

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE XILANASAS
EXTRACELULARES PROVENIENTES DE BACTERIAS
EXTREMÓFILAS***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
de Magíster en Bioquímica área de Especialización en
Bioquímica Ambiental y Memoria para optar al Título de
Bioquímico por:**

FRANCISCA CONTRERAS LEIVA

**Director de Tesis: Dra. Jenny Blamey Alegría
Co-Director de Tesis: Dr. Davor Cotoras Tadic**

Santiago-CHILE

Junio 2016

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

FRANCISCA CONTRERAS LEIVA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica Ambiental y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día _____

Director de Tesis:

Dra. Jenny Blamey Alegría _____

Co-director de Tesis:

Dr. Davor Cotoras Tadic _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Sergio Álvarez Armijo _____

Dr. Rubén Polanco Opazo _____

Dr. Christian Wilson Moya _____

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, en especial a mi madre Cecilia y a mi padre Sergio, por quererme, apoyarme y enseñarme el valor de la perseverancia, el cual me ayudó a seguir adelante en este trabajo. A mi esposo Octavio por ayudarme de todas las formas posibles, amarme a pesar de todo y sacarme una sonrisa en los peores momentos.

A la directora de tesis, la Dra. Jenny Blamey quien me dio su apoyo y guía en la realización de este largo trabajo.

A Olivier Rickmers y Jenny Blamey, directores de la Fundación Científica y Cultural Biociencia, quienes financiaron este proyecto y confiaron en mi persona.

A mis compañeros de Biociencia, Daniela, Sebastián, María Teresa, Paulina y Patricio por darme sus consejos, palabras de aliento y brindarme una mano en los momentos difíciles.

A mis compañeros de carrera, Juan, Valentina, Daniel, Felipe, Adrián, Christopher y Fernanda con los cuales compartí no solo largas noches de estudio, si no risas, apoyo y amistad durante todos estos años.

A la comisión evaluadora por guiar, comprender y enriquecer mi trabajo.

Finalmente, quiero agradecer por todas las situaciones que me tocaron vivir, las cuales me ayudaron a formar carácter y crecer como investigador.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|------|
| TABLA DE CONTENIDO | IV |
| ÍNDICE DE FIGURAS | VI |
| ÍNDICE DE TABLAS | VIII |
| RESUMEN | IX |
| 1. MARCO TEÓRICO..... | 1 |
| 1.1. Extremófilos y enzimas..... | 2 |
| 1.2. Adaptaciones de extremófilos y extremozimas | 3 |
| 1.3. Enzimas en la industria..... | 5 |
| 1.4. Enzimas e industria del papel..... | 6 |
| 1.5. Xilanasas provenientes de microorganismos..... | 7 |
| 1.6. Clasificación de las xilanasas | 9 |
| 1.7. Xilano, sustrato de las xilanasas | 11 |
| 1.8. Mecanismos catalíticos de las xilanasas..... | 13 |
| 1.9. Xilanasas e industria del papel..... | 15 |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS | 18 |
| 2.1. Aislamiento de cepas bacterianas provenientes de sitios geotérmicos y la Antártica | 18 |
| 2.2. Procedimientos de biología molecular..... | 20 |
| 2.3. Detección de la actividad xilanolítica | 22 |
| 2.4. Purificación de una xilanasas extracelular proveniente de las bacterias seleccionadas..... | 24 |
| 2.5. Identificación de la xilanasas purificada proveniente del aislado 7L y Asc6BA..... | 26 |
| 2.6. Caracterización bioquímica de las xilanasas purificadas..... | 29 |
| 3. RESULTADOS | 32 |
| 3.1. Aislamiento de microorganismos a partir de muestras ambientales provenientes de sitios geotérmicos y la Antártica..... | 32 |
| 3.2. Selección de aislados de acuerdo a su actividad xilanolítica..... | 33 |
| 3.3. Purificación de una xilanasas extracelular de <i>Anoxybacillus</i> sp. 7L mediante técnicas cromatográficas..... | 35 |
| 3.4. Identificación de las xilanasas extracelulares presentes en el genoma de <i>Anoxybacillus</i> sp. 7L..... | 37 |
| 3.5. Determinación de temperatura, pH óptimo y termoestabilidad de la xilanasas en el medio extracelular de <i>Anoxybacillus</i> sp. 7L y semipurificada..... | 38 |
| 3.6. Medición de la actividad xilanolítica extracelular de <i>Anoxybacillus</i> sp. 7L con el ensayo del DNS modificado..... | 41 |
| 3.7. Selección de nuevos aislados presentes en la colección de Fundación Biociencia..... | 42 |
| 3.8. Purificación de xilanasas extracelulares de <i>Bacillus</i> sp. Asc6BA..... | 44 |
| 3.9. Identificación de xilanasas extracelulares de <i>Bacillus</i> sp. Asc6BA..... | 46 |

| | |
|---|----|
| 3.10. Caracterización bioquímica de las xilanasas purificadas de <i>Bacillus</i> sp. Asc6BA..... | 52 |
| 4. DISCUSIÓN | 57 |
| 5. CONCLUSIÓN | 66 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 67 |
| 7. ANEXO..... | 74 |
| 7.1. Medios de cultivo utilizados para el crecimiento de los diferentes aislados.... | 74 |
| 7.2. Determinación de la masa molecular de las xilanasas X2 y X3. | 77 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estructura tridimensional de xilanasas. | 11 |
| Figura 2. Xilano y las enzimas necesarias para degradarlo. | 12 |
| Figura 3. Mecanismo de acción de las glicosil hidrolasas. | 14 |
| Figura 4. Detección cualitativa de actividad xilanasa del aislado 7L. | 35 |
| Figura 5. Detección cualitativa de actividad xilanasa de los aislados (A) Asc6BA y (B) 2.10-2C. | 43 |
| Figura 6. Visualización de fracciones con actividad xilanólítica obtenidas en la purificación de xilanasas a partir del sobrenadante del aislado Asc6BA. | 48 |
| Figura 7. Gel SDS-PAGE al 12 % de la xilanasa X2 para zimograma. | 49 |
| Figura 8. Gel SDS-PAGE al 12 % de la xilanasa X3 para zimograma. | 50 |
| Figura 9. SDS PAGE al 12 % de la xilanasa X2 teñido con azul de Coomassie. | 53 |
| Figura 10. Actividad enzimática en función de la temperatura de la xilanasa (A) X2 y (B) X3. | 54 |
| Figura 11. Actividad enzimática en función del pH de la xilanasa (A) X2 y (B) X3. | 54 |
| Figura 12. Termoestabilidad de la actividad xilanólítica de (A) X2 y (B) X3 en el tiempo. | 55 |
| Figura 13. Actividad relativa de la xilanasa X2 y X3 antes y después de someterlas a liofilización. | 56 |
| Figura 14. Curva de calibración para la determinación de la masa molecular en condiciones nativas de las xilanasas X2 y X3. | 77 |
| Figura 15. Patrón de elución de proteínas de la xilanasa X2 de las fracciones obtenidas de la columna Superdex 200. | 77 |

Figura 16. Patrón de elución de proteínas de la xilanasa X3 de las fracciones obtenidas de la columna Superdex 200. 78

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Aislados utilizados pertenecientes a la colección de microorganismos de Fundación Biociencia..... | 19 |
| Tabla 2. Afiliación de los aislados mediante el análisis del gen que codifica para el ARNr 16S..... | 33 |
| Tabla 3. Actividad xilanolítica medida mediante el ensayo cualitativo del rojo congo. . | 34 |
| Tabla 4. Tabla de purificación de la xilanasa proveniente del aislado 7L..... | 37 |
| Tabla 5. Identificación de proteínas con posible actividad xilanolítica en el genoma de la bacteria 7L. | 37 |
| Tabla 6. Evaluación del blanco a utilizar en el ensayo del DNS..... | 39 |
| Tabla 7. Absorbancias obtenidas de los diferentes ensayos revelados con DNS..... | 40 |
| Tabla 8. Comparación de la actividad de la xilanasa comercial proveniente de <i>A. niger</i> con el ensayo del DNS y RRB-X..... | 41 |
| Tabla 9. Actividad xilanolítica obtenida del ensayo cualitativo de los aislados seleccionados de la colección de Fundación Biociencia..... | 43 |
| Tabla 10. Tabla de purificación de la xilanasa X2..... | 45 |
| Tabla 11. Tabla de purificación de la xilanasa X3..... | 45 |
| Tabla 12. Genes que codifican para xilanasas presentes en el genoma de <i>Bacillus</i> sp. Asc6BA. | 47 |

RESUMEN

Las xilanasas son enzimas encargadas de hidrolizar el enlace β -1,4-D-xilosídico de la cadena principal del xilano, el compuesto más abundante de la hemicelulosa presente en la pared celular de las células vegetales. Estas enzimas pueden ser utilizadas en diversas industrias, como por ejemplo en la industria del papel para mejorar la etapa del blanqueamiento, ya que se disminuyen los compuestos químicos contaminantes utilizados actualmente y la energía utilizada en el proceso, generando una menor impacto ambiental. La etapa del blanqueamiento se lleva a cabo a altas temperaturas y pH alcalino, siendo las enzimas que naturalmente son activas en estas condiciones, las más idóneas para el proceso. Este tipo de enzimas se pueden encontrar en microorganismos que crecen de forma óptima en estas condiciones, los extremófilos. El objetivo de este trabajo consistió en aislar bacterias extremófilas que posean enzimas xilanasas extracelulares con actividad en el rango de temperatura entre 50 - 70 °C y pH 8,0 - 9,0, para posteriormente purificarla y caracterizarla. La búsqueda se realizó en microorganismos aislados de muestras ambientales provenientes de géiseres, volcanes, la Antártica, salares y una estufa de esterilización. De los aislados obtenidos, se seleccionaron el aislado termófilo 7L y el aislado halófilo Asc6BA pertenecientes al género *Anoxybacillus* y *Bacillus*, respectivamente. El aislado 7L mostró actividad xilanolítica, pero la expresión de la xilanasas fue muy baja, haciéndola inadecuada para los ensayos en el laboratorio. Por otra parte, del aislado Asc6BA fue posible purificar dos xilanasas extracelulares, denominadas X2 y X3, pertenecientes a las familias GH 8 y GH 11, respectivamente. Entre las características obtenidas, la xilanasas X2 posee una actividad óptima a una temperatura de 50 °C y pH

6,0, y es funcional por una hora a 50 °C. Por otra parte, la xilanasas X3 posee una actividad óptima a una temperatura de 60 °C y pH 7,0, y retiene más del 70% de su actividad al ser incubada por 32 horas a 50 °C. Ambas xilanasas retienen más del 90 % de su actividad luego de ser sometidas a liofilización.

De acuerdo al trabajo realizado, se evidenció que la bacteria halófila Asc6BA perteneciente al género *Bacillus* posee dos xilanasas extracelulares, X2 y X3, las cuales poseen actividad en rangos adecuados para su utilización en diversas etapas de la industria del papel.

1. MARCO TEÓRICO

Las enzimas son proteínas cuya función es acelerar reacciones químicas y posibilitar procesos que normalmente no ocurrirían bajo ciertas condiciones. El mecanismo de catálisis enzimática, al igual que en la catálisis química, consiste en reducir la energía de activación de la reacción lo que conduce a un aumento de la velocidad de reacción en un factor de 10^6 a 10^{12} con respecto a reacciones sin catalizar. Las enzimas son muy selectivas y específicas en cuanto al sustrato que utilizan y a los productos resultantes de la reacción, siendo inusual que generen productos secundarios. La especificidad de ellas viene dada por la identidad de los grupos químicos (especificidad geométrica) y por la quiralidad (estereoespecificidad) de los sustratos utilizados [1]. Por las características que presentan, cada vez es más interesante realizar un reemplazo total o parcial de los catalizadores químicos utilizados actualmente por enzimas. En la actualidad, los microorganismos como arqueas, bacterias, hongos y levaduras, que en su mayoría crecen óptimamente entre 20 y 40 °C, son los modelos más utilizados en la búsqueda y producción de enzimas. La problemática hoy en día, es que las enzimas provenientes de los microorganismos nombrados, no se ajustan por completo a las necesidades requeridas en la industria, especialmente en procesos de producción que se llevan a cabo en condiciones más agresivas de temperatura, pH y salinidad, entre otros. Para lograr cubrir estas necesidades, la búsqueda de enzimas se amplió hacia microorganismos que naturalmente toleren estas condiciones: los extremófilos [2].

1.1. Extremófilos y enzimas

Los extremófilos son organismos capaces de vivir en condiciones extremas de temperatura ($>50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $<15\text{ }^{\circ}\text{C}$), presión ($>10\text{ MPa}$), radiación ($>1,5\text{ kGy}$ radiación gamma), salinidad (2-5 M NaCl) y pH (<3 y >9), por lo que pueden ser clasificados en diversos grupos [3]. Los extremófilos pueden crecer en una o más condiciones extremas consideradas medioambientes no convencionales. Debido a lo anterior, se asume que las propiedades de sus enzimas han sido naturalmente optimizadas para ser funcionales bajo estas condiciones. Esto ha sido validado por medio de la caracterización de enzimas purificadas provenientes de este tipo microorganismos, denominadas extremozimas [4, 5]. Las extremozimas tienen propiedades que las hacen diferentes y únicas en comparación con sus pares provenientes de microorganismos que crecen en condiciones neutras de temperatura, pH entre otros. El interés de la industria hacia las extremozimas radica en que muchos de los procesos de producción ocurren en una o más condiciones extremas, ya sea de alta y/o baja temperatura, pH ácidos y/o alcalinos y en una amplia gama de solventes, evidenciando que las enzimas poli-extremófilas son las más adecuadas y apetecidas para llevar a cabo tales procesos [6]. Por ejemplo, en el proceso de degradación de polímeros, como celulosa, quitina o almidón, se necesitan enzimas que sean activas a altas temperaturas y condiciones extremas de acidez o basicidad.

1.2. Adaptaciones de extremófilos y extremozimas

Los extremófilos poseen diversas adaptaciones que les permiten crecer en condiciones extremas. Por ejemplo, en los termófilos, la membrana celular de estos microorganismos está compuesta de ácidos grasos saturados, los cuales la rigidizan a altas temperaturas [7]. Adicionalmente, los termófilos poseen una ADN girasa que produce un superenrollamiento positivo en el ADN, lo que aumenta la temperatura de desnaturalización de ésta molécula [8]. Las proteínas de los termófilos tienen una estructura secundaria diferente, presentando una mayor hidrofobicidad, menor cantidad de cavidades, menor cantidad de residuos termolábiles, mayor cantidad de puentes de hidrógeno y salinos, un aumento en el contenido helicoidal, entre otros [9], lo cual le confiere una mayor termoestabilidad y mayor resistencia a la desnaturalización [10–12]. Debido al interés en dilucidar los mecanismos que les confieren las propiedades de termoestabilidad y resistencia a pHs extremos de las extremozimas, se han realizado diversos estudios estructurales y comparativos con enzimas mesófilas [13].

Los microorganismos halófilos han desarrollado diferentes adaptaciones fisiológicas para crecer en ambientes con altas concentraciones de sales. Los halófilos, además de mantener una alta concentración de iones inorgánicos, como KCl, en el interior de la célula o generar solutos orgánicos compatibles, con el objeto de igualar la osmolaridad intracelular con el medio extracelular [14], poseen proteínas con propiedades especiales para resistir la baja disponibilidad de agua. Este tipo de proteínas poseen una baja hidrofobicidad y gran cantidad de aminoácidos ácidos en la superficie, los cuales son utilizados para favorecer la solvatación y disminuir la agregación en un ambiente con baja actividad de agua [15].

Se ha observado también que las proteínas extracelulares de microorganismos halófilos, que crecen óptimamente a temperaturas medias (30 – 40 °C), tienen propiedades termofílicas y pueden llevar a cabo la catálisis de manera óptima en temperaturas mayores a 55 °C [16–18]. Estudios de sus proteínas, muestran que las propiedades estructurales que les confieren resistencia a la baja actividad de agua les otorgan también propiedades de resistencia a altas temperaturas, siendo algunas de estas características estructurales compartidas con las enzimas provenientes de termófilos. [19].

Dentro del grupo de las extremozimas, las enzimas activas a altas temperaturas (termozimas) son las que más llaman la atención, debido a que pueden ser utilizadas en procesos que requieren altas temperaturas, por ejemplo, para disminuir el riesgo de contaminación, favorecer el aumento de la solubilidad de algunos compuestos, especialmente los polímeros, entre otros. La primera etapa en la obtención de nuevas enzimas termoestables para el uso industrial, es realizar una búsqueda en microorganismos extremófilos. Si las enzimas encontradas no cumplen completamente con las necesidades requeridas, éstas pueden ser modificadas a través de técnicas de biología molecular introduciendo características estructurales específicas, como por ejemplo mediante evolución dirigida de proteínas. Lo anterior se logra al contar con información detallada de la estructura de las proteínas nativas.

1.3. Enzimas en la industria

Las exigencias impuestas por la industria en relación a la producción de compuestos complejos a partir de materias primas simples aumentan cada día. Para la optimización de los procesos, es importante minimizar la cantidad de etapas orientadas hacia la generación de valor agregado. Por ejemplo, en etapas críticas del proceso de la producción de fármacos, combustibles y compuestos químicos son necesarios catalizadores, siendo la mayoría de los utilizados actualmente, compuestos químicos inorgánicos, orgánicos u organometálicos. Este tipo de químicos poseen bajo costo, pero poseen desventajas tales como alta toxicidad, convirtiéndolos en compuestos contaminantes y difíciles de manipular.

Las necesidades globales de aplicar tecnologías “limpias”, el reemplazo de materias primas no renovables, el difícil manejo de químicos peligrosos y los residuos producidos, crean nuevos retos en cuanto a la investigación química y biotecnológica. La investigación científica ha permitido aumentar el número de catalizadores biológicos (enzimas) que son aplicados en diferentes procesos de producción, haciendo que los procesos biocatalíticos se presenten como una alternativa viable para solventar las necesidades actuales de las industrias. Entre las ventajas que presentan las enzimas en comparación a los catalizadores químicos se encuentran: gran eficiencia catalítica, producción de estereoisómeros específicos, generación de una menor cantidad de reacciones secundarias y llevar a cabo reacciones en condiciones amigables con el medio ambiente [20].

1.4. Enzimas e industria del papel

En la industria de la celulosa, la producción de la pulpa se encuentra compuesta por tres grandes etapas. La primera, denominada “*pulping*” o pulpaje, consiste en separar las fibras de lignina y celulosa, y re-suspender estas últimas en agua. Luego se procede a la refinación de la pulpa, donde se remueven impurezas, homogeneiza y se elimina el exceso de compuestos químicos de la etapa anterior. Finalmente ocurre el blanqueamiento donde se remueve el color de la pulpa causado por la lignina residual. De la energía total utilizada en la producción del papel, las etapas de generación de la pulpa y refinado utilizan la mayor cantidad de energía, debido a que la lignina y hemicelulosa son compuestos muy recalcitrantes que necesitan de varios procesos mecánicos y químicos para degradarlos. Frente a los contaminantes generados durante el proceso, existe un amplio campo de investigación focalizado en encontrar alternativas más ecológicas, entre las cuales se encuentra el uso de enzimas para catalizar las diferentes reacciones del proceso. En la etapa de pulpaje y refinación de la pulpa, las enzimas pueden disminuir la energía utilizada [21] y minimizar el daño que se produce a las fibras en el proceso de refinación mecánica. Al ser más específicas actúan exclusivamente sobre la lignina y la hemicelulosa, y no sobre las fibras de celulosa. Adicionalmente, pueden actuar en el tratamiento de aguas residuales y en la eliminación de la tinta del papel reciclado [22, 23].

El tratamiento de la madera se inicia en condiciones de altas temperaturas, presión y a pH básico. Las siguientes etapas tienen condiciones variables, las cuales, en términos generales ocurren a temperaturas entre los (50 - 70 °C) y principalmente pH >8,0. Por lo que son necesarias enzimas termoestables que puedan realizar la

catálisis en un amplio rango de pH, entre las cuales se encuentran, por ejemplo, las xilanasas [24], lacasas [25] y pectinasas [26]. El principal efecto de estas enzimas sobre la madera es que ésta se vuelve más esponjosa y porosa, permitiendo un rompimiento más sencillo de los chips de madera en la etapa pulpaje, lo cual disminuye considerablemente la energía utilizada [27].

1.5. Xilanasas provenientes de microorganismos.

Actualmente, se han descrito hongos y bacterias con sistemas xilanolíticos completos, capaces de producir múltiples xilanasas con diferentes características, y con actividad sinérgica sobre la hidrólisis del xilano [28]. Los microorganismos más comunes que producen isoenzimas de xilanasas, son *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Bacillus*. La multiplicidad de las xilanasas probablemente proviene de redundancia genética, o de modificaciones post-transcripcionales, como glicosilación, presencia de un péptido señal o diferentes cortes proteolíticos, siendo la glicosilación la más importante. Esta modificación contribuye entre un 10 a un 30 % al peso molecular de la enzima y le confiere diferentes características de estabilidad. Por ejemplo, la glicosilación y puentes disulfuro en xilanasas de la levadura *Cryptococcus albidus* TAE85, aislado de la Antártica, impiden su desnaturalación bajo los 5 °C, temperatura a la cual crece este microorganismo [29]. Por otra parte, cambios en la glicosilación de una xilanasas mesófila de *Bacillus subtilis*, incrementó su termoestabilidad al aumentar en 2,5 veces el tiempo en que la actividad decae a la mitad [30].

Los microorganismos que degradan celulosa son muy ubicuos y pueden ser aislados de residuos de industrias agrícolas, o de sitios geotermales, en donde está disponible el carbono orgánico. Se ha observado que miembros de géneros de

Anoxybacillus y *Bacillus*, secretan una variedad de enzimas lignocelulolíticas, como xilanasas y celulasas, para degradar el material lignocelulolítico, pero también existen reportes de xilanasas intracelulares. Se cree que los microorganismos que sintetizan estas últimas poseen transportadores de oligosacáridos, con los cuales pueden ingresar diferentes xilooligosacáridos al interior de la célula, para terminar de degradarlos [31].

El género *Anoxybacillus* es relativamente nuevo, fue propuesto por Pikuta *et al.* 2000. Este género pertenece a la familia de los *Bacillaceae* y posee pocos exponentes, estando a la fecha válidamente publicadas solo 19 especies y dos subespecies. Se han descrito xilanasas de bacterias del género *Anoxybacillus* en cepas aisladas de sitios geotermales turcos [32], en *A. flavithermus* BC [33], *A. pushchinoensis* A8 [34] y *Anoxybacillus sp.* E2 [35]. La mayoría de las xilanasas caracterizadas pertenecientes a bacterias del género *Anoxybacillus* tienen una actividad óptima entre 50 - 70 °C, a pH alcalino.

El género *Bacillus* está conformado por bacterias aeróbicas o aeróbicas facultativas con forma de bastón y Gram-positivas [36]. Se han descrito diversas xilanasas pertenecientes a este género. De acuerdo a la base de datos “*Carbohydrate-active Enzyme*” (CaZy) [37] se han registrado más de 85 secuencias de xilanasas provenientes de *Bacillus*, de las cuales 49 han sido caracterizadas.

1.6. Clasificación de las xilanasas

Las xilanasas pertenecen a la clase de las glicosidasas (GH), las cuales se subclasifican en familias. Esta clasificación está basada en la comparación de la estructura primaria de los dominios catalíticos y agrupa las secuencias relacionadas en familias [38]. Como la estructura primaria y el plegamiento de una enzima están relacionados, esta clasificación refleja características tanto estructurales como del mecanismo de acción, observándose que las enzimas de una familia en particular tienen una estructura tridimensional y un mecanismo molecular similar [37]. De acuerdo a la clasificación CaZy las endo-xilanasas se pueden encontrar en las familias 5, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 26, 30, 43, 44, 51, 62 y 98; aunque la mayoría se encuentra en las familias 10 y 11. Las endo-xilanasas reportadas en las familias 16, 51 y 62, son aparentemente enzimas bi-funcionales que contienen dos sitios catalíticos, un dominio de la familia 10 u 11 y un segundo dominio glicosidasa. Un ejemplo, una enzima de *Ruminococcus flavefaciens* tiene una xilanasas de la familia 11 y en el amino- y carboxi-terminal una liquisas de la familia 16, por lo tanto está clasificada como miembro de ambas familias [39].

Las endo-xilanasas de la familia 10, son proteínas de alto peso molecular, con un bajo punto isoeléctrico, conformadas por un dominio de unión a la celulosa y un dominio catalítico, los cuales están conectados por un péptido de unión. Las xilanasas pertenecientes a esta familia tienen una estructura de barril $(\alpha/\beta)_8$, que consiste en 8 sábanas- β paralelas, ubicadas una al lado de la otra para formar un cilindro, seguidas de 8 α -hélices (Figura 1A). La forma de la proteína se asemeja a un “*bowl* de ensalada”, donde una cara de la proteína tiene un radio de 45 Å, mientras la cara

opuesta tiene un radio de aproximadamente 30 Å. Los análisis cristalográficos y cinéticos de la actividad de las xilanasas sobre los xilooligosacáridos de diferentes tamaños han demostrado que las xilanasas de esta familia tienen de cuatro a cinco sitios de unión al sustrato.

Las endo-xilanasas de la familia 11 son proteínas de bajo peso molecular, y muy específicas, ya que no toleran muchas sustituciones en la cadena principal de xilano. De acuerdo a su punto isoeléctrico, estas pueden ser sub-clasificadas en dos grupos: alcalino o ácido. Se piensa que debido a su bajo peso molecular, estas endo-xilanasas pueden atravesar por los poros de la hemicelulosa, para hacer más eficiente la hidrólisis. Estas enzimas tienen con una estructura de “*β-jelly roll*”, compuesta de dos sábanas- β que forman una hendidura, en donde la forma general se asemeja a una mano semi-cerrada (Figura 1B) [40].

En la familia 8 (GH8) las endo-xilanasas tienen menos representantes en comparación a las familias 10 y 11, y a la fecha se han caracterizado solo 5 endo-xilanasas pertenecientes a GH8. Éstas son monómeros de una masa molecular alta (~45 kDa) y una estructura de barril (α/α)₆, compuesta de 6 α -hélices internas y 6 α -hélices externas (Figura 1C). Las endo-xilanasas de esta familia tienen una diversa especificidad de sustratos, teniendo como preferencia sustratos poco sustituidos, lo que le permite ser compatible con su uso en la industria y poder competir con las endo-xilanasas más utilizadas actualmente (familias 10 y 11) [41].

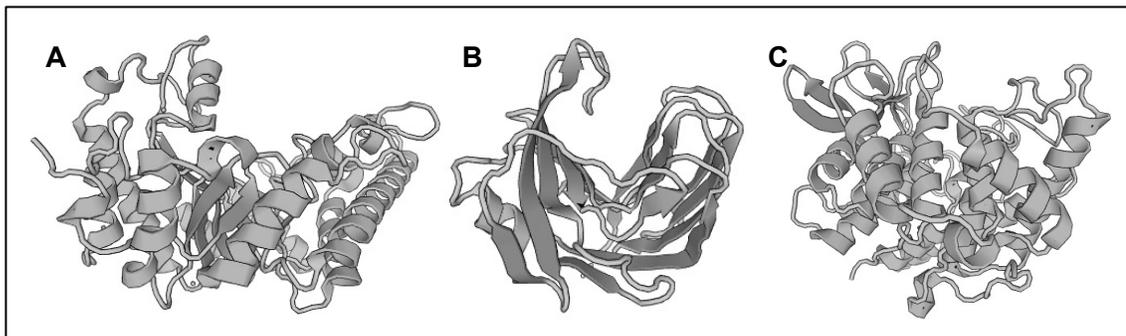


Figura 1. Estructura tridimensional de xilanasas. De (A) *Bacillus halodurans* (familia 10) PDB ID: 2UWF [42]; (B) *Bacillus circulans* (familia 11) PDB ID: 1BCX [43]; (C) *Pseudalteromona haloplanktis* (familia 8) PDB ID: 1H12 [44].

1.7. Xilano, sustrato de las xilanasas

El xilano es un polímero natural formado por monómeros de xilosa y es uno de los principales componentes de la hemicelulosa, una de las fracciones importantes de la madera. El xilano es un heteropolímero ramificado que está compuesto de hexosas (manosa, glucosa y galactosa) y pentosas (xilosa y arabinosa), siendo la xilosa el azúcar más abundante [45].

El xilano se caracteriza por poseer una cadena principal formada por enlaces β -(1 \rightarrow 4) de xilosa, siendo una modificación común la sustitución con residuos glucuronil unidos mediante enlace α -(1 \rightarrow 2) y residuos 4-O-metil glucuronil. Los xilanos en los cuales domina este tipo de sustitución son los glucuronoxilanos. Los xilanos también pueden poseer residuos de arabinosa unidos a la cadena principal, estos xilanos se llaman arabinoxilanos y glucoroarabinoxilanos.

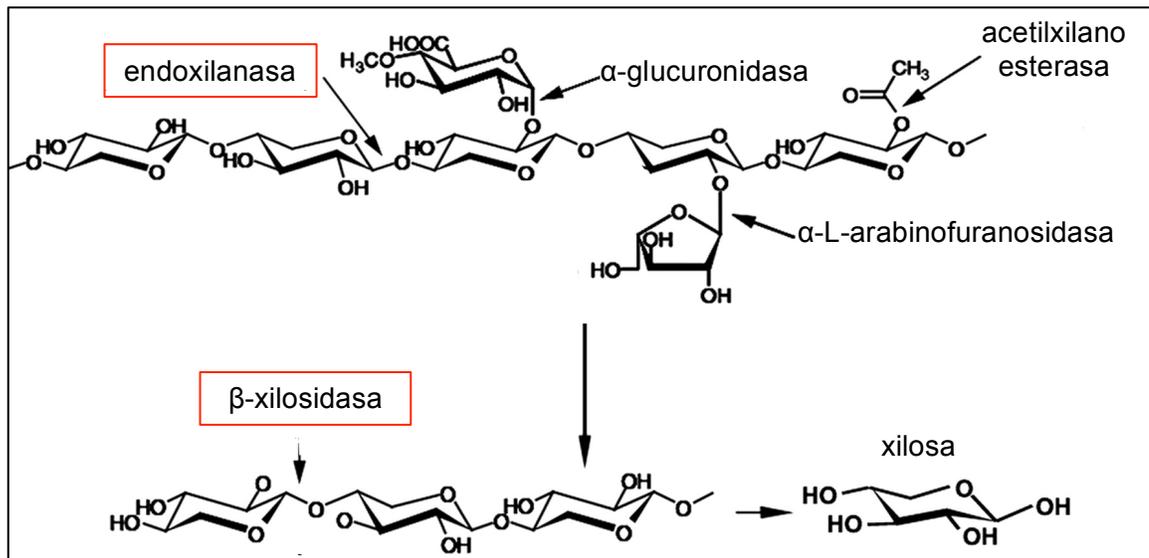


Figura 2. Xilano y las enzimas necesarias para degradarlo. Modificado de Sun *et al.* 2012.

Para degradar completamente este polímero se necesita la acción conjunta de diferentes enzimas, entre las cuales se encuentran la endo-1,4-β-xilanasas (endo-xilanasas) (EC 3.2.1.8) y la xilano-1,4-β-xilosidasas (β-xilosidasas) (EC 3.2.1.37), encargadas de hidrolizar el enlace β-1,4-D-xilosídico de la cadena principal. La endo-xilanasas hidroliza de manera aleatoria la cadena principal de xilano, obteniéndose como productos de la reacción catalítica xilooligosacáridos. La β-xilosidasas hidroliza los xilooligosacáridos en el extremo no reductor, obteniéndose monómeros de xilosa como producto de la reacción, las cuales serán utilizadas por las células como fuente de energía. Las enzimas α-glucuronidasas, α-L-arabinofuranosidasas y acetilxilano esterasas, hidrolizan las ramificaciones de la cadena principal [45] (Figura 2).

1.8. Mecanismos catalíticos de las xilanasas

El mecanismo de catálisis de las GH se puede dividir en dos tipos: las que retienen la configuración del oxígeno anomérico durante la reacción y las que lo invierten. La primeras, poseen un residuo ácido/base y uno nucleófilo, mientras que las segundas poseen un residuo catalítico ácido y uno básico [47].

Las enzimas de las familias 5, 7, 10 y 11 catalizan la hidrólisis con la retención de la configuración anomérica, donde dos residuos de glutamato están implicados en el mecanismo de reacción. En este tipo de hidrólisis, la reacción se lleva a cabo por medio de una catálisis ácido/base en dos pasos, primero como ácido ocurre una glicosilación y luego como base ocurre la desglicosilación. En el primer paso se dona un protón al átomo de oxígeno glicosídico, mientras que el nucleófilo forma un intermediario covalente glicosil-enzima. En el segundo paso, el ácido/base desprotonado actúa como base para activar la molécula de agua que lleva a cabo el ataque nucleofílico en el intermediario glicosil-enzima. Con dos pasos de inversión se llega a la retención de la estereoquímica del centro anomérico (Figura 3A).

Las enzimas de las familias 8 y 43 invierten la configuración del oxígeno anomérico y se cree que los residuos catalíticos son glutamato y aspartato. Estas enzimas funcionan mediante una única reacción de desplazamiento, en donde el residuo ácido catalítico dona un protón al oxígeno anomérico, mientras que el residuo básico catalítico remueve un protón de la molécula de agua, aumentando su nucleofilicidad y facilitando su ataque en el centro anomérico. Este ataque rompe el

enlace glicosídico y produce la inversión de la configuración del carbón anomérico (Figura 3B).

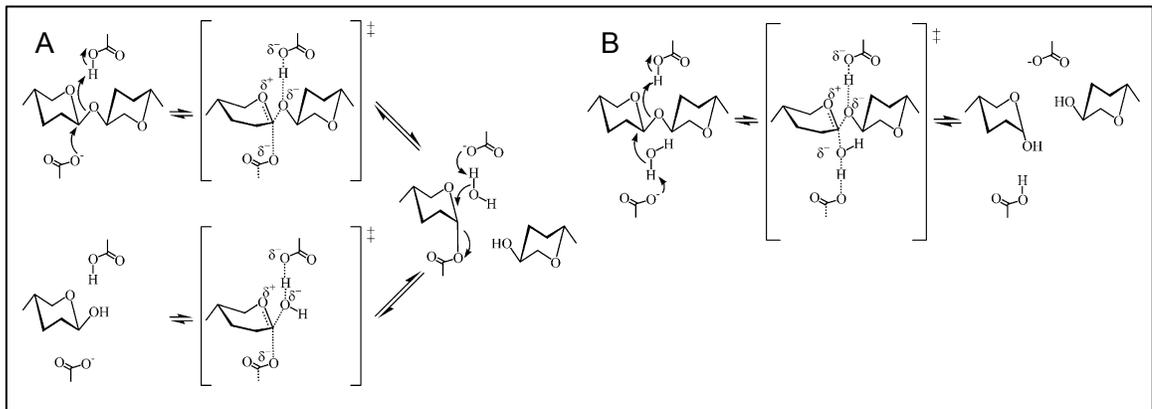


Figura 3. Mecanismo de acción de las glicosil hidrolasas. Mecanismo de (A) retención e (B) inversión de la configuración del centro anomérico. Modificado de Collins *et al.* 2005.

1.9. Xilanasas e industria del papel

Las xilanasas son enzimas cotizadas en la industria debido a las múltiples aplicaciones que poseen, pudiendo ser utilizadas en: la industria alimentaria para generar pan de calidad superior, al mejorar la consistencia de la masa [49]; en la industria ganadera para hacer más digerible el alimento de los animales [50]; en la industria textil para mejorar la calidad de las fibras [51] y en la producción de biocombustible, debido a que permiten la sacarificación de diferentes biodesechos, produciendo azúcares fermentables que son utilizados para la producción de bioetanol [52].

En la industria de la celulosa, las xilanasas poseen gran importancia debido a que pueden actuar en diferentes etapas, específicamente el blanqueamiento del papel y la etapa de refinado [26].

En la etapa del pulpaje y refinación de la pulpa se modifican mecánica y/o químicamente las fibras de celulosa, para que posteriormente puedan interactuar entre sí. En este paso se requiere la acción de altas concentraciones de diversas soluciones de compuestos químicos, como hidróxido de sodio, sulfuro de sodio, sulfito de sodio, entre otros, para lograr la disolución de la lignina y la hemicelulosa, siendo la remoción de la lignina una etapa clave y necesaria para producir papel de alta calidad. La intervención de las xilanasas en la refinación de la pulpa es posible, debido a que al degradar xilano se produce una mejor separación de hemicelulosa y lignina. Esto hace a la pulpa más susceptible a los químicos utilizados en el paso posterior de blanqueamiento [53, 54]. En esta etapa, se utilizan comúnmente compuestos clorados,

los cuales son muy contaminantes para el medio ambiente. También se utilizan peróxidos y ozono, los cuales son más amigables con el medioambiente, pero más costos. Debido a su bajo costo los más utilizados son los compuestos clorados, que generan entre sus desechos químicos compuestos organoclorados, los cuales son muy recalcitrantes y tóxicos en bajas concentraciones. Se ha observado que el uso de xilanasas y pectinasas en una etapa de pre-blanqueamiento del papel logra disminuir un 25 % la cantidad de cloro utilizado en las siguientes etapas, sin disminuir el brillo del papel [53, 55].

El uso de xilanasas termófilas y alcalófilas en este proceso, poseería diversas ventajas, tales como, la mantención de la actividad en el tiempo a temperatura ambiente y a altas temperaturas y la posibilidad de ser utilizadas en pHs básicos extremos necesarios en el proceso. Debido a que la aplicación de las xilanasas es muy variada, su utilización y necesidad va a depender del proceso específico que se requiera, siendo ideal que mantenga su actividad en un rango de pH y temperatura lo más amplio posible [56].

De acuerdo a lo planteado anteriormente, se estableció como hipótesis de trabajo:

Existen bacterias extremófilas que poseen enzimas xilanasas extracelulares con actividad en el rango de temperatura entre 50 - 70 °C y pH 8,0 - 9,0, características demandadas en la industria del papel.

Con el fin de probar esta hipótesis, se estableció el siguiente objetivo general:
Determinar las características bioquímicas de una xilanasa extracelular proveniente de una bacteria extremófila.

Se propuso los siguientes objetivos específicos:

1. Obtener una bacteria extremófila con actividad xilanolítica
 - 1.1. Identificar una bacteria extremófila con actividad xilanolítica a partir de muestras ambientales.
 - 1.2. Identificar una bacteria extremófila con actividad xilanolítica a partir de bacterias aisladas.
2. Obtener una xilanasa extracelular purificada de la bacteria extremófila seleccionada.
 - 2.1. Purificar una enzima extracelular con actividad xilanolítica.
 - 2.2. Identificar la xilanasa purificada.
3. Caracterizar la xilanasa extracelular purificada
 - 3.1. Determinar el pH y temperatura óptima de la xilanasa extracelular purificada.
 - 3.2. Determinar la termoestabilidad de la actividad enzimática en el tiempo, a la temperatura del proceso de blanqueamiento (50 – 60 °C).
 - 3.3. Determinar la actividad de la enzima luego de someterla a liofilización.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Aislamiento de cepas bacterianas provenientes de sitios geotérmicos y la Antártica

Para el aislamiento de nuevas cepas bacterianas se utilizaron muestras ambientales provenientes del glaciar Collins, Antártica; geisers en Yellowstone y el Volcán Copahue, Chile. Los sitios de muestreo se encontraban en el rango de temperatura entre 20 °C y 70 °C con un pH 4,0 - 8,0.

Se realizaron enriquecimientos de bacterias mesófilas y termófilas, utilizándose el medio PAE2 y PAE1 (Anexo 7.1) respectivamente. En los cultivos sólidos se suplementó el medio respectivo con agar 15 g·L⁻¹. Las bacterias mesófilas y termófilas fueron aisladas a través de trasposos sucesivos de cultivo líquido a sólido (agotamiento por estrías) a 23 °C y 55 °C respectivamente. La pureza de los microorganismos se confirmó mediante visualización de la uniformidad de las colonias en medio sólido y visualización mediante microscopio óptico.

Para la selección final de microorganismos termófilos, éstos fueron incubados a 60 °C en medio XIL (Anexo 7.1). Se realizaron pasajes sucesivos de cultivo líquido a sólido y para la confirmación de la pureza se visualizó la uniformidad de las colonias en el medio TB (Anexo 7.1).

Además de las muestras inicialmente mencionadas, se utilizaron bacterias aisladas provenientes de la colección privada de la Fundación Biociencia, los cuales fueron incubados en los medios de cultivos y condiciones descritas en la Tabla 1.

Tabla 1. Aislados utilizados pertenecientes a la colección de microorganismos de Fundación Biociencia.

| Origen muestra | Aislado | Medio | Género | Incubación | |
|---------------------------|------------------------|---------|----------------------|------------------|-----|
| | | | | Temperatura (°C) | pH |
| Glaciar Alpes, Suiza | 6b* | LB/4 | <i>Geobacillus</i> | 70 | 7,0 |
| Isla Decepción, Antártica | ID17 [57] ^a | MMM | <i>Geobacillus</i> | 65 | 7,0 |
| Estufa de esterilización | GWE1 [58] ^b | TL/2 | <i>Geobacillus</i> | 60 | 5,8 |
| Glaciar Alpes, Suiza | 5a1 | TL/3 | <i>Acinetobacter</i> | 30 | 5,8 |
| Glaciar Alpes, Suiza | 5a | TL/2 | <i>Acinetobacter</i> | 30 | 5,8 |
| Salar de Ascotán, Chile | Asc6BA | HVMOD-D | <i>Bacillus</i> | 37 | 7,3 |
| Salar de Ascotán, Chile | 2.10-2C | HVMOD-D | <i>Bacillus</i> | 30 | 7,3 |

La composición de los medios de cultivo se encuentran en el Anexo 7.1.
a, b: publicaciones de los aislados.

2.1.1. Crecimiento de la cepa termófila seleccionada aislada de una muestra geotérmica

A partir de los aislados obtenidos de las muestras ambientales provenientes de sitios geotérmicos, se seleccionó la bacteria termófila *Anoxybacillus* sp. 7L. Esta bacteria fue aislada de una muestra ambiental proveniente de la ladera del volcán Copahue, Región del BioBío, Chile. Para el crecimiento de la bacteria 7L se utilizó el medio PAE1. La cepa 7L fue inoculada al 10 % (v/v) a partir de un cultivo madre e incubada por 22 h sin agitación a 60 °C.

2.1.2. Crecimiento de la cepa halófila seleccionada perteneciente a la colección de Fundación Biociencia

A partir de la biblioteca de cepas aisladas pertenecientes a la colección de Fundación Biociencia se seleccionó la bacteria halófila *Bacillus* sp. Asc6BA para realizar el trabajo de Tesis. Esta bacteria fue previamente aislada de una muestra ambiental proveniente del Salar de Ascotán, Chile. Para el crecimiento de Asc6BA se utilizó el medio HVMOD-D. La bacteria Asc6BA fue inoculada al 5 % (v/v) e incubada por 38 h sin agitación a 37 °C.

Los inóculos de *Anoxybacillus* sp. y la bacteria Asc6BA cepas fueron preparados con los medios PAE1 y HVMOD-D respectivamente, y al escalar el cultivo a 10 L se reemplazó el xilano de madera de haya (Sigma) por salvado de trigo 25 g·L⁻¹.

2.2. Procedimientos de biología molecular

2.2.1. Extracción de ADN genómico de aislados provenientes de muestras ambientales

Los microorganismos aislados provenientes de muestras ambientales se seleccionaron y se cultivaron por 24 h. Posterior a la incubación se centrifugó a 9.000 x g durante 10 min. Las células fueron resuspendidas en 1 mL de tampón TE (Tris-HCl 100 mM conteniendo EDTA 10 mM pH 8,0). Este procedimiento se realizó dos veces. Finalmente, se resuspendió en 500 µl de tampón TE, se agregó 50 µl de lisozima (10 mg/mL, Sigma) y se incubó por 1 h a 37 °C. A la mezcla anterior se agregaron 10 µl de proteinasa K (20 mg/mL, Invitrogen) y 50 µl de SDS al 10 % (p/v), se incubó 1 h a 56

°C y se observó la ruptura celular al microscopio. Posteriormente, se agregó 1 volumen de solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó 10 min a 13.000 x g. Este último paso se repitió las veces que fuese necesario hasta la desaparición de la fase blanquecina. Dos volúmenes de etanol absoluto frío se agregaron al sobrenadante y se incubó durante la noche a -20 °C. El ADN fue centrifugado a 13.000 x g por 40 min, se eliminó el etanol y se secó el precipitado, el cual se resuspendió en 50 µl de tampón TE y se incubó por 10 min a 65 °C. El ADN fue analizado por electroforesis en geles de agarosa (1,0 %) y visualizado en un transiluminador UV.

2.2.2. Amplificación del gen ARN ribosomal 16S de los microorganismos aislados de muestras ambientales

El ADN extraído de los microorganismos aislados provenientes de muestras ambientales fue utilizado para la amplificación del gen ARNr 16S. El ADN extraído se diluyó en una razón 1:10 en tampón TE 1x. Se utilizaron dos pares de partidores 27F - 1492R [59] y BAC334F - BAC939R [60]. La mezcla de la reacción contenía 5,0 µl de amortiguador para Taq polimerasa (10x, Fermentas), 5,0 µl de dNTPs (2 mM), 4,0 µl de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µl de partidor R (100 mM), 0,5 µl de partidor F (100 mM), 1,0 µl de ADN, 0,25 µl de Taq polimerasa (5U/µl) y H₂O estéril hasta completar 50 µl. El protocolo del PCR utilizado consistió en: *hot start* 95 °C por 5 min; 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min; alineamiento a 54 °C para el primer par de partidores y 58 °C para el segundo, durante 1 min; y una extensión a 72 °C por 1,5 min. Se realizó una extensión final a 72 °C por 10 min. El amplificado resultante se visualizó en un gel de agarosa (1,0 % (p/v)).

2.2.3. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Las muestras de ADN se mezclaron con tampón de carga (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, azul de bromofenol 0,25 % (p/v) y glicerol 30 % (v/v)) y se resolvieron por electroforesis en un gel de agarosa (1,0 % (p/v)) preparado en tampón TAE (Tris-acetato 0,04 M pH 8,3, EDTA 1 mM). Como marcador de peso molecular se utilizó ADN de fago λ digerido con *Hind*III. El ADN se visualizó por tinción con Sybr gold (100 ng/mL, Invitrogen) en un transiluminador ultravioleta (UV).

2.2.4. Análisis filogenético del gen 16S rRNA

El ADN amplificado fue secuenciado (Michigan State University) y las secuencias resultantes fueron analizadas utilizando la herramienta BlastN [61] y la base de datos de secuencias de ARNr 16S de bacteria y arquea del GenBank.

2.3. Detección de la actividad xilanolítica

2.3.1. Ensayo cualitativo de la actividad xilanolítica de los microorganismos aislados

La actividad xilanolítica de los microorganismos aislados se determinó cualitativamente incubándolos en placas de Petri, en el medio de crecimiento respectivo, suplementado con agar 15 g·L⁻¹ y xilano 4 g·L⁻¹. Pasado el tiempo de incubación, se reveló el ensayo agregando rojo congo 5 g·L⁻¹ e incubando durante 5 min. Luego se eliminó el rojo congo y se lavó con NaCl 1M durante 10 min. Un halo decolorado alrededor de la colonia representa un resultado positivo para xilanasas.

2.3.2. Ensayo cuantitativo de la actividad xilanolítica

2.3.2.1. Ensayo del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

La actividad xilanolítica se determinó cuantitativamente utilizando el ensayo del DNS [62]. Este ensayo se basa en la determinación de la concentración de azúcares reductoras en una solución. Se incubó 100 μl de enzima con 500 μl de xilano 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y 400 μl de tampón Tris-HCl 100 mM pH 8,0 a 60 °C durante 10 min. Se agregó 1 mL de la solución de DNS (DNS 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, fenol 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, sulfito de sodio 0,5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, NaOH 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y tartrato de sodio y potasio 400 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y se reveló la solución incubándola en agua hirviendo durante 10 min. Se enfrió la muestra y se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro (Shimadzu). La concentración de azúcares liberadas se determinó en relación a una curva de calibración con xilosa utilizando concentraciones entre 1,0 - 10,0 mM. Se definió una unidad de xilanasa como la cantidad de enzima que libera un μmol de azúcar reductor equivalente a xilosa por minuto. Se utilizó como control positivo la enzima xilanasa comercial proveniente de *Aspergillus niger* (Megazyme). Para determinar la concentración de proteínas se utilizó el ensayo de proteína de Bio-Rad basado en el método de Bradford [63]

2.3.2.2. Ensayo del “Remazol brilliant blue – xylan” (RBB-X)

El método de RBB-X (Sigma) se basa en el uso de un sustrato cromogénico para la detección de endo-1,4- β -xilanasas. Se incubaron 500 μl de enzima (diluida en tampón MES 100 mM pH 6,0) con 500 μl de sustrato a 60 °C por 10 min. La reacción fue detenida agregando 2,5 mL de etanol, provocando la precipitación de los fragmentos de RBB-X de alta masa molecular que no fueron degradados. Posteriormente, se centrifugó por 10 min a 9.000 x g y la absorbancia de 1 mL de

sobrenadante fue medida en un espectrofotómetro (Shimadzu) a 590 nm. La actividad se determinó en referencia a una curva estándar, definiéndose una unidad enzimática como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de RBB por minuto a 60 °C y pH 6,0.

2.4. Purificación de una xilanasa extracelular proveniente de las bacterias seleccionadas

2.4.1. Preparación del concentrado extracelular

Para la preparación del concentrado extracelular se obtuvo el medio extracelular incubando las bacterias seleccionadas de acuerdo a lo descrito en la sección 2.1.1 y 2.1.2. El salvado de trigo presente en el medio de cultivo fue removido mediante filtración con gasa. Las células se separaron del medio extracelular mediante un sistema de filtración tangencial SartoJet (Sartorius), utilizando una membrana de 0,1 μm de corte. El medio extracelular se concentró 15 veces, utilizando el sistema de filtración tangencial SartoJet con una membrana de corte de 30 kDa.

El concentrado extracelular proveniente de la bacteria Asc6BA se diluyó con tres volúmenes de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5 conteniendo azida de sodio 0,2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y se concentró nuevamente. Este proceso se realizó dos veces. El concentrado final se ultracentrifugó (Hitachi, rotor P50AT2) durante 30 min a 109.000 x g para eliminar los sólidos en suspensión.

2.4.2. Purificación cromatográfica de una xilanasa extracelular.

La purificación cromatográfica de una xilanasa extracelular fue controlada por un sistema de FPLC (Pharmacia Biotech) y todos los pasos de purificación fueron realizados a temperatura ambiente. La actividad xilanolítica fue medida en todas las fracciones, en cada etapa de purificación.

2.4.3. Purificación de una xilanasa extracelular proveniente del microorganismo *Anoxybacillus* sp. 7L

La purificación de la xilanasa proveniente del microorganismo 7L se realizó como sigue: el sobrenadante concentrado fue cargado en una columna con resina de intercambio iónico Q-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare), equilibrada con el tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,0. La columna fue eluida con gradiente lineal de NaCl 0-1 M a un flujo de 1 mL/min. La fracción que no se unió a la columna se recolectó y se concentró mediante el sistema de filtración tangencial Vivaflow (Sartorius) utilizando una membrana de corte de 30 kDa. El concentrado se cargó en una columna con resina de hidroxiapatita (HA Ultrogel, Sigma) equilibrada con tampón fosfato de sodio 10 mM pH 8,0. La columna se eluyó con un gradiente lineal de 50 a 500 mM de fosfato de sodio.

2.4.4. Purificación de dos xilanasas extracelulares proveniente del microorganismo *Bacillus* sp. Asc6BA

La purificación de las xilanasas provenientes de la bacteria Asc6BA se realizó como sigue: el concentrado extracelular fue diluído con tampón A (50 mM Tris-HCl pH 7,5 conteniendo azida de sodio $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) y cargadas en una columna Q-Sepharose

Fast Flow previamente equilibrada con el tampón A. La fracción que no se unió a la columna se recolectó y se concentró mediante el sistema de filtración tangencial Vivaflow. Las proteínas concentradas se diluyeron 10 veces con tampón B (50 mM Tris-HCl pH 9,0 conteniendo azida de sodio $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) y fueron cargadas en una columna Q-Sepharose Fast Flow previamente equilibrada con el tampón B. La fracción que no se unió a la columna se recolectó y se concentró mediante el sistema de filtración tangencial Vivaflow y se cargó en la columna SP-HiTrap (Pharmacia Biotech) previamente equilibrada con tampón B. Las proteínas fueron eluidas con un gradiente lineal (30 mL) de NaCl de 0 a 0,5 M en tampón B. El último paso cromatográfico fue una cromatografía de exclusión molecular con la resina Superdex 200 (GE Healthcare), donde las xilanasas fueron eluidas a 1 mL/min con tampón Tris-HCl 50mM pH 8,0 conteniendo 0,2 M de NaCl.

2.5. Identificación de la xilanasa purificada proveniente del aislado 7L y Asc6BA.

2.5.1. Búsqueda de genes que codifican para xilanasas en el genoma de los aislados 7L y Asc6BA.

Se realizó una búsqueda de genes que codifican para xilanasas en los genomas de las bacterias 7L y Asc6BA, a partir de los cuales se obtuvo las respectivas secuencias de aminoácidos. Posteriormente, se realizó un alineamiento con la herramienta BLASTp, con secuencias de proteínas bacterianas almacenadas en la base de datos GenBank. Se realizó una determinación teórica del punto isoeléctrico (pI) y masa molecular (PM) a las secuencias seleccionadas, utilizando la herramienta SwissProt [64], y la presencia de péptido señal mediante la herramienta SignalP [65].

2.5.2. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes (PAGE).

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12 % (v/v) [66]. Las muestras se desnaturalaron incubándolas por 10 min a 95 °C. El tampón de carga (5X) contenía: SDS 10 % (p/v), β -mercaptoetanol 10 mM, glicerol 20 % (v/v), Tris-HCl 0,2 M pH 6,8 y azul de bromofenol 0,05 % (p/v). Se utilizó como estándar el marcador de proteínas 14-100 kDa (Winkler) y tampón de corrida TG-SDS (Winkler). Se realizaron dos tipos de tinciones para la visualización de las proteínas, tinción con azul de Coomassie y tinción con nitrato de plata.

En la tinción con azul de Coomassie el gel fue incubado en una solución de azul de Coomassie R-250 (0,125 % (p/v), metanol (45 % (v/v) y ácido acético (10 % (v/v)) durante la noche. Para visualizar, se utilizó una solución de desteñido con ácido acético:metanol:agua (10:20:70).

La tinción con plata se realizó de acuerdo a [67] con ciertas modificaciones. Para la tinción se utilizaron las siguientes soluciones: A: Fijación (etanol 50 % (v/v) y ácido acético 10 % (v/v)); B: Lavado (etanol 30 % (v/v)); C: Sensibilizante ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,04 % (p/v)); D: Tinción (AgNO_3 0,2 % (p/v) y formalina 0,076 % (v/v)); E: Reveladora (Na_2CO_3 6 % (p/v), formalina 0,05 % (v/v) y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,0004 % (p/v)); F: Detención (ácido acético 5 % (v/v)). Para la tinción se fijó el gel durante la noche con la solución A. Luego se realizaron tres lavados consecutivos de 20 min, dos con la solución B y uno con agua destilada. El gel se sensibilizó con la solución C durante 2 min. Se

realizaron tres lavados consecutivos con agua destilada por 5 min. Se tiñó el gel con la solución D durante 20 min y luego se realizaron dos lavados consecutivos con agua destilada por 30 s. Se reveló entre 3-7 min con la solución E, hasta que las bandas aparecieran claras. La reacción se detuvo con la solución F.

Las proteínas del gel de SDS-PAGE se analizaron semi-cuantitativamente mediante densitometría utilizando el software ImageJ [68].

2.5.3. Zimograma para xilanasas.

El zimograma se realizó según lo descrito por Park *et. al.* [69]. Para ello se realizó un gel SDS-PAGE 12 % (v/v) de acuerdo a lo descrito en la Sección 2.5.2 con las siguientes modificaciones: las muestras no se desnaturaron mediante calor; no se adicionó β -mercaptoetanol al tampón de carga; y el gel de poliacrilamida se copolimerizó con xilano 0,1 % (p/v). La carga de las muestras se realizó en duplicado. Posterior a la realización de la electroforesis, se cortó el gel por la mitad. Una mitad de gel se incubó en isopropanol 25 % (v/v) durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se incubó en tampón A (citrate de sodio 50 mM pH 6,0) durante 30 min a temperatura ambiente. Se renovó el tampón A y se incubó a 60 °C por 1 h. Posteriormente, se tiñó el gel en una solución de rojo congo 0,5 % (p/v) durante 30 min y se destiñó con NaCl 1 M por 3 h, cambiando la solución cada 30 min. Para aumentar el contraste se incubó en ácido acético 0,5 % (v/v) por un minuto. Una reacción positiva se visualizó como una decoloración en el gel de poliacrilamida. La otra mitad del gel se tiñó con azul de Coomassie de acuerdo a lo descrito en la Sección 2.5.2 para la visualización de proteínas.

2.5.4. Análisis de las xilanasas purificadas mediante huella peptídica.

Las xilanasas purificadas X2 y X3 fueron identificadas mediante huella peptídica. Para ello se realizó un gel SDS-PAGE de acuerdo a lo descrito en la sección 2.5.2. Se cortaron las bandas correspondientes a xilanasas y fueron enviadas para la identificación de huella peptídica (MS-MS/MS) mediante MALDI TOF/TOF al Centro Nacional de Biotecnología (CNB), España. Las muestras fueron analizadas con la base de datos de NCBI mediante el algoritmo de MASCOT [70] y con el genoma de los microorganismos como base de datos mediante el algoritmo SearchGUI [71] y su procesador de datos PeptideShaker [72].

2.6. Caracterización bioquímica de las xilanasas purificadas.

2.6.1. Determinación de la masa molecular de las xilanasas purificadas.

La masa molecular de las xilanasas nativas purificadas fue determinada por cromatografía líquida de exclusión molecular y las subunidades por SDS-PAGE descrito en la Sección 2.5.2. Para la determinación por cromatografía de exclusión molecular se utilizó una columna (GE Healthcare, Tricorn 10/600) de Superdex-200 (GE Healthcare) previamente equilibrada a un flujo de 1 mL/min, con 10 volúmenes de tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,0 conteniendo NaCl 0,2 M. La columna fue calibrada utilizando como estándar α -lactoalbúmina (14,2 kDa, Sigma), anhidrasa carbónica (29 kDa, Sigma), albúmina de pollo (45,0 kDa, Sigma), albúmina de suero bovino (66,0 kDa, Sigma), catalasa (200 kDa, Winkler). Se utilizó azul dextrano para calcular el volumen vacío de la columna. Todos los estándares, xilanasas y azul dextrano fueron eluidos a un flujo de 1 mL/min utilizando tampón Tris-HCl 50mM pH 8,0 conteniendo

NaCl 0,2 M. El coeficiente de partición K_{av} fue determinado a partir del volumen de elución mediante la siguiente fórmula:

$$K_{av} = \frac{V_i - V_0}{V_t - V_0}$$

donde V_i es el volumen de la muestra, V_0 es el volumen del azul dextrano (16,8 mL) y V_t el volumen total de la columna (39 mL). La curva de calibración para la resina Superdex 200 es mostrada en el Anexo 7.2.

2.6.2. Efecto de la temperatura y pH en la actividad xilanolítica.

El efecto de la temperatura fue ensayado en las xilanasas X2 y X3. La temperatura óptima para la actividad xilanolítica fue determinada incubando la enzima con el sustrato a diferentes temperaturas entre 30 - 80 °C de acuerdo al protocolo descrito en la Sección 2.3.2.1. El pH del tampón fue corregido de acuerdo a su dpK_a/dT para cada temperatura.

El efecto del pH fue ensayado en las xilanasas X2 y X3. El pH óptimo para la actividad xilanolítica fue determinado por incubación de las enzimas a diferentes valores de pH desde 4,0 a 9,0 de acuerdo al protocolo descrito en la Sección 2.3.2.1. Los tampones empleados fueron citrato de sodio 50 mM pH 4,0-5,0; PIPES 100 mM (Sigma) pH 6,0-7,0; fosfato 100 mM pH 8,0; TAPS 100 mM (Sigma) pH 9,0.

2.6.3. Termoestabilidad de la actividad xilanolítica.

La termoestabilidad de la actividad xilanolítica de la xilanasa X2 y X3 fue determinada agregando la enzima en tubos y luego cubriéndola con aceite mineral. Los

tubos fueron incubados entre 0 - 8 h en un baño seco (Major Science) a 50 °C y 60 °C. Alícuotas fueron obtenidas cada 1,25 h para X3 y cada 10 min para X2. La actividad xilanolítica residual fue determinada de acuerdo a las condiciones descritas en la Sección 2.3.2.1.

2.6.4. Efecto de la liofilización en la actividad de las xilanasas.

Se ensayó el efecto de la liofilización en la actividad xilanolítica de las xilanasas X2 y X3. Para ello se utilizaron tubos criogénicos para liofilizar (Liobras) la enzima que se encontraba en tampón 50 mM Tris-HCl pH 8,0 conteniendo azida de sodio 0,2 g·L⁻¹. Luego de liofilizar las xilanasas, se resuspendió en el volumen inicial con agua desionizada y se midió la actividad xilanolítica a 60 °C y pH 8,0 de acuerdo a lo descrito en la Sección 2.3.2.1. Se determinó la actividad relativa como un porcentaje de la actividad previa a la liofilización.

3. RESULTADOS

Los resultados presentados a continuación corresponden al trabajo realizado con dos aislados de bacterias extremófilas diferentes: *Anoxybacillus* sp. 7L y *Bacillus* sp. Asc6BA. Por lo anterior, los resultados obtenidos del trabajo con ambas bacterias se muestran de forma independiente y se encuentran presentados en orden cronológico.

3.1. Aislamiento de microorganismos a partir de muestras ambientales provenientes de sitios geotermales y la Antártica.

A partir de las diferentes muestras ambientales provenientes de sitios geotermales y la Antártica se aislaron 11 bacterias, las cuales comparten la característica de crecer en xilano como única fuente de carbono. Se aislaron dos grupos de bacterias: 6 bacterias mesófilas, con una temperatura de incubación de 20 °C y 5 bacterias termófilas moderadas con una temperatura de incubación de 55 °C. Los aislados fueron identificados mediante amplificación por PCR del gen que codifica para el ARNr 16S y posterior comparación de su secuencia contra la base de datos de NCBI (Tabla 2).

Tabla 2. Afiliación de los aislados mediante el análisis del gen que codifica para el ARNr 16S.

| Aislado | Género | Característica |
|----------------|----------------------|-----------------------|
| A1II | <i>Sporosarcina</i> | Mesófilo |
| A2I | <i>Pseudomonas</i> | Mesófilo |
| A2III-1 | <i>Pseudomonas</i> | Mesófilo |
| A2III-2 | <i>Serratia</i> | Mesófilo |
| A31 | <i>Pseudomonas</i> | Mesófilo |
| E3 | <i>Pseudomonas</i> | Mesófilo |
| 4 | <i>Anoxybacillus</i> | Termófilo |
| 7L | <i>Anoxybacillus</i> | Termófilo |
| 20 | <i>Anoxybacillus</i> | Termófilo |
| FW | <i>Anoxybacillus</i> | Termófilo |
| SY | <i>Anoxybacillus</i> | Termófilo |

3.2. Selección de aislados de acuerdo a su actividad xilanolítica.

La selección de aislados con actividad xilanolítica se llevó a cabo mediante la detección cualitativa de la xilanasas en las 11 bacterias aisladas. Se observó la presencia de actividad xilanolítica débil en todas las bacterias (Tabla 3).

Tabla 3. Actividad xilanolítica medida mediante el ensayo cualitativo del rojo congo.

| Aislado | Actividad Xilanolítica |
|----------------|-------------------------------|
| A1II | + |
| A2I | + |
| A2III-1 | + |
| A2III-2 | + |
| A31 | + |
| E3 | + |
| 4 | + |
| 7L | ++ |
| 20 | + |
| FW | + |
| SY | + |

(+): Actividad débil; (++): Actividad media.

Todos los aislados presentaron un halo de aproximadamente 1 mm y decoloración total en la porción de agar que se encuentra debajo de la colonia. Se seleccionó el microorganismo termófilo 7L perteneciente al género *Anoxybacillus* sp., el cual exhibía el halo de decoloración de mayor diámetro alrededor de la colonia (Figura 4).

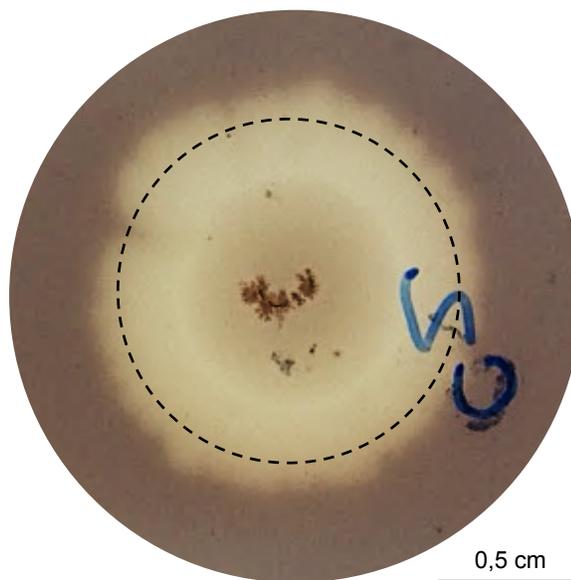


Figura 4. Detección cualitativa de actividad xilanasa del aislado 7L. La línea punteada representa el área donde se encontraba la colonia.

Luego se procedió a la determinación cuantitativa de la actividad xilanolítica de la bacteria seleccionada. La actividad xilanasa medida en la fracción intracelular y extracelular sin concentrar de la bacteria 7L fue 4,1 U/mL y 30,0 U/mL, respectivamente. Se utilizó sustrato y tampón como blanco de la reacción.

3.3. Purificación de una xilanasa extracelular de *Anoxybacillus* sp. 7L mediante técnicas cromatográficas

Para la purificación de una xilanasa extracelular proveniente del aislado 7L se cultivó 20 L de la bacteria de acuerdo a lo descrito en la Sección 2.1.1. Debido a que la xilanasa se encontraba diluida en el medio extracelular, ésta no se pudo detectar mediante el ensayo del DNS. Por lo anterior, el medio extracelular fue concentrado 15 veces aproximadamente y éste se consideró como primer paso de purificación (Tabla 4).

Al concentrar con el sistema de filtración tangencial, se eliminaron las proteínas y péptidos de una masa molecular menor a 30 kDa, considerándose como un paso de purificación.

El primer protocolo de purificación consistió en cargar el sobrenadante concentrado en una columna que contiene la resina de interacción hidrofóbica Octyl-Sepharose. No se logró detectar actividad xilanolítica en ninguna fracción y se observó que el sulfato de amonio interfiere en la revelación del color en el ensayo de reacción enzimática.

En el siguiente protocolo de purificación, se utilizó una columna que contenía la resina de intercambio aniónico Q-Sepharose. En la fracción que no se unió a la resina se observó una mayor actividad xilanolítica, correspondiente a aproximadamente al 57 % de las unidades totales que se cargaron en dicha resina. En las fracciones eluidas de la columna HA-Ultrogel, la única que presentó actividad fue la fracción que no se unió a la columna. Luego de concentrar esta fracción se obtuvo una purificación de 5 veces con un rendimiento de 36 % (Tabla 4).

Tabla 4. Tabla de purificación de la xilanasa proveniente del aislado 7L

| Columna | Actividad Total (U) | Proteína Total (mg) | Actividad Específica (U/mg) | Rendimiento (%) | Factor de Purificación |
|--------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------------|------------------------|-------------------------------|
| Concentrado extracelular | 3.657 | 959,0 | 3,8 | 100 | 1,0 |
| Q-Sepharose | 2.075 | 494,6 | 4,0 | 57 | 1,1 |
| HA-Ultrogel | 1.314 | 67,9 | 19,4 | 36 | 5,1 |

3.4. Identificación de las xilanasas extracelulares presentes en el genoma de *Anoxybacillus* sp. 7L.

Se realizó una búsqueda de genes que codifiquen para xilanasas en el genoma de la bacteria 7L. Esta búsqueda reveló la ausencia de anotaciones de genes que codifiquen para xilanasas. Luego de una segunda búsqueda, donde se incluyeron secuencias de enzimas relacionadas con la degradación del xilano, se encontraron 8 secuencias que codifican para diferentes polisacárido deacetilasa. Al hacer el alineamiento de estas secuencias con secuencias de proteínas bacterianas almacenadas en la base de datos GenBank, dos de éstas coincidieron con xilanasa/quitina deacetilasa del género *Anoxybacillus* (Tabla 5).

Tabla 5. Identificación de proteínas con posible actividad xilanolítica en el genoma de la bacteria 7L.

| Función | pI | MM (kDa) |
|------------------------------------|-----------|-----------------|
| Polisacárido deacetilasa, putativa | 7,1 | 34,9 |
| Polisacárido deacetilasa, putativa | 9,5 | 28,5 |

3.5. Determinación de temperatura, pH óptimo y termoestabilidad de la xilanasa en el medio extracelular de *Anoxybacillus* sp. 7L y semipurificada.

Se midió la actividad en función de la temperatura de la xilanasa extracelular del aislado 7L y se observó un máximo de actividad a dos temperaturas diferentes, 50 y 90 °C (datos no mostrados). Al medir la termoestabilidad de la actividad xilanolítica a 60 °C se observó que la actividad se mantuvo estable por 7 h.

Al medir la actividad en función del pH, se observó que la mayor actividad se obtuvo a un valor de pH 8,0. Además, se retiene más del 50 % de actividad en el rango de pH 6,0 - 11,0 (datos no mostrados).

En una segunda réplica biológica, se obtuvo que a diferentes temperaturas la actividad se mantuvo constante entre 40 y 90 °C (datos no mostrados). La actividad en función del pH se observó muy similar a los diferentes pH en los cuales se llevó a cabo la reacción.

De acuerdo a la similitud de las mediciones espectrofotométricas en función de la temperatura, pH y tiempo de incubación de la xilanasa de 7L, se decidió revisar los blancos utilizados en el ensayo del DNS. Para la revisión de los blancos utilizados en el ensayo, se utilizó como muestra el sobrenadante de 7L concentrado 15 veces y 10 unidades de xilanasa de *Aspergillus niger* (Megazyme) como control positivo, ambas en sus versiones nativas y desnaturaladas (hervidas durante 10 min). Se reveló con DNS (Tabla 6) (a) el sustrato solo, (b) la enzima sola, (c) el sustrato con la enzima y luego el DNS y (d) el sustrato con el DNS y luego la enzima. Debido a que el DNS se encuentra

preparado en hidróxido de sodio el pH de ésta solución es cercano a 12, esto produce que la enzima se inactive al entrar en contacto con el DNS. Por lo anterior, las reacciones (a), (b) y (d) corresponden a blancos, mientras que la reacción (c) indica si hay o no actividad.

Tabla 6. Evaluación del blanco a utilizar en el ensayo del DNS.

| | S | E | S+E |
|---|---|---|-----|
| a | ✓ | - | - |
| b | - | ✓ | - |
| c | - | - | ✓ |
| d | ✓ | ✓ | - |

Cada ensayo se reveló con DNS. a, b, c, d: diferentes ensayos; S: sustrato; E: enzima.
 ✓: compuesto agregado a la reacción.

Al hacer reaccionar por separado el sustrato (a) y la enzima (b) con el DNS se observa un cambio positivo en la absorbancia en todas las muestras (Tabla 7). Al utilizar como blanco la absorbancia obtenida de la reacción del sustrato solo (a), se está sobreestimando la actividad xilanólítica, debido a que no se toma en consideración el valor de absorbancia proporcionada por interferentes encontrados en el extracto concentrado. Cabe recalcar, que éste fue el blanco que se utilizó durante el trabajo realizado inicialmente.

Tabla 7. Absorbancias obtenidas de los diferentes ensayos revelados con DNS.

| | (a) | (b) | (a) + (b) | (c) | (d) |
|----------------------------|-------|-------|-----------|-------|-------|
| Muestra | 0,215 | 0,263 | 0,478 | 0,477 | 0,488 |
| Muestra desnaturalada | 0,215 | 0,312 | 0,527 | 0,513 | 0,506 |
| Enzima comercial | 0,215 | 0,097 | 0,311 | 1,214 | 0,205 |
| E. comercial desnaturalada | 0,215 | 0,089 | 0,303 | 0,203 | 0,209 |

Se observó que en la reacción (d) se obtiene una absorbancia similar a la suma aritmética de las absorbancias del sustrato y la enzima ((a) + (b)), reaccionando por separado con el DNS. Esto corrobora que el DNS inhibe la catálisis enzimática de la xilanasas. Los ensayos realizados con la muestra desnaturalada, presentan sistemáticamente mayor absorbancia que los realizados con la muestra nativa. Con el objetivo de no subestimar la actividad xilanolítica en el concentrado extracelular, no se utilizó la enzima desnaturalada como blanco de la reacción. Ambos resultados indican que el mejor blanco a utilizar es el ensayo (d) que utiliza la enzima nativa, la cual se adiciona a la reacción, pero se inactiva al entrar en contacto con el DNS. De este modo, se toman en cuenta todas las azúcares reductoras que se puedan encontrar en la muestra y que no son generadas por la acción de la actividad xilanolítica de la enzima, para poder ser descontadas de la reacción enzimática.

Para validar la medición de la actividad xilanolítica mediante el ensayo del DNS, se comparó la actividad xilanolítica de la enzima comercial, la cual fue medida con el ensayo RBB-X y el ensayo del DNS. Se observó una actividad similar en la medición

con ambos ensayos (Tabla 8), corroborándose una correcta medición de la actividad enzimática mediante el ensayo del DNS.

Tabla 8. Comparación de la actividad de la xilanasa comercial proveniente de *A. niger* con el ensayo del DNS y RRB-X.

| Control | Actividad (U/mL) | Actividad Específica (U/mg) |
|---------|------------------|-----------------------------|
| DNS | 189,4 | 2309,8 |
| RRB-X | 173,1 | 2111,0 |

3.6. Medición de la actividad xilanolítica extracelular de *Anoxybacillus* sp. 7L con el ensayo del DNS modificado.

Se midió la actividad xilanolítica en el extracto concentrado de la bacteria 7L mediante el ensayo del DNS utilizando como blanco del ensayo sustrato-DNS-enzima. A partir de un litro de medio extracelular del microorganismo 7L concentrado se midió actividad xilanolítica. En la fracción extracelular se obtuvo una actividad de 0,2 U/mg y 0,3 mU/mL de cultivo. En la fracción intracelular no se logró detectar actividad. Este resultado evidencia una sobreestimación en la medición previa de actividad y/o una disminución en la expresión de la xilanasa.

Debido a lo anterior, se intentó inducir una mayor expresión de la xilanasa extracelular de 7L. Para esto se realizó un nuevo cultivo madre, a partir de una muestra original del aislado 7L que se encontraba criopreservada. Luego el microorganismo 7L se incubó con diferentes concentraciones de los inductores xilano y salvado de trigo, sin obtener una mejora en la actividad xilanolítica extracelular. Estos resultados

implican que es técnicamente inadecuado trabajar con estas cantidades de xilanasas, por lo que se decidió cambiar de microorganismo.

De acuerdo a los resultados obtenidos anteriormente y debido a la imposibilidad de inducir una mayor actividad xilanolítica en la bacteria *Anoxybacillus* sp. 7L se decidió realizar un *screening* de microorganismos aislados presentes en la colección de la Fundación Biociencia.

3.7. Selección de nuevos aislados presentes en la colección de Fundación Biociencia.

En la selección de aislados presentes en la colección de Fundación Biociencia con actividad xilanolítica se analizaron 7 aislados extremófilos. Las condiciones de crecimiento de cada uno se resume en la Tabla 1. Se realizó el análisis cualitativo de la actividad xilanolítica de los aislados seleccionados, de acuerdo a lo descrito en la Sección 2.3.1, obteniéndose resultados positivos para 6 aislados (Tabla 9). Los aislados Asc6BA y 2.10-2C pertenecientes al género *Bacillus* sp. presentaron un halo de mayor tamaño (Figura 5).

Tabla 9. Actividad xilanolítica obtenida del ensayo cualitativo de los aislados seleccionados de la colección de Fundación Biociencia.

| Aislado | Actividad Xilanolítica |
|---------|------------------------|
| 6b* | - |
| ID17 | + |
| E1 | + |
| 5a1 | + |
| 5a | + |
| Asc6BA | +++ |
| 2.10-2C | ++ |

(-): Sin actividad; (+): Actividad débil; (++) : Actividad media; (+++): Actividad elevada.

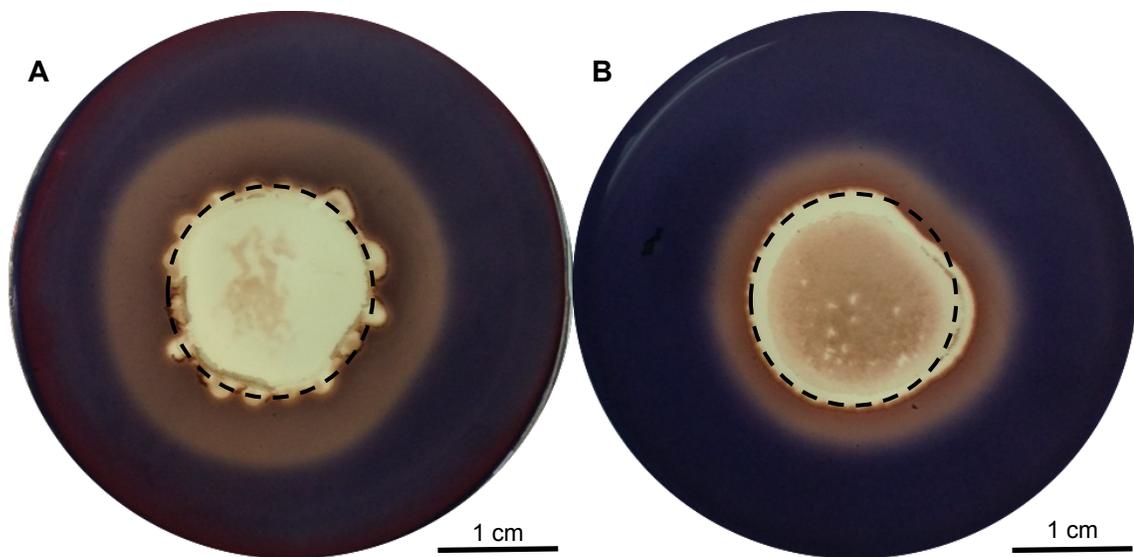


Figura 5. Detección cualitativa de actividad xilanasa de los aislados (A) Asc6BA y (B) 2.10-2C. La línea punteada representa el área donde se encontraba la colonia.

Para confirmar la selección del aislado Asc6BA, se desarrolló el ensayo cuantitativo de medición de la actividad xilanolítica descrito en la Sección 2.3.2.2. Se realizó un extracto celular con un 500 mL de cultivo, de acuerdo a lo descrito en la Sección 2.4.1. Se midió actividad xilanolítica de forma cuantitativa en la fracción extracelular e intracelular de todos los aislados seleccionados y se logró detectar

actividad solo en el aislados Asc6BA. Este resultado evidencia una alta sensibilidad del ensayo cualitativo del rojo congo, en comparación al ensayo cuantitativo utilizado.

En el medio extracelular concentrado del aislado Asc6BA se detectó una actividad de 0,49 U/mg y 78 mU/mL de cultivo, a pH 8,0. Debido a que fue el único aislado, a partir del cual se pudo cuantificar la actividad, se escogió este microorganismo para continuar con el desarrollo del trabajo de esta Tesis.

3.8. Purificación de xilanasas extracelulares de *Bacillus* sp. Asc6BA.

Al medir actividad en el extracto concentrado se detectó que *Bacillus* sp. Asc6BA posee al menos una xilanasas extracelular. Para la purificación de ésta se utilizaron cuatro pasos cromatográficos con columnas de intercambio aniónico, intercambio catiónico y filtración en gel. Se consideró como primer paso de purificación el concentrado extracelular, debido a la imposibilidad de medir actividad directamente en el medio extracelular. Luego de utilizar la resina de intercambio aniónico, a pH 7,5 y 9,0, se logró una purificación de aproximadamente 7 veces de las xilanasas, con un rendimiento del 85 %. En ambos pasos, la fracción con actividad fue aquella que no se unió a la resina. En el tercer paso cromatográfico se lograron separar dos xilanasas diferentes, las cuales fueron designadas como X2 y X3, con un factor de purificación de 110 y 42 veces, respectivamente. El rendimiento de cada una fue cercano al 7 %. En el último paso cromatográfico, de exclusión molecular, se incrementó considerablemente la pureza de las xilanasas, en aproximadamente 600 veces (~640 veces para X2 y ~570 veces para X3), obteniéndose una actividad específica de 157 U/mg para X2 (Tabla 10) y 140 U/mg de X3 (Tabla 11). De la xilanasas X3 se obtuvieron tres

fracciones de la columna Superdex 200, siendo la fracción N°3 la que presentó actividad. Las tablas de purificación de las xilanasas X2 y X3 representan una purificación tipo de un triplicado biológico.

Tabla 10. Tabla de purificación de la xilanasas X2.

| Muestra | Unidad Total (U) | Proteína Total (mg) | Actividad Específica (U/mg) | Factor Purificación | Rendimiento |
|--------------------------|-------------------------|----------------------------|------------------------------------|----------------------------|--------------------|
| Concentrado extracelular | 372,3 | 1.519,6 | 0,2 | 1,0 | 100% |
| Q-Sepharose pH 7,5 | 263,5 | 407,8 | 0,6 | 2,6 | 71% |
| Q-Sepharose pH 9,0 | 318,3 | 176,3 | 1,8 | 7,4 | 85% |
| SP-HiTrap X2 | 26,9 | 1,0 | 27,1 | 110,8 | 7% |
| Superdex 200 X2 | 16,9 | 0,1 | 157,5 | 642,7 | 5% |

Tabla 11. Tabla de purificación de la xilanasas X3.

| Muestra | Unidad Total (U) | Proteína Total (mg) | Actividad Específica (U/mg) | Factor Purificación | Rendimiento |
|--------------------------|-------------------------|----------------------------|------------------------------------|----------------------------|--------------------|
| Concentrado extracelular | 372,3 | 1.519,6 | 0,2 | 1,0 | 100% |
| Q-Sepharose pH 7,5 | 263,5 | 407,8 | 0,6 | 2,6 | 71% |
| Q-Sepharose pH 9,0 | 318,3 | 176,3 | 1,8 | 7,4 | 85% |
| SP-HiTrap X3 | 22,6 | 2,2 | 10,3 | 42,0 | 6% |
| Superdex 200 X3 | 7,7 | 0,1 | 140,5 | 573,3 | 2% |

3.9. Identificación de xilanasas extracelulares de *Bacillus* sp. Asc6BA.

La identificación de las xilanasas extracelulares purificadas, X2 y X3, de *Bacillus* sp. Asc6BA se llevó a cabo mediante una aproximación bioinformática y bioquímica. El resultados de ambas aproximaciones se encuentran detalladas en las siguientes secciones.

3.9.1. Búsqueda de xilanasas presentes en el genoma de *Bacillus* sp. Asc6BA.

De acuerdo a la aproximación bioinformática se realizó la búsqueda de genes que codifican para xilanasas en el genoma de *Bacillus* sp. Asc6BA. Se lograron identificar 5 genes, de los cuales se pudieron identificar dos grupos de xilanasas: endo-xilanasas alcalinas y β -xilosidasas ácidas (Tabla 12). Considerando los resultados del punto isoeléctrico de las proteínas que codifican para xilanasas en el genoma se diseñó el protocolo de purificación presentado en la Sección 3.5. Con el objetivo de separar en una primera instancia las β -xilosidasas, con la resina Q-Sepharose pH 7,5 y posteriormente purificar las endo-xilanasas con la resina Q-Sepharose pH 9,0 y la resina SP pH 9,0.

Se observó que las secuencias de las “endo-1,4- β -xilanasasa A (precursor)” (Tabla 12) poseen un péptido que señala la exportación en las bacterias Gram positivas, por lo que estas xilanasas serían extracelulares.

Tabla 12. Genes que codifican para xilanasas presentes en el genoma de *Bacillus* sp. Asc6BA.

| | Enzima | pI | MM (kDa) | Péptido señal (N° aminoácido) |
|---|---|-----|----------|-------------------------------|
| 1 | Endo-1,4- β -xilanasasa A (precursor) | 8,2 | 55,0 | 26 |
| 2 | Endo-1,4- β -xilanasasa A (precursor) | 8,4 | 48,5 | 28 |
| 3 | β -xilosidasa | 5,8 | 61,6 | - |
| 4 | β -xilosidasa | 5,6 | 59,9 | - |
| 5 | β -xilosidasa | 5,7 | 58,0 | - |

3.9.2. Análisis electroforético en geles SDS-PAGE de las proteínas de *Bacillus* sp. Asc6BA.

De acuerdo a la aproximación bioquímica se realizó un análisis electroforético de las proteínas provenientes las fracciones con actividad en cada paso de purificación. Se realizó un SDS-PAGE al 15 % con cada fracción de acuerdo a la Sección 2.5.2. A medida que se aplicaba un nuevo paso cromatográfico, se observó una disminución de bandas en el gel de poliacrilamida. En las fracciones obtenidas de la Superdex 200 (X2 y X3), se reduce el número de proteínas de la muestra con respecto a la etapa anterior (Figura 6). Con las flechas se destacan las posibles proteínas que corresponderían a xilanasas de acuerdo a la información obtenida en el genoma (Tabla 12). La actividad específica reportada de las xilanasas X2 y X3 obtenidas de la columna Superdex 200 (Tabla 10 y Tabla 11) considera todas las proteínas y péptidos presentes en la fracción. Por esta razón, se realizó un nuevo cálculo con el fin de obtener una actividad específica más certera. Para esto, se considera el porcentaje que representa la proteína de interés (indicada con una flecha negra en la Figura 6), en el total de las proteínas presentes en la fracción eluida. Al

incorporar este factor al cálculo de la actividad específica, se obtiene como resultado para X2 y X3 una actividad específica de 403 U/mg y 474 U/mg, respectivamente.

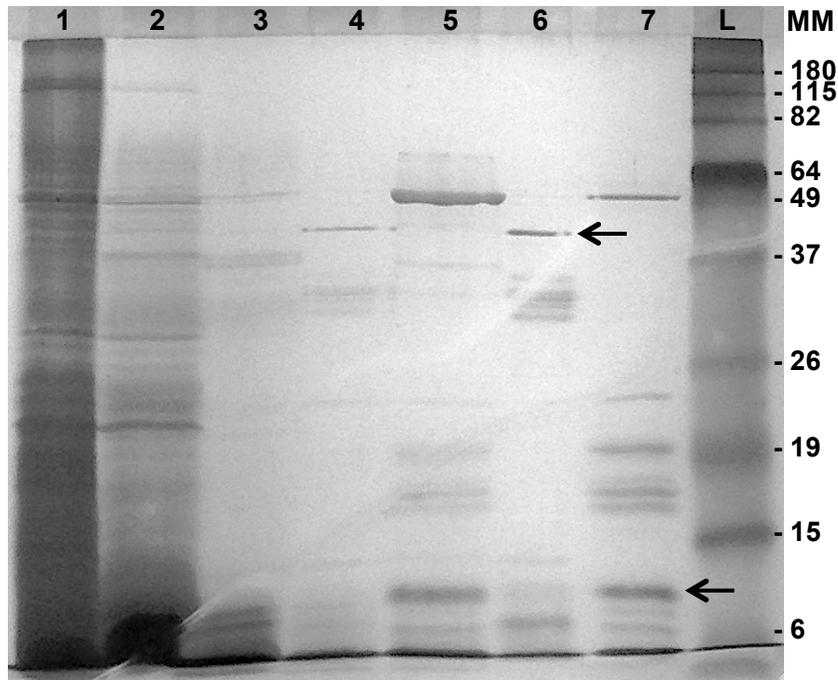


Figura 6. Visualización de fracciones con actividad xilanólítica obtenidas en la purificación de xilanasas a partir del sobrenadante del aislado Asc6BA. SDS-PAGE al 15% revelado con tinción de plata. MM: Masa molecular; L: Marcador de proteínas; 1: Extracto crudo; 2: Q-Sepharose pH 7,5; 3: Q-Sepharose pH 9,0; 4: SP (X2); 5: SP (X3); 6: Superdex 200 (X2); 7: Superdex 200 (X3). Las flechas indican posibles xilanasas.

3.9.3. Zimograma para xilanasas purificadas de *Bacillus* sp. Asc6BA.

Se realizó un zimograma de las xilanasas purificadas de *Bacillus* sp. Asc6BA con el fin de comprobar que las bandas identificadas en el SDS-PAGE, en base a la información obtenida del genoma, poseen actividad xilanólítica. Se cargaron las fracciones X2 y X3 provenientes de la columna Superdex en un gel SDS-PAGE 12%. Se observó en el gel teñido con rojo congo una decoloración en el carril de la proteína

X2 (Figura 7B). Esta decoloración fue identificada mediante el gel teñido con azul de Coomassie, donde la decoloración correspondió a una proteína de masa de 80 kDa aproximadamente (indicada con la flecha negra, Figura 7A). Esta banda fue seleccionada, cortada y enviada a identificar al Centro Nacional de Biotecnología (CNB), España.

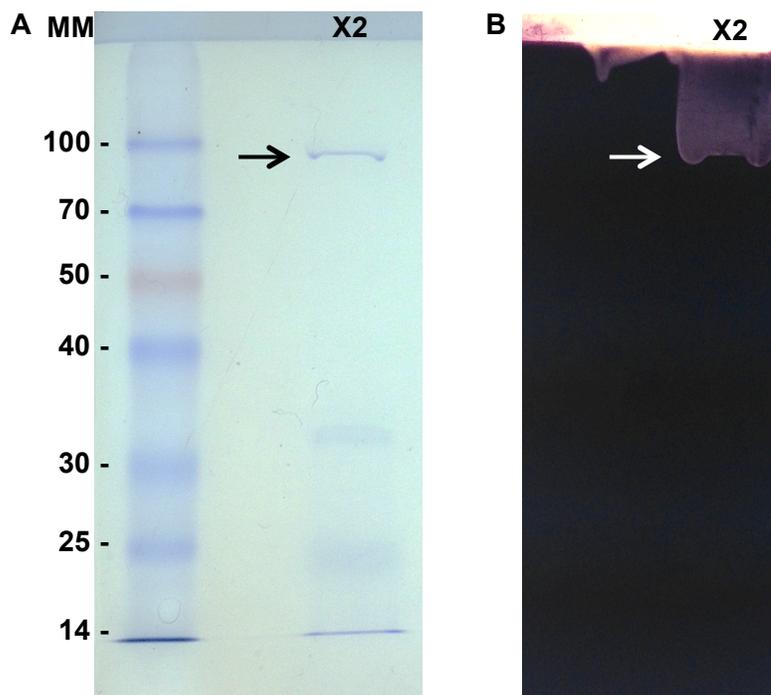


Figura 7. Gel SDS-PAGE al 12 % de la xilanasa X2 para zimograma. (A) Teñido con azul de Coomassie y (B) teñido con rojo Congo. MM: Masa molecular; L: marcador masa molecular; X2: fracción Superdex 200. Se indican con flecha negra la banda enviada a identificar mediante espectroscopia de masa.

Con la muestra X3 también se observó una decoloración en el zimograma (Figura 8B), correspondiente a una proteína de masa molecular de 16 kDa aproximadamente, indicada con la flecha negra, de acuerdo a lo observado en el gel teñido con azul de Coomassie (Figura 8A). Debido a que la banda observada en el gel teñido con azul de Coomassie es muy débil, se enviaron a identificar al CNB todas las

proteínas de la fracción X3 obtenida de la columna Superdex 200. El resultado de la identificación de las bandas de proteínas de la muestra X2 y X3 se muestra en la siguiente sección.

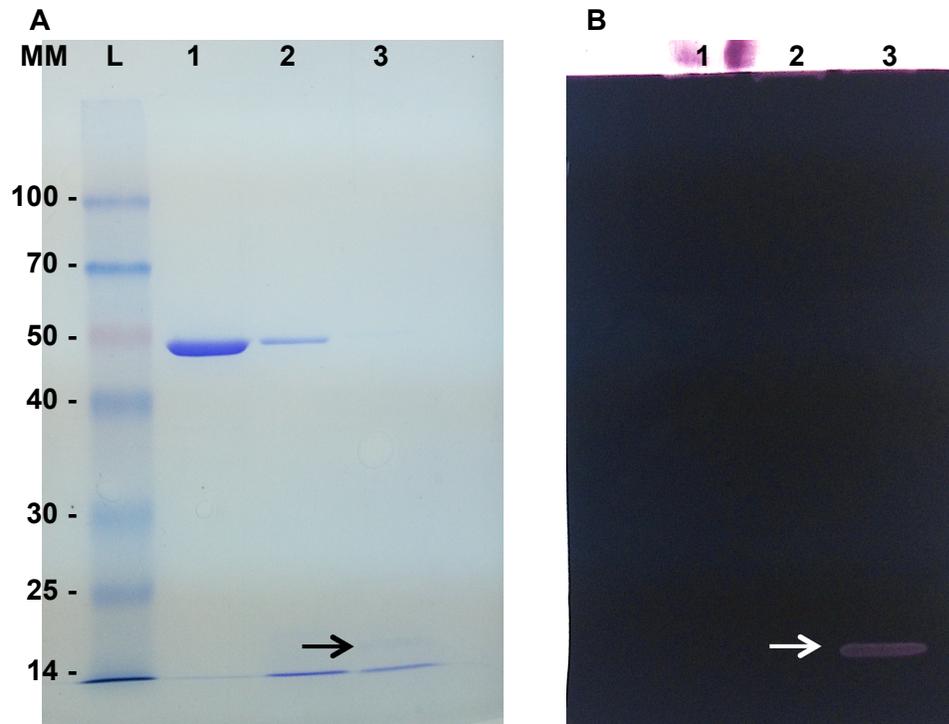


Figura 8. Gel SDS-PAGE al 12 % de la xilanasa X3 para zimograma. (A) Teñido con azul de Coomasie y (B) teñido con rojo Congo. MM: Masa molecular; L: marcador masa molecular; 1: fracción N°1 Superdex 200; 2: fracción N°2 Superdex 200; 3: fracción N°3 Superdex 200. Se indica con flecha negra la posible xilanasa.

3.9.4. Identificación de xilanasas X2 y X3 mediante análisis de huella peptídica.

La identificación de las xilanasas X2 y X3 se realizó utilizando la información de la huella peptídica obtenida de la espectrometría de masa realizada en el CNB. Se realizaron dos búsquedas independientes de xilanasas, con diferentes algoritmos y bases de datos. Los resultados entregados por el CNB, corresponden a un análisis utilizando la base de datos de NCBI a través del algoritmo MASCOT, donde la banda

X2 correspondería a la xilanasa Y (gi: 757434240) de *Bacillus paralicheniformis*. Ésta es una secuencia obtenida desde la secuenciación genómica de *Bacillus paralicheniformis* y no una xilanasa caracterizada. En la búsqueda realizada utilizando el genoma de la bacteria Asc6BA como base de datos y el algoritmo X!Tandem, la banda X2 correspondería a la xilanasa “Endo-1,4-β-xilanasa A (precursor)” (enzima N°2, Tabla 12), perteneciente a la familia GH 8, en la cual se encuentran caracterizadas solo 5 endo-xilanasas. Al realizar un alineamiento entre las xilanasas identificadas mediante ambos algoritmos, éste arrojó una identidad del 99 % con una cobertura del 100 %.

En los resultados entregados de la muestra X3 por el CNB se informa que la proteína analizada correspondería a la “beta-1,4-endoxylanase” (gi: 99030999) de *Bacillus licheniformis* perteneciente a la familia GH 11. En la búsqueda realizada utilizando el genoma de la bacteria Asc6BA como base de datos y el algoritmo X!Tandem no se encontró una xilanasa que se correspondiera con la huella peptídica. En el genoma no se encontró la secuencia de la “beta-1,4-endoxylanase”, ni una proteína con los aminoácidos conservados del sitio catalítico de las xilanasas de la familia GH 11.

3.10. Caracterización bioquímica de las xilanasas purificadas de *Bacillus* sp. Asc6BA

3.10.1. Determinación de la masa molecular de las xilanasas X2 y X3.

La determinación de la masa molecular aparente de las xilanasas X2 y X3 purificadas de *Bacillus* sp. Asc6BA se realizó mediante cromatografía de exclusión molecular empleando la resina Superdex 200. Se determinó una masa de 38 y 11 kDa para X2 y X3, respectivamente. Para la muestra X3, la masa molecular obtenida a través de SDS-PAGE fue de 16 kDa. La muestra X2 fue tratada independientemente con dos métodos: uno de ellos es en condiciones desnaturalantes, tratada con SDS, β -mercaptoetanol y calentada por 10 min a 95 °C y el otro es en condiciones no desnaturalantes tratada solo con SDS, por lo que migra de acuerdo a su relación masa/carga. Para X2, en condiciones desnaturalantes, se observaron dos bandas de masa molecular de 47 y 35 kDa, mientras que en condiciones no desnaturalantes se observó una única banda a 82 kDa (Figura 9).

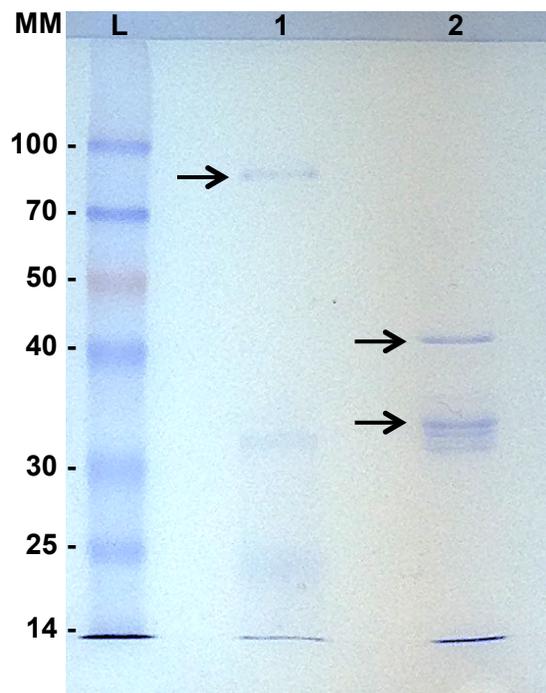


Figura 9. SDS PAGE al 12 % de la xilanasas X2 teñido con azul de Coomassie. MM: masa molecular; L: Marcador de proteínas; 1: X2 en condiciones no desnaturalantes; 2: X2 en condiciones desnaturalantes. Las flechas negras indican las proteínas correspondientes a X2.

3.10.2. Efecto de la temperatura y el pH en la actividad xilanolítica de las xilanasas X2 y X3.

Se analizó la actividad xilanolítica de las xilanasas X2 y X3 purificadas de *Bacillus* sp. Asc6BA en función de la temperatura y el pH. Las muestras de las xilanasas X2 y X3 utilizadas para la medición de actividad poseían una concentración de proteína de 0,1 y 0,05 mg/mL, respectivamente. Para X2 se obtuvo que la temperatura óptima de reacción fue a 50 °C (Figura 10A) y para X3 fue a 60 °C (Figura 10B). La xilanasas X2 retiene más del 50 % de la actividad en un rango entre 30 y 60 °C, mientras que X3 retiene la misma actividad en un rango entre 45 y 65 °C.

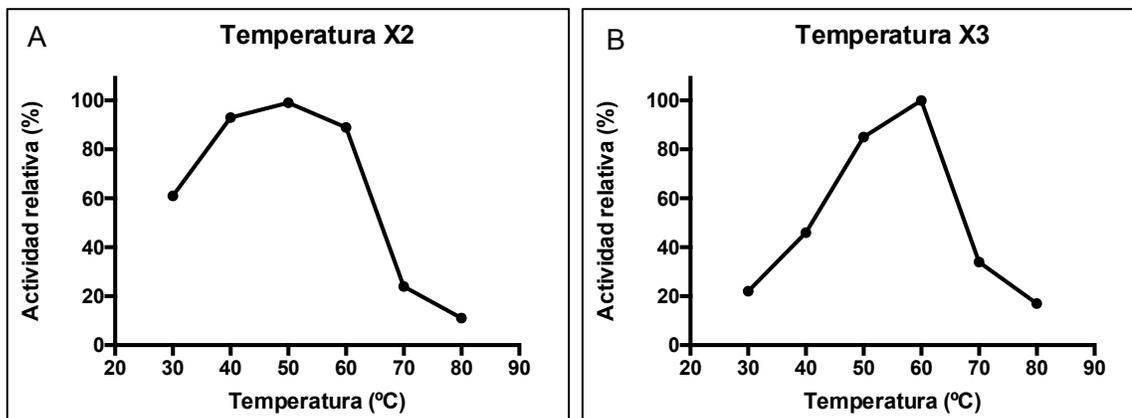


Figura 10. Actividad enzimática en función de la temperatura de la xilanasa (A) X2 y (B) X3.

Al analizar la actividad de las xilanasas X2 y X3 en dependencia del pH, se puede observar que la xilanasa X2 tiene una actividad óptima a un pH de 6,0 y mantiene el 50 % de su actividad entre pH 5,5 y 7,5 (Figura 11A). En tanto, X3 tiene una actividad óptima a un pH de 7,0 y retiene más del 50 % de la actividad entre pH 4,5 y 7,5 (Figura 11B).

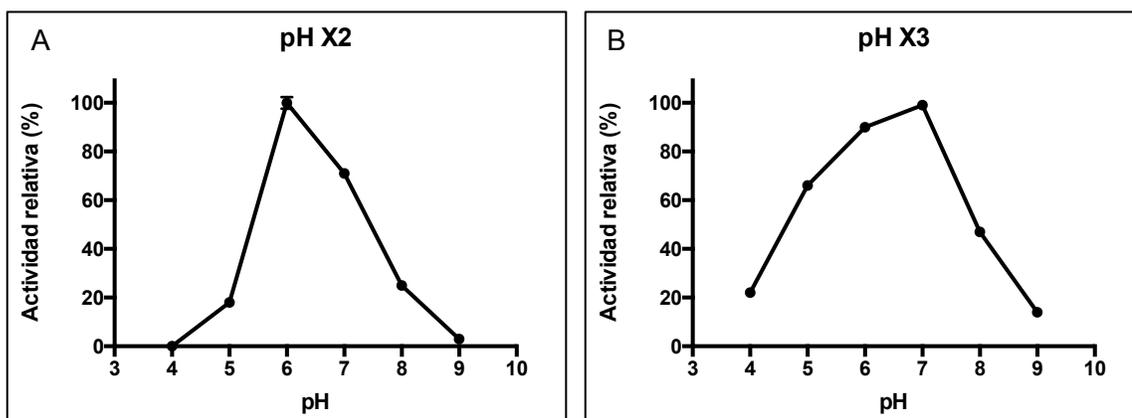


Figura 11. Actividad enzimática en función del pH de la xilanasa (A) X2 y (B) X3.

3.10.3. Termoestabilidad de la actividad xilanólítica de las xilanasas X2 y X3.

Se analizó la actividad xilanólítica de las xilanasas X2 y X3 en función al tiempo de incubación a 50 y 60 °C. Se observó que la xilanasa X2 retiene el 50 % de la actividad a los 30 min de incubación a 50 °C, mientras que a 60 °C retiene el 50 % a los 8 min (Figura 12A).

La xilanasa X3 a 50 °C retuvo el 100 % de la actividad por 24 h de incubación y más del 70 % de la actividad a las 32 h de incubación, mientras que a 60 °C pierde completamente la actividad en 1h (Figura 12B).

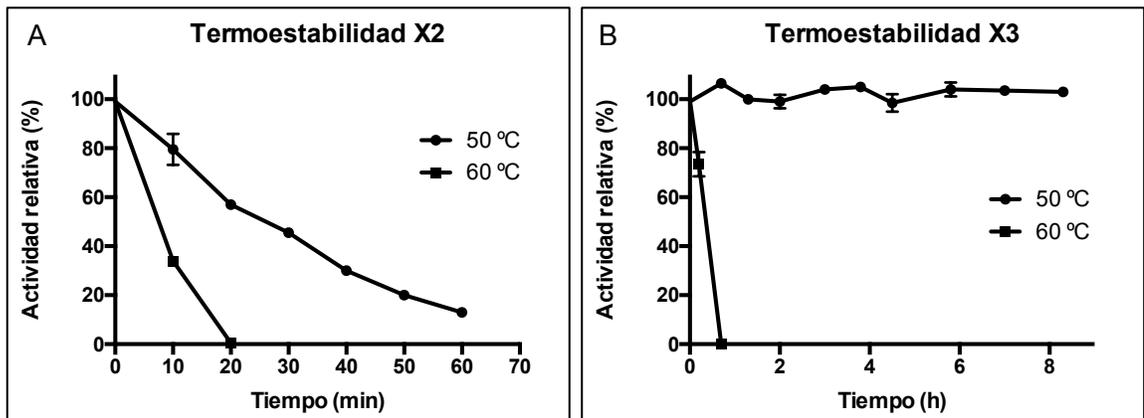


Figura 12. Termoestabilidad de la actividad xilanólítica de (A) X2 y (B) X3 en el tiempo.

3.10.4. Efecto de la liofilización en la actividad de las xilanasas X2 y X3

Se analizó el efecto del proceso de liofilización sobre la actividad de las xilanasas X2 y X3. Se observó que luego de ser liofilizadas y resuspendidas, mantienen aproximadamente el 90 % de su actividad inicial (Figura 13). De acuerdo al

análisis estadístico *t-test*, no se obtuvo un cambio significativo de la actividad xilanolítica antes y después liofilizar las xilanasas X2 y X3.

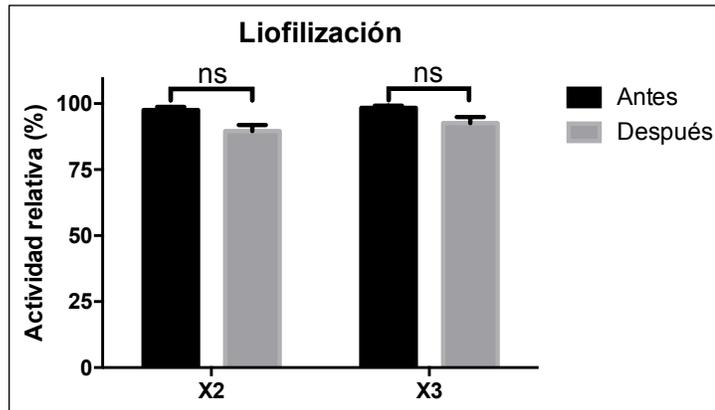


Figura 13. Actividad relativa de la xilanasas X2 y X3 antes y después de someterlas a liofilización. ns: no significativo ($n = 3$ * $p < 0,05$)

4. DISCUSIÓN

Actualmente en la industria del papel se utilizan xilanasas en diferentes etapas del proceso de producción de pulpa. El primer proceso es la cocción de los *chips* de madera, la cual se lleva a cabo a una temperatura de 180 °C, altas presiones y en la presencia de hidróxido de sodio. Posterior a la cocción, la pulpa es refinada, donde se remueven las impurezas y los químicos utilizados en la etapa anterior. Es en esta fase donde se puede introducir el tratamiento enzimático, el cual afloja las fibras de celulosa, produciendo una disminución en el consumo de energía y mejora en la consistencia de la pulpa y las propiedades de la fibra. En la etapa del blanqueamiento se disminuye la utilización de cloro elemental y otros compuestos químicos, como peróxido de hidrógeno y ozono [73]. La incubación de la xilanasas con la pulpa actualmente ocurre entre 40 – 60 °C, pH 6 – 8 y 60 – 240 min, dependiendo de la fábrica en la cual se utilice [56]. Debido a que las enzimas que se han utilizado no se ajustan apropiadamente al proceso, actualmente se buscan enzimas más robustas que sean activas a mayores temperaturas y pHs. Xilanasas con tales características se pueden encontrar en microorganismos que naturalmente realicen catálisis en estas condiciones.

Durante el desarrollo de este trabajo se aislaron microorganismos xilanolíticos, donde se utilizó el xilano como presión de selección. Debido a que este polímero es la principal fuente de carbono en el medio de cultivo, los microorganismos necesitan secretar xilanasas para degradar el xilano disponible y utilizarlo en su metabolismo [31]. De las estrategias utilizadas para aislar los microorganismos, se obtuvo que el

medio de cultivo PAE1, modificado de Pathania *et al.* 2012, resultó ser muy selectivo para el género *Anoxybacillus*, debido a que con muestras de diversos orígenes se lograron aislar diferentes especies pertenecientes a éste género. De los 11 microorganismos xilanolíticos aislados (Tabla 3), el que presentó mayor actividad xilanolítica extracelular (30,0 U/mL) fue el aislado 7L perteneciente al género *Anoxybacillus*. Lo anterior concuerda con lo descrito por otros autores, donde señalan que miembros de los géneros *Anoxybacillus* y *Bacillus*, secretan una variedad de enzimas celulolíticas, como xilanasas y celulasas [75, 76]. La mayoría de las xilanasas caracterizadas provenientes de *Anoxybacillus*, poseen su actividad óptima entre 50 - 70 °C y pH > 7,0 [33, 35, 77]. Esto indica que el aislado 7L podría representar un buen modelo para el estudio de xilanasas con las características señaladas.

El aislado 7L se creció en 20 L de medio PAE1 donde el xilano fue reemplazado por salvado de trigo, un desecho de la agroindustria, que se utiliza para aminorar el alto costo asociado al uso del xilano en la etapa de producción. Este reemplazo ha sido estudiado por varios autores, por ejemplo, de Alencar *et al.* 2013 ensayó diversos desechos de agroindustria, obteniendo con el salvado de trigo una actividad muy similar a la obtenida con el xilano.

En la purificación de xilanasas se han descrito diversos protocolos, los que comúnmente utilizan fraccionamiento como etapa inicial, seguido por el uso de columnas cromatográficas. Utilizando la información de los autores Zheng *et al.* 2012; Chi *et al.* 2012 y Kacagan *et al.* 2008, se generó un protocolo utilizando fraccionamiento con sulfato de amonio y acetona como primera etapa. Con ambos

métodos se obtuvieron resultados artefactuales, debido a que el sulfato de amonio interfiere en el ensayo del DNS y la acetona interfiere en la medición de proteínas mediante el ensayo de Bradford. Considerando lo anterior y para realizar una medición adecuada, se concluyó que la utilización de estos procedimientos requeriría de tratamientos posteriores, como diálisis, para eliminar los interferentes. Como segunda etapa de purificación se realizaron técnicas cromatográficas, utilizando resinas de intercambio aniónico y catiónico, de interacción hidrofóbica, filtración en gel e hidroxiapatita. La xilanasas no logró adherirse a ninguna de las resinas utilizadas y la actividad fue detectada en la fracción que no se unió a la columna. Esto pudo deberse a que el tampón utilizado poseía un pH inadecuado para el punto isoeléctrico de la xilanasas y el tipo de resina utilizada. Otra posibilidad es que existiera un interferente en la muestra que impidiese la adecuada unión de la enzima a la resina, como por ejemplo exopolisacáridos. El protocolo que otorgó mejores resultados para purificar la xilanasas extracelular de *Anoxybaillus* sp. 7L fue el expuesto en la Tabla 4, debido a que dentro de todas las combinaciones ensayadas, éste otorgó el mejor factor de purificación de la xilanasas con la menor cantidad de etapas.

Al caracterizar la xilanasas extracelular purificada de *Anoxybacillus* sp. 7L se realizaron mediciones de actividad a diferentes temperaturas, pH y tiempo de incubación, observándose una similitud entre las mediciones. Esta similitud entre los datos se puede deber a una baja concentración de enzima purificada presente en la muestra, por lo que se estaría trabajando fuera del límite de detección del ensayo del DNS. También se puede deber a la presencia de interferentes en la muestra. De acuerdo a lo estudiado por Teixeira *et al.* 2012 los aminoácidos triptófano y cisteína

pueden aumentar hasta en 50 % la medición de absorbancia mediante DNS. Por los anterior se revisaron los blancos utilizados en la detección de actividad xilanolítica mediante el ensayo enzimático del DNS, comprobándose que el mejor blanco a utilizar es la reacción sustrato-DNS-enzima, en aquel orden, en comparación al blanco empleado inicialmente (sustrato-tampón-DNS). Al medir la actividad xilanolítica con el nuevo blanco, ésta disminuyó 150 veces con respecto a la medida inicialmente.

La imposibilidad de inducir mayor cantidad de xilanasas presentes en el cultivo de *Anoxybacillus* sp. 7L condujo a la decisión de cambiar el microorganismo en estudio para este trabajo de tesis. Para esto se buscaron nuevos microorganismos extremófilos pertenecientes a la colección de Fundación Biociencia. El origen y características de los microorganismos seleccionados fue muy diversa, ensayándose microorganismos termófilos, mesófilos y halófilos aislados de muestras provenientes de la Antártica, géiseres, salares y una estufa de esterilización. Se incluyó en la búsqueda microorganismos halófilos debido a que se ha observado que las características que le confieren termoestabilidad a las termozimas son compartidas o muy similares a las características que le confieren estabilidad a las enzimas halófilas. De los microorganismos ensayados aquel que presentó mayor actividad xilanolítica fue el aislado Asc6BA, una bacteria mesófila y halófila perteneciente al género *Bacillus*, en el cual se han descrito variadas xilanasas termofílicas [82–85].

Debido a que anteriormente se obtuvieron resultados negativos en el intento de purificación mediante fraccionamiento con la xilanasa de *Anoxybacillus* sp. 7L, se decidió cambiar esta etapa por filtración tangencial. El protocolo de purificación fue

elaborado considerando lo descrito acerca de purificación de xilanasas provenientes de bacterias halófilas [17] y considerando la información disponible en el genoma. En este último se encontraron dos grupos de xilanasas (Tabla 12) con un punto isoeléctrico teórico de aproximadamente 5,5 y 8,0. Se diseñó un protocolo donde inicialmente se realizaron dos pasos cromatográficos con una resina de intercambio aniónico, primero a pH 7,5 y luego a pH 9,0. Debido a que la xilanasas no se adhirió a la resina a pH 9,0, lo que eluyó se cargó directamente en una columna con una resina de intercambio catiónico. De esta última columna se lograron separar dos xilanasas, las cuales se cargaron independientemente en una columna de filtración en gel, como último paso de purificación. En el cálculo del factor de purificación, se consideró el concentrado extracelular como primer paso de purificación, debido a que no es posible medir actividad directamente en el sobrenadante. Mediante este protocolo las xilanasas X2 y X3 se purificaron aproximadamente 600 veces, con un rendimiento de 2 y 5 % respectivamente con respecto a la actividad total. Este nivel de pureza permitió realizar la determinación de características bioquímicas. Aún así, el rendimiento obtenido fue bajo, considerando que el objetivo final es su utilización en la industria, siendo recomendable realizar la versión recombinante de la xilanasas X2 y/o X3, para su producción a mayor escala. Al visualizar las fracciones de X2 y X3 en el gel SDS-PAGE teñido con nitrato de plata (Figura 6), se puede observar una mayor intensidad en la tinción de algunas bandas en comparación al gel de las fracciones X2 (Figura 9) y X3 (Figura 8) revelado con azul de Coomassie. Esto se puede deber a que el nitrato de plata interacciona mejor con grupos ácidos de las proteínas [86], mientras que el azul de Coomassie se une más eficientemente a residuos básicos e hidrofóbicos [87], por lo

que la diferencia en la intensidad se puede deber diferencias entre proteínas ácidas y básicas.

En la identificación de las dos xilanasas de *Bacillus* sp. Asc6BA, X2 y X3, se correlacionó la información obtenida del genoma de *Bacillus* sp. Asc6BA, la huella peptídica obtenida a partir de la espectrometría de masa y la masa molecular en condiciones nativas y desnaturalantes. Cada análisis, por sí solo y en conjunto, aporta información para caracterizar de forma efectiva cada xilanasas purificada. Mediante la información obtenida del genoma se identificaron genes que codifican para xilanasas (Tabla 12) y a partir de su secuencia aminoacídica traducida fue posible calcular la masa molecular y punto isoeléctrico teórico de las xilanasas. Con la información obtenida de la espectrometría de masa y la base de datos GenBank, se identificaron las xilanasas X2 y X3 como endo- β -1,4-xilanasas de la familia 8 y 11 respectivamente. Si se utiliza el genoma como base de datos, X2 correspondería a la endo-xilanasas número 2 de la Tabla 12. Por el contrario, la xilanasas X3 no se pudo correlacionar con ninguna proteína del genoma, posiblemente debido a que la secuencia de la xilanasas se podría encontrar en el 10 % del genoma que no fue secuenciado.

La masa molecular de las xilanasas X2 y X3 fue determinada mediante SDS-PAGE y filtración en gel. Para la xilanasas X2, la masa molecular sin desnaturalar fue de 82 kDa, mientras que desnaturalada mostró dos bandas, una de 47 y otra de 35 kDa (Figura 9). Mediante filtración en gel la masa molecular de X2 fue de 38 kDa. Considerando los resultados de los geles de SDS-PAGE, se puede postular que X2 es una xilanasas heterodimérica de 82 kDa con dos subunidades de 47 y 35 kDa

respectivamente. Para X3 la masa molecular medida mediante SDS-PAGE sin desnaturar y desnaturada fue de 16 kDa y mediante la filtración en gel 11 kDa.

En ambas enzimas, X2 y X3, se observa que la masa molecular obtenida de la cromatografía en gel es menor a la obtenida del SDS-PAGE no desnaturada. Esta diferencia se puede deber a una interacción entre la xilanasa y la resina, tal como ha sido reportada anteriormente [82, 88]. La adsorción entre proteínas y resinas de exclusión molecular puede producirse por interacciones electrostáticas, hidrofóbicas o puentes de hidrógeno con los grupos funcionales de las resinas. Esta adsorción puede ser reversible o irreversible; si es reversible aumentará el tiempo de retención de la proteína, otorgando una masa molecular aparentemente menor [89]. Las interacciones se pueden detectar observando picos de elución ensanchados o asimétricos, tal como lo observado en la elución de las xilanasas X2 y X3 (Anexo 7.2). Para contrarrestar estas interacciones se puede modificar la fase móvil utilizada en la cromatografía, aumentando la concentración de NaCl a 0,3 - 0,4 M [90] o incorporando arginina en el tampón [91].

La xilanasa X3 demostró una termoestabilidad muy alta a 50 °C y pH 7,0, donde por 32 h retiene más del 70 % de su actividad. Esta termoestabilidad es comparable solo con dos xilanasas descritas hasta el momento, la xilanasa proveniente del hongo *Talaromyces thermophilus* [92] y la xilanasa de la bacteria *Thermomonospora* sp. [92, 93] las cuales mantienen el 100 % de su actividad a 50 °C por 7 días y 72 h respectivamente.

Dependiendo de la planta de procesamiento de celulosa, diversos químicos, temperaturas y pH son utilizados en las etapas de pulpaje y refinación de la pulpa, por lo cual, las características de las enzimas a utilizar van a depender de los procesos específicos de cada planta. En la actualidad, por ejemplo, el uso de xilanasas a 50 °C, pH 6,5 durante 90 min, aumentó el brillo, resistencia y longitud de las fibras de celulosa [73]. En otra planta de procesamiento de celulosa el uso de xilanasas a 60 °C, pH 8,0 durante 60 min, produjo aflojamiento de las fibras de la pared celular de la madera, haciéndola más susceptible a los químicos utilizados en etapas posteriores [94]. Las características de termoestabilidad, temperatura y pH óptimos de las xilanasas X2 y X3, obtenidas en este trabajo de tesis, son similares a las xilanasas utilizadas en industrias señaladas anteriormente, por lo que las xilanasas X2 y X3 serían apropiadas para ser utilizadas en la industria del papel, en la etapa de refinamiento de la pulpa. Aún así, estas xilanasas no son ideales, debido que se buscan enzimas que sean activas en condiciones más cercanas a 180 °C y pH 11, estado en el cual se encuentra la pulpa en el término de la etapa de cocción. Aunque, la alta termoestabilidad de la xilanasa X3 la hace promisoría candidata para ser utilizada en la industria del papel como parte del pre-tratamiento de los chips e incluso en otras industrias como biocombustibles o de alimentos.

Se estudió la liofilización de la enzima, por ser una técnica ampliamente utilizada en los laboratorios para su preservación luego de ser purificadas. Las xilanasas X2 y X3 purificadas en este estudio, provenientes de *Bacillus* sp. Asc6BA retienen más del 90 % de la actividad xilanólítica luego de ser sometidas a liofilización, no siendo necesaria la adición de ningún tipo de estabilizador. Este resultado es muy

relevante desde el punto de vista biotecnológico, debido a que las enzimas liofilizadas presentan ventajas en su transporte, aplicación y conservación. Además al no ser necesaria la adición de estabilizadores, se reducen los costos de producción facilitando su fabricación.

Finalmente, durante este trabajo de tesis se desarrolló una metodología apropiada para la detección, purificación y medición de actividad de dos xilanasas extracelulares. Lo anterior se logró utilizando diferentes técnicas y herramientas que permitieron identificar las xilanasas purificadas X2 y X3, y obtener la secuencia nucleotídica de la xilanasas X2. Esta última información de gran importancia en un paso posterior de expresión heteróloga de la enzima para escalar su producción.

5. CONCLUSIÓN

De acuerdo al trabajo realizado, se evidenció que la bacteria halófila Asc6BA perteneciente al género *Bacillus* posee dos xilanasas extracelulares, X2 y X3. Estas xilanasas son activas en rangos adecuados de pH y temperatura para su utilización en diversas etapas de la industria del papel. Por el contrario, se puede deducir que la bacteria termófila 7L perteneciente al género *Anoxybacillus* es inadecuada para ser utilizada en investigación y a nivel industrial, debido a los bajos niveles de xilanasas obtenidos en el medio extracelular.

Cabe destacar la alta termoestabilidad de la xilanasas X3 a 50 °C, la cual es superior a las xilanasas utilizadas actualmente, otorgándole mayor espectro de aplicación en diversas industrias, como la de alimentos o biocombustibles.

Esta tesis demuestra la existencia de una nueva xilanasas que posee interesantes características para su uso industrial. En el futuro se podría lograr su producción a gran escala, utilizando técnicas de biología molecular. En la industria del papel la aplicación de las xilanasas permitiría disminuir la energía utilizada y el consumo de compuestos clorados nocivos para el medio ambiente.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Voet D, Voet JG (1990) Introduction to enzymes. En: Stiefel J (ed) Biochemistry. John Wiley & Sons, pp 316–320.
2. Adams MWW, Perler FB, Kelly RM (1995) Extremozymes: Expanding the Limits of Biocatalysis. *Nat Biotechnol* 13:662–668.
3. van den Burg B (2003) Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr Opin Microbiol* 6:213–218.
4. Holmes ML, Scopes RK, Moritz RL, Simpson RJ, Englert C, Pfeifer F, Dyll-Smith ML (1997) Purification and analysis of an extremely halophilic beta-galactosidase from *Haloferax alicantei*. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol* 1337:276–286.
5. Kim M-H, Kim H-K, Lee J-K, Park S-Y, Oh T-K (2000) Thermostable lipase of *Bacillus Stearothermophilus*: high-level production, purification, and calcium-dependent thermostability. *Biosci Biotechnol Biochem* 64:280–286.
6. Sarmiento F, Peralta R, Blamey JM (2015) Cold and Hot Extremozymes: Industrial Relevance and Current Trends. *Front Bioeng Biotechnol*. 3:148.
7. Shah SP, Jansen SA, Taylor LJ-A, Chong PL-G, Correa-Llantén DN, Blamey JM (2014) Lipid composition of thermophilic *Geobacillus* sp. strain GWE1, isolated from sterilization oven. *Chem Phys Lipids* 180:61–71.
8. López-García P (1999) DNA supercoiling and temperature adaptation: A clue to early diversification of life? *J Mol Evol* 49:439–452.
9. Kumar S, Nussinov R (2001) How do thermophilic proteins deal with heat? *Cell Mol life Sci* 58:1216–1233.
10. Li WF, Zhou XX, Lu P (2005) Structural features of thermozyms. *Biotechnol Adv* 23:271–281.
11. Takagi H, Takahashi T, Momose H, Inouye M, Maeda Y, Matsuzawa H, Ohta T (1990) Enhancement of the thermostability of subtilisin E by introduction of a disulfide bond engineered on the basis of structural comparison with a thermophilic serine protease. *J Biol Chem* 265:6874–6878.
12. Vogt G, Woell S, Argos P (1997) Protein thermal stability, hydrogen bonds, and ion pairs. *J Mol Biol* 269:631–643.
13. Zaccardi MJ, Mannweiler O, Boehr DD (2012) Differences in the catalytic mechanisms of mesophilic and thermophilic indole-3-glycerol phosphate synthase enzymes at their adaptive temperatures. *Biochem Biophys Res Commun* 418:324–329.
14. Oren A (1999) Bioenergetic Aspects of Halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:334–348.
15. Fukuchi S, Yoshimune K, Wakayama M, Moriguchi M, Nishikawa K (2003)

Unique Amino Acid Composition of Proteins in Halophilic Bacteria. *J Mol Biol* 327:347–357.

16. Giridhar P V, Chandra T (2010) Production of novel halo-alkali-thermo-stable xylanase by a newly isolated moderately halophilic and alkali-tolerant *Gracilibacillus* sp. TSCPVG. *Process Biochem* 45:1730–1737.
17. Prakash B, Vidyasagar M, Jayalakshmi SK, Sreeramulu K (2012) Purification and some properties of low-molecular-weight extreme halophilic xylanase from *Chromohalobacter* sp. TPSV 101. *J Mol Catal B Enzym* 74:192–198.
18. Langborg P, Ingvorsen K, Kusk K (2003) Purification and characterisation of two extremely halotolerant xylanases from a novel halophilic bacterium. *Extremophiles* 7:423–31.
19. Ermler U, Merckel MC, Thauer RK, Shima S (1997) Formylmethanofuran: tetrahydromethanopterin formyltransferase from *Methanopyrus kandleri* - new insights into salt-dependence and thermostability. *Structure* 5:635–646.
20. Rozzell JD (1999) Commercial scale biocatalysis: Myths and realities. *Bioorganic Med Chem* 7:2253–2261.
21. Pramod B (2011) Emerging applications of enzymes for energy saving in pulp&paper industry. *Ippta J* 23:181–186.
22. Dhiman SS, Garg G, Sharma J, Kalia VC, Kang YC, Lee J-K (2014) Reduction in acute ecotoxicity of paper mill effluent by sequential application of xylanase and laccase. *PLoS One* 9:e102581.
23. Virk AP, Puri M, Gupta V, Capalash N, Sharma P (2013) Combined enzymatic and physical deinking methodology for efficient eco-friendly recycling of old newsprint. *PLoS One* 8:e72346.
24. Tolan JS, Collins J (2004) Use of xylanase in the production of bleached, unrefined pulp at Marathon Pulp Inc. *Pulp Pap Canada* 105:44–46.
25. Lecourt M, Soranzo A, Petit-Conil M (2011) Refining of Pine Radiata and Eucalyptus Kraft Pulps Assisted With Commercial Laccase Mediator Systems. *O Pap* 72:57–61.
26. Dhiman SS, Garg G, Mahajan R, Garg N, Sharma J (2009) “Single lay out” and “mixed lay out” enzymatic processes for bio-bleaching of kraft pulp. *Bioresour Technol* 100:4736–41.
27. Mansfield SD, De Jong E, Stephens RS, Saddler JN (1997) Physical characterization of enzymatically modified kraft pulp fibers. *J Biotechnol* 57:205–216.
28. Moon YH, Iakiviak M, Bauer S, Mackie RI, Cann IKO (2011) Biochemical analyses of multiple endoxylanases from the rumen bacterium *Ruminococcus albus* 8 and their synergistic activities with accessory hemicellulose-degrading enzymes. *Appl Environ Microbiol* 77:5157–69.
29. Amoresano A, Andolfo A, Corsaro MM, Zocchi I, Petrescu I, Gerday C, Marino G

- (2000) Structural characterization of a xylanase from psychrophilic yeast by mass spectrometry. *Glycobiology* 10:451–8.
30. Fonseca-Maldonado Vieira R, Alponi DS, Sanchez J, Bonneil E, Thibault P, Ward RJ (2013) Engineering the pattern of protein glycosylation modulates the thermostability of a GH11 xylanase. *J Biol Chem* 288:25522–34.
 31. Shulami S, Shenker O, Langut Y, Lavid N, Gat O, Zaide G, Zehavi A, Sonenshein AL, Shoham Y (2014) Multiple regulatory mechanisms control the expression of the *Geobacillus stearothermophilus* gene for extracellular xylanase. *J Biol Chem* 289:25957–75.
 32. İnan K, Çanakçı S, Beldüz AO (2011) Isolation and characterization of xylanolytic new strains of *Anoxybacillus* from some hot springs in Turkey. *Turkish J Biol* 35:529–542.
 33. Kambourova M, Mandeva R, Fiume I, Maurelli L, Rossi M, Morana A (2007) Hydrolysis of xylan at high temperature by co-action of the xylanase from *Anoxybacillus flavithermus* BC and the beta-xylosidase/alpha-arabinosidase from *Sulfolobus solfataricus* Oalpa. *J Appl Microbiol* 102:1586–93.
 34. Kacagan M, Canakci S, Sandalli C, İnan K, Colak DN, Belduz AO (2008) Characterization of a xylanase from a thermophilic strain of *Anoxybacillus pushchinoensis* A8. *Biologia* 63:599–606.
 35. Wang J, Bai Y, Yang P, Shi P, Luo H, Meng K, Huang H, Yin J, Yao B (2009) A new xylanase from thermoalkaline *Anoxybacillus* sp. E2 with high activity and stability over a broad pH range. *World J Microbiol Biotechnol* 26:917–924.
 36. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Stanley JT, Williams ST (1994) Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th ed. Williams & Wilkins, pp 559.
 37. Lombard V, Golaconda H, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B (2014) The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res* 42:D490–D495.
 38. Naumoff DG (2011) Hierarchical classification of glycoside hydrolases. *Biochem* 76:622–35.
 39. Flint HJ, Martin J, Mcpherson CA, Daniel AS (1993) A Bifunctional Enzyme , with Separate Xylanase and xynD Gene of *Ruminococcus flavefaciens*. *J Bacteriol* 175:2943–2951.
 40. Paës G, Berrin J-G, Beaugrand J (2012) GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. *Biotechnol Adv* 30:564–92.
 41. Pollet A, Schoepe J, Dornez E, Strelkov S V., Delcour JA, Courtin CM (2010) Functional analysis of glycoside hydrolase family 8 xylanases shows narrow but distinct substrate specificities and biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:2125–35.
 42. Mamo G, Thunnissen M, Hatti-Kaul R, Mattiasson B (2009) An alkaline active

- xylanase: Insights into mechanisms of high pH catalytic adaptation. *Biochimie* 91:1187–1196.
43. Wakarchuk WW, Campbell RL, Sung WL, Davoodi J, Yaguchi M (1994) Mutational and crystallographic analyses of the active site residues of the *Bacillus circulans* xylanase. *Protein Sci* 3:467–475.
 44. Petegem F Van, Collins T, Meuwis M, Gerday C, Feller G, Beeumen J Van (2003) The Structure of a Cold-adapted Family 8 Xylanase at 1.3 Å Resolution. *J Biol Chem* 278:7531–7539.
 45. Scheller HV, Ulvskov P (2010) Hemicelluloses. *Annu Rev Plant Biol* 61:263–89.
 46. Sun J, Tian C, Diamond S, Louise Glassa N (2012) Deciphering transcriptional regulatory mechanisms associated with hemicellulose degradation in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* 11:482–493.
 47. Vuong T V, Wilson DB (2010) Glycoside hydrolases: catalytic base/nucleophile diversity. *Biotechnol Bioeng* 107:195–205.
 48. Collins T, Gerday C, Feller G (2005) Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol Rev* 29:3–23.
 49. Dornez E, Verjans P, Arnaut F, Delcour JA, Courtin CM (2011) Use of psychrophilic xylanases provides insight into the xylanase functionality in bread making. *J Agric Food Chem* 59:9553–62.
 50. McAlpine PO, O'Shea CJ, Varley PF, O'Doherty J V. (2012) The effect of protease and xylanase enzymes on growth performance and nutrient digestibility in finisher pigs. *J Anim Sci* 90:375–377.
 51. Patra AK, Madhu A, Chakraborty JN (2010) Studies on enzymatic pretreatment of linen. *Indian J fibre Text Res* 35:337–341.
 52. Juodeikiene G, Basinskiene L, Vidmantiene D, Makaravicius T, Bartkiene E (2012) Benefits of β -xylanase for wheat biomass conversion to bioethanol. *J Sci Food Agric* 92:84–91.
 53. Skals PB, Krabek A, Nielsen PH, Wenzel H (2008) Environmental Assessment of Enzyme Assisted Processing in Pulp and Paper Industry. *LCA case Stud* 13:124–132.
 54. Ahlawat S, Battan B, Dhiman SS, Sharma J, Mandhan RP (2007) Production of thermostable pectinase and xylanase for their potential application in bleaching of kraft pulp. *J Ind Microbiol Biotechnol* 34:763–70.
 55. Kaur A, Mahajan R, Singh A, Garg G, Sharma J (2010) Application of cellulase-free xylano-pectinolytic enzymes from the same bacterial isolate in biobleaching of kraft pulp. *Bioresour Technol* 101:9150–5.
 56. Torres CE, Negro C, Fuente E, Blanco A (2012) Enzymatic approaches in paper industry for pulp refining and biofilm control. *Appl Microbiol Biotechnol* 96:327–44.

57. Muñoz PA, Flores PA, Boehmwald FA, Blamey JM (2011) Thermophilic bacteria present in a sample from Fumarole Bay, Deception Island. *Antarct Sci* 23:549–555.
58. Correa-Llantén D, Larraín-Linton J, Muñoz PA, Castro M, Boehmwald F, Blamey JM (2013) Characterization of the thermophilic bacterium *Geobacillus* sp. strain GWE1 isolated from a sterilization oven. *Korean J Microbiol Biotechnol* 41:278–283.
59. Reysenbach A, Longnecker K (2000) Novel bacterial and archaeal lineages from an in situ growth chamber deployed at a mid-Atlantic ridge hydrothermal vent. *Appl Environ Microbiol* 66:3768–3806.
60. Forney LJ, Zhou X, Brown CJ (2004) Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. *Curr Opin Microbiol* 7:210–220.
61. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–10.
62. Miller GL (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem* 31:426–428.
63. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
64. Bjellqvist B, Hughes GJ, Pasquali C, Paquet N, Ravier F, Sanchez J-C, Frutiger S, Hochstrasser D (1993) The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* 14:1023–1031.
65. Petersen TN, Brunak S, Heijne G von, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8:785–786.
66. Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
67. Chevallet M, Luche S, Rabilloud T (2006) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat Protoc* 1:1852–1858.
68. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676–682.
69. Park D-J, Lee Y-S, Chang J, Fang S-J, Choi Y-L (2013) An β -1,4-xylanase with exo-enzyme activity produced by *Paenibacillus xylanilyticus* KJ-03 and its cloning and characterization. *J Microbiol Biotechnol* 23:397–404.
70. Perkins DN, Pappin DJC, Creasy DM, Cottrell JS (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20:3551–3567.
71. Vaudel M, Barsnes H, Berven FS, Sickmann A, Martens L (2011) SearchGUI: An

- open-source graphical user interface for simultaneous OMSSA and X!Tandem searches. *Proteomics* 11:996–9.
72. Vaudel M, Burkhart JM, Zahedi RP, Overland EE, Berven FS, Sickmann A, Martens L, Barsnes H (2015) PeptideShaker enables reanalysis of MS-derived proteomics data sets. *Nat Biotechnol* 33:22–4.
 73. Yang G, Lucia LA, Chen J, Cao X, Liu Y (2011) Effects of Enzyme Pretreatment on the Beatability of Fast-Growing Poplar APMP Pulp. *Biores* 6:2568–2580.
 74. Pathania S, Sharma N, Verma SK (2012) Optimization of Cellulase-Free Xylanase Produced by a Potential Thermoalkalophilic *Paenibacillus* sp. N1 Isolated From Hot Springs of Northern Himalayas in India. *J Microbiol Biotechnol Food Sci* 2:1–24.
 75. Lim YL, Chan KG, Ee R, Belduz AO, Canakci S, Kahar UM, Yaakop AS, Goh KM (2015) Complete genome of the potential thermozyyme producer *Anoxybacillus gonensis* G2T isolated from the Gönen hot springs in Turkey. *J Biotechnol* 212:65–66.
 76. Thite VS, Nerurkar AS (2015) Xylanases of *Bacillus* spp. isolated from ruminant dung as potential accessory enzymes for agro-waste saccharification. *Lett Appl Microbiol* 60:456–466.
 77. Ellis JT, Magnuson TS (2012) Thermostable and Alkalistable Xylanases Produced by the Thermophilic Bacterium *Anoxybacillus flavithermus* TWXYL3. *ISRN Microbiol* 2012:1–8.
 78. de Alencar NC, Sorgatto M, Peixoto-Nogueira SDC, Betini JHA, Zanoelo FF, Marques MR, de Moraes Polizeli MDLT, Giannesi GC (2013) Bioprocess and biotechnology: effect of xylanase from *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* on pulp biobleaching and enzyme production using agroindustrial residues as substrate. *Springerplus* 2:380–87.
 79. Zheng H, Liu Y, Liu X, Wang J, Han Y, Lu F (2012) Isolation, purification, and characterization of a thermostable xylanase from a novel strain, *Paenibacillus campinasensis* G1-1. *J Microbiol Biotechnol* 22:930–8.
 80. Chi W-J, Park DY, Chang Y-K, Hong S-K (2012) A novel alkaliphilic xylanase from the newly isolated mesophilic *Bacillus* sp. MX47: production, purification, and characterization. *Appl Biochem Biotechnol* 168:899–909.
 81. Teixeira RSS, Da Silva ASA, Ferreira-Leitão VS, Da Silva Bon EP (2012) Amino acids interference on the quantification of reducing sugars by the 3,5-dinitrosalicylic acid assay mislead carbohydrase activity measurements. *Carbohydr Res* 363:33–37.
 82. Damiano VB, Ward R, Gomes E, Ferreira H, Da Silva R (2006) Purification and Characterization of Two Xylanases From Alkalophilic and Thermophilic *Bacillus licheniformis* 77-2. *Appl Biochem Biotechnol* 129:289–302.
 83. Menon G, Mody K, Keshri J, Jha B (2011) Isolation, purification, and characterization of haloalkaline xylanase from a marine *Bacillus pumilus* strain,

GESF-1. *Biotechnol Bioprocess Eng* 15:998–1005.

84. Ratanakhanokchai K, Kyu KL, Tanticharoen M (1999) Purification and properties of a xylan-binding endoxylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain K-1. *Appl Environ Microbiol* 65:694–7.
85. Kumar V, Satyanarayana T (2011) Applicability of thermo-alkali-stable and cellulase-free xylanase from a novel thermo-halo-alkaliphilic *Bacillus halodurans* in producing xylooligosaccharides. *Biotechnol Lett* 33:2279–85.
86. Rabilloud T (1990) Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: a 10-year synthesis. *Electrophoresis* 11:785–794.
87. Congdon RW, Muth GW, Splittgerber AG (1993) The Binding Interaction of Coomassie Blue with Proteins. *Anal Biochem* 213:407–413.
88. Breccia JD, Siñeriz F, Baigorí MD, Castro GR, Hatti-Kaul R (1998) Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Enzyme Microb Technol* 22:42–49.
89. Arakawa T, Ejima D, Li T, Philo JS (2010) The Critical Role of Mobile Phase Composition in Size Exclusion Chromatography of Protein Pharmaceuticals. *J Pharm Sci* 99:1674–1692.
90. Herold M (1993) SEC : Influence of Salt Concentration in the Mobile Phase. *Am Lab* 25:35–35.
91. Ejima D, Yumioka R, Arakawa T, Tsumoto K (2005) Arginine as an effective additive in gel permeation chromatography. *J Chromatogr A* 1094:49–55.
92. Maalej I, Belhaj I, Masmoudi NF, Belghith H (2009) Highly thermostable xylanase of the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*: Purification and characterization. *Appl Biochem Biotechnol* 158:200–212.
93. George SP, Ahmad A, Rao MB (2001) A novel thermostable xylanase from *Thermomonospora* sp.: Influence of additives on thermostability. *Bioresour Technol* 78:221–224.
94. Lei XC, Lin L, Kecheng LC (2008) Effect of xylanase pretreatment of wood chips on fiber separation in CTMP refining process. *Biores* 3:801–815.

7. ANEXO

7.1. Medios de cultivo utilizados para el crecimiento de los diferentes aislados.

| Medio: PAE 1 pH 7,0 | |
|---------------------------------------|------------------------------------|
| Compuesto | Concentración (g·L ⁻¹) |
| Xilano | 4,0 |
| Extracto de levadura | 5,0 |
| NH ₄ SO ₄ | 6,0 |
| NH ₄ Cl | 1,0 |
| NaCl | 0,5 |
| MgSO ₄ ·7 H ₂ O | 0,1 |
| CaCl ₂ | 1,0 |
| Medio: PAE 2 pH 7,0 | |
| Compuesto | Concentración (g·L ⁻¹) |
| Xilano | 7,0 |
| Extracto de levadura | 2,0 |
| NaCl | 2,5 |
| NH ₄ Cl | 5,0 |
| KH ₂ PO ₄ | 15,0 |
| Na ₂ HPO ₄ | 30,0 |
| MgSO ₄ ·7 H ₂ O | 0,025 |
| Medio: XIL pH 7,0 | |
| Compuesto | Concentración (g·L ⁻¹) |
| Xilano | 3,0 |
| NH ₄ SO ₄ | 2,5 |
| NaCl | 1,0 |
| KCl | 7,0 |
| MgCl ₂ | 3,0 |
| Solución trazas | 1,0 mL |

| Medio: TL pH 5,8 | |
|--|------------------------------------|
| Compuesto | Concentración (g·L ⁻¹) |
| NH ₄ Cl | 1,2 |
| NaCl | 35,0 |
| MgSO ₄ ·7 H ₂ O | 3,5 |
| KCl | 0,325 |
| CaCl ₂ | 0,75 |
| KH ₂ PO ₄ | 0,5 |
| NaBr | 0,05 |
| H ₃ BO ₃ | 0,015 |
| SrCl ₂ | 0,0075 |
| KI | 0,05 |
| Maltosa | 3,0 |
| Citrato | 0,005 |
| Peptona | 5,0 |
| Extracto de Levadura | 5,0 |
| Xilano | 4,0 |
| Solución trazas | 15 mL |
| Medio: TB pH 7,0 | |
| Compuesto | Concentración (g·L ⁻¹) |
| Triptona | 8,0 |
| Extracto de levadura | 4,0 |
| NaCl | 2,0 |
| Glucosa | 10,0 |
| Agar | 15,0 |
| Medio: HVMOD-D1 pH 7,3 | |
| Compuesto | Concentración (g·L ⁻¹) |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 5,0 |
| NaCl | 60,0 |
| KH ₂ PO ₄ | 0,5 |
| Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·6H ₂ O | 0,05 |
| Glucosa | 5,0 |
| Extracto de levadura | 4,0 |
| Peptona | 4,0 |
| Citrato de sodio | 2,0 |
| Xilano | 4,0 |

| Medio: LB pH 7,0 | |
|---|------------------------------------|
| Compuesto | Concentración (g·L ⁻¹) |
| Triptona | 10,0 |
| Extracto de levadura | 5,0 |
| NaCl | 10,0 |
| Xilano | 5,0 |
| Medio: MMM pH 7,0 | |
| Compuesto | Concentración (g·L ⁻¹) |
| NH ₄ Cl | 1,2 |
| NaCl | 14 |
| MgSO ₄ ·7 H ₂ O | 2 |
| MgCl ₂ | 3,5 |
| KCl | 0,35 |
| CaCl ₂ | 0,3 |
| KH ₂ PO ₄ | 0,3 |
| NaBr | 0,06 |
| H ₃ BO ₃ | 0,015 |
| SrCl ₂ | 0,02 |
| Citrato de sodio | 0,006 |
| KI | 0,02 |
| Extracto de levadura | 5,0 |
| Maltosa | 5,0 |
| Triptona | 5,0 |
| Xilano | 4,0 |
| Solución trazas | 10 mL |
| Solución Trazas | |
| Compuesto | Concentración (g·L ⁻¹) |
| C ₆ H ₉ NO ₆ | 1,0 |
| FeCl ₃ | 1,1 |
| MnSO ₄ | 0,5 |
| Na ₂ WO ₄ | 0,3 |
| NiCl ₂ | 0,2 |
| CoSO ₄ | 0,1 |
| ZnSO ₄ | 0,1 |
| CuSO ₄ | 0,01 |
| Na ₂ MoO ₄ | 0,01 |

7.2. Determinación de la masa molecular de las xilanasas X2 y X3.

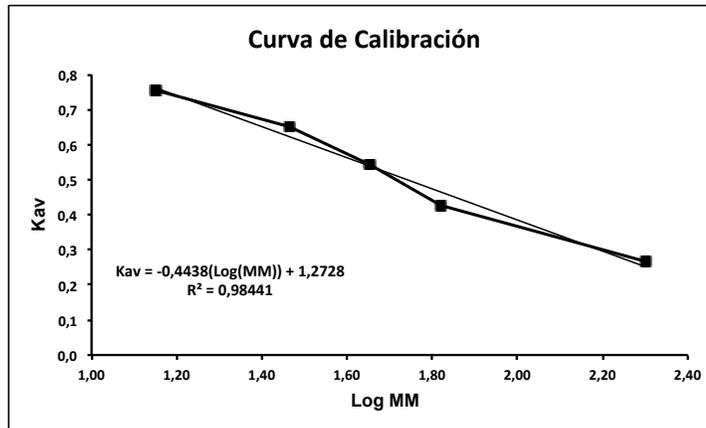


Figura 14. Curva de calibración para la determinación de la masa molecular en condiciones nativas de las xilanasas X2 y X3. Se utilizó como estándares de masa molecular conocida las siguientes proteínas: α -lactoalbúmina (14,2 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), albúmina de pollo (45,0 kDa), albúmina de suero bovino (66,0 kDa), catalasa (200 kDa).

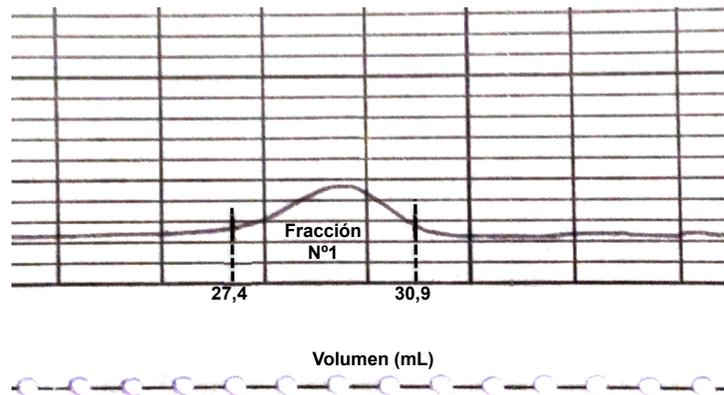


Figura 15. Patrón de elución de proteínas de la xilanasas X2 de las fracciones obtenidas de la columna Superdex 200.

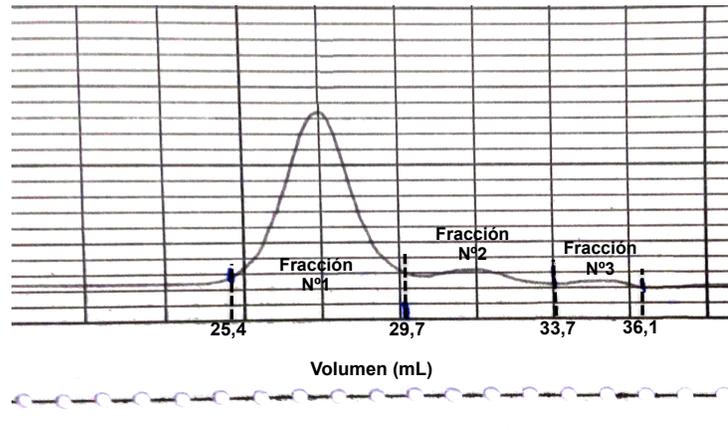


Figura 16. Patrón de elución de proteínas de la xilanasas X3 de las fracciones obtenidas de la columna Superdex 200. La fracción Nº3 contiene la actividad xilanolítica.