, la cromatografía de afinidad o de intercambio iónico.

Una xilanasa enriquecida se obtuvo, a partir de los extractos enzimáticos de *F. solani*, acompañada de proteínas contaminantes que, con algunos pasos de purificación adicionales, puede recuperarse a homogeneidad para completar la caracterización bioquímica. Los pasos siguientes de purificación deben consistir en estrategias específicas para la eliminación de contaminantes sin perder actividad enzimática, como la cromatografía de afinidad o de filtración en gel con resinas de alta resolución, seguido de electroforesis en dos dimensiones, técnica que permitiría resolver aún más las proteínas de interés.

Es posible que la xilanasa enriquecida en esta fase de la investigación sea diferente a la xilanasa encontrada en el extracto crudo de la SSF antes del enriquecimiento, ya que en base al zimograma revelado, una señal electroforética con actividad xilanolítica se identificó, con un peso molecular aparente de 20.8 kD.

Esta enzima enriquecida es activa a pH y temperatura moderados, es muy estable a 40 °C y es específica hacia la xilana, pues carece de actividad celulólitica. Debido a estas características, el uso potencial de esta xilanasa es en la recuperación de fibras de celulosa en procesos donde las condiciones de operación sean moderadas.

Con la purificación de la xilanasa se obtendrán parámetros cinéticos de la enzima y valores específicos de pH y temperatura óptimos, así como un efecto más claro de los iones metálicos y otras sustancias efectoras.

La purificación de la xilanasa enriquecida será un paso hacia el descubrimiento de la estructura tridimensional de la proteína mediante cristalografía de rayos X y la secuencia de aminoácidos para su clasificación en las familias de las glicosido hidrolasas, y así saber si mediante esta información si se puede establecer una relación evolutiva con otros microorganismos. Además, estas características proporcionan un fuerte estímulo para investigaciones adicionales acerca de la estructura de la xilanasa purificada y lograr aumentar su actividad y estabilidad en diferentes condiciones operacionales, mediante modificaciones por sustitución, adición o delección de los aminoácidos de la cadena polipeptídica, alteración de los sitios de glicosilación o inmovilización en soportes adecuados.

Un aspecto importante es elucidar si la actividad enzimática observada en *F. solani* se debe a la gran eficiencia catalítica de las xilanasas o si corresponde a la gran cantidad de enzimas xilanolíticas que el hongo secreta al medio. Esta cuestión se resolverá al tener la enzima purificada, calcular sus parámetros cinéticos específicos y comparar con la actividad enzimática específica en los extractos crudos.

## CONCLUSIONES GENERALES

- ❖ En la diversidad fúngica existen especies con potencial biotecnológico, puestas en perspectiva mediante un estudio biodirigido para la producción de preparaciones xilanolíticas extracelulares con mínima actividad celulolítica, tal como, el hongo filamentoso *Fusarium solani*.
- ❖ Los extractos xilanolíticos extracelulares de *F. solani* potencialmente pueden utilizarse como cocteles enzimáticos eficientes en la hidrólisis de sustratos económicos tales como el rastrojo y olote de maíz en la producción de xilosa y otros subproductos.
- ❖ Una xilanasa principal del complejo xilanolítico extracelular de *F. solani* es promisoría para su aplicación en la recuperación fibras de celulosa o en la industria alimentaria, debido a que es específica para degradar xilanas en moderadas condiciones de reacción.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS GENERALES

1. Assamoi, A. A., Delvigne, F., Aldric, J-M, Destain, J. y Thonart, P. 2008. Improvement of xylanase production by *Penicillium canescens* 10-10c in solid-state fermentation. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 12: 111-118.
2. Beg, Q. K., Kapoor, M., Mahajan, L. y Hoondal, G. S. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56: 326-338.
3. Beliën, T., Campenhout, S. V., Robben, J. y Volckaert, G. 2006. Microbial Endoxylanases: Effective Weapons to Breach the Plant Cell-Wall Barrier or, Rather, Triggers of Plant Defense Systems? *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19: 1072-1081.
4. Bhosale, S. H., Rao, M. B. y Deshpande V. V. 1996. Molecular and Industrial Aspects of Glucose Isomerase. *Microbiological Reviews*, 60: 280-300.
5. Biely, P., Vršanská, M., Tenkanen, M. y Kluepfel, D. 1997. Endo- $\beta$ -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *Journal of Biotechnology*, 57: 151-166.
6. Bokhari, S. A. I., Farooq, L. y Rajoka, M. I. 2009. Purification and characterization of xylanases from *Thermomyces lanuginosus* and its mutant derivative possessing novel kinetic and thermodynamic properties. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 25: 493-502.
7. Brutus, A., Reça, I. B., Herga, S., Mattei, B., Puigserver, A., Chaix, J-C, Juge, N., Bellincampi, D. y Giardina, T. 2005. A family 11 xylanase from the pathogen *Botrytis cinerea* is inhibited by plant endoxylanase inhibitors XIP-I and TAXI-I. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337: 160-166.
8. Chaiyaso, T., Kuntiya, A., Techapun, C., Leksawasdi, N., Seesuriyachan, P. y Hanmoungjai, P. 2011. Optimization of Cellulase-Free Xylanase Production by Thermophilic *Streptomyces thermovulgaris* TISTR1948 through Plackett-Burman and Response Surface Methodological Approaches. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75: 531-537.
9. Chidi, S. B., Godana, B., Ncube, I., Van Rensburg, E. J., Cronshaw, A. y Abotsi, E. K. 2008. Production, purification and characterization of cellulase-free xylanase from *Aspergillus terreus* UL 4209. *African Journal of Biotechnology*, 7: 3939-3948.
10. Chintong, S., Tachaapaikoon, C., Pason, P., Kyu, K. L., Kosugi, A., Mori, Y. y Ratanakhanokchai, K. 2011. Isolation and Characterization of Endocellulase-Free Multienzyme Complex from Newly Isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* Strain NOI-1. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21: 284-292.
11. Chong, S. L., Battaglia, E., Coutinho, P. M., Henrissat, B., Tenkanen, M. y de Vries, R. P. 2011. The  $\alpha$ -glucuronidase Agu1 from *Schizophyllum commune* is a member of a novel glycoside hydrolase family (GH115). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90: 1323-1332.

12. Collins, T., Gerday, C. y Feller, G. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 3–23.
13. Comlekcioglu, U., Ozkose, E., Tutus, A., Akyol, I. y Ekinci, M. S. 2010. Cloning and characterization of cellulase and xylanase coding genes from anaerobic fungus *Neocallimastix* sp. GMLF1. *International Journal of Agriculture and Biology*, 12: 691–696.
14. Cosgrove, D. J. 1997. Cellular mechanisms underlying growth asymmetry during stem gravitropism. *Planta*, 203: S130-S135.
15. Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J. y Higgins. D. R. 2000. Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 16: 23-52.
16. de Vries, R. P. 1999. Accessory enzymes from *Aspergillus* involved in xylan and pectin degradation. Thesis Landbouwniversiteit Wageningen, ISBN 90-5808-108-7: 149-160.
17. Degefu, Y., Fagerström, R. y Kalkkinen, N. 1995. Purification and partial characterization of xylanase from the fungal maize pathogen *Helminthosporium turcicum* (Pass). *European Journal of Plant Pathology*, 101: 291-299.
18. Degefu, Y., Paulin, L. y Lübeck, P. S. 2001. Cloning, sequencing and expression of a xylanase gene from the maize pathogen *Helminthosporium turcicum*. *European Journal of Plant Pathology*, 107: 457–465.
19. Deshpande, V. y Rao, M. 2006. Enzyme Technology, Chapter 12: Glucose Isomerase. Editors: Ashok Pandey, Colin Webb, Carlos Ricardo Soccol, Christian Larroche. Springer, 239-244.
20. e Silva, C. H. C. Puls, J., de Sousa, M. V., Filho, E. X. F. 1999. Purification and characterization of a low molecular weight xylanase from solid-state cultures of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Revista de Microbiologia*, 30: 114-119.
21. Faulet, B. M., Niamké, S., Gonnety, J. T. Y Kouamé, L. P. 2006. Purification and biochemical properties of a new thermostable xylanase from symbiotic fungus, *Termitomyces* sp. *African Journal of Biotechnology*, 5: 273-282.
22. Fawzi, E. M. 2011. Highly thermostable xylanase purified from *Rhizomucor miehei* NRL 3169. *Acta Biologica Hungarica*, 62: 85-94.
23. García, G. M., Quintero, R. R. y López-Munguía, C. A. 2004. Biotecnología Alimentaria. Editorial LIMUSA, Noriega Editores, 111-112.
24. Garg, G., Mahajan, R., Kaur A. y Sharma, J. 2011. Xylanase production using agro-residue in solid-state fermentation from *Bacillus pumilus* ASH for biodelignification of wheat straw pulp. *Biodegradation*, 22: 1143-1154.
25. Gherbawy, Y. y Voigt, K. 2011. Molecular Identification of Fungi. ISBN 978-3-642-05041-1, DOI 10.1007/978-3-642-05042-8.
26. Gupta, S., Bhushan, B., Hoondal, G. S. y Kuhad, R. C. 2001. Improved xylanase production from a haloalkalophilic *Staphylococcus* sp SG-13 using inexpensive agricultural residues. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 17: 5-8.
27. Hernández, A., López, J. C., Arenas, M., Santamaría, R., Díaz, M., Fernández-Abalos, J. M., Copa-Patiño, J. L., Soliveri, J. 2008. Xylan-binding xylanase Xyl30 from *Streptomyces avermitilis*: cloning, characterization, and overproduction in solid-state fermentation. *International Microbiology*, 11: 133-141.
28. Hespell, R. B. y Whitehead, T. R. 1990. Physiology and Genetics of Xylan Degradation by Gastrointestinal Tract Bacteria. *Journal of Dairy Science*, 73: 3013-3022.
29. Howard, R.L., Abotsi, E., Jansen van Rensburg, E.L. y Howard, S. 2003. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, 2: 602-619.
30. Hung, K. S., Liu, S. M., Fang, T. Y., Tzou, W. S., Lin, F. P., Sun, K. H. y Tang, S. J. 2011. Characterization of a salt-tolerant xylanase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* NTOU1. *Biotechnology Letters*, 33: 1441-1447.

31. Inmaculada, J., de la Rosa, O., Navas-Cortés, J. A., Jiménez-Díaz, R. M. y Tena, M. 2005. Extracellular xylanases from two pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris: enzyme production in culture and purification and characterization of a major isoform as an alkaline endo- $\beta$ -(1,4)-xylanase of low molecular weight. *Antonie van Leeuwenhoek*, 88: 49–59.
32. Jeffries, T. W. y Jin, Y-S. 2000. Ethanol and Thermotolerance in the Bioconversion of Xylose by Yeasts. *Advances in Applied Microbiology*, 47:221-268.
33. Kimura, T., Suzuki, H., Furuhashi, H., Aburatani, T., Morimoto, K., Karita, S., Sakka, K. y Ohmiya, K. 2000. Molecular cloning, overexpression, and purification of a major xylanase from *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64: 2734-2738.
34. King, B. C., Waxman, K. D., Nenni, N. V., Walker, L. P., Bergstrom, G. C., Gibson, D. M. 2011. Arsenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi. *Biotechnology for Biofuels*, 4:4. doi: 10.1186/1754-6834-4-4.
35. Kirk, T. K. y Cullen, D. 1998. *Enzymology and Molecular Genetics of Wood Degradation by White-Rot Fungi*. Capítulo 9. *Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry*, edited by Raymond A. Young and Masood Akhtar ISBN 0-471-15770-8 © John Wiley & Sons, Inc.
36. Krause, D. O., Denman, S. E., Mackie, R. I., Morrison, M., Rae, A. L., Attwood, G. T., McSweeney, C. S. 2003. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiology Reviews*, 27: 663-693.
37. Lafond, M., Tauzin, A., Desseaux, V., Bonnin, E., Ajandouz, E. H. y Giardina, T. 2011. GH10 xylanase D from *Penicillium funiculosum*: biochemical studies and xylooligosaccharide production. *Microbial Cell Factories*, 10:20. doi:10.1186/1475-2859-10-20.
38. Le, Y., Peng, J., Wu, H., Sun, J., Shao, W. 2011. An Approach to the Production of Soluble Protein from a Fungal Gene Encoding an Aggregation-Prone Xylanase in *Escherichia coli*. *PLoS One*, 6: e18489.
39. Lee, D. S., Wi, S. G., Lee, Y. G., Cho, E. J., Chung, B. Y. y Bae, H. J. 2011. Characterization of a New  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase from *Penicillium* sp. LYG 0704, and their Application in Lignocelluloses Degradation. *Molecular Biotechnology*, 49: 229-239.
40. Lee, J-W, Park, J-Y, Kwon, M. y Choi, I-G. 2009. Purification and characterization of a thermostable xylanase from the brown-rot fungus *Laetiporus sulphureus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107: 33-37.
41. Li, X. T., Jiang, Z. Q., Li, L. T., Yang, S. Q., Feng, W. Y., Fan, J. Y. y Kusakabe, I. 2005. Characterization of a cellulase-free, neutral xylanase from *Thermomyces lanuginosus* CBS 288.54 and its biobleaching effect on wheat straw pulp. *Bioresource Technology*, 96: 1370–1379.
42. Liu, J., Shi, J., Li, J. y Yuan, X. 2011. Effects of surfactants Tween 80 and rhamnolipid on the extracellular enzymes amylase, protease, CMCase and xylanase of one strain. *International Conference on Computer Distributed Control and Intelligent Environmental Monitoring*. IEEE. DOI 10.1109/CDCIEM.2011.481.
43. Liu, J.-R., Duan, C.-H., Zhao, X., Tzen, J. T. C., Cheng, K.-J. y Pai, C.-K. 2008. Cloning of a rumen fungal xylanase gene and purification of the recombinant enzyme via artificial oil bodies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79: 225–233.
44. Liu, W., Shi, P., Chen, Q., Yang, P., Wang, G., Wang, Y., Luo, H., Yao, B. 2010. Gene Cloning, Overexpression, and Characterization of a Xylanase from *Penicillium* sp. CGMCC 1669. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162: 1–12.
45. London South Bank University, Faculty of Engineering, Science and the Built Environment. Source of Enzymes. This page was last updated by Martin Chaplin on 20 December, 2004.

46. Lowe, S. E., Theodorou, M. K., y Trinci, A. P. J. 1987a. Growth and Fermentation of an Anaerobic Rumen Fungus on Various Carbon Sources and Effect of Temperature on Development. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 1210-1215.
47. Lowe, S. E., Theodorou, M. K. y Trinci, A. P. J. 1987b. Cellulases and Xylanase of an Anaerobic Rumen Fungus Grown on Wheat Straw, Wheat Straw Holocellulose, Cellulose, and Xylan. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 1216-1223.
48. Lucena-Neto, S. de A. y Ferreira-Filho, E. X. 2004. Purification and characterization of a new xylanase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35: 86-90.
49. Maalej, I., Belhaj, I., Masmoudi, N.F., Belghith, H. 2009. Highly thermostable xylanase of the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*: purification and characterization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 158: 200-212.
50. Mellon, J.E., Cotty, P.J., Callicott, K.A., Abbas, H. 2011. Identification of a Major Xylanase from *Aspergillus flavus* as a 14-kD Protein. *Mycopathologia*, 172: 299-305.
51. Mi, K., Jaeyong, S., Jong, H. K., Hong-Seog, P. y Jongsoo, C. 2009. Analysis of Functional Genes in Carbohydrate Metabolic Pathway of Anaerobic Rumen Fungus *Neocallimastix frontalis* PMA02. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 22: 1555-1565.
52. Milagres, A. M. F., Magalhães, P. O., Ferraz, A. 2005. Purification and properties of a xylanase from *Ceriporiopsis subvermisporea* cultivated on *Pinus taeda*. *FEMS Microbiology Letters*, 253: 267-272.
53. Min, Young, S., Kim, B. G., Lee, C., Hur, H.-G. y Ahn, J.-H. 2002. Purification, Characterization, and cDNA Cloning of Xylanase from Fungus *Trichoderma* strain SY. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12: 890-894.
54. Montes, H. M. C. y Magaña, P. I. 2002. Enzimas con aplicación industrial. *Avance y Perspectiva*, 21: 279-282.
55. Motta, F. L., Andrade C. C. P. y Santana M. H. A. 2013. A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications. In *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization*. Chapter 10, 251-275. <http://dx.doi.org/10.5772/53544>.
56. Mountfort, D. O. y Asher, R. A. 1989. Production of Xylanase by the Ruminant Anaerobic Fungus *Neocallimastix frontalis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 1016-1022.
57. Nghiem, N. P., Montanti, J., Johnston, D. B., Drapcho, C. 2011. Fractionation of Corn Fiber Treated by Soaking in Aqueous Ammonia (SAA) for Isolation of Hemicellulose B and Production of C5 Sugars by Enzyme Hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164: 1390-404.
58. Nierstrasz, V. A. y Warmoeskerken, M. M. C. G. 2003. Capítulo 4. Process engineering and industrial enzyme applications. *Textile processing with enzymes*. Woodhead Publishing Limited-The Textile Institute. Editado por Cavaco-Paulo, A. y Gübitz, G. M., 121-122.
59. Pal, A., Ray L. y Chattopadhyay, P. 2006. Purification and immobilization of an *Aspergillus terreus* xylanase: Use of continuous fluidized bed column reactor. *Indian Journal of Biotechnology*, 5: 163-168.
60. Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A. y Amorim, D. S. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67: 577-591.
61. Qing, Q. y Wyman C. E. 2011. Supplementation with xylanase and  $\beta$ -xylosidase to reduce xylo-oligomer and xylan inhibition of enzymatic hydrolysis of cellulose and pretreated corn stover. *Biotechnology for Biofuels*, 4:18. doi: 10.1186/1754-6834-4-18.
62. Raghukumar, C., Muraleedharan, U., Gaud, V. R. y Mishra, R. 2004. Xylanases of marine fungi of potential use for biobleaching of paper pulp. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31: 433-441.

63. Ratanachomsri, U., Sriprang, R., Sornlek, W., Buaban, B., Champreda, V., Tanapongpipat, S. y Eurwilaichitr, L. 2006. Thermostable Xylanase from *Marasmius* sp.: Purification and Characterization. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 39: 105-110.
64. Riou, C. Freyssinet, G. y Fevre, M. 1991. Production of Cell Wall-Degrading Enzymes by the Phytopathogenic Fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 1478-1484.
65. Ruiz-Roldán, M. C., Di Pietro, A., Huertas-González, M. D. y Roncero, M. I. G. 1999. Two xylanase genes of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* are differentially expressed during infection of tomato plants. *Molecular Genetics and Genomics*, 261: 530-536.
66. Sae-Lee, R. y Boonmee, A. 2014. Newly derived GH43 gene from compost metagenome showing dual xylanase and cellulase activities. *Folia Microbiologica*, 59: 409-417.
67. Saha, B. C. y Demirjian, D. C. 2001. *Applied Biocatalysis in Specialty Chemicals and Pharmaceuticals*. ACS Symposium Series, American Chemical Society: Washington, DC.
68. Salama, M.A., K.M.I. Ismail, H.A. Amany, A. El-Lill and N.S.I. Geweely, 2008. Biochemical studies of purified extracellular xylanases from *Aspergillus versicolor*. *International Journal of Botany*, 4: 41-48.
69. Sandrim, V. C., Rizzatti, A. C. S., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., Milagres, A. M. F. y Polizeli, M. L. T. M. 2005. Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching. *Process Biochemistry*, 40: 1823-1828.
70. Sanghvi, G. V., Koyani, R. D. y Rajput, K. S. 2010. Thermostable xylanase production and partial purification by solid-state fermentation using agricultural waste wheat straw. *Mycology*, 1: 106-112.
71. Saraswat, V. y Bisaria, V. S. 2000. Purification, characterization and substrate specificities of xylanase isoenzymes from *Melanocarpus albomyces* IIS 68. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64: 1173-1180.
72. Saul, D. J., Williams, L. C., Reeves, R. A., Gibbs, M. D. y Bergquist, P. L. 1995. Sequence and Expression of a Xylanase Gene from the Hyperthermophile *Thermotoga* sp. Strain FjSS3-B.1 and Characterization of the Recombinant Enzyme and Its Activity on Kraft Pulp. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 4110-4113.
73. Shin, Keum, Jeya, M., Lee, J-K y Kim, Y-S. 2010. Purification and Characterization of a Thermostable Xylanase from *Fomitopsis pinicola*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20: 1415-1423.
74. Sistema de Información Arancelaria Vía Internet (SIAVI) de la Secretaria de Economía. 2009. ANEXO 8. Estadísticas de los Productos Biotecnológicos con presencia en México.
75. Solórzano, L. J. L., Bon, E. P. S., Ebole, S. M. de F. y Pereira, J. N. 2000. Thermal stability of xylanases produced by *Aspergillus awamori*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31: 206-211.
76. Tsai, C. T. y Huang, C-T. 2008. Overexpression of the *Neocallimastix frontalis* xylanase gene in the methylotrophic yeasts *Pichia pastoris* and *Pichia methanolica*. *Enzyme and Microbial Technology*, 42: 459-465.
77. Uffen, R. L. 1997. Xylan degradation: a glimpse at microbial diversity. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 19: 1-6.
78. Van Gool, M. P., Vancsó, I., Schols, H. A., Toth, K., Szakacs, G., Gruppen, H. 2011. Screening for distinct xylan degrading enzymes in complex shake flask fermentation supernatants. *Bioresource Technology*, 102: 6039-6047.
79. van Peij, N. N. M. E., Gielkens, M. M. C., de Vries, R. P., Visser, J. y de Graaff, L. H. 1998. The Transcriptional Activator XlnR Regulates Both Xylanolytic and Endoglucanase Gene Expression in *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3615-3619.

80. Wegener, S., Ransomt, R. F. y Walton, J. D. 1999. A unique eukaryotic  $\beta$ -xylosidase gene from the phytopathogenic fungus *Cochliobolus carbonurn*. *Microbiology*, 145: 1089-1095.
81. Widjaja, A., Lestari, E., Tanjung, A., Widiawan, Alfian y Ogino, H. 2009. Optimized production of xylanase from fungal strains and its purification strategies. *Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation*, 4: 219-232.
82. Wong, K. K. Y., Tan, L. U. L. y Saddler, J. N. 1988. Multiplicity of beta-1,4-xylanases in microorganisms: functions and applications. *Microbiology Reviews*, 52: 305-317.
83. Yang, Y., Zhang, W., Huang, J., Lin, L., Lian, H., Lu, Y., Wu, J. y Wang, S. 2010. Purification and characterization of an extracellular xylanase from *Aspergillus niger* C3486. *African Journal of Microbiology Research*, 4: 2249-2256.
84. Zamudio-Jaramillo, M. A., Castro Montoya, A. J., Maya-Yescas, R., Chavez Parga, M. C., Gonzalez Hernandez, J. C., Saucedo Luna, J. 2014. Optimization of particle size for hydrolysis of pine wood polysaccharides and its impact on milling energy. *International Journal of Renewable Energy Research*, 4: 338-348.