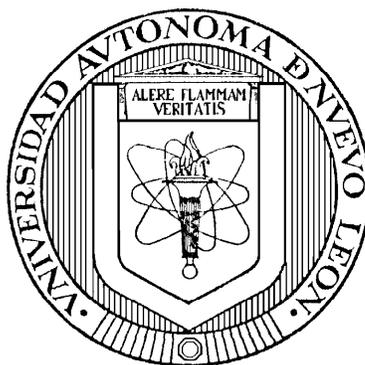


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



CARACTERIZACIÓN DE UNA ENDO-XILANASA

PRODUCIDA POR *Bacillus flexus* NJY2

Por

ALEXANDRA MARGARITA MONTOYA MENDOZA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación en
Microbiología Industrial

Mayo 2012

RESUMEN

Alexandra Margarita Montoya Mendoza

Fecha de graduación: Mayo 2012

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título de estudio: CARACTERIZACIÓN DE UNA ENDO-XILANASA PRODUCIDA
POR *Bacillus flexus* NJY2

Número de páginas: 76

Candidata para el grado de Maestría en
Ciencias con Orientación en
Microbiología Industrial

Área de estudios: Microbiología Industrial

Las endo-1,4- β -xilanasas (EC 3.2.1.8) son glicohidrolasas que degradan al xilano, polisacárido de las paredes celulares vegetales. Estas enzimas son producidas por bacterias, algas y hongos, y tienen ya un papel importante en diversas industrias. La mayoría de las xilanasas son mesofílicas y muestran actividad a pH neutro o ligeramente ácido; sin embargo, se han reportado enzimas con actividad a pH de 2 a 11. *Bacillus flexus* NJY2, cepa aislada de nejayote y capaz de crecer en ambientes alcalinos, produce feruloil esterasa, una enzima que trabaja de manera sinérgica con las xilanasas. En este estudio se realizó la detección de xilanasas producidas por *B. flexus* NJY2, así como la caracterización por técnicas moleculares.

Conclusiones:

- *B. flexus* NJY2 aislado del nejayote presentó capacidad de actividad xilanolítica.
- La actividad xilanolítica se produjo en medios ricos de xilano o xilosa.
- La endo-xilanasas fue capaz de actuar a pH alcalino (pH=8.0).
- *B. flexus* NJY2 produjo una endo-xilanasas de secuencia similar a la Familia 10 de glicohidrolasas.
- *B. flexus* NJY2 sufrió una pérdida de la actividad xilanolítica debido a pérdida de material genético.

FIRMA DE LA ASESORA: _____

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Residuos Agroindustriales en México	1
1.1.1 Panorama General	1
1.1.2 Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales	3
1.1.2.1 Producción de Biocombustibles	4
1.1.2.2 Obtención de Otros Compuestos de Interés Comercial	7
2. ANTECEDENTES	9
2.1 Compuestos Hemicelulósicos	9
2.1.1 Pre-tratamiento de Hemicelulosa para Extracción de Xilano	12
2.1.2 Degradación Enzimática de Hemicelulosa	14
2.2 Endo-xilanasas	15
2.2.1 Características Moleculares	18
2.2.1.1 Dominios Catalíticos de Xilanasas	19
2.3 Aplicaciones de las Xilanasas	21
2.3.1 Industria Papelera	21
2.3.2 Biorefinería	22
2.3.3 Industria de Piensos	23
2.3.4 Industria de Alimentos	23
2.3.5 Industria Textil	24
2.3.6 Farmacéutica	25
2.3.7 Otras Aplicaciones	26
2.4 Bacterias Alcalófilas	27
2.4.1 <i>Bacillus flexus</i>	29
2.4.1.1 <i>Bacillus flexus</i> NJY2	30
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	31
3.1 Hipótesis	31
3.2 Objetivos	31
3.2.1 Objetivo General	31

Capítulo	Página
3.2.2	Objetivos Específicos 31
4	MATERIAL Y MÉTODOS 32
4.1	Microorganismos 32
4.1.1	<i>Bacillus flexus</i> NJY2 32
4.1.2	<i>Escherichia coli</i> top10 32
4.1.3	<i>Bacillus subtilis</i> B23 32
4.1.4	<i>Bacillus subtilis</i> DSM-10 33
4.2	Medios de Cultivo 33
4.2.1	Medios Utilizados para <i>Bacillus flexus</i> NJY2 33
4.2.2	Medios Utilizados para <i>Escherichia coli</i> top10 34
4.2.3	Medios Utilizados para <i>Bacillus subtilis</i> B23 y DSM-10 35
4.3	Producción de la Endo-xilanasa por <i>B. flexus</i> NJY2 35
4.3.1	Crecimiento Bacteriano e Inóculo Inicial 35
4.3.2	Condiciones de Cultivo 36
4.3.3	Monitoreo de Crecimiento por Microscopía 36
4.3.4	Separación de Células y Extracto Crudo 36
4.3.5	Ultrafiltración 37
4.4	Caracterización de la Endo-xilanasa 37
4.4.1	Zimograma 37
4.4.2	Hidrólisis en Placa 38
4.4.3	Tinción de Xilano 39
4.4.4	Ensayos de Actividad Xilanolítica 39
4.4.5	Medición de Azúcares Reductores Totales 39
4.4.6	Extracción de ADN Total de <i>B. flexus</i> NJY2 40
4.4.7	Aislamiento de Plásmido de <i>E. coli</i> top10 40
4.4.8	Diseño de Iniciadores 41
4.4.9	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) 42
4.4.9.1	PCR Punto Final 42
4.4.9.2	PCR Asimétrico 43
4.4.10	Electroforesis de Ácidos Nucléicos 43
4.4.11	Recuperación de ADN de Gel de Agarosa 44
4.4.12	Estimación de Tamaño de Fragmentos de ADN 44
5	RESULTADOS 45
5.1	Detección de Actividad Xilanolítica 45
5.1.1	<i>Bacillus flexus</i> NJY2 45
5.1.2	<i>Escherichia coli</i> top10 46
5.2	Clasificación Molecular de la Endo-xilanasa 47
5.3	Crecimiento y Actividad Xilanolítica de <i>B. flexus</i> NJY2 51

Capítulo	Página
6 DISCUSIÓN	59
6.1 Producción de la Endo-xilanasa por <i>B. flexus</i> NJY2	59
6.2 Amplificación de GH10	60
6.3 Pérdida de Actividad Enzimática	63
7 CONCLUSIONES	66
REFERENCIAS	67

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Cierre de la Producción Anual Agrícola por Cultivo en México, Año 2010	2
2. Pérdida Anual en la Producción de Cultivos en México, Año 2010	3
3. Enzimas Involucradas en la Hidrólisis de Xilano	14
4. Características de Algunas Xilanasas Identificadas en Microorganismos del Género <i>Bacillus</i>	17
5. Familias de Dominios Catalíticos de Xilanasas	20
6. Microorganismos Estudiados en Relación a la Eficiencia de sus Xilanasas en el Proceso de Blanqueado de la Pulpa de Papel	22
7. Iniciadores para la Amplificación de GH10 y GH11	41
8. Concentraciones Finales en Reacciones de Amplificación de GH10 y GH11	42
9. Condiciones para Reacciones de Amplificación de GH10 y GH11	42
10. Concentración Final de Iniciadores para Amplificación de GH10 por PCR Asimétrico	43
11. Amplificación por PCR de GH10 y GH11	49

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Participación de las Energías Renovables dentro del Consumo Mundial Final de Energía	5
2. Esquema General de los Procesos de Producción de Bioetanol a Partir de Biomasa Vegetal	6
3. Proyectos de Investigación sobre Biocombustibles Identificados por la REMBIO	7
4. Representación Esquemática de la Pared Celular Vegetal de la Cebolla	10
5. Estructura General del Xilano	12
6. Estructura Hipotética del Xilano Mostrando sus Ramificaciones y los Sitios de Corte de las Diferentes Enzimas del Sistema Xilanolítico	15
7. Distribución de Microorganismos Alcalófilos en Ambientes a Diferente pH	28
8. Prueba Hidrolítica en Placa para <i>B. flexus</i> NJY2	45
9. Zimograma de Extracto Concentrado de un Cultivo de <i>B. flexus</i> NJY2 en Medio XSA	46
10. Halo de Hidrólisis Producido por EC11	47
11. Electroforesis de Material Genómico Extraído de <i>B. flexus</i> NJY2 y EC11	48
12. Electroforesis de Fragmentos de GH10 Amplificados por PCR	49
13. Amplificación de GH10 a Partir de B1 y B2	50

Figura	Página
14. Productos de PCR Asimétrico con B2 como Template	51
15. Crecimiento y Producción de Azúcares Reductores (AR) por <i>B. flexus</i> NJY2 en Medio XC	52
16. Microscopía Óptica de NJY2 en Diferentes Etapas de Crecimiento	53
17. Actividad Xilanólítica de Extracto Crudo	54
18. Producción de Azúcares Reductores en Cultivos de NJY2 en Medios YEP y XC0.1	55
19. Cinética de Producción de Azúcares Reductores (Método DNS) para la Determinación de Actividad Xilanólítica en Sobrenadantes de Fermentación	55
20. Actividad Xilanólítica de Sobrenadante de Fermentación Obtenido de un Cultivo en Medio XC0.1	56
21. Cinética de Producción de Azúcares Reductores (Método DNS) para Determinación de Actividad Xilanólítica de Células Cultivadas en Medio XC0.1	57
22. Producción de Azúcares Reductores en Medio XC0.1.	58
23. Segunda Prueba Hidrolítica en Placa	58

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Residuos Agroindustriales en México

1.1.1 Panorama General

México, como la octava potencia mundial agropecuaria, atiende la demanda alimentaria de millones de personas dentro y fuera del país. El territorio nacional cuenta con más de 21.5 millones de hectáreas de superficie sembrada, lo que equivale a más del 11% del territorio nacional (Abaonza Flores et al., 2011). Los pastos y la caña de azúcar son los cultivos de mayor producción en México (Tabla 1).

Tabla 1. Cierre de la Producción Anual Agrícola por Cultivo en México, Año 2010 (SIAP, 2011).

Cultivo	Sup. sembrada (Ha)	Sup. cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Valor de la producción (Miles de pesos)
Agave	162,388.89	15,880.250	1,246,790.13	1,263,266.44
Aguacate	134,322.12	123,403.69	1,107,135.16	14,165,758.09
Alfalfa verde	383,436.68	377,755.75	29,110,563.04	11,018,750.50
Avena forrajera	114,531.79	112,349.37	2,815,599.24	1,148,883.16
Café cereza	781,015.99	741,410.69	1,332,263.19	5,727,519.07
Caña de azúcar	734,818.74	703,943.12	50,421,619.53	31,250,469.38
Cártamo	100,256.73	83,933.58	97,063.21	421,634.15
Frijol	326,915.60	315,819.38	390,922.91	4,306,999.36
Limón	153,442.62	143,869.42	1,891,403.15	5,437,093.48
Mango	183,108.37	174,969.85	1,632,649.34	4,347,697.77
Maíz grano	1,155,270.35	1,136,778.96	6,672,028.90	16,356,751.12
Naranja	339,389.04	334,573.21	4,051,631.61	4,876,987.94
Pastos	2,272,115.68	2,224,950.59	45,313,053.21	16,346,847.84
Sorgo grano	823,058.38	774,649.12	2,930,532.83	6,134,283.67
Trigo grano	590,958.73	583,654.64	3,469,335.37	9,302,082.39

Todos los cultivos son vulnerables al clima o enfermedades, ocasionando pérdidas que pueden superar el 2% de superficie sembrada considerada como merma por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) (Tabla 2). Lo anterior genera pérdidas económicas, además de altos volúmenes de biomasa. Por ejemplo, anualmente los cultivos de alfalfa, limón, maíz y sorgo registran pérdidas de más de 100 mil toneladas, mientras que los residuos de caña de azúcar superan los 2 millones de toneladas. Caso particular es el del agave, que tuvo una pérdida durante el año 2010 de 11.5 millones de toneladas, lo que equivale a más de 11 mil millones de pesos.

Tabla 2. Pérdida anual en la Producción de Cultivos en México, Año 2010.

Cultivo	Sup. siniestrada (Ha)	Sup. siniestrada (%)	Producción perdida (Ton)	Valor de la producción perdida (Miles de pesos)
Agave	146,508.70	90.22	11,502,398.04	11,654,344.72
Aguacate	10,918.43	8.13	97,938.32	1,253,117.83
Alfalfa verde	5,680.93	1.48	437,772.47	165,701.26
Café cereza	39,605.30	5.07	71,289.54	306,480.15
Caña de azúcar	30,875.62	4.20	2,211,620.66	1,370,718.25
Limón	9,573.20	6.24	125,887.58	361,880.21
Mango	8,183.52	4.47	76,352.24	203,323.73
Maíz grano	18,491.39	1.60	108,544.46	266,101.08
Pastos	47,165.09	2.08	960,752.88	346,591.60
Sorgo grano	48,409.26	5.88	182,987.00	383,033.88

Parte importante de los productos agrícolas no son aprovechables para usos primarios pues son dañados durante su transporte, almacenaje o procesado (Godon, 1993). Por ejemplo, en el caso de la caña de azúcar, se estima que aproximadamente el 24% del total de la producción será considerado desecho (Valdés-Delgado, 2004). Esto equivaldría a una pérdida adicional de 530 mil toneladas.

El sector agropecuario en México requiere de una estrategia para reorientar el uso de su producción; no sólo de sus residuos, sino de la materia viable en mercados afectados por una alta competencia e introducción de nuevos productos (Aguilar-Rivera, 2007; Casas, 1988).

1.1.2 Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales

Es posible obtener productos de interés comercial en cantidades significativas mediante la biodegradación o bioconversión de material agrícola. La biodegradación del material agrícola produce principalmente combustibles

líquidos, solventes, y mono- y oligosacáridos que pueden ser destinados a diversas aplicaciones.

Es de particular interés el empleo de desechos provenientes del procesado de cereales. Estas industrias producen biomasa, residuos y efluentes que, además de contaminantes, poseen un alto contenido energético, son abundantes y están disponibles durante todo el año (Durán-de-Bazúa, 1988).

1.1.2.1 Producción de Biocombustibles

La bioconversión de biomasa para la obtención de combustibles, o biorefinería, es un rubro que ha tenido gran expansión en los últimos años. De la energía total producida mundialmente, el 19% corresponde a energías renovables, y de éstas, sólo el 0.6% a biocombustibles (Figura 1). Aún y cuando su participación en comparación con los combustibles fósiles es baja, los biocombustibles muestran la tendencia a ocupar mayores espacios debido a que son renovables, menos dañinos al ambiente, tienen el potencial de ser un factor para el desarrollo rural y generación de empleos, y pueden ser producidos a partir de desechos.

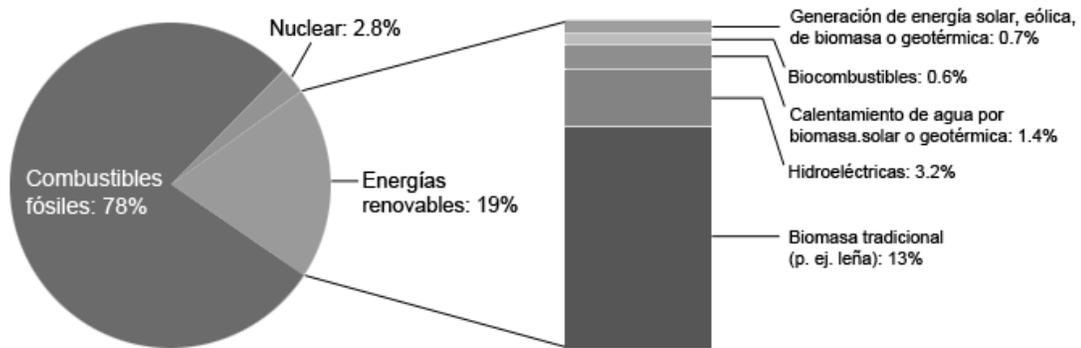


Figura 1. Participación de las energías renovables dentro del consumo mundial final de energía (REN21, 2010).

Los biocombustibles que se pueden obtener a partir de residuos agroindustriales son el biodiesel y el bioetanol. El biodiesel puede ser producido a partir de ciertas plantas oleaginosas, mientras que el bioetanol se obtiene a partir de plantas ricas en azúcares fermentables, principalmente el maíz y la caña de azúcar. El bioetanol es el biocombustible que ha cobrado mayor auge a nivel mundial, con una producción encabezada por Estados Unidos y Brasil estimada en 75 millones de toneladas para el año 2015 (SAGARPA, 2009).

Existen procesos y tecnologías establecidas para la obtención de bioetanol empleando material rico en azúcares y almidón. La Figura 2 muestra el esquema del proceso general de producción de alcohol a partir biomasa vegetal. Sin embargo, no existen aún procesos comerciales para su producción a partir de material hemicelulósico, que permitirían el aprovechamiento de residuos agroindustriales a gran escala.

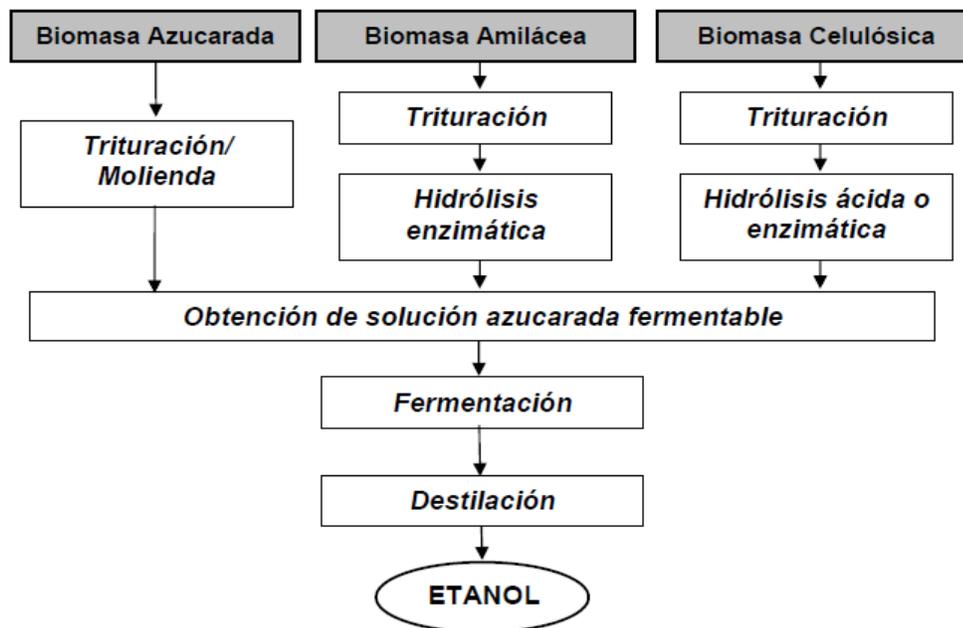


Figura 2. Esquema general de los procesos de producción de bioetanol a partir de biomasa vegetal (Masera Cerutti et al., 2006).

En México se ha impulsado la investigación y desarrollo de tecnologías enfocadas a la producción de biocombustibles a partir de diversos tipos de cultivos. Un reporte solicitado por la Secretaría de Energía (SENER) y publicado en 2006, concluyó que el bioetanol podría ser producido en el país a gran escala a partir de caña de azúcar, maíz, sorgo y remolacha, porque son cultivos ya disponibles y para los que existen tecnologías establecidas (Masera Cerutti et al., 2006).

Hasta el año 2011, la Red Mexicana de Bioenergía (REMBIO) ha identificado 372 proyectos a nivel nacional enfocados a la producción y transferencia de tecnologías en materia de biocombustibles. De éstos, el 59% están enfocados a la obtención de bioetanol a partir de cultivos de alta disponibilidad en México, como lo son la caña de azúcar, maíz y sorgo (Figura 3).

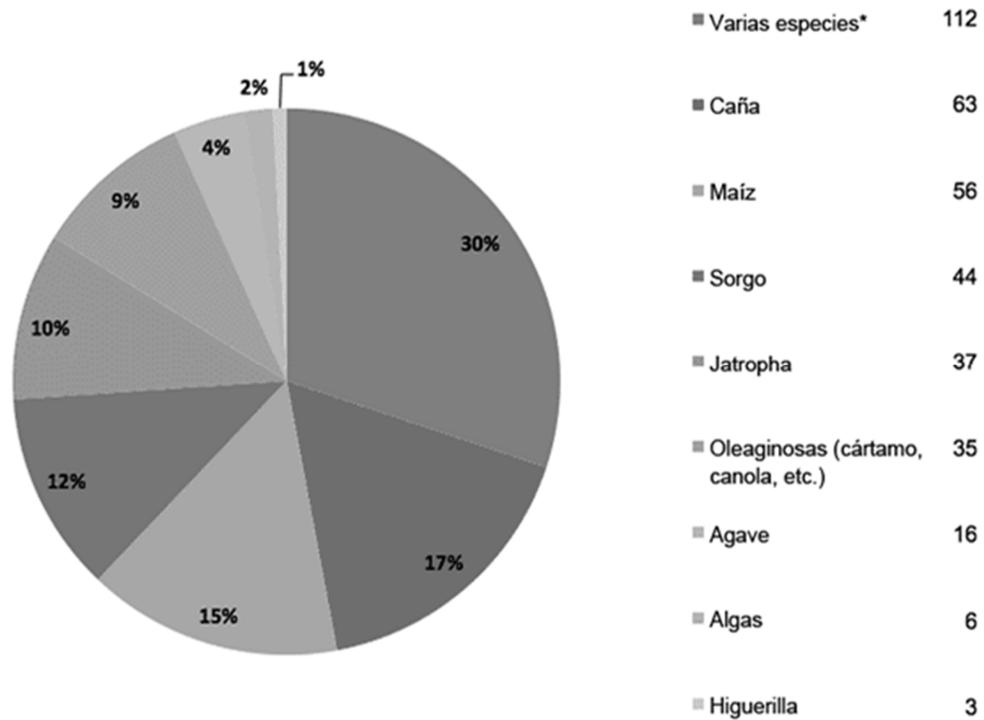


Figura 3. Proyectos de investigación sobre biocombustibles identificados por la REMBIO (SAGARPA, 2011).

Como parte de una reforma energética, se ha propuesto incorporar un 6% de bioetanol a las gasolinas de las tres zonas metropolitanas del país: México, Guadalajara y Monterrey. Esto generaría una demanda de 986 millones de litros de bioetanol para finales del año 2012 (SENER, 2009).

1.1.2.2 Obtención de Otros Compuestos de Interés Comercial

En comparación con otros países, en México es escasa la investigación o desarrollo de tecnologías enfocadas a la producción de compuestos químicos a partir de residuos agroindustriales.

La obtención del gluten de trigo produce como residuo sólido la cascarilla de trigo, y un efluente con residuos fermentables y minerales (Domínguez, 2000).

Domínguez-Espinosa et al. (2002) han empleado este desecho en el cultivo del hongo *Monascus purpureus* para la producción de pigmentos rojos y amarillos resistentes a altas temperaturas y a cambios extremos de pH, logrando rendimientos de hasta 140mg/L para pigmentos rojos y 60mg/L para pigmentos amarillos.

El proceso de nixtamalización del maíz para la producción de tortillas genera como residuo grandes volúmenes de nejayote, un efluente de alto pH (10-14) y materia orgánica, como almidón, carbohidratos solubles, hemicelulosa, proteínas y cal (Calderón, 1990).

Se han realizado esfuerzos para el aprovechamiento de los residuos de la industria de la tortilla. Domínguez-Espinosa et al. (2002) emplearon al nejayote como sustrato para *Aspergillus awamori* en la producción de amilasas, logrando producir 7.38 U/g de proteína, una actividad mayor a otros estudios donde se ha empleado la misma especie. Por otro lado, Sánchez-González et al. (2011) emplearon una cepa de *Bacillus flexus* NJY2 en cultivo con pericarpio de maíz, recuperado del nejayote, como sustrato para la obtención de ácido ferúlico, empleado como antioxidante. *B. flexus* generó una liberación máxima de 1.5g de ácido ferúlico por kilogramo de sustrato. La hidrólisis del pericarpio de maíz por *B. flexus* NJY2 indica la producción de xilanasas, enzimas que son una herramienta indispensable en la degradación de materiales lignocelulósicos para la generación de productos de valor agregado. En este estudio se realizará la detección y caracterización de las xilanasas producidas por *B. flexus* NJY2.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Compuestos Hemicelulósicos

Las paredes celulares vegetales rodean completamente a la célula por fuera de la membrana plasmática, y gracias a su morfología y composición pueden realizar diversas funciones. En plantas, las paredes aportan una barrera física contra patógenos u otros compuestos; se encargan de conexiones célula-célula para la formación de tejidos; tienen un papel en la señalización para el crecimiento y división, así como en el reconocimiento, transporte y secreción de moléculas; y definen y mantienen la forma de la célula. Estas estructuras ofrecen además rigidez, soporte y fuerza mecánica para la célula y estructuras macroscópicas de la planta (Lodish et al., 2003; Saupe, 2009).

Las paredes celulares en plantas son altamente heterólogas, formadas por una diversidad de complejos moleculares y polisacáridos solubles e insolubles. La composición básica de las paredes se da por diferentes capas de microfibrillas de celulosa embebidas en una matriz de pectina, lignina y hemicelulosa (Figura 4). La celulosa está formada por agrupaciones de

polímeros de glucosa largos y lineales de arreglo cristalino. Los monómeros de glucosa están unidos por enlaces β -glicosídicos. La pectina es un polímero de D-galacturonato y otros monosacáridos. La lignina es un polímero aromático sintetizado a partir de precursores fenilpropanoides, y puede encontrarse en concentraciones variables, principalmente en plantas leñosas. La hemicelulosa es un polímero altamente ramificado formado por monosacáridos de cinco o seis carbonos (Lodish et al., 2003; Pérez et al., 2002). La presencia y concentración de los polímeros en paredes celulares dependen de la ubicación, la especie o la etapa de crecimiento de la planta.

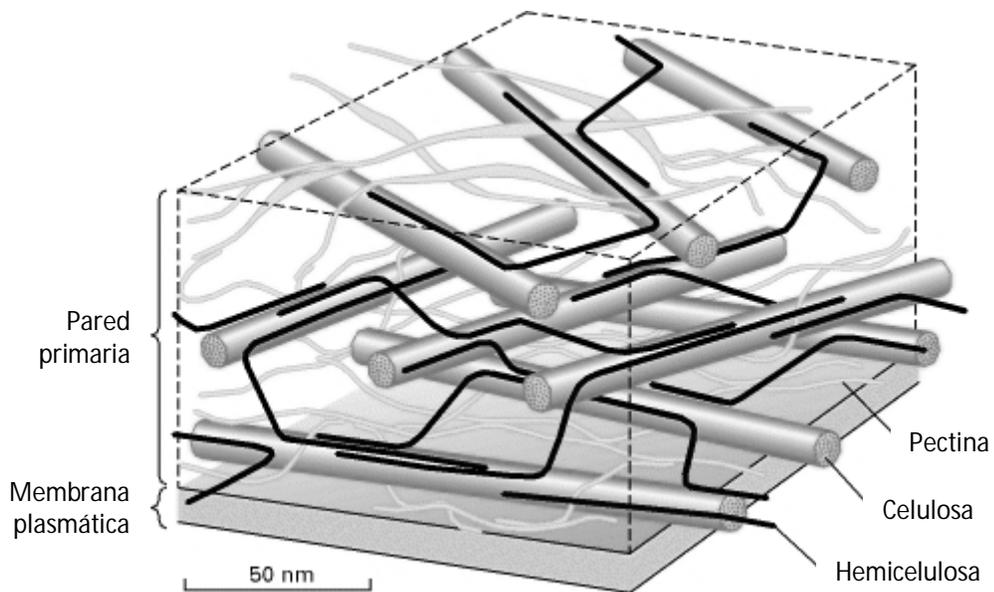


Figura 4. Representación esquemática de la pared celular vegetal de la cebolla. ("Schematic representation of the cell wall of an onion," 2000).

La celulosa y hemicelulosa comprenden más del 50% del peso seco de la biomasa vegetal total. De ésta, hasta el 50% puede estar formado completamente por hemicelulosa. La hemicelulosa es un complejo de

heteropolisacáridos de cadena corta, ramificados, y fácilmente hidrolizables. Estos polímeros protegen a la celulosa de ataques enzimáticos. Pueden estar compuestos por pentosas, hexosas y azúcares ácidos, formando xilano, xiloglucano, glucomanano, galactoglucomanano o arabinogalactano. Polímeros pentosados son comúnmente encontrados en maderas y residuos agroindustriales (Collins et al., 2005; Kuhad et al., 1997; Pérez et al., 2002; Saha, 2003).

De los diferentes componentes de la hemicelulosa, el xilano es el más abundante, encontrado en rangos de 7 a 30%. Esto convierte al xilano en uno de los polisacáridos más abundante en la naturaleza (Collins et al., 2005; Saha, 2003).

El xilano no forma agregados, es parcialmente soluble, y pudiera tener un papel importante en la cohesión de la pared celular. Este polímero es un polisacárido no muy compactado formado por una columna principal de D-xilanopiranosas. Los residuos de xilosa están unidos por enlaces β -1,4-glicosídicos. Las cadenas cortas ramificantes pueden estar formadas de azúcares, como arabinosa, ácido glucurónico o 4-O-metil éter, y ácidos acético, ferúlico y *p*-cumárico. La estructura típica de un xilano se muestra en la Figura 5 (Gilbert & Hazlewood, 1993; Kuhad et al., 1997; Pérez et al., 2002; Saha, 2003; Tombs & Harding, 1998).

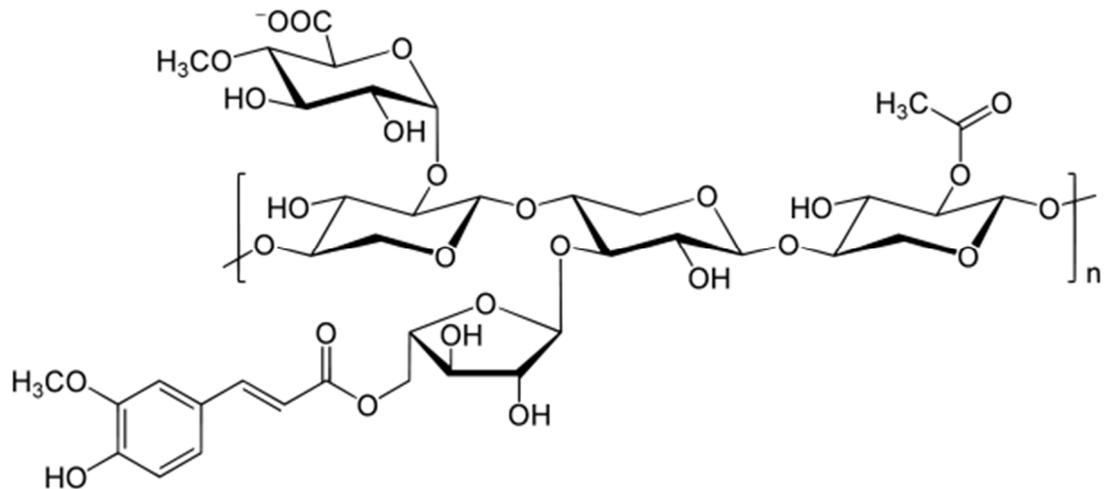


Figura 5. Estructura general del xilano. El esquema de un xilano típico muestra la columna de xilopiranosil unido por enlaces β -1,4-glicosídicos y ramificado por ácido glucurónico, arabinosa y ácido ferúlico (“Xylan,” n d).

2.1.1 Pre-tratamiento de Hemicelulosa para Hidrólisis de Xilano

La hidrólisis del xilano se puede realizar por métodos físicos, químicos o biológicos. Estos métodos se pueden emplear alternada o secuencialmente para una sacarificación más eficiente a partir de material rico en xilano. Debido a que la pared celular protege a la planta de ataques enzimáticos, es necesario el pre-tratamiento de la biomasa para poder realizar la biodegradación. El pre-tratamiento de la hemicelulosa aumenta la eficiencia de la degradación enzimática de 3 a 10 veces, dependiendo de la composición de la biomasa y el método empleado (da Costa Sousa et al., 2009).

El pre-tratamiento físico involucra el aumento del área superficial de la biomasa al reducirla a partículas más pequeñas, ya sea por vibración o molienda. Este proceso reduce también la cristalinidad y grado de

polimerización de los compuestos hemicelulósicos (da Costa Sousa et al., 2009).

Aún y cuando los métodos químicos son comúnmente empleados para la extracción y aislamiento de xilano, éstos pueden ser también efectivos para la hidrólisis, particularmente en la producción de xilooligosacáridos (XOS) (Rose & Inglett, 2010; Vegas et al., 2004). Los métodos químicos incluyen la exposición a pH extremos y vapor. Por una parte, los tratamientos ácidos rompen los enlaces glicosídicos encontrados en la columna de xilosa y residuos ramificantes del polímero, mientras que las soluciones alcalinas rompen los enlaces éster que unen a los ácidos fenólicos (Faulds et al., 1999).

La hidrólisis por vapor, o autohidrólisis, es un método en el que la biomasa es expuesta a temperaturas entre 160 y 290°C y una presión superior a 5 bar. Estas condiciones causan la liberación de grupos acetilo, generando un cambio en pH que favorece la hidrólisis (Alonso et al., 2003). A temperaturas mayores de 180°C, el material hemicelulósico es separado de la lignina y celulosa que forman la biomasa (Ingram et al., 2009).

La alta concentración de ácidos o bases requerida en los tratamientos de exposición a pH extremos, hacen de la autohidrólisis un proceso más sencillo para la degradación del xilano. Sin embargo, estas condiciones físicas pueden producir modificaciones al polímero o generar subproductos no deseados.

2.1.2 Degradación Enzimática de Hemicelulosa

Un método más suave para la hidrólisis de xilano es la degradación enzimática. En comparación con los métodos físicos y químicos, la degradación biológica es más eficiente energéticamente. Sin embargo, debido a la heterogeneidad del xilano, se necesita de un sistema enzimático complejo para su degradación.

Las xilanasas son enzimas que rompen los enlaces que unen a los azúcares en la columna del polímero. Además de las enzimas degradadoras de xilano, se requieren esterases para hidrolizar los enlaces éster entre la columna de xilosas y el ácido acético (acetilxilano esterasa), o ácidos fenólicos (feruloil o *p*-cumárico esterases). La Tabla 3 y Figura 6 muestran la actividad y sitios de corte para las enzimas que forman parte del sistema enzimático xilanolítico.

Tabla 3. Enzimas involucradas en la hidrólisis del xilano (Saha, 2003).

Enzima	Actividad
Endo-xilanasa	Hidroliza enlaces β -1,4 internos de la columna de xilano
Exo-xilanasa	Hidroliza enlaces β -1,4 liberando xilobiosa
β -xilosidasa	Libera xilosa de xilobiosa y xilooligosacáridos
α -arabinofuranosidasa	Hidroliza el extremo no reductor de α -arabinofuranosa
α -glucuronidasa	Libera ácido glucurónico
Acetilxilano esterasa	Hidroliza enlaces éster de grupos acetil
Feruloil esterasa	Hidroliza enlaces éster de ferulatos
Ácido <i>p</i> -cumárico esterasa	Hidroliza enlaces éster de <i>p</i> -cumaril

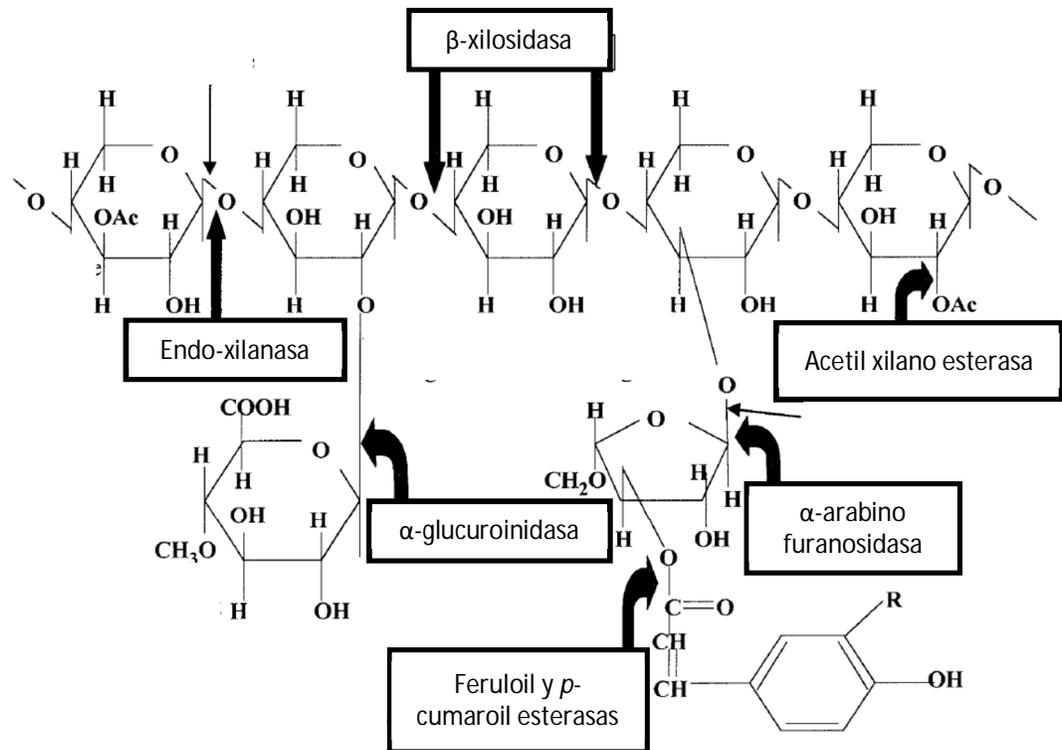


Figura 6. Estructura hipotética del xilano mostrando sus ramificaciones y los sitios de corte de las diferentes enzimas del sistema xilanólico (Beg et al., 2001).

2.2 Endo-xilanasas

Las xilanasas, inicialmente llamadas pentosanasas, fueron descritas por primera vez en 1955, y finalmente clasificadas como xilanasas en 1961. Éstas son *O*-glicósido hidrolasas que incluyen a enzimas con actividad digestiva sobre el xilano.

Existen tres enzimas con acción hidrolítica directa sobre la columna de xilano: endo-1,4-β-xilanasas (EC 3.2.1.8), exo-1,4-β-xilanasas, y β-xilosidasa (EC 3.2.1.37) (Tabla 3, Figura 6). De estas, las endo-1,4-β-xilanasas son de particular

importancia ya que son responsables de la hidrólisis de xilano en XOS de menor tamaño que permiten la parcial o total solubilización del sustrato, necesaria para la completa degradación. Esta hidrólisis parcial es también necesaria para la hidrólisis de los residuos ramificantes (Saha, 2003).

Las xilanasas son producidas por bacterias, algas y hongos. La mayoría de estas enzimas estudiadas hasta la fecha son de origen fúngico o bacteriano, extracelulares o unidas a membrana, mesofílicas, y de actividad óptima a pH neutro o ligeramente ácido. Sin embargo, se han descrito xilanasas que no sólo son estables sino activas en ambientes extremos. Xilanasas con actividad a temperaturas de 5 a 105°C, pH de 2 a 11, y ambientes de hasta 30% de salinidad han sido reportadas. Muchos microorganismos alcalófilos producen xilanasas con pH óptimo cerca de la región neutra, pero alta actividad en condiciones alcalinas (Collins et al., 2005), como *B. licheniformis* (Lee et al., 2008) y diversas cepas de *Bacillus* sp. (Avcioglu et al., 2005; Hamamoto et al., 1987; Okazaki et al., 1985; Sapre et al., 2005). Para *Bacillus* sp., se han reportado endo-xilanasas con pH óptimo de 5 a 10.5, y temperatura óptima de 30 a 75°C (Tabla 4).

Tabla 4. Características de algunas xilanasas identificadas en microorganismos del género *Bacillus*.

Microorganismo	Masa Molecular (kDa)	pH óptimo de actividad ^a	Temp (°C)	K _m (mg/mL)	V _{max}	pl	Ref.
<i>B. licheniformis</i>	23	5-7	40-50	6.7	379 μmol/min/mg	---	(Lee et al., 2008)
<i>B. stearothermophilus</i> T-6	43	6.5 (6.5-10)	65	1.63	288 U/mg	9 / 6.8	(Gat et al., 1994; Khasin et al., 1993)
<i>B. subtilis</i> R5	23	7	30	4.5	5550 nkat/mg	---	(Jalal et al., 2009)
<i>Bacillus</i> sp. C-125	48	(5-11)	---	---	---	---	(Hamamoto et al., 1987; Honda et al., 1985)
	43	(6-12)					
	16	(6-7)					
<i>Bacillus</i> sp. 41M-1	36	9	50	3.3	1,100 μmol/min/mg	---	(Nakamura et al., 1993)
<i>Bacillus</i> sp. AR-009	23	9 (5-11)	60-70	---	---	---	(Gessesse, 1998)
	48	9-10 (5-11)	70-75				
<i>Bacillus</i> sp.	44	6.5, 8.5 y 10.5 ^b	50	0.025	450 U/mg	---	(Sapre et al., 2005)
<i>Bacillus</i> sp.	22, 23 y 40	6.5 (4.5-10)	50	---	180 U/mg	---	(Avcioglu et al., 2005)

^a pH óptimo (rango de actividad)

^b Picos de actividad

Los microorganismos, según su especie, son capaces de producir una o más formas isoenzimáticas de xilanasas. Se ha demostrado la existencia de glicohidrolasas con actividad sobre más de un tipo de polisacárido. La actividad de estas enzimas es generalmente menos eficiente que la de enzimas con actividad para un solo sustrato (Wong et al., 1988).

Actualmente existen 96 familias de glicohidrolasas, agrupadas según la conservación de la secuencia primaria del dominio catalítico. Seis familias agrupan a las enzimas que han demostrado actividad sobre el xilano, y de éstas, las familias 10 y 11 (anteriormente F y G) incluyen principalmente proteínas de actividad endoenzimática y preferencia por el xilano como sustrato. Xilanasas con estas características son consideradas las “verdaderas

xilanasas". Las familias 10 y 11 presentan xilanasas provenientes de *Bacillus* sp. (Henrissat, 1991).

2.2.1 Características Moleculares

Ciertas glicohidrolasas toleran algunas sustituciones en los polímeros de azúcar (Collins et al., 2005); sin embargo, es común que algunos microorganismos produzcan más de una forma de enzimas con actividad xilanasas. Estas no necesariamente tendrán la misma especificidad de sustrato, efectividad catalítica, o mostrarán actividad bajo las mismas condiciones. Es común, incluso, que las bacterias produzcan dos xilanasas: una de alta masa molecular y con actividad en medios ácidos, y otra de baja masa molecular con actividad en medios alcalinos (Kulkarni et al., 1999). El tamaño molecular de las xilanasas tiene un rango muy amplio, entre 8 y 145 kDa (Sunna & Antranikian, 1997).

La multiplicidad de xilanasas en un microorganismo podría deberse a diferentes causas. Se ha sugerido un aumento en el número de genes codificantes de glicohidrolasas en general debido a la alta estructuración del sustrato, que no evidencia los sitios de corte a la enzima (Kulkarni et al., 1999). Muchas copias de un gen podrían sobre-expresar la enzima para aumentar la eficiencia de hidrólisis de un sustrato. Por otra parte, se ha propuesto que la heterogeneidad del sustrato es causa de esta diversidad (Gilkes et al., 1991). Una alta sustitución en los monómeros del xilano, así como la gran variedad en

la composición de los diferentes tipos de pared celular, podrían requerir una diversidad de sitios catalíticos que otorguen versatilidad a las enzimas presentes en el microorganismo.

Debido a la gran variedad de formas isoenzimáticas que se pueden encontrar en una especie única de bacterias, así como su aparente diversidad filogenética, se ha sugerido que la multiplicidad de xilanasas se debe a la transferencia horizontal entre diferentes grupos de procariotas, y no necesariamente al procesamiento del producto post-traducciona l de un solo gen amplificado (Gilbert & Hazlewood, 1993; Gilkes et al., 1991).

El entendimiento de la estructura y función de estas enzimas recae en gran parte en la comparación de sus dominios con secuencias de xilanasas ya estudiadas. Por lo que su clasificación basada en la secuencia del dominio catalítico cobra importancia para el entendimiento de su función. Sin embargo, las familias de xilanasas pueden incluir enzimas con otro tipo de actividad glicohidrolítica. No se han encontrado homologías obvias que puedan separar a las xilanasas del resto de las glicohidrolasas con las que comparten familia (Kulkarni et al., 1999).

2.2.1.1 Dominios Catalíticos de Xilanasas

Las “verdaderas xilanasas” presentan un solo dominio catalítico altamente conservado y tiende a ser de tamaño regular aunque la enzima total varía en su longitud (Gilbert & Hazlewood, 1993; Gilkes et al., 1991). La Tabla 5 muestra el

tamaño en número de aminoácidos para algunas xilanasas y sus dominios catalíticos.

Tabla 5. Familias de dominios catalíticos de xilanasas (Gilkes et al., 1991).

Familia	Microorganismo	Enzima	No. de aminoácidos	Dominio catalítico	
				Término	No. de aminoácidos
10	<i>Bacillus</i> sp. C-125	XynA	396	---	---
	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	XynA	378	N	~350
	<i>Caldocellum saccharolyticum</i>	CelB	1,011	N	347
		XynA	312	---	---
		ORF 4	312	---	---
	<i>Cellulomonas fimi</i>	Cex	443	N	315
	<i>Clostridium thermocellum</i>	XynZ	809	C	~350
	<i>Cryptococcus albidus</i>	Xyn	311	---	---
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> subsp. <i>cellulosa</i>	XynA	585	C	342
		XynB	555	C	272
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Xyn	269	---	---	
11	<i>Bacillus circulans</i>	Xyn	185	---	---
	<i>Bacillus pumilis</i>	XynA	201	---	---
	<i>Bacillus subtilis</i>	Xyn	182	---	---
	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	XynB	234	---	---

Los dominios catalíticos de cada familia se encuentran en variadas combinaciones con secuencias conservadas, como dominios de unión a celulosa y secuencias repetidas. Esto da lugar a un número variado de estructuras primarias en xilanasas (Gilkes et al., 1991).

Debido a que el glutamato y aspartato son los aminoácidos involucrados en el mecanismo catalítico de xilanasas pertenecientes a las familias 10 y 11 y la histidina tiene un papel en la estabilización de la proteína, la conservación de estos residuos es un buen punto de partida para el estudio de dominios catalíticos por comparación de secuencias (Collins et al., 2005; Paice & Jurasek, 1979; Zvelebil & Sternberg, 1988).

2.3 Aplicaciones de las Xilanasas

2.3.1 Industria Papelera

Actualmente, la principal aplicación de las xilanasas es la preparación y blanqueamiento de la pulpa para papel (Polizeli et al., 2005).

El método de mayor uso para el blanqueamiento de la pulpa es el proceso Kraft. Este método involucra los siguientes pasos:

1. Pre-tratamiento de la madera con hidróxido de sodio y sulfuro de sodio.
2. Primer blanqueamiento con oxígeno.
3. Segundo blanqueamiento de tres etapas: (a) ozono y dióxido de cloro; (b) hidróxido de sodio, oxígeno y peróxido de hidrógeno; y (c) dióxido de cloro.

Además de los altos costos y bajo rendimiento en la obtención de papel, el proceso Kraft emplea agentes contaminantes en altas cantidades, y el uso de cloro resulta en la producción de organoclorados que son altamente tóxicos y mutagénicos. El empleo de xilanasas en el pre-blanqueamiento genera una reducción de 30% en el uso de compuestos clorados y una reducción de 15-20% de éstos en los efluentes de la industria (Polizeli et al., 2005; Zamost et al., 1991).

Para el proceso de blanqueamiento enzimático se emplean xilanasas principalmente de origen fúngico, sin actividad celulasa y capaces de degradar a temperaturas y pH extremos. Diversos hongos y bacterias se han explotado para la producción de enzimas con aplicación en la industria del papel (Tabla 6).

Tabla 6. Microorganismos estudiados en relación a la eficiencia de sus xilanasas en el proceso de blanqueado de la pulpa de papel.

Microorganismo	Referencia
<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	(Garg et al., 1996)
<i>Streptomyces roseiscleroticus</i>	(Patel et al., 1993)
<i>Streptomyces</i> sp.	(Beg et al., 2000; Georis et al., 2000)
<i>Streptomyces galbus</i>	(Kansoh & Nagieb, 2004)
<i>Bacillus</i> sp.	(Kulkarni & Rao, 1996; Shah et al., 1999)
<i>Bacillus pumilus</i>	(Bim & Franco, 2000; Duarte et al., 2003)
<i>Bacillus circulans</i>	(Dhillon et al., 2000)
<i>Aspergillus kawachii</i>	(Tenkanen et al., 1997)
<i>Aspergillus oryzae</i>	(Christov et al., 1999)
<i>Aspergillus niger</i>	(Zhao et al., 2002)
<i>Aspergillus nidulans</i>	(Taneja et al., 2002)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	(Lenartovicz et al., 2002)
<i>Chaetomium cellulolyticum</i>	(Baraznenok et al., 1999)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	(Haarhoff et al., 1999)
<i>Trichoderma reesei</i>	(Oksanen et al., 2000)
<i>Acrophilophora nainiana</i> y <i>Humicola grisea</i>	(Salles et al., 2005)

2.3.2 Biorefinería

Productos de la degradación del xilano, como β -D-xilanopiranosil, pueden ser procesados para la producción de etanol. Los residuos de β -D-xilanopiranosil representan del 5 al 20% de los azúcares empleados para la producción de alcoholes combustibles (Polizeli et al., 2005).

El proceso de biorefinería para la producción de combustibles involucra una deslignificación inicial para la liberación de celulosa y hemicelulosa, seguida de

una despolimerización de los carbohidratos y una subsecuente fermentación de los azúcares liberados para la producción del alcohol (Lee, 1997).

Se ha realizado con éxito la producción a gran escala de etanol a partir de xilano empleando las levaduras *Pichia stipitis* y *Candida shehatae* (Canilha et al., 2010), cepas de *Saccharomyces cerevisiae* genéticamente modificadas (Sonderegger et al., 2004), y diversas xilanasas termófilas y termoestables (Turner et al., 2007).

2.3.3 Industria de Piensos

El arabinoxilano soluble presente en los ingredientes del alimento para aves y porcinos aumenta la viscosidad del alimento ingerido, dificultando la movilidad. Al agregar xilanasas al alimento, se reduce esta viscosidad en los intestinos permitiendo una mejor absorción de nutrientes (Bedford & Classen, 1992; Twomey et al., 2003).

Junto con otras enzimas, las xilanasas también son empleadas como pre-tratamiento en el alimento de rumiantes para aumentar la digestibilidad, y por ende el valor nutricional, del alimento (Gilbert & Hazlewood, 1993).

2.3.4 Industria de Alimentos

Preparaciones enzimáticas que contienen xilanasas degradan la hemicelulosa presente en las harinas, ayudando a la redistribución de agua, lo

que hace a la masa más suave y fácil de manipular. Durante el horneado, las enzimas retrasan la formación de grumos, permitiéndole a la masa crecer. La adición de xilanasas permite el incremento en los volúmenes de los panes y ofrece una resistencia a la fermentación (Camacho & Aguilar, 2003; Maat et al., 1992).

Estas hemicelulasas son empleadas también en la obtención y aclaramiento de jugos, cerveza y vinos. Son aplicadas para la licuefacción de frutas y verduras; estabilización de la pulpa; incremento en la obtención de aromas, aceites, vitaminas, minerales y pigmentos; reducción de la viscosidad en las bebidas; e hidrólisis de sustancias que puedan causar turbidez (Biely, 1985; Dekker, 1979; Ganga et al., 1999; Wong & Saddler, 1993).

2.3.5 Industria Textil

No se ha investigado de manera importante la preparación de fibras textiles mediante hidrólisis enzimática; sin embargo, esta es un área de gran potencial. Complejos xilanólíticos sin actividad celulasa pueden ser empleados para el tratamiento de fibras, como lino, algodón o yute (Polizeli et al., 2005). Además de eliminar el xilano de las fibras de celulosa, este método evita la oxidación de la lignina presente, que produce un oscurecimiento de las fibras. Así, empleando procesos biológicos, se puede reducir o eliminar la necesidad de etapas de blanqueamiento químico (Csiszár et al., 2006).

2.3.6 Farmacéutica

Las xilanasas han sido empleadas en la industria farmacéutica de manera limitada. Se sabe que éstas enzimas pueden emplearse en combinación con otras hemicelulasas y proteasas como suplemento alimenticio para tratar la mala digestión, pero existen sólo algunos productos medicinales disponibles (Polizeli et al., 2005).

Productos obtenidos a partir de la degradación biológica con xilanasas tienen también aplicaciones potenciales en la salud.

Los xilooligosacáridos (XOS) han demostrado capacidad prebiótica, con el potencial agregado de poder incorporarse a diferentes productos alimenticios. Los beneficios nutricionales han sido evidentes para diferentes especies con comunidades bacterianas intestinales complejas. El mecanismo que otorga esta actividad prebiótica a los XOS no ha sido esclarecido del todo. Se sabe, sin embargo, que la fermentación de estos XOS resulta en la acidificación del ambiente colónico y en la formación de ácidos de cadena corta, que pudieran tener un papel en la regulación de procesos celulares (Aachary & Prapulla, 2011).

A partir de xilosa es posible sintetizar xilitol, un polialcohol con propiedades edulcorantes. A diferencia de otros azúcares, el xilitol no es cariogénico, y al aportar 40% menos carga energética que la sacarosa, es recomendado para individuos diabéticos u obesos. Es también empleado para la prevención o

tratamiento de osteoporosis, desórdenes metabólicos, lesiones renales y parenterales, e infecciones de oído, respiratorias y sepsis (Maguire & Rugg-Gunn, 2003; Marti et al., 2008; Mattila, 1999; Parajó et al., 1998; Uhari et al., 1998; Zabner et al., 2000).

Oligosacáridos ácidos obtenidos a partir de xilano mediante degradación enzimática con endo-xilanasas de la familia 10 y 11 han demostrado actividad antimicrobiana contra diversas cepas aerobias Gram positivas y Gram negativas, así como contra la microaerófila *Helicobacter pylori* (Christakopoulos et al., 2003). Oligosacáridos ferulados obtenidos por hidrólisis enzimática han demostrado también actividad antioxidante, importante en la inhibición de la peroxidación de lipoproteínas, lo que disminuye el riesgo de aterosclerosis (Katapodis et al., 2003).

2.3.7 Otras Aplicaciones

Otras áreas de aplicación para las xilanasas incluyen:

1. Digestión enzimática de residuos industriales como alternativa a vertederos (Gilbert & Hazlewood, 1993).
2. Transglicosilación del xilano para la producción de alquil-glicósidos para su uso como surfactantes (Matsumura et al., 1999).
3. El lavado de equipo de súper precisión y semiconductores (Imanaka & Sakurai, 1992).

4. En la investigación, para la caracterización de polisacáridos y paredes celulares, así como para la producción de protoplastos (Wong et al., 1988).

2.4 Bacterias Alcalófilas

Ciertos procesos enzimáticos requieren ser llevados a cabo bajo condiciones extremas de temperatura o pH, por lo que enzimas que muestran tolerancia y estabilidad bajo estas condiciones confieren una ventaja al proceso.

Los microorganismos alcalófilos son aquellos que requieren un pH de 9 o mayor para su crecimiento, óptimamente entre 10 y 12, y no crecen a pH's cercanos a la neutralidad o ácido (<6.5). Un microorganismo alcalófilo facultativo puede soportar pH's elevados y crecer en regiones cercanas a la neutralidad (Horikoshi, 1999a). Es por esto que es posible encontrar bacterias alcalófilas en ambientes de variado pH (Figura 7).

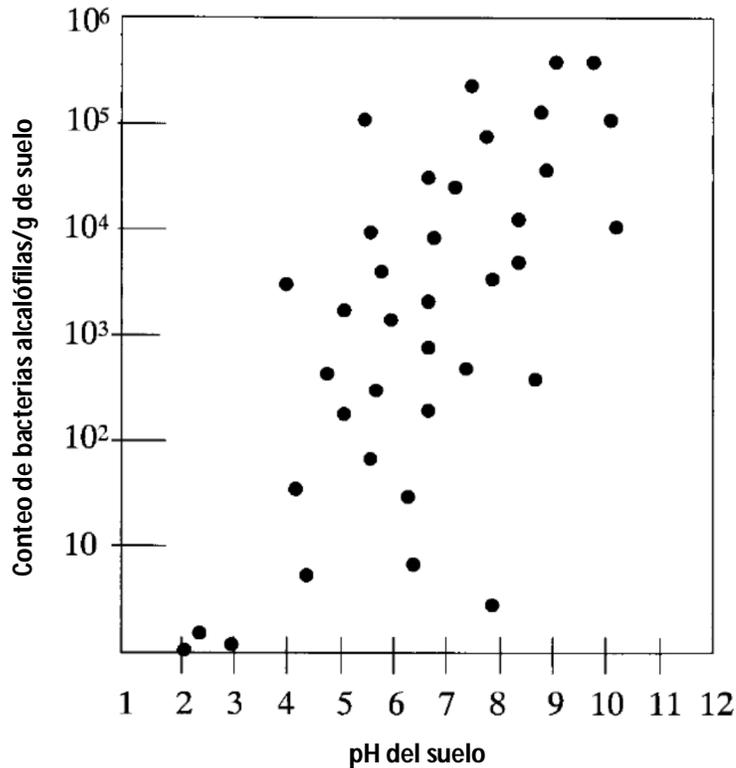


Figura 7. Distribución de microorganismos alcalófilos en ambientes a diferentes pH (Horikoshi, 1999a).

Debido a esta preferencia o tolerancia a pH's elevados, las bacterias alcalófilas producen enzimas extracelulares adaptadas para la actividad en ambientes alcalinos. Por esto, las bacterias alcalófilas son ideales para ser empleadas como biocatalizadores o para la producción y aislamiento de enzimas de potencial aplicación industrial.

Los requerimientos para el crecimiento de microorganismos alcalófilos representan una desventaja en términos económicos y energéticos. En cambio, las bacterias alcalófilas facultativas, al tolerar un rango de pH más amplio, pueden ser cultivadas a gran escala para la producción de enzimas.

2.4.1 *Bacillus flexus*

Bacillus flexus (ex Batchelor 1919; Priest et al. 1989) es un alcalófilo facultativo capaz de crecer en ambientes con pH máximo de 12, y es encontrada comúnmente en ambientes alcalinos, como suelo y heces. El microorganismo también es tolerante a alta salinidad, capaz de crecer en medios con cloruro de sodio (NaCl) al 10% (Kannan et al., 2009; Priest et al., 1988; Sánchez-González et al., 2011).

B. flexus es una bacteria Gram positiva, aerobia y formadora de esporas. Cepas de esta especie tienen propiedades similares a *B. megaterium*, pero se diferencian de estas principalmente por su tamaño, al ser más pequeñas con un ancho promedio de 0.9µm. Esta bacteria degrada almidón y polipéptidos, como la caseína, elastina y gelatina. No se ha reportado la producción de 3-hidroxiбутanona, según la prueba Voges-Proskauer, ni ácidos a partir de pentosas (Claus & Berkeley, 1986; Hunger & Claus, 1981; Priest et al., 1988).

Sólo un estudio ha reportado una evaluación de actividad xilanolítica en *B. flexus*. Las cepas SR4.3 y SR8.4 aisladas de aguas termales en Tailandia fueron evaluadas en conjunto con miembros de otros géneros, más no se encontró actividad evidente (Pakpitcharoen et al., 2008).

Sánchez-González et al. (2011) aislaron cepas de *Bacillus* del nejayote. Las cepas NJY2 y NJY4 fueron identificadas como *Bacillus flexus* mediante análisis

de secuencias de ADNr 16S, mostrando 99.8-100% de similitud con dicha especie.

2.4.1.1 *Bacillus flexus* NJY2

La cepa *B. flexus* NJY2 es capaz de crecer en medio alcalino con pericarpio de maíz produciendo un sobrenadante viscoso, señales de hidrólisis y uso de hemicelulosa. Este cepa de *Bacillus* también mostró altos niveles de actividad para feruloil esterasa (FAE) (Sánchez-González et al., 2011). Esta enzima hidroliza el enlace éster del ácido ferúlico, un residuo común encontrado en el xilano. Debido a la asociación del ácido ferúlico y el xilano, es común encontrar xilanasas en microorganismos con actividad FAE y viceversa. Aún y cuando la actividad xilanólítica en *B. flexus* no ha sido demostrada, la actividad FAE encontrada en *B. flexus* NJY2 y su capacidad de crecer en un medio rico en hemicelulosa hacen de esta cepa un posible candidato para la producción de xilanasas.

CAPÍTULO 3

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

La cepa *Bacillus flexus* NJY2 produce una enzima de actividad endo-xilanolítica con capacidades catalíticas en ambientes alcalinos.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo General

Caracterizar una endo-xilanasa producida por *Bacillus flexus* NJY2.

3.2.2 Objetivos Específicos

1. Detectar la actividad xilanasa.
2. Producir una endo-xilanasa por cultivo de *B. flexus* NJY2.
3. Clasificar molecularmente la enzima.

CAPÍTULO 4

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Microorganismos

4.1.1 *Bacillus flexus* NJY2

B. flexus NJY2 fue conservado a 4°C en medio IOWA.

4.1.2 *Escherichia coli* top10

La biblioteca genómica de *B. flexus* NJY2 fue elaborada mediante la inserción de fragmentos del genoma en plásmidos pJET1.2 introducidos en *E. coli* top10. Las colonias se conservaron en caldo lisogénico Lennox a 4°C.

4.1.3 *Bacillus subtilis* B23

B. subtilis B23 fue proporcionada por el Instituto de Biocatálisis Técnica de la Universidad Tecnológica de Hamburgo-Harburgo (TUHH), Alemania.

4.1.4 *Bacillus subtilis* DSM-10

B. subtilis L, una cepa productora de endo-xilanasas, fue proporcionada por el Instituto de Microbiología Técnica de la TUHH.

4.2 Medios de Cultivo

4.2.1 Medios utilizados para *Bacillus flexus* NJY2

Medio Iowa para conservación de la cepa: 5g/L (p/v) pericarpio de maíz, 5g/L (p/v) extracto de levadura, 20g/L (p/v) dextrosa, 8g/L (p/v) Ca(OH)_2 y 18g/L (p/v) agar bacteriológico (BD Bioxon, Maryland, EUA). El Ca(OH)_2 se esterilizó por separado. El medio se ajustó a pH=9.

Medio Agar-Xilano (AX) para evaluar la actividad xilanasas: 10g/L (p/v) xilano de haya (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) y 18g/L (p/v) agar bacteriológico. El medio se ajustó a pH=9.

Medios para la producción de la enzima:

Medio Extracto de Levadura-Peptona (YEP): 5g/L (p/v) extracto de levadura, 5g/L (p/v) peptona, 1g/L (p/v) KH_2PO_4 y 0.2g/L (p/v) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. El medio se preparó en buffer de glicina-NaOH 0.2M pH=9.

Medio Xilosa (XSA): Medio YEP y 10g/L (p/v) xilosa. La xilosa fue suspendida y esterilizada por separado, y se dejó enfriar antes de ser agregada al medio YEP.

Medio Xilano 1% (XC): Medio YEP y 10g/L (p/v) xilano de haya. El xilano fue suspendido y esterilizado por separado, y se dejó enfriar antes de ser agregado al medio YEP.

Medio Xilano 0.1 % (XC0.1): Medio XC, disminuyendo 10 veces la concentración de xilano de haya.

4.2.2 Medios utilizados para *Escherichia coli* top10

Caldo Lisogénico Lennox (LBL) (BD Difco, Maryland, EUA) para crecimiento y conservación de la cepa: Se preparó según instrucciones del fabricante. 100µg/mL (p/v) de ampicilina fueron adicionados. Se agregó la cantidad necesaria de agar bacteriológico para obtener una concentración final de 18g/L (p/v) agar cuando fue requerido. El medio se ajustó a pH=7.

LB-Lennox-Xilano (LBX) para evaluar la actividad xilanasa: Se preparó medio LBL, y se adicionaron xilano de haya y agar bacteriológico hasta alcanzar concentraciones de 10g/L (p/v) y 18g/L (p/v), respectivamente.

4.2.3 Medios utilizados para *B. subtilis* B23 y DSM-10

Se empleó medio LBL para la conservación de las cepas, y XC0.1 para la producción de endo-xilanasa.

Todos los medios y suspensiones se prepararon en agua bidestilada (H₂O_{bd}), a excepción del medio YEP. Se empleó NaOH para ajustar el pH indicado. Los medios fueron esterilizados a 121°C, 15psi, por 20min.

4.3 Producción de la Endo-xilanasa por *B. flexus* NJY2

4.3.1 Crecimiento Bacteriano e Inóculo Inicial

El crecimiento bacteriano fue monitoreado por densidad óptica (DO) diluyendo 100µL de muestra en 900µL de H₂O_{bd} y midiendo la absorbancia a 600nm.

Para el ajuste del inóculo bacteriano inicial se consideró el crecimiento logarítmico tomando como base una absorbancia de 1 unidad a 600nm para 1×10^9 unidades formadoras de colonias (UFC/mL). Para cultivos de primera etapa, las células fueron resuspendidas en 1mL de buffer fosfato salino (2g (p/v) KCl, 2.4g (p/v) KH₂PO₄, 80g (p/v) NaCl y 21.6g (p/v) Na₂HPO₄·7H₂O). Para cultivos de segunda etapa, 100µL de cultivo de primera etapa fueron agregados a 900µL de buffer fosfato salino. La DO de estas suspensiones fue medida y, de

ser necesario, ajustada con el mismo buffer a 0.1 unidades de absorbancia antes de inocular el medio.

4.3.2 Condiciones de Cultivo

Los cultivos en medios con agar y caldo fueron incubados a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ (*B. flexus*), o $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ (*E. coli*). Los cultivos en caldo se realizaron en dos etapas, en volúmenes de 50mL contenidos en matraces Erlenmeyer de 250mL, y se incubaron a las temperaturas antes mencionadas con agitación a 150 revoluciones por minuto (rpm).

4.3.3 Monitoreo de Crecimiento por Microscopía

Se empleó un microscopio óptico para monitoreo del crecimiento bacteriano. Una muestra de 10 μL de cultivo de *B. flexus* NJY2 fue colocada sobre un portaobjetos y observada directamente bajo microscopio. Las muestras fueron tomadas en periodos de una hora.

4.3.4 Separación de Células y Extracto Crudo

Posterior a la fermentación, el cultivo fue centrifugado a $17670\times g$, a 4°C por 20min. El sobrenadante (extracto crudo) fue esterilizado por filtración empleando una membrana con poro de $0.2\mu\text{m}$. Las células fueron lavadas dos veces con 5mL de buffer MOPS 0.1M pH=7.5, y tratadas con cloranfenicol

(100µg/mL). Tanto extracto como células fueron almacenados a 4°C para su uso posterior.

4.3.5 Ultrafiltración

Se empleó una cámara de ultrafiltración Amicon de 50mL y una membrana de celulosa con tamaño de corte de 10kDa (Millipore, Billerica, EUA).

4.4 Caracterización de la Endo-xilanasa

4.4.1 Zimograma

Para los zimogramas se empleó como muestra el extracto crudo de *B. flexus* NJY2. La bacteria fue cultivada en medio XSA por 48h a 28°C, 150 rpm. El extracto crudo (3.3.4) fue concentrado mil veces por ultrafiltración.

Electroforesis en geles de poliacrilamida se realizaron según el método de Laemmli (Laemmli, 1970).

Gel separador de poliacrilamida 12%: 10mg/mL (p/v) xilano de haya, H₂O_{bd} (1.7mL), acrilamida 30% (2mL), buffer Tris-HCl 1.5M, pH=8.8 (1.3mL), SDS 10% (50µL), persulfato de amonio 10% (APS) (50µL), y TEMED (2µL).

Gel concentrador: H₂O_{bd} (1.4mL), acrilamida 30% (330µL), buffer Tris-HCl 0.5M pH=6.8 (250µL), SDS 10% (20µL), APS 10% (20µL), y TEMED (2µL).

Previo a la electroforesis, las muestras fueron incubadas en buffer de tratamiento (buffer Tris-HCl 0.125M pH=6.8, SDS 4%, glicerol 20%) por 5min.

Las electroforesis se realizaron en buffer de glicina (0.192M glicina, 0.025M Tris pH=8.3, SDS 0.1%), a 25mA.

Posterior a la electroforesis, el gel fue lavado con buffer MOPS 100mM, pH=8 y Tween 20% por 30min, y después incubado en buffer MOPS 100mM, pH=8 a 40°C y 40 rpm durante toda una noche.

4.4.2 Hidrólisis en Placa

B. flexus NJY2 fue cultivado en medio lowa por 24hr a 28°C y 150 rpm. Las células y el extracto crudo fueron separados (3.3.4), y 10 µL de cada uno fueron transferidos a una placa AX e incubados por 48hr a 28°C.

Para evaluar la actividad de *E. coli* top10, diez colonias de la cepa fueron cultivadas por separado en medio LBL por 24hr a 37°C y 150 rpm. Las células fueron separadas del extracto crudo y transferidas a una placa LBX, e incubada por 48hr a 37°C.

4.4.3 Tinción de Xilano

El xilano polimerizado con agar o poliacrilamida fue incubado con 5mL de rojo Congo al 0.1% (p/v), a temperatura ambiente por 10min, y posteriormente lavado con 5mL de NaCl 1M por 10min.

4.4.4 Ensayos de Actividad Xilanólítica

Se emplearon 20g/L de xilano disuelto en H₂O_{bd} como sustrato para la determinación de actividad enzimática. La reacción se inició al agregar 250μL de sustrato a 250μL de muestra (cultivo bacteriano, extracto crudo o células). La reacción se incubó a 30°C, 500 rpm por 60min. Después del tiempo de reacción, la enzima fue inactivada al mezclarse con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). En el caso de reacción con células, las muestras fueron centrifugadas a 17670xg por 1 min antes de agregar el DNS. Se empleó una reacción con 250μL de sustrato y 250μL de H₂O_{bd} como control negativo. La actividad xilanólítica se determinó por medición de azúcares reductores totales. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y en casos de escasez de muestra al menos por duplicado.

4.4.5 Medición de Azúcares Reductores Totales

Los azúcares reductores (AR) obtenidos por la hidrólisis del xilano fueron cuantificados mediante el método del DNS (Miller, 1959). Después de mezclar 1

volumen de DNS (16g/L (p/v) NaOH, 10g/L (p/v) DNS y 300g/L (p/v) $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$ en H_2O_{bd}) con 1 volumen de muestra producto de la reacción descrita en la sección 3.4.3, la reacción fue incubada a 95°C por 15min e interrumpida por shock térmico con hielo durante 5min. La muestra fue diluida dos veces con H_2O_{bd} y equilibrada a temperatura ambiente antes de su lectura por espectrofotometría a 540nm. Se empleó H_2O_{bd} como blanco. Para el cálculo de la concentración se utilizó xilosa en H_2O_{bd} como estándar. Una unidad de actividad xilanolítica se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μ mol de xilosa por minuto.

4.4.6 Extracción de ADN Total de *B. flexus* NJY2

La extracción de material genómico total de *B. flexus* se realizó con microondas (Saini et al., 1999) empleando cultivos de 12h incubados a 28°C, 150 rpm. 1mL del cultivo de *B. flexus* fue centrifugado a 2820xg, 4°C por 10min. La pastilla de células fue resuspendida en 1mL de buffer MOPS y calentada en microondas por 60s. La suspensión fue centrifugada a 22360xg durante 10min, y el sobrenadante con los ácidos nucleicos fue recuperado y almacenado a -20°C.

4.4.7 Aislamiento de Plásmido de *E. coli* top10

E. coli fue inoculada en medio LBL e incubada durante 12h, a 37°C y 150 rpm. Las células fueron separadas del medio por centrifugación a 2820xg, 4°C

por 30min, y empleadas para la extracción del plásmido pJET1.2. El aislamiento del plásmido se realizó utilizando el kit *High Pure Plasmid Isolation* (Roche, Indianapolis, EUA) según las instrucciones del fabricante. El plásmido fue almacenado a -20°C.

4.4.8 Diseño de Iniciadores

La xilanasa 10A de *B. firmus* y la xilanasa BxyN de *B. megaterium* CX3 se emplearon como templete para el diseño de iniciadores para amplificación de los dominios catalíticos de las familias 10 y 11 de glicohidrolasas (GH10 y GH11), respectivamente. Las secuencias fueron obtenidas de la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las secuencias templete de xilanasa 10A (GenBank: AY376353.1) y BxyN (GenBank: GQ228845.1) fueron analizadas en Primer3 v.0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) para el diseño de iniciadores. La Tabla 7 muestra la secuencia de los iniciadores y sus características.

Tabla 7. Iniciadores para la amplificación de GH10 y GH11.

Iniciador	Secuencia	Inicio	Longitud (pb)	T _m (°C)	%GC
DF10	5'-AAAGCCTTTTGTTGCTGGAC-3'	18	20	59.4	45.0
DR10	5'-TTAATCAATAATTCCCCAGTAAGCA-3'	1191	25	60.1	32.0
DF11	5'-AGAATTTCTTAGTGGGATTAACG-3'	17	23	55.9	34.8
DR11	5'-TTACCACACTGTTACGTTAGAACT-3'	642	24	55.0	37.5

4.4.9 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

4.4.9.1 PCR Punto Final

Las condiciones para la reacción de PCR inicial involucró un diseño de experimentos evaluando diferentes concentraciones de iones de magnesio Mg^{2+} (1.5, 2.5 y 3.0mM) y diferentes temperaturas de alineamiento (T_a) para GH10 (52.2-64.0°C) y GH11 (51.0-58.1°C). ADN total de *B. flexus* NJY2 o el plásmido de *E. coli* top10 fueron empleados como ADN blanco. Las reacciones de amplificación se prepararon con las concentraciones especificadas en la Tabla 8 y se realizaron bajo las condiciones descritas en la Tabla 9.

Tabla 8. Concentraciones finales en reacciones de amplificación de GH10 y GH11.

	[final en reacción]
Buffer de reacción	1X
Mg^{2+}	1.5, 2.5 o 3.0 mM
Iniciador río arriba	5 pmol/ μ L
Iniciador río abajo	5 pmol/ μ L
dNTPs	0.5 mM
Taq ADN polimerasa	0.025 U/ μ L

Tabla 9. Condiciones para reacciones de amplificación de GH10 y GH11.

Etapa	GH10			GH11		
	No. de ciclos	Temp. (°C)	Tiempo	No. de ciclos	Temp. (°C)	Tiempo
Inicio	1	94	5 min	1	94	5 min
Desnaturalización	35	94	45 s	30	94	45 s
Alineamiento		52.2-64.0	45 s		51.0-58.1	45 s
Elongación		72	1 min 10 s		72	15 s
Elongación final	1	72	10 min	1	72	10 min
Conservación	1	4	∞	1	4	∞

Subsecuentes reacciones de amplificación para GH10 se prepararon con las concentraciones especificadas en la Tabla 8, empleando una concentración final

de Mg^{2+} de 2.5mM. Las reacciones se realizaron bajo las condiciones descritas en la Tabla 9, empleando una T_a de 64°C.

4.4.9.2 PCR Asimétrico

Se realizaron cuatro reacciones con diferentes concentraciones finales de iniciadores (Tabla 10). El resto de los componentes de la reacción se emplearon según la reacción de amplificación descrita anteriormente para GH10.

Tabla 10. Concentración final de iniciadores para amplificación de GH10 por PCR asimétrico.

Reacción	DF10 (pmol/ μ L)	DR10 (pmol/ μ L)
1	5	0.1
2	5	0.05
3	0.1	5
4	0.05	5

Las reacciones se realizaron bajo las condiciones estándar descritas en la sección anterior.

4.4.10 Electroforesis de Ácidos Nucleicos

La electroforesis de ácidos nucleicos se realizó en geles de agarosa 0.8% (p/v) para ADN total y plásmidos, o 1.5% (p/v) para fragmentos amplificados. La electroforesis se realizó con buffer Tris-acetato-EDTA (TAE) 1X, a 45 mA/115 V. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio 0.5 mg/L.

4.4.11 Recuperación de ADN de Gel de Agarosa

La recuperación de fragmentos amplificados del gel de agarosa se realizó con el kit *DNA Extraction from Agarose Gels Montage* (Millipore, Billerica, EUA) según las instrucciones del fabricante.

4.4.12 Estimación del Tamaño de Fragmentos de ADN y Proteína

Se emplearon dos marcadores para ácidos nucleicos (0.1-1kpb y 1-10kpb), que fueron cargados en los geles correspondientes. Se midió la distancia de migración de los marcadores y fragmentos de interés en los geles después de la electroforesis. Los tamaños fueron calculados por análisis en *Fragment Size Calculator* (Universidad Northwestern, EUA, <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/SizeCalc.html>).

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

5.1 Detección de Actividad Xilanólica

5.1.1 *Bacillus flexus* NJY2

La detección inicial de actividad xilanólica se realizó por medio de una prueba de hidrólisis en placa teñida con rojo Congo. La tinción reveló un halo alrededor de la colonia de NJY2 (Figura 8). No se observó hidrólisis causada por el sobrenadante.

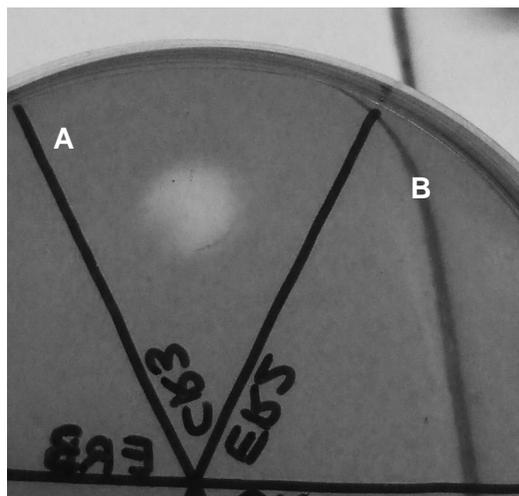


Figura 8. Prueba hidrolítica en placa para *B. flexus* NJY2. Células (A) y sobrenadante de la fermentación (B). Placa AX teñida con rojo Congo.

B. flexus fue empleado para la realización de un zimograma, teñido con rojo Congo posterior a la incubación. Se observó una banda de hidrólisis en el gel, correspondiente a la actividad de una endo-xilanasa (Figura 9).



Figura 9. Zimograma de extracto concentrado de un cultivo de *B. flexus* NJY2 en medio XSA.

5.1.2 *Escherichia coli* top10

De las 10 colonias de *E. coli* top10 evaluadas para actividad xilanolítica, sólo la colonia número 11 (EC11) produjo un halo en el medio LBX, correspondiente a hidrólisis de xilano (Figura 10).

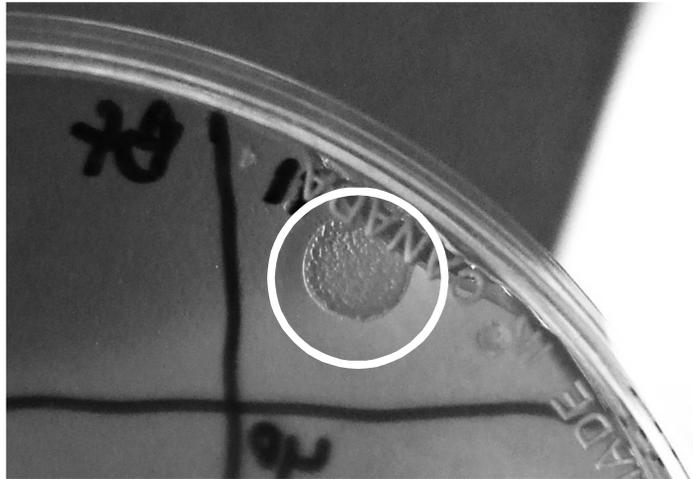


Figura 10. Halo de hidrólisis producido por EC11. El círculo indica el perímetro del halo de hidrólisis.

5.2 Clasificación Molecular de la Endo-xilanasa

El ADN total de NJY2 (NJY2) y el plásmido de EC11 fueron visualizados en un gel de agarosa (Figura 11). La electroforesis de NJY2 mostró una banda correspondiente al ADN cromosomal. La cepa NJY2 no presentó bandas adicionales que pudieran corresponder a un plásmido. La electroforesis de EC11 mostró dos bandas de ~6kpb y ~3kpb.

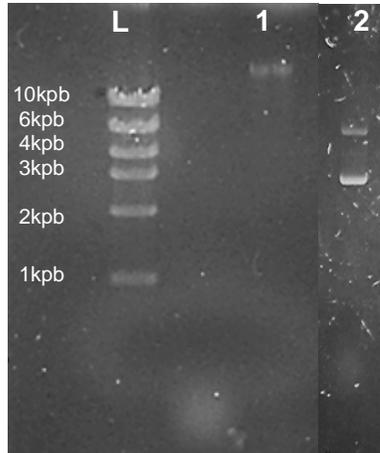


Figura 11. Electroforesis de material genómico extraído de *B. flexus* NJY2 y EC11. ADN cromosomal de NJY2 (1), plásmidos de EC11 (2) y marcador (L).

El ADN y plásmido extraídos se emplearon como template para la amplificación por PCR de los dominios catalíticos de dos xilanasas pertenecientes a las familias 10 y 11 de glicohidrolasas. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados. La Tabla 11 resume las condiciones empleadas para las diferentes reacciones y especifica aquellas para las cuales se observó amplificación. GH11 no fue amplificado bajo ninguna de las condiciones probadas. Cuando se empleó el ADN de NJY2 como template, se observó amplificación de GH10 para reacciones con 2.5 mM de Mg^{2+} y T_a de 60.1°C. Las reacciones con T_a de 62.7 y 64°C mostraron amplificación cuando se emplearon 2.5 y 3.0 mM de Mg^{2+} . EC11 sólo produjo amplificación de fragmentos en reacciones con 3.0 mM de Mg^{2+} y T_a de 64°C.

Tabla 11. Amplificación por PCR de GH10 y GH11.

GH10							GH11						
T _a	[Mg ²⁺]						T _a	[Mg ²⁺]					
	1.5mM		2.5mM		3.0mM			1.5mM		2.5m		3.0mM	
	NJY2	EC11	NJY2	EC11	NJY2	EC11		NJY2	EC11	NJY2	EC11	NJY2	EC11
52.2	-	-	-	-	-	-	51.0	-	-	-	-	-	-
54.0	-	-	-	-	-	-	52.1	-	-	-	-	-	-
56.9	-	-	-	-	-	-	53.5	-	-	-	-	-	-
60.1	-	-	+	-	-	-	55.0	-	-	-	-	-	-
62.7	-	-	+	-	+	-	56.6	-	-	-	-	-	-
64.0	-	-	+	-	+	+	58.1	-	-	-	-	-	-

Una segunda electroforesis en gel de agarosa fue llevada a cabo con los productos de las reacciones para determinar los tamaños de los fragmentos amplificados. En la Figura 12 se muestra que NJY2 amplificó para una banda de 353pb (B2). La reacción realizada con 2.5 mM Mg²⁺ y T_a 64°C amplificó una banda adicional de 739pb (B1). El tamaño del fragmento obtenido con EC11 fue de 422pb (B3).

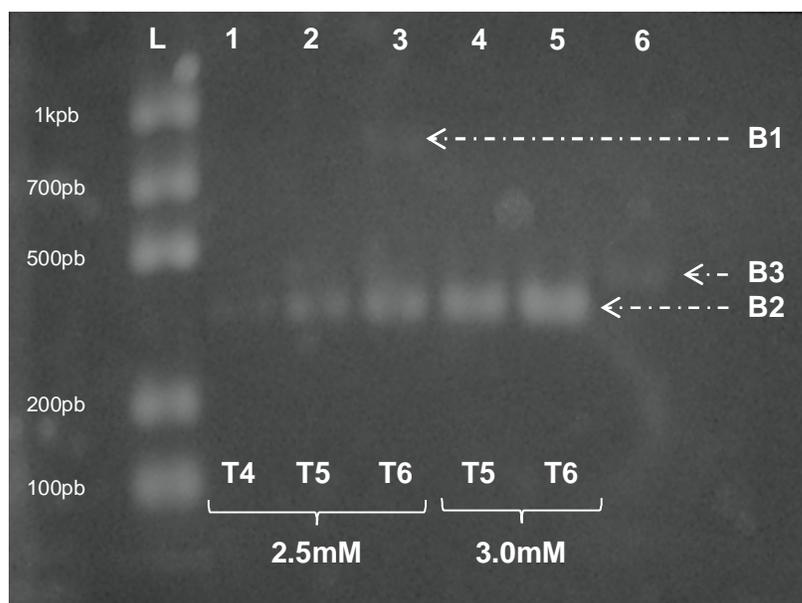


Figura 12. Electroforesis de fragmentos de GH10 amplificados por PCR. Productos amplificados a partir de NJY2 (1-5) y EC11 (6). T4 = 60.1°C, T5 = 62.7°C, y T6 = 64.0°C.

Las dos bandas productos de la amplificación con NJY2 fueron recuperadas del gel de agarosa y empleadas como templete en una nueva reacción. B1 amplificó para ambos fragmentos, mientras que B2 sólo produjo una banda de ~350pb (Figura 13).

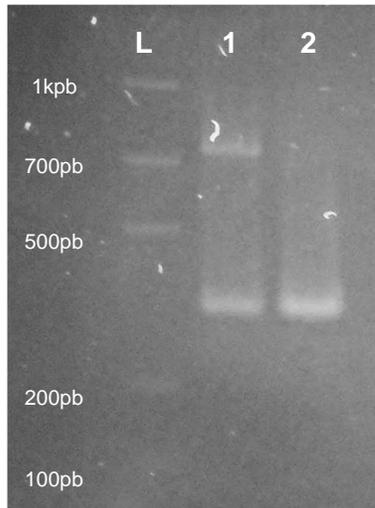


Figura 13. Amplificación de GH10 a partir de B1 (1) y B2 (2).

Se realizó un PCR asimétrico con B2 como templete. Reacciones con mayores concentraciones de DF10 amplificaron para B1 y B2, mientras que reacciones con mayores concentraciones de DR10 amplificaron sólo para B2 (Figura 14). Sin embargo, los diferentes fragmentos de B2 mostraron variaciones en longitud.

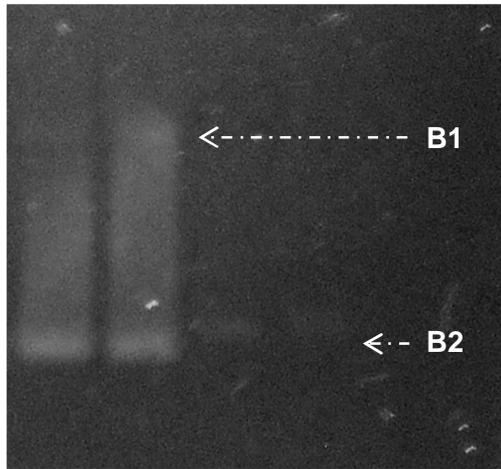


Figura 14. Productos de PCR asimétrico con B2 como templete.

Posteriores pruebas de PCR realizados con ADN templete de diferentes extracciones no produjeron amplificación de fragmentos.

5.3 Crecimiento y Actividad Xilanolítica de *B. flexus* NJY2

Fueron monitoreados el crecimiento de NJY2 en medio XC, así como la generación de azúcares reductores (Figura 15). La fase exponencial de crecimiento inició a las 6h, y finalizó alrededor de las 26h. Por lo que respecta a los azúcares reductores, se apreció un aumento a partir de las 7h, pero después de 23h de crecimiento se presentó una disminución en la velocidad de producción de AR. El pH durante el cultivo fue monitoreado y se observó que las primeras 7h fueron acompañadas de un decremento en el pH del medio, comportamiento invertido alrededor de las 8h hasta alcanzar un pH 8 al final del cultivo.

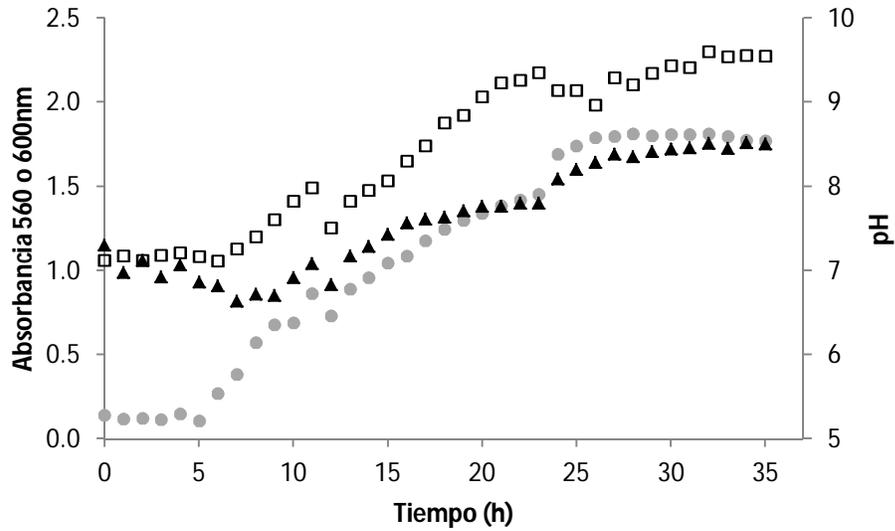


Figura 15. Crecimiento y producción de azúcares reductores (AR) por *B. flexus* NJY2 en medio XC. Densidad óptica (●), AR (□) y pH (▲).

Observaciones microscópicas del cultivo se presentan en la Figura 16 y, como se puede apreciar, de las 6 a las 8 horas el número de bacterias se incrementó de manera significativa. Por otro lado a partir de las 19 h se observó el inicio de la esporulación y hacia las 24h, en la etapa exponencial tardía, células y esporas se agregaron en conglomerados que aumentaron en tamaño y número a lo largo de la fase estacionaria (32-34h).

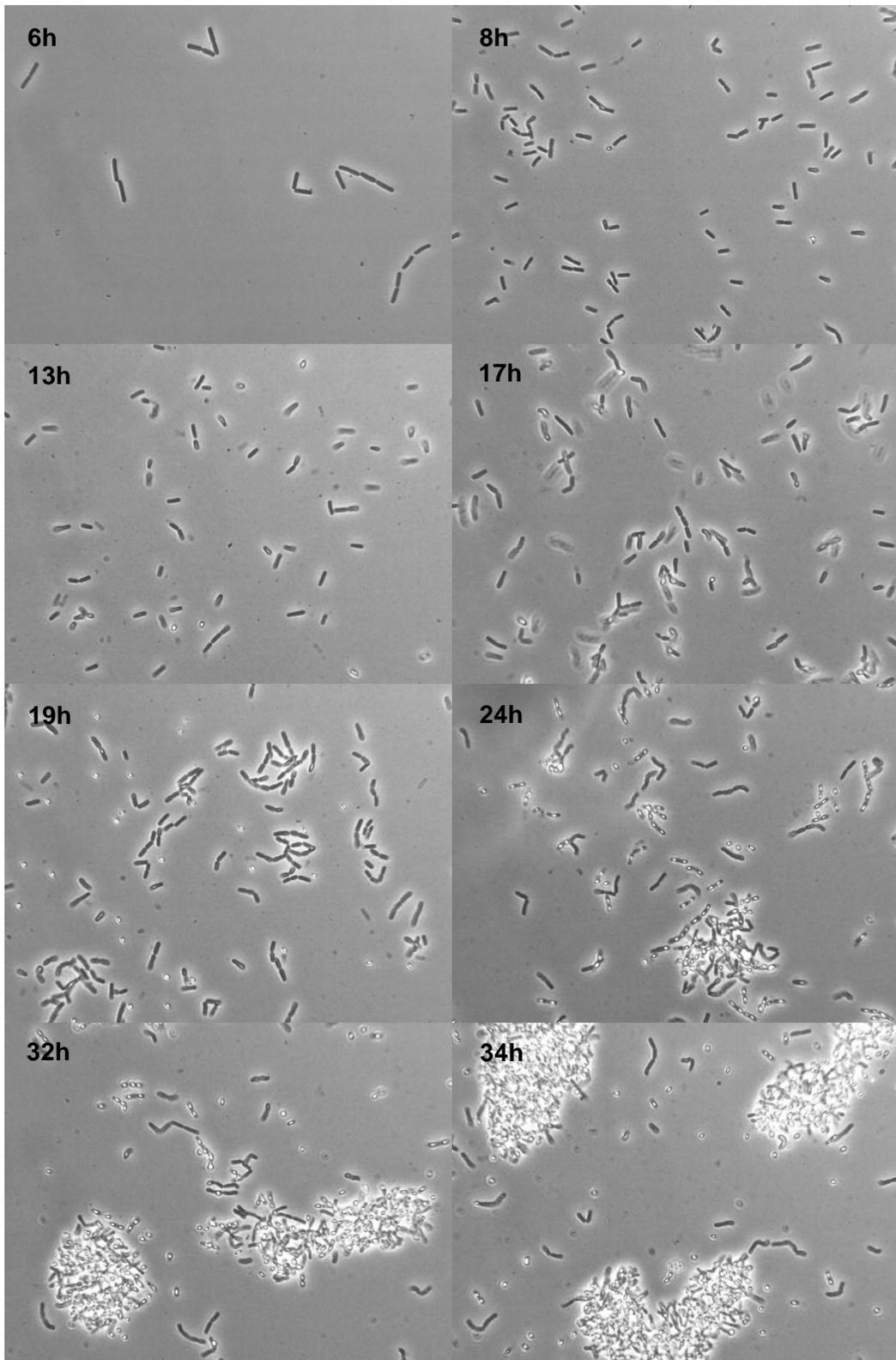


Figura 16. Microscopía óptica de NJY2 en diferentes etapas de crecimiento.

Se midió la actividad xilanolítica del sobrenadante obtenido de un cultivo de 18h en medio XC. No se observó actividad en comparación al control negativo durante los primeros 60min (Figura 17). Sin embargo, se detectó un aumento de AR en la cepa NJY2 a las 24h de iniciada la reacción (datos no mostrados).

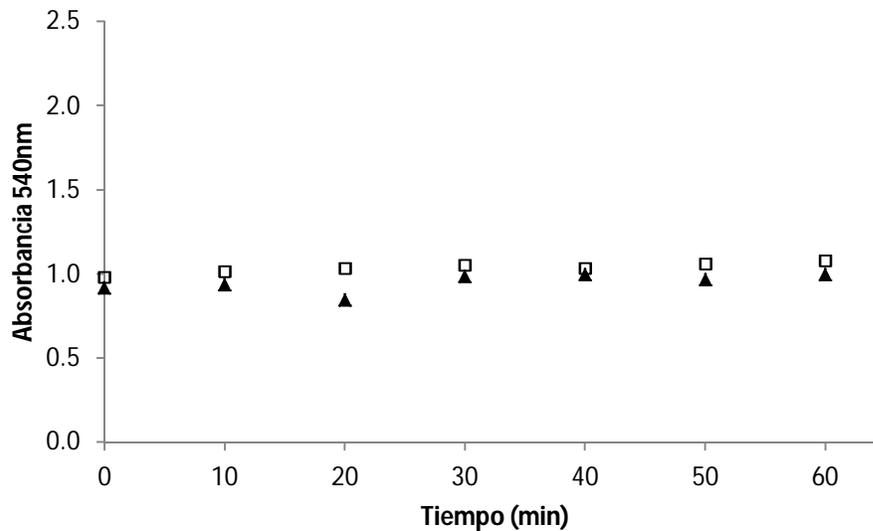


Figura 17. Actividad xilanolítica de extracto crudo. Extracto obtenido de cultivo de *B. flexus* NJY2 (□) y control negativo (▲).

Se realizaron dos cultivos de NJY2 en medios YEP y XC0.1 por un periodo de 18h, al final del cual se agregó xilano para obtener una concentración final de 10g/L. El contenido de AR en el medio fue medido a partir de la adición del sustrato. En la Figura 18 se observa que ambos cultivos registraron un aumento continuo de AR a lo largo de las siguientes 8h de incubación.

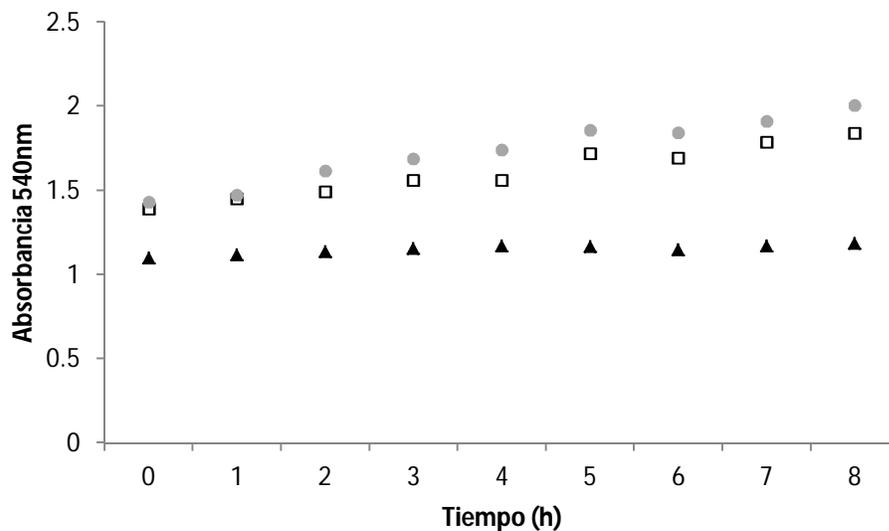


Figura 18. Producción de azúcares reductores en cultivos de NJY2 en medios YEP y XC0.1. Cultivos en XC0.1 (●), YEP (□) y control negativo (▲).

Los sobrenadantes de cultivos en XC0.1 y YEP concentrados veinte veces por ultrafiltración no presentaron cambios en el contenido de AR para ninguna de las reacciones (Figura 19).

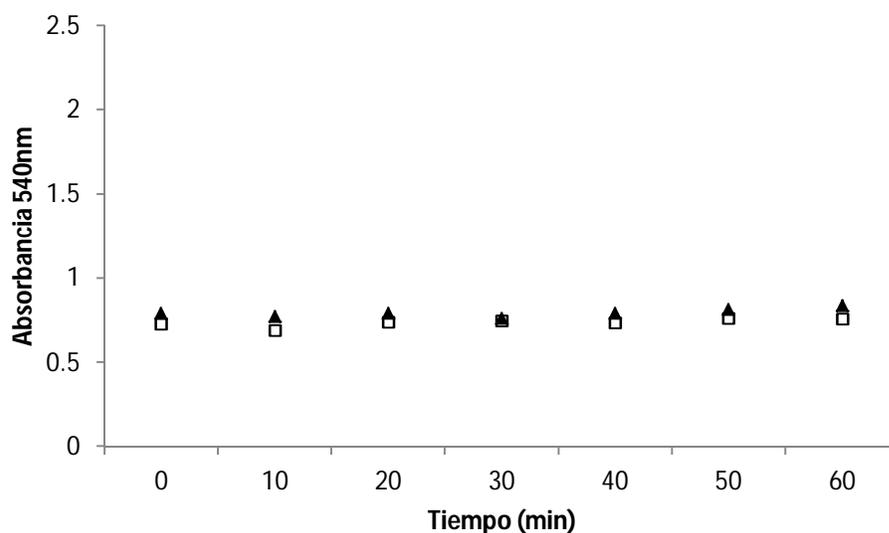


Figura 19. Cinética de producción de azúcares reductores (método DNS) para la determinación de actividad xilanolítica en sobrenadantes de fermentación. Sobrenadante de medio de cultivo YEP (□) y XC0.1 (▲).

El sobrenadante de un cultivo en XC0.1 fue adicionado con 1% (p/v) xilano. El extracto fue incubado y se midieron los AR de muestras recolectadas cada hora (Figura 20). No se detectó actividad enzimática al realizar cinéticas de hidrólisis de xilano.

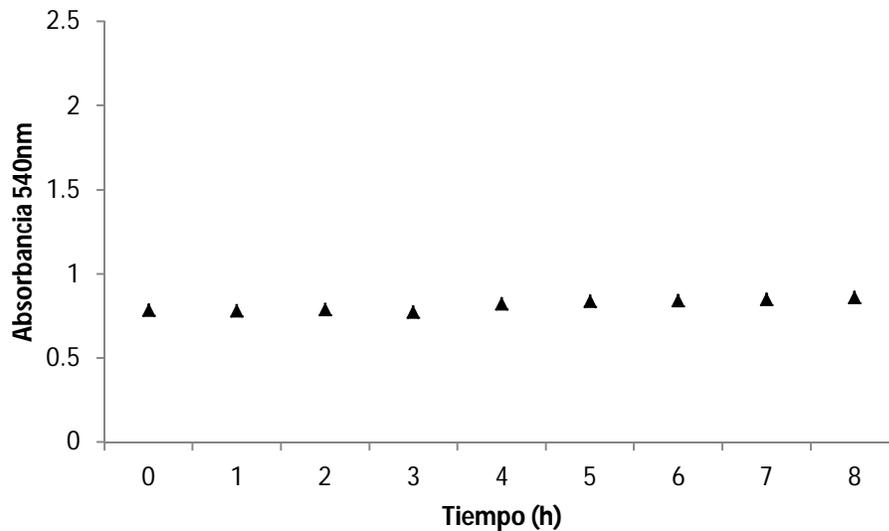


Figura 20. Actividad xilanólítica de sobrenadante de fermentación obtenido de un cultivo en medio XC0.1.

Se realizó un ensayo de actividad xilanólítica con las células provenientes del cultivo empleado en la prueba anterior. Las células fueron concentradas 15 y 7.5 veces por resuspensión antes de realizar la reacción enzimática. No se observó aumento de AR durante el periodo de 2h monitoreado (Figura 21).

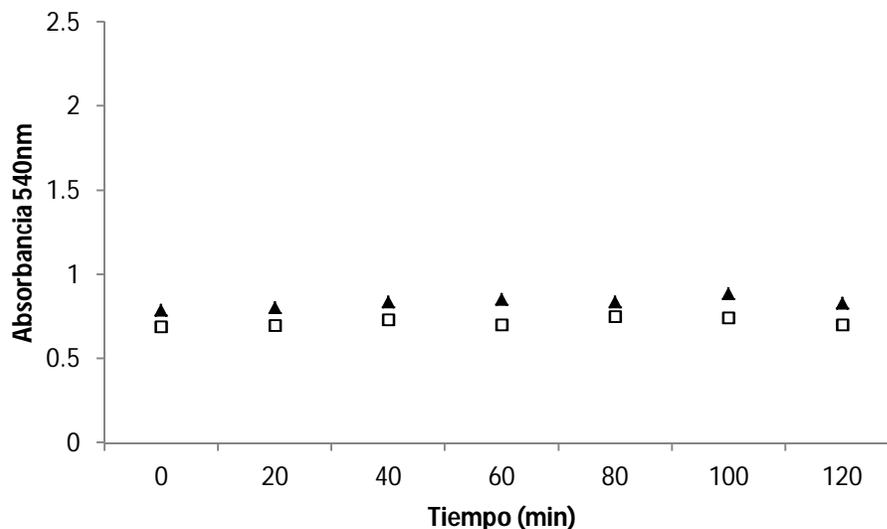


Figura 21. Cinética de producción de azúcares reductores (método DNS) para determinación de actividad xilanolítica de células cultivadas en medio XC0.1. Células concentradas 15x (▲) y 7.5x (□).

Se midieron AR directamente del cultivo de tres diferentes cepas de *Bacillus*: *B. flexus* NJY2, *B. subtilis* B23, y *B. subtilis* DSM-10. *B. subtilis* DSM-10 es una cepa silvestre productora de xilanasas, empleada en esta prueba como control positivo de la hidrólisis de xilano en el medio de cultivo. *B. subtilis* B23 se empleó como control negativo. Después de 18h de incubación en medio YEP, una solución de xilano fue agregada al medio de cultivo para alcanzar una concentración final de 10g/L. Posterior a la reacción con DNS, las muestras fueron diluidas cuatro veces con H₂Obd antes de medir AR totales por espectrofotometría. *B. flexus* NJY2 y *B. subtilis* B23 no mostraron cambios en los niveles de AR en el medio (Figura 22). En cambio, el cultivo de la cepa xilanolítica *B. subtilis* DSM-10 presentó una mayor cantidad de AR reductores en el medio desde las 0h, y aumentó hasta un nivel constante a la hora 2, presentando variaciones cíclicas durante el periodo de muestreo. La cepa

positiva registró un contenido de AR máximo de 1.8g/L de xilosa, mientras que *B. flexus* y *B. subtilis* B23 registraron 0.21 y 0.28g/L, respectivamente.

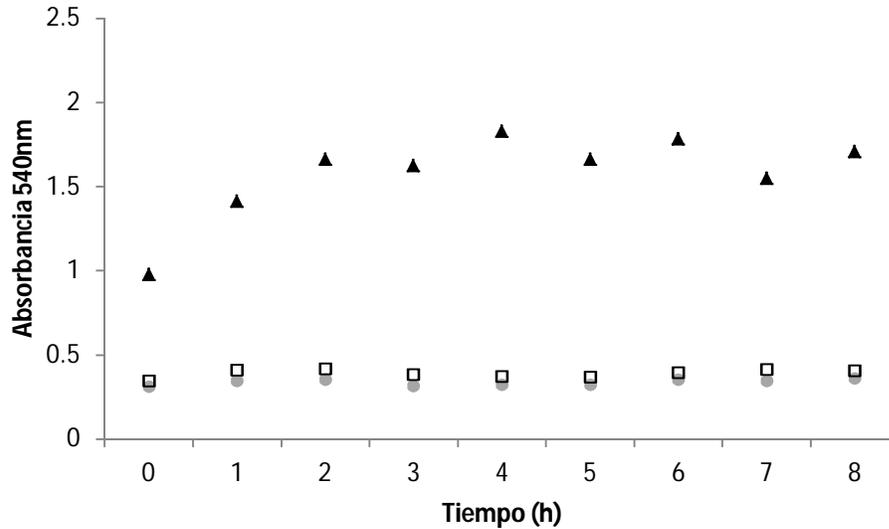


Figura 22. Producción de azúcares reductores en medio XC0.1. *B. flexus* NJY2 (●), *B. subtilis* B23 (□) y *B. subtilis* DSM-10 (▲).

Finalmente, se realizó una segunda prueba hidrolítica en placa para *B. flexus* NJY2. A diferencia de la prueba inicial realizada para la detección de actividad (Figura 8), *B. flexus* no produjo halo de hidrólisis en esta segunda prueba (Figura 23).

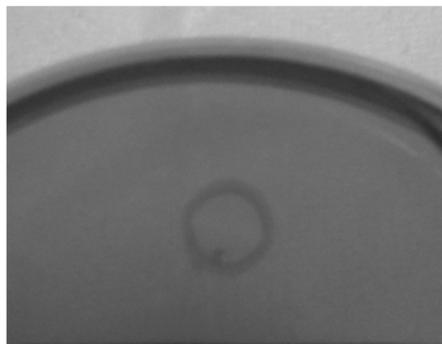


Figura 23. Segunda prueba hidrolítica en placa.

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN

6.1 Producción de la Endo-xilanasa por *B. flexus* NJY2

La tinción de la prueba hidrolítica en placa para NJY2 reveló un halo alrededor de la colonia sembrada (Figura 8). Ya que el rojo Congo se une a polisacáridos lineales, el halo corresponde al área donde fue degradado el xilano a oligo- o monosacáridos por acción de una xilanasa. La presencia de actividad xilanasa fue comprobada también por la hidrólisis producida por *E. coli* (Figura 10). El halo observado sugiere que el gen o parte del gen codificante para una enzima con actividad xilanasa fue insertado al plásmido introducido en EC11.

La producción de la enzima o su actividad está asociada al crecimiento exponencial (Figura 15). Los cambios en el contenido de AR en el medio siguen a la curva de crecimiento de la bacteria. Los AR incrementan ya que *B. flexus* NJY2 ha iniciado la fase exponencial, y continúa con esta tendencia positiva hasta que la bacteria alcanza la fase estacionaria.

Por otra parte, también se observó un aumento en el pH del medio, lo que indica que la xilanasa presente tiene actividad a pH alcalino. Se ha reportado que algunos microorganismos alcalófilos adecúan el pH del medio de cultivo para que sus enzimas puedan actuar (Horikoshi, 1999b).

La ausencia de actividad correspondiente al sobrenadante obtenido del cultivo sugiere inicialmente la posibilidad de que la enzima es producida en pequeñas cantidades o que está asociada a células (Figura 8). Aún y cuando las xilanasas asociadas a células no son abundantes, se han reportado para *Thermoanaerobacterium* sp. (Brechtel et al., 1999; Shao et al., 1995), *Ruminococcus flavefaciens* (Flint et al., 1991), *Paenibacillus* sp. (Gallardo et al., 2003) y *Thermotoga maritima* (Liebl et al., 2008). Sin embargo, la banda de hidrólisis presente en el zimograma puede interpretarse como evidencia de una baja producción de enzima extracelular (Figura 9).

6.2 Amplificación de GH10

La amplificación a partir del genoma de NJY2 con iniciadores para GH10 confirma la presencia de una secuencia homóloga a glicohidrolasas de la familia 10 (Tabla 11 y Figura 12).

El aislamiento de plásmidos de EC11 produjo dos bandas correspondientes a dos diferentes plásmidos (Figura 11). Esto indica la introducción de dos plásmidos a la célula durante la transformación. Ya que EC11 demostró

actividad xilanolítica y el vector pJET2.1 es de 2974pb de longitud, el plásmido de mayor tamaño tiene un inserto de ~3kpb que contiene la secuencia o parte de la secuencia correspondiente al dominio catalítico de la endo-xilanasas.

La reacción realizada con 2.5mM de MgCl₂ y T_a de 64°C produjo dos fragmentos de diferente longitud (Figura 12). Los tamaños 2:1 de B1 y B2, respectivamente, sugieren una amplificación inespecífica, la producción de cadenas sencillas durante la reacción de PCR, o la presencia de una secuencia repetida.

Durante el diseño de iniciadores, no se observó una complementariedad entre los iniciadores y alguna región en el interior de la secuencia. La comparación de secuencias de xilanasas de *Bacillus* obtenidas de NCBI muestra hasta un 98% de similitud entre éstas. Aún y cuando el contenido %GC de los iniciadores es menor al recomendado para reacciones de PCR (Tabla 7), y las amplificaciones se realizaron a temperatura de alineamiento alta (64°C), podríamos asumir que la alta conservación en secuencias de glicohidrolasas dificultaría una hibridación inespecífica. Para descartar esta posibilidad, B1 y B2 fueron empleados como templete (Figura 13). El fragmento B1 amplificó nuevamente para ambos fragmentos (B1 y B2), por lo que los resultados descartan la amplificación de dos regiones independientes del genoma.

Se realizó un PCR asimétrico para comprobar una presencia de cadenas de ADN sencillas producto de la reacción de PCR punto final (Figura 14). El PCR asimétrico amplifica selectivamente una sola cadena del ADN templete. Ya que

B2, el fragmento de menor tamaño, produjo ambos fragmentos, no es posible que éste sea ADN de cadena sencilla.

Búsquedas en la base de datos *GAS (Glycosyl hydrolase AnnotationS)* (Zhou et al., 2010) indican que se han reportado secuencias de glicohidrolasas con dos o tres fragmentos correspondientes a dominios catalíticos pertenecientes a un solo tipo de familia. En bacterias, este fenómeno se ha observado repetidamente en enzimas de la familia GH43, que pueden incluir actividad xilanasa (Copeland et al., 2011; Fulton et al., 2008b; Gibbs et al., 2000; Luthi et al., 1990; Morris et al., 1999; van de Werken et al., 2008). Secuencias homólogas a GH10 no se han encontrado por duplicado en el mismo gen. Sin embargo, se han reportado secuencias de GH10 asociadas a GH43 (Fulton et al., 2008a; Gibbs et al., 2000; Morris et al., 1999) y GH5 (Gibbs et al., 2000; Miyake et al., 1997; Saul et al., 1989; van de Werken et al., 2008), la cual es una familia predominantemente compuesta de endo-glucanasas, pero que puede incluir actividad 1,4-xilanasa.

Sería necesaria la secuenciación de los fragmentos para descartar la presencia de secuencias repetidas o de una región complementaria a iniciadores dentro de la secuencia del fragmento amplificado de mayor tamaño.

6.3 Pérdida de Actividad Enzimática

Se intentó solucionar una posible baja producción de enzima concentrando el sobrenadante del cultivo. Sin embargo, el alto contenido de xilano en el medio resultaba en un extracto altamente viscoso y poco manipulable. Se decidió probar si la reducción o eliminación del xilano en el medio de cultivo podría ser efectivo para la producción de la xilanasas. Se observó un incremento de AR en los cultivos en medio XC0.1 y YEP, lo que sugería que la alta concentración de xilano empleada anteriormente no era necesaria para la inducción de la enzima (Figura 18). Esta reducción o eliminación de xilano del medio facilitó la concentración de los sobrenadantes; sin embargo, tampoco se observó actividad xilanolítica con los extractos concentrados (Figura 19).

Para descartar la actividad asociada a células, las bacterias fueron separadas del sobrenadante y enfrentadas al sustrato. Sin embargo, las células tampoco produjeron hidrólisis que pudiera explicar el aumento de AR observado en los cultivos (Figura 21).

Con subsecuentes repeticiones de las pruebas, *B. flexus* NJY2 mostró diferentes resultados a los observados inicialmente. Las mediciones de actividad enzimática a través de la hidrólisis de xilano no mostraron aumento en la producción de AR y los zimogramas no presentaron bandas de hidrólisis, independientemente del factor de concentración del extracto. Además, no fue posible repetir la amplificación de GH10. Esto sugería una pérdida de actividad xilanolítica. Esta pérdida de actividad fue confirmada con una segunda prueba

de hidrólisis en placa, en la que no se observó un halo correspondiente a degradación de xilano, en contraste a las pruebas realizadas inicialmente (Figura 23 y Figura 8). Se realizó también una comparación con *B. subtilis* DSM-10, una cepa xilanolítica, en la que se observó una diferencia importante en la liberación de AR (Figura 22).

El *switching* es un cambio rápido y a veces irreversible del fenotipo de microorganismos. Se ha observado principalmente como un cambio en la morfología de patógenos como respuesta al ataque inmunológico del hospedero. Sin embargo, se han reportado casos en que el *switching* puede afectar la producción de metabolitos y enzimas. Por ejemplo, se han reportado cambios en la producción de antibióticos para diferentes especies de *Streptomyces* (Reusser et al., 1961; Williams & McCoy, 1953), y pérdidas de producción de β -galactosidasa y α -amilasa en *E. coli* y *B. subtilis*, respectivamente (Rodríguez, 1995; Shapiro & Higgins, 1989).

Se ha sugerido la mutación espontánea como causa de este fenómeno; sin embargo, la frecuencia de variantes observada es muy alta, y la herencia muy variable para poder ser explicadas por este mecanismo (Rodríguez, 1995). Se ha sugerido también la acción de elementos transponibles como causa de estos cambios (Shapiro, 1988).

Invariablemente, se ha observado que cambios ambientales, como el medio de cultivo o la temperatura de incubación, pueden afectar la expresión de grupos de genes, lo que significaría un cambio en la síntesis de enzimas

(Martínez et al., 1990). Durante este proyecto, *B. flexus* NJY2 fue enfrentada a medios y condiciones de cultivo artificiales, lo cual podría ser causa de la pérdida de la actividad xilanasa. La presencia de variantes en *B. flexus* NJY2 podría comprobarse con la transferencia seriada de la cepa en los diferentes medios de cultivo empleados, monitoreando su morfología y actividad durante varios ciclos.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

- *B. flexus* NJY2 aislado del nejayote presentó capacidad de actividad xilanolítica.
- La actividad xilanolítica se produjo en medios ricos de xilano o xilosa.
- La endo-xilanasa fue capaz de actuar a pH alcalino (pH=8.0).
- *B. flexus* NJY2 produjo una endo-xilanasa de secuencia similar a la Familia 10 de glicohidrolasas.
- *B. flexus* NJY2 sufrió una pérdida de la actividad xilanolítica debido a una eliminación de material genético.

REFERENCIAS

- Aachary, A. A., & Prapulla, S. G. (2011). Xylooligosaccharides (XOS) as an emerging prebiotic: microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(1), 2-16.
- Abaonza Flores, O., Arroy Vargas, J. M., Briones Vargas, L. I., Cabiedes Granados, F., Campos Leal, J. L., Castillo Morales, J., Castro Arenas, E., et al. (2011). *Nuevo León. Panorama Agroalimentario y Pesquero 2011. Panorama* (p. 50). México, DF.
- Aguilar-Rivera, N. (2007). Bioetanol de la caña de azúcar. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 11(3), 25-39.
- Alonso, J. L., Domínguez, H., Garrote, G., Parajó, J. C., & Vázquez, M. J. (2003). Xylooligosaccharides: Properties and production technologies. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 2(1), 230-32.
- Avcioğlu, B., Eyupoglu, B., & Bakir, U. (2005). Production and characterization of xylanases of a *Bacillus* strain isolated from soil. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21, 65-8.
- Baraznenok, V. A., Becker, E. G., Ankudimova, N. V., & Okunev, N. N. (1999). Characterization of neutral xylanases from *Chaetomium cellulolyticum* and their biobleaching effect on eucalyptus pulp. *Enzyme and Microbial Technology*, 25(651-9).
- Bedford, M. R., & Classen, H. L. (1992). The influence of dietary xylanase on intestinal viscosity and molecular weight distribution of carbohydrates in rye fed broiler chick. En J. Visser, G. Beldman, M. A. K. VanSomeren, & A. G. J. Voragen (Eds.), *Xylans and Xylanases* (pp. 361-70). Amsterdam: Elsevier.
- Beg, Q. K., Bhushan, B., Kapoor, M., & Hoondal, G. S. (2000). Enhanced production of a thermostable xylanase from *Streptomyces* sp. QG-11-3 and its application in biobleaching of eucalyptus kraft pulp. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 459-66.
- Beg, Q. K., Kapoor, M., Mahajan, L., & Hoondal, G. S. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(3), 326-38.
- Biely, P. (1985). Microbial xylanolytic systems. *Trends in Biotechnology*, 3, 286-90.
- Bim, M. A., & Franco, T. T. (2000). Extraction in aqueous two phase systems of alkaline xylanase produced by *Bacillus pumilus* and its application in kraft pulp bleaching. *Journal of Chromatography*, 43, 349-56.

- Brechtel, E., Matuschek, M., Hellberg, A., Egelseer, E. M., Schmid, R., & Bahl, R. (1999). Cell wall of *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1: isolation of its components and attachment of the xylanase XynA. *Archives of Microbiology*, 171, 159-65.
- Calderón, H. E. (1990). *Obtención y evaluación biológica de biomasa microbiana con bajo contenido de calcio, a partir de un sistema de tratamiento aerobio de nejayote*. UNAM.
- Camacho, N. A., & Aguilar, O. G. (2003). Production, purification and characterization of a low molecular mass xylanase from *Aspergillus* sp. and its application in bakery. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 104, 159-72.
- Canilha, L., Carvalho, W., de Almeida Felipe, M. G., de Almeida e Silva, J. B., & Giuliatti, M. (2010). Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 161, 84-92.
- Casas, R. (1988). Potencial de la investigación biotecnológica agrícola en México. *Revista Mexicana de Sociología*, 50(1), 121-46.
- Christakopoulos, P., Katapodis, P., Kalogeris, E., Kekos, D., Macris, B. J., Stamatis, H., & Skaltsa, H. (2003). Antimicrobial activity of acidic xylo-oligosaccharides produced by family 10 and 11 endoxylanases. *International Journal of Biological Macromolecules*, 31(4-5), 171-5.
- Christov, L. P., Szakacs, G., & Balakrishnan, H. (1999). Production, partial characterization and use of fungal cellulase free xylanases in pulp bleaching. *Process Biochemistry*, 34, 511-7.
- Claus, D., & Berkeley, R. C. W. (1986). Genus *Bacillus* Cohn 1872. En P. H. A. Sneath (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (pp. 1105-1140). Baltimore, MD: Williams & Wilkins.
- Collins, T., Gerday, C., & Feller, G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(1), 3-23.
- Copeland, A., Lucas, S., Lapidus, A., Barry, K., Detter, J. C., Glavina del Rio, T., Hammon, N., et al. (2011). *Complete sequence of Clostridium thermocellum ATCC 27405*. Walnut Creek, CA.
- Csiszár, A., Losonczy, B., Koczka, B., Szakács, G., & Pomlényi, A. (2006). Degradation of lignin-containing materials by xylanase in biopreparation of cotton. *Biotechnology Letters*, 28(10), 749-53.
- da Costa Sousa, L., Chundawat, S. P., Balan, V., & Dale, B. E. (2009). "Cradle-to-grave" assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(3), 339-47.
- Dekker, R. F. H. (1979). The hemicellulase group of enzymes. En J. M. V. Blanshard & J. R. Mitchell (Eds.), *Polysaccharides in Food* (pp. 93-108). London: Butterworths.
- Dhillon, A., Gupta, J. K., Jauhari, B. M., & Khanna, S. (2000). A cellulase-poor, thermostable, alkalitolerant xylanase produced by *Bacillus circulans* AB 16 grown on rice straw and its application in biobleaching of eucalyptus pulp. *Bioresource Technology*, 73, 273-7.

- Domínguez, R. (2000). *Bioconversion of cereal raw materials for Monascus pigment production*. University of Manchester.
- Domínguez-Espinosa, R. M., Wang, R., & Pacheco-Carrillo, J. D. (2002). Residuos agroindustriales como materia prima para la producción de compuestos químicos finos. *Tecnología, Ciencia y Educación*, 17(002), 77-83.
- Duarte, M. C. T., Silva, E. C., Gomes, I. M. B., Ponezi, A. N., Portugal, E. P., Vicente, J. R., & Davanzo, E. (2003). Xylan-hydrolysing enzyme system from *Bacillus pumilus* CBMAI 0008 and its effects on *Eucalyptus grandis* kraft pulp for bleaching improvement. *Bioresource Technology*, 88, 9-15.
- Durán-de-Bazúa, C. (1988). Una Nueva Tecnología para la Extrusión Alcalina de Maíz y Sorgo. *Monografía Tecnológica*, 2, 71. México, DF.
- Faulds, C. B., Kroon, P. A., Bartolomé, B., & Williamson, G. (1999). Hydrolysis of hemicelluloses using combinations of xylanases and feruloyl esterases. En C. Bucke (Ed.), *Methods in Biotechnology, Vol 10: Carbohydrate Biotechnology Protocols* (Vol. 10, pp. 183-95). Totowa, NJ: Humana Press.
- Flint, H. J., McPherson, C. A., & Martin, J. (1991). Expression of two xylanase genes from the rumen cellulolytic bacterium *Ruminococcus flavefaciens* 17 cloned un pUC13. *Journal of General Microbiology*, 137, 123-9.
- Fulton, L., Clifton, S., Fulton, B., Xu, J., Minx, P., Pepin, K. H., Johnson, M., Thiruvilangam, P., et al. (2008a). *Draft genome sequence of Bacteroides intestinalis* (DSM 17393). St. Louis, MO.
- Fulton, L., Clifton, S., Fulton, B., Xu, J., Minx, P., Pepin, K. H., Johnson, M., Tiruvilangam, P., et al. (2008b). *Draft genome sequence of Clostridium nexile* (DSM 1787). St. Louis, MO.
- Gallardo, O., Diaz, P., & Pastor, F. I. J. (2003). Characterization of a *Paenibacillus* cell-associated xylanase with high activity on aryl-xylosides: a new subclass of family 10 xylanases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61, 226-33.
- Ganga, M. A., Piñaga, F., Vallés, S., Ramón, D., & Querol, A. (1999). Aroma improving in microvinification processes by the use of a recombinant wine yeast strain expressing the *Aspergillus nidulans* xlnA gene. *International Journal of Food Microbiology*, 47(171-8).
- Garg, A. P., McCarthy, A. J., & Roberts, J. C. (1996). Biobleaching effect of *Streptomyces thermoviolaceus* xylanase preparations on birchwood kraft pulp. *Enzyme and Microbial Technology*, 18, 261-7.
- Gat, O., Lapidot, A., Alchanati, I., Regueros, C., & Shoham, Y. (1994). Cloning and DNA sequence of the gene coding for *Bacillus stearothermophilus* T-6 xylanase. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(6), 1889-96.
- Georis, J., Giannotta, F., de Buyl, E., Granier, B., & Frere, J.-M. (2000). Purification and properties of three endo-B-1,4-xylanases produced by *Streptomyces* sp. strain S38 which differ in their ability to enhance the bleaching of kraft pulp. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 178-86.

- Gessesse, A. (1998). Purification and properties of two thermostable alkaline xylanases from an alkaliphilic *Bacillus* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3533-5.
- Gibbs, M. D., Reeves, R. A., Farrington, G. K., Anderson, P., Williams, D. P., & Bergquist, P. L. (2000). Multidomain and multifunctional glycosyl hydrolases from the extreme thermophile *Caldicellulosiruptor* isolate Tok7B.1. *Current Microbiology*, 40(5), 333-40.
- Gilbert, H. J., & Hazlewood, G. P. (1993). Bacterial cellulases and xylanases. *Journal of General Microbiology*, 139(2), 187-94.
- Gilkes, N. R., Henrissat, B., Kilburn, D. G., Miller, R. C., & Warren, R. A. J. (1991). Domains in microbial B-1,4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. *Microbiological Reviews*, 55(2), 303-15.
- Godon, B. (1993). *Bioconversion of Cereal Products*. (B. Godon & A. Boundreau, Eds.). London: VCH Publishers Ltd.
- Haarhoff, J., Moes, C. J., Cerff, C., van Wyk, W. J., Gerischer, G., & Janse, B. J. H. (1999). Characterization and biobleaching effect of hemicellulases produced by thermophilic fungi. *Biotechnology Letters*, 21, 415-20.
- Hamamoto, T., Honda, H., Kudo, T., & Horikoshi, K. (1987). Nucleotide sequence of the xylanase A gene of alkalophilic *Bacillus* sp. strain C-125. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51(3), 953-5.
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*, 280, 309-16.
- Honda, H., Kudo, T., Ikura, Y., & Horikoshi, K. (1985). Two types of xylanases of alkaliphilic *Bacillus* sp. no. C-125. *Canadian Journal of Microbiology*, 31(6), 538-542.
- Horikoshi, K. (1999a). Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(4), 735-50.
- Horikoshi, K. (1999b). Cell structure. *Alkaliphiles* (pp. 40-56). Países Bajos: Harwood Academic Publishers.
- Hunger, W., & Claus, D. (1981). Taxonomic studies on *Bacillus megaterium* and on agarolytic strains. En R.C.W. Berkeley & M. Goodfellow (Eds.), *The Aerobic Endospore-forming Bacteria: Classification and Identification* (pp. 217-239). London & New York: Academic Press.
- Imanaka, T., & Sakurai, S. (1992). Method of washing super precision devices, semiconductors, with enzymes.
- Ingram, T., Rogalinski, T., Bockemühl, V., Antranikian, G., & Brunner, G. (2009). Semi-continuous liquid hot water pretreatment of rye straw. *Journal of Supercritical Fluids*, 48(3), 238-46.
- Jalal, A., Rashid, N., Rasool, N., & Akhtar, M. (2009). Gene cloning and characterization of a xylanase from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain R5. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107(4), 360-5.

- Kannan, P., Ignacimuthu, S., & Paulraj, M. G. (2009). Buffering capacity and membrane H⁺ conductance of protease producing facultative alkaliphilic bacterium *Bacillus flexus* from mangrove soil. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 46, 305-17.
- Kansoh, A. L., & Nagieb, Z. A. (2004). Xylanase and mannanase enzymes from *Streptomyces galbus* NR and their use in biobleaching of softwood kraft pulp. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of Microbiology and Serology*, 85(103-14).
- Katapodis, P., Vardakou, P., Kalogeris, E., Kekos, D., Macris, B. J., & Christakopoulos, P. (2003). Enzymatic production of a feruloylated oligosaccharide with antioxidant activity from wheat flour arabinoxylan. *European Journal of Nutrition*, 42(1), 55-60.
- Khasin, A., Alchanati, I., & Shoham, Y. (1993). Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(6), 1725-30.
- Kuhad, R. C., Singh, A., & Eriksson, K. E. L. (1997). Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. En T. Scheper (Ed.), *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Vol. 57 (pp. 45-125). Berlin: Springer-Verlag.
- Kulkarni, N., & Rao, M. (1996). Application of xylanase from alkaliphilic thermophilic *Bacillus* sp. NCIM 59 in biobleaching of bagasse pulp. *Journal of Biotechnology*, 51, 167-73.
- Kulkarni, N., Shendye, A., & Rao, M. (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(4), 411-56.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- Lee, C. C., Kibblewhite-Accinelli, R. E., Smith, M. R., Wagschal, K., Orts, W. J., & Wong, D. W. S. (2008). Cloning of *Bacillus licheniformis* xylanase gene and characterization of recombinant enzyme. *Current Microbiology*, 57(4), 301-5.
- Lee, J. (1997). Biological conversion of lignocellulose biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology*, 56, 1-24.
- Lenartovicz, V., Souza, C. G. M., Moreira, F. G., & Peralta, R. M. (2002). Temperature effect in the production of multiple xylanases by *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Basic Microbiology*, 42, 388-95.
- Liebl, W., Winterhalten, C., Baumeister, W., Armbrrecht, M., & Valdez, M. (2008). Xylanase attachment to the cell wall of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Journal of Bacteriology*. 190(4), 1350-8.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, L., et al. (2003). *Molecular Cell Biology. Perspective* (5th ed., p. 973). San Francisco, CA: W.H. Freeman.
- Luthi, E., Love, D. R., McAnulty, J., Wallace, C., Caughey, P. A., Saul, D., & Bergquist, P. L. (1990). Cloning, sequence analysis, and expression of genes encoding xylan-degrading enzymes from the thermophile "*Caldocellum saccharolyticum*." *Applied and Environmental Microbiology*, 56(4), 1017-24.

- Maat, J., Roza, M., Verbakel, J., Stam, H., Santos da Silva, M. J., Bosse, M., Egmond, M. R., et al. (1992). Xylanases and their applications in bakery. En J. Visser, G. Beldman, M. A. K. VanSomeren, & A. G. J. Voragem (Eds.), *Xylans and Xylanases* (pp. 349-60). Amsterdam: Elsevier.
- Maguire, A., & Rugg-Gunn, A. J. (2003). Xylitol and caries prevention - is it a magic bullet? *British Dental Journal*, 194(8), 429-36.
- Marti, N., Funes, L. L., Saura, D., & Micol, V. (2008). An update on alternative sweeteners. *Agro Food Industry Hi-tech*, 19(1), 8-10.
- Martínez, J. P., Gil, M. L., Casanova, M., López-Ribot, J. L., García De Lomas, J., & Sentandreu, R. (1990). Wall mannoproteins in cells from colonial phenotypic variants of *Candida albicans*. *Journal of General Microbiology*. 136, 2421-32.
- Masera Cerutti, O., Rodríguez Martínez, N., Lazcano Martínez, I., Horta Nogueira, L. A., Macedo, I. C., Trindade, S. C., Thrän, D., et al. (2006). *Potenciales y Viabilidad del Uso de Bioetanol y Biodiesel para el Transporte en México* (p. 600). México, DF.
- Matsumura, S., Sakiyama, K., & Toshima, K. (1999). Preparation of octyl-B-D-xylobioside ad xyloside by xylanase catalyzed direct transglycosylation reaction of xylan and octanol. *Biotechnology Letters*, 21, 17-22.
- Mattila, P. T. (1999). *Dietary xylitol in the prevention of experimental osteoporosis: Beneficial effects on bone resorption, structure and biomechanics*. University of Oulu.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.
- Miyake, K., Machida, Y., Hattori, K., & Iijima, S. (1997). *Characterization of a multi-domain cellulase from and extremely thermophilic anaerobe strain NA10*. Aichi, Japan.
- Morris, D. D., Gibbs, M. D., Ford, M., Thomas, J., & Bergquist, P. L. (1999). Family 10 and 11 xylanases genes from *Caldicellulosiruptor* sp. strain Rt69B.1. *Extremophiles*, 3(2), 103-11.
- Nakamura, S., Wakabayashi, K., Nakai, R., Aono, R., & Horikoshi, K. (1993). Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41M-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(7), 2311-6.
- Okazaki, W., Akiba, T., Horikoshi, K., & Akahoshi, R. (1985). Purification and characterization of xylanases from alkalophilic thermophilic *Bacillus* spp. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49(7), 2033-9.
- Oksanen, T., Pere, J., Paavilainen, L., Buchert, J., & Viikari, L. (2000). Treatment of recycled kraft pulps with *Trichoderma reesei* hemicellulases and cellulases. *Journal of Biotechnology*, 78, 39-48.
- Paice, M. G., & Jurasek, L. (1979). Structural and mechanistic comparisons of some B-1,4-glycosidase hydrolases. *Hydrolysis of Cellulose: Mechanisms of Enzymatic and Acid Catalysis*, Vol. 181 (pp. 361-74). Washington, DC: American Chemical Society.

- Pakpitcharoen, A., Potivejkul, K., Kanjanavas, P., Areekit, S., & Chansiri, K. (2008). Biodiversity of thermotolerant *Bacillus* sp producing biosurfactants, biocatalysts, and antimicrobial agents. *SCIENCEASIA*, 34(4), 424-431.
- Parajó, J. C., Domínguez, H., & Domínguez, J. M. (1998). Biotechnological production of xylitol. Part, interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. *Bioresource Technology*, 65, 191-201.
- Patel, R. N., Grabski, A. C., & Jeffries, T. W. (1993). Chromophore release from kraft by purified *Streptomyces roseiscleroticus* xylanase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39, 405-12.
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., De La Rubia, T., & Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*, 5(2), 53-63.
- Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., & Amorim, D. S. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(5), 577-91.
- Priest, F. G., Goodfellow, M., & Todd, C. (1988). A numerical classification of the genus *Bacillus*. *Journal of General Microbiology*, 134(7), 1847-82.
- REN21. (2010). *Renewables 2010 Global Status Report. Nuclear Safety* (p. 78). Paris.
- Reusser, F., Koepsell, H. J., & Savage, G. M. (1961). Degeneration of *Streptomyces niveus* with repeated transfers. *Applied and Environmental Microbiology*. 9(4). 342-5.
- Rodríguez, H. (1995). Colony switching in an alpha-amylase-producing strain of *Bacillus subtilis*. *Journal of Industrial Microbiology*. 15, 112-5.
- Rose, D. J., & Inglett, G. E. (2010). Two-stage hydrothermal processing of wheat (*Triticum aestivum*) bran for the production of feruloylated Arabinoxylooligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10), 6427-6432.
- SAGARPA. (2009). *Programa de Producción Sustentable de Insumos para Bioenergéticos y de Desarrollo Científico y Tecnológico* (p. 25). México, DF.
- SAGARPA. (2011). Proyectos de Investigación. *Bioenergéticos - SAGARPA*. Accesada Septiembre 7, 2011, de <http://www.bioenergeticos.gob.mx/index.php/programas/proyectos-de-investigacion.html>
- Saha, B. (2003). Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(5), 279-91.
- Saini, H. S., Shepherd, M., & Henry, R. J. (1999). Microwave extraction of total genomic DNA from barley grains for use in PCR. *Journal of the Institute of Brewing*, 105(3), 185-90.
- Salles, B. C., Medeiros, R. G., Bão, S. N., Silva, F. G., & Filho, E. X. F. (2005). Effect of cellulase free xylanases from *Acrophialophora nainiana* and *Hemicola grisea* var. *thermoidea* on eucalyptus kraft pulp. *Process Biochemistry*, 40(1), 343-9.

- Sánchez-González, M., Blanco-Gámez, A., Escalante, A., Valladares, A. G., Olvera, C., & Parra, R. (2011). Isolation and characterization of new facultative alkaphilic *Bacillus flexus* strains from maize processing waste water (nejayote). *Letters in Applied Microbiology*, 52(4), 413-9.
- Sapre, M. P., Jha, H., & Patil, M. B. (2005). Purification and characterization of a thermoalkalophilic xylanase from *Bacillus* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(5), 649-54.
- Saul, D. J., Williams, L. C., Love, D. R., Chamley, L. W., & Bergquist, P. L. (1989). Nucleotide sequence of a gene from *Caldocellum saccharolyticum* encoding for exocellulase and endocellulase activity. *Nucleic Acids Research*, 17, 439.
- Saupe, S. G. (2009). Cell Walls - Structure & Function. Accesada Octubre 6, 2009, de <http://employees.csbsju.edu/SSAUPE/biol327/Lecture/cell-wall.htm>
- Schematic representation of the cell wall of an onion. (2000). Accesada Octubre 6, 2009, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mcb.figgrp.6591>
- SENER. (2009). *Programa de Introducción de Bioenergéticos* (p. 34). México, DF.
- Shah, A. K., Sidid, S. S., Ahmad, A., & Rele, M. V. (1999). Treatment of bagasse pulp with cellulase free xylanase from alkalophilic *Bacillus* sp. Sam-3. *Bioresource Technology*, 68, 133-40.
- Shao, W., DeBlois, S., & Wiegel, J. (1995). A high-molecular weight, cell-associated xylanase isolated from exponentially growing *Thermoanaerobacterium* sp. strain JW/SL-YS485. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(3), 937-40.
- Shapiro, J. A. (1988). What transposable elements do in bacteria. En M. E. Lambert, J. F. McDonald, & I. B. Weinstein (Eds.), *Eukariotic Transposable Elements as Mutagenic Agents* (pp. 3-15). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Shapiro, J. A., & Higgins, N. P. (1989). Differential activity of a transposable element in *Escherichia coli* colonies. *Journal of Bacteriology*. 171(11), 5975-86.
- SIAP. (2011). Cierre de la Producción Agrícola por Cultivo. *Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera*. Accesada Septiembre 4, 2011, de http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350
- Sonderegger, M., Jeppsson, M., Larsson, C., Gorwa-Grauslund, M. F., Boles, E., Olsson, L., Spencer-Martins, I., et al. (2004). Fermentation performance of engineered and evolved xylose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnology and Bioengineering*, 11(9), 583-9.
- Sunna, A., & Antranikian, G. (1997). Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 17(1), 39-67.
- Taneja, K., Gupta, S., & Kuhad, R. C. (2002). Properties and application of a partially purified alkaline xylanase from an alkalophilic fungus *Aspergillus nidulans* KK-99. *Bioresource Technology*, 85(1), 39-42.

- Tenkanen, M., Viikari, L., & Buchert, J. (1997). Use of acid tolerant xylanase for bleaching of kraft pulps. *Biotechnology Techniques*, 11(2), 935-8.
- Tombs, M., & Harding, S. E. (1998). *An Introduction to Polysaccharide Biotechnology* (p. 183). London: Taylor & Francis.
- Turner, P., Mamo, G., & Nordberg Karlsson, E. (2007). Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microbial Cell Factories*, 6, 9.
- Twomey, L. N., Pluske, J. R., Rowe, J. B., Choct, M., Brown, W., McConnell, M. F., & Pethick, D. W. (2003). The effects of increasing levels of soluble non-starch polysaccharides and inclusion of feed enzymes in dog diets of faecal quality and digestibility. *Animal Feed Science and Technology*, 108(1-4), 71-82.
- Uhari, M., Kontiokari, T., & Niemelä, M. (1998). A novel use of xylitol sugar in preventing acute otitis media. *Pediatrics*, 102(4), 879-974.
- Valdés-Delgado, A. (2004). *La biomasa azucarera como fuente de energía renovable* (p. 19). La Habana.
- Vegas, R., Alonso, J. L., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2004). Processing of rice husk autohydrolysis liquors for obtaining food ingredients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(24), 7311-7.
- van de Werken, H. J., Verhaart, M. R., VanFossen, A. L., Willquist, K., Lewis, D. L., Nichols, J. D., Goorissen, H. P., et al. (2008). Hydrogenomics of the extremely thermophilic bacterium *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(21), 6720-9.
- Williams, A. M., & McCoy, E. (1953). Degeneration and regeneration of *Streptomyces griseus*. *Applied Microbiology*, 1, 307-13.
- Wong, K. K. Y., & Saddler, J. N. (1993). Applications of hemicellulases in the food, feed, and pulp and paper industries. En M. P. Coughlan & G. P. Hazlewood (Eds.), *Hemicelluloses and Hemicellulases* (pp. 127-43). London: Portland Press.
- Wong, K. K. Y., Tan, L. U. L., & Saddler, J. N. (1988). Multiplicity of B-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiological Reviews*, 52(3), 305-17.
- Xylan. (n.d.). Accesada Noviembre 8, 2010, de <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Xylan.svg>
- Zabner, J., Seiler, M. P., Launspach, J. L., Karp, P. H., Kearney, W. R., Look, D. C., Smith, J. J., et al. (2000). The osmolyte xylitol reduces the salt concentration of airway surface liquid and may enhance bacterial killing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(21), 11614-9.
- Zamost, B. L., Nielsen, H. K., & Starnes, R. L. (1991). Thermostable enzymes for industrial applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 8(2), 71-81.
- Zhao, J., Li, X., Qu, Y., & Gao, P. (2002). Xylanase pretreatment leads to enhanced soda pulping of wheat straw. *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 734-40.

Zhou, F., Chen, H., & Xu, Y. (2010). GASdb: a large-scale and comparative exploration database of glycosyl hydrolysis systems. *BMC Microbiology*, 10, 69.

Zvelebil, M. J., & Sternberg, M. J. (1988). Analysis and prediction of the location of catalytic residues in enzymes. *Protein Engineering*, 2, 127-38.