



Proteómica de xilanasas de *Paenibacillus barcinonensis*. Proyecciones biotecnológicas

Susana Valeria Valenzuela Mayorga



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – Compartir Igual 3.0. Espanya de Creative Commons**.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – Compartir Igual 3.0. España de Creative Commons**.

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0. Spain License**.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE BIOLOGIA
DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGIA

PROTEÓMICA DE XILANASAS DE
Paenibacillus barcinonensis.
PROYECCIONES BIOTECNOLÓGICAS

Memoria presentada por **Susana Valeria Valenzuela Mayorga** para optar al grado de Doctora por la Universitat de Barcelona.

Programa de doctorado: Microbiologia Ambiental i Biotecnologia (2008 – 2012)

Tesis realizada bajo la dirección del Dr. Francisco I. Javier Pastor Blasco, en el Departamento de Microbiología de la Universitat de Barcelona.

VºBº del Director de Tesis

Dr. Francisco I. Javier Pastor
Blasco

Memoria presentada por

Susana V. Valenzuela
Mayorga

Barcelona, Septiembre del 2012

*<< Pero nunca cometió el error de detener su desarrollo intelectual
aceptando de manera oficial credo o sistema alguno, ni convirtiendo en
morada permanente una posada que sólo es conveniente para pasar un día,
o unas pocas horas de una noche sin estrellas y en la que la luna está de
parto>>*

Oscar Wilde

A mi familia

A mis amores

En tu memoria

La presente Tesis Doctoral ha sido financiada por el Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación Español, a través de una beca MAEC-AECID concedida por la Agencia Española de Cooperación Internacional, convocatoria 2008-2011.

Agradecimientos

Ahora que comienzo a cerrar todos los cabos sueltos del presente trabajo, y pese a que es mi nombre el que figura como autora, no puedo sino pensar en que toda la investigación que se ha llevado a cabo no hubiese sido posible sin la ayuda inconmensurable de muchas personas que tanto a lo largo de la tesis como en etapas previas han contribuido de alguna u otra manera al desarrollo de ésta.

Llegar desde Santiago de Chile a Barcelona hace 5 años, no significó solamente cambiar de laboratorio, sino cambiar de país, de costumbres, de amigos y parece mentira pero incluso de idioma (y no me refiero al catalán). Vivir esta experiencia me hace sentir una persona muy afortunada en la vida, la he vivido al lado de grandes personas que han hecho que este período sea sobretodo enriquecedor y que considere esta ciudad como mi nueva casa.

Tengo palabras de agradecimientos para muchas personas, y aunque no soy muy buena escribiendo, al menos quisiera plasmar las siguientes:

En primer lugar, quisiera brindar mi más profundo y sincero agradecimiento al Dr. Javier Pastor, no sólo por aceptarme de buena manera en su grupo de trabajo, o por facilitarme siempre su tiempo y medios para la realización de nuestra investigación, o por contagiarme con su buena disposición para realizar las tareas diaria, sino que principalmente por su apoyo incondicional que en todo momento me ha otorgado, la confianza que ha depositado en mí, y su tolerancia absoluta ante la maternidad que disfruto desde los comienzos de la tesis. Desde el día que te conté la noticia, aunque te hayas

cogido la cabeza entre las manos, siempre he tenido todo tu apoyo. Sin ese soporte, la armonía de ambas actividades no hubiese sido posible. Sin duda, eres una gran persona y me siento tremendamente afortunada de haber realizado mi tesis bajo tu dirección.

A la Dra. Pilar Diaz, por su constante buena disposición hacia nosotros, siempre contagiándonos con su espíritu científico. Gracias por tus constantes aportaciones, por tu espíritu moderador dentro y fuera del laboratorio, siempre positiva. Verdaderamente, la salida anual del Lab 2, una de las mejores iniciativas laborales.

...gracias por la bondad, energía y entereza de ambos.

A las Dras. Teresa Vidal, Blanca Roncero y Cristina Valls de la Universidad Politécnica de Catalunya. Una inmensa fuente de poder femenino. Gracias por permitirme realizar la aplicación de mis enzimas en su laboratorio, por compartir conmigo sus conocimientos papeleros, por integrarme tan amablemente dentro de su grupo y por aguantar la explosión del peróxido de hidrógeno!!! Gràcies de tot cor.

To Dr. Peter Biely for providing so helpfully the aldouronics acids, and for his contributions during his visits to the University.

Dra. Julia Sanz Aparicio y a Ángela Sainz por su trabajo de cristalización de Xyn30D y su paciencia en la redacción del manuscrito.

A todos mis compañeros del Lab 2. Ha sido un placer trabajar con uds.

A Silvia y Arnau, con quienes he compartido casi todo estos años, vaya trío. Gracias a los dos, siempre sumando. Mis respetos a ambos como grandes

*científicos que son, estábamos listos para la empresa... solo nos faltó la idea·
Gracias por ser mis amigos y cómplices, aunque cada uno tome su rumbo
lejos de aquí, los recuerdos de estos años siempre estarán conmigo· A mis
chiquillas, Mónica, Amandita, Belén y Lily (y Silvieta... te repito aquí
también), gracias por las risas, llantos, cotilleos, chistes, recetas, parloteos...
momentos únicos que solo un laboratorio lleno de estrógenos puede tener!!
Mujeres al poder!!! Son únicas, y no puedo agradecer tantas cosas como las
que debo, pero al menos decirles que las quiero a todas! A los veteranos del
Lab 2, Óscar, Cristina, Noelia, Iulia, Pere, Eriel y Erich, gracias por
recibirme e integrarme· A la versión itinerante del Lab 2, María, TCris,
Mai, Marta, André, Mayra, Paola... ha sido un gusto conocerlos y compartir
días y días de trajín· A todos... No sé cómo me aguantaron, pero lo
lograron!!!*

*A todos los chicos del departamento de microbiología, de fase I y de fase II,
por intentar que la familia microbióloga esté siempre en sintonía· El trabajo
ha sido fructífero, pero las salidas, cenas y birras no se quedan atrás·*

*A los papeleros Facundo, Elisabetta, Elisabet, Oriol, Clemente y Adrián·
Gracias por su buena disposición para ayudarme siempre, y por compartir
conmigo tan agradables jornadas laborales· Por supuesto, gracias por
develarme secretos y truquillos papeleros, y Facundo, gracias por enseñarme
a fabricar un hoja papel!!!*

*A todos los miembros de la secretaría de microbiología y en especial, a
Susana y Macu· Les agradezco la paciencia, el soporte y la ayuda logística·
También se agradece la sonrisa con que siempre nos reciben y la cordialidad
que nos brindan·*

A Teresa María a quien tuvo la gentileza de recibirme una vez al mes durante cuatro años, siempre amable y con buena disposición para resolver los asuntos burocráticos de mi beca.

A la red de capital humano avanzado planteado, por transitar juntos y revueltos en el camino de la investigación y en las sendas paralelas. En particular, agradezco a la división internacional, con quienes compartimos las penas y alegrías de la emigración e inmigración, gracias por venir a mi boda. Ya saben, pero a todos los quiero.

A mis amigas del alma, quienes son un soporte espiritual incondicional.

A los Dres. Nicolas Guiliani, Francisco Chávez y Mario Vera. Les doy mis más sinceros agradecimientos por realizar mi formación inicial de investigadora. Espero que el camino de la ciencia sea un no parar de crecimiento como científico, y recuerdo con mucho cariño mis primeros pasos a cargo de uds. quienes fueron grandes responsables de que hoy día haya podido terminar esta tesis doctoral. Gracias por su tiempo y paciencia dedicados.

A Arturo, no hay palabras que puedan expresar lo que siento. Te doy las gracias por mostrarme siempre un nuevo color del prisma. Con sólo verte en la mañana, puedo saber que todo irá bien. Te admiro como científico, y te agradezco todas tu aportaciones, eres muy grande!! y te amo sobre todo. Gracias también por entregarme un motor en la vida. Gabriel, gracias por demostrarme que el corazón puede salir de mi cuerpo y adquirir vida propia. Lo eres todo.

A mi familia, por su amor incondicional y por darme todo todito todo. A mis padres Susana y Patricio por su esfuerzo y dedicación hacia nosotros. A mis hermanos, por su amor y comprensión. A mis abuelos por su cariño y enseñanzas. A mis tíos por querernos como a sus hijos. A mis primos por considerar la familia el pilar fundamental de nuestras vidas, a mi prima favorita por ser mi única hermana, a mis sobrinos, por ser tan lindos y buenos. Y por supuesto a mi nueva familia Rodríguez Banqueri, por abrirme su hogar y acogerme. Gracias por estar siempre presente y hacer posible la conciliación trabajo-familia. Gracias Emi.

ÍNDICE

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 1 | <u>INTRODUCCIÓN</u> | 5 |
| 1.1 | PARED CELULAR | 7 |
| 1.1.1 | CELULOSA | 8 |
| 1.1.2 | PECTINA | 9 |
| 1.1.3 | LIGNINA | 10 |
| 1.1.4 | HEMICELULOSAS | 12 |
| 1.2 | XILANO | 13 |
| 1.3 | XILANASAS | 15 |
| 1.4 | CLASIFICACIÓN DE XILANASAS | 16 |
| 1.5 | MECANISMO CATALÍTICO DE LAS XILANASAS | 17 |
| 1.6 | XILANASAS GH10 | 19 |
| 1.7 | XILANASAS GH11 | 23 |
| 1.8 | XILANASAS GH8 | 25 |
| 1.9 | XILANASAS GH30 | 26 |
| 1.10 | MÓDULOS DE UNIÓN A CARBOHIDRATOS | 27 |
| 1.11 | APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LAS XILANASAS | 29 |
| 1.11.1 | INDUSTRIA ALIMENTARIA | 29 |
| 1.11.2 | INDUSTRIA AGRÍCOLA | 29 |
| 1.11.3 | BIOCOMBUSTIBLES | 30 |
| 1.11.4 | INDUSTRIA PAPELERA | 30 |
| 1.12 | <i>PAENIBACILLUS BARCINONENSIS</i> | 32 |
| 2 | <u>OBJETIVOS</u> | 35 |
| 2.1 | OBJETIVO GENERAL E INTERÉS DEL PROYECTO REALIZADO | 37 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 38 |
| 2.2.1 | IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS XILANASAS | 38 |
| 2.2.2 | CLONACIÓN DE XILANASAS EN CEPAS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> | 38 |
| 2.2.3 | CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS XILANASAS IDENTIFICADAS | 39 |
| 2.2.4 | ESTUDIO ESTRUCTURAL DE LA XILANASA XYN30D | 39 |
| 2.2.5 | EVALUACIÓN EN EL BLANQUEO DE LA PASTA DE PAPEL | 40 |
| 3 | <u>PUBLICACIONES DERIVADAS DEL PRESENTE TRABAJO</u> | 41 |
| 3.1 | RECOMBINANT EXPRESSION OF AN ALKALI STABLE GH10 XYLANASE FROM <i>PAENIBACILLUS BARCINONENSIS</i> | 45 |
| 3.2 | MODULAR GLUCURONOXYLAN-SPECIFIC XYLANASE WITH A FAMILY CBM35 CARBOHYDRATE-BINDING MODULE | 53 |
| 3.3 | CHARACTERIZATION OF A CHAPERONE DEPENDENT XYLANASE FROM <i>PAENIBACILLUS BARCINONENSIS</i> WITH POTENTIAL APPLICATIONS IN UPGRADING PAPER PULPS | 69 |
| 3.4 | EFFECTIVENESS OF NEW XYLANASES FROM DIFFERENT GH FAMILIES ON LIGNIN AND HEXENURONIC ACIDS REMOVAL OF SPECIALTY SISAL FIBRES | 87 |
| 3.5 | PRELIMINARY CRYSTALLOGRAPHIC ANALYSIS OF XYN30D FROM <i>PAENIBACILLUS BARCINONENSIS</i> | 103 |
| 4 | <u>DISCUSIÓN GLOBAL</u> | 115 |
| 4.1 | IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS XILANASAS DE <i>PAENIBACILLUS BARCINONENSIS</i> | 117 |
| 4.1.1 | XYN10A | 118 |
| 4.1.2 | XYN30D | 118 |
| 4.1.3 | XYN11E | 119 |
| 4.2 | EXPRESIÓN HETERÓLOGA EN <i>ESCHERICHIA COLI</i> DE LAS XILANASAS IDENTIFICADAS | 120 |
| 4.2.1 | XYN10A | 120 |

| | | |
|-----------------|--|-------------------|
| 4.2.2 | XYN30D | 121 |
| 4.2.3 | XYN11E | 123 |
| 4.3 | PURIFICACIÓN DE LAS XILANASAS RECOMBINANTES | 124 |
| 4.4 | CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE LAS XILANASAS RECOMBINANTES | 126 |
| 4.5 | PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS DE XILANOS GENERADOS POR LAS XILANASAS CARACTERIZADAS | 129 |
| 4.6 | ANÁLISIS DEL MODULO DE UNIÓN A CARBOHIDRATOS XYN-CBM35 | 131 |
| 4.7 | APLICACIÓN DE LAS XILANASAS RECOMBINANTES SOBRE PASTAS DE PAPEL | 133 |
| <u>5</u> | <u>CONCLUSIONES</u> | <u>139</u> |
| <u>6</u> | <u>BIBLIOGRAFÍA</u> | <u>143</u> |
| <u>7</u> | <u>ABREVIATURAS</u> | <u>153</u> |
| <u>8</u> | <u>INFORMES</u> | <u>159</u> |

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

La presente tesis se ha centrado en la identificación y caracterización de xilanasas de *Paenibacillus barcinonensis* con aplicaciones industriales. Las xilanasas son enzimas que catalizan la hidrólisis del xilano, uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza que se ubica en la pared celular de las células vegetales. Actualmente, las xilanasas han adquirido un gran interés comercial en procedimientos que requieran degradar la pared vegetal ya que presentan, frente a los catalizadores químicos, las ventajas de ser biocatalizadores altamente selectivos y no contaminantes, características que las convierten en herramientas útiles para el desarrollo de tecnologías limpias. El trabajo de investigación realizado se enmarca dentro de otro proyecto de mayor envergadura enfocado a la búsqueda, identificación y caracterización de nuevas enzimas capaces de mejorar las propiedades de las fibras papeleras y obtener productos de valor añadido a partir de materiales lignocelulósicos.

1.1 Pared celular

La pared celular es el exoesqueleto de las células vegetales, que les confiere forma y consistencia, y media la interacción celular con el entorno. Comparte una estructura común, donde se distinguen fundamentalmente tres partes: La pared primaria, la cual acompaña el crecimiento de la célula y presenta una resistencia mecánica baja; la pared secundaria, cuya formación ocurre una vez completado el crecimiento celular y tiene especial importancia para la solidez e impermeabilidad de la célula; y la lámina media, la parte más externa, que corresponde al primer depósito secretado por la célula y se puede descomponer con facilidad para dar lugar a células individuales. La pared celular está compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosas, sustancias pécticas y glicoproteínas, y en ocasiones se encuentra reforzada por polímeros aromáticos como la lignina. Estos polímeros están entremezclados y unidos químicamente entre sí mediante enlaces covalentes y no covalentes, formando una estructura denominada lignocelulosa (Jordan et al., 2012). La proporción de cada uno de estos componentes varía según el tipo celular y la especie vegetal, donde la celulosa representa entre el 35

y 50% del peso seco de los residuos vegetales, mientras que la lignina y la hemicelulosa representan del 20 al 35% y del 5 al 30% respectivamente.

1.1.1 Celulosa

Dentro de la pared celular vegetal, la celulosa es el componente mayoritario y constituye el biopolímero más abundante de la naturaleza. Cumple un rol estructural en las plantas debido a que forma parte de los tejidos de sostén. La pared de una célula vegetal joven contiene aproximadamente un 40% de celulosa; la madera un 50%, mientras que el ejemplo más puro de celulosa es el algodón con un porcentaje mayor al 90%.

La celulosa está compuesta por moléculas de glucosa enlazadas por enlaces glucosídicos β -(1,4) donde las unidades contiguas de glucosa han girado 180° unas respecto a otras a lo largo del eje molecular y en torno a él (Fig. 1). Su grado de polimerización (DP) varía entre 100 y 20.000 unidades de β -glucosa, que forman cadenas largas, rectas y sin ramificar. Estas cadenas están unidas en paralelo entre sí mediante puentes de hidrógeno dando lugar a una estructura fibrilar rígida, insoluble y cristalina denominada microfibrilla (Gilkes et al., 1991). La biomasa celulósica se produce principalmente mediante fotosíntesis por algas y plantas superiores, aunque existen varios ejemplos de organismos no fotosintéticos productores de celulosa, tales como varias especies bacterianas, algunos invertebrados marinos, hongos, gusanos de seda, amebas y tunicados (Tomme et al., 1995).

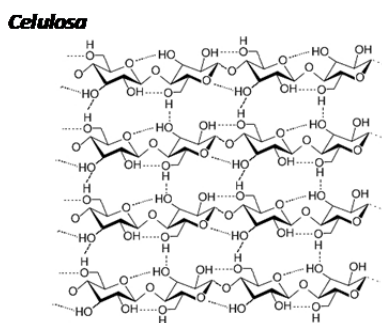


Figura 1. Esquema de una cadena de celulosa.

1.1.2 Pectina

La pectina es un heteropolisacárido estructural contenido en la pared primaria y en la lámina media de las células vegetales. Este polímero es probablemente, uno de los polisacáridos más complejos y cumple diversas funciones dentro de la célula vegetal. Las pectinas forman geles hidratantes que permiten el deslizamiento de las microfibrillas de celulosa durante el crecimiento celular, al mismo tiempo que las mantienen en su posición cuando éste cesa. Determinan el grosor y la porosidad de la pared primaria y mantienen las células unidas formando una capa adhesiva entre ellas, la lámina media. Al mismo tiempo, las pectinas son los principales blancos de ataque de los microorganismos invasores y sus productos de degradación funcionan como inductores de la respuesta de defensa en las plantas (Cosgrove, 2005).

Las pectinas pueden variar en su composición química, en su abundancia y en su estructura entre las diferentes especies vegetales, dentro de una misma planta a lo largo del tiempo o en las diversas partes de la misma. Representan hasta un 40% de los polisacáridos no celulósicos en la pared primaria de plantas dicotiledóneas y se componen de largas cadenas de moléculas de ácido galacturónico unidas mediante enlaces α -(1,4), usualmente esterificadas con grupos metilos y/o acetilos, y conteniendo un porcentaje variable de otros azúcares. Entre las pectinas se encuentran el galacturonano, el ramnogalacturonano I, el ramnogalacturonano II, el galactano, el arabinogalactano y el arabinano (Tabla 1) (de Vries and Visser, 2001).

Tabla 1. Pectinas.

| | |
|-----------------------|---|
| Galacturonano | Cadenas de ácido galacturónico α -(1,4), metiladas en diferente proporción en el C6 de los grupos carboxilos. |
| Ramnogalacturonano I | Cadenas de galacturonano interrumpidas por residuos ocasionales de L-ramnosa unidos mediante enlaces α -(1,2) a los residuos de ácido galacturónico adyacentes. Al O4 de estos residuos de ramnosa pueden unirse largas cadenas de arabinano o galactano. También pueden encontrarse grupos acetilos unidos al O2 o al O3 de los residuos de ácido galacturónico de la cadena principal. |
| Ramnogalacturonano II | Cadenas cortas de galacturonano (mínimo de 8 residuos) que presentan 4 cadenas laterales diferentes, que contienen azúcares poco comunes como la 2-O-metil-L-fucosa, el ácido 3-deoxi-D-mano-2-octulosónico, el ácido acérico o la D-apiosa. Puede formar dímeros mediante puentes borato entre dos enlaces éster. |
| Galactano | Cadenas de D-galactosa β -(1,4) que pueden presentar residuos de ácido ferúlico unidos al O6 de algunas galactosas. |
| Arabinogalactano | Como el galactano pero con cadenas laterales de L-arabinosa unidas al C3 de residuos de galactosa de la cadena principal. |
| Arabinano | Cadenas de L-arabinosa α -(1,5) que pueden presentar residuos laterales de L-arabinosa unidas mediante enlaces α -(1,3) a la cadena principal, y/o residuos de ácido ferúlico unidos al O2 de la arabinosa terminal. |

1.1.3 Lignina

La lignina es un heteropolímero aromático de elevado peso molecular, amorfo, insoluble en agua y ópticamente inactivo, que está unido covalentemente a la celulosa y hemicelulosa. Es un elemento abundante en la pared secundaria de la célula vegetal y representa el componente no polisacárido más abundante de la naturaleza. Confiere soporte estructural, impermeabilidad y resistencia al ataque microbiano y al estrés oxidativo.

Se origina por la polimerización de los alcoholes coniferílico, sinapílico y *p*-cumarílico, donde estas unidades básicas están unidas principalmente por enlaces C-C y aril-éter. El alcohol coniferílico es el componente principal de las maderas blandas mientras el cumarílico y el sinapílico predominan en las maderas duras (Pérez et al., 2002). Los polímeros de lignina son estructuras complejas interconectadas con un peso molecular superior a 10.000 Da (Fig. 2). Su DP es difícil de determinar, ya que suele romperse durante el proceso de extracción.

El grado de lignificación presente en los vegetales aumenta con el curso de la maduración, por lo que la célula vegetal se vuelve cada vez más resistente a la degradación bacteriana, especialmente las células leñosas, lo cual afecta su digestibilidad.

Lignina

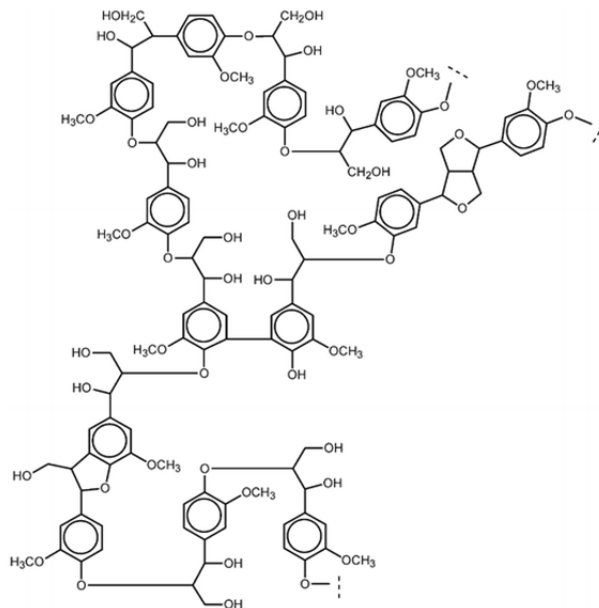


Figura 2. Estructura típica de la lignina (Pérez et al., 2002).

1.1.4 Hemicelulosas

Las hemicelulosas forman un conjunto de diversos heteropolímeros en la célula vegetal que, junto a la celulosa, están presentes en casi todas las plantas. Se encuentran unidas a la superficie de las fibrillas de celulosa y forman una matriz entre ellas, con lo cual juegan un doble rol al evitar la agregación de las mismas y añadir flexibilidad a la pared celular vegetal. Las hemicelulosas constituyen aproximadamente el 30% de la biomasa de las plantas dicotiledóneas y hasta el 50% de algunas monocotiledóneas.

La composición de las hemicelulosas varía entre especies y tejidos. Sus componentes pueden ser clasificados en cuatro grupos principales descritos en la Tabla 2. El grado de polimerización de las hemicelulosas es más corto que el de la celulosa (DP 200 o menos) y su heterogeneidad comporta beneficios físicos estructurales como la resistencia a la degradación de las células (Scheller and Ulvskov, 2010).

Tabla 2. Componentes principales de la hemicelulosa.

| | |
|----------------------------|--|
| Mananos | Compuestos principalmente por cadenas de manosa que pueden contener otros monosacáridos. Según su composición pueden clasificarse en mananos lineales, galactomananos, glucomananos y galactoglucomananos. En plantas presentan un rol estructural y también son utilizados como fuente de reserva de carbohidratos sin almidón. |
| Glucanos de enlaces mixtos | Compuestos por cadenas de residuos de D-glucosa unidos por enlaces β -(1,3) y β -(1,4). Juegan un papel principal durante el crecimiento celular. Su cantidad en la célula es dependiente de la fase de crecimiento. |
| Xiloglucanos | Presentan un esqueleto lineal de β -(1,4)-glucanos con ramificaciones que contienen xilasas y otros monosacáridos. Están presentes en la mayoría de las células vegetales como polisacáridos de almacenamiento. |
| Xilanos | Compuestos fundamentalmente de moléculas de xilosa unidas por enlaces β -(1,4). |

1.2 Xilano

Es el principal componente de la hemicelulosa y constituye el segundo polímero más abundante en la tierra después de la celulosa. Representa aproximadamente un tercio de todo el carbono orgánico renovable del planeta (Collins et al., 2005). Este polisacárido se compone de cadenas de monómeros de xilopiranosas unidas por enlaces β -(1,4), que pueden presentar diversos tipos de ramificaciones en posición 2' o 3' de los residuos de xilosa. La naturaleza de las ramificaciones, el grado de polimerización o el grado de sustitución (DS) varía ampliamente entre las especies de plantas o incluso entre el tipo celular (Joseleau et al., 1992). Los sustituyentes que frecuentemente se encuentran en el xilano incluyen: arabinosa, ácidos glucurónico, metil glucurónico, acético, ferúlico, *p*-cumárico, galactosa y en menor medida ramnosa (Fig. 3) (Coughlan and Hazlewood, 1993).

En el caso de la madera, el xilano se ubica principalmente en la pared celular secundaria junto con la lignina, formando una matriz amorfa que embebe las microfibrillas de celulosa. Las maderas se clasifican en duras y blandas, según el árbol del que se obtienen (angiospermas o gimnospermas). La madera dura, es aquella que procede de árboles de crecimiento lento, por lo que es más densa y soporta mejor las inclemencias del tiempo, en tanto que la madera blanda procede de las coníferas y presenta mayor ligereza y menor coste.

El xilano de maderas duras contiene un alto porcentaje de ácido 4-*O*-metil-D-glucurónico (MeGlcA), por lo que comúnmente se denomina glucuronoxilano (MeGAX), y está acetilado. Los residuos de MeGlcA se encuentran unidos mediante enlaces α -(1,2) al esqueleto de xilasas mientras que los grupos acetilo están unidos mediante enlaces éster a las posiciones C(O)-2 o C(O)-3 de la xilosa. Los MeGAX presentan un DP promedio de 150-200.

En cuanto a las maderas blandas y cereales, el xilano también contiene residuos de MeGlcA, pero la ramificación predominante en este caso corresponde a la arabinosa, motivo por el que se denomina arabinoxilano (AX). Raramente se encuentra acetilado.

Los residuos de la arabinosa están unidos a la xilosa por enlaces α -(1,3). Los AX presentan un DP promedio de 70-130.

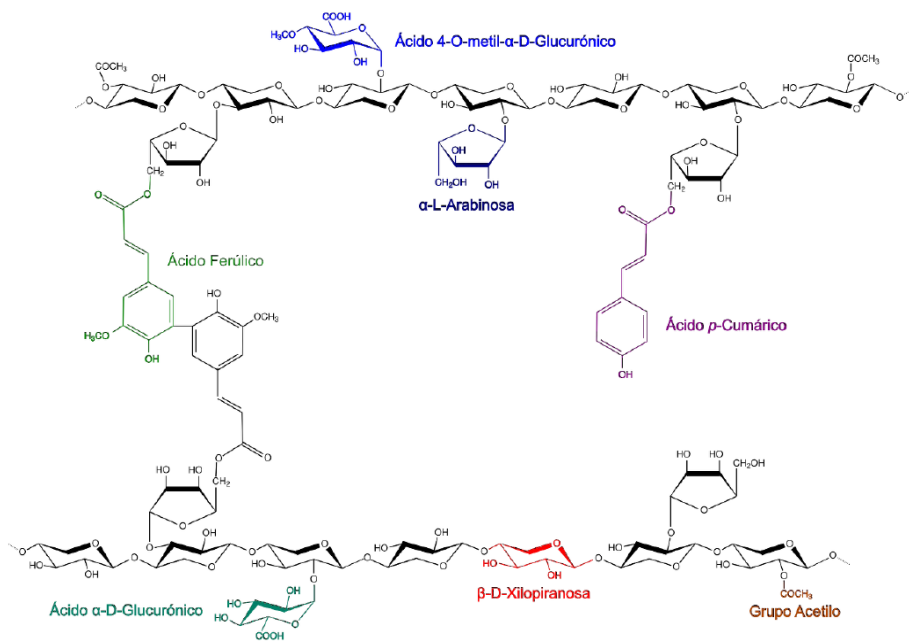


Figura 3. Esquema de la estructura del xilano (Gallardo, 2007).

El xilano tiene un elevado potencial industrial, debido a la utilidad de los productos que genera su hidrólisis o conversión (Paës et al., 2012). Sin embargo, por su complejidad y estructura heterogénea, su degradación requiere la cooperación de varias enzimas hidrolíticas que puedan actuar tanto en la cadena principal como en sus ramificaciones laterales (Fig. 4). Por consiguiente, el sistema enzimático degradador suele contener enzimas que actúan sobre la cadena principal, como xilanasas (EC 3.2.1.8) y xilosidasas (EC 3.2.1.37), y también enzimas desramificantes, como son las α -L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55), α -D-glucuronidasas (EC 3.2.1.139) y diferentes tipos de esterasas: acetil xilano esterasas (EC 3.1.1.72), feruloil esterasas (EC 3.1.1.73) y glucuronil esterasas (Biely, 1985; Biely et al., 1986). Las xilanasas catalizan la hidrólisis del esqueleto principal del xilano para producir oligosacáridos, que a su vez pueden ser

convertidos a xilosa por las β -xilosidasas (Sørensen et al., 2007). Las xilanasas en conjunto con las celulasas y pectinasas acumulan el 20% del mercado mundial de enzimas (Polizeli et al., 2005).

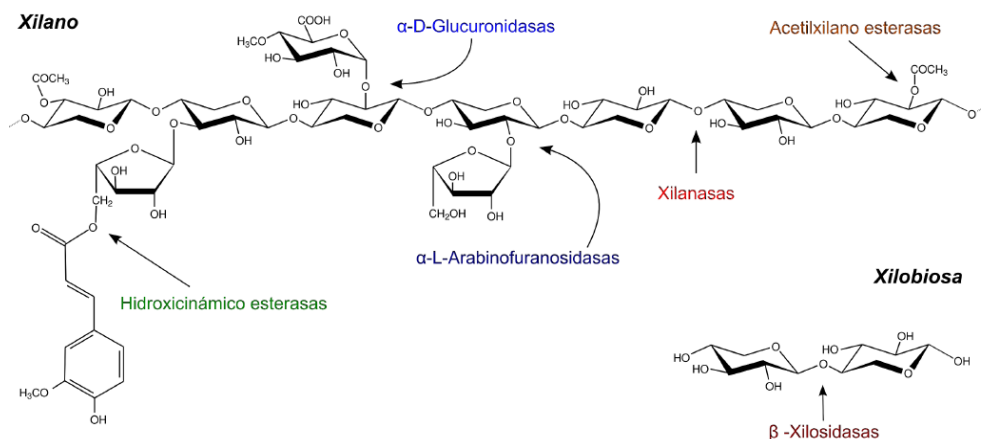


Figura 4. Diagrama de la acción coordinada de hemicelulasas sobre el esqueleto de xilano (Gallardo, 2007).

1.3 Xilanasas

Las xilanasas o endo- β -(1,4)-D-xilanasas (EC 3.2.1.8) son glicosil hidrolasas que catalizan la hidrólisis del enlace glucosídico interno β -(1,4) de la cadena de xilosas del xilano, generando xilooligosacáridos (XOS) de bajo peso molecular con o sin ramificaciones (Reilly, 1981; Biely et al., 1997). Son las enzimas claves en la degradación del xilano.

Estas enzimas son producidas por una amplia variedad de organismos procariontas y eucariontas, como bacterias, hongos, algas, protozoos, crustáceos, caracoles, insectos y semillas de plantas terrestres (Sunna and Antranikian, 1997). La hidrólisis del xilano mediante la acción de microorganismos fue descrita por primera vez a principios del siglo XIX. Sin embargo, la primera purificación parcial de xilanasas se realizó a partir de un cultivo de *Aspergillus foetidus* y data de menos de sesenta años (Whistler and

Masak, 1955). Desde entonces, un gran número de xilanasas diferentes ha sido identificado y caracterizado.

Las xilanasas difieren en su especificidad por los diferentes tipos de xilano que pueden degradar. Pueden mostrar preferencias por el grado de polimerización, el grado de sustitución o el patrón de sustitución del xilano. Asimismo, estas enzimas presentan diferente estructura tridimensional, mecanismo catalítico y propiedades fisicoquímicas (Collins et al., 2005).

En los microbios xilanolíticos hay una gran multiplicidad de xilanasas. Un único microorganismo puede presentar varios genes distintos codificantes para xilanasas, y cada uno de ellos puede dar lugar a diferentes xilanasas en función de su procesamiento post-transcripcional y post-traducciona (Wong et al., 1988).

Dado que el xilano es un polímero de gran tamaño, que no puede ingresar a la célula, la mayoría de las xilanasas son enzimas extracelulares, secretadas normalmente mediante el sistema de secreción de tipo II, es decir, son "sec dependientes" (Tjalsma et al., 2004). Recientemente se han descrito xilanasas localizadas en el interior de las células tales como la xilanasas Xyn10B de *P. barcinonensis* o la xilanasas del mismo nombre de *P. curdlanolyticus* (Gallardo et al., 2003; Sudo et al., 2010), cuya función fisiológica hipotética consiste en degradar las pequeñas moléculas de XOS, procedentes de la hidrólisis extracelular del xilano, que son transportadas al interior de la célula para su metabolización.

1.4 Clasificación de xilanasas

La mayoría de las glicosil hidrolasas, incluyendo muchas xilanasas, presentan una estructura molecular compleja, que comprende módulos discretos funcionalmente independientes, unidos entre sí por secuencias aminoácidas no estructuradas llamadas secuencias *linker* (Collins et al., 2005). La estructura típica está compuesta por un módulo catalítico unido a módulos accesorios adicionales tales como los dominios

de unión a fibronectina tipo III (Fn3), los módulos SLH (*surface-layer homologous*) y los módulos de unión a carbohidratos (CBMs).

En base a la similitud de la secuencia de aminoácidos del módulo o dominio catalítico, las glicosil hidrolasas han sido clasificadas en diferentes familias (Henrissat, 1991). La clasificación nos da información de las propiedades estructurales, las relaciones evolutivas y del mecanismo catalítico de la enzima. La mayoría de las xilanasas se clasifican como glicosil hidrolasas de las familias GH10 y GH11 (Gilkes et al., 1991; Henrissat and Bairoch, 1996), aunque unos pocos ejemplos de xilanasas recientemente caracterizadas se han asignado a las familias GH30, GH8 y GH5 [*Carbohydrate-Active Enzymes (CAZy) database*] (Cantarel et al., 2009). Existen también enzimas bifuncionales o multidominios con actividad xilanasas en las familias GH7, GH16, GH43 y GH62 (Cantarel et al., 2009).

El dominio catalítico de las xilanasas presenta una hendidura abierta en la que se aloja el sitio catalítico o centro activo de la enzima, donde se une el sustrato para ser hidrolizado. Contiene aminoácidos, en su mayoría residuos aromáticos, que recubren la pared interna de la hendidura y forman los subsitios de unión al sustrato. Un subsitio es una región capaz de acomodar una unidad monomérica del sustrato tal como la xilosa o la arabinosa. Los aminoácidos que componen el subsitio, interactúan con el sustrato mediante puentes de hidrógeno o uniones hidrofóbicas y son fundamentales en el reconocimiento del mismo. Los subsitios se denominan desde $-n$ a $+n$, con número negativo para los subsitios situados hacia la región glicón (extremo no reductor) del sustrato y número positivo para los subsitios situados hacia la región aglicón del sustrato (extremo reductor). El corte del enlace glicosídico ocurre entre los subsitios -1 y $+1$ del sitio catalítico (Biely et al., 1981).

1.5 Mecanismo catalítico de las xilanasas

Los miembros que pertenecen a la misma familia de glicosil hidrolasas comparten un mecanismo catalítico común. En la mayoría de los casos, las glicosil hidrolasas realizan la hidrólisis del enlace glicosídico mediante la interacción de dos aminoácidos

carboxílicos, habitualmente dos residuos de ácido glutámico (Glu) del sitio activo. Uno de ellos actúa como catalizador ácido/base y el otro como residuo nucleófilo. Dependiendo de la posición espacial de los residuos catalíticos, la hidrólisis ocurre a través de la retención o inversión de la configuración del centro anomérico sometido a la catálisis (Davies and Henrissat, 1995).

Las xilanasas de las familias GH10, GH11, GH30 y GH5 son enzimas de retención, que operan mediante el mecanismo de doble desplazamiento (Fig. 5A). En una primera fase (glicosilación), el residuo catalítico ácido/base funciona como un catalizador ácido general, que protona el oxígeno del enlace glicosídico; mientras que el segundo residuo catalítico, realiza un ataque nucleófilo sobre el carbono anomérico del enlace, provocando la liberación de uno de los productos de reacción y la formación de un intermediario α -glicosilo-enzima. En el segundo paso (desglicosilación), el residuo ácido/base actúa como base general disociando un protón de una molécula de agua entrante. La molécula de agua activada ataca el carbono anomérico del intermediario α -glicosilo-enzima, produciendo su hidrólisis. Como resultado se obtiene la liberación de la enzima y un producto de reacción en el que el carbono anomérico vuelve a la configuración β , al igual que la del sustrato (Davies and Henrissat, 1995).

Por el contrario, las xilanasas de familia GH8 utilizan el mecanismo de inversión mediante una reacción de simple desplazamiento (Fig. 5B), en las que se obtiene un producto de configuración anomérica invertida respecto al sustrato. En este caso, los residuos aminoacídicos catalíticos suelen ser un glutamato (Glu) y un aspartato (Asp), donde el primero actúa como catalizador ácido, protonando el oxígeno del enlace glicosídico, y el segundo como catalizador básico, produciendo la activación de una molécula de agua que ataca el carbono anomérico. En este caso, la hidrólisis del enlace β -glicosídico origina un producto de configuración α en el carbono anomérico (Pollet et al., 2010).

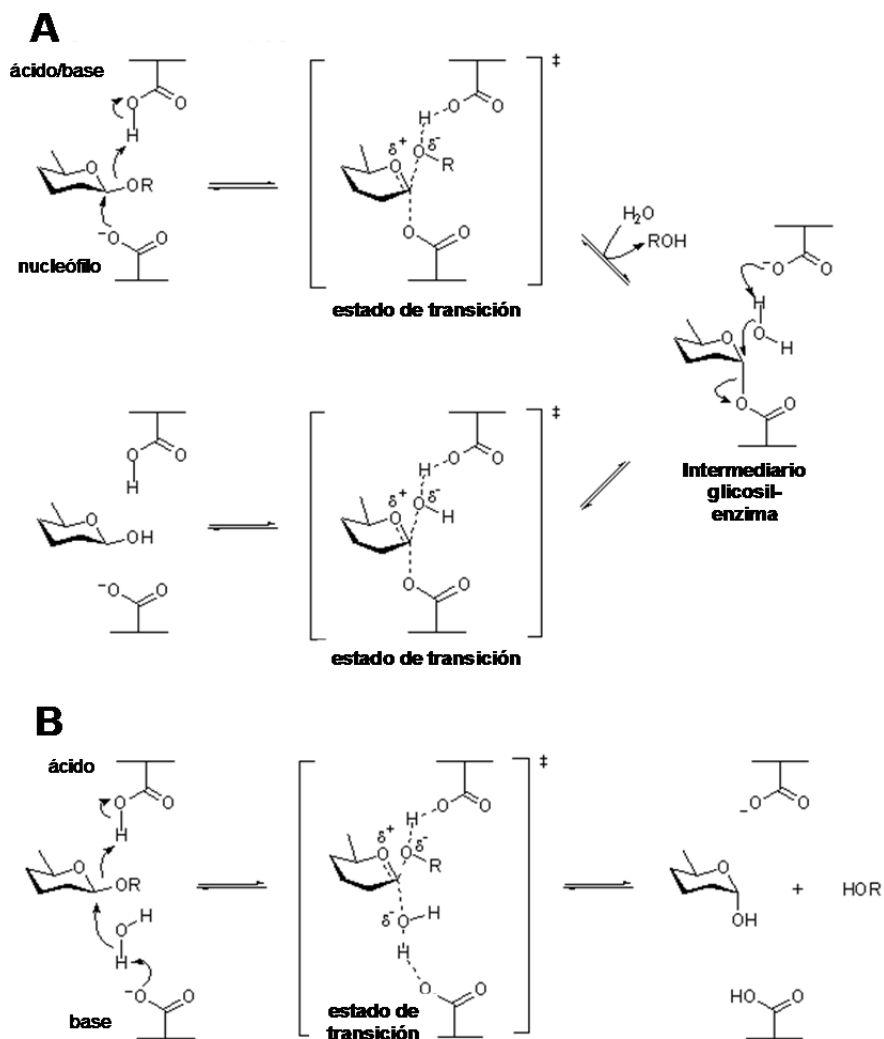


Figura 5. Mecanismo general de β -glicosidasas de retención (A) y de inversión (B).

1.6 Xilanasas GH10

Las xilanasas de familia GH10, son en su mayoría endo- β -(1,4)-xilanasas (EC 3.2.1.8), salvo pocas excepciones, que son endo- β -(1,3)-xilanasas (EC 3.2.1.32).

Las endo- β -(1,4)-xilanasas de familia GH10 se caracterizan por presentar un amplio rango de sustrato, ya que no sólo son activas sobre el xilano lineal, sino que son capaces de acomodar diferentes tipos de ramificaciones laterales presentes en los heteroxilanos.

Las enzimas de la familia GH10 son miembros del clan GH-A al igual que las de la familia GH30. El clan, también llamado superfamilia, que corresponde a un nivel jerárquico de clasificación superior a la familia, agrupa a aquellas familias de enzimas que comparten una estructura terciaria similar y que además conservan los aminoácidos catalíticos, así como el mecanismo enzimático. Su módulo catalítico presenta un plegamiento en barril $(\beta/\alpha)_8$, también llamado *TIM-barrel*, por el parecido en su forma a un barril, altamente conservado entre las diferentes enzimas (Fig. 6A).

El sitio activo se encuentra en una hendidura poco profunda de la superficie enzimática en el extremo carboxilo terminal de las hojas β del barril $(\beta/\alpha)_8$. Los dos glutamatos catalíticos involucrados en la hidrólisis se ubican en las hojas β_4 y β_7 . Estas enzimas contienen habitualmente 5 o 6 subsitios de unión a sustrato, siendo los subsitios -2, -1, y +1 los más conservados. La capacidad de los subsitios de acomodar el sustrato también está conservada en las xilanasas de familia GH10, siendo las ramificaciones de MeGlcA normalmente acomodadas en los subsitios +1 y/o en el -3, mientras que el AX acomoda las ramificaciones de arabinosa principalmente en los subsitios +1 y -2 (Pollet et al., 2010).

El análisis de los productos de hidrólisis tanto del MeGAX como de los AX ha demostrado que estas xilanasas pueden atacar la cadena principal hacia el extremo reductor de una sustitución simple o doble de la xilosa y requieren de dos xilosas no sustituidas. Debido a estas características, las xilanasas GH10 suelen liberar pequeños oligosacáridos incluso a partir de xilanos con elevado DS (Kolenová et al., 2006).

Presentan actividad sobre oligosacáridos sin sustitución, siendo normalmente la xilotriosa el oligosacárido más pequeño hidrolizado por esta familia de xilanasas. En la

hidrólisis de MeGAX, el principal oligosacárido sustituido liberado, consiste en una molécula de xilotriosa unida a un MeGlcA en el extremo no reductor, denominado ácido aldotetraurónico ($\text{MeGlcA}^3\text{Xyl}_3$). En el caso del AX, el principal oligosacárido sustituido liberado corresponde a una molécula de xilobiosa unida a una arabinosa en el extremo no reductor. En comparación con las xilanasas de familia GH11, las xilanasas de familia GH10 producen productos de hidrólisis de menor tamaño a partir de los heteroxilanos MeGAX y AX (Fig. 7) (Biely et al., 1997; Charnock et al., 1998; Kolenová et al., 2006). Hasta la fecha, todas las xilanasas provenientes de plantas se han clasificado dentro de esta familia.

No obstante el estudio de la especificidad del sustrato de las enzimas GH10 es limitado, además de las actividades comentadas se han descrito casos de actividad sobre arilcelobiósidos, aunque no sobre la celulosa. También pueden hidrolizar xilanos que contengan enlaces β -(1,4) ubicados a continuación de enlaces β -(1,3) o enlaces β -(1,3) flanqueados en ambos extremos por enlaces β -(1,4). Finalmente también se ha descrito un caso en que pueden tolerar la sustitución de uno o dos residuos de xilosa consecutivos por residuos de glucosa en el sustrato a hidrolizar (Biely et al., 1997).

La primera estructura publicada de un dominio catalítico de xilanasas GH10 fue la de la xilanasas A de *Streptomyces lividans* (Derewenda et al., 1994). En la actualidad existen cerca de un centenar de estructuras conocidas que han ayudado a comprender el mecanismo de acción de este tipo de enzimas.

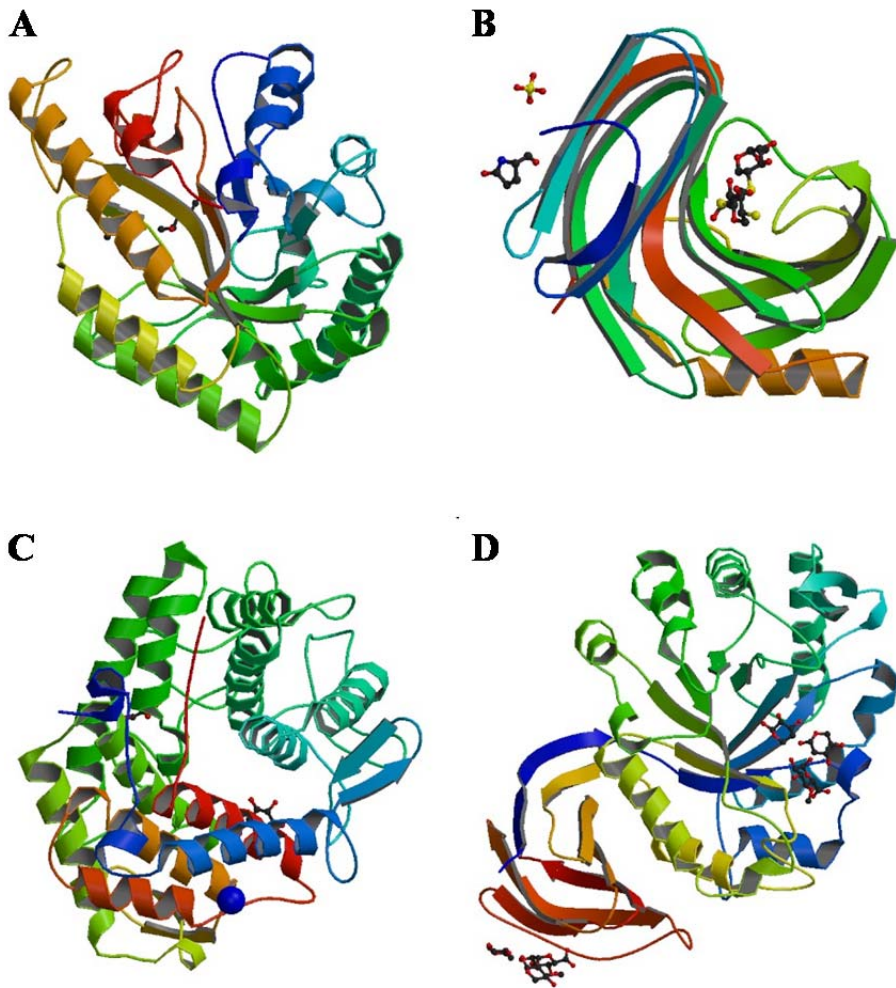


Figura 6. Estructura tridimensional de los dominios catalíticos de las xilanasas pertenecientes a diferentes familias. (A) Estructura de la xilanasa Xyn10B de *Paenibacillus barcinonensis*, con plegamiento típico $(\beta/\alpha)_8$ (Gallardo et al., 2010b). (B) Estructura de la xilanasa de *Chaetomium thermophilum* de familia GH11 con plegamiento de β jelly roll (Jänis et al., 2005). (C) Estructura de la exoxilanasa liberadora de xilosas a partir del extremo reductor de *Bacillus halodurans* C-125 perteneciente a la familia GH8 (Fushinobu et al., 2005). (D) Estructura de la xilanasa XynC de *Bacillus subtilis* 168 perteneciente a la familia GH30, de estructura $(\beta/\alpha)_8$ unida al β side domain (St John et al., 2011).

1.7 Xilanasas GH11

La familia GH11 contiene exclusivamente endo- β -(1,4)-xilanasas. Se caracterizan por su elevada selectividad de sustrato, alta eficiencia catalítica, pequeño tamaño (aproximadamente 20 kDa), y amplia variedad de pHs y temperaturas óptimas. Estas características hacen que las xilanasas de esta familia sean frecuentemente utilizadas en diversos procesos industriales.

Al igual que las xilanasas GH10, las xilanasas GH11 son activas sobre xilanos con y sin ramificaciones. No son activas sobre la celulosa ni sobre sus derivados. Los análisis de los productos de hidrólisis, han revelado que la xilobiosa y la xilotriosa son los oligosacáridos no sustituidos más pequeños liberados por estas enzimas. La xilopentaosa es el oligosacárido más pequeño que puede ser digerido por las mismas, aunque se ha observado actividad sobre la xilotetraosa en pequeña magnitud (Biely et al., 1997).

Si bien las GH11 son activas sobre xilanos ramificados, son más eficientes en regiones no ramificadas. Requieren al menos tres xilosas consecutivas sin sustituciones y tienen baja actividad sobre xilanos con alto grado de decoraciones (Fig. 7). En el caso del MeGAX, el ácido aldopentaurónico ($\text{MeGlcA}^3\text{Xyl}_4$) es el principal oligosacárido sustituido liberado, que corresponde a una xilotetraosa con un MeGlcA unido a la segunda xilosa a partir del extremo no reductor. En el caso del AX, el principal oligosacárido sustituido liberado es una xilotriosa enlazada a una arabinosa en la xilosa central. Y en el caso de los xilanos de enlaces mixtos, el producto más pequeño es una xilotetraosa que contiene un enlace β -(1,3) en el medio.

Las primeras estructuras cristalográficas de xilanasas GH11 fueron obtenidas en el año 1994 (Törrönen et al., 1994; Wakarchuk et al., 1994), y desde entonces se han publicado más de cincuenta estructuras cristalinas que han permitido dilucidar el funcionamiento de este tipo de enzimas. Las xilanasas GH11 han sido clasificadas dentro del clan GH-C, apreciándose un alto grado de conservación dentro de la misma familia. En su mayoría suelen ser mono dominio, donde el dominio catalítico presenta

una arquitectura típica de lámina β curvada sobre sí misma, denominada β *jelly roll* (Fig. 6B). Esta estructura típica se compone de dos hojas β antiparalelas llamadas A y B que esculpen una hendidura larga y profunda. La topología de esta familia de proteínas parece una mano derecha parcialmente cerrada. Las hojas β A y B corresponderían a los dedos de la palma, mientras que parte de las regiones no estructuradas de los *loops* B8 y B7 serían el pulgar (Törrönen et al., 1994; Törrönen and Rouvinen, 1995). El sitio activo contiene los dos glutamatos catalíticos ubicados en el lado cóncavo de la “palma” que forma la estructura. Adicionalmente, el sitio activo presenta generalmente de cinco a seis subsitios, que se encuentran altamente conservados y caracterizados tanto por análisis mutacionales como por modelos computacionales. Se sugiere que los subsitios -2, -1 y +1 no son capaces de acomodar ramificaciones debido al impedimento estérico, por lo que las decoraciones se tendrían que acomodar en posición -3 ó +2. Únicamente se ha descrito un caso de una ramificación de MeGlcA acomodada en posición -2, hecho que implica un elevado coste energético para la enzima, ya que debe adoptar una conformación diferente para el alojamiento de la cadena lateral (Pollet et al., 2010).

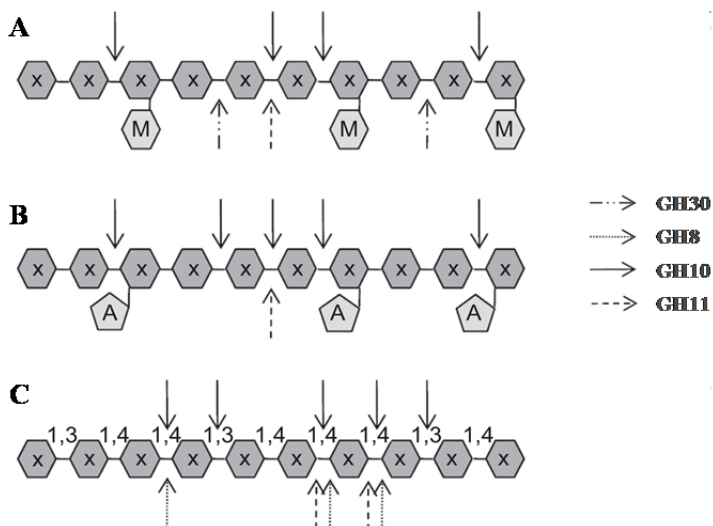


Figura 7. Actividad hidrolítica de las xilanasas pertenecientes a las distintas familias sobre (A) MeGAX, (B) AX y (C) xilanos de enlaces mixtos β -(1,3)/ β -(1,4). \odot : xilosa unida por enlace β -(1,4) (excepto donde se indica) (X); MeGlcA (M); \ominus : arabinosa (A) (Adaptada de Pollet et al., 2010).

1.8 Xilanasas GH8

La familia GH8 está compuesta principalmente por celulasas (EC 3.2.1.4), pero también se han descrito liquenasas (EC 3.2.1.73), endo-(1,4)- β -xilanasas (EC 3.2.1.8) y exooligoxilanasas liberadoras de xilosas desde el extremo reductor (EC 3.2.1.156). Actualmente, no más de diez enzimas con actividad sobre xilanos o XOS han sido caracterizadas (Cantarel et al., 2009), siendo los estudios más exhaustivos los de la xilanasas de *Pseudoalteromonas haloplanktis* (Collins et al., 2002) y los de la exooligoxilanasas *Rex* de *Bacillus halodurans* C-125 (Honda and Kitaoka, 2004). En ambos casos, se ha realizado una caracterización bioquímica completa, además de la determinación de su estructura cristalográfica (Van Petegem et al., 2003; Fushinobu et al., 2005).

En el caso de la xilanasas de *P. haloplanktis*, la actividad máxima ha sido detectada sobre xilanos de enlaces mixtos y sobre oligosacáridos de cadena larga (Fig. 7). Su actividad catalítica se ve afectada por la presencia de ramificaciones de arabinosa en el esqueleto de xilano. Esta enzima es capaz de hidrolizar los enlaces β -(1,4) que preceden enlaces β -(1,3) en xilanos mixtos, pero sólo si están ubicados al menos 2 enlaces después de uno β -(1,3). El oligosacárido mixto más pequeño liberado, corresponde a una xilotetraosa con una unión β -(1,3) en el extremo no reductor.

Por otro lado, la exooligoxilanasas liberadora de xilosa desde el extremo reductor de *B. halodurans* es altamente específica, liberando xilosa de manera progresiva a partir de XOS con DP ≥ 3 . Sin embargo este tipo enzimático no es activo sobre xilanos.

La estructura de estas xilanasas es un dominio único de plegamiento en barril (α/α)₆, consistente en 6 hélices α centrales, rodeadas por otras 6 hélices α (Fig. 6C). Este tipo de plegamiento está presente en otras familias de glicosil hidrolasas con mecanismo catalítico de inversión, como por ejemplo las familias GH15, GH65 y GH9. La familia GH8 de glicosil hidrolasas pertenece al clan GH-M conjuntamente con la familia GH48.

1.9 Xilanasas GH30

La familia GH30 contiene enzimas con diferentes actividades, tales como glucosilceramidases, (EC 3.2.1.45), β -(1,6)-glucanasas (EC 3.2.1.75), β -xilosidasas (EC 3.2.1.37), β -fucosidasas (EC 3.2.1.38), β -glucosidasas (3.2.1.21), endo- β -1,6-galactanasas (EC:3.2.1.164) y endo- β -(1,4)-xilanasas (EC 3.2.1.8) (Cantarel et al., 2009). Al igual que en el caso de las xilanasas de familia GH8, entre las glicosil hidrolasas de familia GH30 encontramos muy pocas xilanasas.

Anteriormente, las xilanasas de familia GH30 estaban clasificadas como xilanasas pertenecientes a la familia GH5, sin embargo, recientemente, se han descrito motivos estructurales conservados que han ayudado a definir la familia GH30. El dominio catalítico de estas xilanasas presenta una conformación típica de barril (β/α)₈ común con la conformación de las glicosil hidrolasas de familia GH5, unido a una lámina β de nueve tramos denominada *β -side domain*, que es exclusiva de las enzimas de esta familia (Fig. 6D) (St John et al., 2010). Si bien la estructura β_9 está presente en todas las enzimas de familia GH30, su función aún no ha sido definida. Sin embargo, el hecho de que esta estructura se conecte a través de dos *linkers* que asocian tanto el extremo amino como el carboxilo a una interfaz hidrofóbica al costado del dominio catalítico, sugiere que la *β -side domain* se comporta como una unidad funcional independiente (St John et al., 2010).

Al presente, sólo siete glicosil hidrolasas de la familia GH30 han sido confirmadas como xilanasas. En los tres casos en los que se ha realizado una caracterización bioquímica exhaustiva se ha demostrado que estas enzimas tienen actividad exclusiva sobre MeGAX, no siendo activas sobre AX (Fig. 7). El requerimiento de sustituciones de MeGlcA parece ser estricta para la hidrólisis y a medida que el grado de sustitución aumenta, también lo hace la actividad específica. En el caso de las dos xilanasas más estudiadas de esta familia, XynA de *Erwinia chrysanthemi* (Hurlbert and Preston, 2001; Vrsanská et al., 2007) y XynC de *Bacillus subtilis* (St John et al., 2006), la hidrólisis se realiza en el segundo enlace a continuación de la ramificación hacia el extremo reductor en la cadena de xilano. Por consiguiente, los productos generados de la

hidrólisis contienen una molécula de MeGlcA unida al penúltimo residuo de xilosa a partir del extremo reductor. Los productos de hidrólisis más abundantes contienen al menos cinco residuos de xilosa y en su mayoría están sustituidos por una molécula de MeGlcA. No se ha detectado la liberación de oligosacáridos lineales sin sustitución a partir de estas enzimas. Estas dos xilanasas son activas sobre oligosacáridos ramificados con MeGlcA pero no sobre oligómeros lineales. Sin embargo, una tercera enzima caracterizada, Xyn30B de *Bacillus* sp., presenta como rasgo diferencial respecto a las dos enzimas anteriores la actividad sobre oligosacáridos no ramificados cuando están presentes a elevada concentración (Gallardo et al., 2010a).

Tanto la estructura de XynC de *Bacillus subtilis* como la de XynA de *Erwinia chrysanthemi* han sido resueltas (St John et al., 2011; Urbániková et al., 2011). En ambos casos se observa la estructura típica $(\beta/\alpha)_8$ -barrel, al igual que en las xilanasas GH10 también pertenecientes al clan GH-A y la estructura lateral β_9 , β -side domain. El sitio activo con los glutamatos catalíticos está situado en la parte carboxilo terminal del barril $(\beta/\alpha)_8$. En base a las dos estructuras resueltas, se ha propuesto un modo de acción único en el que se requiere la acomodación de un residuo de MeGlcA en el subsitio -2.

Cabe destacar que recientemente se ha descrito una xilanasas de familia GH5 que no ha sido reclasificada en la familia GH30, dado que no presenta la estructura lateral β_9 . Esta xilanasas tiene actividad exclusiva sobre AX y parece definir un nuevo tipo de xilanasas (Correia et al., 2011).

1.10 Módulos de unión a carbohidratos

Como se ha comentado, gran parte de las glicosidasas conocidas son proteínas modulares que contienen además del módulo catalítico, módulos de unión a carbohidratos o CBMs. A estos módulos se les atribuyen funciones como las de incrementar la concentración de enzima en la superficie del sustrato, causar unas disrupciones no hidrolíticas del sustrato y/o de ser capaces de modificar la superficie del mismo (Arantes and Saddler, 2010). La ubicación en la proteína del CBM con

respecto al dominio catalítico puede ser amino y/o carboxilo terminal, estando usualmente conectados por *linkers* de longitud variable, ricos en serina o treonina (Gilbert and Hazlewood, 1993). Basándose en sus propiedades, los CBMs, al igual las glicosil hidrolasas, se han agrupado en sesenta y cuatro familias que presentan importantes diferencias en especificidad de sustrato y otras propiedades (Boraston et al., 2004). En general, existe una estrecha correlación entre el ligando que es capaz de reconocer un CBM y el sustrato específico sobre el que actúa el dominio catalítico. La proximidad espacial y estructural de la celulosa y el xilano en la pared celular vegetal hace que la presencia de CBMs que unen celulosa o xilano facilite la actividad de la xilanasa sobre el xilano.

Entre los CBMs que se han descrito como módulos accesorios de glicosil hidrolasas, podemos encontrar los CBMs de la familia 35. Estos CBM35, pueden encontrarse en una gran variedad de enzimas modulares activas sobre componentes hemicelulósicos y pécticos de la pared vegetal (Montanier et al., 2009). Son capaces de unir β -(1,3)-galactano, β -(1,4)-manano, y la cadena lateral α -(1,6)-Gal de los galactomananos (Cantarel et al., 2009) mediante diferentes mecanismos de reconocimiento de ligando dependientes e independientes de calcio (Tunnicliffe et al., 2005).

Recientemente se han descrito cuatro CBMs 35 altamente conservados, presentes en tres hidrolasas de polisacáridos distintas y una exo- β -D-glucosaminidasa, que son específicos para la unión de ácido glucurónico y/o de ácido Δ 4,5-anhidrogalaturónico. Este último proveniente de la degradación de la pectina, actúa como una molécula de "*targeting*" en los tejidos vegetales que se encuentran en pleno proceso de degradación. Se postula que en estos casos los CBMs más que dirigir los módulos catalíticos a los sustratos específicos de cada enzima, dirigen las enzimas hacia zonas vegetales que están siendo activamente degradadas (Montanier et al., 2009).

Hoy por hoy, sólo se ha caracterizado un CBM35 presente en una xilanasa (Kellett et al., 1990), por lo que son necesarios más estudios para la dilucidar la función de los módulos de esta familia en las xilanasas.

1.11 Aplicaciones biotecnológicas de las xilanasas

Las hemicelulasas bacterianas, especialmente las xilanasas, presentan aplicaciones prometedoras en la industria debido a su enorme potencial de modificar y transformar los sustratos lignocelulósicos. La aplicación biotecnológica de las xilanasas comenzó en la década de los 80 para la preparación de pienso animal y posteriormente su uso se extendió a la industria alimentaria, textil y papelera entre otras. A continuación, se revisan brevemente los procesos más comunes donde se utiliza este tipo de enzimas.

1.11.1 Industria Alimentaria

La aplicación de xilanasas presenta gran interés en la industria alimentaria, principalmente en las industrias panaderas y cerveceras. En el proceso de panificación, se utilizan mezclas de xilanasas de diferentes familias, principalmente para mejorar la estructura de la miga y la calidad del pan, y para reducir la viscosidad de la masa (Goesaert et al., 2005). También se han utilizado xilanasas para facilitar la separación de la harina de trigo en almidón y gluten (Van Der Borgh et al., 2005), o para mejorar la consistencia de la masa de espaguetis (Ingelbrecht et al., 2001). En la industria cervecera, la aplicación de xilanasas permite aumentar el rendimiento de filtración ya que su aplicación disminuye la fracción de AXs y por consiguiente, reduce la viscosidad y el tiempo del procedimiento (Debyser et al., 1997). El mismo principio se aplica en el proceso de clarificado del zumo de frutas, ya que las xilanasas disminuyen los niveles de material insoluble, dando paso a un mejor rendimiento y a la facilitación de la filtración del zumo (Olfa et al., 2007).

1.11.2 Industria Agrícola

Otra aplicación de importancia económica de las xilanasas es en la industria de piensos. Se suelen utilizar cócteles de xilanasas junto a otras glicosil hidrolasas para disminuir la viscosidad de piensos para animales monogástricos, con lo que mejoran su digestibilidad y aumentan su valor nutricional (Polizeli et al., 2005). La aplicación de xilanasas también permite la obtención de XOS a partir de diferentes materias primas. Los XOS obtenidos por la digestión enzimática se utilizan como suplemento en la dieta

para mejorar el rendimiento en el crecimiento, la digestión y los parámetros inmunológicos y microflora del intestino. Las aplicaciones de los XOS se atribuyen en parte a que favorecen el desarrollo de bifidobacterias en el tracto intestinal y por tanto pueden considerarse como prebióticos (Gao et al., 2007).

1.11.3 Biocombustibles

En el caso de los biocombustibles, el denominado bioetanol de segunda generación, se produce a partir de sustratos lignocelulósicos sin valor nutricional para el hombre. La materia prima se degrada e hidroliza para producir una mezcla de azúcares que son fermentados y posteriormente destilados, dando paso a la producción del biocombustible (Margeot et al., 2009). La etapa de hidrólisis o despolimerización del sustrato lignocelulósico puede ser llevada a cabo por agentes químicos o mediante la acción de una mezcla enzimática con xilanasas y celulasas, entre otras hidrolasas. Según la composición de la mezcla utilizada, se puede llegar a obtener un gran rendimiento de conversión, al contrario de lo que sucede con el tratamiento químico, obteniendo soluciones con altas concentraciones de azúcares para la fermentación, con lo que se obtiene una mayor concentración final de etanol, que facilita su posterior destilación.

1.11.4 Industria Papelera

Por otro lado, la preocupación medioambiental desarrollada por la sociedad junto con las presiones ejercidas por las nuevas legislaciones, han forzado a las industrias a realizar cambios en los procesos productivos o a la implantación de nuevas metodologías que reduzcan el impacto ambiental, forjando el desarrollo de tecnologías sostenibles. En el caso de la industria papelera, la etapa que genera mayor cantidad de contaminantes corresponde a la etapa del blanqueo de la pasta de papel. Esto se debe a que el proceso conlleva la utilización de blanqueadores químicos clorados, que generan compuestos organohalogenados adsorbibles (AOX) de elevada toxicidad a partir de la lignina residual. Mediante la utilización de xilanasas en el blanqueo de pasta de papel, se han conseguido importantes avances. El uso de estas enzimas determina una mejora tecnológica debido a que se potencia el efecto blanqueador de los agentes

químicos, permitiendo un importante ahorro de estos agentes, y disminuyendo notablemente la generación de contaminantes AOX en el proceso de blanqueo (Viikari, L. et al., 1986; Roncero et al., 2005).

La efectividad de xilanasas de familia 10 y 11 en el proceso de blanqueo ha sido evaluada por diferentes autores, siendo las xilanasas de familia GH11 las que usualmente muestran un mejor comportamiento (Clarke et al., 1997). Sin embargo, existen múltiples factores que pueden afectar el rendimiento de la enzima, como son la naturaleza de la materia prima papelera, el tipo de pasteado, o las condiciones del proceso de blanqueo.

Recientemente se ha descrito que el blanqueo de pasta de papel con xilanasas reduce el contenido de ácidos hexenurónicos (HexAs), hecho que retarda el envejecimiento del papel fabricado, confiriendo a las pastas un valor añadido (Valls and Roncero, 2009). Los HexAs se forman durante la cocción alcalina de la pasta (cocción Kraft), por la conversión del MeGlcA presente como cadenas laterales del xilano, en su correspondiente ácido hexenurónico insaturado, mediante la liberación de una molécula de metanol (Daniel et al., 2003). Las xilanasas actuarían sobre las pastas hidrolizando los xilanos más accesibles de la superficie de las fibras paperas, los cuales contendrían los HexAs, por lo que al eliminar estos xilanos se eliminarían también los HexAs.

Actualmente los esfuerzos de investigación en esta área están enfocados al abaratamiento de los costes de producción de estas enzimas, así como a mejorar la calidad de los cócteles enzimáticos utilizados para la hidrólisis mediante la búsqueda o mejora biotecnológica de enzimas con diferentes especificidades y de elevada actividad.

Según la aplicación final deseada, las características requeridas en una xilanasas varían, y la elección de la enzima adecuada suele ser empírica, lo que explica la necesidad de profundizar el conocimiento en este ámbito. Adicionalmente, la aplicación industrial de

una xilanasas suele depender de características fisicoquímicas como su dependencia del pH, resistencia térmica, sensibilidad hacia diferentes tipos de inhibidores y su compatibilidad con las condiciones de los procesos industriales.

1.12 *Paenibacillus barcinonensis*

Paenibacillus es un nuevo género de bacterias escindidas del género *Bacillus*, definido en 1993 (Ash et al., 1993). Contiene más de 120 especies diferentes, aisladas a partir de una gran variedad de hábitats. Muchas de ellas, son ampliamente utilizadas en áreas como la agricultura, la industria, la medicina y la biorremediación ambiental.

P. barcinonensis es una bacteria gram positiva, endosporulada que ha sido identificada en nuestro equipo de investigación como una nueva especie (Fig. 8) (Sánchez et al., 2005). Fue aislada a partir de suelos de arrozal provenientes del Delta del Ebro (España) y seleccionada en función de su elevado poder xilanolítico, determinado por la producción de numerosas xilanasas tanto secretadas como intracelulares (Blanco and Pastor, 1993). Sus colonias son circulares, ligeramente irregulares, de color amarillento y de 0,5 mm de diámetro después de dos días de crecimiento a 30°C en agar nutritivo. Presenta crecimiento en el rango de temperaturas entre 10 y 40°C, y en el de pHs entre 5 y 10,4. Puede crecer en presencia de 5% de NaCl y de 0,001% de lisozima. Es catalasa positivo, oxidasa y ureasa negativo. No reduce el nitrato y no produce acetilmetilcarbinol. El pH en la prueba Voges-Proskauer es de 4,7. Hidroliza la gelatina pero no la caseína ni el almidón y no utiliza el citrato ni el propionato. Su gran capacidad hidrolítica le permite crecer con xilano como única fuente de carbono. En la actualidad, se han caracterizado tres de sus xilanasas Xyn10A, Xyn10B y Xyn10C, todas pertenecientes a la familia GH10 (Blanco et al., 1995, 1999; Gallardo et al., 2010b). La xilanasas mayoritaria de *P. barcinonensis* denominada Xyn10A ha sido ensayada con éxito en el blanqueo de pasta de papel eucalipto (Blanco et al., 1995).

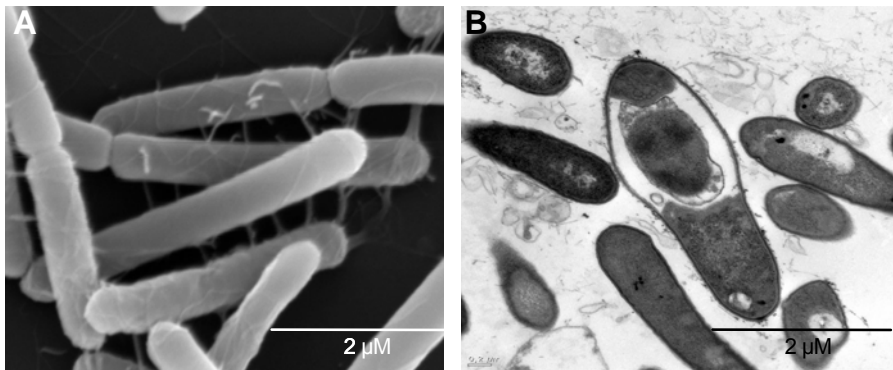


Figura 8. Observación microscópica de células de *Paenibacillus barcinonensis*. (A) Imagen obtenida mediante microscopía electrónica de barrido (SEM); (B) Imagen obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) de una célula endosporulada (Sánchez et al., 2005).

Los exitosos resultados que han presentado las xilanasas a nivel industrial en numerosos procesos junto a sus prometedoras aplicaciones, que están siendo ampliamente desarrolladas, determinan el interés de incrementar el conocimiento de estas enzimas en función de obtener mejores biocatalizadores.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general e interés del proyecto realizado

El desarrollo de la presente tesis doctoral se ha enfocado al estudio de xilanasas desde dos vertientes distintas: la biología molecular y la aplicación biotecnológica. En primer lugar se ha estudiado la bioquímica y genética de estas enzimas clave en la degradación del xilano, y un segundo aspecto ha sido la evaluación de la aplicación las xilanasas en biotecnología papelera.

Al inicio de esta Tesis, únicamente se habían identificado tres xilanasas de *Paenibacillus barcinonensis*. Teniendo en cuenta el gran poder xilanolítico de la bacteria y la complejidad de su sistema enzimático degradador del xilano, se ha considerado de interés la identificación de las xilanasas restantes y el estudio de su potencial biotecnológico.

En cuanto a los estudios básicos sobre xilanasas, se ha abordado la identificación y caracterización de las distintas enzimas de *Paenibacillus barcinonensis* implicadas en la depolimerización del xilano, con el fin de conocer el sistema xilanolítico completo y analizar las funciones específicas que cada una de ellas realiza en la degradación del xilano. En segundo lugar, se ha abordado la aplicación biotecnológica de las xilanasas en el blanqueo de pasta de papel. Tal como se ha comentado en la introducción, la utilización de xilanasas en el proceso de blanqueo de la pasta de papel potencia la efectividad de los blanqueadores químicos, reduciendo la generación de residuos organoclorados adsorbibles (AOX) y por consiguiente el impacto ambiental. Sin embargo, la capacidad de facilitar el blanqueo no es general entre las xilanasas, encontrándose grandes diferencias entre las distintas enzimas descritas. El trabajo se ha dirigido principalmente al blanqueo de pastas enzimáticamente asistido, así como también a mejorar las propiedades físicas del papel y la obtención de fibras con nuevas propiedades.

El objetivo central del proyecto de tesis ha sido la identificación de nuevas xilanasas para su caracterización molecular y para su evaluación en biotecnología papelera.

Para su realización, se han concretado los apartados que se describen a continuación.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Identificación de nuevas xilanasas

Construcción de una genoteca específica para la realización de “*gene walking*” a partir del DNA genómico de la especie *P. barcinonensis*. Esta técnica facilitó la identificación de nuevas xilanasas que fueron posteriormente caracterizadas.

2.2.2 Clonación de xilanasas en cepas de *Escherichia coli*

La sobreexpresión de xilanasas en vectores de *E. coli* se desarrolló para generar cantidades suficientes de enzima que permitieran su posterior purificación y caracterización.

Esta aproximación se aplicó para estudiar las siguientes enzimas:

- Xyn10A: xilanasas de familia GH10, previamente descrita por el grupo de investigación y evaluada con éxito en una secuencia de blanqueo de pasta Kraft de eucalipto (Blanco et al., 1995).
- Xyn30D: Nueva xilanasas de la familia GH30, identificada en el transcurso de esta tesis.
- Xyn30D-CM: Dominio catalítico de la xilanasas Xyn30D.
- Xyn-CBM35: Dominio de unión a carbohidratos de familia CBM35, de Xyn30D.
- Xyn11E: Nueva xilanasas de la familia GH11, identificada en el transcurso de esta tesis.

2.2.3 Caracterización bioquímica de las xilanasas identificadas

Para todas las xilanasas identificadas se realizó una caracterización bioquímica de su actividad catalítica, que incluyó:

- Determinación de la especificidad de sustrato y constantes catalíticas.
- Determinación de las condiciones óptimas de actividad.
- Estudios de estabilidad ante diferentes condiciones de pH y temperatura.
- Estudio de los productos de hidrólisis generados por cada enzima.

Además, la xilanasas Xyn30D fue sometida a ensayos de ingeniería de proteínas, donde sus dominios fueron separados para su estudio a nivel individual. Los estudios del dominio de unión a carbohidratos Xyn-CBM35 fueron diferentes a los antes mencionados, ya que no presenta actividad catalítica xilanasas. En este caso, se realizaron los siguientes estudios:

- Determinación de unión a polisacáridos insolubles.
- Determinación de unión a polisacáridos solubles.

2.2.4 Estudio estructural de la xilanasas Xyn30D

Con el fin de profundizar en el conocimiento de esta familia de enzimas, aún poco explorada, se realizó la purificación de la xilanasas Xyn30D a niveles de pureza más elevados que los utilizados convencionalmente para la caracterización bioquímica. Con esta proteína se realizaron ensayos de cristalización para obtener una mayor comprensión de la relación estructura-función de las xilanasas GH30.

Además se construyó un mutante inactivo mediante la técnica de mutagénesis dirigida por PCR *Quikchange*[®] para su cristalización y posterior realización de ensayos de “soaking” con diferentes sustratos.

2.2.5 Evaluación en el blanqueo de la pasta de papel

Todas las xilanasas estudiadas durante la presente tesis fueron evaluadas sobre pasta de papel de sisal (*Agave sisalana*) para determinar su efecto en el grado de deslignificación y su capacidad de reducción del contenido de ácidos hexenurónicos. El tratamiento realizado fue incluido en una secuencia de blanqueo XP, donde X correspondió a la etapa enzimática y P a una etapa de extracción con peróxido. Se evaluaron los parámetros: número kappa (KN), blancura, viscosidad y contenido de HexAs.

PUBLICACIONES

3 PUBLICACIONES DERIVADAS DEL PRESENTE TRABAJO

Recombinant expression of an alkali stable GH10 xylanase from *Paenibacillus barcinonensis*.

Susana V. Valenzuela, Pilar Diaz y F. I. Javier Pastor

J. Agric. Food Chem., 2010, 58 (8), pp 4814–4818

DOI: 10.1021/jf9045792

Publication Date (Web): March 10, 2010

Modular Glucuronoxylan-Specific Xylanase with a Family CBM35 Carbohydrate-Binding Module.

Susana V. Valenzuela, Pilar Diaz y F. I. Javier Pastor

Appl. Environ. Microbiol. 2012, 78(11):3923.

DOI: 10.1128/AEM.07932-11.

Published Ahead of Print: 23 March 2012.

Characterization of a chaperone dependent Xylanase from *Paenibacillus barcinonensis* with potential applications in upgrading paper pulps.

Susana V. Valenzuela, Mai Nielsen, Pilar Diaz y F. I. Javier Pastor

En preparación.

Effectiveness of new xylanases from different GH families on lignin and hexenuronic acids removal of specialty sisal fibres.

Susana V. Valenzuela, Cristina Valls, Teresa Vidal, Pilar Diaz y Francisco J Pastor

En preparación.

Preliminary crystallographic analysis of Xyn30D from *Paenibacillus barcinonensis*

María Ángela Sainz-Polo, Susana V. Valenzuela, F. I. Javier Pastor y Julia Sanz-Aparicio

En curso.

3.1 Recombinant Expression of an Alkali Stable GH10 Xylanase from *Paenibacillus barcinonensis*

Susana V. Valenzuela, Pilar Díaz y F. I. Javier Pastor

La xilanasa A de *Paenibacillus barcinonensis*, una nueva especie bacteriana aislada en arrozales provenientes del delta del Ebro, ha sido clonada y expresada en *Escherichia coli*. La xilanasa recombinante purificada mostró una elevada actividad tanto sobre xilanos de maderas duras como de maderas blandas, exhibiendo sobre el xilano de abedul una K_m y una V_{max} de 2,93 mg/mL y 50,67 U/mg, respectivamente. La xilanasa A mostró alta actividad a 60°C en condiciones alcalinas hasta pH 9,5 y permaneció estable durante al menos 3 horas en estas condiciones. La secuencia aminoacídica deducida de *xynA* evidenció que la proteína es una xilanasa de dominio único perteneciente a la familia GH10 de glicosil hidrolasas. El análisis mediante cromatografía en capa fina de los productos de hidrólisis de xilano, mostró que la enzima es capaz de liberar xilooligómeros sustituidos a partir de arabinoxilano de cereales, mientras que los principales productos de hidrólisis de glucuronoxilano fueron xilosa, xilobiosa y ácido aldotetraurónico. La enzima liberó una mezcla compleja de xilooligómeros a partir de xilano acetilado de eucalipto.

Las condiciones descritas anteriormente, posicionan a XynA como un potente despolimerizador de xilano de eucalipto, materia ampliamente utilizada en la industria papelera.

Recombinant Expression of an Alkali Stable GH10 Xylanase from *Paenibacillus barcinonensis*

SUSANA V. VALENZUELA, PILAR DÍAZ, AND F. I. JAVIER PASTOR*

Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Avinguda Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

Xylanase A from *Paenibacillus barcinonensis*, a new species isolated from a rice field, has been cloned and expressed in *Escherichia coli*. Purified recombinant xylanase showed high activity on xylans from hardwoods and cereals, and exhibited K_m and V_{max} of 2.93 mg/mL and 50.67 U/mg on birchwood xylan. Xylanase A was highly active at 60 °C in alkaline pH values up to 9.5 and remained stable for at least 3 h in alkaline conditions. The amino acid sequence deduced from *xynA* revealed that it is a single domain xylanase belonging to the GH10 family. Thin layer chromatography analysis showed that the enzyme released a mixture of hydrolysis products including substituted xylooligomers from cereal arabinoxylans, while xylose, xylobiose, and aldotetrauronic acid were the main products released from glucuronoxylan from birchwood. The enzyme released a complex mixture of xylooligomers for acetylated xylan from eucalyptus, revealing its potential to depolymerize this widely used resource in the pulp and paper industry.

KEYWORDS: Biotechnology; xylanase; alkali stable; enzymatic hydrolysis; bioconversion; *Paenibacillus*

INTRODUCTION

Xylan is a main structural polysaccharide in plant cell walls that constitutes approximately one-third of the renewable organic carbon on earth (1). The catabolic breakdown of xylan thus represents a critical step in the recycling of carbon in nature and has been targeted as a subject of intense research as renewable energy resources (2). Xylans contain a xylose $\beta(1 \rightarrow 4)$ linked backbone, which depending on the plant source, can be variably substituted by side chains of arabinosyl, glucuronosyl, methylglucuronosyl, acetyl, feruloyl, and *p*-coumaroyl residues. Biodegradation of xylan is a complex process that requires the coordinate action of several enzymes, among which xylanases (1,4- β -D-xylan xylanohydrolase; EC 3.2.1.8), cleaving internal linkages on the β -1,4-xylose backbone, play a key role. On the basis of amino acid sequence similarity and hydrophobic cluster analysis, xylanases have been classified into two main families of glycosyl hydrolases, GH10 and GH11 (3, 4), although several recently characterized xylanases, that could complement the activity of GH10 and GH11 enzymes, have been described in glycosyl hydrolases families 5, 7, 8, and 43 (1). The complex chemical nature and heterogeneity of xylan can account for the multiplicity of xylanases produced by microorganisms (5).

Xylanases have biotechnological application in many industrial processes, although xylan bioconversion depends on the efficiency of the xylanase selected (6). Pulp bleaching is one of the most highlighted industrial application of xylanases, where they enhance the effectiveness of bleaching chemicals, thereby reducing the consumption of chlorine containing chemicals and

consequently reducing the generation of toxic wastes (adsorbable organic halogens, AOX) and the environmental impact of pulp bleaching (7, 8). Xylanases are also successfully used as additives to improve the digestibility of feed (6), in the bakery industry to improve the quality of bread (9), while their use to obtain xylooligosaccharides to be used as prebiotics is one of the most recent and promising applications of these enzymes (10, 11).

Paenibacillus barcinonensis is a recently identified new species, isolated from rice fields in the Ebro river delta in Spain, and selected for its high xylan degrading activity (12, 13). It shows a multiple enzyme system for xylan degradation, which allows it to utilize xylan as the only carbon source. XynA is the main xylanase of *P. barcinonensis*, as it is the most abundant enzyme among the proteins secreted by the strain when grown on xylans. XynA was previously tested on eucalyptus kraft pulp bleaching, showing high effectiveness as a bleaching aid that allowed important reductions in the chlorine dioxide dose needed to reach target brightness (14). We describe in this article the cloning of the *xynA* gene from *P. barcinonensis* and its heterologous expression in *Escherichia coli*. The recombinant enzyme has been purified and biochemically characterized. This makes possible the production of the enzyme in recombinant hosts, devoid of background cellulase activity, for its biotechnological applications.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains and Plasmids. *Paenibacillus barcinonensis* was grown as described previously (12). *Escherichia coli* BLR(DE3) and pET3b were used as host strain and plasmid vector, respectively, to express *xynA*. Cultures from *E. coli* BLR(DE3)/pET3XynA were grown on tetracycline and ampicillin supplemented LB broth (50 μ g/mL each) at 37 °C for 16 h. Cells were disrupted by sonication for small culture volumes (up to 10 mL) or by French press for higher volumes (1 or 2 L).

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +34-93-4034626. Fax: +34-93-4034629. E-mail: fpastor@ub.edu.

Table 1. Oligonucleotide Primers Used^a

| | |
|------------------------------|------------------------------|
| deg1XynA ^b | AAYGGNAAYATHATHGCGNGCARGTNC |
| deg2XynA ^b | TAYTGGAAAYCARGTNACNCCNGARAAY |
| XynA-A1 ^b | TGGTCGATGGCATCGGTATTCAA |
| XynA-A2 ^b | AATCCGAGCCTGTCTGCCCGTCT |
| XynA-upstream ^b | TGCGAGCGTACCTACCGTC |
| XynA-downstream ^b | AGCGTCTGCGATGCAATG |
| XynAFwNdeI ^c | GGAGGAATCATATGTTGAAGTC |
| XynARvBamHI ^c | CGACTCGGATCCAGATCAAG |

^a Restriction sites introduced in oligonucleotide sequences are underlined.

^b Oligonucleotides used in sequencing. ^c Oligonucleotides used in the cloning of *xynA* in pET3b.

Nucleic Acid Manipulations. Genomic DNA of *P. barcinonensis* was isolated with Genomic DNA Extraction Kit (Biotools). It was digested by *EcoRV*, *PvuII*, *DraI*, or *SmaI* restriction enzymes, and the fragments obtained were linked to commercial adaptors of Universal Genome Walker Kit (BD Biosciences). The DNA samples resulting from ligation were used as templates for PCR amplification with pairs of primers from the commercial kit and deduced from the N-terminal sequence of xylanase A, previously determined (14) (Table 1). One of the fragments amplified showed a DNA sequence encoding for the known N-terminal sequence of the enzyme. This DNA sequence allowed the design of new primers to obtain the whole *xynA* sequence by gene walking. The following primers XynAFwNdeI (GGAGGAATCATATGTTGAAGTC) and XynARvBamHI (CGACTCGGATCCAGATCAAG), including restriction sites for *NdeI* and *BamHI*, respectively, were used to amplify the whole *xynA* and to clone it in the polylinker of expression vector pET3b under the control of the T7 promoter. In this construction, no extra amino acids were added to XynA, which maintained its original signal peptide. The primers used in genome walking and in cloning were purchased from Sigma-Aldrich and are listed in Table 1.

Plasmid DNA was purified with commercial Illustra Plasmidprep Mini Spin Kit (GE Healthcare). PCR amplifications were performed with Pfu DNA polymerase (Stratagene) or Taq DNA polymerase (New England Biolabs). Restriction enzymes and ligases were purchased from Fermentas, New England Biolabs, and Roche Diagnostics. All kits were used according to the instructions of the suppliers. *E. coli* was transformed as described (15). The DNA sequence was obtained by automated fluorescence sequencing with an ABI PRISM dye terminator cycle sequencing ready reaction mix (Perkin-Elmer) in a 377 Perkin-Elmer DNA sequencer. Sequence similarity was analyzed through BLAST (16).

Enzyme Assays. Xylanase activity was assayed essentially as described (17). The polysaccharides tested as substrates were birchwood, oat spelt and beechwood xylan, methylglucuronoxylan, CMC, starch, pectin, lichenan, polygalacturonic acid (Sigma Chemical), rye or wheat arabinoxylan (Megazyme), and Avicel (Fluka). The assay mixtures contained 1.5% of polysaccharide in a final volume of 0.1 mL of 50 mM phosphate buffer at pH 6.5. The mixture was incubated at 60° for 15 min. Color development was measured at 520 nm. To study the activity on aryl-glycosides, the enzyme was incubated with substrate at 50 °C in a final volume of 0.5 mL of 100 mM phosphate buffer at pH 6.5 until the solution became yellow. Substrate concentration was 0.5% for *pNP*- β -xyloside, *oNP*- β -xyloside, *pNP*- β -glucopyranoside, *pNP*- α -arabinofuranoside, or *pNP*- α -arabinopyranoside (Sigma Chemical). The reaction was stopped by the addition of 1 mL of 1 M Na₂CO₃, and color development was measured at 400 nm. One unit of enzymatic activity was defined as the amount of enzyme that releases 1 μ mol of reducing sugar equivalent, *p*-nitrophenol, or *o*-nitrophenol per min under the assay conditions described.

To study the effect of temperature and pH on enzyme activity, we used the same assay conditions described above, but incubation was performed at different temperatures or pH. The following buffers were used: 150 mM sodium citrate, pH 3.0–4.0; 150 mM sodium acetate, pH 4.0–6.0; 150 mM sodium phosphate, pH 6.0–7.0; 150 mM Tris-HCl, pH 7.0–9.0; and 150 mM sodium glycine, pH 9.0–11.0. For the study of thermostability, enzyme samples were preincubated for different intervals at several pH values and temperatures, and residual xylanase activity on birchwood xylan was determined under the standard assay conditions.

Kinetic parameters (V_{\max} and K_m) were determined under optimal assay conditions using 0–30 mg mL⁻¹ of birchwood xylan as substrate.

K_m and V_{\max} were determined by fitting hyperbolic Michaelis–Menten curves with the program SigmaPlot, version 4.00 (Jandel Scientific).

Purification of XynA. XynA was purified from *E. coli* BLR(DE3)/pET3XynA cultures. The recombinant strain was grown on 2 L of LB broth supplemented with ampicillin and tetracycline (50 μ g/mL each) at 37 °C for 16 h. To avoid the formation of inclusion bodies because of enzyme overexpression, cultures were not induced by IPTG. In these conditions, 21 xylanase units/mL of culture were obtained. Cells were collected following disruption by a French press. Cell extracts were treated with streptomycin sulfate to eliminate nucleic acids by ultracentrifugation, and proteins were concentrated by precipitation with 20% ammonium sulfate. Concentrated extracts were subjected to cation exchange chromatography (Tricorn MonoS 5/50 GL, GE-Healthcare) on a fast protein liquid chromatography system (AKTA FPLC, GE-Healthcare). Bound proteins were eluted with a 0–1 M NaCl gradient.

Gel Electrophoresis and Zymograms. Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) was performed in 12% gels, essentially as described (18). For the detection of xylanase activity, 0.2% birchwood xylan was included in gels before polymerization, and zymograms were developed as described (17). Samples were heated for 10 min at 50 °C in sample buffer before being applied to gels. After electrophoresis, gels were washed for 30 min in 2.5% triton X-100, then were incubated for 30 min in 50 mM phosphate buffer at pH 6.5, and finally incubated at 55 °C for 10 min in the same prewarmed fresh buffer. Gels were then stained with 0.1% Congo Red for 15 min and washed with 1 M NaCl until xylanase bands became visible. Gels were then immersed in 10% (v/v) acetic acid and photographed. Isoelectric focusing (IEF) was performed as described (19).

Thin Layer Chromatography. Products from xylan and xylooligosaccharide hydrolysis were analyzed on silica gel plates (Merck, Darmstadt). Xylose and birchwood xylan were from Sigma Chemical, xylooligosaccharides and wheat xylan were from Megazyme, and *Eucalyptus* xylan was a gift of J. Carlos Parajó. The solvent used was chloroform–acetic acid–water (3:6:1). Hydrolysis products were detected by spraying the plates with an ethanol-concentrated sulfuric acid mixture (95:5) (20).

Nucleotide Sequence Accession Number. The DNA sequence of the *xynA* gene was submitted to the EMBL database under accession number FN430833.

RESULTS

Cloning of *xynA* Gene. N-Terminal sequence of xylanase A was previously determined (14), allowing the design of specific primers to PCR amplify a small portion of its encoding gene using as a template a mixture of *Paenibacillus barcinonensis* genomic DNA fragments linked to commercial adaptors. By gene walking from this *xynA* portion, the sequence of a 3000 bp DNA fragment containing a 960 bp open reading frame encoding a xylanase of 320 amino acids was obtained. *xynA* was flanked upstream by a putative 2',3'-cyclic-nucleotide 2'-phosphodiesterase precursor (71% identity with YP_002775154 from *Brevibacillus brevis*) and downstream by an open reading frame with similarity to a copper amine oxidase domain protein (38% identity with YP_003243369 from *Geobacillus* sp.). These flanking open reading frames do not seem to belong to the same transcriptional unit of *xynA*, as a putative promoter sequence showing a –35-(TTCAAA) and –10 (TATAAA) regions is found between the open reading frame located upstream and *xynA*, while the downstream open reading frame is transcribed in the opposite direction.

Six nucleotides upstream of the ATG initiation codon of *xynA*, a potential Shine–Dalgarno sequence (GGAGG), were found. The deduced amino acid sequence of XynA shows an N-terminal region of 30 amino acids with the features of a signal peptide. The predicted molecular weight and pI of the mature xylanase are 32.62 kDa and 8.65, respectively. Alignment of the deduced amino acid sequence of *xynA* to sequences contained in databases showed that the cloned enzyme is a single domain xylanase with

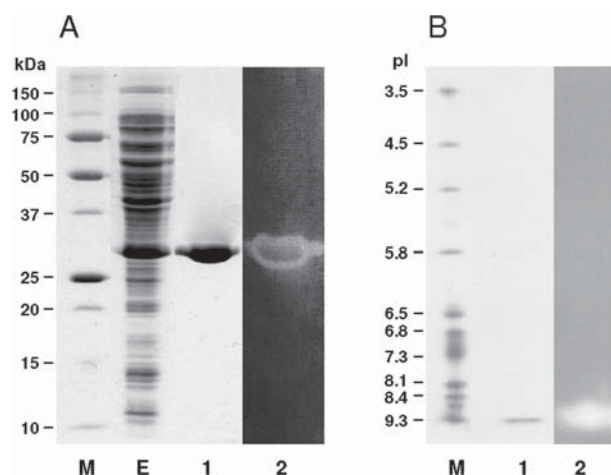


Figure 1. Electrophoretic analysis of xylanase A. **(A)** Analysis by SDS-PAGE. **(B)** Isoelectric focusing. Lanes: 1, protein staining of purified XynA; 2, zymogram of the purified enzyme; E, protein staining of cell extracts of *E. coli* BLR(DE3)/pET3XynA; M, molecular weight or pI standard proteins.

similarity to enzymes belonging to the GH10 family. The highest similarity was found to be to the catalytic domain of a xylanase from an uncultured bacterium (21) which shares 75% identity, while xylanase B from *Paenibacillus* sp. KCTC8848P (22) and Xyn10A from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (23) share identities of 73 and 65% with the cloned enzyme, respectively. Putative catalytic residues, Glu144 and Glu251, were found in XynA in the position corresponding to conserved regions of GH10 xylanases (24, 25).

Production of Recombinant XynA in *Escherichia coli*. Two specific primers were designed to clone the whole *xynA* encoding sequence in plasmid vectors in *Escherichia coli*. Several expressing vectors and host strains were tested, but in many of the recombinant clones constructed, the yield of active xylanase was low, probably because of the formation of inclusion bodies by an excessive production of the enzyme. Among the recombinant strains constructed, *E. coli* BLR(DE3)/pET3XynA, which showed the highest enzyme activity, was chosen to produce active xylanase. Cultures of the strain were collected, cells were disrupted by a French press, and cell extracts obtained were used to purify the xylanase. The alkaline pI of XynA allowed the purification to homogeneity of the enzyme in a single step, by cationic exchange chromatography in buffers at pH 7.0, where XynA was the only protein detected in the bound fraction. It was eluted from the column with a NaCl gradient, and the purified xylanase was analyzed by SDS-PAGE, isoelectric focusing, and zymography, showing an apparent molecular weight of 31 kDa and a pI of 9.3 (Figure 1), in agreement with the molecular weight and pI deduced from the nucleotide sequence. The properties of recombinant xylanase A were similar to those reported for the enzyme produced in the *P. barcinonensis* original host (14), indicating a proper folding and signal peptide processing of the protein in the recombinant host.

Characterization of Xylanase Activity. The hydrolytic activity of the recombinant enzyme on various substrates was determined (Table 2). The enzyme was highly active on glucuronoxylans and arabinoxylans, showing the highest activity on birchwood xylan (47 U/mg). It showed reduced activity on aryl xylosides, while carboxymethyl cellulose (CMC), Avicel, starch, polygalacturonic acid, or lichenan were not hydrolyzed by the enzyme. The kinetic constants of the enzyme were determined on birchwood xylan as substrate, showing a K_m and V_{max} of 2.93 mg/mL and 50.67 U/mg, respectively.

Table 2. Substrate Specificity of XynA

| substrates | activity (U/mg) |
|-------------------------------|-----------------|
| birchwood xylan | 47.13 |
| oat spelt xylan | 31.70 |
| beechwood xylan | 41.23 |
| wheat arabinoxylan | 32.46 |
| rye arabinoxylan | 24.44 |
| 4-O-methylglucuronoxylan | 22.17 |
| polygalacturonic acid | ND ^a |
| starch | ND ^a |
| Avicel | ND ^a |
| carboxymethyl cellulose (CMC) | ND ^a |
| lichenan | ND ^a |
| pectin | 10.83 |
| pNPX | 3.30 |
| pNPG | ND ^a |
| oNPX | 7.50 |
| pNPAP | 3.20 |
| pNPAf | 0.10 |

^a Not detected.

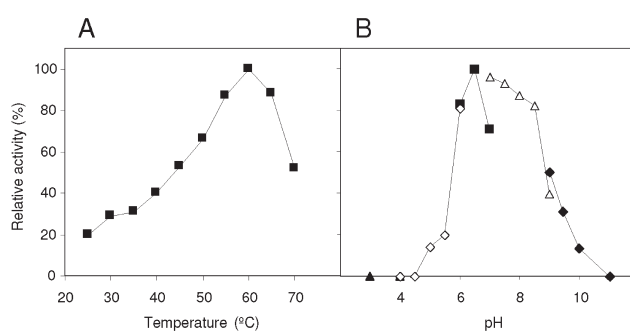


Figure 2. Effect of temperature and pH on Xylanase A activity. **(A)** Effect of temperature on XynA activity. Activity assays were performed under standard conditions at pH 6.5 and temperatures ranging from 25 to 70 °C. **(B)** Effect of pH on XynA activity. Activity assays were performed under standard conditions at 60 °C and pH ranging from 3.0 to 11.0 with citrate buffer (▲), acetate buffer (◇), phosphate buffer (■), Tris buffer (△), and glycine buffer (◆).

Analysis of the effect of temperature and pH on the enzymatic activity of XynA showed that optimal conditions for xylan hydrolysis were 60 °C and pH 6.5 (Figure 2). However, the xylanase showed a good level of activity at alkaline pH, exhibiting more than 60% of its maximum activity at pH 8.5 and showing high activity at pH 9.5 and 60 °C (Figure 2). Stability assays showed that the enzyme was highly stable at alkaline conditions, retaining 77% of initial activity after incubation at pH 8.5 and 50 °C for 3 h (Figure 3).

Products of Xylan Degradation by XynA. The hydrolysis products from xylooligosaccharides and xylans from birchwood, wheat, and *Eucalyptus* were analyzed by thin layer chromatography (TLC). XynA was not active on xylobiose, while longer oligosaccharides were hydrolyzed to xylobiose and xylose as main products (Figure 4). Birchwood glucuronoxylan was cleaved to xylobiose, aldotauroic acid (MeGIAx₃), and xylose as main hydrolysis products in long-term incubations (Figure 5). Main products from wheat arabinoxylan were xylose, xylobiose, and oligosaccharides that migrated among linear xylooligomers, indicating that they were variably substituted with arabinose side chains. A more complex hydrolysis pattern was obtained from acetylated *Eucalyptus* xylan, which was degraded to a mixture of products ranging from long size oligosaccharides up to products of higher mobility than xylose, including products of intermediate

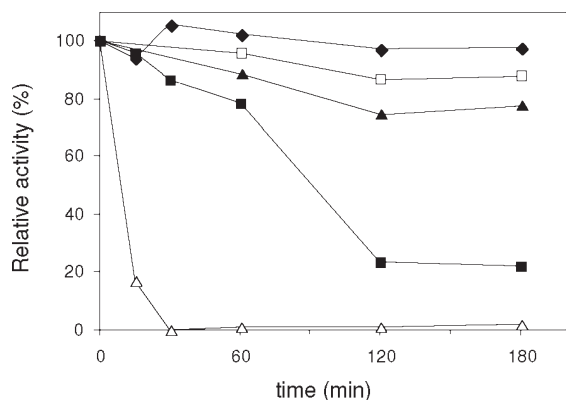


Figure 3. Stability of xylanase A. Thermal stability of XynA at 50 °C and pH 6.5 (◆), 7.5 (□), or 8.5 (▲). Thermal stability of XynA at pH 6.5 and 55 °C (■) or 60 °C (△).

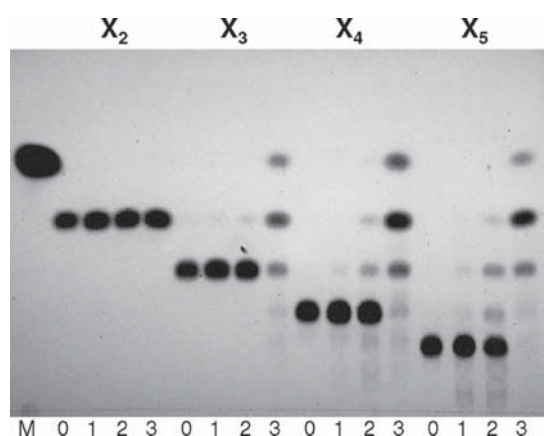


Figure 4. Hydrolysis products from xylooligosaccharides. XynA (0.15 μ M) was incubated at 50 °C and pH 6.5 with 1.5% xylobiose (X_2), xylotri-ose (X_3), xylo-tetraose (X_4), or xylo-pentaose (X_5). Samples were taken at times 0 (lanes 0), 15 min (lanes 1), 60 min (lanes 2), or overnight (lanes 3) and analyzed by thin layer chromatography. Lane M contains a xylose size marker.

mobility, in agreement with the high level of side chain substitution and acetylation of the *Eucalyptus* xylan tested.

DISCUSSION

Xylanase A from *Paenibacillus barcinonensis* was previously evaluated on the bleaching of *Eucalyptus* kraft pulp, showing a remarkable bleach boosting effect, which gives the enzyme a high potential for application in the pulp and paper industry (14). However, the commercial exploitation of the xylanase requires, besides its high effectiveness, the improvement of enzyme yield by the producer microbial host to minimize production costs to competitive prices. Additionally, for a bleaching application the enzyme has to be devoid of contaminant cellulase activity. This makes *Paenibacillus barcinonensis* a poor candidate as xylanase producer for pulp bleaching, as it has an important cellulase activity background. As a strategy to produce the enzyme for this purpose, we isolated the XynA encoding gene and cloned it in *Escherichia coli* under the control of an expressing vector. This also facilitated the purification of the enzyme, which was biochemically characterized.

The recombinant enzyme produced in *E. coli* showed high activity and stability in alkaline conditions. Although the enzyme showed maximum activity at pH 6.5, it was highly active up to

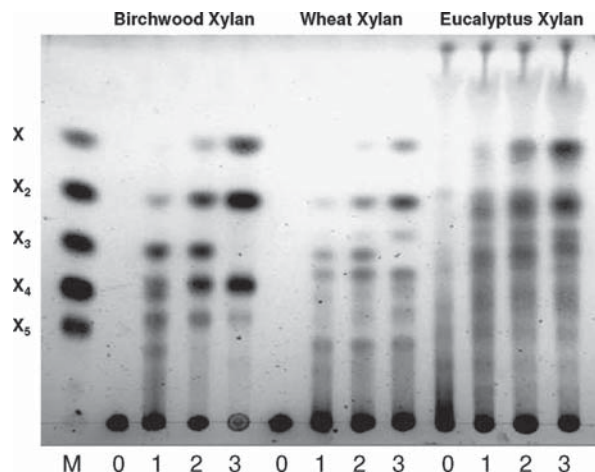


Figure 5. Hydrolysis products from xylans. XynA (1.5 μ M) was incubated at 50 °C and pH 6.5 with 1.5% birchwood xylan, wheat xylan, or *Eucalyptus* xylan. Samples were taken at times 0 (lanes 0), 15 min (lanes 1), 60 min (lanes 2), or overnight (lanes 3) and analyzed by thin layer chromatography. Lane M contains size markers of xylose (X), xylobiose (X_2), xylotri-ose (X_3), xylo-tetraose (X_4), and xylo-pentaose (X_5).

pH 9.5 and remained stable after 3 h of incubation at pH 8.5. The profile of activity and stability at alkaline pH of XynA is clearly different from that of homologous GH10 xylanases, as the xylanase from the uncultured bacterium described by Li et al. (21) and Xyn10A from *Clostridium acetobutylicum* (26) showed low activity above pH 8.0 or were not active at all in these conditions; while biochemical traits of the homologous xylanase from *Paenibacillus* sp. KCTC8848P (22) have not been reported. The pH profile of xylanase A, together with its optimum temperature of 60 °C, make it a good candidate for pulp bleaching, an application where enzymes active and stable at alkaline pH and high temperature, conditions of the industrial process, are required (27–29).

TLC analysis of mode of action of XynA on birchwood glucuronoxylan showed that the enzyme behaves as a typical GH10 xylanase, releasing a mixture of products including aldohexuronic acid as the shortest glucuronic acid substituted oligomer (30). Analysis of hydrolysis pattern on wheat arabinoxylan indicated that XynA is able to cleave in proximity to arabinose side chains, similar to what has been reported for GH10 xylanases from *Cellvibrio mixtus* and *Aspergillus aculeatus*, that release arabinoxylobiose and arabinoxylotri-ose from cereal xylans (31, 32). The production of arabinoxylooligosaccharides (AXOS) is an important focus of research because of their increasing use as ingredients in functional foods and prebiotics (11). On the other hand, the enzyme degraded acetylated xylan from *Eucalyptus* to a complex mixture of oligomers, that should contain both acetyl and glucuronic acid substitutions. At this regard, acetylated xylooligomers have been reported among the hydrolysis products from acetylated glucuronoxylan from beechwood (33). The high activity of XynA on *Eucalyptus* pulp, in agreement with its bleach boosting effect previously reported, is a clear indication of the potential of the enzyme for its application in the pulp and paper industry in template climate countries, where *Eucalyptus* is the main resource for pulp production.

The recombinant clone constructed produced a high level of xylanase activity devoid of the cellulase background produced by the original host. This facilitates the production of XynA to study the optimization of its application in the pulp industry and to test it in other biotechnological applications. However, the industrial production of the enzyme will require a further improvement of

xylanase yield and the expression of the enzyme in a secreting host to facilitate its purification or concentration. In this way, we have developed several cloning vectors for xylanase expression in cellulase deficient strains of *Bacillus subtilis* (34). Current experiments are in progress to construct recombinant strains that produce and secrete high levels of XynA, to test its biotechnological application in industrial processes where alkali active and stable enzymes are required.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Carlos Parajó for his generous gift of eucalyptus xylan.

LITERATURE CITED

- (1) Collins, T.; Gerday, C.; Feller, G. *FEMS Microbiol. Rev.* **2005**, *29*, 3–23.
- (2) Cardona, C.; Quintero, J.; Paz, I. *Bioresour. Technol.* **2009**, *10*, 097. (doi: 10.1016/j.biortech.2009.10.097).
- (3) Gilkes, N. R.; Henrissat, B.; Kilburn, D. G.; Miller, R. C.; Warren, R. A. *Microbiol. Rev.* **1991**, *55*, 303–315.
- (4) Henrissat, B.; Bairoch, A. *Biochem. J.* **1996**, *316* (Pt 2), 695–6.
- (5) Kulkarni, N.; Shendye, A.; Rao, M. *FEMS Microbiol. Rev.* **1999**, *23*, 411–456.
- (6) Polizeli, M. L. T. M.; Rizzatti, A. C. S.; Monti, R.; Terenzi, H. F.; Jorge, J. A.; Amorim, D. S. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *67*, 577–591.
- (7) Viikari, L.; Kantelinen, A.; Sundquist, J.; Linko, M. *FEMS Microbiol. Rev.* **1994**, *13*, 335–350.
- (8) Bajpai, P. *Crit Rev Biotechnol.* **2004**, *24*, 1–58.
- (9) Linko, Y.; Javanainen, P.; Linko, S. *Trends Food Sci. Technol.* **1997**, *8*, 339–344.
- (10) Vázquez, M. J.; Alonso, J. L.; Domínguez, H.; Parajó, J. C. *Trends Food Sci. Technol.* **2000**, *11*, 387–393.
- (11) Grootaert, C.; Van den Abbeele, P.; Marzorati, M.; Broekaert, W. F.; Courtin, C. M.; Delcour, J. A.; Verstraete, W.; Van de Wiele, T. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2009**, *69*, 231–242.
- (12) Blanco, A.; Pastor, F. I. *Can. J. Microbiol.* **1993**, *39*, 1162–1166.
- (13) Sanchez, M. M.; Fritze, D.; Blanco, A.; Sproer, C.; Tindall, B. J.; Schumann, P.; Kroppenstedt, R. M.; Diaz, P.; Pastor, F. I. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2005**, *55*, 935–939.
- (14) Blanco, A.; Vidal, T.; Colom, J. F.; Pastor, F. I. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 4468–4470.
- (15) Sambrook J.; Fritsch E. F.; Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 1989; Vol. 1, pp 2–3.
- (16) Altschul, S.; Madden, T.; Schaffer, A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3389–3402.
- (17) Gallardo, O.; Diaz, P.; Pastor, F. I. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *61*, 226–233.
- (18) Laemmli, U. K. *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
- (19) Gallardo, O.; Diaz, P.; Pastor, F. I. *Curr. Microbiol.* **2004**, *48*, 276–279.
- (20) Blanco, A.; Di-az, P.; Zueco, J.; Parascandola, P.; Javier Pastor, F. I. *Microbiology* **1999**, *145* (Pt 8), 2163–2170.
- (21) Li, R.; Kibblewhite, R.; Orts, W.; Lee, C. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *25*, 2071–2078.
- (22) Lee, H.; Shin, D.; Cho, N. C.; Kim, H.; Shin, S.; Im, S.; Blaise Lee, H.; Chun, S.; Bai, S. *Biotechnol. Lett.* **2000**, *22*, 387–392.
- (23) Nolling, J.; Breton, G.; Omelchenko, M. V.; Makarova, K. S.; Zeng, Q.; Gibson, R.; Lee, H. M.; Dubois, J.; Qiu, D.; Hitti, J.; GTC Sequencing Center Production/Finishing, A. B. T.; Wolf, Y. I.; Tatusov, R. L.; Sabathe, F.; Doucette-Stamm, L.; Soucaille, P.; Daly, M. J.; Bennett, G. N.; Koonin, E. V.; Smith, D. R. *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 4823–4838.
- (24) Baba, T.; Shinke, R.; Nanmori, T. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 2252–2258.
- (25) Fukumura, M.; Sakka, K.; Shimada, K.; Ohmiya, K. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1995**, *59*, 40–64.
- (26) Ali, M. K.; Rudolph, F. B.; Bennett, G. N. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *32*, 12–18.
- (27) Horikoshi, K. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1999**, *63*, 735–750.
- (28) Vieille, C.; Zeikus, G. J. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2001**, *65*, 1–43.
- (29) Beg, Q. K.; Kapoor, M.; Mahajan, L.; Hoondal, G. S. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *56*, 326–338.
- (30) Kolenova, K.; Vrsanska, M.; Biely, P. *Enzyme Microb. Technol.* **2005**, *36*, 903–910.
- (31) Pell, G.; Taylor, E. J.; Gloster, T. M.; Turkenburg, J. P.; Fontes, C. M. G. A.; Ferreira, L. M. A.; Nagy, T.; Clark, S. J.; Davies, G. J.; Gilbert, H. J. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 9597–9605.
- (32) Rantanen, H.; Virkki, L.; Tuomainen, P.; Kabel, M.; Schols, H.; Tenkanen, M. *Carbohydr. Polym.* **2007**, *68*, 350–359.
- (33) Kalogeris, E.; Christakopoulos, P.; Vrsanská, M.; Kekos, D.; Biely, P.; Macris, B. J. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *11*, 491–501.
- (34) Gallardo, O.; Diaz, P.; Pastor, F. I. *J. Biocatal. Biotransform.* **2007**, *25*, 157–162.

Received for review December 28, 2009. Revised manuscript received February 16, 2010. Accepted February 19, 2010. This work was partially supported by the Spanish Ministry of Education and Science, grant No CTQ2007-68003-C02-02/PPQ. Susana Valenzuela held a MAEC-AECI grant from Spanish Ministry of External Affairs. The experiments described in this article have been performed complying with the Spanish current laws.

3.2 Modular Glucuronoxylan-Specific Xylanase with a Family CBM35 Carbohydrate-Binding Module

Susana V. Valenzuela, Pilar Díaz y F. I. Javier Pastor

La xilanasa Xyn30D de la cepa xilanolítica *Paenibacillus barcinonensis* ha sido identificada y caracterizada. La enzima presentó una estructura modular compuesta por un módulo catalítico GH30 y un dominio de unión a carbohidratos CBM35. Al igual que otras xilanasas de familia GH30, Xyn30D fue capaz de hidrolizar eficientemente glucuronoxilano y xilooligosacáridos ramificados con ácido metil glucurónico, pero no arabinoxilano. Los parámetros cinéticos determinados para Xyn30D fueron determinados sobre madera de haya. Se obtuvieron valores de 14,72 mg/ml para la Km y 1.510 para la kcat. La estructura multidominio de Xyn30D la distingue claramente de las xilanasas pertenecientes a la familia GH30 caracterizadas hasta la fecha, todas ellas de dominio único. Los módulos estructurales de Xyn30D fueron expresados individualmente en *Escherichia coli* y posteriormente purificados y caracterizados. El módulo catalítico GH30 presentó una actividad catalítica, modo de acción y parámetros cinéticos similares a los de la enzima completa. El modelo computacional 3D de Xyn30D mostró que el módulo catalítico presenta la típica estructura lateral β_9 adosada a la estructura de barril $(\beta/\alpha)_8$. Se construyeron una serie de mutantes con deleciones crecientes de esta estructura lateral, pero en ninguno de los casos se obtuvo un derivado funcional, indicando la importancia de esta estructura en la catálisis de Xyn30D. Las propiedades de unión del módulo CBM35 fueron analizadas mediante AGE, demostrando la capacidad de este módulo de unirse a las fracciones solubles del glucuronoxilano y arabinoxilano. Los ensayos de ITC demostraron que adicionalmente el módulo CBM35 es capaz de unir ácido glucurónico y que la unión es dependiente de calcio.

La existencia de un CBM35 en una xilanasa específica de glucuronoxilano es un rasgo diferencial de la enzima caracterizada.

Modular Glucuronoxylan-Specific Xylanase with a Family CBM35 Carbohydrate-Binding Module

Susana Valeria Valenzuela, Pilar Diaz and F. I. Javier Pastor
Appl. Environ. Microbiol. 2012, 78(11):3923. DOI:
10.1128/AEM.07932-11.
Published Ahead of Print 23 March 2012.

Updated information and services can be found at:
<http://aem.asm.org/content/78/11/3923>

SUPPLEMENTAL MATERIAL

These include:

<http://aem.asm.org/content/suppl/2012/04/27/78.11.3923.DC1.html>

REFERENCES

This article cites 46 articles, 13 of which can be accessed free
at: <http://aem.asm.org/content/78/11/3923#ref-list-1>

CONTENT ALERTS

Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new
articles cite this article), [more»](#)

Information about commercial reprint orders: <http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

Modular Glucuronoxylan-Specific Xylanase with a Family CBM35 Carbohydrate-Binding Module

Susana Valeria Valenzuela, Pilar Diaz, and F. I. Javier Pastor

Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Xyn30D from the xylanolytic strain *Paenibacillus barcinonensis* has been identified and characterized. The enzyme shows a modular structure comprising a catalytic module family 30 (GH30) and a carbohydrate-binding module family 35 (CBM35). Like GH30 xylanases, recombinant Xyn30D efficiently hydrolyzed glucuronoxylans and methyl-glucuronic acid branched xylo-oligosaccharides but showed no catalytic activity on arabinose-substituted xylans. Kinetic parameters of Xyn30D were determined on beechwood xylan, showing a K_m of 14.72 mg/ml and a k_{cat} value of 1,510 min⁻¹. The multidomain structure of Xyn30D clearly distinguishes it from the GH30 xylanases characterized to date, which are single-domain enzymes. The modules of the enzyme were individually expressed in a recombinant host and characterized. The isolated GH30 catalytic module showed specific activity, mode of action on xylan, and kinetic parameters that were similar to those of the full-length enzyme. Computer modeling of the three-dimensional structure of Xyn30D showed that the catalytic module is comprised of a common (β/α)₈ barrel linked to a side-associated β -structure. Several derivatives of the catalytic module with decreasing deletions of this associated structure were constructed. None of them showed catalytic activity, indicating the importance of the side β -structure in the catalysis of Xyn30D. Binding properties of the isolated carbohydrate-binding module were analyzed by affinity gel electrophoresis, which showed that the CBM35 of the enzyme binds to soluble glucuronoxylans and arabinoxylans. Analysis by isothermal titration calorimetry showed that CBM35 binds to glucuronic acid and requires calcium ions for binding. Occurrence of a CBM35 in a glucuronoxylan-specific xylanase is a differential trait of the enzyme characterized.

Biodegradation of xylan, which constitutes approximately one-third of the renewable organic carbon on earth (15), is a critical step in the recycling of carbon in nature and has been targeted as a subject of intense research as a renewable energy resource and for the bioconversion of plant biomass into high-added-value products (34, 46, 48). Catalytic breakdown of xylan is a complex process that requires the coordinated action of several enzymes, among which xylanases (1,4- β -D-xylan xylanohydrolase; EC 3.2.1.8), cleaving internal linkages on the β -1,4-xylose backbone, play a key role. The complex chemical nature and heterogeneity of xylan can account for the multiplicity of xylanases produced by microorganisms (11, 26). The activity of different xylanases with subtle differences in substrate specificities and modes of action contributes to improving the degradation of plant xylan in natural habitats.

Most of the xylanases characterized to date are grouped into glycoside hydrolase families GH10 and GH11 (CAZy) (20). These xylanases do not seem to be specialized for hydrolysis of a particular type of xylan, because they are able to degrade hardwood glucuronoxylans, cereal arabinoxylans, and even algal β -1,4- β -1,3-xylan (2, 25, 32). Recently, three xylanases belonging to family GH30 have been biochemically characterized in detail. The enzymes, XynA from *Erwinia chrysanthemi* (47), XynC from *Bacillus subtilis* (38), and Xyn5B from *Bacillus* sp. BP-7 (18) are specific for glucuronoxylan, as they hydrolyze this polymer but are not active on arabinose branched xylan. Analysis of the three-dimensional (3D) structure of these enzymes suggests that the accommodation of a xylopyranosyl residue substituted with methyl-glucuronic acid in the -2 subsite of the catalytic cleft is a specificity determinant (40, 43). GH30 xylanases must play an important role in complementing the action of GH10 and GH11 enzymes in the depolymerization of glucuronoxylans in plant biomass.

Glycosyl hydrolases frequently display a modular structure comprising catalytic and ancillary modules, such as carbohydrate-

binding modules (CBM). Similar to catalytic modules, CBMs are also classified into families based on amino acid sequence homologies (CAZy). The general function of CBMs is to promote the interaction of the enzymes with their target substrates, thereby potentiating their catalytic efficiency (8, 42). Analysis of binding properties of CBMs of family 35 suggests that these modules can direct the enzymes to regions of the plant that are being actively degraded (30). Many xylanases are modular enzymes containing one or more CBM. These noncatalytic modules found in xylanases belong to different families and recognize a diversity of ligands, including xylans, xylose oligomers, and carbohydrates that are not substrates of the xylanases, such as cellulose, in close proximity to xylan in the plant cell wall (7, 8, 17).

Paenibacillus barcinonensis is a recently identified xylanolytic bacteria (36) which produces a set of xylanases, some of which have been successfully evaluated in paper biotechnology (4, 45). Three of these enzymes, Xyn10A, Xyn10B, and Xyn10C, have been cloned and characterized (5, 19, 44). In this study, we describe the identification and cloning of a fourth xylanase from the strain, Xyn30D. Like the few examples of xylanases of family GH30, the enzyme shows specificity for glucuronoxylans, but unlike GH30 xylanases, which are single-domain enzymes, Xyn30D has a modular structure. This xylanase has a carbohydrate-binding module of the CBM35 family which is rarely found in known xylanases,

Received 20 December 2011 Accepted 17 March 2012

Published ahead of print 23 March 2012

Address correspondence to F. I. Javier Pastor, fpastor@ub.edu.

Supplemental material for this article may be found at <http://aem.asm.org/>.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.07932-11

making this enzyme even more unique. These features of Xyn30D suggest that it degrades glucuronoxytan and must therefore have a special role in the bioconversion of xylan-containing biomass into fermentable products.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and plasmids. *Paenibacillus barcinonensis* was grown as described previously (3). Supernatants of 2-day-old cultures of the strain in 100 ml of BM medium (0.6% Na₂HPO₄, 0.3% KH₂PO₄, 0.05% NaCl, 1 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂, 0.1% yeast extract, 0.25% urea) containing 0.5% glucose or birchwood xylan were cleared by centrifugation and filtered through a 0.22- μ m-pore-size membrane (Whatman). Supernatant proteins were collected by precipitation with 10% (wt/vol) trichloroacetic acid at 4°C overnight and centrifugation at 14,000 \times g for 2 h at 4°C. Pellets were washed three times with 70% cold ethanol, dried, and resuspended in 400 μ l of urea rehydration buffer (8 M urea, 18 mM Tris-HCl [pH 8.0], 4% 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate [CHAPS], 0.01% blue bromophenol). Samples were then analyzed by two-dimensional electrophoresis in duplicated gels that were stained for proteins or developed as zymograms for enzyme activity. The proteins that showed xylanase activity were excised from the gels, trypsin digested, and analyzed by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) using a Voyager DE-PRO (Applied Biosystems) instrument as described elsewhere (23). A peptide with sequence homology to a xylanase from *Aeromonas caviae* (31) was identified. Degenerated primers deduced from the sequence of the enzyme allowed for the amplification of a portion of a *P. barcinonensis* gene encoding a xylanase, Xyn30D, whose complete sequence was obtained by gene walking from the DNA fragment amplified using the Genome Walker universal kit (Clontech).

To overexpress wild-type xylanase, *xyn30D* was PCR amplified (Kapa-HiFi, KAPABiosystems) with the oligonucleotide primers FWwt (5' CAC CATGAAGATGGGATTCA 3') and BWwt (5' CGCGGAGGCCGTTAC TGTA 3') and cloned in pET101/D-TOPO (Invitrogen), giving rise to the recombinant plasmid pET101Xyn30D, which produced the full-length enzyme containing a signal peptide and linked to a C-terminal His₆ tag (Xyn30D). A similar strategy was used to clone and overexpress the catalytic module of the enzyme. Oligonucleotide primers FWwt and BWcat (5' GTTAGCAACAAATGTTGTACA 3') were used to amplify and clone the catalytic module in the plasmid or pET101Xyn-CM, which produced the catalytic module linked to a C-terminal His₆ tag (Xyn-CM). The DNA encoding the carbohydrate-binding module was amplified with the oligonucleotide primers FWcbm (5' CATATGGCTAGCCTCTCTGG TGTAACA 3') and BWcbm (5' AAGGATCCTTAGGAGGCCGTTACT GTAA 3'), which contained NheI and BamHI restriction sites, respectively. The amplified fragment was cloned into pET28a doubly digested with NheI and BamHI (Roche) to give rise to the recombinant plasmid pET28aXyn-CBM35 that produced the carbohydrate-binding module with an N-terminal His₆ tag (Xyn-CBM35).

Amplified DNA (Expand Hi Fidelity; Roche) encoding Xyn30D, Xyn-CM, Xyn30D Δ 414, Xyn30D Δ 399, Xyn30D Δ 372, or Xyn30D Δ 344, was directly cloned in pGEM-T Easy vector (Promega) in *Escherichia coli* DH5 α as the host strain. All the amplifications were performed with the same FWpgem primer (5' GAGGAGGGTAACGTATGAAG 3'), while the BW primers used were BWwtpgem (5' TTAGGAGGCCGTTACTGTAA 3'), BWcatpgem (5' GTTAGCAACAAATGTTGTACA 3'), BW414 (5' TTAACCTGTGTGGAAGCTGAG 3'), BW399 (5' TTAATCGGTG CAAGCTTGCCA 3'), BW372 (5' TTAACACCGCTGACTAGCT GCCG 3'), and BW344 (5' TTAATTGGTATCCGGGTTTTTG 3'). All DNA constructs were verified by sequencing. Sequence homology was analyzed by BLAST.

Expression and purification of recombinant proteins in *E. coli*. Xyn30D, Xyn-CM, and Xyn-CBM35 were purified from *E. coli* BL21Star(DE3) recombinant clones containing plasmids pET101Xyn30D, pET101Xyn-CM, or pET28aXyn-CBM35, respectively. Exponential-

phase cultures (optical density at 600 nm [OD₆₀₀] of 0.6) were induced with 1 mM IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) at 37°C for 3 h. Cells were disrupted by using a French press. The recombinant His₆ tag proteins were purified from cell extracts by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) using HisTrap HP columns of 1 ml (GE Healthcare) and eluted in 20 mM phosphate buffer (pH 7.4) with a 0 to 500 mM imidazole gradient, on a fast protein liquid chromatography system (AKTA FPLC; GE Healthcare). Buffer exchange and protein concentration were performed in Centricon centrifugal filter units of 3-kDa molecular mass cutoff (Millipore).

Enzyme assays. Xylanase activity was assayed by measuring the amount of reducing sugar released from xylan from hardwoods or cereals by the Nelson-Somogyi method (37). The standard assay was performed at 50°C in phosphate buffer (pH 6.5) for 15 min as described previously (44). Birchwood, beechwood, and oat spelt xylans and 4-O-methyl-glucuronoxytan were purchased from Sigma Chemical. Rye and wheat arabinoxylans were purchased from Megazyme. One unit of enzymatic activity was defined as the amount of enzyme that releases 1 μ mol of reducing sugar equivalent per min under the assay conditions described. A standard curve of xylose was used to calculate activity units. The Britton-Robinson buffer in a pH range between 3.0 and 12.0 was used to study the optimum pH (10). Protein concentration of the samples was determined using the Bradford method (9). All determinations of enzyme activity were made in triplicate.

Gel electrophoresis and zymograms. For two-dimensional electrophoresis, proteins were first separated by isoelectric focusing (IEF) on immobilized pH gradient (IPG) strips (7 cm, pH 3 to 10; Amersham Biosciences). The strips were previously rehydrated for 6 h at room temperature. Samples of 50 μ g of protein in urea rehydration buffer (8 M urea, 18 mM Tris-HCl [pH 8.0], 4% CHAPS, 0.01% blue bromophenol) were loaded onto the strips, and IEF was performed at 30 V for 6.5 h, 500 V for 1 h, 1,000 V for 1 h, and 5,000 V for 7 h in an IPGphor System (Amersham Biosciences). After being run, the strips were equilibrated for 15 min with a buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.8), 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, and 10 mg/ml dithiothreitol (DTT) followed by a 15-min wash with the same buffer but containing 25 mg/ml iodoacetamide. For the second dimension, the strips were loaded onto SDS-PAGE 12% (wt/vol) polyacrylamide gels and were run at 25 V for 10 min and 120 V for 1 h. For zymogram analysis, gels were soaked in 2.5% (wt/vol) Triton X-100 for 30 min, washed in 50 mM phosphate buffer (pH 6.0) for 30 min, overlaid with agarose gels containing 0.2% birchwood xylan, and incubated at 50°C for 30 min. Agarose gels were then stained with 0.1% (wt/vol) Congo red for 15 min and washed with 1 M NaCl until xylanase spots became visible. For protein staining, SDS-PAGE gels were stained with 0.2% (wt/vol) Coomassie brilliant blue R-350.

To analyze the electrophoretic homogeneity of purified proteins, SDS-PAGE was performed in 15% (wt/vol) polyacrylamide gels essentially as described by Laemmli (27). For detection of xylanase activity, zymogram analysis was performed in SDS-PAGE gels containing 0.2% (wt/vol) birchwood xylan as described previously (44).

Affinity gel electrophoresis (AGE) was performed by following the method of Correia et al. (12). Continuous native polyacrylamide gels containing 7.5% acrylamide in 25 mM Tris-250 mM glycine buffer (pH 8.3) were used. Soluble xylan (2 to 4 mg/ml) was included in gels before polymerization. Gels, with and without xylan, were polymerized at the same time and were run in the same gel tank. About 6 μ g of target protein was loaded in each well at room temperature, and gels were run at 10 mA/gel for 2 h. Bovine serum albumin (BSA) was used as a negative noninteracting control.

Binding to insoluble polysaccharides. Binding activity to insoluble polysaccharides was assessed as described by Hogg et al. with some modifications (21). Briefly, 250 μ g of purified Xyn30D, Xyn-CM, or Xyn-CBM35 was mixed with 25 mg of Avicel or insoluble oat spelt xylan in a final volume of 500 μ l of 50 mM phosphate buffer (pH 6.5) in 1.5-ml microcentrifuge tubes. The samples were incubated for 1 h at 4°C with

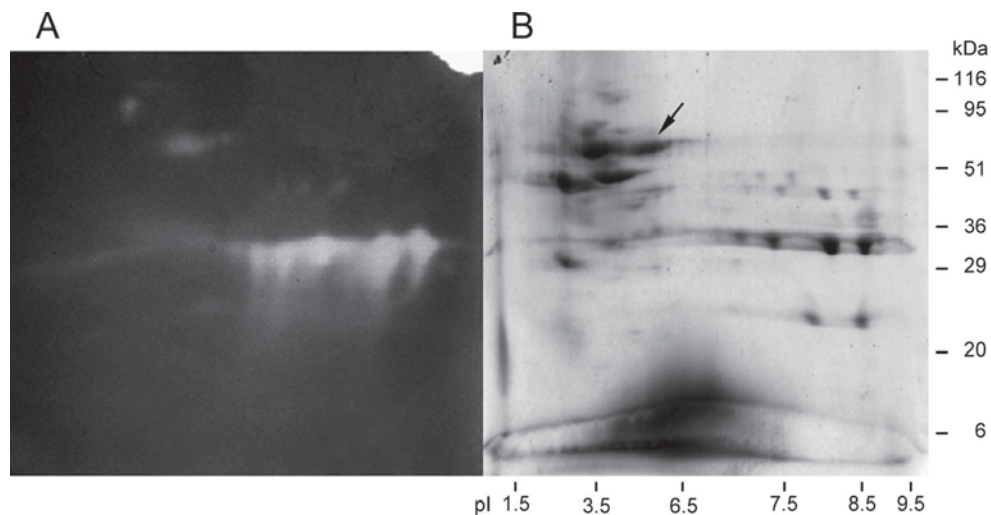


FIG 1 Secretome analysis of *Paenibacillus barcinonensis* by two-dimensional electrophoresis. (A) Zymogram of activity on birchwood xylan. (B) Protein-stained two-dimensional SDS polyacrylamide gel. The arrow points to Xyn30D. The positions of molecular mass standards and pI markers are indicated.

gentle orbital mixing. Samples were then centrifuged at $18,000 \times g$ for 20 min, and supernatants, containing unbound protein, were carefully removed. Pellets were washed three times with 400 μ l of the same buffer, before being resuspended in 400 μ l of 10% SDS and boiled for 10 min to release bound protein. Samples were then analyzed by SDS-PAGE on 10 to 15% (wt/vol) polyacrylamide gels.

ITC. Isothermal titration calorimetry (ITC) was conducted using a VP-ITC (MicroCal) by following the method of Bolam et al. (6). During the titration, Xyn-CBM35 (120 to 180 μ M) in 50 mM HEPES buffer (pH 7.0) supplemented or not with 5 mM CaCl_2 , stirred at 300 rpm in a 1.3586-ml reaction cell maintained at 25°C, was injected with 42 successive aliquots of 7 μ l of 3 mM glucuronic acid or polysaccharide at 5 to 25 mg/ml at 200-s intervals. The apo form of Xyn-CBM35, obtained by treatment with Chelex, was titrated against 3 mM CaCl_2 to determine whether calcium bound independently to the protein. The results were analyzed by nonlinear regression using a single-site-binding model (Microcal Origin, version 5.0). Thermodynamic parameters were calculated using the standard thermodynamic equation: $-RT \ln K_a = \Delta G = \Delta H - T\Delta S$, where ΔG , ΔH , and ΔS are the changes in free energy, enthalpy, and entropy of binding, respectively, T is the absolute temperature, and R equals 1.98 cal $\text{mol}^{-1} \text{K}^{-1}$.

Analysis of hydrolysis products from xylan and xylooligosaccharides. Thin-layer chromatography (TLC) was performed as previously described (19). Neutral xylooligosaccharides and the aldouronic acid mixture standard were purchased from Megazyme. Aldotetraouronic acid 4-*O*-methyl- α -D-glucuronosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-xylose (MeGlcA³Xyl₃) and aldopentaouronic acid β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[4-*O*-methyl- α -D-glucuronosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-xylose (MeGlcA³Xyl₄) were a gift from Peter Biely. For the analysis of mode of action on glucuronoxylans, Xyn30D (1.7 μ M) or Xyn-CM (1.7 μ M) was incubated with 1.5% birchwood or beechwood xylan at 50°C in 50 mM phosphate buffer (pH 6.5) for 18 h. The mode of action on branched xylooligosaccharides was analyzed by incubating (1.7 μ M) Xyn30D with (7.7 mM) xylooligosaccharides in the same conditions. The reactions were stopped by heating for 15 min at 90°C. All samples and markers were adjusted at pH 6.5 before loading.

For the analysis of xylan hydrolysis products by MALDI-TOF MS, 1 μ l of hydrolysates was mixed with 1 μ l of matrix solution (10 mg/ml 2,5-dihydroxybenzoic acid dissolved in acetonitrile-water [1:1, vol/vol], 0.1% [wt/vol] trifluoroacetic acid). One microliter of the mixture was spotted onto the MALDI-TOF MS plate and allowed to dry before the analysis.

Positive mass spectra were collected with a 4800 Plus MALDI TOF/TOF (ABSciex 2010) spectrometer with an Nd:YAG 200-Hz laser operated at 355 nm.

Bioinformatics tools. The iCODEHOP version 1.1 tool was used to design PCR primers from protein multiple sequence alignments (<http://dbmi-icode-01.dbmi.pitt.edu/i-codehop-context/Welcome>). BLAST searches were performed for DNA or protein sequence analysis, including domain classification (1). Putative signal peptide was identified through SignalP 3.0 (16) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). 3D structure homology models were generated with SwissModel software (<http://swissmodel.expasy.org/>) based on template *gtmA*, corresponding to XynC from *Bacillus subtilis* 168. Pymol software (The PyMOL Molecular Graphics System, version 1.2r3pre; Schrödinger, LLC) was used to visualize the 3D protein models. The ExpASY proteomics server (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>) was used to analyze the protein physicochemical parameters (ProtParam tool).

Nucleotide sequence accession number. The DNA sequence of *xyn30D* gene was submitted to the GenBank database under accession number JQ178343.

RESULTS

Cloning and sequence analysis of Xyn30D. Supernatants of *Paenibacillus barcinonensis* cultures on BM medium, supplemented or not with 0.5% birchwood xylan, were analyzed in two-dimensional SDS polyacrylamide gels that were also developed for enzyme activity by zymography. Several protein spots were identified that appeared only in the xylan-supplemented cultures (Fig. 1). Those that showed xylanase activity in the zymograms were analyzed by MALDI-TOF MS to determine their amino acid sequence. One of the identified xylanases contained a peptide with sequence homology to a xylanase from *Aeromonas caviae* (31). Degenerated primers deduced from the sequence of this enzyme allowed amplification of a portion of the gene encoding a new xylanase from *P. barcinonensis* (Xyn30D), whose complete sequence was obtained by gene walking from the DNA fragment amplified. The open reading frame identified (1,686 bp) encodes a protein of 562 amino acids that shows an N-terminal region of 32 amino acids with the features of a signal peptide. The predicted molecular mass and isoelectric point of the mature protein are 58.5 kDa and 5.9, respectively. Sequence comparison to proteins

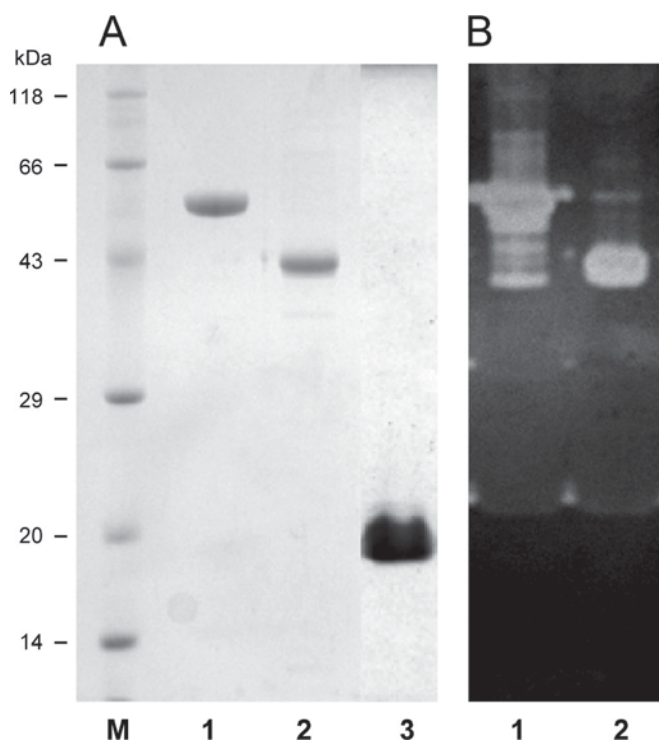


FIG 2 SDS-PAGE analysis of Xyn30D, Xyn-CM, and Xyn-CBM35. (A) Protein staining; (B) zymogram of xylanase activity. Lanes: 1, purified Xyn30D; 2, purified Xyn-CM; 3, purified Xyn-CBM35; M, positions of molecular mass standards.

contained in the NCBI database revealed that the enzyme is a modular xylanase composed of a catalytic module of family 30 of glycosyl hydrolases, GH30, and a carbohydrate-binding module of family 35, CBM35. The modular xylanase was named Xyn30D. It shows high homology to xylanase D from *Aeromonas caviae* ME-1 (41) and endoxylanase from *Aeromonas caviae* W-61 (31) (92 and 90% identity, respectively). The catalytic module of *P. barcinonensis* Xyn30D shows homology to the biochemically characterized GH30 xylanases XynC from *Bacillus subtilis* (38), Xyn5B from *Bacillus* sp. BP-7 (18), and XynA from *Erwinia chrysanthemi* (22, 47) (81, 79, and 41% identity, respectively), while the carbohydrate-binding module of *P. barcinonensis* Xyn30D shows 41% identity to CBM35 from exo- β -D-glucosaminidase C_{sxa} from *Amycolatopsis orientalis* (14), 38% identity to rhamnolacturonan acetyl esterase Rgae12A from *Clostridium thermocellum* (Che_3141), and 35% identity to CBM35 from Xyn10B from *Cellvibrio japonicus* (24).

Properties of the enzyme. *xyn30D* was cloned under the control of the high expression T7 promoter from plasmid pET101 in *E. coli* BL21Star(DE3) to produce a fusion protein of full-length Xyn30D to a C-terminal His tag. A similar construction was performed to clone and overexpress the individual catalytic module GH30 (Xyn-CM). The carbohydrate-binding module CBM35 was cloned in pET28a to produce a fusion protein of this module to an N-terminal His tag (Xyn-CBM35). The three recombinant proteins Xyn30D, Xyn-CM, and Xyn-CBM35 were purified to near homogeneity from cell extracts of the corresponding clones by IMAC (Fig. 2).

Purified Xyn30D was analyzed by SDS-PAGE, isoelectric fo-

cusing, and zymographic analysis showing an apparent molecular mass of 59 kDa and a pI of 6.0, in accordance with those deduced from the amino acid sequence. Substrate specificity of Xyn30D was determined by evaluating the activity of the enzyme on xylans, other polysaccharides, and aryl-glycosides. The enzyme showed high hydrolytic activity on glucuronic acid branched xylans (glucuronoxylans). Beechwood xylan was the preferred substrate, on which a specific activity of 30.3 xylanase units/mg was found (Table 1). In contrast, the enzyme did not show detectable activity on arabinoxylans from oat spelt, rye, and wheat. Nor did it show activity on any of the other polysaccharides tested, such as crystalline or amorphous celluloses, *p*NP- β -D-xylopyranoside (*p*NPX), or other aryl-glycosides, like *p*NPG and *p*NPAf. Purified Xyn-CM showed identical substrate specificity to the full-length enzyme.

Kinetic parameters of Xyn30D and Xyn-CM on beechwood xylan were determined. The two enzymes showed similar values: Xyn30D showed a K_m of 14.72 mg/ml and a k_{cat} value of 1,510 min^{-1} , while Xyn-CM showed a K_m of 14.93 mg/ml and a k_{cat} value of 2,024 min^{-1} . The results indicate that the carbohydrate-binding module CBM35 comprised in Xyn30D is not essential for hydrolytic activity of the enzyme under these conditions and on the substrates tested.

Analysis of the effect of pH and temperature on the hydrolytic activity of Xyn30D and Xyn-CM on beechwood xylan showed similar pH and temperature profiles. Optimal conditions for activity of the two enzymes were 50°C and pH 6.5 (Fig. 3). Thermostability assays showed that Xyn30D remained highly stable up to 50°C after 3 h of incubation at pH 6.5, while Xyn-CM lost 30% of its initial activity after incubation under these conditions. Analysis of the influence of pH on enzyme stability showed that while Xyn30D retained more than 70% of its initial activity after incubation at 50°C for 3 h in buffers ranging from pH 6.0 to 8.0, Xyn-CM was less stable under these conditions, losing more than 50% of its initial activity in buffers at pH lower than 6.0 or higher than 7.0.

Analysis of the 3D structure of xylanases of family GH30 reveals that they all have a $(\beta/\alpha)_8$ barrel catalytic module fused to a side β -structure of nine strands, denominated side-associated β -domain (28, 39). Computer modeling of the 3D structure of Xyn30D showed a similar structure of a $(\beta/\alpha)_8$ barrel with an associated β -domain (see Fig. S1 in the supplemental material). The first strand (β s1) was located at the N terminus of the mature enzyme, amino acids 4 to 7, while the strands β s2 to β s9 were located between the end of the $(\beta/\alpha)_8$ barrel and the beginning of the CBM35 module, covering Gly331 to Asn421. To evaluate the role of the side β -structure in the catalytic activity of the enzyme, a series of derivatives of the recombinant catalytic module, Xyn-

TABLE 1 Substrate specificity of Xyn30D and Xyn-CM

| Substrate | Activity (U/mg) ^a | |
|---------------------------|------------------------------|------------|
| | Xyn30D | Xyn-CM |
| Beechwood xylan | 30.3 ± 1.5 | 27.7 ± 2.1 |
| Birchwood xylan | 28.2 ± 2.1 | 27.2 ± 3.2 |
| Oat spelt xylan | ND | ND |
| 4-O-methyl-glucuronoxylan | 19.2 ± 1.8 | 17.5 ± 2.5 |
| Wheat arabinoxylan | ND | ND |
| Rye arabinoxylan | ND | ND |

^a ND, not detected.

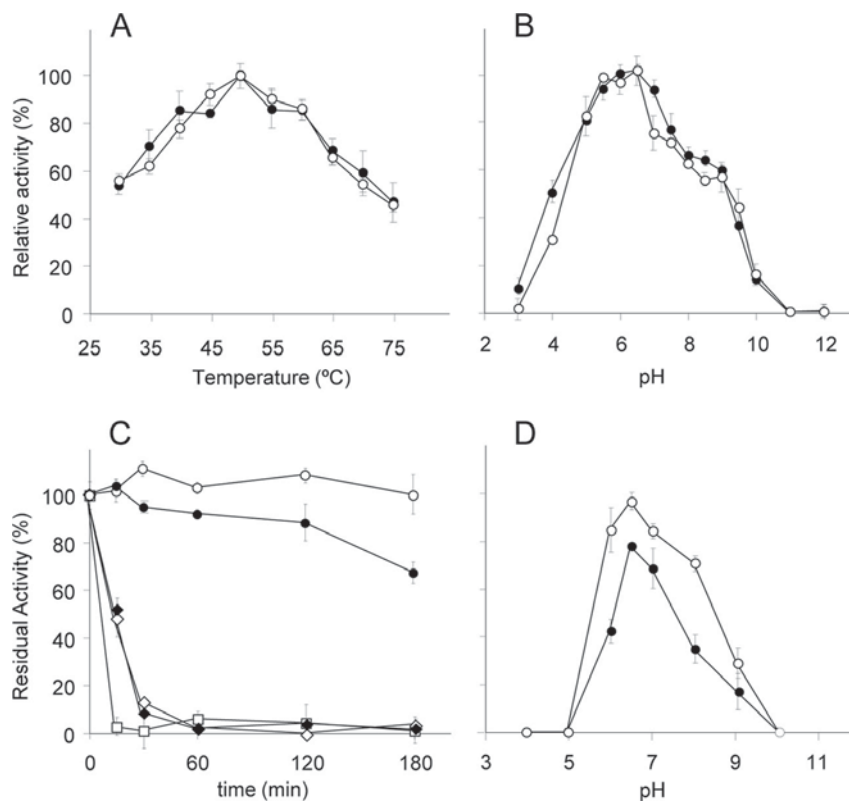


FIG 3 Effect of pH and temperature on activity and stability of Xyn30D and Xyn-CM. (A) Effect of temperature on activity of Xyn30D (○) and Xyn-CM (●); (B) effect of pH on activity of Xyn30D (○) and Xyn-CM (●); (C) effect of temperature on stability of Xyn30D (open symbols) and Xyn-CM (closed symbols). The samples were incubated in 50 mM phosphate buffer (pH 6.5) at 50°C (○, ●), 55°C (◇, ◆), or 60°C (□, ■), and residual activity after different time intervals was determined. (D) Effect of pH on stability of Xyn30D (○) and Xyn-CM (●). The samples were incubated at 50°C in buffers at different pH for 3 h, and residual activity was determined.

CM, lacking an increasing portion of the β -structure, ranging from only the β s9 strand up to the removal of the seven strands β s3 to β s9, were constructed. Similar to the strategy used to over-express Xyn30D and Xyn-CM, the truncated derivatives were cloned in *E. coli* BL21Star(DE3) using the expression vector pET101. All the clones showed high expression of the recombinant proteins, which appeared in the insoluble fraction of cell extracts probably as a result of the formation of inclusion bodies. As different approaches to avoid their formation were unsuccessful, the truncated derivatives, as well as Xyn30D and Xyn-CM, were cloned in a different host strain (*E. coli* DH5 α) and vector (pGEM-T Easy). While Xyn30D and Xyn-CM were expressed in an active form, none of the recombinant clones of the truncated derivatives showed hydrolytic activity on xylan, indicating that a full-length side β -structure is required for enzyme activity of Xyn30D (Table 2).

TABLE 2 Enzymatic activity of deleted derivatives of Xyn30D

| Construction | Amino acids | Activity ^a |
|--------------------|-------------|-----------------------|
| Xyn30D | 1–562 | + |
| Xyn-CM | 1–421 | + |
| Xyn30 Δ 414 | 1–414 | – |
| Xyn30 Δ 399 | 1–399 | – |
| Xyn30 Δ 372 | 1–372 | – |
| Xyn30 Δ 344 | 1–344 | – |

^a +, active; –, not active.

Mode of action of Xyn30D. Hydrolysis products released by the enzyme from glucuronoxylans were analyzed by thin-layer chromatography. Birchwood and beechwood xylans were degraded to a mixture of products of intermediate mobility between linear xylooligosaccharides, indicating that they are methylglucuronic acid-substituted xylooligomers (aldouronic acids) (Fig. 4). To characterize these products better, the hydrolysate of beechwood xylan was also analyzed by MALDI-TOF MS. The mass spectrum showed the presence of molecular ions of substituted xylooligomers identified as sodium and potassium adducts (see Fig. S2 in the supplemental material and Table 3). The major ions corresponded to substituted xylooligosaccharides consisting of 2 to 8 xylopyranosyl residues and a single MeGlcA residue, indicating that they are aldouronic acids, in accordance with the results of the TLC analysis. Xyn-CM gave a similar pattern of hydrolysis products (see Fig. S2).

Purified Xyn30D hydrolyzed aldopentaouronic acid (MeGlcA³Xyl₅) to xylose and aldopentaouronic acid (MeGlcA³Xyl₄) acid was shortened to aldopentaouronic acid by the enzyme. This is in accordance with the proposed mode of action of GH30 xylanases on glucuronic acid-substituted substrates (38, 47). In contrast to the activity found on substituted oligomers, Xyn30D did not show activity on linear xylooligomers.

Binding to polysaccharides. Binding of Xyn30D to insoluble polysaccharides was tested. Avicel and insoluble oat spelt xylan were mixed with Xyn30D, and after 1 h of incubation the fractions

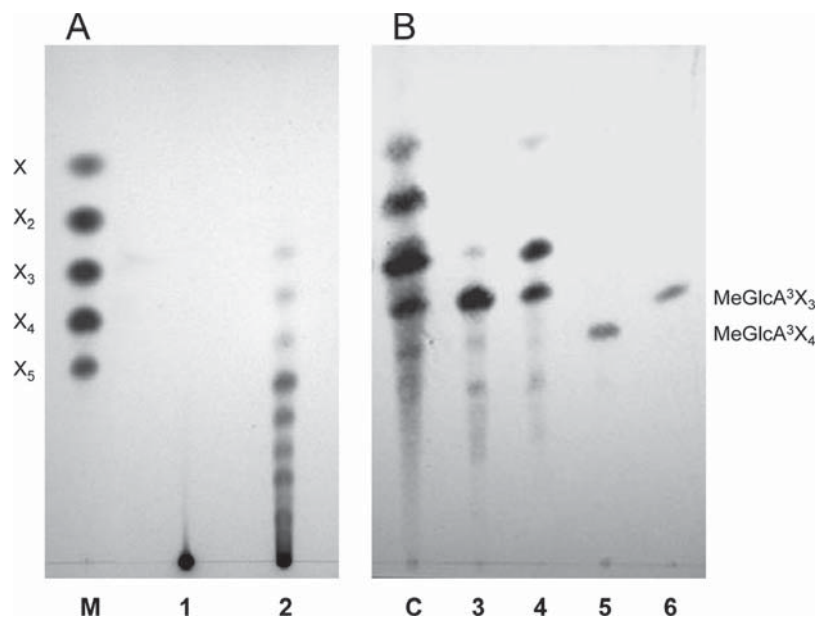


FIG 4 Thin-layer chromatography analysis of the mode of action of Xyn30D. (A) Hydrolysis products from beechwood xylan. Lanes: 1, control, no digested samples; 2, products of xylan hydrolysis by Xyn30D; M, size markers of xylose (X), xylobiose (X_2), xylotriose (X_3), xylo-tetraose (X_4), and xylopentaose (X_5). (B) Hydrolysis products from glucuronic acid-substituted xylooligomers. Lanes: 3, control, no digested aldotetrauronic acid ($\text{MeGlcA}^3\text{Xyl}_3$); 4, products of aldotetrauronic acid hydrolysis by Xyn30D; 5, control, no digested aldopentaauronic acid ($\text{MeGlcA}^3\text{Xyl}_4$); 6, products of aldopentaauronic acid hydrolysis by Xyn30D; C, size markers of a mixture containing aldotetrauronic, aldotriouronic, and aldobiouronic acids and xylose.

bound or unbound to the insoluble polymers were separated by centrifugation and analyzed by SDS-PAGE. Xyn30D bound to insoluble oat spelt xylan, since almost all the enzyme was found adsorbed on the polymer, while none was found in the supernatant and wash fractions (Fig. 5). In contrast, the enzyme did not bind to Avicel, as the protein remained in the supernatants and only a very small amount was detected adsorbed on Avicel. The binding properties of Xyn-CM and Xyn-CBM35 to Avicel and insoluble xylan were also analyzed. As in the case of Xyn30D, purified Xyn-CM and Xyn-CBM35 bound to insoluble oat spelt xylan, although the binding was less efficient. A large amount of Xyn-CM and Xyn-CBM35 adsorbed to the polymer, while a smaller amount remained in the nonadsorbed fraction (Fig. 5). In contrast, Xyn-CM and Xyn-CBM35 did not bind to Avicel.

To evaluate the adsorption capacity of the enzyme to soluble polysaccharides, the binding of the purified carbohydrate-binding module, Xyn-CBM35, to soluble fractions of wheat arabinoxylan, oat spelt, and beechwood xylans was analyzed using affinity gel electrophoresis. Migration of Xyn-CBM35 in gels containing sol-

uble xylans was retarded compared with the migration of the protein in gels without xylan (Fig. 6). Beechwood xylan produced the higher retardation of Xyn-CBM35 in the gels, while oat spelt xylan and wheat arabinoxylan retarded migration in similar ways.

To analyze the binding specificity of Xyn-CBM35 in more detail, isothermal titration calorimetry (ITC) was used to quantify the binding of the protein to soluble xylans and to glucuronic acid, present in variable quantities in glucuronoxylans and arabinoxylans (33). Titration of Xyn-CBM35 with glucuronic acid is shown in Fig. 7. Xyn-CBM35 bound to glucuronic acid with a stoichiometry of 1:1 and an association constant (K_A) of $1.12 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. No binding was detected in the absence of calcium added to buffer, indicating that divalent ions were required for binding. To investigate the role of the calcium in ligand binding in more detail, an apo form of Xyn-CBM35 was produced by treating the protein with Chelex. ITC analysis showed that the apo form of Xyn-CBM35 bound to Ca^{+2} with a stoichiometry of 1:1 and a K_A of $1.12 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (Fig. 7). Binding of Xyn-CBM35 to soluble beech and oat spelt xylans was also analyzed by ITC, but it was not strong enough to be quantified by this technique.

TABLE 3 Oligosaccharides identified by MALDI-TOF MS after hydrolysis of beechwood xylan by Xyn30D

| Xylooligomer | M_r^a | m/z | | |
|----------------------|---------|---------|---------|--------|
| | | Na | K | Na + K |
| MeGlcAX ₂ | 472 | | 511.1 | 533.0 |
| MeGlcAX ₃ | 604 | 627.1 | 643.1 | 665.1 |
| MeGlcAX ₄ | 736 | 759.2 | 775.2 | 797.1 |
| MeGlcAX ₅ | 868 | 891.2 | 907.2 | 929.2 |
| MeGlcAX ₆ | 1,000 | 1,023.3 | 1,039.2 | 1,061 |
| MeGlcAX ₇ | 1,132 | 1,155.3 | 1,171.2 | |
| MeGlcAX ₈ | 1,264 | 1,287.3 | 1,303.3 | |

^a M_r , molecular weight.

DISCUSSION

Xylanases are glycosyl hydrolases usually grouped in families GH10 and GH11. However, a few xylanases that exhibit homology to enzymes belonging to other glycoside hydrolase families have also been described (11, 32). Among them, three xylanases of family 30 (GH30), previously classified in family 5, have been biochemically characterized. The enzymes are XynA from *Erwinia chrysanthemi* (22, 47), XynC from *Bacillus subtilis* (38), and Xyn5B from *Bacillus* sp. BP-7 (18). These xylanases are single-domain enzymes whose distinctive trait is their specificity for glucuronoxylans; they show high activity on glucuronoxylans but none on arabinoxylans. These enzymes have an absolute requirement of

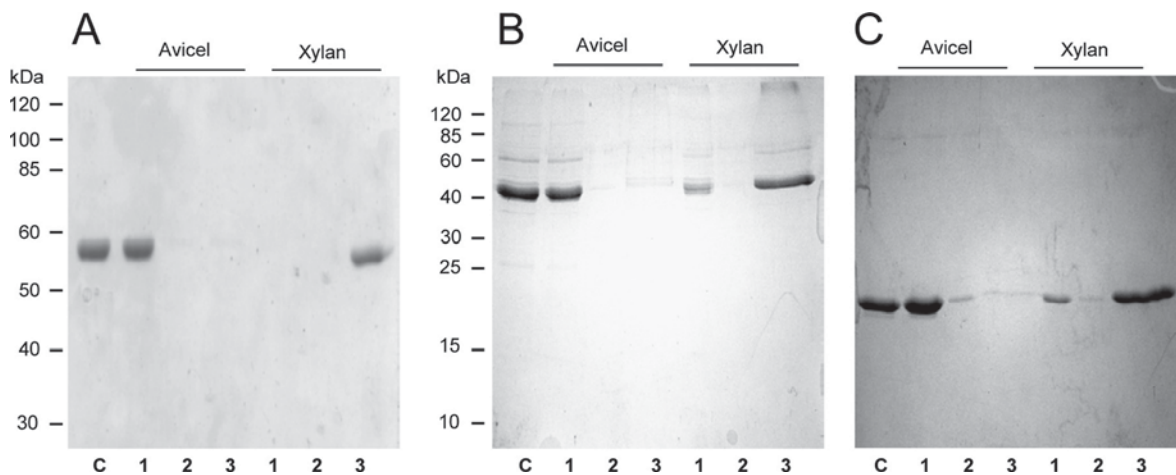


FIG 5 SDS-PAGE analysis of binding to insoluble polysaccharides. (A) Binding of Xyn30D. (B) Binding of Xyn-CM. (C) Binding of Xyn-CBM35. Proteins were mixed with Avicel or with the insoluble fraction of oat spelt xylan for 1 h; bound and unbound fractions were separated by centrifugation and analyzed by SDS-PAGE. Lanes: 1, unbound fraction; 2, wash; 3, fraction adsorbed to the polymer; C, control protein. The positions of molecular mass standard proteins are indicated.

methyl-glucuronosyl (MeGlcA) side residues for hydrolysis of xylan, releasing as products xylooligosaccharides substituted in the penultimate xylose from the reducing end (38, 47). The crystalline structure of XynA from *Erwinia chrysanthemi* (43) and XynC from *Bacillus subtilis* (40) reveals that the accommodation of MeGlcA in the -2 subsite of the catalytic site is a determinant for substrate recognition of these enzymes. GH30 xylanases are targeted to glucuronic acid branched regions of xylans, unlike the majority of xylanases belonging to families GH10 or GH11, which are not active on densely substituted xylan (32). Recently, a GH30 enzyme active on both glucuronoxylans and arabinoxylans from the fungus *Bispora* sp. MEY-1 has been identified as a xylanase (29). However, the *Bispora* enzyme has been classified in subgroup G of the GH30 family, while the glucuronoxylan-specific xylanases are classified in subgroup H (39). An arabinoxylan-specific xylanase belonging to the GH5 family has recently been characterized (13). The accommodation of arabinose in subsite -1 of its catalytic groove seems to be a specificity determinant of this new xylanase.

The enzyme we characterized, *Paenibacillus barcinonensis* Xyn30D, is a glucuronoxylan-specific xylanase. Like xylanases of

family GH30, it is highly active on glucuronic acid-decorated xylans and it does not hydrolyze arabinoxylans. Comparison of kinetic constants of Xyn30D and those reported for GH30 xylanases, such as XynC from *Bacillus subtilis* (38), shows that while the k_{cat} values are in the same range, the K_m of Xyn30D is higher than that of the *Bacillus subtilis* enzyme (14.72 mg/ml versus 1.63 mg/ml). *Paenibacillus barcinonensis* Xyn30D is a modular enzyme composed of a catalytic module of family 30 (GH30) and a carbohydrate-binding module of family 35 (CBM35). To our knowledge, this is the only example of modular GH30 xylanase characterized to date. Xyn30D shows high sequence identity to xylanase D from *Aeromonas caviae* ME-1 (41) and endoxylanase from *Aeromonas caviae* W-61 (31), although the biochemical properties of these enzymes have not been studied in detail. Xylanases belonging to family GH30 share a unique overall structure of the catalytic module comprising a common $(\beta/\alpha)_8$ barrel linked to a side β -structure consisting of a 9-stranded aligned β -sandwich. This trait has led to the recent reclassification of these xylanases, from family GH5 to family GH30 (39). It has been suggested that the side β -structure has a substrate-targeting role, as a putative carbohydrate-binding module (40). Xyn30D from *Paenibacillus barcinonensis* shares with GH30 xylanases the overall structure of the catalytic module comprising a $(\beta/\alpha)_8$ barrel linked to the side β -structure. The role of this side β -structure in the activity of Xyn30D was tested in a series of truncated derivatives of the enzyme that were constructed. None of them retained catalytic activity and was able to hydrolyze glucuronoxylans. The fact that even the derivative with the shortest deletion (which only removed the β s9 strand at the C terminus of the catalytic module) did not show enzymatic activity indicates the essential role of the side β -structure in the catalysis of Xyn30D, as has been previously proposed (39). This is the first reported evidence of the importance of this β -structure associated to the $(\beta/\alpha)_8$ barrel for the catalytic activity of xylanases of family GH30.

The carbohydrate-binding module of Xyn30D belongs to the family CBM35. This is uncommon among xylanases and makes the characterized enzyme more unusual. Only one other xylanase, Xyn10B from *Cellvibrio japonicus*, has previously been reported to contain a CBM of family 35 (24). ITC analysis showed that the

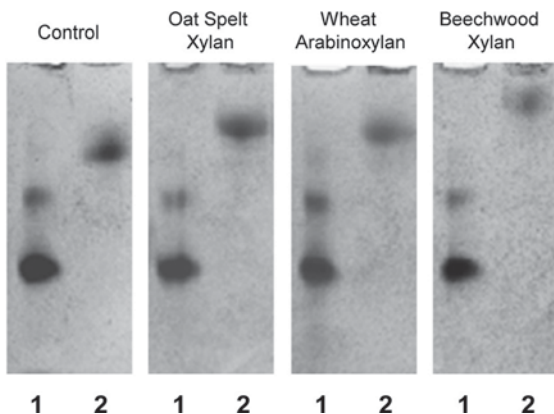


FIG 6 Affinity gel electrophoresis analysis of Xyn-CBM35 binding to soluble polysaccharides. Xyn-CBM35 was analyzed on nondenaturing polyacrylamide gels containing no ligand (control) or soluble xylan from oat spelt, beechwood, or wheat arabinoxylan. Lanes: 1, BSA; 2, Xyn-CBM35.

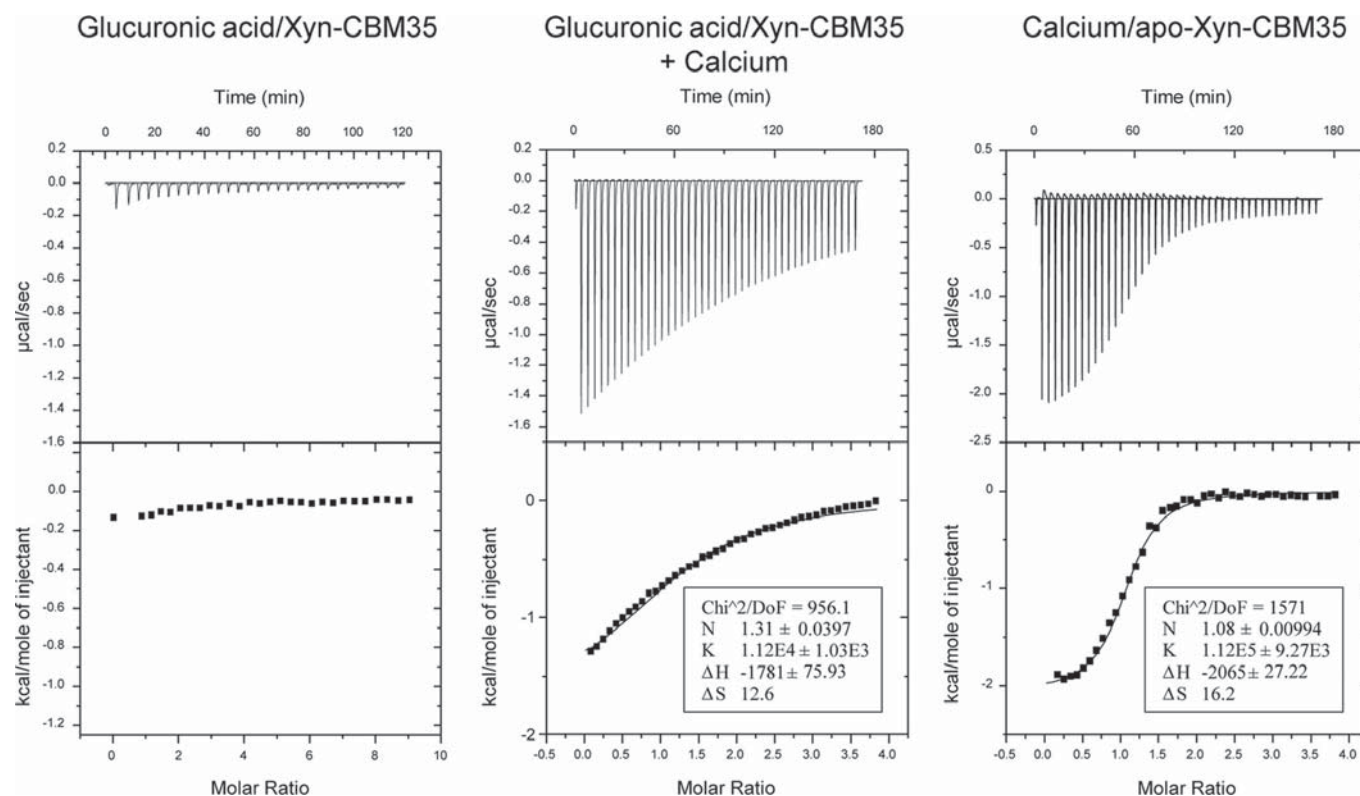


FIG 7 ITC analysis of Xyn-CBM35 binding to glucuronic acid. The upper part of each panel shows the raw binding heats, and the lower part shows the integrated binding heats minus the dilution control heats fitted to a single-site binding model with MicroCal Origin. Calcium was at 5 mM when included in titrations with glucuronic acid and was at 3 mM (in the syringe) when titrated into apo-Xyn-CBM35.

CBM35 from *Paenibacillus barcinonensis* Xyn30D (Xyn-CBM35) binds glucuronic acid and requires calcium ions for binding. The results are in agreement with the findings for CBM35s of Xyn10B from *Cellvibrio japonicus* and exo- β -D-glucosaminidase Csxa from *Amycolatopsis orientalis* but differ from results found with rhamnogalacturonan acetyl esterase Rgae12A from *Clostridium thermocellum*, which showed only a weak interaction with glucuronic acid (30). Sequence comparison of CBM35s has identified several highly conserved amino acids, among them an asparagine residue which seems to play a key role in ligand orientation (6, 12). The equivalent Asn is found in position 119 of Xyn-CBM35, while most of the conserved amino acids are also found in the CBM. On the basis of protein sequence relatedness, family CBM35s have been grouped into four main clusters which are reported to differ in ligand specificity. Some of the CBM35s, like that of *Paenibacillus barcinonensis* Xyn30D, bind glucuronic acid decorations, while members of the other clusters bind mannan and galactomannan (12). More CBMs of this family need to be characterized to understand their role in polysaccharide hydrolysis, including their potential role in targeting of the enzymes to areas of the cell wall under biological degradation (30).

ITC was also used to study the binding ability of Xyn-CBM35 to polymeric xylan, but the binding was too weak to be evaluated by this method. Analysis by affinity gel electrophoresis showed that Xyn-CBM35 bound glucuronoxylans and arabinoxylans. Binding of a CBM35 to xylan has previously been reported for the arabinofuranosidase Abf62A from *Cellvibrio japonicus* (6). The results found show that Xyn-CBM35 binds both xylans and also

glucuronic acid. It seems that the CBM35 of Xyn30D targets the enzyme to its substrate, probably by the recognition of glucuronic acid decorations. In fact, the recognition of decorations of hemicelluloses has been proposed as a mechanism of substrate targeting of CBM35 (12). These decorations are also present in arabinoxylans, although steric hindrance of arabinose side chains probably precludes arabinoxylans from catalytic breakage by Xyn30D. The CBM35 of Xyn30D does not seem to be required for hydrolysis of xylan, as the isolated catalytic module shows similar activity to the full-length enzyme on the substrates tested. This indicates that the catalytic and the CBM modules of Xyn30D can function independently, as has frequently been reported for glycosyl hydrolases (21, 35).

Paenibacillus barcinonensis is a powerful xylanolytic microorganism, from which several xylanases of family GH10 have previously been characterized (5, 19, 44). The enzyme identified and characterized in our study, Xyn30D, is a GH30 xylanase with a modular structure comprising a CBM35, which clearly differentiates the enzyme from known xylanases. Xyn30D probably plays a specific role in xylan biodegradation. Its marked preference for glucuronoxylan suggests that it has a distinctive role in the depolymerization of xylan in natural habitats. The biochemical characterization of new GH30 xylanases will be required to compare with the few known examples of these enzymes, in order to understand their role in xylan hydrolysis and their contribution to biomass degradation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Peter Biely for kindly providing aldotetrauronic and aldopenta-uronic acids and for scientific advice. We thank the Proteomics Plat-

form of Barcelona Science Park, member of ProteoRed-ISCI network, for the proteomics study.

The study was supported in part by the Spanish Ministry of Education and Science, grant CTQ2010-20238-C03-02, and AGAUR from Generalitat de Catalunya, grant 2009 SGR 819. Susana Valenzuela was the recipient of an MAE AECEI doctorate grant from the Spanish Ministry of Foreign Affairs.

REFERENCES

- Altschul SF, et al. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389–3402.
- Biely P, Vrřanská M, Tenkanen M, Kluepfel D. 1997. Endo- β -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *J. Biotechnol.* 57:151–166.
- Blanco A, Pastor FIJ. 1993. Characterization of cellulase-free xylanases from the newly isolated *Bacillus* sp. strain BP-23. *Can. J. Microbiol.* 39:1162–1166.
- Blanco A, Vidal T, Colom JF, Pastor FIJ. 1995. Purification and properties of xylanase A from alkali-tolerant *Bacillus* sp. strain BP-23. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:4468–4470.
- Blanco A, Diaz P, Zueco J, Parascandola P, Pastor FIJ. 1999. A multi-domain xylanase from a *Bacillus* sp. with a region homologous to thermotabilizing domains of thermophilic enzymes. *Microbiology* 145:2163–2170.
- Bolam DN, et al. 2004. X4 modules represent a new family of carbohydrate-binding modules that display novel properties. *J. Biol. Chem.* 279:22953–22963.
- Boraston AB, et al. 2001. Binding specificity and thermodynamics of a family 9 carbohydrate-binding module from *Thermotoga maritima* xylanase 10A. *Biochemistry* 40:6240–6247.
- Boraston AB, Bolam DN, Gilbert HJ, Davies GJ. 2004. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem. J.* 382:769–781.
- 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.
- Britton HTS. 1952. Hydrogen ions, 4th ed. Chapman and Hall, London, United Kingdom.
- Collins T, Gerday C, Feller G. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:3–23.
- Correia MAS, et al. 2010. Signature active site architectures illuminate the molecular basis for ligand specificity in family 35 carbohydrate binding module. *Biochemistry* 49:6193–6205.
- Correia MAS, et al. 2011. Structure and function of an arabinoxylan-specific xylanase. *J. Biol. Chem.* 286:22510–22520.
- Côté N, et al. 2006. Two exo- β -D-glucosaminidases/exochitosanases from actinomycetes define a new subfamily within family 2 of glycoside hydrolases. *Biochem. J.* 394:675–686.
- de Vries RP, Visser J. 2001. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65:497–522.
- Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2007. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP, and related tools. *Nat. Protoc.* 2:953–971.
- Fujimoto Z, et al. 2002. Crystal structures of the sugar complexes of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 xylanase: sugar binding structure of the family 13 carbohydrate binding module. *J. Mol. Biol.* 316:65–78.
- Gallardo O, et al. 2010. Characterization of a family GH5 xylanase with activity on neutral oligosaccharides and evaluation as a pulp bleaching aid. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:6290–6394.
- Gallardo O, et al. 2010. Structural insights into the specificity of Xyn10B from *Paenibacillus barcinonensis* and its improved stability by forced protein evolution. *J. Biol. Chem.* 285:2721–2733.
- Henrissat B, Davies G. 1997. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:637–644.
- Hogg D, et al. 2003. The modular architecture of *Cellvibrio japonicus* mannanases in glycoside hydrolase families 5 and 26 points to differences in their role in mannan degradation. *Biochem. J.* 371:1027–1043.
- Hurlbert JC, Preston JF. 2001. Functional characterization of a novel xylanase from a corn strain of *Erwinia chrysanthemi*. *J. Bacteriol.* 183:2093–2100.
- Irar S, Oliveira E, Pagès M, Goday A. 2006. Towards the identification of late-embryonic abundant phosphoproteome in *Arabidopsis* by 2-DE and MS. *Proteomics* 6:S175–S185.
- Kellett LE, et al. 1990. Xylanase B and an arabinofuranosidase from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* contain identical cellulose-binding domains and are encoded by adjacent genes. *Biochem. J.* 272:369–376.
- Kolenová K, Vrřanská M, Biely P. 2006. Mode of action of endo- β -1,4-xylanases of families 10 and 11 on acidic xylooligosaccharides. *J. Biotechnol.* 121:338–345.
- Kulkarni N, Shendye A, Rao M. 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 23:411–456.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Larson SB, Day J, Barba dela Rosa AP, Keen NT, McPherson A. 2003. First crystallographic structure of a xylanase from glycoside hydrolase family 5: implications for catalysis. *Biochemistry* 42:8411–8422.
- Luo H, et al. 2010. Molecular cloning and characterization of the novel acidic xylanase XYLD from *Bispora* sp. MEY-1 that is homologous to family 30 glycosyl hydrolases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86:1829–1839.
- Montanier C, et al. 2009. Evidence that family 35 carbohydrate binding modules display conserved specificity but divergent function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:3065–3070.
- Okai N, et al. 1998. Molecular properties and activity of a carboxyl-terminal truncated form of xylanase 3 from *Aeromonas caviae* W-61. *Biochem. Biotechnol.* 62:1560–1567.
- Pollet A, Delcour JA, Courtin CM. 2010. Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. *Crit. Rev. Biotechnol.* 30:176–191.
- Puls J, Schuseil J. 1993. Enzymological aspects of microbial hemicellulases with emphasis on fungal systems, p 1–27. *In* Coughlan MP, Hazlewood GP (ed), *Hemicelluloses and hemicellulases*. Portland Press, London, United Kingdom.
- Ragauskas AJ, et al. 2006. The path forward for biofuels and biomaterials. *Science* 311:484–489.
- Sakka M, Higashi Y, Kimura T, Ratanakhanokchai K, Sakka K. 2011. Characterization of *Paenibacillus curdolanolyticus* B-6 Xyn10D, a xylanase that contains a family 3 carbohydrate-binding module. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:4260–4263.
- Sánchez MM, et al. 2005. *Paenibacillus barcinonensis* sp. nov., a xylanase-producing bacterium isolated from a rice field in the Ebro River delta. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:935–939.
- Spiro RG. 1966. The Nelson-Somogyi copper reduction method. Analysis of sugars found in glycoprotein. *Methods Enzymol.* 8:3–26.
- St. John FJ, Rice JD, Preston JF. 2006. Characterization of XynC from *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain 168 and analysis of its role in depolymerization of glucuronoxylan. *J. Bacteriol.* 188:8617–8626.
- St. John FJ, González JM, Pozharski E. 2010. Consolidation of glycosyl hydrolase family 30: a dual domain 4/7 hydrolase family consisting of two structurally distinct groups. *FEBS Lett.* 584:4435–4441.
- St. John FJ, Hurlbert JC, Rice JD, Preston JF, Pozharski E. 2011. Ligand bound structures of a glycosyl hydrolase family 30 glucuronoxylan xylanohydrolase. *J. Mol. Biol.* 407:92–109.
- Suzuki T, Ibata K, Hatsu M, Takamizawa K, Kawai K. 1997. Cloning and expression of a 58-kDa xylanase VI gene (xynD) of *Aeromonas caviae* ME-1 in *Escherichia coli* which is not categorized as a family F or family G xylanase. *J. Ferment. Bioeng.* 84:86–89.
- Tomme P, et al. 1998. Characterization and affinity applications of cellulose-binding domains. *J. Chromatogr. B.* 715:283–296.
- Urbániková L, Vrřanská M, Mørkeberg Krogh KBR, Hoff T, Biely P. 2011. Structural basis for substrate recognition by *Erwinia chrysanthemi* GH30 glucuronoxylanase. *FEBS J.* 278:2105–2116.
- Valenzuela SV, Diaz P, Pastor FIJ. 2010. Recombinant expression of an alkali stable GH10 xylanase from *Paenibacillus barcinonensis*. *J. Agric. Food Chem.* 58:4814–4818.
- Valls C, et al. 2010. Obtaining low-HexA-content cellulose from eucalypt fibres: which glycosyl hydrolase family is more efficient? *Carbohydr. Polym.* 80:154–160.
- Van Vleet JH, Jeffries TW. 2009. Yeast metabolic engineering for hemicellulosic ethanol production. *Curr. Opin. Biotech.* 20:300–306.
- Vrřanská M, Kolenová K, Puchart V, Biely P. 2007. Mode of action of glycoside hydrolase family 5 glucuronoxylan xylanohydrolase from *Erwinia chrysanthemi*. *FEBS J.* 274:1666–1677.
- Wang J, Sun B, Cao Y, Tian Y, Wang C. 2009. Enzymatic preparation of wheat bran xylooligosaccharides and their stability during pasteurization and autoclave sterilization at low pH. *Carbohydr. Polym.* 77:816–821.

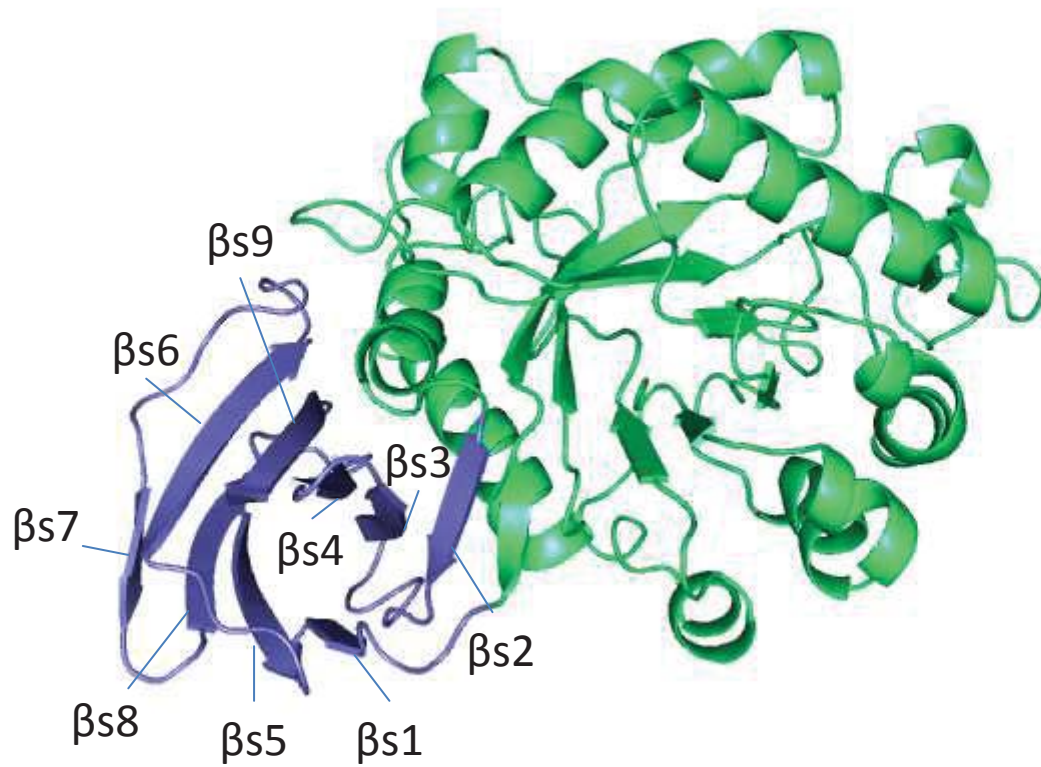


Figure S1

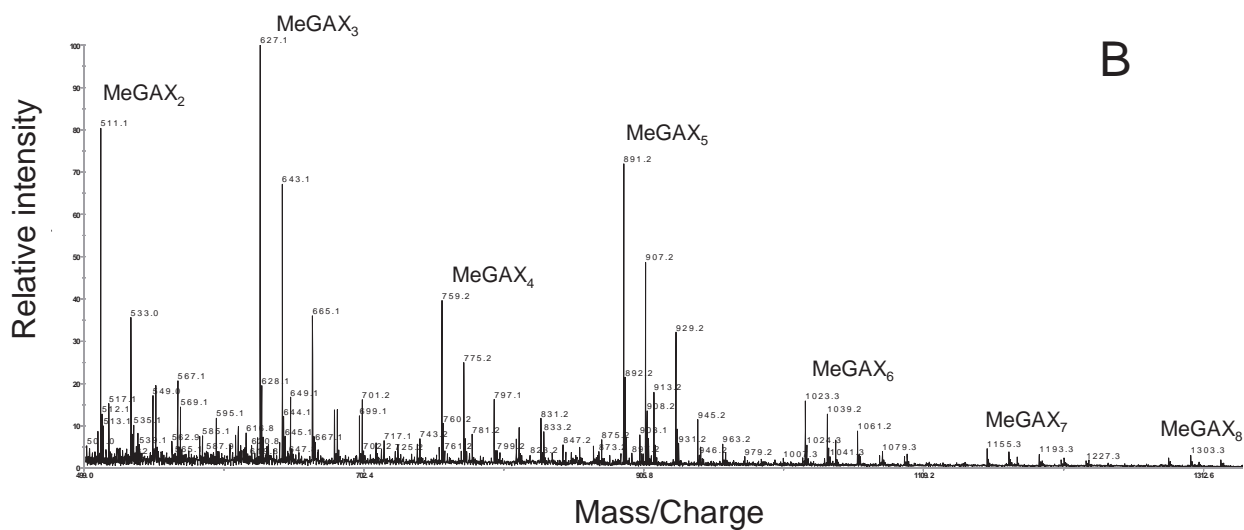
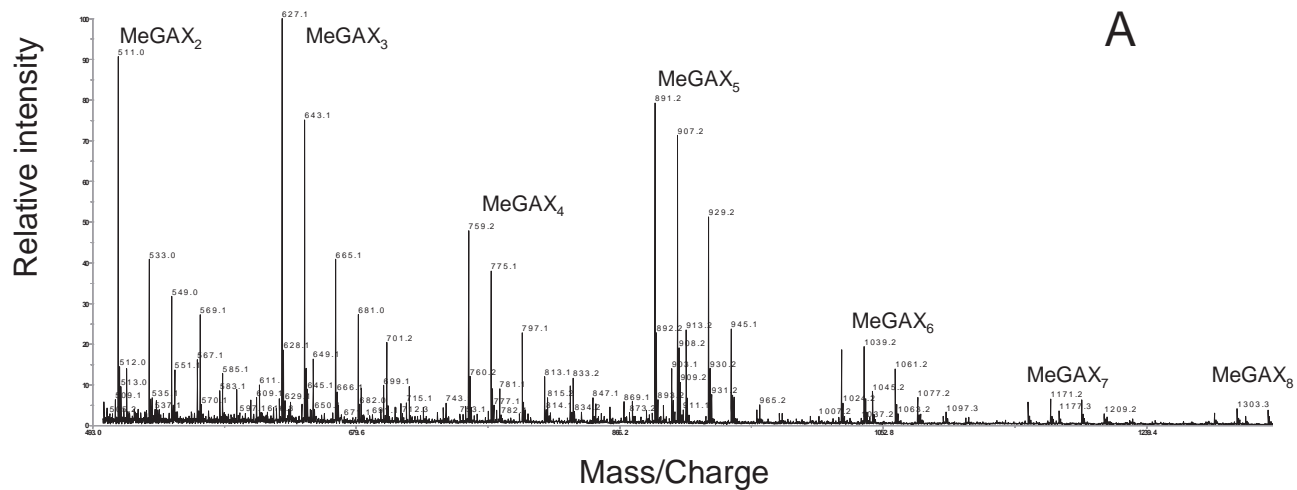


Figure S2

LIST of SUPPLEMENTARY FIGURES

Supplementary Figure 1. Computer modeling of 3D structure of catalytic module of xylanase 30D. The (β/α)₈ barrel is represented in green. The associated β -domain is represented in blue. The numbering of the β s strands is indicated

Supplementary Figure 2. MALDI-TOF MS spectra of products of beechwood xylan hydrolysis by Xyn30D (A) or Xyn-CM (B). Formulas of the substituted xylooligosaccharides were deduced from the observed mass-to-charge signals of the corresponding ion adducts

3.3 Characterization of a Chaperone Dependent Xylanase from *Paenibacillus barcinonensis* with Potential Applications in Upgrading Paper Pulps

Susana V. Valenzuela, Mai Nielsen, Pilar Diaz y F. I. Javier Pastor

En el presente trabajo, se describe la purificación y caracterización de una nueva xilanasas de *Paenibacillus barcinonensis*, Xyn11E, que pertenece a la familia GH11 de glicosil hidrolasas y su expresión activa es dependiente de la chaperona LppX. La xilanasas madura mostró un peso molecular teórico de 20,652 kDa y un pI de 8,7. Xyn11E y LppX fueron clonadas y expresadas en *Escherichia coli*. Se caracterizaron la especificidad de sustrato, las propiedades cinéticas, y la formación de productos. Xyn11E mostró una elevada actividad sobre xilanos ramificados, siendo el xilano de haya el más afín de los sustratos ensayados. El pH y temperatura óptimos de la enzima purificada fueron 6,5 y 50 °C respectivamente, mientras que la estabilidad de la xilanasas no se vio mayormente afectada en estas condiciones por al menos 2 h. Las constantes catalíticas de Xyn11E fueron determinadas sobre xilano de haya, obteniéndose valores de 12,98 mg/ml y 3.023 U/mg para la K_m y la V_{max} respectivamente. La xilanasas fue capaz de hidrolizar xilooligosacáridos de cadena larga ($DP > 4$), mientras que los oligómeros de menos de 4 residuos no fueron degradados. Los productos liberados a partir del glucuronoxilano fueron más pequeños que los liberados a partir del arabinoxilano. La actividad de Xyn11E sobre pastas de papel blanqueadas también fue evaluada. La enzima fue capaz de liberar azúcares tanto de pastas ECF como TCF provenientes de eucalipto, sisal, y lino.

La xilanasas Xyn11E puede ser una gran candidata para la producción enzimáticamente asistida de pastas en alto contenido de celulosa, a partir de pastas de grado papelerero.

Characterization of a chaperone dependent Xylanase from *Paenibacillus barcinonensis* with potential applications in upgrading paper pulps.

Susana Valeria Valenzuela, Mai Nielsen, Pilar Diaz and F. I. Javier Pastor

Department of Microbiology, Faculty of Biology. Universitat de Barcelona. Av. Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain

ABSTRACT

In this report we describe the purification and characterization of a new xylanase from *Paenibacillus barcinonensis*, Xyn11E, which belongs to the family 11 of glycosyl hydrolases (GH11) and is dependent on chaperone LppX for folding in an active form. The mature xylanase showed a predicted molecular weight of 20.652 kDa and a pI of 8.7. Xyn11E and LppX have been cloned and heterologously expressed in *Escherichia coli*. Substrate specificity, kinetic properties, and product formation of the purified xylanase were characterized. Xyn11E exhibited high activity towards branched xylans, being beechwood xylan the preferred substrate. The optimum pH and temperature of the purified enzyme were 6.5 and 50°C, respectively, while it remained stable at 50°C in pH 6 up to 2 h. Catalytic constants were determined on beechwood xylan on which Xyn11E showed a K_m of 12.98 ± 2.24 mg/ml and a V_{max} of 3023 ± 232 U/mg. The enzyme hydrolyzed long xyloligosaccharides, while oligomers shorter than xylo-tetraose were not degraded by the enzyme. Products released from glucuronoxylans were shorter than those liberated from cereal arabinoxylans. Activity of the enzyme on bleached pulps was evaluated. Xyn11E liberated reducing sugars from ECF and TCF pulps from eucalyptus, sisal and flax, which makes it a good candidate for the enzymatic assisted production of high cellulose content pulps from paper grade pulps.

Keywords: *Paenibacillus*; xylanase; enzymatic hydrolysis; bioconversion; dissolving pulps.

INTRODUCTION

Xylan is the main component of plant hemicelluloses and it is the second most abundant renewable polysaccharide on earth (Coughlan and Hazlewood, 1993). This polymer is composed of β -(1,4)-linked D-xylose residues forming long chain, which are usually branched with substituents like glucuronosyl, arabinosyl or acetyl residues among others (Joseleau et al., 1992). Thus its degradation requires the coordination of several enzymes, among which endo-(1,4)- β -xylanase (EC 3.2.1.8) play a fundamental role, because they catalyze the degradation of xylan into short oligosaccharides. Xylanases differ in their catalytic mechanism, protein folding, physicochemical properties and substrate specificity (Collins et al., 2005). According to their amino acid sequence and hydrophobic cluster analysis most of xylanases are grouped in two families of glycosyl hydrolases, GH10 and GH11, while a small group of xylanases has been included into families GH5, GH8, GH30 and GH43 (Cantarel et al., 2009). Xylanases of family GH11 are the smallest of them. They present a β -jelly-roll architecture (Pollet et al., 2010) and can be divided into alkaline and acidic pI xylanases based on the properties of the enzyme (Törrönen and Rouvinen, 1997; Sapag et al., 2002).

During recent years, xylanases have been the subject of many studies for their multiple uses in biotechnological processes. They have been used successfully in fiber and food industries, to improve product quality factors, and in non food applications, such as pulp industry and biofuels production, to reduce the environmental impact of these processes (Paës et al., 2012). Enzymatic treatment of pulps is at present being evaluated on the adjustment of viscosity and the increase in pulp reactivity for the production of dissolving pulps from paper grade pulps (Gehmayr and Sixta, 2012).

Paenibacillus barcinonensis is a new species isolated from rice fields of Ebro river delta in Spain. It produces high xylanase activity and is able to grow on xylan as a sole carbon source (Blanco and Pastor, 1993). The enzyme system of *P. barcinonensis* has been analyzed and four of its xylanases have been cloned. They are classified into families GH10 and GH30: Xyn10A, Xyn10B, Xyn10C and Xyn30D (Blanco et al., 1995, 1999;

Gallardo et al., 2010; Valenzuela et al., 2010, 2012). However, in spite of the important contribution of family GH11 xylanases to xylan degradation, no xylanases of this family have been identified previously in this xylanolytic bacterium. The aim of this study was to identify a new xylanase from *P. barcinonensis*. Xyn11E has been cloned and heterologously expressed in *Escherichia coli* and the purified recombinant protein has been characterized. The ability to release sugars from bleached pulps was also tested in order to determine its potential use for upgrading paper-grade pulps to dissolving-grade pulps.

MATERIALS AND METHODS

***xyn11E* and *lppx* cloning**

For cloning *xyn11E* and *xyn11E-lppx* in pGEM-T Easy vector (Promega) the genes were amplified with primers listed in table 1, using the Expand High Fidelity polymerase (Roche) and the products were ligated in the vector as described by the supplier. For the overexpression, the *xyn11E* and *lppx* genes were amplified (Kappa HIFI polymerase, KAPABiosystems) for directional cloning into the NheI and BamHI restriction sites of the pET28a expression vector. The 5' primer (Xyn11E Fw s/PS NheI) was designed to express Xyn11E without its peptide signal, predicted by using SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Bendtsen et al., 2004) and fused in-frame behind the N-terminal his tag of pET28a. The 3' primer (LppX Rv BamHI) was designed six nucleotides downstream of the stop codon of *lppx* (Table 1). All the constructions were verified by sequencing.

Purification of Xyn11E

Escherichia coli BL21 Star (DE3) was transformed with pET28a/Xyn11E-LppX and grown in kanamycin supplemented LB medium (50 µg/ml) at 37°C until the absorbance at 600 nm reached 0.8, then it was induced with 0,5 mM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) for 18 h at 30°C. The cells were collected by centrifugation at

6000 x g for 15 min, resuspended in 20 mM Tris buffer pH 7, and disrupted by using a french press. The recombinant Xyn11E was purified from cell extracts by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) using HisTrap HP columns of 1 ml (GE Healthcare) on a fast protein liquid chromatography system (ÄKTA FPLC; GE Healthcare). A washing with 50 mM Tris pH 7, 50 mM imidazole and 500 mM NaCl were performed before an elution in a single step with 50 mM Tris buffer pH 7, 500 mM NaCl and 200 mM imidazole. The buffer exchange and protein concentration were performed in Centricon centrifugal filter units of 3 kDa molecular mass cutoff (Millipore). Protein concentrations were determined by Bradford (Bradford, 1976) using bovine serum albumin as the standard and the purity was determined by SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) (Laemmli, 1970).

Table 1. List of primers for cloning *xyn11E* and *lppx*.

| Name of the primer | Sequence 5' → 3' |
|---------------------|--------------------------------------|
| Xyn11E Fw c/RBS | CAAAAAAATTTAAATCCAGGAGTT |
| LppX Rv | CTACGTACCACTCGCAATCCCTGGTC |
| Xyn11E Rv | CCAAACAGTCACATTCGAA |
| Xyn11E Fw s/PS NheI | AAAA <u>GCTAGC</u> GCGACTACAGGCGCTAC |
| LppX Rv BamHI | AA <u>GGATCC</u> TTCGTTAACCGAAGAG |

Enzyme assays

The xylanase activity was analyzed by quantifying the amount of reducing sugar released from polysaccharides by the Nelson Somogyi method as described before (Spiro, 1966; Valenzuela et al., 2010). Birchwood, beechwood, oat spelt xylans, and 4-O-methyl-glucuronoxylan were purchased from Sigma Chemical. Rye and wheat arabinoxylans were purchased from Megazyme. The standard assay was performed at 50°C in 50 mM phosphate buffer pH 6.0 for 15 min. Kinetic parameters (V_{max} and K_m) were carried out under the standard assay using 0–30 mg/ml of beechwood xylan as substrate. K_m and V_{max} were determined by fitting hyperbolic Michaelis–Menten

curves with the program SigmaPlot, version 8.00 (Jandel Scientific). One unit of enzymatic activity was defined as the amount of enzyme that releases 1 μmol of reducing sugar equivalent per min under the assay conditions described. A standard curve of xylose was used to calculate the activity units. All the determinations of enzyme activity were made in triplicate, and each assay was done at least two times in order to do the statistical analysis. For the detection of xylanase activity on gel, zymograms assays were done as described (Valenzuela et al., 2010) including 0.2% beechwood xylan in gels before polymerization.

Effects of pH and temperature on xylanase activity and stability

The effects of pH and temperature on xylanase activity were determined using beechwood xylan as substrate. The optimal pH was determined between pH 3.0 and 11.0 (pH 3.0–5.0 in 50 mM sodium acetate buffer and pH 5.7–8.0 in 50 mM sodium phosphate buffer), while the optimal temperature was measured at temperatures from 25 to 65°C. The pH stability was determined by incubating xylanase in buffers at 50 °C for 2 h. The residual activity was determined with the standard assay. The thermal stability was performed by incubating Xyn11E in 50 mM phosphate buffer pH 6 at different temperatures for intervals up to 2 hours. The residual activity was then determined with the standard assay.

Substrates hydrolysis and product analysis

Thin layer chromatography was performed to analyze the products of the hydrolysis of different types of xylans and oligosaccharides as previously reported (Valenzuela et al., 2010). Xylooligosaccharides and xylans from different sources were incubated with Xyn11E or buffer for control reactions at 45°C and pH 6 for 18 h before the analysis. Neutral xylooligosaccharides were purchased from Megazyme.

RESULTS AND DISCUSSION

Cloning of *xyn11E* and *lppx* genes

Based on the available genome of *Paenibacillus polymyxa* E681, primers for a xylanase of family GH11 were designed. Amplification with these primers on the genomic DNA of *Paenibacillus barcinonensis*, resulted in an amplicon with homology to xylanases. By gene walking from this DNA portion, the sequence of two open reading frames (ORF) in the same direction was determined. The first ORF was named *xyn11E* and its deduced amino acid sequence showed similarity to xylanases from GH11 family, such as *Paenibacillus* sp. W-61 (94% identity, Watanabe et al., 2008), *Aeromonas punctata* (91% identity, Kubata et al., 1992) and *Paenibacillus* sp. DG-22 (83% identity, Lee et al., 2007). The deduced amino acid sequence consisted in a pre-protein of 211 residues which showed a putative signal peptide of 23 aminoacids. The predicted molecular weight and pI of the mature xylanase were 20.7 kDa and 8.7, respectively. The putative catalytic residues, Glu104 and Glu 197, were found in the position corresponding to conserved regions of GH11 xylanases (Oakley et al., 2003). The second ORF identified was located immediately downstream *xyn11E* and was named *lppx*. Its deduced amino acid sequence showed similarity with the chaperone LppX of *Paenibacillus* sp. W-61 (76% identity, Fukuda et al., 2009) and with the transcriptional regulator of *Bacillus halodurans* C-125 (62% identity, Takami et al., 2000). *Paenibacillus* sp. W-61 LppX has been described as the only case of a chaperone required for the proper folding of a xylanase up to date. The deduced amino acid sequence of *P. barcinonensis* Lppx consisted in a 280 residues protein, with a putative signal peptide of 23 residues and a predicted molecular weight and pI of the mature protein of 29.1 kDa and 4.9, respectively. To verify if Xyn11E needed the presence of LppX to be expressed in an active form, two constructions, one of them containing only the xylanase gene and another including both the xylanase and the putative chaperone *lppX* genes, were made in the pGEM-T Easy vector. The recombinant plasmids were transformed in *E. coli* DH5 α and plated on Remazol brilliant blue xylan (RBB-xylan) agar plates to test the xylanase activity. Only the construction containing *xyn11E* and *lppx* was able to produce

xylan degradation halos. When cell extracts from the recombinant clones were assayed for xylanase activity and analyzed in zymograms, similar results were obtained, confirming the dependence on the putative chaperone for the activity of the xylanase. Xylanases from family GH11 are widely distributed among multiple firmicutes bacteria and the traits showed by Xyn11E, low MW and high pI, are typical for xylanases of family GH11 described up to date (Paice et al., 1986; Breccia et al., 1998). However, a clear difference that distinguishes Xyn11E, together with Xyn1 from *Paenibacillus* sp. W-61, is the need of a chaperon, LppX, for activity. A bioinformatic search revealed that LppX paralogues are widely distributed in the genome of *Paenibacillus* strains and eventually appeared in some other firmicutes like *Bacillus halodurans* C-125 (GI 15613463) or *Clostridium cellulolyticum* H10 (GI 220929284), but they were not found in any strain of *Bacillus subtilis*.

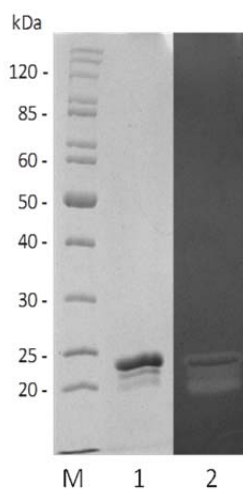


Figure 1. Electrophoretic analysis of Xyn11E by SDS-PAGE after elution. Lanes: 1, Coomassie protein staining of purified Xyn11E; 2, zymogram of the purified enzyme; M, molecular weight standard proteins.

Expression and purification of recombinant Xyn11E.

Xyn11E was expressed with a fused N-terminal His₆ tag in *E. coli* BL21star(DE3). When the recombinant strain was grown at 37°C almost all the enzyme was produced as inclusion bodies (data not shown). Several temperatures of induction between 30°C

and 16°C were tested to avoid the formation of these inclusion bodies, being the induction at 30 ° C the best of the tested conditions. The recombinant protein was purified by a single step by IMAC with a His Trap column (GE Healthcare). The purified xylanase showed an apparent molecular weight of 23 kDa as revealed by SDS-PAGE and zymography (Fig. 1), in agreement with the molecular weight of the deduced amino acid sequence.

Characterization of xylanase activity

The hydrolytic activity of Xyn11E on several polysaccharides was evaluated. The enzyme showed high activity on xylans from soft and hardwoods, showing the highest activity on beechwood xylan (Table 2). The enzyme did not show activity on carboxymethyl cellulose (CMC), avicel, starch, polygalacturonic acid, laminarin, pectin, β -D-barley glucan, nor lichenan. Analysis of kinetic constants of Xyn11E on beechwood xylan showed a Km of 12.98 ± 2.24 mg/ml and a Vmax of 3023 ± 232 U/mg.

Table 2. Substrate Specificity of Xyn11E

| Substrates | Activity (U/mg) |
|---------------------------|--------------------|
| Beechwood xylan | $1234,72 \pm 20,4$ |
| Birchwood xylan | $740,71 \pm 10,8$ |
| Oat spelt xylan | $284,69 \pm 106,4$ |
| Wheat arabinoxylan | $687,06 \pm 18,2$ |
| Rye Arabinoxylan | $226,58 \pm 100$ |
| 4-O-methyl glucuronoxylan | $713,88 \pm 10,8$ |

The effect of temperature and pH on enzyme activity was studied. The enzyme showed maximum activity at 50°C and in a pH range between 5.7 and 6.5 (Fig. 2). Analysis of stability of the enzyme after incubation for 2 h at 50°C in different pH showed it retains about 80% of activity at a pH lower or equal to 6. While the thermostability assays showed that the enzyme remained active up to 2 hours of incubation at 45°C and 50°C in buffer pH 6, but was rapidly inactivated at higher temperatures.

The optimum conditions for activity of Xyn11E were similar to those presented by an extracellular xylanase described in *Paenibacillus* sp. HY-8 with pH 6 and 50°C (Heo et al., 2006), and fairly close to other *Paenibacillus* xylanases that have been reported in *P. campinasensis* BL11 (Ko et al., 2010), in *Paenibacillus* sp. W-61 (Viet et al., 1991) and in *Paenibacillus* sp. DG22 (Lee et al., 2007). On the other hand, the stability profiles were better for Xyn11E than for the xylanase of *Paenibacillus* sp. DG22, but it were lower than the stability of Xyn1 from *Paenibacillus* sp. W-61. In the case of the xylanase of *P. campinasensis* BL11, at 70 and 80°C, the interpolated half-lives were 120 and 50 min, respectively, however this xylanase presented an accessory domain attached to the catalytic domain, thus probably it was contributing to its stability.

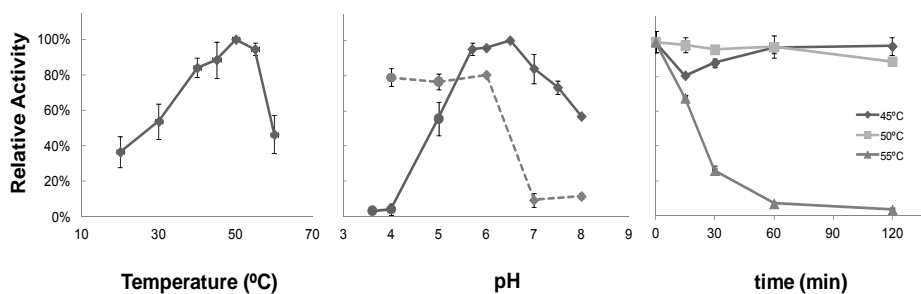


Figure 2. Effect of temperature and pH on Xyn11E activity. **(A)** Effect of temperature on Xyn11E activity. **(B)** Effect of pH on Xyn11E. Activity assays for optimum activity (continuous line) and stability (dashed line) were performed at 50°C with pH from 3.6 to 8.0 in acetate buffer (●) or phosphate buffer (◆). **(C)** Thermostability of Xyn11E at pH 6 and 45°C (◆), 50°C (■) or 55°C (▲).

Analysis of hydrolysis products from xylan and xylooligomers

The products of the hydrolysis of Xyn11E on xylan and xylooligosaccharides were analyzed by thin layer chromatography (TLC). Xyn11E showed no detectable activity on xylobiose and xylotriose, and it had low activity on xylo-tetraose. On the contrary, xylopentaose and xylohexaose were hydrolyzed to xylo-tetraose and xylo-triose as main hydrolysis products (Fig. 3). Among them, oligosaccharides of higher polymerization degree than the starting substrates were obtained, in accordance to the

transglycosydase activity previously reported for retaining glycosidases (Ajisaka and Yamamoto, 2002). The degradation pattern shown indicates that Xyn11E only recognizes xylooligosaccharides with a degree of polymerization (DP) greater than three. Previous studies have reported that xylanases hydrolyze oligosaccharides with a DP greater than two and that the catalytic activity increases with the DP of the substrates (Biely et al., 1997; Watanabe et al., 2008). When high concentrations of enzyme and long term incubations, of 20 h onwards, were applied, we could observe the hydrolysis of xylotriose (data not shown). We believe that the hydrolysis of this oligomer was forced by the high concentration of enzyme applied in our experiments, but that under physiological conditions, small oligosaccharides would not be hydrolyzed.

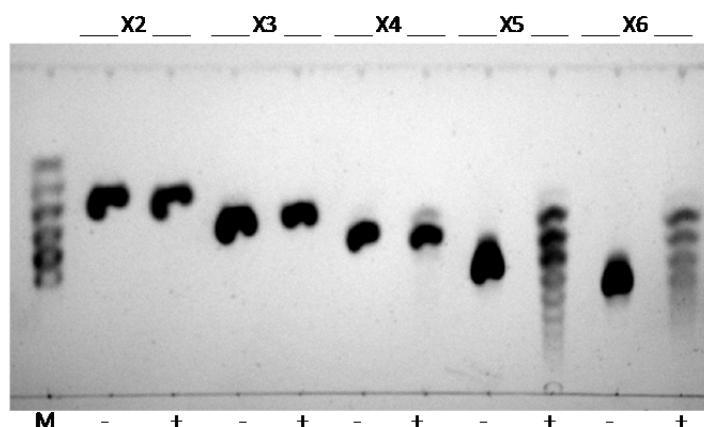


Figure 3. Hydrolysis products from xylooligosaccharides analyzed by TLC. Samples of xylobiose (X₂), xylotriose (X₃), xylo-tetraose (X₄), xylo-pentaose (X₅) or xylo-hexaose (X₆) were incubated with Xyn11EA (+) or buffer for controls reactions (-) at 45 °C and pH 6 for 18 h. Lane M contains size markers of xylose (X), xylobiose (X₂), xylotriose (X₃), xylo-tetraose (X₄), xylo-pentaose (X₅) and xylo-hexaose (X₆).

Xylans from hardwoods, as beechwood and birchwood xylans and 4-O-methylglucuronoxylan were cleaved to short chain xylooligosaccharides (DP 4-6) as main products in long-term incubations (Fig. 4), in accordance to the mode of action of GH11 enzymes on glucuronoxylans, which release aldopentaauronic acid (MeGlcA3Xyl4)

as the smaller branched product from these substrates (Kolenová et al., 2006). On the contrary, hydrolysis pattern on arabinoxylans showed a mixture of highly variable length oligomers, of higher size than those produced from glucuronoxylans. Oat spelt xylan was hydrolyzed in much lower extent than rye or wheat arabinoxylan probably because of its high proportion of insoluble fraction versus its soluble fraction which only represent the 20% in this polysaccharide.

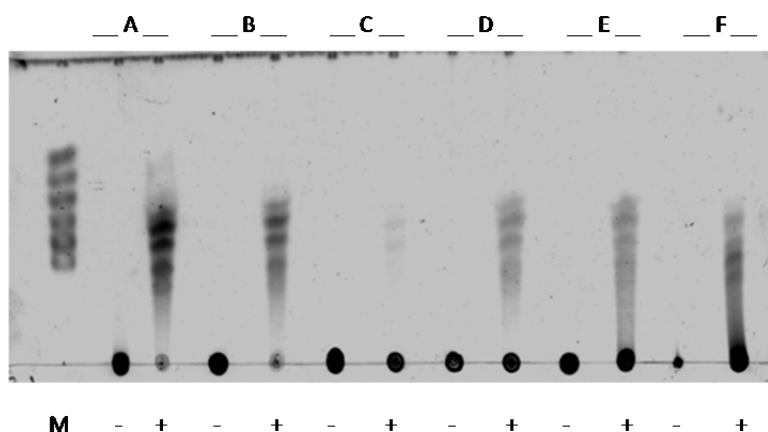


Figure 4. Hydrolysis products from xylans analyzed by TLC. Samples of beechwood xylan (A), birchwood xylan (B), oat spelt xylan (C), 4-O-methylglucuronoxylan (D), wheat xylan (E), or rye xylan (F) were incubated in buffer (-) or with Xyn11E (+) at 45°C and pH 6 for 18 h. Lane M contains size markers of xylose (X), xylobiose (X₂), xylotriose (X₃), xylo-tetraose (X₄), xylopentaose (X₅) and xylohexaose (X₆).

Xyn11E activity towards bleached pulp.

The catalytic properties of Xyn11E are suitable for industrial applications that do not involve high temperatures or alkaline conditions. The high specific activity on xylans and lack of detectable cellulase activity in the recombinant xylanase make the construction a good candidate for applications where the xylan must be removed without causing any damage to the cellulose fibers, for example the upgrading of paper pulp to dissolving pulp.

The activity of Xyn11E on bleached pulps from flax, sisal and eucalyptus, obtained by ECF and TCF bleaching sequences was evaluated. Pulps were incubated with the enzyme for 3 h at 45°C in buffers at pH 6 and the reducing sugars released from them were quantified (Table 3). Xyn11E was active on the bleached pulps. In all cases, TCF pulps released higher amount of sugars than ECF. The best results were obtained with eucalyptus and sisal pulps, which was consistent to the high proportion of hemicelluloses contained in these pulps. On the other hand, treatment of flax pulps released low amount of sugar in agreement with its low xylan content (Valenzuela 2012, Submitted). In contrast to paper-grade pulps, dissolving pulps must contain a high content of cellulose (90–99%), low content of hemicelluloses (2–4%) and traces of residual lignin, therefore the selective elimination of hemicelluloses is gaining ground as an alternative for upgrading paper pulp. There are different ways to accomplish this procedure, being the xylanase application a recent explored approach (Engström et al., 2006; Ibarra et al., 2010). The good results obtained with Xyn11E clearly show the potential role of the enzyme for the biotechnological upgrading of lignocellulosic materials.

Table 3. Activity of Xyn11E towards bleached pulps

| Pulp | µg of xilose / g of pulp |
|----------------|--------------------------|
| Flax ECF | 215,3 ± 31 |
| Flax TCF | 312,1 ± 47 |
| Sisal ECF | 1180,0 ± 149 |
| Sisal TCF | 1512 ± 74 |
| Eucaliptus ECF | 1232 ± 102 |
| Eucaliptus TCF | 1619,2 ± 212 |

CONCLUSIONS

The xylanase characterized in this work, together with Xyn1 from *Paenibacillus* sp. W-61, belong to a new minor group of xylanases dependent of chaperones for active folding. These enzymes belong to the low molecular weight and high isoelectric point subgroup of xylanases, widely distributed in the phylum firmicutes. Xyn11E is a highly active xylanase and may be a strong candidate for its use in upgrading bleached pulps.

Acknowledgments

We thank Teresa Vidal for his generous gift of bleached pulps of eucalyptus, sisal and flax. The work was partially supported by the Spanish Ministry of Education and Science, grant No CTQ2010-20238-C03-02, and AGAUR from Generalitat de Catalunya, grant 2009 SGR 819. Susana Valenzuela held a MAEC-AECI grant from Spanish Ministry of External Affairs. The experiments described in this article have been performed complying with the Spanish current laws.

References

- Ajisaka, K., and Yamamoto, Y. (2002). Control of the Regioselectivity in the Enzymatic Syntheses of Oligosaccharides Using Glycosidases. *ChemInform* 33, 251–251.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G., and Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340, 783–795.
- Biely, P., Vrsanská, M., Tenkanen, M., and Kluepfel, D. (1997). Endo-beta-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *J. Biotechnol.* 57, 151–166.
- Blanco, A., Díaz, P., Zueco, J., Parascandola, P., and Javier Pastor, F.I. (1999). A multidomain xylanase from a *Bacillus* sp. with a region homologous to thermostabilizing domains of thermophilic enzymes. *Microbiology (Reading, Engl.)* 145 (Pt 8), 2163–2170.
- Blanco, A., and Pastor, F.I.J. (1993). Characterization of cellulase-free xylanases from the newly isolated *Bacillus* sp. strain BP-23. *Canadian Journal of Microbiology* 39, 1162–1166.

Blanco, A., Vidal, T., Colom, J.F., and Pastor, F.I. (1995). Purification and properties of xylanase A from alkali-tolerant *Bacillus* sp. strain BP-23. *Appl. Environ. Microbiol.* *61*, 4468–4470.

Bradford, M.M. (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.

Breccia, J.D., Siñeriz, F., Baigorí, M.D., Castro, G.R., and Hatti-Kaul, R. (1998). Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Enzyme and Microbial Technology* *22*, 42–49.

Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., and Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* *37*, D233–238.

Collins, T., Gerday, C., and Feller, G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* *29*, 3–23.

Coughlan, M.P., and Hazlewood, G.P. (1993). beta-1,4-D-xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnol. Appl. Biochem.* *17 (Pt 3)*, 259–289.

Engström, A.-C., Ek, M., and Henriksson, G. (2006). Improved accessibility and reactivity of dissolving pulp for the viscose process: Pretreatment with monocomponent edogluconase. *Biomacromolecules* *7*, 2027–2031.

Fukuda, M., Watanabe, S., Kaneko, J., Itoh, Y., and Kamio, Y. (2009). The membrane lipoprotein LppX of *Paenibacillus* sp. strain W-61 serves as a molecular chaperone for xylanase of glycoside hydrolase family 11 during secretion across the cytoplasmic membrane. *J. Bacteriol.* *191*, 1641–1649.

Gallardo, O., Pastor, F.I.J., Polaina, J., Diaz, P., Łysek, R., Vogel, P., Isorna, P., González, B., and Sanz-Aparicio, J. (2010). Structural insights into the specificity of Xyn10B from *Paenibacillus barcinonensis* and its improved stability by forced protein evolution. *J. Biol. Chem.* *285*, 2721–2733.

Gehmayr, V., and Sixta, H. (2012). Pulp Properties and Their Influence on Enzymatic Degradability. *Biomacromolecules* *13*, 645–651.

Heo, S., Kwak, J., Oh, H.-W., Park, D.-S., Bae, K.S., Shin, D.H., and Park, H.-Y. (2006). Characterization of an extracellular xylanase in *Paenibacillus* sp. HY-8 isolated from an

herbivorous longicorn beetle. *Journal of microbiology and biotechnology* *16*, 1753–1759.

Ibarra, D., Köpcke, V., Larsson, P.T., Jääskeläinen, A.-S., and Ek, M. (2010). Combination of alkaline and enzymatic treatments as a process for upgrading sisal paper-grade pulp to dissolving-grade pulp. *Bioresour. Technol.* *101*, 7416–7423.

Joseleau, J.P., Cartier, N., Chambat, G., Faik, A., and Ruel, K. (1992). Structural features and biological activity of xyloglucans from suspension-cultured plant cells. *Biochimie* *74*, 81–88.

Ko, C.-H., Tsai, C.-H., Tu, J., Lee, H.-Y., Ku, L.-T., Kuo, P.-A., and Lai, Y.-K. (2010). Molecular cloning and characterization of a novel thermostable xylanase from *Paenibacillus campinasensis* BL11. *Process Biochemistry* *45*, 1638–1644.

Kolenová, K., Vrsanská, M., and Biely, P. (2006). Mode of action of endo-beta-1,4-xylanases of families 10 and 11 on acidic xylooligosaccharides. *J. Biotechnol.* *121*, 338–345.

Kubata, K., Horitsu, H., Kawai, K., Takamizawa, K., and Suzuki, T. (1992). Xylanase I of *Aeromonas caviae* ME-1 Isolated from the Intestine of a Herbivorous Insect (*Samia cynthia pryeri*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *56*, 1463–1464.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680–685.

Lee, T.H., Lim, P.O., and Lee, Y.-E. (2007). Cloning, characterization, and expression of xylanase A gene from *Paenibacillus* sp. DG-22 in *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* *17*, 29–36.

Oakley, A.J., Heinrich, T., Thompson, C.A., and Wilce, M.C.J. (2003). Characterization of a family 11 xylanase from *Bacillus subtilis* B230 used for paper bleaching. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* *59*, 627–636.

Paës, G., Berrin, J.-G., and Beaugrand, J. (2012). GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. *Biotechnology Advances* *30*, 564–592.

Paice, M.G., Bourbonnais, R., Desrochers, M., Jurasek, L., and Yaguchi, M. (1986). A xylanase gene from *Bacillus subtilis*; nucleotide sequence and comparison with *B. pumilus* gene. *Archives of Microbiology* *144*, 201–206.

Pollet, A., Delcour, J.A., and Courtin, C.M. (2010). Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. *Critical Reviews in Biotechnology* 30, 176–191.

Sapag, A., Wouters, J., Lambert, C., de Ioannes, P., Eyzaguirre, J., and Depiereux, E. (2002). The endoxylanases from family 11: computer analysis of protein sequences reveals important structural and phylogenetic relationships. *Journal of Biotechnology* 95, 109–131.

Spiro, R.G. (1966). [1] Analysis of sugars found in glycoproteins. In *Complex Carbohydrates*, (Academic Press), pp. 3–26.

Takami, H., Nakasone, K., Takaki, Y., Maeno, G., Sasaki, R., Masui, N., Fuji, F., Hirama, C., Nakamura, Y., Ogasawara, N., et al. (2000). Complete genome sequence of the alkaliphilic bacterium *Bacillus halodurans* and genomic sequence comparison with *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* 28, 4317–4331.

Törrönen, A., and Rouvinen, J. (1997). Structural and functional properties of low molecular weight endo-1,4-beta-xylanases. *J. Biotechnol.* 57, 137–149.

Valenzuela, S.V., Díaz, P., and Javier Pastor, F.I. (2010). Recombinant expression of an alkali stable GH10 xylanase from *Paenibacillus barcinonensis*. *J. Agric. Food Chem.* 58, 4814–4818.

Valenzuela, S.V., Diaz, P., and Pastor, F.I.J. (2012). Modular Glucuronoxylan-Specific Xylanase with a Family CBM35 Carbohydrate-Binding Module. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 3923–3931.

Viet, D.N., Kamio, Y., Abe, N., Kaneko, J., and Izaki, K. (1991). Purification and Properties of beta-1, 4-Xylanase from *Aeromonas caviae* W-61. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 445–449.

Watanabe, S., Viet, D.N., Kaneko, J., Kamio, Y., and Yoshida, S. (2008). Cloning, expression, and transglycosylation reaction of *Paenibacillus* sp. strain W-61 xylanase 1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 951–958.

3.4 Effectiveness of New Xylanases from Different GH Families on Lignin and Hexenuronic Acids Removal of Specialty Sisal Fibres

Susana V. Valenzuela, Cristina Valls, Teresa Vidal, Pilar Diaz y F. I. Javier Pastor

La efectividad del tratamiento de xilanasas no comerciales en el blanqueo de fibras de sisal ha sido evaluada por primera vez. Se ensayaron cuatro xilanasas pertenecientes a la especie bacteriana *Paenibacillus barcinonensis*, de las familias GH10, GH30, GH30-CBM35 y GH11, así como el sobrenadante crudo de la misma bacteria. Se blanquearon pastas alcalinas de sisal (*Agave sisalana*) mediante una secuencia XP, donde X corresponde al tratamiento enzimático y P a la etapa de extracción con peróxido de hidrógeno. Se evaluó el número kappa (KN), la blancura, la viscosidad y el contenido de ácidos hexenurónicos presentes al inicio y al final de la secuencia. Los mejores resultados fueron obtenidos por el tratamiento realizado con Xyn10A de la familia GH10 y con el sobrenadante crudo de *P. barcinonensis*, que produjeron una deslignificación notable y una reducción de ácidos hexenurónicos, sin una pérdida significativa de viscosidad. La liberación de azúcares en los efluentes de la etapa X estuvo correlacionada con la efectividad de las enzimas ensayadas. El contenido en xilano de fibras madereras y no madereras, y su accesibilidad, también mostró una correlación con la efectividad de las enzimas.

Effectiveness of new xylanases from different GH families on lignin and hexenuronic acids removal of specialty sisal fibres

Susana Valeria Valenzuela¹, Cristina Valls², Teresa Vidal², Pilar Diaz¹ and F. I. Javier Pastor^{1*}

¹ Department of Microbiology, Faculty of Biology. Universitat de Barcelona. Av. Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain

² Department of Textile and Paper Engineering. Universitat Politècnica de Catalunya. Colom 11, E-08222 Terrassa, Spain

ABSTRACT

Effectiveness of non-commercial xylanase treatment on bleaching of sisal fibres was evaluated for the first time. Four *Paenibacillus barcinonensis* xylanases belonging to families GH10, GH30, GH30-CBM35, and GH11, and crude culture supernatants of the producing bacteria were evaluated. Alkaline pulps of sisal (*Agave sisalana*) were bleached by an XP sequence, where X denotes enzyme treatment and P a hydrogen peroxide extraction stage, and kappa number, brightness, viscosity and hexenuronic acids content were determined.

Best results were obtained by treatment with Xyn10A from family GH10 and with crude supernatants of *P. barcinonensis*, which produced a notable delignification and reduction of hexenuronic acids content of pulps without significant loss of viscosity.

The release of sugars in the effluents from the X stage applied in sisal correlated with the effectiveness of the xylanases tested. The xylan content of wood and non-wood fibres and its accessibility showed also influence on the effectiveness of xylanases.

Keywords: Biobleaching; Hexenuronic acids; Sisal; Xylanase; Effluents

INTRODUCTION

Commercial non-wood pulp production has been estimated to be about 10% of the global pulp production and it is expected to increase in the next years. Sisal (*Agave sisalana*) is a good candidate for this purpose because of its low cost, easy availability and renewability (Li et al., 2000). Sisal fibers offer attractive properties for the production of high values papers, as those used in surgical gauze, filters, condensers or even for tea bags (Hurter, R, 2001).

The application of xylanases as bleach boosting agents has gained field in the pulp and paper industry for the reduction in the use bleaching chemicals and in the production on pollutants (Valls et al., 2010b). Xylanases can also decrease the content of hexenuronic acids (HexA) present in the pulp, formed during the alkaline cooking of wood (Daniel et al., 2003). They can increase kappa number and brightness reversion, and besides produce a consumption of bleaching reagents and can retain metal ions (Cadena et al., 2010).

Paenibacillus barcinonensis is a recently isolated xylanolytic bacteria (Sánchez et al., 2005), which produces a complex set of xylanases, some of which have been successfully evaluated in eucalyptus pulp bleaching (Blanco et al., 1995; Valls et al., 2010a). The aim of this work was to evaluate five xylanase preparations of *P. barcinonensis*, from different enzyme families, on sisal fibres. All the xylanases were applied separately as a pretreatment of a hydrogen peroxide extraction stage. Their bleach boosting ability was tested by analyzing their effect in decreasing the content of HexA and lignin. In addition, paper and effluent properties were analyzed. Our work shows for the first time the application of non-commercial xylanases to sisal fibres.

MATERIALS AND METHODS

Raw material

Sisal (*Agave sisalana*) alkaline pulps from soda anthraquinone cooking process were supplied by CELESA (Tortosa, Spain). Before the initial characterization, fibres were washed with water pH 4 (H_2SO_4) at 2% consistency for 30 min, followed by filtration and extensive washing with de-ionized water. The properties of initial pulp were 47.81% ISO brightness, kappa number 8.1, viscosity 778 mL/g and hexenuronic acids content 42.05 $\mu\text{mol/g}$ oven-dried pulp (odp). Unbleached alkaline pulps from flax (*Linum usitatissimum*) and kenaf (*Hibiscus cinnabinus*) were also supplied by CELESA. Unbleached eucalyptus (*Eucalypts globulus*) kraft pulp was supplied by ENCE (Pontevedra, Spain).

Xylan content of initial pulps was determined by quantitative acid hydrolysis with 72% sulfuric acid (TAPPI T13m method). The resulting hydrolysates were analyzed for monosaccharides (glucose coming from cellulose, and xylose coming from hemicelluloses) by high performance liquid chromatography (HPLC) (Garrote et al., 1999).

Xylanase treatments

Xylanases (EC 3.2.1.8) assayed were Xyn10A from family GH10 (Valenzuela et al., 2010), Xyn30D and Xyn30Dcat from family GH30, and Xyn11E from family GH11 (Valenzuela et al., 2012). Xyn10A and Xyn11E are single domain enzymes, thus comprised only of a catalytic module. Xyn30D is a modular enzyme comprised of a GH10 catalytic module linked to a CBM35 carbohydrate binding module. Xyn30Dcat is a truncated derivative of Xyn30D devoid of the CBM35. All these xylanases were recombinant enzymes from *P. barcinonensis* expressed and produced in *Escherichia coli*. The supernatants of cultures of *P. barcinonensis* grown on rice straw (Pba crude xylanase) (Blanco et al., 1995) were also evaluated.

Xylanase treatments (X stage) were performed on 12 g of dried sisal pulps by using 10 xylanase Units per gram of oven-dried pulp in 50 mM phosphate buffer pH 6 at 10% consistency. The treatments were carried out in polyethylene bags at 50°C for 2 h. Control reaction contained all components but without the enzyme. Once treated, pulps were filtered, their residual liquor collected, and pulps were extensively washed with de-ionized water (Valls and Roncero, 2009).

Bleaching treatment

The X stage was followed by a bleaching stage with hydrogen peroxide (P stage) which was performed in an Ahiba Spectradye dyeing apparatus from Datacolor equipped with closed vessels. It was carried out at 5% consistency with 2% odp of hydrogen peroxide, 1.5% odp of NaOH, 0.5% odp of DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid) and 0.2% odp $MgSO_4$ at 90°C for 2 h. Then, treated pulps were filtered and extensively washed with de-ionized water.

Analysis of Effluents

Reducing sugars were quantified by the method of Nelson and Somogyi using a standard curve of xylose as described before (Valenzuela et al., 2010). Thin layer chromatography (TLC) was performed as described previously (Valenzuela et al., 2010) with 150 μ l of each effluent.

Analysis of pulp properties

Kappa number, pulp brightness, and viscosity were determined according to ISO 302, ISO 2470-1, and ISO 5351/1, respectively. The hexenuronic acids (HexA) content was determined after P stage by the method of (Gellerstedt and Li, 1996), as modified for UV detection by (Chai et al., 2001). All parameters were measured at least three times in order to calculate a standard deviation.

RESULTS AND DISCUSSION

Xylanase activity on sisal fibres

As a first approach to evaluate the activity of xylanases of different GH families on sisal fibres, the effluents obtained from the treatment with the different enzymes (X stage) were analyzed to quantify their content in reducing sugars and their oligosaccharide composition. Xyn10A and Pba crude xylanase released high amounts of reducing sugars from sisal fibres, Xyn30Dcat and Xyn11E released a lower amount, while treatment with Xyn30D produced a minor liberation of sugars (Table 1). Analysis by thin layer chromatography (TLC) showed that sugars released by Xyn10A were mostly short chain oligosaccharides of polymerization degree ≤ 5 , while Xyn30D, Xyn30Dcat and Xyn11E released predominantly longer oligosaccharides (Fig. 1). These results are in accordance with the reported mode of action on xylans of these enzymes, belonging to different GH families (Valenzuela et al., 2010, 2012). On the other hand, the profile obtained with Pba crude xylanases was very similar to that obtained with Xyn10A, in agreement with the fact that it is the major xylanase contained in the supernatants of cultures of *P. barcinonensis* (Blanco et al., 1995).

Table 1. Reducing sugars liberated by xylanase treatment of pulps.

| | μg of xylose equivalent/ml of effluent | | | |
|------------|---|-------------------|------------------|------------------|
| | Sisal | Eucalyptus | Flax | Kenaf |
| Control | 23.1 \pm 17.6 | 21.6 \pm 17.0 | 27.0 \pm 17.7 | 39.2 \pm 17.9 |
| Xyn10A | 589.4 \pm 28.5 | 1045.8 \pm 40.2 | 88.1 \pm 30.8 | 697.2 \pm 16.7 |
| Xyn30D | 54.9 \pm 16.7 | 62.4 \pm 17.9 | 62.4 \pm 27.3 | 142.1 \pm 34.4 |
| Xyn30Dcat | 138.7 \pm 32 | 162.8 \pm 19.1 | 122.1 \pm 25.0 | 182.7 \pm 16.7 |
| Xyn11E | 132.1 \pm 43.7 | 117.2 \pm 20.3 | 45.8 \pm 20.3 | 111.4 \pm 23.8 |
| Pba c. xyl | 323.8 \pm 28.5 | 830.0 \pm 40.2 | 154.5 \pm 30.8 | 464.9 \pm 40.2 |

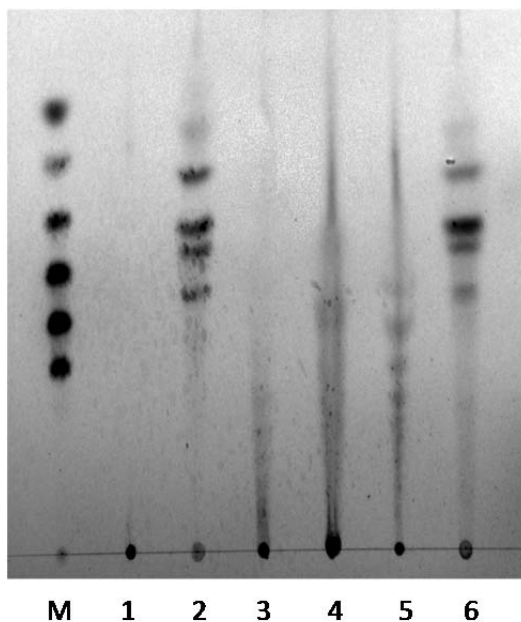


Figure 1. Thin layer chromatogram of effluents from X stage. Analyses of effluents from control (1), Xyn10A (2), Xyn30D (3), Xyn30Dcat (4), Xyn11E (5) or Pba crude xylanase treatments (6) of sisal pulps. A mass standard with xylose, xylobiose, xylotriose, xylohexaose, xylopentaose and xylohexaose was included (M).

Analysis of sisal pulp properties

Pulp samples from the X stage and from the following peroxide bleaching (P stage) were analyzed in order to evaluate and compare the ability of the xylanases to increase delignification and chromophore removal. Fig. 2 shows kappa number (KN) and brightness values of pulps after the enzyme treatments and after P stage. Xylanase application produced a decrease in the kappa number in most of the samples. The decrease in kappa number obtained by the treatment with the different xylanases was in accordance with the amount of sugars released by each enzyme. The maximum effect was obtained with Xyn10A and with Pba crude xylanase, which produced a kappa number decrease of 22% and 21% respectively after the X stage and a similar reduction, 23% and 18%, after the P stage, when compared to the control pulps. Xyn30Dcat also

showed an important kappa number decrease (11%) after the P stage (Fig. 2). However Xyn30D application did not reduce kappa number of pulps, while Xyn11E produced only a minor decrease in kappa number. A recent study of enzymatic treatment of sisal pulps showed that commercial xylanases in similar conditions but at lower dose, 3 U/odp, caused a drop off in kappa number of about 14%, and values of 22% reduction in kappa number were only achieved by combining the X stage with a laccase/mediator stage (Aracri and Vidal, 2011). These results show the importance of assessing the doses required for the application of enzymes as delignification aids and evidences the different efficiency of xylanases of different GH families (Valls et al., 2010a).

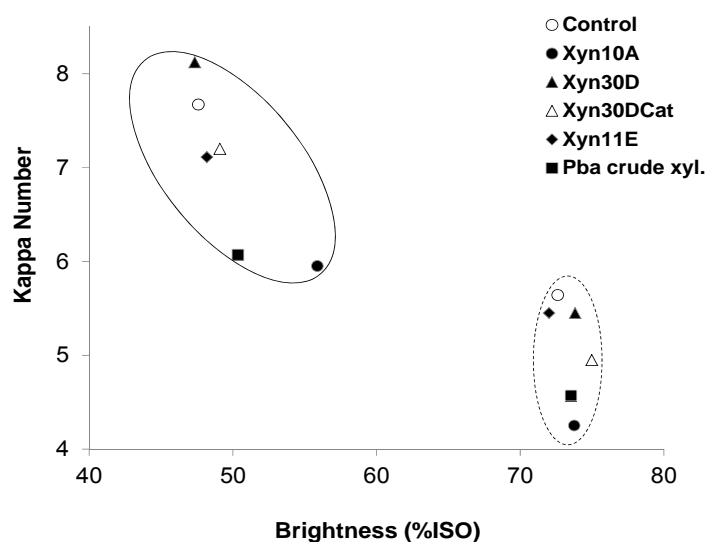


Figure 2. Kappa number vs Brightness values for sisal pulps after the X stage (continous line), and after the P stage (dashed line).

Brightness analysis of pulps showed that treatment with Xyn10A, Pba crude xylanase and Xyn30DCat produced a brightness increase of 8.3, 2.8 and 1.5% ISO respectively after the X stage, compared control pulp (Fig. 2). After the P stage all samples, including control pulps, showed a notable brightness increase of around 25% ISO, which denoted

the bleaching effect of alkaline peroxide. Treatment with xylanases produced in most of the cases an additional increase in brightness between 0.9 and 2.4% ISO. Surprisingly, and in accordance with the lack of a significant contribution to delignification above detailed, Xyn11E did not produce increase in brightness, showing that not all family GH11 xylanases are suitable for the bleaching process, on the contrary to what has been suggested (Clarke et al., 1997; Esteghlalian et al., 2008). The lack of efficiency of Xyn11E can be alternatively due to putative inhibitors present in pulps that could affect the activity of individual xylanases.

Our results show that the effect of xylanases were less evident after the P stage than after the X stage, probably because of an excess of bleaching agent in the P stage. Nevertheless, the bleaching capacity could be seen immediately after the X stage because of the changes in the pulp properties (Wong et al., 1996). Therefore, we considered Xyn10A as the best candidate among the xylanases assayed for improving the bleachability of sisal fibres. It should be noticed that Pba crude xylanase produced similar results than Xyn10A. As it was mentioned before, Xyn10A is the predominant enzyme in Pba crude xylanase. So, it is considerably cheaper to use this crude xylanase, supernatants of cultures of *P. barcinonensis*, than using recombinant Xyn10A, due to the costs that its production can imply. In the case of Xyn30D vs Xyn30Dcat, the better results were obtained with Xyn30Dcat, which is a truncated derivative of Xyn30D. As Xyn30D is a modular xylanase containing a CBM35 carbohydrate binding module, it has higher size (62 kDa) than Xyn30Dcat, which comprises only the catalytic module of the enzyme (47 kDa). Even when the catalytic domain is the responsible for xylan hydrolysis, hence for the bleaching capability, the extra size added by CBM35 could interfere with accessibility to xylan from fibres. Previous results that evaluated the performance of a modular 120 kDa xylanase from *P. barcinonensis* on eucalyptus fibres showed that the enzyme did not produce effects on bleaching (Valls et al., 2010b). These results suggest that the accessory modules may decrease the bleaching efficiency of an enzyme, because the difficulty faced by a larger molecule to access to lignin trapped in pulp fibers. The lower bleaching capacity of xylanase Xyn30D could also be

caused by its glucuronic acid binding ability (Valenzuela et al., 2012), that could decrease the free diffusion of the enzyme between the fibers.

Table 2. Pulp properties after each bleaching stage.

| | X | | P | | | |
|------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------------|----------------------------|
| | KN | Br (%ISO) | KN | Br (%ISO) | Viscosity (mL/g) | HexA ($\mu\text{mol/g}$) |
| Control | 7.7 \pm 0.02 | 47.6 \pm 1.9 | 5.6 \pm 0.09 | 72.6 \pm 0.3 | 772 \pm 25 | 42.2 \pm 1.5 |
| Xyn10A | 6.0 \pm 0.02 | 55.9 \pm 0.4 | 4.3 \pm 0.08 | 73.8 \pm 0.1 | 724 \pm 18 | 31.4 \pm 0.8 |
| Xyn30D | 8.1 \pm 0.11 | 47.4 \pm 0.3 | 5.5 \pm 0.18 | 73.8 \pm 0.1 | 662 \pm 12 | 37.5 \pm 1.7 |
| Xyn30Dcat | 7.2 \pm 0.12 | 49.1 \pm 0.5 | 5.0 \pm 0.02 | 75.0 \pm 0.1 | 620 \pm 52 | 36.3 \pm 0.91 |
| Xyn11E | 7.1 \pm 0.01 | 48.2 \pm 1.3 | 5.5 \pm 0.18 | 72.0 \pm 0.3 | 658 \pm 18 | 39.9 \pm 0.6 |
| Pba c.xyl. | 6.1 \pm 0.02 | 50.4 \pm 0.2 | 4.6 \pm 0.21 | 73.5 \pm 0.1 | 753 \pm 10 | 31.4 \pm 0.6 |

Even when all treatments with recombinant xylanases were cellulase free, the Pba crude xylanase contained a small amount of cellulase (11.6 U/ml of xylanase activity vs 0.05 U/ml of CMCase activity). Moreover, enzyme treatments can cause damage in the structural integrity of the cellulose. For that reason in order to assess the effect of each treatment on cellulose, the viscosity of pulps after the P stage was determined (Table 2). In all cases a small decrease of viscosity was observed. However, treatments with the best results in bleaching (Xyn10A and Pba crude xylanase), were those with lower loss of viscosity. On the contrary, those treatments with lower effect on bleaching caused a greater decrease in viscosity degree. This was consistent with the fact that removal of xylans in the X stage may increase the average degree of polymerization of carbohydrates in the fiber, because of their lower DP compared with that of cellulose (Paice et al., 1988; Torres et al., 2000).

Hexenuronic Acids content of sisal fibres

The HexA content of pulps was measured after the P stage. All xylanase treatments gave rise to a reduction of HexA content (Table 2). Again the best results were obtained

with Xyn10A and Pba crude xylanase, which produced a reduction of around 25% of total HexA of pulps. Treatments with Xyn30D and Xyn30Dcat caused a HexA reduction of 11-14%, which was in contrast with previous results that reported a smaller effect of xylanases of family GH30 in HexA removal from eucalyptus fibres (Valls et al., 2010b). The higher effectiveness found in our results can be correlated to the higher enzyme dose used (3x), to the difference in the fibres assayed (sisal or eucalyptus) or to the different GH30 xylanases applied. A deeper investigation, that involve more xylanases and more raw materials should be done in order to clarify the effect of xylanase application on HexA content of pulps.

Xylanase application on other non-wood and wood fibres

As the amounts of sugar released in the X stage was correlated with the bleaching efficiency and HexAs removal capacity of the xylanases evaluated, other three raw materials were assayed in order to infer the potential efficiency of the xylanases on these fibres. Eucalyptus, flax and kenaf fibres were similarly treated with the enzymes under study and the effluents of all treatments were analyzed to quantify the reducing sugars released (Table 1). On eucalyptus fibres the maximum activity was observed with Xyn10A and Pba crude xylanase, which released a remarkably higher amount of reducing sugars than from sisal. The previously reported bleaching efficiency of Xyn10A on eucalyptus fibres (Blanco et al., 1995) supported the correlation between the activity on pulp xylans here found and bleaching properties of this xylanase. Xyn30, Xyn30cat and Xyn11E had similar behaviors on eucalyptus than on sisal fibres, thus suggesting a similar behavior in bleaching. Xylanase treatment of flax fibres released low amount of sugar in all cases, probably because of the low xylan content of these fibres in accordance with its high cellulose content (Fillat et al., 2011). On its side kenaf fibres gave slightly better results than those obtained with sisal, indicating that an enzyme-assisted bleaching with Xyn10A or Pba crude xylanase may have promising results. We believe this result is remarkable since to our knowledge no xylanases have been tested in the bleaching of kenaf fibres.

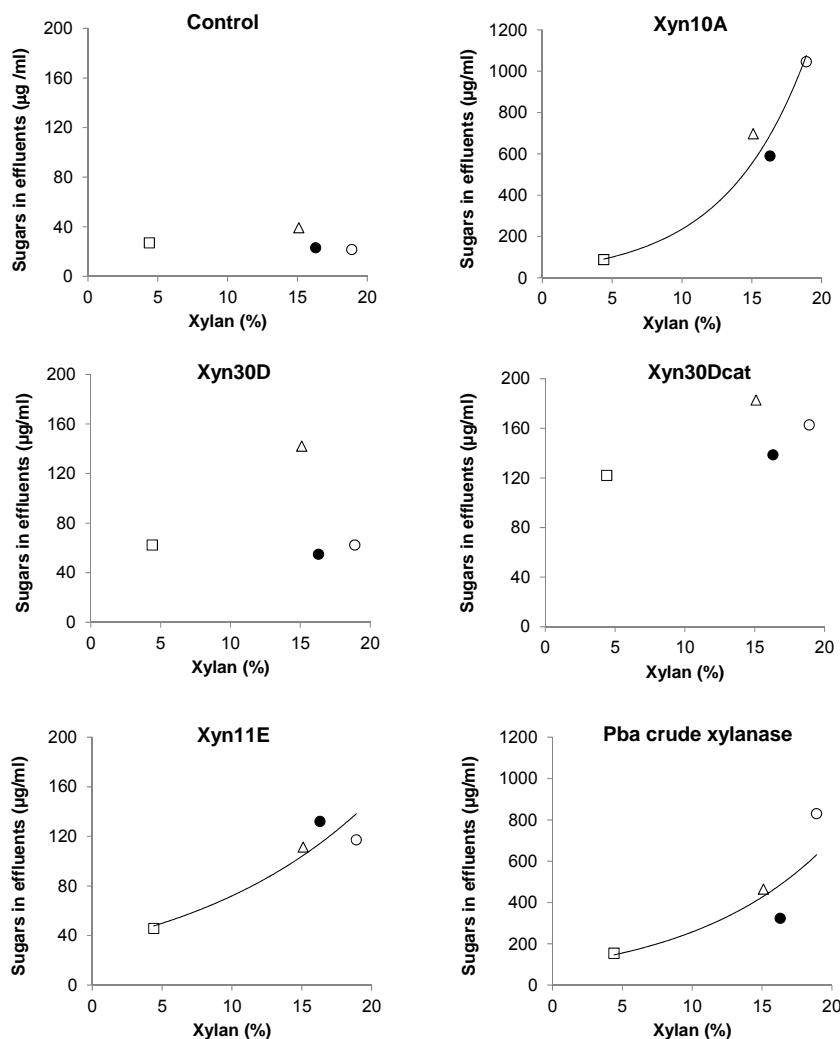


Figure 3. Relationship between the content of xylan of flax (open square), kenaf (open triangle), sisal (solid circle) and eucalyptus (open circle), and the reducing sugars equivalent released from fibres after the enzymatic stage.

Xylan content of the different non-wood and wood fibres tested was determined. They showed different percentage of xylans: eucalyptus pulp had the highest xylan content (18.9%), followed by sisal (16.3%), kenaf (15.1%), and finally by flax (4.4%). Fig. 3a and 3b show the important effect of Xyn10A and Pba crude xylanase in releasing sugars

from fibres. An exponential correlation between sugars liberation and xylan content of fibres was found. Concerning Xyn11E (Fig. 3e) this correlation was maintained, although the release of sugars by this xylanase was significantly lower, in accordance with its lower effects on pulp properties. The correlation found was not observed with the xylanases from family GH30 (Fig. 3c and 3d). However, the effectiveness of these GH30 enzymes was increased in kenaf fibres, suggesting that the kind or the accessibility of kenaf xylans is better for GH30 xylanases. Comparison of Xyn30D with Xyn30Dcat suggests that the lower size of Xyn30Dcat allowed a better accessibility of this xylanase to the xylan polymer of fibres. These results indicate that the effectiveness of a xylanase depends on the xylan content of fibres and on the kind and accessibility of these xylans.

CONCLUSIONS

Xyn10A from family GH10 was the most efficient xylanase in delignification and decreasing HexA content of sisal fibres. Similar results were obtained with Pba crude xylanase, an enzyme cocktail which contained Xyn10A as a major component. Xylanases belonging to family GH30 were more efficient when applied as single catalytic domain. On contrast, Xyn11E did not produce significant effects in pulp properties. It has been found out that the release of sugars in the effluents of the X stage correlates with the effectiveness of the enzymes tested. Moreover, the effectiveness of a xylanase depends on the xylan content of fibres and on the kind and accessibility of these xylans.

Acknowledgements

The study was supported in part by the Spanish Ministry of Education and Science, grant CTQ2010-20238-C03-01, CTQ2010-20238-C03-02, CTQ2009-12904 and AGAUR from Generalitat de Catalunya, grant 2009 SGR 819. Susana Valenzuela was the recipient of an MAEC-AECI doctorate grant from the Spanish Ministry of Foreign Affairs.

REFERENCES

- [1] Aracri, E., Vidal, T., 2011. Xylanase- and laccase-aided hexenuronic acids and lignin removal from specialty sisal fibres. *Carbohydrate Polymers* 83, 1355–1362.
- [2] Blanco, A., Vidal, T., Colom, J.F., Pastor, F.I.J., 1995. Purification and properties of xylanase A from alkali-tolerant *Bacillus* sp. strain BP-23. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 4468–4470.
- [3] Cadena, E.M., Vidal, T., Torres, A.L., 2010. Can the laccase mediator system affect the chemical and refining properties of the eucalyptus pulp? *Bioresource Technology* 101, 8199–8204.
- [4] Chai, X.-S., Zhu, J.Y., Li, J., 2001. A simple and rapid method to determine hexenuronic acid groups in chemical pulps. *Journal of Pulp and Paper Science* 27, 165–170.
- [5] Clarke, J.H., Rixon, J.E., Ciruela, A., Gilbert, H.J., Hazlewood, G.P., 1997. Family-10 and family-11 xylanases differ in their capacity to enhance the bleachability of hardwood and softwood paper pulps. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 177–183.
- [6] Daniel, A.I.D., Neto, C.P., Evtuguin, D.V., Silvestre, A.J.D., 2003. Hexenuronic acid contents of *Eucalyptus globulus* kraft pulps: Variation with pulping conditions and effect on ECF bleachability. *Tappi Journal* 2, 3–8.
- [7] Esteghlalian, A.R., Kazaoka, M.M., Lowery, B.A., Varvak, A., Hancock, B., Woodward, T., Turner, J.O., Blum, D.L., Weiner, D., Hazlewood, G.P., 2008. Prebleaching of softwood and hardwood pulps by a high performance xylanase belonging to a novel clade of glycosyl hydrolase family 11. *Enzyme Microb. Technol.* 42, 395–403.
- [8] Fillat, A., Roncero, M.B., Vidal, T., 2011. Assessing the use of xylanase and laccases in biobleaching stages of a TCF sequence for flax pulp. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 86, 1501–1507.
- [9] Garrote, G., Domínguez, H., Parajó, J.C., 1999. Mild autohydrolysis: An environmentally friendly technology for xylooligosaccharide production from wood. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 74, 1101–1109.
- [10] Gellerstedt, G., Li, J., 1996. An HPLC method for the quantitative determination of hexenuronic acid groups in chemical pulps. *Carbohydrate Research* 294, 41–51.

- [11] Hurter, R, 2001. Sisal fibre: market opportunities in the pulp and paper industry. FAO/CFC. Technical Paper 14, 61–74.
- [12] Li, Y., Mai, Y.-W., Ye, L., 2000. Sisal fibre and its composites: a review of recent developments. *Composites Science and Technology* 60, 2037–2055.
- [13] Paice, M.G., Bernier, R., Jurasek, L., 1988. Viscosity-enhancing bleaching of hardwood kraft pulp with xylanase from a cloned gene. *Biotechnology and Bioengineering* 32, 235–239.
- [14] Sánchez, M.M., Fritze, D., Blanco, A., Spröer, C., Tindall, B.J., Schumann, P., Kroppenstedt, R.M., Diaz, P., Pastor, F.I.J., 2005. *Paenibacillus barcinonensis* sp. nov., a xylanase-producing bacterium isolated from a rice field in the Ebro River delta. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 935–939.
- [15] Torres, A.L., Roncero, M.B., Colom, J.F., Pastor, F.I.J., Blanco, A., Vidal, T., 2000. Effect of a novel enzyme on fibre morphology during ECF bleaching of oxygen delignified Eucalyptus kraft pulps. *Bioresource Technology* 74, 135–140.
- [16] Valenzuela, S.V., Díaz, P., Javier Pastor, F.I.J., 2010. Recombinant expression of an alkali stable GH10 xylanase from *Paenibacillus barcinonensis*. *J. Agric. Food Chem.* 58, 4814–4818.
- [17] Valenzuela, S.V., Diaz, P., Pastor, F.I.J., 2012. Modular Glucuronoxylan-Specific Xylanase with a Family CBM35 Carbohydrate-Binding Module. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 3923–3931.
- [18] Valls, C., Gallardo, O., Vidal, T., Pastor, F.I.J., Díaz, P., Roncero, M.B., 2010a. New xylanases to obtain modified eucalypt fibres with high-cellulose content. *Bioresource Technology* 101, 7439–7445.
- [19] Valls, C., Roncero, M.B., 2009. Using both xylanase and laccase enzymes for pulp bleaching. *Bioresour. Technol.* 100, 2032–2039.
- [20] Valls, C., Vidal, T., Gallardo, O., Diaz, P., Pastor, F.I.J., Blanca Roncero, M., 2010b. Obtaining low-HexA-content cellulose from eucalypt fibres: Which glycosil hydrolase family is more efficient? *Carbohydrate Polymers* 80, 154–160.
- [21] Wong, K.K.Y., Nelson, S.L., Saddler, J.N., 1996. Xylanase treatment for the peroxide bleaching of oxygen delignified kraft pulps derived from three softwood species. *Journal of Biotechnology* 48, 137–145.

3.5 Preliminary Crystallographic Analysis of Xyn30D from *Paenibacillus barcinonensis*

María Ángela Sainz-Polo, Susana V. Valenzuela, F. I. Javier Pastor y Julia Sanz-Aparicio

La xilanasa Xyn30D, un nuevo miembro del grupo de xilanasas de la familia GH30 recientemente caracterizado, ha sido purificada y cristalizada. Comparte el modo de acción distintivo de estas enzimas, donde la hidrólisis de los enlaces β -(1,4) del xilano es dirigida por la posición de las ramificaciones de glucuronato, que deben situarse en el subsitio -2 del centro activo de las xilanasas. Xyn30D es una enzima bimodular que está compuesta por un dominio catalítico amino terminal, perteneciente a la familia GH30 de glicosil hidrolasas, y un dominio de unión a carbohidratos de la familia CBM35, ubicado en posición carboxilo terminal, que presenta capacidad de unir xilanos y ácido glucurónico. Se obtuvieron cristales de la xilanasa completa. La estructura de Xyn30D fue determinada por reemplazo molecular a una resolución de 2,4 Å y el refinamiento de la estructura se encuentra en curso.

Este informe es la tercera estructura resuelta de esta familia única de xilanasas, y la primera de una enzima bimodular con la arquitectura de dominios GH30-CBM35. Este estudio contribuye a la comprensión del papel que juegan las diferentes xilanasas en la despolimerización del glucuronoxilano.

Preliminary crystallographic analysis of Xyn30D from *Paenibacillus barcinonensis*

María Ángela Sainz-Polo¹, Susana V. Valenzuela², F. I. Javier Pastor² and Julia Sanz-Aparicio¹

¹ Department of Crystallography and Structural Biology, Institute of Physical-Chemistry “Rocasolano”, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Serrano 119, 28006 Madrid, Spain

² Department of Microbiology, Faculty of Biology. Universitat de Barcelona. Av. Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain

ABSTRACT

Xyn30D, a new member of the recently identified xylanases from family GH30, has been purified and crystallized. It shares the distinctive endo mode of action described for these enzymes, where the hydrolysis of the β -(1,4) bonds of xylan is directed by α -1,2-linked glucuronate moieties, which have to be placed at the -2 subsite of the active site of xylanases. Xyn30D is a bi-modular enzyme composed by an N-terminal catalytic domain belonging to glycoside hydrolase family 30 (GH30), and a C-terminal carbohydrate binding domain of family 35 (CBM35) able to bind xylans and glucuronic acid. Crystals of the whole enzyme were obtained. The structure of the xylanase has been determined by molecular replacement to a resolution of 2.4 Å and refinement is underway. This report represents the third crystallization of a member of this unique xylanase family and the first of a bi-modular enzyme with the domain architecture GH30-CBM35. This study will contribute to the understanding of the role that the different xylanases play in the depolymerization of glucuroxylan.

Keywords: xylanase; GH30; CBM35; crystallization

INTRODUCTION

Within the line of energy independence, the enzymatic degradation of the plant cell wall is a process that wins more followers every day because of its importance in the use of renewable carbon sources. Xylan is one of their main components, which comprises one third of the world's renewable carbon (de Vries and Visser, 2001), thus its depolymerization plays a key role in the biodegradation of the plant cell wall. Xylanases are enzymes that catalyze the hydrolysis of the main chain of xylan, and to date they have been successfully used in textile, food, feed and paper industry among others. Nevertheless, the complexity of xylan requires the combined action of different xylanases besides other enzymes that can degrade ramifications xylan (Biely, 1985).

Commonly, xylanases are generally classified into GH10 or GH11 families of glycosyl hydrolases, but in recent times, new xylanases have been classified into families GH5, GH8, GH30 and GH43. The GH30 family xylanases share a common property of being only active on glucuronoxylans, which is a unique trait of this xylanase family. Recently, two xylanases belonging to this family have been crystallized (St John et al., 2011; Urbániková et al., 2011). In both cases, they show a catalytic domain with a common $(\beta/\alpha)_8$ barrel fold tightly connected to a side β -sheet structure. Recently a new xylanase of family GH30, Xyn30D from *Paenibacillus barcinonensis*, has been identified and characterized (Valenzuela et al., 2012). The enzyme is a bi-modular xylanase comprised of a complete GH30 domain bound to an ancillary CBM35 carbohydrate-binding module, and constitutes the first example of modular xylanase within GH30 family. We report here its purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis.

The few existing reports on the catalytic properties of xylanases specific for glucuronoxylan hydrolysis make it difficult to identify common traits that can give clues to understanding their contribution to depolymerization of this polysaccharide. Further studies will be required to ascertain their role in degradation of xylan in natural

habitats. Elucidation of Xyn30D structure will contribute to deciphering the biochemical function of the different xylanases present in a single microorganism.

MATERIALS AND METHODS

Cloning and expression of Xyn30D

Construction of the Xyn30D expression vector for crystallization studies was previously described (Valenzuela et al., 2012). For the expression assay, *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) was transformed with pET101Xyn30D and grown in ampicillin supplemented LB medium (50 µg/ml) at 37°C until the absorbance at 600 nm reached 0.8, then it was induced with 0,5 mM IPTG (isopropyl-β-d-thiogalactopyranoside) for 18 h at 30 °C. The cells were collected by centrifugation at 6000 x g for 15 min and resuspended in 50 mM Tris pH 7, 20 mM imidazole, 500 mM NaCl. Cells were disrupted with a French press. The solution was then centrifuged for 20 min at 20 000 x g and the resulting supernatant was placed on ice. Xyn30D was expressed with its own signal peptide, and its C - terminus fused to a 6XHis tag to facilitate the purification.

Purification of Xyn30D

The recombinant Xyn30D was initially purified from cell extracts by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) using HisTrap HP columns of 1 ml (GE Healthcare) and eluted in 50 mM Tris pH 7, 500 mM NaCl with a 20 to 500 mM imidazole gradient on a fast protein liquid chromatography system (ÄKTA FPLC; GE Healthcare). The IMAC elution fractions were concentrated and dialyzed with 50 mM Tris pH 7 using Centricon centrifugal filter units of 30 kDa molecular mass cutoff (Millipore) to a final volume of less than 10 ml. Concentrated enzyme was then loaded onto a MonoQ ionic exchange column. Single injections of 1800 µl were made and the protein was eluted with a gradient of 0 to 1M NaCl. Purified Xyn30D was concentrated at least to 10 mg/ml for crystal screens. The purity of the protein was determined by SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) (Laemmli, 1970).

Enzyme assays

Xyn30D was assayed for enzyme activity using the method of Somogyi and Nelson (Valenzuela et al., 2012) to detect the release of reducing sugar. Beechwood xylan (Sigma) at 1.5% (w/v) was included in the reactions as the substrate.

Crystallization

In order to know the suitable protein concentration to crystallize, the Pre-Crystallization Test (PCT, Hampton Research) was used. 13.14 mg/ml was a correct concentration. Initial crystallization conditions of the purified protein samples were investigated by high-throughput techniques with a NanoDrop robot (Innovadyne Technologies Inc.) using the commercially available Index Screen, SaltRx and Crystal Screen from Hampton Research and PACT Suite and JCSG Suite from Qiagen. The assays were carried out by the sitting-drop vapour-diffusion method at 291 K in Innovaplate SD-2 microplates (Innovadyne Technologies Inc.) by mixing 250 nl protein solution with 250 nl precipitant solution and equilibrating against 60 μ l well solution.

A few PEG 3350-containing solutions gave small needle-like crystals and these conditions were optimized through further sitting-drop and hanging-drop experiments by mixing 1 μ l protein solution with 1 μ l precipitant solution and equilibrating against 500 μ l well solution on Cryschem plates (Hampton Research).

Data collection and processing

All crystals were soaked in precipitant solution containing an additional 30% glycerol before being flash-cooled to 100 K. Crystals were tested using synchrotron radiation. Diffraction data sets were collected at the ESRF (Grenoble, France). The data sets were processed using the program iMOSFLM (Battye et al., 2011) and SCALA (Evans, 2006) as distributed in the CCP4 suite (Winn et al., 2011).

RESULTS AND DISCUSION

Protein purification and crystallization

The purification of the Xyn30D by the two columns yielded an active protein with a high degree of purity and homogeneity (Fig. 1).

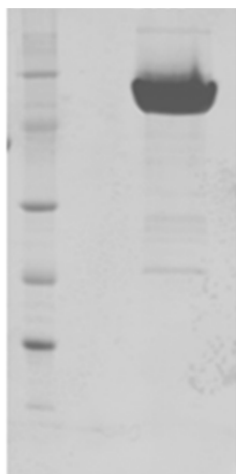


Figure 1. SDS-PAGE analysis of purified Xyn30D in 15% polyacrylamide gels. Lane 1, low-molecular-weight protein marker; lane 2, purified Xyn30D.

A preliminary search for crystallization conditions with several commercial screens led to small needle-like crystals at 15% PEG 4 K, 0.2 M magnesium chloride, 0.1 M Tris pH 8.5, (Fig. 2a). Optimization was performed by varying the protein/precipitant concentration and pH, and by adding different additives to the crystallization solution: MPD (2-methyl-2,4-pentanediol), glycerol, and guanidinium chloride. First, 5% glycerol led to small rod-shaped crystals (Fig. 2b) that increased its size by incrementing the protein concentration (drop ratio 2:1) (Fig. 2c). Finally, streak seeding was crucial in providing high quality crystals that allowed full data collection.

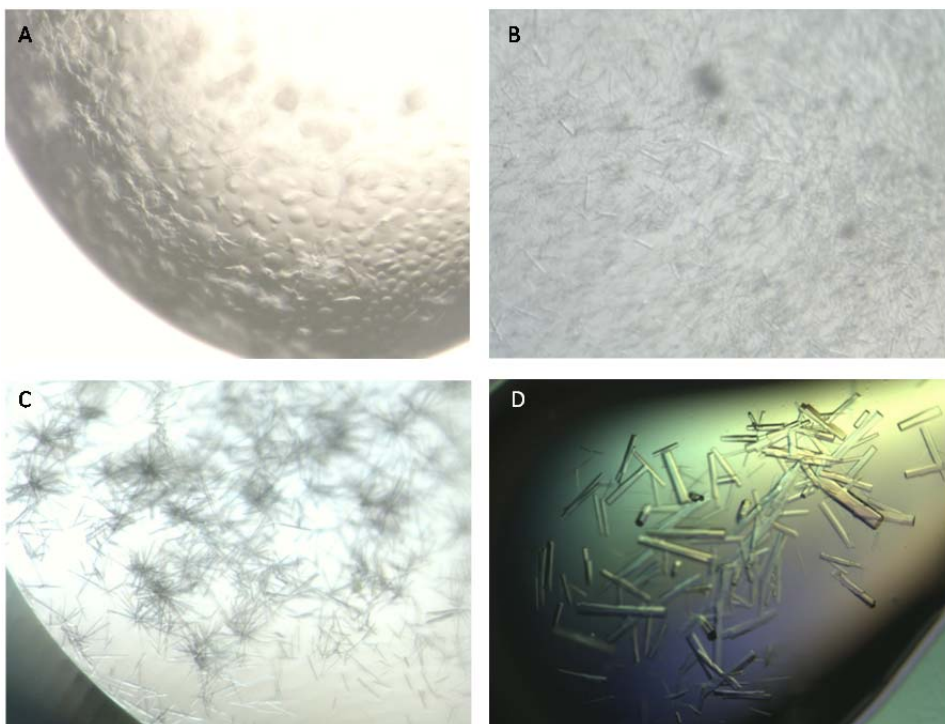


Figure 2. Crystals of Xyn30D

The best rod-shaped crystals were grown by mixing double amount of 13.14 mg/ml of Xyn30D in 20 mM Tris pH 8, 80 mM NaCl and a solution consisting of 10% PEG 3350, 5% glycerol, 0.1 M Tris pH 8 (Fig. 2d). The final optimized crystals were tested using a synchrotron-radiation source to obtain high-resolution data. Several native data sets were collected at 100 K on the ID23-2 beamline at the ESRF (Grenoble, France). The crystals belonged to space group P3221, with unit-cell parameters $a = 173.81$, $b = 173.81$, $c = 183.74$ Å, and diffracted up to 2.4 Å resolution (Fig 3). As calculated by its sequence analysis, the molecular weight of the monomer is 62124 kDa and, therefore, assuming a reasonable Matthews coefficient value within the range 4.87-2.44 Å³ Da⁻¹ (Matthews, 1968) corresponding to 75-50% solvent content, the presence of 3-5 molecules in the asymmetric unit should be expected. We investigated the local symmetry relating the subunits in the asymmetric unit using POLARRFN (Kabsch, 1976) from the CCP4 package. Several self-rotation functions were computed in the

resolution range 15-3.5 Å, with Patterson vectors from 25 to 40 Å radius of integration. Structure determination is in progress using the coordinates of glucuronoxylanase XynC from *Bacillus subtilis* (PDB code 3GTN), which shows 80% sequence identity with the GH30 portion of Xyn30D, and the C-terminal CBM35 from amycolaptosis orientalis exochitosanase (PDB code 2VZQ), with 40 % identity with the C-terminal domain. This model was used as a template in the molecular-replacement method with data to 3.5 Å resolution, using MOLREP (Winn et al, 2011). A solution containing four molecules in the asymmetric unit has been found and preliminary structural refinement of this octamer with REFMAC (Murshudov et al, 2011) lowered the R factor to 0.41 (Rfree = 0.46). Model building and further refinement are ongoing

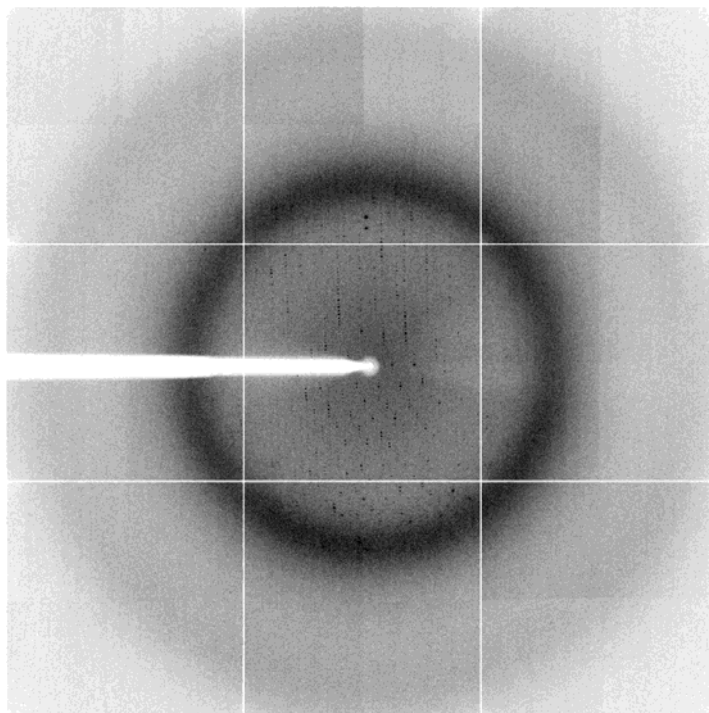


Figure 3. Representative diffraction pattern of a Xyn30D crystal (the outer circle corresponds to 2.4 Å resolution).

CONCLUSIONS

Crystals of Xyn30D have been obtained and its structure is being solved. Research is currently aimed at obtaining crystals from an inactivated Xyn30D mutant to solve also the structure of Xyn30D complexed with aldotetrauronic acid. Obtaining this new structure in complex with its ligand will help to elucidate the substrate-binding mechanism and specificity of this novel family of xylanases.

REFERENCES

- Battye, T. G. G., Kontogiannis, L., Johnson, O., Powell, H. R. & Leslie, A. G.W. (2011). iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Cryst. D67*, 271–281.
- Biely, P. (1985). Microbial xylanolytic systems. *Trends in Biotechnology* 3, 286–290.
- Evans, P. (2006). Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr. D62*, 72–82.
- Kabsch, W. (1976) A solution for the best rotation to relate two sets of vectors, *Acta Crystallogr A*, 32, 922 - 923.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Matthews BW. (1968). Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol* 33:491-497
- Montanier, C., van Bueren, A.L., Dumon, C., Flint, J.E., Correia, M.A., Prates, J.A., Firbank, S.J., Lewis, R.J., Grondin, G.G., Ghinet, M.G., et al. (2009). Evidence that family 35 carbohydrate binding modules display conserved specificity but divergent function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 3065–3070.
- Murshudov, G. N., Skubák, P., Lebedev, A. A., Pannu, N. S., Steiner, R. A., Nicholls, R. A., Winn, M. D., Long, F. & Vagin, A. A. (2011). REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Cryst. D67*, 355–367.
- St John, F.J., Hurlbert, J.C., Rice, J.D., Preston, J.F., and Pozharski, E. (2011). Ligand bound structures of a glycosyl hydrolase family 30 glucuronoxylan xylanohydrolase. *J. Mol. Biol.* 407, 92–109.

Urbániková, L., Vršanská, M., Mørkeberg Krogh, K.B.R., Hoff, T., and Biely, P. (2011). Structural basis for substrate recognition by *Erwinia chrysanthemi* GH30 glucuronoxylanase. *FEBS J.* 278, 2105–2116.

Valenzuela, S.V., Diaz, P., and Pastor, F.I.J. (2012). Modular Glucuronoxylan-Specific Xylanase with a Family CBM35 Carbohydrate-Binding Module. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 3923–3931.

de Vries, R.P., and Visser, J. (2001). *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Microbiol Mol Biol Rev* 65, 497–522.

Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K.D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., Keegan, R. M., Krissinel, E. B., Leslie, A. G. W., McCoy, A., McNicholas, S. J., Murshudov, G. N., Pannu, N. S., Potterton, E. A., Powell, H. R., Read, R. J., Vagin, A. & Wilson, K. S. (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Cryst. D* 67, 235-242

DISCUSIÓN

4 DISCUSIÓN GLOBAL

El trabajo desarrollado en la presente tesis doctoral se enmarca en la temática de investigación del grupo Enzimas Microbianas de la Universidad de Barcelona, que consiste en la identificación y estudio de enzimas microbianas con actividades degradadoras de polímeros vegetales para su posterior evaluación en diversas aplicaciones biotecnológicas. El grupo de investigación dispone de una amplia colección de microorganismos con diferentes actividades degradadoras que han sido aislados de suelos agrícolas, forestales y de materiales textiles en descomposición entre otros. *Paenibacillus barcinonensis* se ha escogido a partir de esta colección debido a su elevado poder xilanolítico.

La investigación realizada se ha centrado en la identificación de tres xilanasas de la cepa seleccionada, las cuales han sido clonadas, sobreexpresadas heterológamente en *Escherichia coli*, purificadas y caracterizadas bioquímicamente. También se ha realizado la aplicación de estas enzimas en procesos de modificación de fibras papeleras, con el fin de evaluar su potencial uso en la industria del papel.

4.1 Identificación de nuevas xilanasas de *Paenibacillus barcinonensis*

Con el objetivo de identificar y clonar nuevos genes codificantes de xilanasas de la bacteria *P. barcinonensis* se construyó una genoteca con el kit comercial BD *Genome walking*. El método de “*gene walking*” permite la obtención de secuencias de DNA desconocidas inmediatas a una secuencia génica conocida (Siebert et al., 1995). La variante escogida en nuestro caso, utilizaba una digestión del DNA genómico que generaba fragmentos de extremos romos que posteriormente fueron ligados a unos adaptadores provenientes del mismo kit. En cada caso, para la amplificación del DNA en estudio se utilizó un cebador específico para la secuencia conocida del gen y un segundo cebador específico de la secuencia del adaptador. La obtención del amplificado y su posterior secuenciación, permitieron ampliar la secuencia conocida del

gen en estudio y diseñar un nuevo cebador para repetir el ciclo de amplificación. Con la aplicación progresiva de este método, se determinaron las secuencias de todos los genes estudiados en la presente tesis.

A partir de la genoteca construida, se realizaron tres aproximaciones diferentes para identificar los genes codificantes de las xilanasas.

4.1.1 Xyn10A

Se obtuvo mediante el diseño de cebadores degenerados a partir de la secuencia amino terminal de la proteína que había sido previamente determinada en nuestro laboratorio (Blanco et al., 1995). Con estos iniciadores y la genoteca construida, se amplificó un fragmento con homología a xilanasas. A partir del fragmento de DNA se diseñaron cebadores específicos que mediante *gene walking* dieron lugar a la obtención de un contig de 3000 bp que contenía un marco abierto de lectura de 960 bp con homología a xilanasas de la familia GH10.

4.1.2 Xyn30D

Se realizaron electroforesis bidimensionales del secretoma de *P. barcinonensis* con el sistema xilanolítico reprimido (cepa cultivada en presencia de glucosa) o inducido (cepa cultivada en presencia de xilano). Los “spots” o manchas proteicas que tenían actividad xilanasa fueron identificados mediante zimografía. Posteriormente estos spots fueron analizados mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, lo que permitió la identificación de un péptido también presente en una xilanasa de *Aeromonas caviae* (Okai et al., 1998). A partir de esta secuencia, se diseñaron cebadores degenerados que amplificaron la secuencia parcial de una nueva xilanasa de *P. barcinonensis*. Con esta información, se diseñaron cebadores específicos con los que se obtuvo un contig que incluía un marco abierto de lectura de 1686 bp, el cual codificaba para una proteína de 562 aminoácidos con las características de una xilanasa de familia GH30 que además, contenía un módulo de unión a carbohidratos de familia CBM35. La proteína deducida del marco abierto de lectura era por tanto una xilanasa

modular que, conjuntamente al dominio o módulo catalítico GH30, contenía un dominio de unión a carbohidratos, mostrando la estructura modular GH30-CBM35.

4.1.3 Xyn11E

El genoma de la bacteria *Paenibacillus polymyxa* E681 fue secuenciado y publicado durante el transcurso de la presente tesis (Kim et al., 2010). La subunidad ribosomal 16S de *P. polymyxa* E681 presenta 94% de identidad con su equivalente en *P. barcinonensis*. La alta similitud genética entre las dos especies animó la comparación de las enzimas relacionadas con la degradación del xilano codificadas en el genoma publicado con las xilanasas identificadas hasta entonces en *P. barcinonensis* (Tabla 3). El análisis reveló una alta similitud de las xilanasas presentes en ambas bacterias, además de la existencia de una xilanasas de familia GH11 que no había sido encontrada con ninguna de las técnicas utilizadas anteriormente en *P. barcinonensis*. Considerando que en el orden firmicutes, la presencia de xilanasas de familia GH11 se encontraba ampliamente distribuida, se decidió diseñar cebadores internos en base a la xilanasas GH11 de *P. polymyxa* E681 con el fin de ensayarlos en la genoteca de *P. barcinonensis*. Con esta aproximación se identificó un fragmento con similitud a xilanasas, que permitió el diseño de cebadores específicos que, mediante el procedimiento descrito anteriormente, dieron lugar a la identificación de un contig que presentaba una alta similitud con el contig descrito recientemente en la cepa *Paenibacillus* W-61 (Fukuda et al., 2009). Dicho contig contenía un marco abierto de lectura de 633 bp que codificaba una preproteína de 211 aminoácidos con homología a xilanasas de la familia GH11. Un segundo marco abierto de lectura fue identificado río abajo del gen codificante para la xilanasas. Este presentó una elevada homología con el gen codificante para la chaperona LppX, ubicado en la misma posición en el contig descrito en la cepa *Paenibacillus* W-61. Esta xilanasas de *Paenibacillus* W-61 presenta expresión dependiente de la chaperona LppX y es el único caso de xilanasas de estas características descrito hasta hoy.

Tabla 3. Comparación de la xilanasas presentes en el genoma de *P. polymyxa* E681 con las xilanasas identificadas de *P. barcinonensis*.

| Enzima de <i>P. polymyxa</i> E681 | | Enzima de <i>P. barcinonensis</i> |
|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| GI: 308067822 | CE4 - CBM6_36 | No encontrada |
| GI: 308068428 | GH30 - CBM35 | 76% de identidad con Xyn30D |
| GI: 308069039 | GH43 - CBM6 - CBM6_36 | No encontrada |
| GI: 308068427 | GH10 | 57% de identidad con Xyn10B |
| GI: 308071367 | fragmento GH10 | 44% de identidad con Xyn10B |
| GI: 308071525 | GH10 | 74% de identidad con Xyn10A |
| GI: 308067745 | GH11 | No encontrada |

4.2 Expresión heteróloga en *Escherichia coli* de las xilanasas identificadas

Escherichia coli es el organismo huésped más utilizado como sistema de expresión procariota para la sobreproducción de proteínas heterólogas. Presenta ventajas, entre otras, por su fácil manipulación, su funcionamiento eficiente y su bajo coste de producción (Hannig and Makrides, 1998). Sin embargo, la expresión eficiente de diferentes genes en *E. coli* no siempre es un proceso rutinario, ya que las características únicas presentes en cada gen y en su transcrito de mRNA, impiden la adopción de un protocolo general aplicable a todas las proteínas con el mismo éxito.

4.2.1 Xyn10A

El gen *xyn10A*, codificante para la xilanasas Xyn10A, fue clonado en el vector pET3b bajo el control del promotor T7 (Tabla 4). La expresión del gen se evaluó en las cepas BL21(DE3)pLysS, Rosetta(DE3) y BLR(DE3). En los tres casos, la inducción con IPTG produjo niveles similares de proteína soluble activa que sin inducción. Se probaron varias concentraciones de inductor en el rango entre 0,1 mM y 1 mM de IPTG, sin variaciones en el resultado. Por este motivo, se realizó la clonación del gen *xyn10A* en el vector pET11a, que a diferencia del vector pET3b contiene el represor *lacI*, pero se

repetieron los mismos resultados. La construcción *E. coli* BLR(DE3)/pET3Xyn10A fue escogida para la producción de la xilanasa, por ser la construcción más eficiente de las evaluadas. Los cultivos celulares se realizaron en ausencia de IPTG, ya que su adición no significó un cambio significativo en el rendimiento. Probablemente las variaciones en la producción mediante la sobreexpresión del promotor podrían haber sido detectados en la fase insoluble, por la formación de cuerpos de inclusión, sin embargo la cantidad de proteína remanente en la fase soluble fue suficiente para realizar la purificación y los análisis posteriores.

4.2.2 Xyn30D

Tanto para la clonación del gen completo ***xyn30D*** como para la de su dominio catalítico ***xyn-CM***, se escogió el sistema Champion™ pET Directional TOPO®. Este kit utiliza un sistema que permite la clonación en tiempos reducidos y clona direccionalmente amplificadas de PCR con extremos romos en vectores tipo pET. El producto génico queda bajo el control del promotor T7 y opcionalmente pueden fusionarse colas de histidina. Las ventajas de este método, además de las mencionadas, son su alta eficiencia y que no necesita ligasa o enzimas de restricción para obtener la construcción deseada. La desventaja de este sistema es su elevado coste, ya que el vector se comercializa linealizado, por lo que no puede ser propagado para su posterior utilización con las mismas ventajas que presenta su versión original.

En ambos casos, se utilizó el vector pET101 de dicho sistema, que permite la posibilidad de incluir una cola de histidina en el extremo carboxilo terminal. Se realizaron las construcciones de las proteínas con y sin fusión de la cola, para comparar su expresión en *E. coli*. Para las dos proteínas se obtuvieron niveles similares de expresión en extractos crudos al añadir el epítipo terminal. Se decidió entonces trabajar con las proteínas fusionadas a las colas de histidina, porque resultan de más fácil manipulación a la hora de obtener la proteína pura (Tabla 4).

Para la clonación del dominio de unión a carbohidratos ***xyn-CBM35***, la construcción con el vector pET101 no produjo la sobreexpresión de la proteína clonada, por lo que se

decidió utilizar el vector pET28a (Tabla 4). Este vector permite la adición de una cola de histidina en posición amino terminal y, según la experiencia de nuestro laboratorio, da niveles de sobreexpresión mayores que los obtenidos con el vector pET101. Con esta construcción, la proteína Xyn-CBM35, fue sobreexpresada a niveles detectables al analizar los extractos solubles de *E. coli* BL21(DE3)Star/pET28aXyn-CBM35 por SDS-PAGE, al contrario de lo que sucedía con la construcción anterior.

La cepa *E. coli* BL21(DE3)Star fue escogida como cepa de expresión en los tres casos, ya que está descrito que mejora la estabilidad del transcrito de mRNA, con lo que la expresión de la proteína puede verse incrementada hasta 10 veces.

En cuanto a los **mutantes de delección de Xyn30D**, se desarrollaron de la siguiente manera: El análisis informático de la estructura del módulo catalítico de la xilanasa Xyn30D reveló una conformación de barril (β/α)₈ fusionado a una estructura lateral “*side-associated β -domain*”, que como se comentó, está presente en todas las glicosil hidrolasas de familia GH30 descritas hasta la fecha. La primera hebra (β s1) de esta estructura lateral estaba ubicada en el extremo amino terminal de la enzima madura, mientras que las cadenas β s2 a β s9 se localizaban entre el final del barril (β/α)₈ y el principio del módulo Xyn-CBM35. Para evaluar el rol de la estructura *side-associated β -domain* en la actividad de la enzima, se construyeron una serie de mutantes derivados del dominio catalítico. Se construyeron mutantes con deleciones crecientes de la estructura lateral, desde la delección única de la hebra β s9 hasta la remoción casi total de la estructura mediante la eliminación de las hebras β s3 a β s9. Todos los mutantes fueron expresados en el vector pET101, al igual que el dominio catalítico y la proteína completa. En todos los casos se obtuvo una alta expresión de la proteínas recombinantes, pero presentes en la fase insoluble probablemente como resultado de la formación de cuerpos de inclusión. Ninguno de los clones construidos presentó actividad xilanasa. Como estrategia alternativa se realizó la construcción de todas las variantes de Xyn30D en el vector pGEM-T Easy. Este vector no es un vector de sobreexpresión, sin embargo permite niveles basales de expresión si el producto génico es clonado con su propio RBS. Sólo las construcciones Xyn30D y Xyn-CM fueron

expresadas de forma activa, indicando que la estructura *side-associated β -domain* es indispensable para la actividad de Xyn30D.

4.2.3 Xyn11E

Considerando que *xyn11E* presentó una elevada homología con la xilanasa 1 de *Paenibacillus* W-61, descrita como dependiente de chaperona, junto con el hecho que río abajo del gen *xyn11E* se encontró un marco abierto de lectura con alta similitud a la chaperona de *Paenibacillus* W-61, la primera aproximación realizada fue la clonación del gen codificante de la xilanasa en solitario o conjuntamente con el gen codificante para la chaperona putativa. Para ello, se utilizó el vector pGEM-T Easy, que como fue mencionado anteriormente, requiere de la inclusión del RBS para poder expresar las proteínas. Sólo en el caso de la clonación conjunta de la xilanasa con la chaperona pudo observarse actividad en los extractos crudos de la cepa de *E. coli* recombinante, por lo que se dedujo que Xyn11E al igual que la xilanasa 1, requiere de la coexpresión de la chaperona LppX para su expresión en forma activa.

Para facilitar la purificación de la xilanasa, se escogió el vector de sobreexpresión pET28a que posibilita la fusión de una cola de histidina en el extremo amino terminal de la proteína clonada. El análisis "*in silico*" de la secuencia de la xilanasa Xyn11E mostró la presencia de un péptido señal, que no fue incluido en la construcción final para evitar la escisión del epítipo durante la expresión heteróloga. La cepa *E. coli* BL21(DE3)Star fue escogida como cepa de expresión para el vector pET28/Xyn11E-LppX (Tabla 4).

En todos los casos, la técnica de sobreexpresión heteróloga mediante la clonación en vectores de *E. coli* fue apropiada para permitir la expresión de las proteínas en fase soluble y en forma activa. Las cantidades de proteína obtenidas en todos los casos fueron suficientes para poder realizar los posteriores experimentos de purificación.

Tabla 4. Vectores construidos para la purificación de las xilanasas o CBM recombinantes

| | Vector | Promotor | Inductor | Resistencia | Tag | Péptido Señal |
|-------------------|--------|----------|----------|-------------------|-----------------------------|---------------|
| pET3Xyn10A | pET3b | T7 | IPTG | Amp (50 µg/ml) | No | Incluido |
| pET101Xyn30D | pET101 | T7 | IPTG | Amp (50 µg/ml) | His ₆ C-terminal | Incluido |
| pET101Xyn-CM | pET101 | T7 | IPTG | Amp (50 µg/ml) | His ₆ C-terminal | Incluido |
| pET28aXyn-CBM35 | pET28a | T7 | IPTG | Kan (50 µg/ml) | His ₆ N-terminal | -- |
| pET28/Xyn11E-LppX | pET28a | T7 | IPTG | Kan (50 µg/ml) | His ₆ N-terminal | No Incluido |

4.3 Purificación de las xilanasas recombinantes

La cromatografía líquida rápida de proteínas o “*Fast protein liquid chromatography*” (FPLC) fue utilizada en todas las purificaciones realizadas. Esta técnica, al igual que otras cromatografías se basa en la afinidad diferencial que presenta una determinada molécula por dos materiales, que corresponden a la fase móvil y la fase estacionaria. La fase móvil en este caso corresponde al tampón que se mueve a un flujo moderado controlado por una bomba peristáltica y la fase estacionaria es una resina empaquetada en columnas comerciales, las cuales fueron escogidas en función de las propiedades de las proteínas a purificar.

Para la purificación de Xyn10A se escogió el método de cromatografía de intercambio iónico (IEC), considerando su alto punto isoeléctrico. Mediante la IEC, las proteínas pueden ser separadas en función de las interacciones electrostáticas que ocurren entre los grupos cargados de la superficie de cada proteína y aquellos de la fase estacionaria. La separación de moléculas con pequeñas diferencias en el punto isoeléctrico puede ser lograda mediante esta técnica. Se utilizó la columna de intercambio catiónico MonoS y

como fase móvil se aplicó tampón 50 mM Tris HCl pH 7, el cual se encuentra más de 2 puntos de pH por debajo del punto isoelectrico de la proteína, con lo que aseguramos una carga neta positiva de la molécula. La elución de las moléculas unidas a la matriz se realizó mediante el cambio de fuerza iónica determinado por un gradiente de NaCl de 0 a 1 M. Mediante este procedimiento se purificó la xilanasas Xyn10A a homogeneidad, que sorprendentemente fue la única proteína detectada en la fracción unida a la columna.

Para el resto de purificaciones realizadas (Xyn30D, Xyn-CM, Xyn-CBM35 y Xyn11E) se utilizó la cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC). La IMAC se basa en las interacciones que forman los aminoácidos, particularmente la histidina con diferentes metales. Con esta técnica las proteínas que tengan afinidad por el metal presente en la resina, comúnmente níquel, son retenidas por la columna y son eluidas mediante una molécula competitiva, en nuestro caso el imidazol.

Mediante la IMAC se purificaron a niveles cercanos a la homogeneidad todas las proteínas recombinantes mencionadas (Tabla 5), con las cuales se realizaron los ensayos de caracterización bioquímica.

Para los ensayos de cristalización de Xyn30D, se agregó un segundo paso de purificación que aumentó la pureza y homogeneidad de la muestra. Este procedimiento, se debe a que para obtener cristales que difracten a una alta resolución, mediante la cristalografía de rayos X, el material de partida que se debe obtener tras el protocolo de purificación y concentración, debe ser de alta calidad, homogéneo y soluble. La primera aproximación utilizada como segundo paso de purificación o paso de pulido de la muestra, fue la cromatografía de gel filtración (GF), que separa las moléculas en base a la diferencia de tamaño. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada como técnica de pulido en ensayos de cristalización, ya que elimina incluso los dímeros o agregados que pudiesen formarse con la misma proteína, sin embargo este método no resultó efectivo a la hora de obtener cristales en los ensayos posteriores. Como segunda aproximación, se utilizó una columna de

intercambio iónico MonoQ, la cual también está indicada como un paso de cromatografía más fino, útil para obtener fracciones de proteína purificada de alta calidad. Con este material, la obtención de cristales logró concretarse con éxito, por lo que se aplicó el procedimiento para producir niveles adecuados de proteína para los ensayos sucesivos de cristalización.

Tabla 5. Xilanasas o CBMs caracterizados en la presente tesis

| | Familia | Peso molecular aparente (kDa) | pI |
|-----------|------------|-------------------------------|----------------|
| Xyn10A | GH10 | 31 | 9,3 |
| Xyn30D | GH30-CBM35 | 59 (his-tagged) | 6,0 |
| Xyn30D-CM | GH30 | 45 (his-tagged) | 8,0 (teórico) |
| Xyn-CBM35 | CBM35 | 17 (his-tagged) | 5,9 (teórico) |
| Xyn11E | GH11 | 23 (his-tagged) | 4,86 (teórico) |

4.4 Caracterización enzimática de las xilanasas recombinantes

La determinación de la actividad de las xilanasas identificadas se realizó mediante el método descrito por Nelson y Somogyi (Nelson, 1944; Somogyi, 1945). Este método cuantifica los azúcares reductores liberados a partir de un sustrato, lo que permite valorar la actividad de las enzimas hidrolíticas que rompen polisacáridos generando nuevos extremos reductores. El ensayo se aplicó con diversos sustratos para la determinación de actividades xilanasas, celulasa, pectinasa y amilasa entre otras. Una ventaja importante que presenta el método escogido es que puede ser utilizado con sustratos naturales, como son los xilanos extraídos de diferentes tipos de plantas, a diferencia de otros métodos que utilizan sustratos artificiales, usualmente unidos a una molécula que al ser hidrolizada produce algún tipo de reacción colorimétrica de fácil cuantificación. Otra condición importante de este método es que ha sido ampliamente utilizado para la caracterización de un gran número de enzimas en nuestro laboratorio. Por tanto, ha servido como control para comparar los resultados obtenidos con las caracterizaciones realizadas con anterioridad, ya que se ha descrito que los diferentes métodos de cuantificación de actividad presentan un elevado grado de variabilidad que

puede afectar sobre todo a la comparación de constantes cinéticas o de los valores de actividad específica (Gusakov et al., 2011).

En cuanto a los resultados, las condiciones óptimas de hidrólisis determinadas para las tres xilanasas identificadas (Xyn10A, Xyn30D y Xyn11E) fueron similares tanto para el óptimo de temperatura como para el óptimo de pH (Tabla 7). Este resultado concuerda con el hecho de que las tres xilanasas son parte del mismo complejo enzimático extracelular que degrada los un sustrato vegetal común bajo condiciones específicas.

Individualmente, Xyn10A demostró ser la xilanasas más robusta de todas las xilanasas de *P. barcinonensis* caracterizadas hasta la fecha. Presentó actividad sobre todos los xilanos analizados, pectinas y aril xilósidos (Tabla 6). Si bien los valores óptimos determinados para esta enzima se corresponden con los de las otras xilanasas caracterizadas en la misma bacteria, la estabilidad mostrada a pHs alcalinos hasta 8,5, junto con el hecho de mantener a la temperatura de 70°C un 50% de la actividad máxima, la posicionan como una gran candidata para su aplicación sobre diferentes procesos biotecnológicos que usualmente requieren una elevada estabilidad de las enzimas.

Xyn30D sólo fue activa sobre MeGAX (Tabla 6). Este comportamiento es similar al de las pocas xilanasas de la familia GH30 descritas hasta la fecha, en concreto al de las xilanasas XynC de *Bacillus subtilis* (St John et al., 2006), YnfF de *Bacillus* BP-7 (Gallardo et al., 2010a) y la xilanasas A de *Erwinia chrysanthemi* (Hurlbert and Preston, 2001; Vrsanská et al., 2007). Todas ellas son xilanasas monodominio, de actividad específica sobre MeGAX, sin actividad sobre AX. La comparación de las constantes cinéticas determinadas para Xyn30D con las publicadas para XynC, muestran que los valores de la K_{cat} se mantienen en el mismo rango (1510 min^{-1} vs 2635 min^{-1}), sin embargo, los valores de la K_m de Xyn30D son bastante mayores que los obtenidos para la enzima de *Bacillus subtilis* (14.72 mg/ml vs 1.63 mg/ml) (Tabla 7).

Tabla 6. Rango de Sustrato de las xilanasas caracterizadas.

| | U/mg de proteína pura | | | |
|----------------------------|-----------------------|--------|-----------|---------|
| | Xyn10A | Xyn30D | Xyn30D-CM | Xyn11E |
| Xilano de abedul | 47.13 | 28.2 | 27.2 | 740.71 |
| Xilano de haya | 41.23 | 30.3 | 27.7 | 1234.72 |
| Xilano de espelta de avena | 31.7 | ND | ND | 284.69 |
| 4-O-metil glucuronoxilano | 22.17 | 19.2 | 17.5 | 713.88 |
| Arabinoxilano de trigo | 32.46 | ND | ND | 687.06 |
| Arabinoxilano de centeno | 24.44 | ND | ND | 226.58 |
| Avicel | ND ^a | ND | ND | ND |
| CMC | ND | ND | ND | ND |
| Almidón | ND | ND | ND | ND |
| Liquenano | ND | ND | ND | ND |
| Pectina | 10.83 | ND | ND | ND |
| Ácido poligalacturónico | ND | ND | ND | ND |
| Laminarina | NR ^b | ND | ND | ND |
| pNPX | 3.3 | ND | NR | NR |
| pNPG | ND | ND | NR | NR |
| oNPX | 7.5 | ND | NR | NR |
| pNPAp | 3.2 | ND | NR | NR |
| pNP Af | 0.1 | ND | NR | NR |

a, no detectado; b, no determinado

Por otro lado, resulta de interés el hecho que Xyn30D, a diferencia de las otras xilanasas caracterizadas de esta familia, contiene un dominio CBM de familia 35, que según la caracterización bioquímica realizada, estaría aumentando la estabilidad de la enzima, sin cambiarle las condiciones óptimas de hidrólisis ni su actividad catalítica. Existen muy pocas evidencias hasta la fecha de la utilidad que presentan las xilanasas de familia GH30 en los procesos biotecnológicos, principalmente, porque su descripción se ha realizado recientemente. Una situación similar ocurre con el CBM de familia 35, que se ha caracterizado bioquímicamente en los últimos años y aún no ha sido evaluado en cuanto a su potencial biotecnológico.

Finalmente, la xilanasa Xyn11E, al igual que la xilanasa Xyn10A, presentó actividad sobre todos los xilanos analizados (Tabla 6). Sus valores óptimos de temperatura y pH fueron similares al de las otras dos xilanasas descritas en la presente tesis, sin embargo, la Vmax de esta enzima superó en dos órdenes de magnitud a la Vmax de las xilanasas Xyn10A y Xyn30D (Tabla 7), con lo que se ubica como la xilanasa más activa descrita en *P. barcinonensis* hasta la fecha. Los valores de actividad son similares a los encontrados en la xilanasa de *Bacillus* sp. YJ6 (Yin et al., 2010) y se corresponden con la alta actividad específica conservada para las enzimas de esta familia (Paës et al., 2012).

Tabla 7. Caracterización bioquímica de las xilanasas.

| | Temperatura óptima | pH óptimo | Estabilidad | Km (mg/ml) | Vmax (U/mg prot) |
|--------|-----------------------|--------------|---------------------------------------|---------------|---------------------|
| Xyn10A | 60 °C | 6,5 | Alta* a pH 8,5 y 50 °C durante 3 h | 2,93 | 50,67 |
| Xyn30D | 50 °C | 6,5 | Alta* a pH 6,5 y 50 °C durante 3 h | 14,72 | 24,1 |
| Xyn11E | 50 °C | 6,5 | Alta* a pH 6 y 50 °C durante 2 h | 12,98 | 3023,2 |

*Superior al 75 % de la actividad inicial.

4.5 Productos de hidrólisis de xilanos generados por las xilanasas caracterizadas

Los productos resultantes de la degradación enzimática de xilanos y oligosacáridos fueron analizados mediante cromatografía en capa fina, más conocida como TLC por su sigla inglesa *thin layer cromathography*. En la TLC se utilizaron placas de sílice como fase estacionaria y una mezcla de solventes de diferentes polaridades que permitieron la separación de la mezcla de oligosacáridos generada en cada reacción. Esta técnica es de fácil realización, sin embargo, la identificación de los compuestos depende de los estándares que se dispongan, ya que se realiza mediante la comparación del *Rf* “*ratio of front*” de un compuesto incógnito con el de compuestos conocidos.

En el caso de Xyn10A, los estudios por TLC revelaron que el modo de acción de esta xilanasas corresponde a un comportamiento típico de xilanasas de familia GH10. La hidrólisis de oligosacáridos se observó sobre oligómeros de 3 o más unidades de xilosas, y la hidrólisis del MeGAX liberó xilobiosa y ácido aldoteaurónico como productos principales (Kolenová et al., 2006). En el caso de la hidrólisis del AX de trigo, se obtuvo un patrón de digestión que reveló la capacidad de Xyn10A de realizar la hidrólisis en sitios próximos a ramificaciones laterales de arabinosa, con lo cual sería apta para producir arabinoxilooligosacáridos (AXOS) a partir de cereales. La producción de estos compuestos resulta de gran atractivo comercial, ya que su utilización como agentes prebióticos en piensos animales está cada vez más difundida (Grootaert et al., 2009). Por último, Xyn10A también mostró actividad sobre xilano de eucalipto, que fue degradado a una mezcla compleja de oligosacáridos de largo de cadena variable. Este resultado, junto con el exitoso estudio anterior de blanqueo de pasta Kraft de eucalipto (Blanco et al. 1995), confirma el potencial que presenta la xilanasas Xyn10A como agente impulsor del blanqueo en procesos industriales que utilicen pasta de eucalipto.

La hidrólisis de MeGAX de haya y de abedul generados a partir de la xilanasas Xyn30D libera una serie de oligosacáridos de movilidad intermedia entre los oligosacáridos neutros, lo cual indica que corresponden a xilooligómeros sustituidos por moléculas de MeGlcA. Este resultado fue confirmado por MALDI-TOF MS y se repitió al realizar la hidrólisis con el módulo catalítico de la enzima, Xyn-CM. Adicionalmente se analizó individualmente la hidrólisis de determinados oligosacáridos ramificados, como el ácido aldoteaurónico, que dio lugar a la molécula de sustrato acortada en una xilosa y la xilosa respectiva. Resultado similar se obtuvo al analizar la actividad sobre el ácido aldopentaurónico. En ningún caso se observó hidrólisis de oligosacáridos neutros. Este modo de acción de Xyn30D nuevamente se corresponde al descrito para las xilanasas de la familia GH30, donde la ramificación de los sustratos con un residuo de MeGlcA es un requisito estricto para realizar la hidrólisis (St John et al., 2006; Vrsanská et al., 2007).

Finalmente, la xilanasa Xyn11E fue capaz de hidrolizar oligosacáridos de al menos cuatro unidades de xilosa, siendo la xilotetraosa débilmente hidrolizada, al contrario de la xilopentaosa y xilohexaosa, que fueron eficientemente hidrolizadas por la enzima. A la vez, la enzima mostró actividad transglicosidasa sobre oligosacáridos, en concordancia al comportamiento descrito para la xilanasa I de *Paenibacillus* W-61 (Watanabe et al., 2008). Las glicosidasas han sido ampliamente utilizadas para la síntesis de oligosacáridos, ya que bajo las condiciones apropiadas, la reacción hidrolítica normal puede ser revertida hacia la síntesis del enlace glicosídico (Ajisaka and Yamamoto, 2002). En el caso de los xilanos, Xyn11E fue capaz de hidrolizar tanto xilanos provenientes de maderas duras como de cereales, siendo más activa sobre los primeros. El xilano de espelta de avena fue el sustrato menos hidrolizado probablemente por su alto contenido de xilano insoluble, hecho que no ocurre con el resto de xilanos analizados, cuya fracción de xilano insoluble es menor. La actividad de la enzima sobre MeGAX produjo, entre otros, XOS ramificados como el ácido pentaaurónico, en concordancia con el modo de acción descrito para las xilanasas de la familia GH11 (Kolenová et al., 2006). En todos los casos se produjo una mezcla de XOS de largo de cadena variable, por lo que Xyn11E también sería apta para la producción de XOS.

Tabla 8. Actividad de las xilanasas.

| | Oligosacáridos neutros | Oligosacáridos ácidos | MeGAX | AX |
|--------|---------------------------|--------------------------|-------|----|
| Xyn10A | >2 | NR ^b | Si | Si |
| Xyn30D | ND ^a | Si | Si | ND |
| Xyn11E | >3 | NR | Si | Si |

a, no detectado; b, no realizado.

4.6 Análisis del módulo de unión a carbohidratos Xyn-CBM35

El módulo de unión a carbohidratos presente en la xilanasa Xyn30D pertenece a la familia CBM35. Esta combinación es bastante inusual en las xilanasas, habiéndose

descrito hasta la fecha únicamente una xilanasa, perteneciente a la familia GH10, que contiene un módulo de unión a carbohidratos de la familia CBM35 (Kellett et al., 1990).

Como primera aproximación de estudio, se evaluó la capacidad de Xyn-CBM35 de unir polisacáridos insolubles. Para esto se incubó con Avicel y con xilano insoluble de espelta de avena, encontrándose que en las condiciones ensayadas, Xyn-CBM35 fue capaz de unir el xilano insoluble, pero no el Avicel. El resultado fue similar al repetir el experimento con el dominio catalítico, Xyn-CM, en lugar de Xyn-CBM35. Con la proteína completa el resultado también fue similar, aunque la eficiencia de unión fue mayor, probablemente porque la capacidad de unión estaría dada tanto por el CBM como por el módulo catalítico.

Posteriormente, se evaluó la capacidad de adsorción de Xyn-CBM35 a polisacáridos solubles, mediante la electroforesis en geles de afinidad (AGE). Se ensayaron las fracciones solubles de xilano de trigo, de espelta de avena y de haya. En todos los casos se observó el retardo de la migración del CBM en geles que contenían el polisacárido, respecto a los que no lo contenían, siendo el retardo en los geles con xilano de haya el más evidente. Este resultado se corresponde con el hecho de que el xilano de haya es el único MeGAX ensayado, mientras que los otros dos polisacáridos son AX, con menor proporción de ramificaciones de MeGlcA.

Para profundizar el conocimiento sobre Xyn-CBM35, se realizaron análisis de la unión del CBM a distintos sustratos mediante la técnica de calorimetría isotérmica de titulación (ITC). Esta técnica permite determinar cuantitativamente de manera directa, la entalpía de unión de la enzima a un sustrato, mediante la medición del calor liberado, o absorbido, durante la reacción a presión constante. Los resultados de estos experimentos revelaron que el Xyn-CBM35 era capaz de unir ácido glucurónico y que la unión era dependiente de la presencia del ion calcio. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en similares condiciones con CBMs de la familia 35, como los de la xilanasa de familia 10 mencionada anteriormente y los de una $\text{exo-}\beta\text{-D-glucosaminidasa}$ de *Amycolatopsis orientalis* (Montanier et al., 2009). Sin embargo, esta propiedad no se

mantiene en todos los CBM35, ya que en otro ejemplo del mismo estudio, el CBM35 de la ramnogalacturonano acetil esterasa de *Clostridium thermocellum*, sólo presenta una interacción débil con el ácido glucurónico (Montanier et al., 2009). La misma técnica se utilizó para estudiar la capacidad de unión del CBM a diferentes tipos de xilanos solubles, sin embargo en todos los casos la interacción fue demasiado débil para poder ser cuantificada.

El hecho de que la unión de Xyn-CBM35 sea más eficiente con el ácido glucurónico que con el xilano podría deberse a que el rol de este CBM esté relacionado principalmente con una función de orientación de la proteína hacia zonas de la planta que están siendo activamente degradadas y que por tanto, son más accesibles para las enzimas. Esto ha sido propuesto recientemente para los CBM35, ya que algunos de los ejemplos de esta familia presentan alta afinidad por el ácido Δ 4,5-anhidrogalacturónico, producto de degradación de la pectina (Montanier et al., 2009).

4.7 Aplicación de las xilanasas recombinantes sobre pastas de papel

Considerando que el blanqueo, enzimáticamente asistido, de pastas de papel provenientes de eucalipto ha sido objeto de estudios previos del grupo de investigación, decidimos analizar la efectividad de las enzimas sobre pastas diferentes, en concreto pastas de sisal (*Agave sisalana*), una materia prima no maderera, actualmente poco estudiada. La producción comercial de pasta no maderera está estimada en alrededor de un 10% de la producción global de pasta, cifra que se espera que aumente en los próximos años. En muchos de los países en vías de desarrollo, la madera que producen no es suficiente para satisfacer la creciente demanda requerida por la industria papelera, siendo los casos más importantes, los de China e India, en los cuales alrededor del 70% de las materias primas utilizadas son plantas no madereras. La planta de sisal es un buen candidato para este propósito, ya que presenta un bajo coste de producción, además se encuentra disponible en numerosos países y presenta una alta tasa de renovabilidad (Li et al., 2000). Actualmente, las fibras de sisal se usan principalmente para fabricar cuerdas resistentes y para la industria agrícola, sin

embargo también presentan atractivas propiedades para la producción de papeles con alto valor añadido, como son los utilizados para fabricar gasas quirúrgicas, condensadores e incluso bolsas de té (Hurter, R 2001).

La aplicación de enzimas sobre las pastas papeleras como paso previo a las secuencias tradicionales de blanqueo, está considerada como una de las alternativas más útiles a los tratamientos químicos. Utilizando esta aproximación se reduce la cantidad de reactivos químicos necesarios para alcanzar el grado de blancura deseado, por lo que se reducen también los contaminantes generados. La efectividad de las xilanasas en el blanqueo de pastas de papel fue descrito por primera vez en 1986 (Viikari, L. et al., 1986) y a partir de entonces se han realizado numerosos estudios que avalan la efectividad de este tratamiento (Clarke et al., 1997; Chauhan et al., 2006; Esteghlalian et al., 2008; Valls and Roncero, 2009). Hoy en día se sabe que las xilanasas son útiles tanto en secuencias libres de cloro elemental (ECF) (Valls et al., 2010a) como en secuencias completamente libres de cloro (TCF) (Valls and Roncero, 2009), por lo que han sido incorporadas en múltiples industrias papeleras como agentes preblanqueadores o potenciadores del blanqueo.

Adicionalmente a la capacidad potenciadora del blanqueo de las xilanasas, recientemente se ha descrito su efectividad para disminuir el contenido de ácidos hexenurónicos (HexAs) presentes en las pastas. Se ha determinado que la presencia de HexAs en las pastas puede incrementar el número kappa y la reversión de la blancura, además de que produce un aumento en el consumo de agentes blanqueadores y retiene iones metálicos (Valls et al., 2010a). Por ello su eliminación supone un gran valor añadido para una xilanasas enfocada a procesos papeleros.

En la presente tesis se ensayaron sobre pastas de sisal cinco preparaciones diferentes de xilanasas provenientes de *P. barcinonensis* (Tabla 8). La primera xilanasas evaluada fue Xyn10A, que ya había sido aplicada con éxito en el blanqueo de pastas de eucalipto (Blanco et al., 1995). La segunda xilanasas fue Xyn30D, de la cual se evaluó tanto la proteína completa como la xilanasas desprovista del CBM35. La cuarta preparación

enzimática fue Xyn11E, que presenta elevada similitud con proteínas utilizadas en la actualidad a nivel industrial. Y finalmente el secretoma completo de la bacteria *P. barcinonensis* también fue ensayado.

Todas las xilanasas mencionadas fueron aplicadas de manera individual sobre pastas de sisal, como pretratamiento a una etapa de extracción con peróxido de hidrógeno. Se evaluó la efectividad en blanqueo mediante el análisis de la blancura, el análisis de la capacidad de reducir el contenido de HexAs y lignina de las pastas, y de propiedades adicionales del papel y de los efluentes.

La xilanasas Xyn10A resultó ser la enzima más eficiente en disminuir el contenido de lignina de las pastas, evaluado mediante el número kappa. Este resultado concuerda con los buenos resultados de aplicación de esta xilanasas, obtenidos en secuencias completas de blanqueo de pasta de eucalipto, previamente mencionados (Blanco et al., 1995). En estos resultados anteriores se obtuvo un grado de blancura que hubiese requerido cantidades significativamente mayores de agentes químicos blanqueadores, lo que en conjunto con nuestro resultado, confirma la idoneidad de Xyn10A para su aplicación en procesos papeleros. En ambos casos, la viscosidad de la pasta no se vio mayormente afectada por el tratamiento enzimático, en cambio sí fue posible apreciar un incremento en la blancura final alcanzada.

Para profundizar en el conocimiento que el tratamiento enzimático ejerce sobre las pastas, también se realizó la cuantificación de los HexAs remanentes al finalizar la secuencia de blanqueo. Nuevamente, los mejores resultados fueron obtenidos en el tratamiento con la xilanasas Xyn10A, donde se obtuvo una reducción del 25% del contenido de HexAs respecto al tratamiento control sin enzima. Esta reducción es significativamente mayor que la obtenida con otras xilanasas de la familia 10 ensayadas sobre pastas de eucalipto (Valls et al., 2010b). Sin embargo, las pocas publicaciones existentes sobre el tema no son suficientes para comprender la relación entre la actividad enzimática, contenido de HexAs, lignina y blancura.

Si bien la relación entre los azúcares liberados de las pastas por el tratamiento enzimático y la capacidad blanqueadora de una enzima no es necesaria (Christov et al., 1999), en nuestro caso, esta relación parece estar bastante conservada. La capacidad de reducción del contenido de HexAs y la cantidad de azúcares liberados por las enzimas fueron las propiedades que mostraron una mejor correlación, siendo éste resultado el primer estudio realizado sobre la materia.

Respecto a los resultados obtenidos con la xilanasa de familia GH30, Xyn30D, la capacidad de eliminación de lignina y HexAs, fue inferior a la mostrada por la xilanasa Xyn10A. En estudios anteriores del grupo de investigación con una xilanasa de la familia GH30, pero proveniente de *Bacillus*, se habían obtenido buenos resultados en la disminución del contenido en lignina, pero deficientes en la eliminación del contenido en HexAs (Valls et al., 2010b). La xilanasa evaluada en dicha experiencia era una xilanasa mono dominio, que presentaba solamente el módulo catalítico GH30. En cambio la xilanasa Xyn30D, como se ha comentado anteriormente, adicionalmente al módulo catalítico presenta un módulo CBM35 capaz de unir ácido glucurónico y xilanos. En nuestro trabajo se realizó la evaluación tanto de la enzima completa como del módulo catalítico aislado. Para nuestra sorpresa, en todos los parámetros analizados, se obtuvieron mejores resultados con el módulo catalítico que con la xilanasa completa. Lo que estaba indicando que el dominio CBM35 estaría causando interferencias a la hora de la actuación enzimática. Creemos que este resultado se debe o a la interferencia estérica que puede presentar una molécula de mayor tamaño a la hora de difundir a través de las fibras papeleras, o al hecho de que el dominio CBM35 tiene capacidad de unión a los residuos de ácido glucurónico. Esto puede reducir la movilidad de la enzima sobre la superficie de las fibras papeleras, por lo que se reduciría también su eficiencia catalítica. Sin embargo, la evaluación de la capacidad catalítica de ambas xilanasas sobre xilanos comerciales mostró resultados muy similares.

En el caso de la evaluación de la xilanasa Xyn11E, la xilanasa no mostró capacidad para realizar modificaciones relevantes en las fibras, contrariamente a lo esperado, ya que existen estudios que avalan la superioridad de las xilanasas de la familia GH11 como

agentes promovedores del blanqueo de pastas de papel (Clarke et al., 1997; Esteghlalian et al., 2008; Valls et al., 2010b). La baja cantidad de azúcares reductores liberados por Xyn11E a partir de pasta de sisal fue un resultado que se repitió al analizar otros 3 tipos de pastas, incluida una muestra de pasta de eucalipto. Esta última pasta había sido blanqueada con excelentes resultados por la xilanasas A de *Bacillus* sp. BP-7, también de la familia GH11, con la que Xyn11E comparte una identidad de un 77%. (Valls et al., 2010b). Por ello, descartamos que la pasta de sisal pudiese presentar algún tipo de inhibidor específico de xilanasas GH11.

Finalmente evaluamos la capacidad blanqueadora que presentaba el secretoma de *P. barcinonensis*. Los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos con la xilanasas Xyn10A, consecuentemente con el hecho de que es su xilanasas mayoritaria. Sin embargo, destacamos la eficacia de la utilización de los sobrenadantes de cultivo de la bacteria, por tener un método de producción muy sencillo, ya que la bacteria fue simplemente cultivada en medios con paja de arroz y los sobrenadantes fue utilizados sin la necesidad de realizarle tratamientos adicionales.

Nuestros resultados sugieren que es muy difícil generalizar sobre la efectividad de una familia particular de glicosil hidrolasas para una determinada aplicación industrial, por lo que la idoneidad de una enzima para un proceso debe ser evaluada de forma individual. La utilización de cócteles enzimáticos que contengan varias enzimas puede ser conveniente en determinados procesos industriales para aumentar la eficiencia de los tratamientos.

CONCLUSIONES

5 CONCLUSIONES

- 1) Se han clonado, purificado y caracterizado tres enzimas degradadoras de xilano de la especie *Paenibacillus barcinonensis*: Xyn10A, Xyn30D y Xyn11E.
- 2) La xilanasa Xyn10A de *P. barcinonensis* pertenece a la familia 10 de las glicosil hidrolasas, GH10. Presenta máxima actividad sobre xilanos de maderas duras (haya y abedul) y un alto potencial para la producción de oligosacáridos derivados del xilano.
- 3) El análisis del secretoma de *Paenibacillus barcinonensis* mediante herramientas proteómicas ha permitido la identificación de la xilanasa Xyn30D. Esta enzima es el primer ejemplo de xilanasa modular de la familia GH30 descrito hasta la fecha. La enzima tiene una estructura bimodular, consistente en el módulo catalítico unido a un módulo de unión a carbohidratos de la familia CBM35.
- 4) La xilanasa Xyn30D presenta actividad exclusivamente sobre glucuronoxilanos, no siendo activa sobre arabinoxilanos. La actividad del módulo catalítico GH30 aislado es similar a la de la enzima completa.
- 5) El módulo catalítico de la xilanasa Xyn30D presenta la estructura lateral β_9 característica de las xilanasas de la familia GH30. La delección de dicha estructura causa la pérdida de la actividad enzimática. Este resultado es la primera evidencia experimental del requerimiento de la estructura lateral β_9 para la actividad de las xilanasas de la familia GH30.
- 6) El módulo de unión a carbohidratos CBM35 de la xilanasa Xyn30D puede comportarse como una unidad funcional independiente y es capaz de unir las fracciones soluble e insoluble del glucuronoxilano, además de ácido glucurónico. Esta última unión es dependiente de calcio.

- 7) Se ha identificado la xilanasas Xyn11E de *P. barcinonensis*. Es una xilanasas homóloga a las del subgrupo de xilanasas de punto isoeléctrico alcalino y bajo peso molecular de la familia GH11, y presenta máxima actividad sobre glucuronoxilanos.
- 8) La xilanasas Xyn11E requiere de la coexpresión de la chaperona LppX para ser expresada heterológamente en forma activa y soluble.
- 9) La aplicación de xilanasas de *P. barcinonensis* en el blanqueo de pastas papeleras de sisal, especialmente de la xilanasas Xyn10A, permite obtener mejoras importantes tanto en el grado de deslignificación como en la disminución del contenido en ácidos hexenurónicos de las pastas.
- 10) Existe una correlación positiva entre la capacidad de las xilanasas de liberar azúcares reductores de las pastas papeleras, durante la etapa enzimática previa a la secuencia de blanqueo, y la efectividad de las enzimas en disminuir el contenido en lignina y ácidos hexenurónicos.
- 11) La aplicación del sobrenadantes crudos de *P. barcinonensis* como agente blanqueador de pastas de papel puede ser una alternativa de bajo coste para el blanqueo enzimáticamente asistido.

BIBLIOGRAFÍA

6 BIBLIOGRAFÍA

Ajisaka, K., and Yamamoto, Y. (2002). Control of the Regioselectivity in the Enzymatic Syntheses of Oligosaccharides Using Glycosidases. *ChemInform* 33, 251–251.

Arantes, V., and Saddler, J.N. (2010). Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. *Biotechnol Biofuels* 4, 3.

Ash, C., Priest, F.G., and Collins, M.D. (1993). Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 64, 253–260.

Biely, P. (1985). Microbial xylanolytic systems. *Trends in Biotechnology* 3, 286–290.

Biely, P., Krátký, Z., and Vrsanská, M. (1981). Substrate-binding site of endo-1,4-beta-xylanase of the yeast *Cryptococcus albidus*. *Eur. J. Biochem.* 119, 559–564.

Biely, P., MacKenzie, C.R., Puls, J., and Schneider, H. (1986). Cooperativity of Esterases and Xylanases in the Enzymatic Degradation of Acetyl Xylan. *Nature Biotechnology* 4, 731–733.

Biely, P., Vrsanská, M., Tenkanen, M., and Kluepfel, D. (1997). Endo-beta-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *J. Biotechnol.* 57, 151–166.

Blanco, A., Dias, P., Zueco, J., Parascandola, P., and Javier Pastor, F.I. (1999). A multidomain xylanase from a *Bacillus* sp. with a region homologous to thermostabilizing domains of thermophilic enzymes. *Microbiology (Reading, Engl.)* 145 (Pt 8), 2163–2170.

Blanco, A., and Pastor, F.I.J. (1993). Characterization of cellulase-free xylanases from the newly isolated *Bacillus* sp. strain BP-23. *Canadian Journal of Microbiology* 39, 1162–1166.

Blanco, A., Vidal, T., Colom, J.F., and Pastor, F.I. (1995). Purification and properties of xylanase A from alkali-tolerant *Bacillus* sp. strain BP-23. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 4468–4470.

Boraston, A.B., Bolam, D.N., Gilbert, H.J., and Davies, G.J. (2004). Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem. J.* 382, 769–781.

Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., and Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* 37, D233–238.

Charnock, S.J., Spurway, T.D., Xie, H., Beylot, M.-H., Virden, R., Warren, R.A.J., Hazlewood, G.P., and Gilbert, H.J. (1998). The Topology of the Substrate Binding Clefs of Glycosyl Hydrolase Family 10 Xylanases Are Not Conserved. *J. Biol. Chem.* 273, 32187–32199.

Chauhan, S., Choudhury, B., Singh, S.N., and Ghosh, P. (2006). Application of xylanase enzyme of *Bacillus coagulans* as a prebleaching agent on non-woody pulps. *Process Biochemistry* 41, 226–231.

Christov, L., Szakacs, G., and Balakrishnan, H. (1999). Production, partial characterization and use of fungal cellulase-free xylanases in pulp bleaching. *Process Biochemistry* 34, 511–517.

Clarke, J.H., Rixon, J.E., Ciruela, A., Gilbert, H.J., and Hazlewood, G.P. (1997). Family-10 and family-11 xylanases differ in their capacity to enhance the bleachability of hardwood and softwood paper pulps. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 177–183.

Collins, T., Gerday, C., and Feller, G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 3–23.

Collins, T., Meuwis, M.-A., Stals, I., Claeysens, M., Feller, G., and Gerday, C. (2002). A novel family 8 xylanase, functional and physicochemical characterization. *J. Biol. Chem.* 277, 35133–35139.

Correia, M.A.S., Mazumder, K., Brás, J.L.A., Firbank, S.J., Zhu, Y., Lewis, R.J., York, W.S., Fontes, C.M.G.A., and Gilbert, H.J. (2011). Structure and function of an arabinoxylan-specific xylanase. *J. Biol. Chem.* 286, 22510–22520.

Cosgrove, D.J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 850–861.

Coughlan, M.P., and Hazlewood, G.P. (1993). beta-1,4-D-xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 17 (Pt 3), 259–289.

Daniel, A.I.D., Neto, C.P., Evtuguin, D.V., and Silvestre, A.J.D. (2003). Hexenuronic acid contents of *Eucalyptus globulus* kraft pulps: Variation with pulping conditions and effect on ECF bleachability. *Tappi Journal* 2, 3–8.

Davies, G., and Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3, 853–859.

Debyser, W., Derdelinckx, G., and Delcour, J.A. (1997). Arabinoxylan solubilization and inhibition of the barley malt xylanolytic system by wheat during mashing with wheat wholemeal adjunct: Evidence for a new class of enzyme inhibitors in wheat. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 55, 153–156.

- Van Der Borgh, A., Goesaert, H., Veraverbeke, W.S., and Delcour, J.A. (2005). Fractionation of wheat and wheat flour into starch and gluten: Overview of the main processes and the factors involved. *Journal of Cereal Science* 41, 221–237.
- Derewenda, U., Swenson, L., Green, R., Wei, Y., Morosoli, R., Shareck, F., Kluepfel, D., and Derewenda, Z.S. (1994). Crystal structure, at 2.6-Å resolution, of the *Streptomyces lividans* xylanase A, a member of the F family of beta-1,4-D-glycanases. *J. Biol. Chem.* 269, 20811–20814.
- Esteghlalian, A.R., Kazaoka, M.M., Lowery, B.A., Varvak, A., Hancock, B., Woodward, T., Turner, J.O., Blum, D.L., Weiner, D., and Hazlewood, G.P. (2008). Prebleaching of softwood and hardwood pulps by a high performance xylanase belonging to a novel clade of glycosyl hydrolase family 11. *Enzyme Microb. Technol.* 42, 395–403.
- Fukuda, M., Watanabe, S., Kaneko, J., Itoh, Y., and Kamio, Y. (2009). The membrane lipoprotein LppX of *Paenibacillus* sp. strain W-61 serves as a molecular chaperone for xylanase of glycoside hydrolase family 11 during secretion across the cytoplasmic membrane. *J. Bacteriol.* 191, 1641–1649.
- Fushinobu, S., Hidaka, M., Honda, Y., Wakagi, T., Shoun, H., and Kitaoka, M. (2005). Structural basis for the specificity of the reducing end xylose-releasing exo-oligoxylanase from *Bacillus halodurans* C-125. *J. Biol. Chem.* 280, 17180–17186.
- Gallardo, O. (2007). Caracterización de nuevas xilanasas bacterianas. Ingeniería de enzimas con la xilanasas B de *Paenibacillus barcinonensis*. (Barcelona: Doctoral Thesis).
- Gallardo, O., Diaz, P., and Pastor, F.I.J. (2003). Characterization of a *Paenibacillus* cell-associated xylanase with high activity on aryl-xylosides: a new subclass of family 10 xylanases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 226–233.
- Gallardo, O., Fernández-Fernández, M., Valls, C., Valenzuela, S.V., Roncero, M.B., Vidal, T., Dias, P., and Pastor, F.I.J. (2010a). Characterization of a family GH5 xylanase with activity on neutral oligosaccharides and evaluation as a pulp bleaching aid. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 6290–6294.
- Gallardo, O., Pastor, F.I.J., Polaina, J., Diaz, P., Łysek, R., Vogel, P., Isorna, P., González, B., and Sanz-Aparicio, J. (2010b). Structural insights into the specificity of Xyn10B from *Paenibacillus barcinonensis* and its improved stability by forced protein evolution. *J. Biol. Chem.* 285, 2721–2733.
- Gao, F., Jiang, Y., Zhou, G.H., and Han, Z.K. (2007). The effects of xylanase supplementation on growth, digestion, circulating hormone and metabolite levels, immunity and gut microflora in cockerels fed on wheat-based diets. *British Poultry Science* 48, 480–488.

Gilbert, H.J., and Hazlewood, G.P. (1993). Bacterial cellulases and xylanases. *Journal of General Microbiology* 139, 187–194.

Gilkes, N.R., Henrissat, B., Kilburn, D.G., Miller, R.C., Jr, and Warren, R.A. (1991). Domains in microbial beta-1, 4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. *Microbiol. Rev.* 55, 303–315.

Goesaert, H., Brijs, K., Veraverbeke, W.S., Courtin, C.M., Gebruers, K., and Delcour, J.A. (2005). Wheat flour constituents: How they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends in Food Science and Technology* 16, 12–30.

Grootaert, C., Van den Abbeele, P., Marzorati, M., Broekaert, W.F., Courtin, C.M., Delcour, J.A., Verstraete, W., and Van de Wiele, T. (2009). Comparison of prebiotic effects of arabinoxylan oligosaccharides and inulin in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *FEMS Microbiol. Ecol.* 69, 231–242.

Gusakov, A.V., Kondratyeva, E.G., and Sinitsyn, A.P. (2011). Comparison of Two Methods for Assaying Reducing Sugars in the Determination of Carbohydrase Activities. *Int J Anal Chem* 2011,.

Hannig, G., and Makrides, S.C. (1998). Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* 16, 54–60.

Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280 (Pt 2), 309–316.

Henrissat, B., and Bairoch, A. (1996). Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* 316 (Pt 2), 695–696.

Honda, Y., and Kitaoka, M. (2004). A family 8 glycoside hydrolase from *Bacillus halodurans* C-125 (BH2105) is a reducing end xylose-releasing exo-oligoxylanase. *J. Biol. Chem.* 279, 55097–55103.

Hurlbert, J.C., and Preston, J.F., 3rd (2001). Functional characterization of a novel xylanase from a corn strain of *Erwinia chrysanthemi*. *J. Bacteriol.* 183, 2093–2100.

Hurter, R (2001). Sisal fibre: market opportunities in the pulp and paper industry. *FAO/CFC. Technical Paper* 14, 61–74.

Ingelbrecht, J.A., Moers, K., Abécassis, J., Rouau, X., and Delcour, J.A. (2001). Influence of arabinoxylans and endoxylanases on pasta processing and quality. Production of high-quality pasta with increased levels of soluble fiber. *Cereal Chemistry* 78, 721–729.

Jänis, J., Hakanpää, J., Hakulinen, N., Ibatullin, F.M., Hoxha, A., Derrick, P.J., Rouvinen, J., and Vainiotalo, P. (2005). Determination of thioxylo-oligosaccharide binding to family

11 xylanases using electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and X-ray crystallography. *FEBS Journal* 272, 2317–2333.

Jordan, D.B., Bowman, M.J., Braker, J.D., Dien, B.S., Hector, R.E., Lee, C.C., Mertens, J.A., and Wagschal, K. (2012). Plant cell walls to ethanol. *Biochemical Journal* 442, 241–252.

Joseleau, J.P., Cartier, N., Chambat, G., Faik, A., and Ruel, K. (1992). Structural features and biological activity of xyloglucans from suspension-cultured plant cells. *Biochimie* 74, 81–88.

Kellett, L.E., Poole, D.M., Ferreira, L.M., Durrant, A.J., Hazlewood, G.P., and Gilbert, H.J. (1990). Xylanase B and an arabinofuranosidase from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* contain identical cellulose-binding domains and are encoded by adjacent genes. *Biochem. J.* 272, 369–376.

Kim, J.F., Jeong, H., Park, S.-Y., Kim, S.-B., Park, Y.K., Choi, S.-K., Ryu, C.-M., Hur, C.-G., Ghim, S.-Y., Oh, T.K., et al. (2010). Genome sequence of the polymyxin-producing plant-probiotic rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* E681. *J. Bacteriol.* 192, 6103–6104.

Kolenová, K., Vrsanská, M., and Biely, P. (2006). Mode of action of endo-beta-1,4-xylanases of families 10 and 11 on acidic xylooligosaccharides. *J. Biotechnol.* 121, 338–345.

Li, Y., Mai, Y.-W., and Ye, L. (2000). Sisal fibre and its composites: a review of recent developments. *Composites Science and Technology* 60, 2037–2055.

Margeot, A., Hahn-Hagerdal, B., Edlund, M., Slade, R., and Monot, F. (2009). New improvements for lignocellulosic ethanol. *Current Opinion in Biotechnology* 20, 372–380.

Montanier, C., van Bueren, A.L., Dumon, C., Flint, J.E., Correia, M.A., Prates, J.A., Firbank, S.J., Lewis, R.J., Grondin, G.G., Ghinet, M.G., et al. (2009). Evidence that family 35 carbohydrate binding modules display conserved specificity but divergent function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 3065–3070.

Nelson, N. (1944). A Photometric Adaptation of the Somogyi Method for the Determination of Glucose. *J. Biol. Chem.* 153, 375–380.

Okai, N., Fukasaku, M., Kaneko, J., Tomita, T., Muramoto, K., and Kamio, Y. (1998). Molecular properties and activity of a carboxyl-terminal truncated form of xylanase 3 from *Aeromonas caviae* W-61. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 1560–1567.

Olfa, E., Mondher, M., Issam, S., Ferid, L., and Nejib, M.M. (2007). Induction, properties and application of xylanase activity from *Sclerotinia sclerotiorum* S2 fungus. *Journal of Food Biochemistry* 31, 96–107.

Paës, G., Berrin, J.-G., and Beaugrand, J. (2012). GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. *Biotechnology Advances* 30, 564–592.

Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T., and Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiol.* 5, 53–63.

Van Petegem, F., Collins, T., Meuwis, M.-A., Gerday, C., Feller, G., and Van Beeumen, J. (2003). The structure of a cold-adapted family 8 xylanase at 1.3 Å resolution. Structural adaptations to cold and investigation of the active site. *J. Biol. Chem.* 278, 7531–7539.

Polizeli, M.L.T.M., Rizzatti, A.C.S., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge, J.A., and Amorim, D.S. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67, 577–591.

Pollet, A., Delcour, J.A., and Courtin, C.M. (2010). Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. *Critical Reviews in Biotechnology* 30, 176–191.

Reilly, P.J. (1981). Xylanases: structure and function. *Basic Life Sci.* 18, 111–129.

Roncero, M.B., Torres, A.L., Colom, J.F., and Vidal, T. (2005). The effect of xylanase on lignocellulosic components during the bleaching of wood pulps. *Bioresour. Technol.* 96, 21–30.

Sánchez, M.M., Fritze, D., Blanco, A., Spröer, C., Tindall, B.J., Schumann, P., Kroppenstedt, R.M., Diaz, P., and Pastor, F.I.J. (2005). *Paenibacillus barcinonensis* sp. nov., a xylanase-producing bacterium isolated from a rice field in the Ebro River delta. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 935–939.

Scheller, H.V., and Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology* 61, 263–289.

Siebert, P.D., Chenchik, A., Kellogg, D.E., Lukyanov, K.A., and Lukyanov, S.A. (1995). An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 23, 1087–1088.

Somogyi, M. (1945). A New Reagent for the Determination of Sugars. *J. Biol. Chem.* 160, 61–68.

Sørensen, H.R., Pedersen, S., Jørgensen, C.T., and Meyer, A.S. (2007). Enzymatic hydrolysis of wheat arabinoxylan by a recombinant “minimal” enzyme cocktail containing beta-xylosidase and novel endo-1,4-beta-xylanase and alpha-l-arabinofuranosidase activities. *Biotechnol. Prog.* 23, 100–107.

- St John, F.J., González, J.M., and Pozharski, E. (2010). Consolidation of glycosyl hydrolase family 30: A dual domain 4/7 hydrolase family consisting of two structurally distinct groups. *FEBS Letters* *584*, 4435–4441.
- St John, F.J., Hurlbert, J.C., Rice, J.D., Preston, J.F., and Pozharski, E. (2011). Ligand bound structures of a glycosyl hydrolase family 30 glucuronoxylan xylanohydrolase. *J. Mol. Biol.* *407*, 92–109.
- St John, F.J., Rice, J.D., and Preston, J.F. (2006). Characterization of XynC from *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain 168 and analysis of its role in depolymerization of glucuronoxylan. *J. Bacteriol.* *188*, 8617–8626.
- Sudo, M., Sakka, M., Kimura, T., Ratanakhanokchai, K., and Sakka, K. (2010). Characterization of *Paenibacillus curdolanolyticus* Intracellular Xylanase Xyn10B Encoded by the xyn10B Gene. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* *74*, 2358–2360.
- Sunna, A., and Antranikian, G. (1997). Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology* *17*, 39–67.
- Tjalsma, H., Antelmann, H., Jongbloed, J.D.H., Braun, P.G., Darmon, E., Dorenbos, R., Dubois, J.-Y.F., Westers, H., Zanen, G., Quax, W.J., et al. (2004). Proteomics of Protein Secretion by *Bacillus subtilis*: Separating the “Secrets” of the Secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *68*, 207–233.
- Tomme, P., Warren, R.A.J., and Gilkes, N.R. (1995). Cellulose Hydrolysis by Bacteria and Fungi. In *Advances in Microbial Physiology*, (Academic Press), pp. 1–81.
- Törrönen, A., Harkki, A., and Rouvinen, J. (1994). Three-dimensional structure of endo-1,4-beta-xylanase II from *Trichoderma reesei*: two conformational states in the active site. *EMBO J.* *13*, 2493–2501.
- Törrönen, A., and Rouvinen, J. (1995). Structural comparison of two major endo-1,4-xylanases from *Trichoderma reesei*. *Biochemistry* *34*, 847–856.
- Tunnicliffe, R.B., Bolam, D.N., Pell, G., Gilbert, H.J., and Williamson, M.P. (2005). Structure of a mannan-specific family 35 carbohydrate-binding module: evidence for significant conformational changes upon ligand binding. *J. Mol. Biol.* *347*, 287–296.
- Urbániková, L., Vršanská, M., Mørkeberg Krogh, K.B.R., Hoff, T., and Biely, P. (2011). Structural basis for substrate recognition by *Erwinia chrysanthemi* GH30 glucuronoxylanase. *FEBS J.* *278*, 2105–2116.
- Valls, C., Gallardo, O., Vidal, T., Pastor, F.I.J., Dias, P., and Roncero, M.B. (2010a). New xylanases to obtain modified eucalypt fibres with high-cellulose content. *Bioresource Technology* *101*, 7439–7445.

Valls, C., and Roncero, M.B. (2009). Using both xylanase and laccase enzymes for pulp bleaching. *Bioresour. Technol.* *100*, 2032–2039.

Valls, C., Vidal, T., Gallardo, O., Diaz, P., Javier Pastor, F.I., and Blanca Roncero, M. (2010b). Obtaining low-HexA-content cellulose from eucalypt fibres: Which glycosil hydrolase family is more efficient? *Carbohydrate Polymers* *80*, 154–160.

Viikari, L., Pauna, M., Kantelinen, A., Sundquist, J., and Linko, M. (1986). Bleaching with enzymes. *Proceedings of the 3rd International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, Stockholm* 67–69.

de Vries, R.P., and Visser, J. (2001). *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Microbiol Mol Biol Rev* *65*, 497–522.

Vrsanská, M., Kolenová, K., Puchart, V., and Biely, P. (2007). Mode of action of glycoside hydrolase family 5 glucuronoxylan xylanohydrolase from *Erwinia chrysanthemi*. *FEBS J.* *274*, 1666–1677.

Wakarchuk, W.W., Campbell, R.L., Sung, W.L., Davoodi, J., and Yaguchi, M. (1994). Mutational and crystallographic analyses of the active site residues of the *Bacillus circulans* xylanase. *Protein Sci* *3*, 467–475.

Watanabe, S., Viet, D.N., Kaneko, J., Kamio, Y., and Yoshida, S. (2008). Cloning, expression, and transglycosylation reaction of *Paenibacillus* sp. strain W-61 xylanase 1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *72*, 951–958.

Whistler, R.L., and Masak, E. (1955). Enzymatic Hydrolysis of Xylan1. *J. Am. Chem. Soc.* *77*, 1241–1243.

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

Yin, L.-J., Lin, H.-H., Chiang, Y.-I., and Jiang, S.-T. (2010). Bioproperties and purification of xylanase from *Bacillus* sp. YJ6. *J. Agric. Food Chem.* *58*, 557–562.

ABREVIATURAS

7 ABREVIATURAS

| | |
|---------|--|
| AGE | Affinity gel electrophoresis |
| Amp | ampicilina |
| AOX | adsorbable organic halogens |
| AX | arabinoxilano |
| AXOS | arabinxiloologósacáridos |
| bp | pares de bases |
| BSA | seroalbúmina bovina |
| CBD | cellulose binding domain (dominio de unión a celulosa) |
| CBM | carbohydrate binding module |
| CMC | carboximetil celulosa |
| Da | Dalton |
| DNA | ácido desoxirribonucleico |
| D.O. | densidad óptica |
| DP | degree of polymerization (grado de polimerización) |
| DS | degree of substitution (grado de sustitución) |
| ECF | elemental chlorine free |
| EDTA | ácido etilen diamino tetraacético |
| et al. | y otros / y colaboradores |
| Fn3 | dominio de unión a fibronectina tipo III |
| FPLC | fast protein liquid chromatography |
| g | gramo |
| GF | gel filtración |
| GH | glicosil hidrolasa |
| h | hora |
| HexA | ácido hexenurónico |
| IEC | ionic exchange chromatography |
| IMAC | immobilized metal ion affinity chromatography |
| IPTG | isopropil- β -tiogalactopiranosido |
| ISO (%) | porcentaje de blancura ISO |

| | |
|--------------------------------------|--|
| ISO | Internacional Organization for Standardization |
| kb | kilobases |
| kDa | kilodalton |
| KN | número kappa |
| Kan | kanamicina |
| l | litro |
| LB | medio rico de cultivo para Escherichia coli, Luria Broth |
| M | molar (mol/l) |
| mA | miliamperio |
| MALDI-TOF MS | Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry |
| MeGAX | glucuronoxilano |
| MeGlcA | ácido 4- <i>O</i> -metil-D-glucurónico |
| MeGlcA ³ Xyl ₃ | Ácido aldotetraurónico |
| MeGlcA ³ Xyl ₄ | Ácido aldopentaurónico |
| mg | miligramo |
| min | minuto |
| ml | mililitro |
| mM | milimolar |
| mm | milimetro |
| mRNA | ácido ribonucleico mensajero |
| °C | grado Centígrados |
| o | orto |
| oNPX | oNitrofenil-β-D-Xilopiranosido |
| ORF | open reading frame |
| PCR | reacción en cadena de la polimerasa |
| pI | punto isoeléctrico |
| p | para |
| pNPAf | pNitrofenil-α-L-Arabinofuranósido |
| pNPAP | pNitrofenil-α-L-Arabinopiranosido |
| pNPG | pNitrofenil-β-D-Glucopiranosido |

| | |
|-----------|--|
| pNPX | <i>p</i> Nitrofenil- β -D-Xilopiranosido |
| rpm | revoluciones por minuto |
| s | segundo |
| SDS PAGE | electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico |
| SEM | microscopía electrónica de barrido |
| sp. | especie |
| TCF | total chlorine free |
| TEM | microscopía electrónica de transmisión |
| TLC | thin layer chromatography (cromatografía en capa fina) |
| U | unidad de actividad |
| V | voltios |
| x g | aceleración de la gravedad |
| XOS | xilooligosacáridos |
| μ mol | micromol |
| μ g | microgramo |
| μ l | microlitro |
| μ m | micrómetro / micra |
| μ M | micromolar |

INFORMES

8 INFORMES

INFORME DEL FACTOR DE IMPACTO

Los artículos que forman parte de la Memoria de Tesis Doctoral presentada por Susana Valenzuela Mayorga han sido publicados o están en preparación para su publicación en revistas internacionales indexadas en el Journal Citation Reports[®] tal y como se detalla a continuación:

Susana V. Valenzuela, Pilar Diaz y F. I. Javier Pastor (2010). Recombinant expression of an alkali stable GH10 xylanase from *Paenibacillus barcinonensis*. JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY. 58 (8): 4814.

Esta revista se encuentra incluida en el primer cuartil del área temática de: agricultura, multidisciplinaria (2/55), química aplicada (8/70) y ciencia de los alimentos y tecnología (10/128), con un factor de impacto para el año 2010 de 2.816

Susana V. Valenzuela, Pilar Diaz y F. I. Javier Pastor (2012). Modular Glucuronoxylan-Specific Xylanase with a Family CBM35 Carbohydrate-Binding Module. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. 78(11):3923.

Esta revista se encuentra incluida en el primer cuartil del área temática de biotecnología y microbiología aplicada (29/157) y en el segundo cuartil del área de microbiología (28/112), con un factor de impacto para el año 2011 de 3.829

Susana V. Valenzuela, Mai Nielsen, Pilar Diaz y F. I. Javier Pastor. Characterization of a chaperone dependent Xylanase from *Paenibacillus barcinonensis* with potential applications in upgrading paper pulps.

En preparación.

Susana V. Valenzuela, Cristina Valls, Teresa Vidal, Pilar Diaz y Francisco J Pastor. Effectiveness of new xylanases from different GH families on lignin and hexenuronic acids removal of specialty sisal fibres.

En preparación.

María Ángela Sainz-Polo, Susana V. Valenzuela, F. I. Javier Pastor y Julia Sanz-Aparicio. Preliminary crystallographic analysis of Xyn30D from *Paenibacillus barcinonensis*.

En curso.



F. I. Javier Pastor
Director de Tesis

INFORME DE COAUTORÍA

La doctoranda Susana Valenzuela Mayorga ha participado en los artículos que forman parte de su Tesis Doctoral de la manera que se detalla a continuación:

Susana V. Valenzuela, Pilar Díaz y F. I. Javier Pastor (2010). Recombinant expression of an alkali stable GH10 xylanase from *Paenibacillus barcinonensis*. JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY. 58 (8): 4814.

La doctoranda llevó a cabo la parte experimental, participó activamente en el diseño experimental y en la redacción del manuscrito.

Susana V. Valenzuela, Pilar Díaz y F. I. Javier Pastor (2012). Modular Glucuronoxylan-Specific Xylanase with a Family CBM35 Carbohydrate-Binding Module. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. 78(11):3923.

La doctoranda llevó a cabo la parte experimental, participó activamente en el diseño experimental y en la redacción del manuscrito.

Susana V. Valenzuela, Mai Nielsen, Pilar Díaz y F. I. Javier Pastor. Characterization of a chaperone dependent Xylanase from *Paenibacillus barcinonensis* with potential applications in upgrading paper pulps.

La doctoranda llevó a cabo la mayor parte de las tareas experimentales, participó activamente en el diseño experimental y en la redacción del manuscrito.

Susana V. Valenzuela, Cristina Valls, Teresa Vidal, Pilar Díaz y Francisco J Pastor. Effectiveness of new xylanases from different GH families on lignin and hexenuronic acids removal of specialty sisal fibres.

La doctoranda llevó a cabo la parte experimental, participó activamente en el diseño experimental y en la redacción del manuscrito.

María Ángela Sainz-Polo, Susana V. Valenzuela, F. I. Javier Pastor y Julia Sanz-Aparicio. Preliminary crystallographic analysis of Xyn30D from *Paenibacillus barcinonensis*.

La doctoranda llevó a cabo la parte experimental de expresión, purificación de Xyn30D, diseño, realización del mutante y purificación. Además participó activamente en la redacción del manuscrito.



F. I. Javier Pastor
Director de Tesis

La ilustración de la portada es una acuarela original de Catalina Somolinos (<http://teconeteque.blogspot.com.es/>).

El diseño de la portada es una idea original de Belén Infanzón y Susana Valenzuela.

Esta obra está sujeta a la licencia Reconocimiento-No Comercial-Compartir Igual 2.5 España de Creative Commons. Para ver una copia de esta licencia, visite <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/es/> o envíe una carta a Creative Commons, 444 Castro Street, Suite 900, Mountain View, California, 94041, USA.