

## AISLAMIENTO DE BACTERIAS TERMOFILICAS PRODUCTORAS DE XILANASAS.

## Isolation of xylanase-producing thermophilic bacteria.

Jeannette Steiner W.<sup>1</sup>, Marcos Mella C.<sup>1</sup>, Rubén Polanco O.<sup>1</sup>, Ximena Ortega A.<sup>1</sup>,  
Jaime Eyzaguirre P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Depto. de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. <sup>2</sup> Depto. de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Proyecto FONDECYT 1960241.

## RESUMEN

Las xilanasas son enzimas, producidas por hongos y bacterias, que degradan el xilano de las hemicelulosas vegetales y tienen una importante aplicación en el bioblanqueamiento de la celulosa.

A partir de compost, se obtuvieron cinco aislados de bacterias termofilicas productoras de xilanasas pertenecientes al género *Bacillus*. Se estudió la cinética de producción de xilanasas extracelulares alcanzándose la máxima actividad (2,8 U/mL) con el aislado K al cuarto día de cultivo. En zimogramas se observó que todas los aislados producen una sola banda de actividad xilanasa excepto K el cual produce una segunda xilanasa a partir del 8º día de cultivo. Las enzimas producidas por K presentaron la mayor termoestabilidad con un 77% de actividad retenida al cabo de 43 h de incubación a 60°C.

**Palabras claves:** xilanasas, bacterias, termófilos, *Bacillus*, termoestables.

## SUMMARY

Xylanases are enzymes, produced by bacteria and fungi, that degrade xylan from plant hemicelluloses and have an important application in cellulose pulp biobleaching. Five isolates of xylanase producing thermophilic *Bacillus sp.* were obtained from compost samples. The kinetics of extracellular xylanase production was followed. Maximum activity (2,8 U/mL) was produced by isolate K after

four days of culture. Zymograms revealed that all the isolates produce one xylanase activity band, except for K that produces a second xylanase after eight days of culture. Enzymes from isolate K presented the highest thermostability with 77% activity retained after 43 h of incubation at 60°C.

## INTRODUCCION

En la actualidad existe una creciente demanda por productos y procesos seguros para el medio ambiente. La industria de la celulosa no ha sido una excepción, ya que los compuestos orgánicos clorados producidos en el blanqueamiento de la pulpa de celulosa tienen un fuerte impacto negativo en el medio ambiente.

Desde fines de los años 80, la industria de la pulpa y el papel se ha visto forzada a considerar todas las nuevas técnicas disponibles para reducir el consumo de cloro. Por este motivo, se ha estudiado la utilización de enzimas xilanolíticas como una alternativa a los agentes químicos.

Las enzimas xilanolíticas corresponden a un complejo enzimático formado por diversas enzimas: endo-xilanasas,  $\beta$ -xilosidasas, glucuronidasas,  $\alpha$ -arabinofuranosidasas y acetilesterasas, las cuales son capaces de hidrolizar polisacáridos complejos (hemicelulosa, xilano). Las endo-xilanasas, o xilanasas, son producidas por hongos y bacterias. Entre las xilanasas bacterianas las de *Streptomyces sp.* y *Bacillus sp.* han sido las más estudiadas. En

general las xilanasas de *Bacillus* presentan un pH óptimo de 7, reteniendo gran parte de su actividad a pH alcalinos. Las enzimas activas a mayores temperaturas y pH alcalino tienen un gran potencial biotecnológico, ya que pueden ser utilizadas con mayor eficiencia, evitando el costo que significa cambiar la temperatura y/o el pH durante el proceso de blanqueamiento de la pulpa de la celulosa.

Es por lo tanto de gran interés la obtención de xilanasas termoestables. Una buena fuente la constituyen los microorganismos termofílicos. El presente trabajo describe la obtención, a partir de compost, de aislados de *Bacillus sp.* productores de xilanasas termoestables.

## MATERIALES Y METODOS

**Aislamiento de bacterias xilanolíticas.** Muestras de 1g de compost de paja de trigo se incubaron en un medio de sales minerales con xilano cáscara de avena (Sigma) al 1% y pH 7 a 55°C, en un baño termostático con agitación entre 3 y 5 días. Con el objeto de enriquecer el medio en bacterias xilanolíticas se realizaron trasplantes sucesivos en las condiciones ya indicadas. Al cabo de tres trasplantes se sembró en placas con xilano y se seleccionaron aquellas colonias capaces de producir halos de hidrólisis del xilano.

**Producción de enzimas extracelulares.** Se evaluó la cinética de producción de enzimas en medio líquido conteniendo: peptona 0,5%, extracto de levadura 0,5%,  $K_2HPO_4$  0,1%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,1%, NaCl 0,01% y xilano de cáscara de avena 1%, pH 7,2. Se inoculó con  $10^8$  UFC/100mL de medio. Diariamente se tomaron muestras, se centrifugaron y se determinó la actividad xilanásica en los sobrenadantes.

**Ensayo enzimático.** La actividad xilanásica se determinó según Belancic y cols (1) incubando la enzima por 5 min a 50°C en tampón fosfato pH 7 con xilano de abedul como sustrato. La liberación de azúcares reductores se midió utilizando ácido

3,5-dinitrosalicílico. 1 U/mL corresponde a 1  $\mu$ mol de xilosa liberado por mL por min.

**Ensayo de termoestabilidad de la enzima.** Se incubó la enzima en ausencia de sustrato en tampón fosfato pH 7 a diferentes temperaturas y se midió la actividad xilanásica a distintos tiempos, en condiciones estándar.

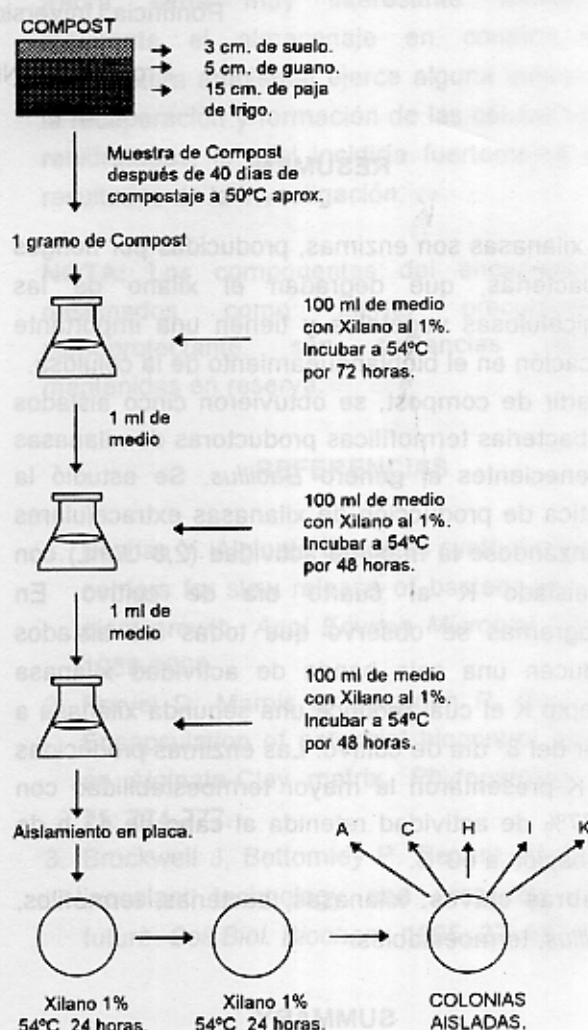


Figura 1. Esquema de aislamiento de las bacterias termofílicas.

**Zimogramas.** Se identificaron las bandas de actividad mediante zimogramas realizados de acuerdo a la técnica de Lee y cols (2), que incluye xilano en el gel separador y posterior renaturación de las enzimas en tampón fosfato. A continuación se corta el gel y una mitad se tiñe con Azul de

Coomassie para identificar las proteínas y la otra con Rojo Congo para ubicar las bandas de actividad.

## RESULTADOS Y DISCUSION

El aislamiento de las bacterias se hizo a partir de compost de paja de trigo (3) donado gentilmente por la Profesora María Teresa Varnero de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Chile. El aislamiento se realizó a partir de 1g de compost de acuerdo al esquema de la Figura 1. La selección se realizó incubando a 54°C placas con xilano al 1% y observando los halos de hidrólisis alrededor de las colonias. Se obtuvieron cinco aislados diferentes que fueron denominados A, C, H, I y K. Los microorganismos presentaron crecimiento entre los 40 y 70°C, determinándose que para todos los aislados, la temperatura óptima de desarrollo era 55°C.

En la Tabla 1 se observan algunas características morfológicas, de cultivo y reacciones bioquímicas de los diferentes aislados. De acuerdo a sus características, las bacterias fueron clasificadas dentro de la Familia *Bacillaceae*, Género *Bacillus*

En la Figura 2 se observa la cinética de producción de xilanasas por las cinco aislados de *Bacillus sp.* crecidos en 1% de xilano de cáscara de avena como única fuente de carbono. La mayor actividad corresponde a K con un máximo de 2,8 U/mL a los 4 días de cultivo.

La Figura 3 muestra la termoestabilidad de los sobrenadantes crudos. La enzima producida por K presentó la mayor termoestabilidad con un 77% de actividad retenida al cabo de 43 horas de incubación a 60°C.

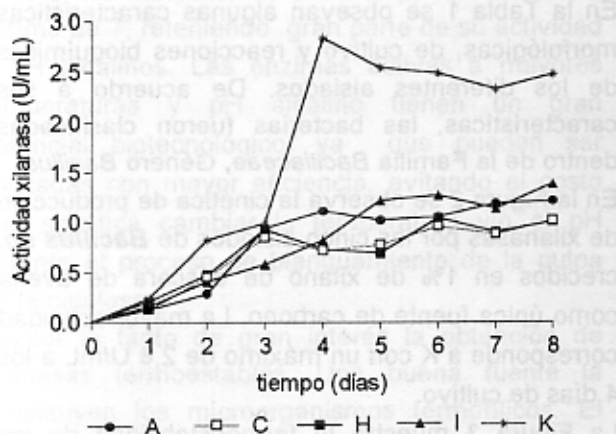
Se estudió el pH más adecuado para efectuar el ensayo de actividad, observándose un incremento de aproximadamente un 25% en la actividad al subir el pH del ensayo de 5.3 a 7 (Figura 4).

Tabla 1. Características morfológicas, de cultivo y reacciones bioquímicas de las cepas aisladas

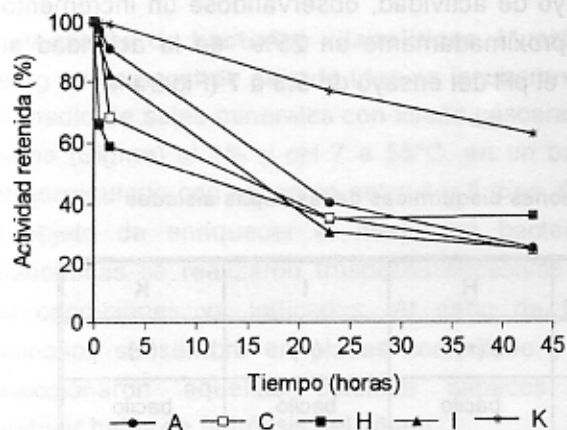
CEPA	A	C	H	I	K
GRAM	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
FORMA	bacilo	bacilo	bacilo	bacilo	bacilo
ESPORAS <sup>1</sup>	+	+	+	+	+
MOVILIDAD	-	-	-	-	-
CATALASA	+	+	+	+	+
CRECIMIENTO AEROBICO	+	+	+	+	+
T (°C) DE DESARROLLO	45-70	45-70	45-70	45-70	45-70
FERMENTACION de GLUCOSA	+	+	+	+	+
INDOL	-	-	-	-	-
CITRATO	-	-	-	-	-

<sup>1</sup> Esporas terminales que deforman la bacteria, observándose éstas como paillito de tambor.



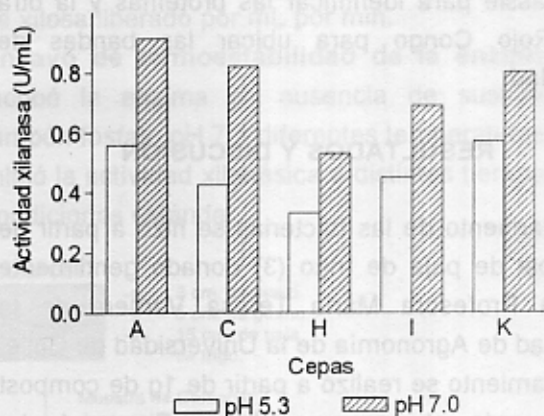


**Figura 2.** Cinética de producción de xilanasas por los aislados A, C, H, I y K de *Bacillus sp.* crecidos en xilano de cáscara de avena como fuente de carbono.

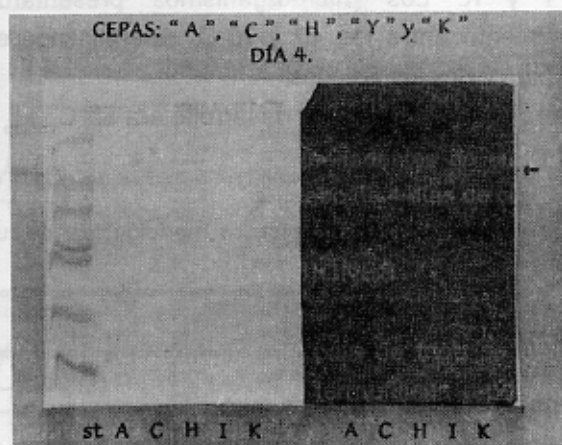


**Figura 3.** Termoestabilidad a 60°C de la actividad xilanasica obtenida de sobrenadantes de cultivo de los distintos aislados.

Al realizar zimogramas con sobrenadantes obtenidos a partir del 4° día de cultivo se aprecia una sola banda de actividad para todas las muestras (Figura 5). En cambio para K, se observa una segunda banda de actividad al 8° día de cultivo (Figura 6). Resultados similares han sido descritos por Dey et al (3) quienes aislaron una cepa alcalofílica y termofílica de *Bacillus sp.* la cual produce 3 U/mL de xilanasica al ser crecido en xilano. Esta cepa produce dos xilanasas de masas moleculares 35.000 y 15.800.



**Figura 4.** Actividad xilanasica de los aislados determinadas en tampón citrato (pH 5,3) y tampón fosfato (pH 7,0).



**Figura 5.** Zimograma de sobrenadantes de cultivo de los aislados A, C, H, I, K al cabo de 4 días de cultivo.

## CONCLUSIONES

- 1.- A partir de compost de paja de trigo se obtuvo cinco aislados de bacterias termofílicas productoras de xilanasas extracelulares pertenecientes al género *Bacillus*.
- 2.- La mejor productora de xilanasas es K con una actividad de 2.8 U/ml en medio con xilano de cáscara de avena.

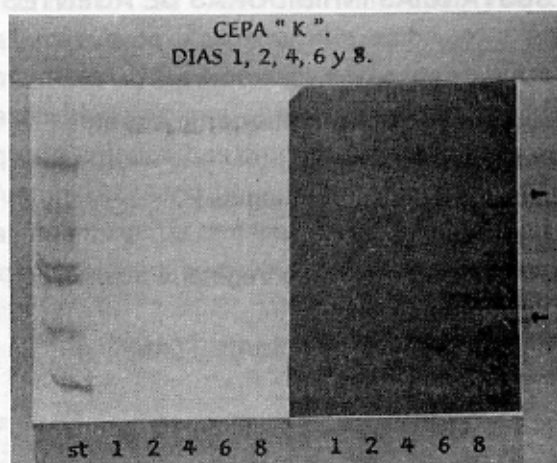


Figura 6. Zimograma de sobrenadantes de cultivo de K al cabo de 1, 2, 4, 6 y 8 días de cultivo.

3.- En todos los casos las enzimas presentan un incremento de su actividad al subir el pH del ensayo de 5,3 a 7.

4.- Al realizar zimogramas de los sobrenadantes de cultivo se observó una banda de actividad xilanasas, excepto con K que presenta una segunda banda al 8° día de cultivo.

5.- El aislado K aparece como la de mayor potencial biotecnológico por su mayor productividad de xilanasas y la alta termoestabilidad de ésta.

## REFERENCIAS

1. Belancic A., Scarpa J., Peirano A., Díaz R., Steiner J., Eyzaguirre J. *Penicillium purpurogenum* produces several xylanases: purification and properties of two of the enzymes. *J Biotech* 1995, 41: 71-79.
2. Lee JMT., Hu Y., Zhu H., Cheng KJ., Krell PJ., Forsberg CW. Cloning of a xylanase gen from the ruminal fungus *Neocallimastix patriciarum*-27 and its expression in *E. coli*. *Can J Microbiol* 1993, 39: 134-139.
3. Fiabane S y Melendez C. Tesis para optar al Título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, 1987.
4. Dey D., Hinge J., Shende A., Rao M. Purification and properties of extracellular endoxylanases from alkalophilic thermophilic *Bacillus sp.* *Can J Microbiol* 1992, 38: 436-442.