



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS



**“Caracterización bioquímica de una xilanasa de *Fusarium solani*
(kp137443)”**

TESIS

Presenta:

Q.F.B. ROCIO MEDINA MEDINA

Para obtener el grado de:
Maestría en Ciencias en
Biología Experimental

Asesor:

Mauro Manuel Martínez Pacheco

Doctor en Ciencias en Biología Experimental Especialidad en

Bioquímica

Morelia Michoacán, Noviembre del 2016

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Fisiología Celular del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, con la dirección de los Doctores en Ciencias Mauro Manuel Martínez Pacheco y Mariana Alvarez Navarrete, con el financiamiento económico de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Dedicatoria

Dedico este trabajo principalmente a dios, por haberme dado la vida y permitir haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

A mi hija, Paulina Huerta Medina, quien ha sido mi mayor motivación para nunca rendirme en los estudios y poder llegar a ser un ejemplo para ella.

A mi Esposo, Carlos Eduardo Huerta Santoyo, por caminar a mi lado y demostrarme su gran apoyo, paciencia, comprensión y amor.

A mi madre y padre, María Guadalupe Medina Mondragón y Cosme Medina Sotero, por haber establecido los cimientos de mi formación en la vida y el apoyo brindado.

A mis hermanas, Karina, Angelica, Adriana, Lupita, Alejandra y hermano José Alfredo, por su protección, amistad, enseñanza y cariño incondicionales.

Agradecimientos

Le agradezco a DIOS, por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por sus investigadores, que me brindaron la formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca económica otorgada.

Al D.C. Mauro Manuel Martínez Pacheco, por su dirección durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

Al D.C. Mariana Alvarez Navarrete por su co-dirección durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

A los sinodales, D.C. Jesús Campos García, D.C. Víctor Meza Carmen, D.C. Asdrubal Aguilera Méndez por sus valiosas aportaciones que contribuyeron en la conformación de este trabajo de tesis.

Al M.C. Alberto Flores García, por su apoyo técnico a lo largo de este trabajo de investigación y por su valiosa amistad.

A mi familia, Carlos, Paulina, Cosme, Guadalupe, Karina, Angélica, Adriana, Lupita, Alejandra, José, Memito, Erika, Alondra, Joselyn, Martha, Eduardo, Víctor, Lalo y Guadalupe.

A mis compañeros de laboratorio, Alejandra, Celeste, Dulce, Enrique, Jared, Lupita, Luz, Nayeli, Rosita, Roberto, por los agradables momentos que pasamos juntos este tiempo.

A mis compañeros de la maestría, Alondra, Laura, Sharel, Marisol, Dulce, Sarahi, Laura Nicolasa, Liz, Roxana, Cristián, Marco, Gustavo, Said y Vicente por el apoyo que me brindaron durante este tiempo.

ABREVIATURAS

AC	Actividad celulolítica
AX	Actividad xilanolítica
AXOS	Arabino-xilooligosacáridos
Asp	Asparagina
BSA	Albúmina sérica bovina
CBM	Módulo de unión carbohidrato
CMC	Carboximetilcelulosa
CAZy	Base de datos de las Enzimas Carbohidrato Active
CreA	Represor de transcripción
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DEAE	Dietilaminoetil-celulosa
E2D	Electroforesis bidimensional
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FG	Crecimiento en estado sólido
MeGlcA	Ácido 4-O-metil- α -D-glucopiranosil úronico
GHs	Glucósido hidrolasas
pI	Punto isoeléctrico
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodesil sulfato de sodio
ITS	Espaciadores transcritos internos

RESUMEN

La obtención de xilosa requiere el uso de un complejo xilanolítico que la hidroliza hasta xilosa, donde las xilanasas cumplen una función central. Estas enzimas son producidas por una gran diversidad de organismos, entre ellos están los hongos. Al respecto, en un trabajo previo, el hongo *Fusarium solani* se aisló de un cultivo de frijol y se seleccionó por su importante capacidad para producir xilanasas extracelulares. Por lo que en este trabajo, es de interés obtener un extracto enriquecido con actividad xilanolítica, en donde el enriquecimiento del extracto crudo enzimático y la determinación de las propiedades bioquímicas darán pauta para conocer si esta enzima presenta propiedades bioquímicas óptimas para su posible uso biotecnológico. El extracto enzimático se obtuvo por fermentaciones en medio sólido con xilana de madera de haya, Por ello, la xilanasa enriquecida es candidata para degradar xilanas en procesos que utilicen temperaturas máximas de 50 °C, pH de 7 y con débil fuerza iónica.

Palabras Clave: Xilanasas; purificación; *Fusarium solani*; actividad enzimática; aplicación industrial

ABSTRACT

The obtention xylose requires the use of a xilanólítico complex tho hydrolyze the xylan, where the xylanases play a central role. These enzymes are produced by a great diversity of organisms, among them are the fungi. In this regard, in a previous work, the fungus *Fusarium solani* (KP137443) was isolated from a bean culture and selected for its important ability to produce extracellular xylanases. Therefore, in this work, it is of interest to obtain an extract enriched with xylanolytic activity, where the enrichment of the crude enzymatic extract and the determination of the biochemical properties will guide to know if this enzyme presents optimal biochemical properties for its possible biotechnological use. Therefore, enriched xylanase is a candidate for degrading xylans in processes that use maximum temperatures of 50 °C, pH of 7 and with weak ionic strength.

KEYWORDS: Xylanase; purification; *Fusarium solani*; enzymatic activity; industrial application

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
Aplicación industrial de las xilanasas	2
Composición del material lignocelulósico	3
Enzimas clave en la hidrólisis de la xilana	5
Clasificación de las xilanasas	6
Mecanismo de hidrólisis del enlace glicosídico	7
Módulos de unión a carbohidratos	8
Producción de xilanasas fúngicas	9
Termoestabilidad de las xilanasas fúngicas	11
Estabilidad ácido-base de las xilanasas fúngicas	11
Microrganismos xilanolíticos	12
Detección de una xilanasas de F. solan	14
JUSTIFICACIÓN	16
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Actividad de endo-β-1,4-xilanasas	20
Actividad de endocelulasa	20
Cuantificación de proteína	21
ENRIQUECIMIENTO DEL EXTRACTO XILANOLÍTICO	23
Medio de mantenimiento y propagación	23
Preparación del inóculo	23
Producción de xilanasas extracelulares	23
Extracción de xilanasas extracelulares	24
.....	24
Enriquecimiento del extracto crudo por precipitación con sulfato de amonio	25
Diálisis	25
Separación por ultrafiltración	26
Cromatografía de intercambio aniónico	27

Cromatografía de intercambio catiónico	27
CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE UNA XILANASA DE <i>F. solani</i> (KP137443)	30
Efecto de la temperatura y el pH en la actividad xilanolítica.....	30
Efecto del pH en la estabilidad de la enzima	31
Efecto de la temperatura en la estabilidad enzimática.....	31
Efecto de iones metálicos y compuestos en la actividad enzimática.....	31
Especificidad por sustrato.....	31
Estimación de parámetros cinéticos aparentes: K_m y V_{max}	32
Análisis de los datos	32
DISCUSIÓN.....	33
BIBLIOGRAFÍA	36

INTRODUCCIÓN

La producción de xilanasas con propiedades fisicoquímicas que se ajusten a las condiciones prevaletientes en el proceso industrial es un reto científico y tecnológico persistente. Por ello, las xilanasas se someten a procesos de purificación para entender el proceso catalítico que llevan a cabo y sugerir su mejor uso industrial. En general, la purificación de una enzima es un procedimiento complejo, cuya metodología es única para cada proteína. El proceso total de purificación depende de tres aspectos, la naturaleza bioquímica, utilización de la enzima y la complejidad del proceso de purificación. El grado de pureza deseado para una enzima de interés depende del uso de la enzima. Por ejemplo, para estudiar la presencia de una molécula con cierta actividad catalítica o el efecto de los parámetros ambientales en la actividad de la enzima; con un extracto crudo enzimático es suficiente. Sin embargo, para estudios de la composición de aminoácidos, propiedades cinéticas y especificidad por un sustrato, la enzima debe ser lo más pura. Generalmente se inicia, a partir de grandes volúmenes de extracto crudo, lo conveniente es empezar con una técnica que permita manipular un volumen mínimo, que se obtiene a partir de la ultrafiltración, liofilización y precipitación, esta última técnica es la más utilizada. El siguiente paso de purificación es utilizar las técnicas cromatográficas y electroforéticas para enriquecer la enzima y su actividad específica, así como eliminar moléculas con propiedades fisicoquímicas similares. El último paso es la eliminación de contaminantes menores, con técnicas de separación como la cromatografía de afinidad y la electroforesis bidimensional (E2D). Las xilanasas hidrolizan xilana y son producidas por una gran diversidad de organismos tales como artrópodos, algas, bacterias hongos, protozoos, caracoles, insectos y semillas de plantas terrestres (Polizeli *et al.*, 2005). A nivel industrial los microorganismos productores de xilanasas más utilizados son las bacterias y los hongos filamentosos. Al respecto, en nuestro grupo de investigación el hongo *Fusarium solani* fue aislado de cultivos de frijol, se identificó molecularmente por medio de los ITS ribosomales y se seleccionó por su interesante capacidad para producir xilanasas extracelulares (Alvarez-Naverrete *et al.*, 2015). Por lo que es de interés enriquecer su xilanasas mayorita, en donde, el fraccionamiento del extracto crudo enzimático y la determinación de las propiedades bioquímicas enzimáticas dará pauta para conocer si esta enzima presenta propiedades bioquímicas óptimas para su posible uso en el procesamiento de la hemicelulosa.

Aplicación industrial de las xilanasas

En la actualidad, el empleo de técnicas amigables con el medio ambiente en los procesos de manufactura ha requerido del uso de enzimas que degraden la hemicelulosa presente en el material vegetal. Las xilanasas han atraído una atención debido a sus aplicaciones que presenta en la industria (Fig. 1), reemplaza el uso de compuestos químicos y se obtienen beneficios para el hombre. Por consiguiente, las xilanasas son una alternativa en la industria del papel ya que su uso, sustituye de 5-7 kg de dióxido de cloro por tonelada de pasta de papel, reduce el uso de sustancias cloradas que contribuyen a la contaminación del medio ambiente y no afecta la salud del personal ya que los compuestos resultantes no son tóxicos y mutagénicos (Howard *et al.*, 2003).

Cuadro 1.- Aplicaciones de las xilanasas en la industria tecnológica.

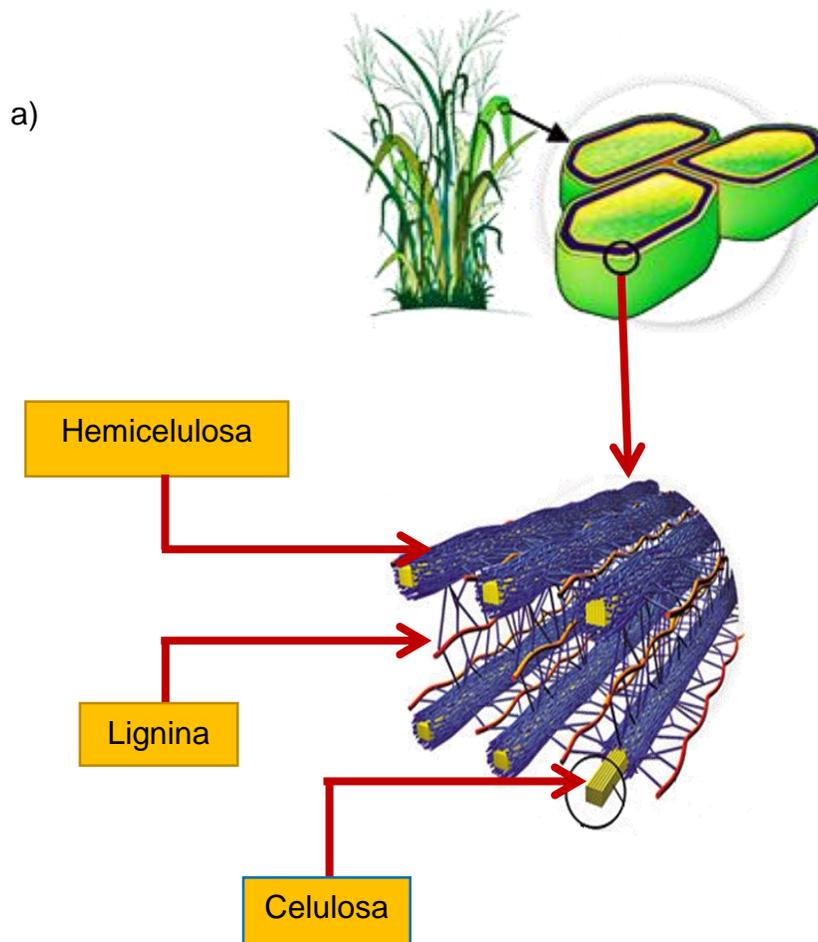
Industria	Aplicaciones	Referencia
Papel	Blanqueo de la pulpa de celulosa.	Howard <i>et al.</i> , 2003
Alimentaria	Hidrólisis de la hemicelulosa en la harina de trigo lo que ayuda una redistribución de agua, proporciona una masa más suave y fácil de amasar.	Beg <i>et al.</i> , 2001
	Clarificación y reducción de la viscosidad de jugos y vinos.	Ponce <i>et al.</i> , 2002 Polizeli <i>et al.</i> , 2005
	Licuefacción de mucilago de café; extracción de saborizantes, pigmentos, aceites de plantas y semilla.	
Alimentaria en animales	Mejoramiento del valor nutrimental en los alimentos	
Farmacéutica	Hidrólisis de la xilana para la obtención de residuos de β -D-xilopiranosil para la producción de xilitol.	
Química	Bioconversión de los materiales lignocelulósicos y tratamiento desechos agrícolas a productos fermentables para la producción de bioetanol.	BNDES, 2008

Las xilanasas en la industria alimentaria coadyuva a la obtención de productos de calidad para su consumo en el ser humano e.g. durante el proceso de panificación permite el crecimiento de la masa, aumento en el volumen del pan, mayor resistencia a la fermentación y una mayor cantidad de arabinosilo-oligosacáridos en el pan, beneficioso para la salud (Beg *et al.*, 2001). Hoy en día, los residuos lignocelulósicos son un problema que existe en México, se generan residuos por encima de los 25 millones de toneladas (SAGARPA, 2010). La conversión de los residuos lignocelulósicos a partir de enzimas, para la obtención de biocombustibles es uno de los principales retos.

Composición del material lignocelulósico

La lignocelulosa es el componente principal de la pared celular de las plantas una fuente renovable de carbono y abundante en la naturaleza. La biomasa de las plantas está compuesta por celulosa (40-50 %), hemicelulosa (25-35%) y lignina (15-20 %) (fig. 1 a). En teoría, el contenido de energía de la xilana y la celulosa en base a las estimaciones de la biomasa total en plantas equivalente a 640 mil millones de toneladas de biocombustibles generados. Los sustratos más utilizados son e.g. los residuos agroindustriales, provenientes del procesamiento de la caña de azúcar, el maíz y la madera (Gray *et al.*, 2006). La lignocelulosa está constituida, por celulosa, que es un polímero insoluble formado por residuos de glucosa unidos por enlaces glucosídicos β -1,4; la lignina, cuya estructura se basa en la polimerización de tres alcoholes fenilpropílicos aromáticos (alcoholes cumarílico, coniferílico y sinapílico). La hemicelulosa que incluye un amplio intervalo de polisacáridos no celulósicos, que se encuentran en varias proporciones, compuesto por unidades de monosacáridos, tales como D-xilosa, D-manosa, D-glucosa, L-arabinosa, D-galactosa, ácido glucurónico y ácido galacturónico (Lee *et al.*, 2011). El componente principal de la hemicelulosa es la xilana, el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa. La xilana es un polisacárido constituido por una cadena lineal de residuos de xilosa unidos por enlaces β -1,4 con diferentes niveles de polimerización que presenta diversas ramificaciones que inician con monosacáridos de ácido glucurónico, arabinosa y

ácido ferúlico (fig. 1 b) (Collins *et al.*, 2005). En la pared celular de las plantas, la lignina, celulosa y la hemicelulosa, interactúan a través de enlaces covalentes y no covalentes. La xilana se encuentra en la interfase entre la lignina y la colección de fibras de celulosa. Es importante para la cohesión de las fibras y la integridad de las paredes celulares de las plantas. La estructura química y las sustituciones de los grupos laterales de las xilanas, se encuentran intercalados, entrecruzados y ligados covalentemente en varios puntos con la gran cubierta de lignina y su interacción no covalente con las fibras de celulosa, 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 (Polizeli *et al.*, 2005).



b)

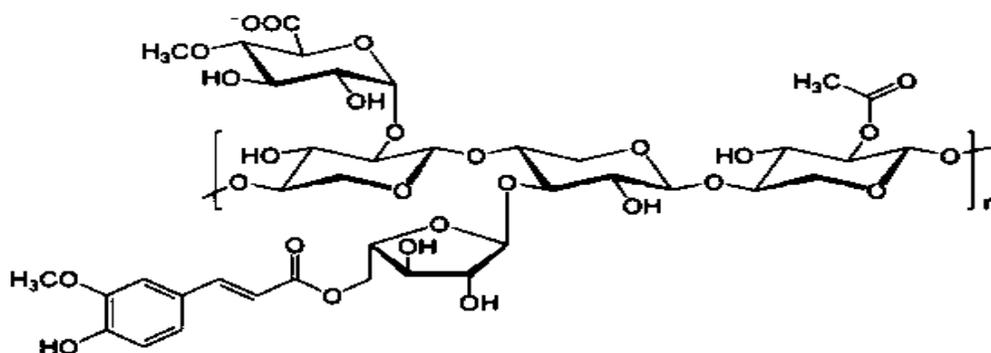


Figura 1.- Representación esquemática de la lignocelulosa. **A)** Composición de la lignocelulosa. **B)** Estructura química de la xilana, representa la columna de xilopiranosil unido por enlaces β -1,4-glicosídicos y ramificados por ácido glucurónico, arabinosa y ácido ferúlico.

Enzimas clave en la hidrólisis de la xilana

La xilana es químicamente compleja, debido a su composición heterogénea se requiere un grupo complejo de enzimas para hidrolizar y metabolizar este polisacárido. Las enzimas clave encargadas de llevar a cabo la hidrólisis de la xilana son las endo- β -1,4-xilanasas (EC 3.2.1.8), que actúan en la cadena principal del polímero e hidrolizan los enlaces glicosídicos internos que conlleva a la formación de una mezcla de xilooligosacáridos cortos y son hidrolizados por la acción de la exo- β -1,4-xilosidasa para producir xilosa. También, las enzimas auxiliares o desramificadoras hidrolizan los grupos laterales del polímero e.g. las enzimas hidroxinámico estereasas, α -L-arabinofuranosidasa, α -D-glucoronidasa y acetil xilana estereasa entre otras enzimas de acuerdo a los monosacáridos presentes en el polímero (Inmaculada *et al* 2005). Estas enzimas son producidas por una amplia variedad de organismos, como bacterias, hongos, algas, protozoos, crustáceos, caracoles, insectos y plantas terrestres (Polizeli *et al.*, 2005). Sin embargo, los hongos filamentosos producen enzimas extracelulares en cantidades mayores respecto a los demás microorganismos. Actualmente, las xilanasas, celulasas y pectinasas representan el 20 % del consumo en el mercado mundial de las enzimas (Polizeli *et al.*, 2005).

Clasificación de las xilanasas

Las xilanasas están incluidas en las glicósido hidrolasas que son un grupo de enzimas que hidrolizan el enlace glicosídico entre dos o más carbohidratos, o entre un hidrato de carbono y un compuesto. Las xilanasas son enzimas diversificadas a niveles estructurales, bioquímicos y catalíticos. Esta diversificación se origina por las redundancias genéticas, modificaciones postraduccionales a través de la escisión proteolítica, glicosilación, la presencia del péptido señal y proteólisis parcial, estrategia en respuesta adaptativa encontrada por los microorganismos para optimizar la biodegradación de los enlaces xilosídicos de las paredes celulares (Pollet *et al.*, 2010).

Inicialmente, las xilanasas se clasificaban en base a la especificidad por el sustrato. Sin embargo, ésta clasificación presentó algunas limitaciones, por tanto se introdujo una nueva clasificación basado en las propiedades físico-químicas, ya que se había descubierto una correlación entre el peso molecular y el punto isoeléctrico. Las xilanasas se dividieron en dos grupos: Un primer grupo de xilanasas de bajo peso molecular (menos de 30 kDa) y un punto isoeléctrico (*pI*) alcalino pertenece a la familia M, un segundo grupo de xilanasas de mayor peso molecular (más de 30 kD) y *pI* ácido corresponde a la familia G (Wong *et al.*, 1988). Ésta clasificación en realidad también mostró algunas limitaciones, especialmente nuevas xilanasas se descubrieron y no se podían atribuir a cualquiera de estos grupos. Un sistema de clasificación más completo de las glucósido hidrolasas (GHs), se ha desarrollado en base a la similitud de las secuencias de aminoácidos del módulo o dominio catalítico, las glucósido hidrolasas son clasificadas en diferentes familias. De modo que, ésta clasificación proporciona información de las propiedades estructurales, relaciones evolutivas y el mecanismo catalítico de la enzima. La base de datos CAZy (Carbohydrate Active Enzyme) ofrece una lista actualizada de la clasificación de las glucósido hidrolasas en diferentes familias 5, 8, 10, 11, 16, 26, 30 y 43. El pliegue de las proteínas es mejor conservado que sus secuencias, algunas de las familias pueden agruparse en clanes. Actualmente, 14 clanes o super familias diferentes existen (GH-A- a GH-N) de acuerdo a los criterios de conservación de pliegues de proteínas, maquinaria catalítica y mecanismo de hidrólisis del enlace O-glucosídico.

Las enzimas con actividad xilanolítica se encuentran en las familias 5, 8, 10, 11 y 43 contienen un dominio catalítico verdaderamente distinto con actividad endo-1,4- β -xilanasas. Las xilanasas que pertenecen a las familias GH7, GH16, GH43 y GH62 son enzimas bifuncionales (Cantarel *et al.*, 2008). En el cuadro 2 se representa las características específicas de la familia 5, 7, 8, 10, 11 y 43.

Cuadro 2.- Familias de las enzimas glucósido hidrolasa con actividad xilanolítica (Collins *et al.*, 2005).

Familia glucósido hidrolasa	Plegamiento	Clan	Mecanismo catalítico	Residuos ácido/base	Residuos nucleófilo/base
5	$(\beta/\alpha)_8$	GH-A	Retención	Glutamato	Glutamato
7	Barril beta	GH-B	Retención	Glutamato	Glutamato
8	$(\alpha/\alpha)_6$	GH-M	Inversión	Glutamato	Aspartato
10	$(\beta/\alpha)_8$	GH-A	Retención	Glutamato	Glutamato
11	<i>Barril beta</i>	GH-C	Retención	Glutamato	Glutamato
43	5- β -láminas- α -hélice	GH-F	Inversión	Glutamato	Aspartato

Mecanismo de hidrólisis del enlace glicosídico

La reacción de hidrólisis del enlace glicosídico catalizado por las distintas xilanasas está mediada por la acción de dos residuos catalíticos presentes en el sitio activo, uno de los cuales actúa como donador de protones y el otro como nucleófilo o base. La hidrólisis del enlace glicosídico se lleva a cabo de dos formas distintas, depende la configuración del carbono anomérico resultante de la hidrólisis. El primer mecanismo es que la configuración anomérica cambie, la reacción hidrolítica que se desarrolla se le designa como mecanismo de inversión. El segundo es que la configuración anomérica se mantenga, por lo que se denomina mecanismo de retención. Las enzimas que hidrolizan mediante el mecanismo de inversión, la distancia de separación de los dos carboxilos catalíticos es de aproximadamente 10 Å, mientras que en las enzimas que retienen la configuración del enlace, la separación es alrededor de 5 Å (Pollet *et al.*, 2010). Las familias GH10, GH11,

GH30 y GH5 son enzimas de retención, que actúan mediante el mecanismo de doble desplazamiento. En una primera fase (glicosilación), el residuo catalítico ácido/base funciona como un catalizador ácido general, que protona el oxígeno del enlace glicosídico. Mientras que, el segundo residuo catalítico realiza un ataque nucleófilo sobre el carbono anomérico del enlace, provoca la liberación de uno de los productos de reacción y la formación de un intermediario α -glicosilo-enzima. En el segundo paso (desglicosilación), el residuo ácido/base actúa como base, disocia un protón de una molécula de agua entrante. La molécula de agua activa ataca el carbono anomérico del intermediario α -glicosil-enzima y produce su hidrólisis y se obtiene la liberación de la enzima y un producto de reacción en el que el carbono anomérico vuelve a la configuración β , al igual que la del sustrato (Pollet *et al.*, 2010).

Por el contrario, las xilanasas de familia GH8 utilizan el mecanismo de inversión mediante una reacción de simple desplazamiento, en las que se obtiene un producto de configuración anomérica invertida respecto al sustrato. En este caso, los residuos catalíticos suelen ser un glutamato (Glu) y un aspartato (Asp), donde el primero actúa como catalizador ácido, protona el oxígeno del enlace glicosídico y el segundo como catalizador básico, produce la activación de una molécula de agua que ataca el carbono anomérico, produce la hidrólisis del enlace β -glicosídico y origina un producto de configuración α en el carbono anomérico (Pollet *et al.*, 2010).

Módulos de unión a carbohidratos

Las glicosidasas son proteínas modulares que contienen además del módulo catalítico, módulos de unión a carbohidratos (CBMs). A los CBMs se les atribuyen funciones tales como, las de incrementar la concentración de la enzima en la superficie del sustrato, causar disrupciones no hidrolíticas del sustrato, capaces de modificar la superficie del mismo y se localizan en el amino y/o carboxilo terminal conectados por péptidos de unión de longitud variable ricos en serina o treonina. Los CBMs se agrupan en familias en base a la similitud de la secuencia de aminoácidos, existen 39 familias definidas en los CBM, tienen la capacidad de reconocer a la celulosa cristalina, celulosa no cristalina, quitina, β -1,3-glucanas,

glucanas con enlaces β -1,3-1,4-mixtos, xilana, manana, galactana y almidón (Boraston *et al.*, 2004). En general, una correlación entre el ligando que es capaz de reconocer un CBM y el sustrato específico sobre el que actúa el dominio catalítico. La proximidad espacial y estructural de la celulosa y la xilana en la pared celular vegetal hace que la presencia de CBMs que unen celulosa o xilana facilite la actividad de la xilanasas sobre la xilana (Boraston *et al.*, 2004).

Producción de xilanasas fúngicas

Los medios de fermentación sumergido y en estado sólido son utilizados en la industria para la producción de xilanasas extracelulares. Sin embargo, el 80-90 % de las xilanasas se obtienen en medio de cultivo sumergido. En cultivos sólidos, los sustratos utilizados son: salvado de trigo, arroz, bagazo de caña, cáscara de arroz y pulpa de madera (Anthony *et al.*, 2003). En cultivo líquido, las xilanasas se obtienen en respuesta a diferentes fuentes de carbono, los residuos β -D-xilopiranosilo pueden actuar como inductores del complejo xilanólítico (Rizzatti *et al.*, 2004). Los microorganismos pueden dar lugar a un control discriminatorio, originándose una represión catabólica de endoxilanasas (Flores *et al.*, 1996). El β -metilo xilósido se utiliza como un inductor, análogo estructural no metabolizable de xilobiosa que se usa por ser de bajo costo. También, los compuestos sintéticos tienen la función de inducir el sistema xilanólítico e.g. 2-O- β -D-xilopiranosil-D-xilosa (Xyl β 1-2Xyl), 3-O- β -D-xilopiranosil D-xilosa (Xyl β 1-3Xyl) y 2-O- β -D-glucopiranosil D-xilosa (Glc β 1-2Xyl), (Hrmová *et al.*, 1991). La xilobiosa es un homodisacárido (Xyl β 1-2Xyl e Xyl β 1-3Xyl), potente inductor de las endo-1,4- β -xilanasas, pero no inducen enzimas del complejo celulolítica, la endo-1,4- β -glucanasa (Polizeli *et al.*, 2005).

Las xilanasas son inducibles por microorganismos cultivados con xilana como fuente de carbono. En la fig. 2 se representa un esquema hipotético de la regulación del complejo xilanólítico que involucra las endoxilanasas y β -xilosidasas. En donde, las xilanasas constitutivas a niveles relativamente bajos de actividad, son responsable de la hidrólisis inicial de la xilana, producen pequeños oligosacáridos β -D-xilopiranosil, xilobiosa y xilotriosa. Sin embargo, la xilobiosa es un inductor de

la síntesis de endoxilanasas con ayuda de permeasas β -xilósido son transportados al interior de la célula, induce la expresión de los genes del sistema xilanolítico. La actividad de la permeasa de las células inducidas disminuye en presencia de glucosa, pero es eficiente en presencia de inductores xilanolíticos. En hongos filamentosos, la expresión de los genes xilanolíticos y celulíticos es estrictamente reprimida por glucosa, fructosa y D-xilosa esta represión catabólica es mediada por la proteína CreA (represor de transcripción) (Gutiérrez *et al.*, 2013).

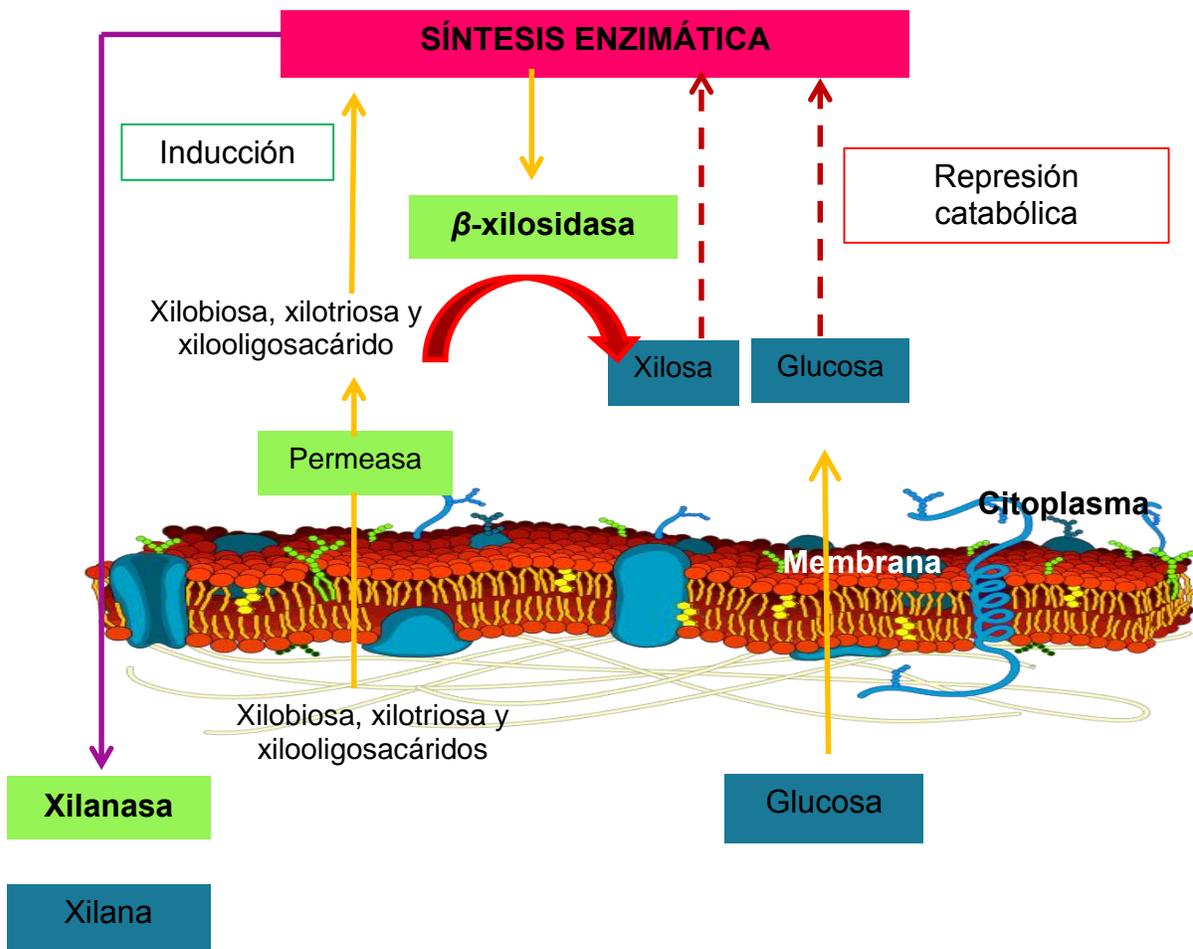


Figura 2.- Esquema hipotético de la regulación del complejo xilanolítico que involucra las endoxilanasas y β -xilosidasas. Las endoxilanasas constitutivas hidrolizan la xilana a xilooligosacáridos y a través de permeasas entran al citoplasma e inducen la transcripción de genes en responsables de la síntesis de las endoxilanasas y β -xilosidasas (Gutiérrez *et al.*, 2013).

Termoestabilidad de las xilanasas fúngicas

Las xilanasas termófilas se caracterizan por presentar un incremento de puentes de disulfuro, interacciones de los residuos aromáticos presentes en la superficie de la enzima, interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, empaquetamiento hidrofóbico, puentes salinos, residuos de prolina en el extremo *N*-terminal y la presencia de moléculas de agua. Por consiguiente, éstas características causan una reducción en la libertad conformacional responsables de la termoestabilidad de las enzimas (Kumar *et al.*, 2000). La xilanasas de *Paecilomyces varioti* presentó un enlace disulfuro adicional en la posición de cisteína 154 y cisteína 110 (Cys154-Cys110). Sin embargo, la xilanasas de *Aspergillus niger* se encuentran presente los aminoácidos de serina 110 y asparagina 154 (Ser110-Asn154). Las xilanasas que son activas a temperaturas bajas se distinguen por una serie de modificaciones discretas que podrían dar lugar a una disminución en la estabilidad y por lo tanto un aumento de la flexibilidad de la estructura molecular. La xilanasas *Pseudoalteromonas haloplanktis* (TAH3a) se caracteriza por un número reducido de puentes salinos y un incremento de residuos hidrofóbicos expuestos (Collins *et al.*, 2005)

Estabilidad ácido-base de las xilanasas fúngicas

Las enzimas son dependientes del pKa de los residuos catalíticos, a cierto pH las cargas de los residuos de los aminoácidos que participan en el sitio activo están en condiciones óptimas para llevar a cabo la actividad hidrolítica en el sustrato. En contraste, los residuos vecinos del grupo carboxilo pueden disminuir o aumentar los valores de pKa del ácido glutámico, conforme a la unión electrostática de los residuos implicados en la interacción. De hecho, las xilanasas acidófilas de la familia 11 tienen un residuo aspártico unido al hidrógeno del catalizador ácido/base que se sustituye por una asparagina en las xilanasas activas en condiciones alcalinas, este residuo influye en la dependencia del pH en la actividad y una mutación de éste aspártico en su residuo de amida en la xilanasas acidófila de *Aspergillus kawachii* resulta un desplazamiento mayor del pH óptimo desde pH 2 a un pH de 5. En efecto, el análisis de la estructura terciaria de esta enzima, así como las xilanasas de la

familia 11 de *T. reesei* y *A. niger* indica que la adaptación a un pH menor se produce por un aumento de la carga negativa, una sustitución y reorientación de los residuos, en particular los residuos aromáticos en el sitio activo. En contraste, las enzimas estables en condiciones alcalinas se caracterizan típicamente por una disminución de residuos ácidos y mayor contenido de residuos de argininas (Collins *et al.*, 2005).

Microrganismos xilanolíticos

Las xilanasas fúngicas son las más importantes en la industria tecnológica por secretar enzimas en el medio de cultivo en mayor cantidad en comparación con levaduras y bacterias. Los hongos filamentosos, particularmente las especies de *Aspergillus* y *Trichoderma*, son reconocidos a nivel industrial por ser productores eficientes de enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas. En el cuadro 3 se presenta los hongos utilizados en la producción industrial de xilanasas, en donde su actividad xilanolítica se lleva a cabo a una temperatura de 50-55 °C y pH de 5-7. Sin embargo, las preparaciones enzimáticas de éstas especies son específicas para determinadas aplicaciones de acuerdo a las propiedades bioquímicas que presentan. Debido a esta limitación, microorganismos productores de enzimas hidrolíticas se requiere investigar. Uno de los microorganismos prometedores en la producción de enzimas xilanolíticas son las especies de *Fusarium*, en el cuadro 4 se presentan las propiedades bioquímicas de xilanasas del género *Fusarium* las cuales presentan su actividad máxima a un pH de 5 - 5,5 y una temperatura de 50 - 55 °C (Polizeli *et al.*, 2005). La producción de xilanasas con propiedades físico-químicas que se ajusten a las condiciones prevalentes en la industria es un reto científico y tecnológico persistente. De acuerdo a su aplicación industrial, las preparaciones enzimáticas deben poseer propiedades catalíticas específicas.

Cuadro 3.- Hongos utilizados en la producción industrial de xilanasas (Polizeli *et al.*, 2005).

Especie	Enzima	pH óptimo	Temperatura óptima (°C)	Aplicaciones industriales
<i>Aspergillus niger</i>	Endo- β -1,4-xilanasa	5,3	65	Alimentos
<i>Humicola insolens</i>	Endo- β -1,4-xilanasa	6,5-7	40-50	Papel
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Endo- β -1,4-xilanasa	5-5,5	55-60	Alimentos
<i>Trichoderma reesei</i>	Endo- β -1,4-xilanasa	5-6	50-55	Papel Panadería

Cuadro 4.- Propiedades bioquímicas de xilanasas producidas por *Fusarium* spp. (N/R= no reportado) (Badal *et al.*, 2001; Saha *et al.*, 2001; Inmaculada *et al.*, 2005).

Genero	Enzima	P.M. (kDa)	Actividad óptima		Estabilidad		pI	k_m (mg/mL)	$V_{m\acute{a}x}$ (U/mg)
			pH	T (°C)	pH	T (°C)			
<i>F. proliferatum</i>	Endo- β -1,4-xilanasa	22,4	5-5,5	55	5-7,5	55	N/R	N/R	N/R
<i>F. verticillioides</i>	Endo- β -1,4-xilanasa	24	5,5	50	4-9,5	50	8,6	N/R	N/R
<i>F. oxysporum</i>	Endo- β -1,4-xilanasa	21,6	5,5	55	7-10	30	9,0	2,2	72

Detección de una xilanasa de *F. solan*

Alvarez- Naverrete *et al.* (2015) realizaron un escrutinio de 103 aislados fúngicos de los cuales seleccionaron 60 aislados fúngicos por presentar un índice xilanólico mayor (IX) en medio mínimo, los 60 aislados fúngicos se sometieron a un análisis de correspondencia. El análisis de correspondencia lo utilizó con el objetivo de conocer el comportamiento de una población de aislados fúngicos, respecto a cuatro variables que corresponde a crecimiento en medio sólido, índice xilanólico, actividad xilanólica y actividad celulolítica. Los hongos que presentaron mayor contribución en la actividad xilanólica total de la población analizada corresponden a un grupo de nueve aislados fúngicos. Sin embargo, el aislado 59 se seleccionó por que presentó un IX mayor (0.964 ± 0.042), rápido crecimiento en estado sólido (1.233 ± 0.050 cm/día), mayor actividad xilanólica específica (3.823 ± 0.210 U/mg) y una actividad celulolítica ausente, respecto al resto de los demás aislados (fig. 3).

El aislado 59 se identificó molecularmente en base en las regiones ITS ribosomales y correspondió a *Fusarium solani* con número de acceso KP144996 (Alvarez- Naverrete *et al.*, 2015).

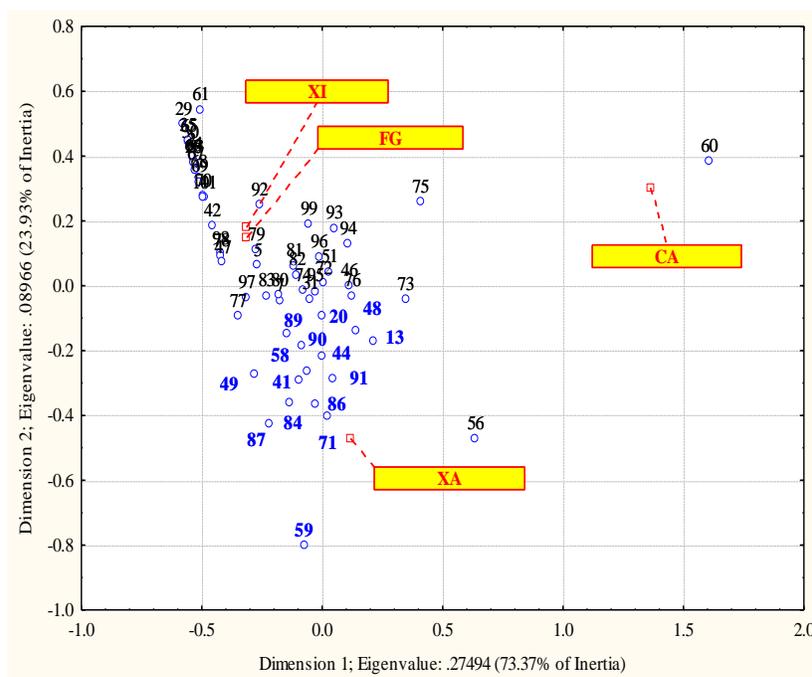


Figura 3.- Análisis de correspondencia de los 60 aislados fúngicos (FG crecimiento en estado sólido, CA actividad celulolítica, XA actividad xilanólica). ● Aislado Fúngico, ■ Variable Respuesta.

En base a un análisis electroforético de un extracto de *F. solani* (KP144996) se detectó la actividad xilanólítica en un extracto crudo. La señal se detectó por tinción con rojo Congo, con un peso molecular aproximado de 20,8 kDa (fig. 4).

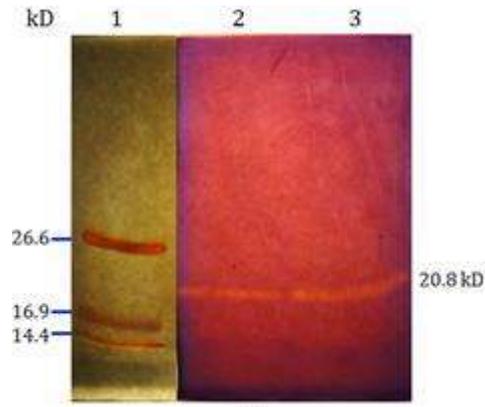


Figura 4.- Zimograma de una xilanasa de *Fusarium solani* (KP144996). 1. Marcadores de peso molecular (daltons): triosa fosfato isomerasa (26,625), mioglobina (16,950), α -lactalbúmina (14,437), 2. Extracto crudo, 3. Xilanasa enriquecida por ultrafiltración (10-50 kDa).

JUSTIFICACIÓN

Las xilanasas fúngicas son importantes en la industria de los polisacáridos. En donde sus propiedades bioquímicas determinan el proceso en el que son utilizadas. Por ello, el enriquecimiento de una xilanasas extracelular de *Fusarium solani* (KP137443) coadyuvará a conocer el aprovechamiento de sus propiedades bioquímicas en la conversión de la hemicelulosa.

HIPÓTESIS

La xilanasa de *Fusarium solani* (KP137443) presenta propiedades bioquímicas con potencial uso en el procesamiento de hemicelulosa.

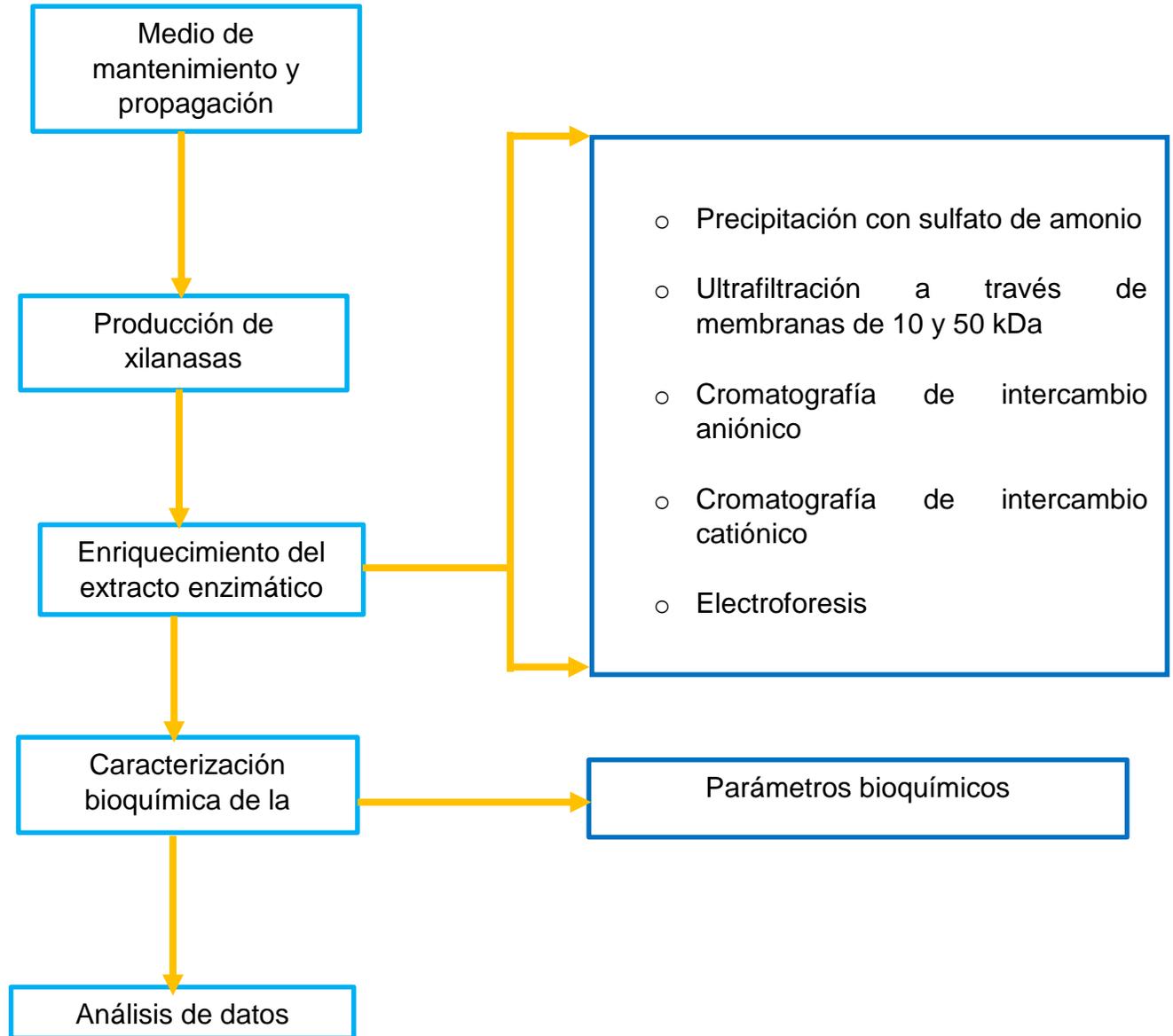
OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar bioquímicamente la actividad xilanolítica de *Fusarium solani* (KP137443).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Enriquecer la actividad xilanolítica de los extractos de *Fusarium solani* (KP137443).
- Determinar los parámetros bioquímicos aparentes de la actividad xilanolítica extracelular de *Fusarium solani* (KP137443).

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



MATERIALES Y MÉTODOS

Actividad de endo- β -1,4-xilanasasa

La actividad de endo- β -1,4-xilanasasa se midió por el método modificado de Bailey y colaboradores (1992). La mezcla de reacción contenía 580 μ L de buffer de citrato de sodio 50 mM a pH 5, 600 μ L de suspensión de xilana de madera de abedul al 1 % (p/v) suspendida en buffer de citrato de sodio 50 mM a pH 5 y 4,38 μ g de proteína (tubo 1). Al tubo de ensaye 2 se añadió 4,38 μ g de proteína y 1 180 μ L de buffer de citrato de sodio 50 mM. Al tubo de ensaye 3 solo se añadió 1 200 μ L buffer y al tubo 4 se le añadieron 600 μ L de buffer de citrato de sodio 50 mM y 600 μ L de sustrato. Los tubos con la mezcla de reacción se incubaron a 50 °C por 30 min y se centrifugaron a 5 000 rpm por 5 min. La reacción se detuvo al añadir 1 mL de DNS y se colocaron en un baño de agua en ebullición por 15 min (Miller, 1959). Los azúcares reductores se cuantificaron a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro (Mca Epoch BioTek®). Cada ensayo se realizó por duplicado. El contenido de azúcares reductores en la mezcla de reacción se obtuvo a partir de una curva patrón de xilosa, con la ecuación de regresión lineal $y = 8,489x - 0,2303$ ($r^2 = 0,987$). La actividad específica se expresó en U/mg. Una unidad de actividad enzimática se define: La cantidad de enzima que libera un micromol de azúcares reductores por minuto a condiciones del ensayo. En la fig. 5 se representa la curva patrón de xilosa.

Actividad de endocelulasa

La actividad de endocelulasa (endo- β -1,4-glucanasa) se midió por el método modificado de Ghose (1987). A tubos de ensaye se añadieron 480 μ L de buffer de citrato de sodio 50 mM a pH de 5, quinientos microlitros de disolución de carboximetilcelulosa (CMC) al 1 % (p/v), preparada en buffer de citrato de sodio 50 mM, pH 5 y 4,38 μ g de proteína. La mezcla de reacción se homogeneizó y se incubó a 50 °C durante 30 min. La reacción se detuvo al añadir 1 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), se colocaron los tubos de ensaye en baño de agua en ebullición por 15 min. Los azúcares reductores se cuantificaron a una longitud de onda de 540 nm. Cada ensayo se realizó por duplicado. La determinación del

contenido de azúcares reductores en la mezcla de reacción se obtuvieron a partir de una curva patrón de glucosa, con la ecuación de regresión lineal $y = 9,4193x - 0,2784$ ($r^2 = 0,979$). La actividad específica se expresó en U/mg. Una unidad de actividad enzimática se define: La cantidad de enzima que libera un micromol de azúcares reductores por minuto a condiciones del ensayo. En la fig. 6 se representa la curva patrón de glucosa.

Cuantificación de proteína

A tubos de ensayo se añadieron 4,38 μg de proteína, 2 980 μL del reactivo de Biuret y se mezcló. Los tubos se incubaron en la oscuridad por un periodo de 15 min, se añadió 150 μL del reactivo de Folin-Ciocalteau, los tubos con la muestra se incubaron por 30 min. Cada ensayo se realizó por duplicado y los valores de absorbencia se determinaron a una longitud de onda de 640 nm. EL contenido de proteína se obtuvo a partir de una curva patrón de Albúmina sérica bovina (BSA) por el método colorimétrico de Lowry *et al.* (1951) a una concentración 1 mg/mL, con la ecuación de regresión lineal $y = 11,62x + 0,0824$ ($r^2 = 0,9898$). La fig. 7 representa la curva patrón de BSA.

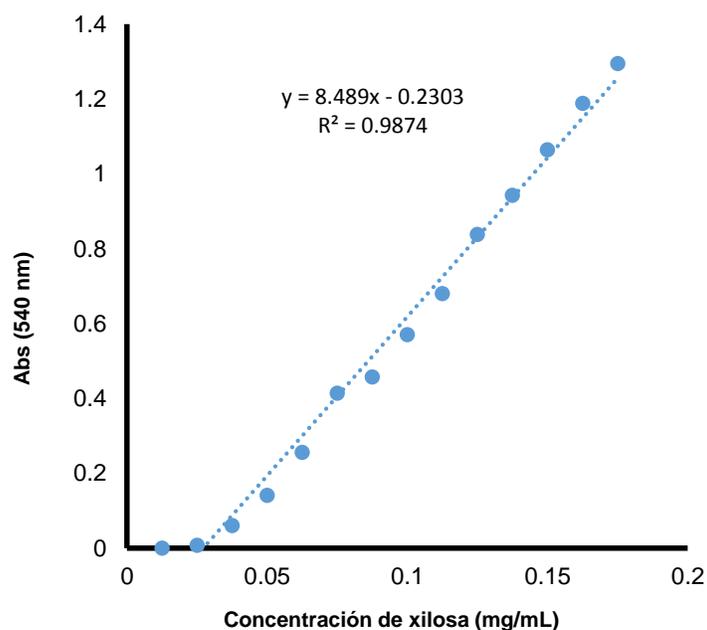


Figura 5.- Curva de calibración de azúcares reductores. Curva patrón: puntos verdes. Curva de regresión lineal: línea verde. Coeficiente de correlación $r^2 = 0,9448$, $n = 3$.

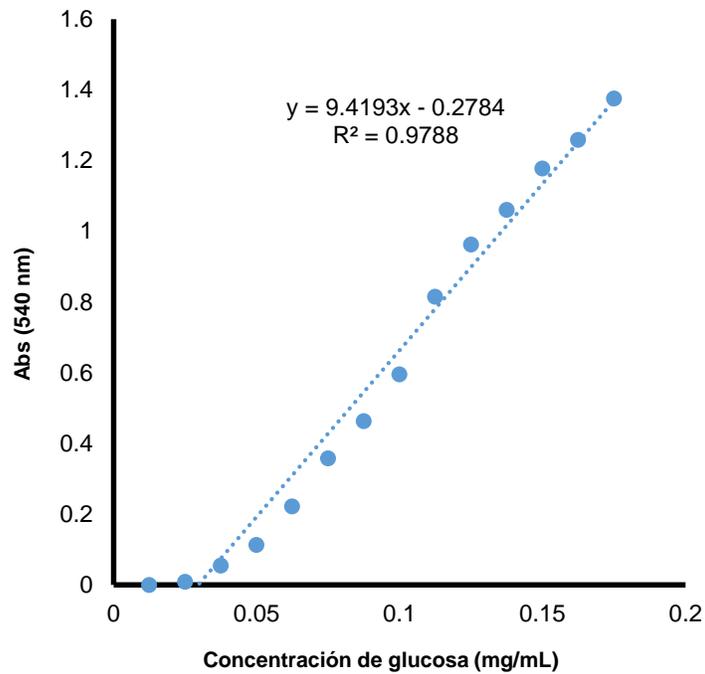


Figura 6.- Curva de calibración de azúcares reductores. Curva patrón: puntos verdes. Curva de regresión lineal: línea verde. Coeficiente de correlación $r^2 = 0,9788$, $n = 3$.

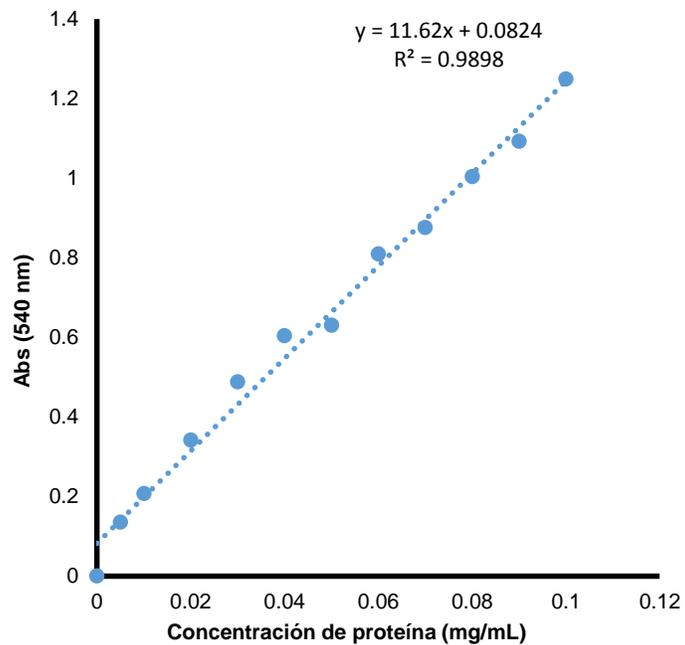


Figura 7.- Curva de calibración de proteína. Curva patrón: puntos verdes. Curva regresión lineal: línea verde. Coeficiente de correlación $r^2 = 0,9898$, $n = 3$.

ENRIQUECIMIENTO DEL EXTRACTO XILANOLÍTICO

Medio de mantenimiento y propagación

Fusarium solani se cultivó en medio basal sólido con la siguiente composición (g/L): C₄H₁₂N₂O₆ (tartrato de amonio), 5; KH₂PO₄, 1; MgSO₄·7H₂O, 0,5; extracto de levadura, 0,1; CaCl₂·2H₂O, 0,001; dextrosa, 4 y agar, 16. Las placas sembradas se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente hasta su uso.

Preparación del inóculo

El medio de cultivo líquido se preparó con la siguiente composición: agua tridestilada 36 mL, xilana de madera de haya 0,04 g, disolución de microelementos 4 mL, que presenta la siguiente composición por litro de agua tridestilada (NH₄)₂SO₄, 1,4 g; KH₂PO₄, 2,0 g; urea, 0,1 g; MgSO₄·7H₂O, 0,3 g; CaCl₂, 0,3 g; FeSO₄·7H₂O, 5,0 mg; MnSO₄·H₂O, 1,56 mg; CoCl₂, 2,0 mg; ZnSO₄·7H₂O, 1,4 mg; dextrosa 3 g; disolución de vitaminas (MEM Vitamins Solution 1000x, Sigma Cell Culture), 100 µL. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5,5 y se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 min. Cuatro propágulos de *F. solani* se inocularon en 40 mL de medio de cultivo y se incubó a 150 rpm a temperatura ambiente. Después de 48 h de incubación, el micelio se extrajo y se lavó tres veces con agua desionizada estéril. Una alícuota de 500 µL de la suspensión de micelio se tomó para lisarlo, 500 µL de hidróxido de sodio 0,5 M se añadieron y se incubó por 14 h a 4 °C. La muestra se centrifugó a 12 000 rpm por 5 min. El sobrenadante se extrajo para cuantificar el contenido de proteína intracelular soluble por el método de Lowry (1951).

Producción de xilanasas extracelulares

Los medios de cultivos sólidos se prepararon de acuerdo a las condiciones experimentales encontradas para la producción de xilanasas extracelulares por *F. solani*, (fig. 8). 500 mL de medio de cultivo sólido se prepararon con la siguiente composición: 1,750 g de xilana de madera de haya (Sigma), 350 µL de extracto de levadura, 100 µL de (NH₄)₂SO₄, 50 µL de urea y el medio de cultivo se humedeció con 4,5 mL de agua tridestilada. El medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 min. Los medios esterilizados se añadieron 500 µL de la disolución de

microelementos y 500 μ L del inóculo (39,5 μ g de proteína), se incubaron durante 84 h a 150 rpm a temperatura ambiente (Alvarez *et al.*, 2015).



Figura 8.- Medio de mantenimiento y producción de xilanasas de *Fusarium solani* (KP144996).

Extracción de xilanasas extracelulares

Los matraces se sacaron de incubación y se añadieron 15 mL de buffer de citrato de sodio 50 mM pH de 5,0 y se homogeneizó. La muestra se centrifugó a 4 °C, 4 500 rpm por 30 min y el sobrenadante se separó de los sólidos y se almacenó a -40 °C hasta su uso (fig. 9).



Figura 9.- Obtención del extracto crudo enzimático de *Fusarium solani* (KP137443).

Enriquecimiento del extracto crudo por precipitación con sulfato de amonio

El sobrenadante de la fermentación se precipitó con sulfato de amonio a 4 °C, a una concentración del 20, 25 y 30 % de saturación con agitación constante. El precipitado obtenido en cada porcentaje de saturación se separó del sobrenadante por centrifugación a 4 °C y 4 700 rpm por 30 min (fig. 10).



Figura 10.- Precipitación del extracto crudo de *Fusarium solani* (KP137443) con sulfato de amonio.

Diálisis

Las fracciones precipitadas se dializaron a través de una membrana de celulosa con un tamaño de exclusión molecular de 12 kDa (Sigma) contra buffer de citrato de sodio 50 mM, pH de 5,0 en agitación constante a 4 °C durante 72 h. El buffer se reemplazó varias veces durante la diálisis (fig. 11). La actividad xilanolítica y la proteína se cuantificaron en cada fracción recuperada y dializada (métodos de Miller y Lowry).



Figura 11.- Representación de las fracciones dializadas contra buffer de citrato de sodio 50 mM.

Separación por ultrafiltración

Las muestras dializadas se fraccionaron y concentraron por ultrafiltración a través de filtros para centrífuga Amicon® Ultra-15 (Millipore) con membranas de punto de corte de 10 y 50 kDa. En la fig. 12 representa el diagrama de flujo del enriquecimiento del extracto enzimático de *Fusarium solani* (KP137443) mediante ultrafiltración. Las muestras se centrifugaron a 4 500 rpm por 30 min. La actividad xilanolítica y el contenido de proteína se cuantificaron en cada fracción obtenida.

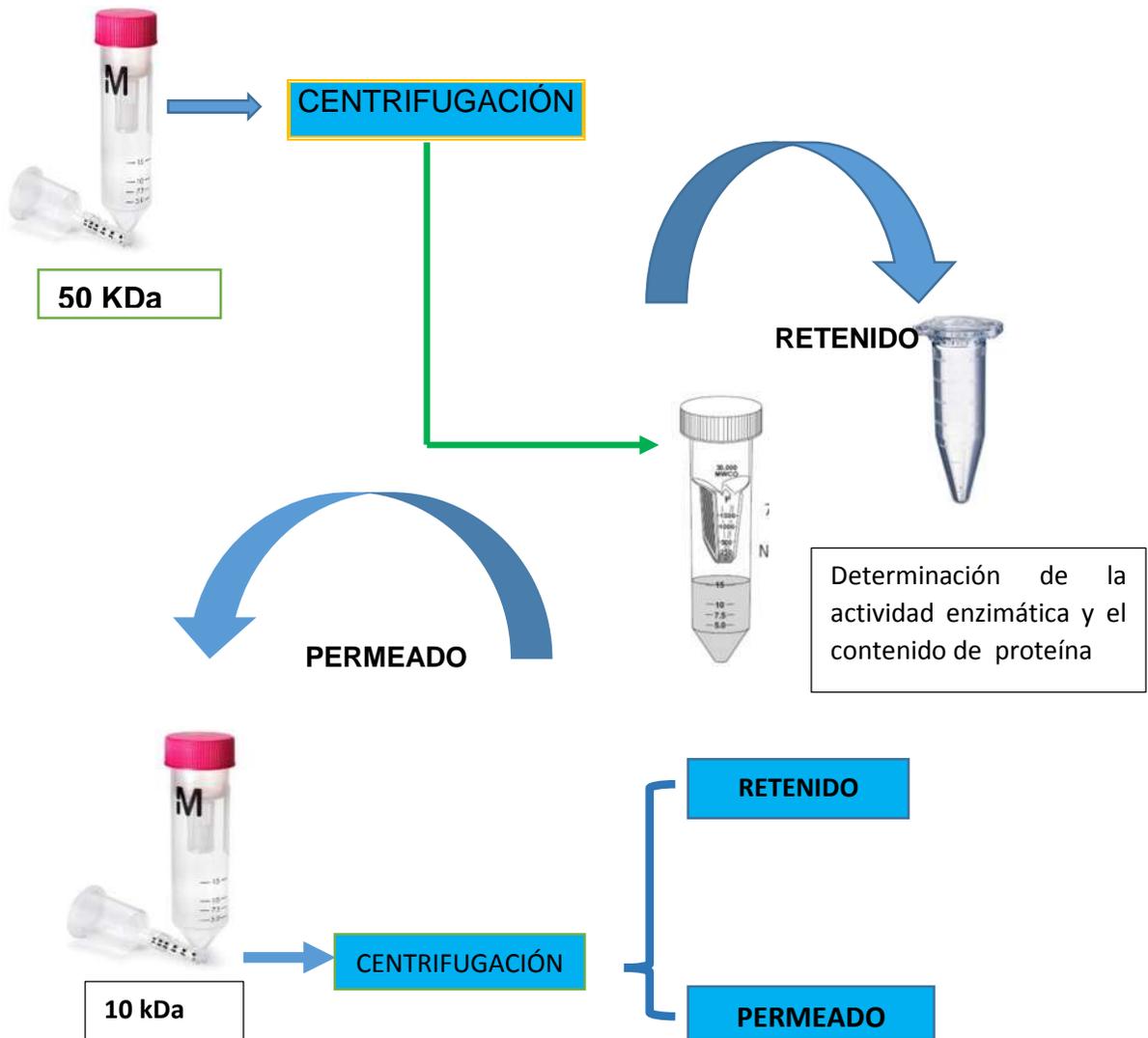


Figura 12.- Diagrama de flujo del enriquecimiento del extracto enzimático de *Fusarium solani* (KP137443) mediante ultrafiltración con membranas de punto de corte de 10 y 50 kDa.

Cromatografía de intercambio aniónico

Tratamiento de la resina

La resina de intercambio aniónico dietilaminoetil Sephadex® (DEAE-Sephadex®) A 25 (10 g) se pesaron y se colocaron en 100 mL de buffer microfiltrado Tris-HCl 20 mM a pH de 8,0, se colocó en baño de agua en ebullición por 2 h. La resina se lavó por tres veces con el mismo buffer y se eliminó el aire con ayuda de una bomba de vacío para evitar la formación de burbujas durante el empaquetamiento de la resina en la columna cromatográfica.

Empaquetamiento de la columna DEAE-Sephadex® A-25

El empaquetamiento de la columna se realizó con un volumen de fase estacionaria de 45 mL (DEAE-Sephadex® A-25) con una dimensión de 15 cm de longitud x 2 cm de diámetro, la resina se equilibró con Tris-HCl 20 mM a pH de 8,0 con un volumen que equivale a cuatro camas de la resina.

Procesamiento de la muestra

La muestra se inyectó (2,33 mg de proteína) en la columna de intercambio iónico, el NaCl se utilizó como gradiente lineal (0-1 M) y como fase móvil Tris-HCl 20 mM a pH de 8, con una velocidad de flujo de 3 mL/min a 25 °C. La elución de la proteína presente en cada fracción se cuantificó a una absorbencia de 280 nm y la actividad xilanolítica se determinó de acuerdo al método de Miller (1959) a una absorbencia de 540 nm. Las fracciones que presentaron mayor actividad enzimática se mezclaron y se fraccionaron en una columna de intercambio catiónico.

Cromatografía de intercambio catiónico

Tratamiento de la resina

La resina de intercambio catiónico carboximetil Sephadex® (CMC-Sephadex®) A 25 (10 g) se pesaron y se colocaron en 100 mL de buffer microfiltrado de acetato de sodio 50 mM a pH de 5,0. La resina se colocó en baño de agua en ebullición por 2

h y se lavó por tres veces con el mismo buffer, con ayuda de una bomba de vacío se eliminó el aire para evitar la formación de burbujas durante el empaquetamiento de la resina.

Empaquetamiento de la columna CM-Sephadex® A-25

El empaquetamiento de la columna se realizó con un volumen de fase estacionaria de 45 mL (CMC-Sephadex® A-25) con una dimensión de 15 cm de longitud x 2 cm de diámetro, la resina se equilibró con buffer de acetato de sodio 50 mM a pH de 5 con un volumen que equivale a cuatro camas de la resina.

La muestra se inyectó (0,111 mg de proteína) en una columna de intercambio catiónico, el NaCl se utilizó como gradiente lineal (0-1 M) y como fase móvil el buffer de acetato de sodio 50 mM a pH de 5,0. Las fracciones se recolectaron con una velocidad de flujo de 3 mL/min a una temperatura de 25 °C, la proteína presente en cada fracción se cuantificó a una absorbencia de 280 nm. La actividad xilanolítica se determinó de acuerdo al método de Miller (1959) a una absorbencia de 540 nm. Las fracciones que presentaron mayor actividad enzimática se juntaron para su posterior caracterización bioquímica.

Electroforesis SDS-PAGE

El gel de poliacrilamida se preparó de acuerdo con el método de Laemmli (1970), a partir de un gel concentrador al 4 % y un gel de resolución al 17 %.

El gel de resolución contiene: agua desionizada 1,7 mL, acrilamida/Bis al 30 % 5,7 mL, buffer Tris-HCl pH 8,8 1,5 M, APS 50 µL 10 % y 5 µL de TEMED. El gel concentrador contiene: agua desionizada 6,1 mL, acrilamida/Bis al 30 % 1,3 mL, buffer Tris-HCl pH 6,8 2,5 M, APS 50 µL 10 % y 10 µL de TEMED.

Procesamiento de la muestra

En tubos eppendorf se añadieron 4,38 µg de proteína (20µL), 60 µL de buffer Tris-HCl con SDS y 5 µL de β-mercaptoetanol, se hirvieron por 4 min a 95 °C. Las

muestras se cargaron en el gel, la cámara se llenó con un buffer Tris-glicina a pH 8,3 y se corrieron las muestras a 115 V por 2 h. Después de la electroforesis, el gel se incubó en una disolución de metanol (40 %), ácido acético (10 %) y agua (50 %) con agitación suave por 1 h, después se lavó con agua durante 1 h. Las señales electroforéticas se visualizaron mediante una tinción con nitrato de plata.

Tinción con nitrato de plata

El gel que contiene las proteínas se incubó durante 1 h en una solución de metanol, ácido acético y agua desionizada (40:10:50, v/v) para fijar las proteínas. El gel se enjuagó durante 24 h con diferentes cambios de agua desionizada y se incubó en una solución de tiosulfato de sodio al 0,02 % (p/v) por 1 min, con agua desionizada se lavó tres veces por 1 min y se incubó en una disolución de nitrato de plata al 0,1 % (p/v) con formaldehído al 0,02 % (v/v) a 4 °C por 20 min, por segunda vez con agua desionizada se lavó tres veces por 1 min y se volvió a incubar en disolución de nitrato de plata. Para revelar las señales, una disolución de carbonato de sodio al 3 % (p/v) con formaldehído al 0,05 % (v/v) se añadió. Al observar un cambio de color amarillo se reemplazó con una disolución nueva de carbonato de sodio al 3 %, por último ácido acético al 5 % se agregó (v/v) para detener la tinción.

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE UNA XILANASA DE *F. solani* (KP137443)

Efecto de la temperatura y el pH en la actividad xilanolítica

El efecto de pH y temperatura en la actividad enzimática se evaluó de manera conjunta a partir de un diseño central compuesto. El sistema de buffer McIlvaine (citrato-fosfato) se utilizó para el intervalo estudiado.

En el cuadro 5 representa los tratamientos que se utilizaron en los ensayos correspondientes. En tubos eppendorf se colocaron 600 μ L de xilana de madera de haya 1 % (p/v), 500 μ L de buffer McIlvaine al pH específico (citrato-fosfato) y 0,052 U de enzima se incubaron a una temperatura específica por 30 min. Los tubos se centrifugaron 5 000 rpm por 5 min, un mililitro del sobrenadante se colocó en un tubo de ensaye. La reacción se detuvo al añadir un mililitro del reactivo DNS. Los tubos se colocaron en baño de agua en ebullición por 15 min, se retiraron y se dejaron enfriar. La cuantificación de los azúcares reductores se realizó a una longitud de onda de 540 nm. Para los ensayos de actividad xilanolítica se utilizaron 0,02 U de enzima. Cada tratamiento se realizó por duplicado.

Cuadro 5.- Tratamientos utilizados para determinar el efecto del pH y la temperatura en la actividad enzimática.

Tratamiento	Temperatura (°C)	pH
1	30	3
2	30	7
3	70	3
4	70	7
5	21,7	5
6	78,3	5
7	50	2,1
8	50	7,8
9	50	5,
10	50	6

Efecto del pH en la estabilidad de la enzima

En tubos de ensaye se colocaron 0,10 U de enzima y buffer McIlvaine (citrato-fosfato) a pH de 4, 5, 6 se pre-incubaron a 50 °C. En intervalos de tiempo se extrajeron 0,02 U de enzima para cuantificar la actividad xilanolítica residual y se expresó en porcentaje (%) en relación a la actividad enzimática observada antes de incubar a los distintos valores de pH. Cada ensayo se realizó por duplicado.

Efecto de la temperatura en la estabilidad enzimática

En tubos de ensaye se colocaron 0,10 U de enzima y buffer de citrato de sodio 50 mM a pH de 5 se pre-incubaron a diferentes intervalos de temperatura 40, 50, 60, 70 y 80 °C. En intervalos de tiempo se extrajeron 0,02 U de enzima para cuantificar la actividad xilanolítica residual y se expresó en porcentaje (%) en relación a la actividad enzimática observada antes de incubar a las distintas temperaturas. Cada ensayo se realizó por duplicado.

Efecto de iones metálicos y compuestos en la actividad enzimática

Los iones metálicos (Mg^{2+} , Fe^{2+} , Ag^+ , Co^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , 1 mM) urea (8mM), Dodecil Sulfato de Sodio (SDS, 2 mM) y Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, 3 mM) se disolvieron en agua desionizada. En un tubo ependorf se colocaron 0,02 U de enzima, la disolución de la sustancia o ion metálico correspondiente y se incubaron a 50 °C durante 15 min. La actividad xilanolítica residual se cuantificó y se expresó en porcentaje (%) en relación a la actividad enzimática observada en el control sin el efector. Cada ensayo se realizó por duplicado.

Especificidad por sustrato

Disoluciones de diferentes polisacáridos: Carboximetilcelulosa (CMC), celulosa Sigmacell®, quitina de camarón y xilana de madera de haya (p/v, 1 %) se prepararon en buffer de citrato de sodio 50 mM a pH 5,0. La enzima (0,02 U) y la disolución del polisacárido (0,6 mL) se incubaron a 50 °C por 30 min excepto, celulosa Sigmacell® que fue por 60 min. Las disoluciones de los polisacáridos sin enzima se incubaron

como control. Las muestras se centrifugaron a 10 000 rpm por 5 min. Los azúcares reductores liberados se cuantificaron por el método de Miller (1959). A la absorbencia de las muestras se les restó la absorbencia de los controles. Cada ensayo se realizó por duplicado.

Estimación de parámetros cinéticos aparentes: K_m y V_{max}

Disoluciones de xilana de madera de haya se prepararon a una concentración de 0,5, 2,5, 5, 10, 20, 30 y 40 mg/mL se disolvieron en buffer de citrato de sodio 50 mM, pH 5. En tubos de ensayo se colocaron 0,08 U de enzima se incubaron con cada una de las disoluciones de xilana de madera de haya a 50 °C. Muestreos 0,02 U de enzima se realizaron cada 10, 20 y 30 min. Las muestras se centrifugaron 10 000 rpm por 5 min y la cantidad de azúcares reductores liberados se cuantificó para estimar la velocidad inicial de hidrólisis. La estimación de los parámetros cinéticos se realizó por regresión no lineal mediante el método de Levenberg–Marquardt con ayuda del programa LAB Fit. Cada ensayo se realizó por duplicado.

Análisis de los datos

El análisis de varianza de una vía y diseño central compuesto así como pruebas de comparación de medias Tukey y t-student se obtuvieron con el paquete estadístico Statistic versión 8.0®, Statsoft.

DISCUSIÓN

En éste estudio se realizó un enriquecimiento de la actividad xilanolítica en un extracto crudo enzimático de *Fusarium solani* (KP137443). El extracto crudo se precipitó con sulfato de amonio al 25 y 30 % de saturación con una actividad específica de 3,72 U/mg y ausencia de actividad celulolítica. Estas fracciones se ultrafiltraron con membranas con un punto de corte de 10 y 50 kDa. Las fracciones de 10-50 kDa se seleccionaron por presentar mayor actividad específica de 4,81 U/mg. Sin embargo, las fracciones menores a 10 kDa y mayores a 50 kDa presentaron menor actividad xilanolítica, lo que indica que el extracto crudo enzimático de *Fusarium solani* presenta una multiplicidad de enzimas hidrolíticas debido que en las tres fracciones presentaron actividad xilanolítica. Por otra parte, en el procesamiento de polisacáridos se requiere de enzimas con pesos moleculares pequeños ya que tienen una mayor capacidad de difusión a través de los poros del material lignocelulósico, romper enlaces glicosídicos en regiones inaccesibles y así desestabilizar las fibras del polisacárido presente en la pared celular (Polizeli *et al.*, 2005). En el fraccionamiento cromatográfico aniónico, la enzima no interaccionó con la resina de intercambio aniónico y eluyó en las primeras fracciones antes de añadir el gradiente de concentración de NaCl con una actividad específica de 8,86 U/mg. Kocabas y colaboradores (2014) llevaron a cabo la purificación de una xilanasas del hongo *Scytalidium thermophilum* ATCC 16454, uno de los pasos de enriquecimiento de la enzima corresponde a una fraccionamiento cromatográfico aniónico. La enzima no interaccionó con la resina y eluyó en las primeras fracciones. Asimismo, Badal y colaboradores (2001) llevaron a cabo la purificación de una xilanasas extracelular de *Fusarium proliferatum*, utilizaron una columna de intercambio aniónico DEAE Bio-Gel A y observaron que la proteínas con actividad xilanolítica no interaccionó con la resina y eluyó en las primeras fracciones antes de iniciar el gradiente de concentración de NaCl.

Las fracciones que presentaron mayor actividad xilanolítica obtenidas en la cromatografía de intercambio aniónico se fraccionaron en una columna de intercambio catiónico, la enzima de interés interaccionó con la resina catiónica y

eluyó al adicionar el gradiente de concentración de NaCl 0,2 M con una actividad específica de 46,75 mg/mL. Sin embargo, éstas fracciones presentaron una actividad total de 2,34 U, mientras que la actividad total del extracto crudo es de 8 668,42 U. En consecuencia, la actividad total disminuyó debido a la pérdida de una multiplicidad de enzimas que actúan de manera sinérgica en la hidrólisis de la xilana (Cantarel *et al.*, 2008). Un resultado similar reportó Heinen y colaboradores (2014) llevaron a cabo la purificación de una xilanasa producida por *Fusarium heterosporum*. Uno de los pasos que se utilizó en el enriquecimiento de la enzima corresponde a un fraccionamiento cromatográfico catiónico. La enzima con actividad xilanolítica interaccionó con la resina y eluyó al adicionar el gradiente de concentración de NaCl 75 mM.

En base a un diseño de superficie respuesta se determinaron el pH y la temperatura óptima de la enzima. Los resultados demuestran que a un pH de 7 y una temperatura de 45 °C son las condiciones óptimas de la enzima en el que presenta mayor actividad enzimática. Por lo tanto, a estas condiciones la velocidad de la reacción es máxima, ya que a determinado pH las cargas de los residuos de los aminoácidos que participan en el sitio activo están en condiciones óptimas para llevar a cabo la actividad catalítica sobre la xilana. Sin embargo, a valores de pH demasiado ácidos o alcalinos que no sean los óptimos no solamente está modificado el sitio activo, si no la estructura terciaria de toda la molécula se encuentra alterada por lo que la actividad xilanolítica disminuye. Por consiguiente, son parámetros bioquímicos importantes en la industria, ya que requieren enzimas que sean activas a pH de 5-9, temperaturas de 40-80 °C (Polizeli *et al.*, 2005). Sandrim y colaboradores (2004) llevaron a cabo la purificación de una xilanasa extracelular de *Aspergillus caespitosus*, presentaron una temperatura y pH óptimo de 50-55 °C y 6,5-7,0.

CONCLUSIÓN

La xilanasa enriquecida de *Fusarium solani* (KP137443) es mesoestable, exhiben un comportamiento Michaeliano, especificidad por xilana de madera de haya y persiste al tratamiento con iones divalentes. Por ello, la xilanasa enriquecida es candidata para degradar xilanas en procesos que utilicen temperaturas máximas de 50 °C, pH de 7 y con débil fuerza iónica.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez Navarrete, M., Reyna López , G., Flores García, A., López Gómez,, R., & Martínez Pacheco, M. (2005). Selection and molecular identification of fungal isolates that produce xylanolytic enzymes. *Genetics and Molecular Research*, 8100-16.
- Anthony, T., Raj, K., Rajendran, A., & Gunasekaran, P. (2003). High molecular weight cellulase-free xylanases from alkali-tolerant *Aspergillus fumigatus* AR1. *Enzyme Microb Technol*, 32:647–654.
- Beg, Q. K., & Mahajan, L. H. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56: 326–338.
- Boraston, A., Bolam, D., Gilbert, H., & Davie, G. (2004). Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem. J*, 382: 769-78.
- Burgess, R. R. (2009). Chapter 20 Protein Precipitation Technique. *Methods in Enzymology*, 463: 331-342.
- Cantarel, B., Coutinho, P., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., & Henrissat, B. (2008). The Carbohydrate-Active Enzymes database (CAZy): an expert resource for. *Nucleic Acids Res*, 37: D233–238.
- Collins, T., Gerday, C., & Feller, G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 3–23.
- Flores, M., Perea, M., Rodríguez, O., Malvárez, A., & Huitron, C. (1996). Physiological studies on induction and catabolic repression of β -xylosidase and endoxylanase in *Streptomyces* sp. CH-M-1035. *J Biotechnol*, 49:179–187.
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59: 257-268.

- Gutiérrez-Rojas, I., Moreno-Sarmiento, N., & Montoya, D. (2013). Mechanisms and regulation of enzymatic hydrolysis of cellulose in filamentous fungi: Classical cases and new models. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32:1-12.
- Howard, R., Abotsi, E., Jansen van Rensburg, E., & Howard, S. (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, 2: 602-619.
- Hrmová M, Petraková, E., & Biely, P. (1991). Induction of cellulose- and xylan-degrading enzyme system in *Aspergillus terreus* by homo- and heterodisaccharides composed of glucose and xylose. *J Gen Microbiol*, 137:541–547.
- Inmaculada, J., de la Rosa, O., Navas-Cortés, J. A., Jiménez-Díaz, R. M., & 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- β -(1,4)-xylanase of low molecular weight. *Antonie van Leeuwenhoek*, 88: 49-59.
- Khasin, A., Alchanati, I., & Shoham, Y. (1993). Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 1725-1730.
- Kocabas, D. S., Guder, S., & Ozben, N. (May 2015). Purification strategies and properties of a low-molecular weight xylanase and its application in agricultural waste biomass hydrolysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 115: 66–75.
- Kumar, P., Eswaramoorthy, S., Vithayathil, P., & Viswamitra, M. (2000). The Tertiary Structure at 1,59 Å resolution and the proposed amino acid sequence of a family-11 Xylanase from the thermophilic fungus *Paecilomyces varoti* Bainier. *Journal of Molecular Biology*, 295: 581-593.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680–685.

- Lee, D.-S., Wi, S.-G., Lee, Y.-G., Cho, E.-J., Chung, B.-Y., & Bae, H.-J. (2011). Characterization of a New α -L-Arabinofuranosidase from *Penicillium* sp. LYG 0704, and their Application in Lignocelluloses Degradation. *Molecular Biotechnology*, 49: 229-239.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Miller, G. L. (1959). Use of DNS for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428.
- Polizeli, M. L., Rizzatti, A., Monti, R., Terenzi, H., Jorge, J., & Amorim, D. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67: 577–591.
- Pollet A. Delcour, J., & Courtin, C. (2010). Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. *Crit Rev Biotechnol*, 30: 176–191.
- Rizzatti ACS, Sandrim , V., Jorge , J., Terenzi , H., & Polizeli , M. (2004). Influence of temperature on the properties of xylanolytic enzymes of the thermotolerant fungus *Aspergillus phoenicis*. *J Ind Microbiol Biotech* , 31:88–93.
- Saha, B. C., & Demirjian, D. (2002). Production, purification and properties of xylanase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. *Process Biochemistry*, 37: 1279–1284.
- Saha, B. C., & Demirjian, D. (2001). Xylanase from a newly isolated *Fusarium verticillioides* Capable of utilizing corn fiber xylan. *Applied Microbiol Biotechnol*, 56:762–766.
- Takahashi, Y., Kawabata, H., & Murakami, S. (2013). Analysis of functional xylanase in xylan degradation by *Aspergillus niger* E-1 and characterization of the GH family 10 xylanase XynVII. *Springer Open Journal*, 2:447.

Valte, R. D., & Archana, R. (2013). Purification, characterization and application of xylanase produced from *Aspergillus foetidus* MTCC4898 by solid state fermentation. . *International Journal of Pharma Bioscience and Tecnology*, 1 : 83-88.

Wong K.K. Tan, L., & Saddler, J. (1988). Multiplicity of β -1,4-xylanases in microorganisms: functions and applications. *Microbiol Rev*, 52: 305–317.