

# ENZIMAS XILANOLÍTICAS BACTERIANAS Y SUS APLICACIONES INDUSTRIALES

Bárbara Leslie Cooper Bribiesca

## RESUMEN

La hemicelulosa es el segundo polisacárido de importancia después de la celulosa. En los últimos años se han estudiado las enzimas xilanolíticas, por su gran potencial biotecnológico en numerosos procesos industriales, clasificándolas y caracterizándolas bioquímicamente; sin embargo, no existen muchos reportes sobre xilanasas de origen bacteriano.

**Palabras Claves:** hemicelulosa, xilanasas.

## Bacterial xylanases and their industrial application

## ABSTRACT

Hemicellulose is the second most important polysaccharide in nature after cellulose. Recently, xylanolytic enzymes have been extensively studied for their biotechnological potential on numerous industrial processes and have been classified and biochemically characterized, however there are not many studies on bacterial xylanases.

**Key Words:** hemicelluloses, bacterial xylanases.

ARTÍCULO RECIBIDO EL 15 DE ABRIL DEL 2013 Y ACEPTADO EL 20 DE MAYO DEL 2013.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad ha surgido un creciente interés en el estudio de los sistemas enzimáticos, necesarios para el metabolismo de la hemicelulosa, particularmente de xilano, que es el componente principal de la hemicelulosa y que después de la celulosa es el polisacárido más abundante en la naturaleza; su composición es variable y depende de la fuente vegetal de que provenga<sup>1</sup>, por lo que las publicaciones recientes se han enfocado en la purificación, caracterización, clonación, expresión, inducción de la producción bajo distintas condiciones y de diferentes orígenes de dichas enzimas y sus usos en diversas industrias.

La hemicelulosa es un heteropolímero comúnmente ramificado compuesto por dos a cuatro residuos de azúcares, ya sean hexosas (D-manosa, D-glucosa y D-galactosa), pentosas (D-xilosay D-arabinosa) o sus ácidos urónicos; dependiendo de su composición se le asigna su nombre como puede ser xilano, manano, galactano o arabinano<sup>2</sup>.

El xilano es el polisacárido hemicelulósico más abundante en paredes celulares de plantas representando hasta 30%–

35% del total de peso seco<sup>3</sup>. El xilano está constituido por una cadena principal de  $\beta$ -(1-4)-xilopiranososa (xilosa); el arabinoxilano tiene residuos de  $\alpha$ -L-arabinofuranosa (L-arabinosa) y de ácido glucurónico en posición C(O)-2 y/o C(O)-3 sobre la estructura del xilano, aunque también puede estar sustituido con glucosa o galactosa y estar esterificados con ácidos ferúlicos, diferúlicos y p-cumáricos en posición C(O)-5 de la arabinosa<sup>4,5</sup> (Figura 1).

La solubilidad de este polisacárido depende de su grado de sustitución o ramificaciones. En maderas duras, el xilano está presente en cadenas muy largas de 150 a 200 monómeros, mientras que en maderas suaves u otros materiales vegetales están formados de xilano de cadenas más cortos de 70 a 130 monómeros y con un menor grado de ramificación<sup>6</sup>.

## GLICOSILHIDROLASAS

Para realizar la hidrólisis completa de los polisacáridos complejos se requieren distintas enzimas como glicanhidrolasas, enzimas desramificadoras y glicosidasas;

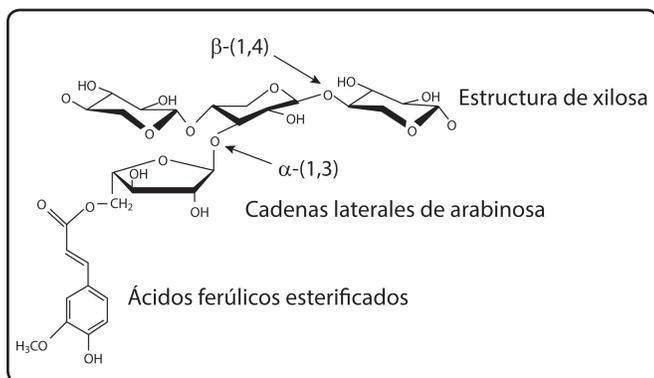


Figura 1. Estructura química general de los arabinoxilanos.

la mayoría presentan actividad mínima o nula si se enfrentan individualmente a los polisacáridos<sup>7</sup>.

Estas enzimas denominadas glucosilhidrolasas, además, se clasifican por familias numeradas basadas en sus actividades catalíticas primarias según se ha determinado por la topografía de su sitio activo; previamente se dividían las enzimas en clanes marcados alfabéticamente basados en la similaridad del doblamiento de su proteína (protein fold). Las enzimas categorizadas en familias numeradas y en clanes alfabéticos poseen actividades catalíticas similares, ya que el criterio de clasificación, ya sea el doblamiento de la enzima o la topografía del sitio activo, están muy relacionadas entre sí, al determinar el comportamiento catalítico de las mismas<sup>8,9</sup>. La hidrólisis de celulosa y xilanos hacia productos solubles requiere diversos tipos de enzimas. La composición de las hemicelulosas es más compleja que la celulosa, aunque no forma estructuras cristalinas tan densamente empacadas de la celulosa, por lo que son moléculas más accesibles al ataque enzimático; sin embargo, dada la naturaleza compleja y variabilidad estructural de las hemicelulosas, se requiere la acción de múltiples enzimas con diversas funciones y sitios de acción para su completa degradación y que actúan cooperativamente para degradar al polímero en sus azúcares constituyentes<sup>7,10</sup>.

## XILANASAS

Las xilanasas son un grupo de enzimas extracelulares que actúan sinérgicamente, producidas por diversos microorganismos como bacterias (saprofitas y fitopatógenas), micorrizas, levaduras, hongos, actinomicetos, además en protozoa, insectos, crustáceos, caracoles y algunas semillas de plantas durante la fase de germinación en suelo<sup>11,12,13,14,15</sup>.

Aunque se han caracterizado completamente y patentado un cierto número de enzimas xilanólíticas, la mayoría de estas corresponden a hongos filamentosos y solo se han caracterizado  $\beta$ -xilosidasas y endo-xilanasas de bacterias de los géneros *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Micrococcus* y *Staphylococcus*; existen muy pocos reportes de estas enzimas en otros géneros de bacterias<sup>16</sup>.

También se han reportado caso de múltiples xilanasas en un mismo organismo; esto puede explicarse por la naturaleza heterogénea del polímero de xilano, que además no tiene todos sus enlaces accesibles para una sola enzima y durante la hidrólisis son variables, por lo que muchos microorganismos utilizan la estrategia de clusters de enzimas con funciones específicas para una hidrólisis eficiente<sup>2</sup>.

El modo de acción y los productos de hidrólisis varían de acuerdo con la fuente de la enzima. Las xilanasas en general se cristalizan fácilmente en sulfato de amonio y fosfato de sodio-potasio en pH de 3.5 a 9 y en otras sales, polímeros y solventes orgánicos; su solubilidad se incrementa con el aumento de temperatura en concentraciones moderadas de sulfato de amonio; la solubilidad en buffer de fosfatos (pH 9) disminuye en temperaturas entre el rango de 0-10°C, pero permanece constante entre temperaturas de 10-37°C<sup>17</sup>.

Las hemicelulasas o xilanasas pueden ser agrupadas de acuerdo a sus propiedades catalíticas, ya sean glucosilhidrolasas (GHs) que hidrolizan enlaces glucosídicos, o bien, Estearasas de carbohidratos (CEs) que hidrolizan enlaces éster. En la tabla 1 se muestran algunas enzimas y su papel en la degradación del xilano.

## CLASIFICACIÓN

La mayoría de las xilanasas conocidas pertenecen a las familias de GH 10 (antes llamada F) y 11 (antes llamada G), aunque también existen en las familias 5, 7, 8, 26 y 43; están agrupadas en estas familias según sus propiedades físico-químicas como peso molecular y punto isoelectrico: Las xilanasas de la familia F/10 son de mayor tamaño, con un peso molecular de aproximadamente 35 KDa y están compuestas por un dominio de unión a celulosa y un sitio catalítico ligados mediante un péptido de unión<sup>20</sup>; muestran menor especificidad hacia el sustrato, y se ha encontrado que también atacan el enlace glucosídico de los  $\beta$ -D- celobiosidos<sup>21</sup>.

Las xilanasas de la familia G/11 son menores, con un peso de solo 20 KDa<sup>17</sup>. Son subdivididas a su vez en dos subgrupos de acuerdo con su punto isoelectrico como alcalinas o ácidas y se considera que debido a su tamaño relativamente pequeño, estas pudieran atravesar los poros en las redes de hemicelulosa permitiendo una hidrólisis más eficiente<sup>22</sup>.

Las endoxilanasas de la familia 10 son capaces de atacar los enlaces glucosídicos cercanos a puntos de ramificación y hacia el extremo no reductor, mientras que los de la familia 11 no lo hacen<sup>23</sup>; además, estas endoxilanasas requieren un espacio de dos residuos de xilopiranosil no sustituidos entre ramificaciones, en tanto que los de la familia 11 requieren tres residuos consecutivos no sustituidos: Según Biely y cols.<sup>21</sup>, las endoxilanasas de la familia 10 tienen propiedades catalíticas que los hacen compatibles con las  $\beta$ -xilosidasas que están agrupadas en las familias 3, 39, 43, 52 y 54 de las glucosil hidrolasas y que hidrolizan xilooligómeros por

Enzima	Modo de acción	Clasificación catalítica
Exo- $\beta$ -(1,4)-xilanasa (EC 3.2.1.156)	Hidroliza enlaces B-1,4-xilosa unida a xilooligosacáridos libera xilobiosa.	GH
Endo- $\beta$ -(1,4)D-xilanasas (E.C. 3.2.1.8)	Hidroliza enlaces B-1.4, haciendo cortes internos al azar en la cadena principal de la molécula, liberando xilooligosacáridos.	GH
$\beta$ -D-xilosidasa (E.C. 3.2.1.37)	Remueve residuos de xilosa de los extremos no reductores de los xilooligosacáridos cortos y xilobiosa, produciendo xilosa.	GH
$\alpha$ -L- arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55)	Remueve las cadenas laterales de arabinosa al hidrolizar el enlace entre arabinofuranosa en el extremo no reductor en los arabinoxilanos.	GH
$\alpha$ -Glucuronidasa (E.C. 3.2.1.139)	Remueve las cadenas laterales de ácido glucurónico al hidrolizar los enlaces $\alpha$ -1,2-glucosídicos con los glucuronoxilanos.	GH
Acetil-xilan estearasa (E.C. 3.1.1.72)	Libera grupos o-acetil al hidrolizar enlaces acetil-éster en acetil-xilanos.	CE
Estearasa de ácido ferúlico (EC 3.1.1.73) Estearasa de ácido p-cumárico	Remueven el ácido ferúlico y p-cumárico de las arabinosas al hidroliza enlaces feruloil-éster y p-Cumaril-éster con xilanos	CE
Endo-B-1,4-mananasa	Libera b-14 mananooligómeros asociados a xilanos	GH
Exo-B-1,4 manosidasa	Hidroliza los B1,4-manooligómeros liberando manosa	GH
Endo-galactanasa	Hidroliza B-1,4-galactano	GH
Acetil-manan-estearasa	Libera 2 o 3-O-acteilxilanos	CE

GH= Glucosilhidrolasas, CE= Carbohidratoestearasas

Tabla 1. Enzimas degradadoras de xilano<sup>4,10,15,18,19</sup>.

mecanismos de retención o por inversión de configuración anomérica (sólo familia 43)<sup>16</sup>.

#### Uso industrial de las xilanasas

Las xilanasas representan una larga proporción de las enzimas hidrolíticas comerciales y se obtienen de fuentes bacterianas y fúngicas; las enzimas de los géneros *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus* y *Thermomonospora* se usan ampliamente así como las de *P. chrysosporium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* y *Penicillium* de origen fúngico, que también han sido estudiados por su producción de hemicelulasas<sup>10</sup>.

En la actualidad, la aplicación de las enzimas xilanolíticas es creciente y de importancia en la industria papelera para tratar sus residuos y el preblanqueado de la pulpa Kraft, ya que se necesitan menos pasos de blanqueado y disminuye el gasto de reactivos químicos; otras aplicaciones incluyen:

- Uso como aditivo en alimento de aves para mejorar la ganancia de peso y mejorar la eficiencia de conversión, porque se mejora la digestibilidad<sup>24</sup>.
- Uso en combinación con amilasas para mejorar el volumen específico en panadería<sup>25</sup>.

- Extracción de almidón, café y aceites vegetales<sup>26</sup>.
- Tratamiento de aguas de desecho<sup>1</sup>.
- Mejoramiento de propiedades nutricionales de ensilados y granos<sup>27</sup>.
- Obtención de proteínas celulares, combustibles y sustancias químicas<sup>1</sup>.
- Aplicación en sistemas donde no se requieren enzimas celulolíticas como en el procesamiento de fibras como linaza y cáñamo<sup>1,28,29,30</sup>.
- Obtención de xilitol y etanol a partir de biomasa lignocelulósica para usarlo como combustibles<sup>7</sup>.
- Clarificación de mostos y jugos de fruta junto con celulasas y pectinasas<sup>1</sup>.

#### CONCLUSIONES

Las enzimas xilanolíticas han cobrado importancia por su alta relevancia en usos industriales y biotecnológicos; aunque ya se han estudiado ampliamente, es necesario continuar en la búsqueda de nuevas fuentes y la optimización de procesos comerciales.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Biely P. Microbial xylanolytic systems. Trends in Biotechnology 1985; 3(11): 286-290.

## VERTIENTES

2. Bastawde KB. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. *World J Microbiol Biotechnol* 1992; 8: 353–68.
3. Joseleau JP, Comtat J, Ruel K. Chemical structure of xylans and their interactions in the plant cell walls. In: Visser J, Beldman G, van Someren MAK, Voragen AGJ (eds). *Xylans and xylanases*. Amsterdam: Elsevier; 1992. p. 1–15.
4. Dornez E, Gebruers K, Delcour JA, Courtin CM. Grain-associated xylanases: occurrence, variability, and implications for cereal processing. *Trends in Food Science & Technology* 2009; 20: 495–510.
5. Whistler RL, Richards EL. Hemicelluloses. In: Pigman W, Horton D, editors. *The carbohydrates*. New York: Academic Press; 1970. p. 447–469.
6. Sunna A, Antranikian G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit Rev Biotechnol* 1997; 17: 39–67.
7. Beg Q K, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal GS. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2001; 56: 326–338.
8. Coughlan, MP, Tuohy MG, Filho E.X., Puls J, Claeysens M, Vranska, M y Houghes M. Enzymological aspects of microbial hemicellulases with emphasis on fungal systems. In: Michael P. Coughlan, MP, Hazlewood GP, editors. *Hemicellulose and hemicellulases*. London: Portland Press; 1993. p. 53–84.
9. Gebler J, Gilkes NR, Claeysens M, Wilson DB, Beguin P, Wakarchuk WW, Kilburn DG, Miller RB, Warren RAJ, Withers SG. Stereoselective hydrolysis catalysed by related B-1,4-glucanases y B-1,4 xylanases. *The J of Biological chemistry* 1992; 267(18): 12559–12561.
10. Marais Susan. Enzymatic hydrolysis with commercial enzymes of a xylan extracted from hardwood pulp. University of Pretoria Tesis de maestría, Departamento de Ingeniería Química, Facultad de ingeniería, ambiente y tecnología de la información, Agosto, 2008.
11. Ball AS, McCarthy AJ. Production and purification of xylanase from actinomycetes. *J Appl Bacteriol* 1989; 66:439–444.
12. Beg QK, Bhushan B, Kapoor M, Hoondal GS .Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from a *Streptomyces* sp. QG-11-3. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2000; 24: 396–402.
13. Knob A, Terrasan C, Carmona E.  $\beta$ -Xylosidases from filamentous fungi: an overview. *World J Microbiol Biotechnol* 2010; 26: 389–407.
14. Mohd Nizam B Zakariya, Tesis de licenciatura, Faculty of chemical and natural resources, University Malaysia Pahang, Abril 2008.
15. Ponce NT, Perez AO. Celulasas y xilanasas en la industria. *Avance y Perspectiva* 2002; 21: 273–277.
16. Veeresh J, Jin CW. Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. *Biotechnology Advances* 2012; 30: 1219–1227.
17. Kregel U, Dijkstra BW. Three-dimensional Structure of Endo-1,4- $\beta$ -xylanase from *Aspergillus niger*: Molecular Basis for its Low pH Optimum. *Journal of Molecular Biology* 1996; 263(1): 70–78.
18. Gilkes N, Henrissat R, Kilburn D G, Miller R C, Warren R A J. Domains in Microbial 3-1,4-Glycanases: Sequence Conservation, Function, and Enzyme Families, *Microbiological Reviews* 1991; 55(2): 303–315.
19. Iubmb: International Union of Biochemistry and Molecular Biology, información en línea accesada Nov 2011 en: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>.
20. Biely P, Vrsanská M, Tenkanen M, Kluepfel D. Endo- $\beta$ -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *J Biotechnol* 1997; 57: 151–66.
21. Biely P, Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases. In: Michael P. Coughlan, MP, Hazlewood GP, editors. *Hemicellulose and hemicellulases*. London: Portland Press; 1993. p. 2–51.
22. Törrönen A, Rouvinen J. Structural and functional properties of low molecular weight endo-1,4- $\beta$ -xylanases. *J Biotechnol* 1997; 57: 137–49.
23. Subramaniyan S, Prema, P. Biotechnology of microbial xylanases: Enzymology, molecular biology and application, *Critical reviews in Biotechnology* 2003; 22(1): 33–64.
24. Bedford MR, Classen HL. The influence of dietary xylanase on intestinal viscosity and molecular weight distribution of carbohydrates in rye-fed broiler chick. In: Visser J, Beldman G, vanSomeren MAK, Voragen AGJ (eds). *Xylans and xylanases*. Amsterdam: Elsevier; 1992. p. 361–370.
25. Maat J, Roza M, Verbakel J, Stam H, daSilva MJS, Egmond MR, Hagemans MLD, vanGarcom RFM, Hessing JGM, vanDerhondel CAMJJ, vanRotterdam C. Xylanases and their application in bakery. In: Michael P. Coughlan, MP, Hazlewood GP, editors. *Hemicellulose and hemicellulases*. London: Portland Press; 1993. p. 349–360.
26. Wong KKY, Saddler JN. *Trichoderma* xylanases, their properties and purification. *Crit Rev Biotechnol* 1992; 12: 413–435.
27. Kuhad RC, Singh A. Lignocellulosic biotechnology: current and future prospects. *Crit Rev Biotechnol* 1993; 13: 151–172.
28. Kapoor M, Beg QK, Bhushan B, Singh K, Dadhich KS, Hoondal GS. Application of an alkaline and thermostable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2 in degumming of ramie (*Boehmeria nivea*) and sunn hemp (*Crotalaria juncea*) bast fibers. *Process Biochem* 2001; 36: 803–807.
29. Puchart V, Katapodis P, Biely P, Kremnický L, Christakopoulos P, Vrsanska M, Kekos D, Marcis BJ, Bhat M.K Production of xylanases, mannanases, and pectinases by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Enzyme Microb Technol* 1999; 24: 355–361.
30. Sharma HSS. Enzymatic degradation of residual non-cellulosic polysaccharides present on dew-retted flax fibers. *Appl Microbiol Biotechnol* 1987; 26: 358–362.