

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
CAMPUS LOS ÁNGELES
ESCUELA DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA VEGETAL**



**ENZIMAS XILANOLÍTICAS PROVENIENTES DE MICROORGANISMOS
TERMÓFILOS PARA APLICACIONES INDUSTRIALES**

**MEMORIA DE TÍTULO PARA
OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO
EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL**

**CAMILA VALENTINA CUEVAS CRISÓSTOMO
LOS ÁNGELES-CHILE**

2021

**Enzimas xilanolíticas provenientes de microorganismos termófilos para
aplicaciones industriales**

Alumna

**Camila Cuevas Crisóstomo
Ingeniero en Biotecnología Vegetal**

Profesora guía.

**Dra. Ángela Machuca Herrera
Profesora Asociada
Bioquímico**

Evaluador externo

**Dr. Regis Teixeira Mendonça
Profesor Titular
Ingeniero Químico**

Evaluador externo

**Dra. Carolina Aguirre Céspedes
Profesora Asociada
Químico**

Jefe de carrera

**Pedro Quiroz Hernández
Profesor Instructor
Ingeniero (E) Forestal**

Director de Departamento

**M. Sc Pablo Novoa Barra
Profesor Asistente
Ingeniero (E) Forestal**



Agradecimientos

Hoy miro hacia atrás y recorro el camino trazado que me trajo hasta aquí, que por momentos fue difícil, pero también fue muy grato y no podría estar aquí hoy si no fuera por muchas personas que contribuyeron en este proceso.

Primero que todo mis mayores agradecimientos siempre serán hacia mi mamá, gracias a ella soy quien soy y pude culminar este maravilloso proceso; gracias por tu amor, paciencia y esfuerzo sobrehumano para salir siempre adelante, sin duda alguna no pude tener un mejor ejemplo a seguir. A mi familia por creer en mí, mi tía Marcela por apoyarme en los momentos más difíciles, a mis padrinos por ser unos padres, a Martín por hacerme reír cuando creí que todo estaba perdido, a Cinthia por su manera de ser metódica, resiliente y enseñarme que siempre hay una edad para todo, a Emilia por ser una inspiración en mi vida y alegrar los días grises, A mi lela Elsa por siempre creer y confiar en mí por ser al igual que mi tía Marcela mi segunda mamá, mi madrina porque cada vez que decaí me llamo y me dio un empujón para tomar fuerza nuevamente, y a Cesar por apoyarme, por amarme y estar ahí siempre, gracias totales a toda mi familia mis tías y tíos por su amor.

Agradezco a mi profesora guía Ángela Machuca quien pacientemente me apoyo y ayudo para obtener mi seminario bibliográfico, gracias por cada enseñanza.

Y finalmente agradecer el apoyo a FONDECYT N°1200504, el cual hizo posible esta investigación.

Tesis Financiada a través del proyecto Fondecyt N° 1200504

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Ítems	Páginas
Resumen	1
Abstract	2
1.-Introducción.	3
2.- Componentes de la pared celular.	5
2.1.- Hemicelulosas o Poliosas.	6
3.-Enzimas xilanolíticas.	8
3.1.- Mecanismo de acción de xilanasas.	9
3.2.- Familias de xilanasas.	12
4.- Xilanasas producidas por microorganismos termófilos.	15
4.1.-Importancia de xilanasas termoestables	18
5.- Xilanasas recombinantes.	21
6.-Utilización de xilanasas en el tratamiento de materiales lignocelulósicos.	24
7.- Proyecciones futuras.	28
8.- Conclusiones.	29
9.- Bibliografía.	31



ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
FIGURA 1	6
FIGURA 2.....	8
FIGURA 3.....	9
FIGURA 4.....	11
FIGURA 5.....	11
FIGURA 6.....	14
FIGURA 7.....	15
FIGURA 8.....	26
FIGURA 9.....	29



ÍNDICE DE TABLAS

	Páginas
TABLA 1.....	17
TABLA 2.....	20
TABLA 3.....	23
TABLA 4.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS

GH: Glucohidrolasas

C: Carbonos

°C: Grados Celsius

pI: Punto isoeléctrico

Glu: Glutamato

Asp: Aspartato



Resumen

La pared celular vegetal está compuesta principalmente por celulosa, lignina y hemicelulosas. Las hemicelulosas son heteropolisacáridos que se encuentran en la interfaz celulosa-lignina, siendo el xilano la más abundante de ellas. Éste se degrada en la naturaleza principalmente por la acción de las enzimas endo-1,4- β -D-xilanasas (EC 3.2.1.8), las cuales rompen los enlaces β -1,4-glicosídicos entre las unidades de D-xilosa, mediante dos mecanismos de acción de retención o inversión de la configuración del carbono anomérico. Las endo-1,4- β -D-xilanasas son enzimas que se clasifican dentro de la familia de las glucohidrolasas (GH), destacando aquí las familias GH10 y GH11, ya que son las enzimas que presentan una mayor especificidad sobre el sustrato (xilano) y tienen una mayor actividad catalítica. Estas enzimas tienen aplicaciones en varias industrias, como por ejemplo, alimentos y bebidas, detergentes, textil, biocombustibles y pulpa y papel. Pero para poder ser eficientes en estas industrias las xilanasas deben ser capaces de resistir condiciones extremas de temperatura y pH, y es aquí donde encontrar xilanasas provenientes de microorganismos termófilos es fundamental. La importancia de las enzimas termoestables radica en que pueden aumentar la solubilidad del sustrato y del producto, reducen los tiempos de hidrólisis entre otras características que las hacen más atractivas y ventajosas que las enzimas que provienen de microorganismos mesófilos. De las fuentes de obtención microbiana de xilanasas destacan los microorganismos termófilos capaces de crecer en temperaturas entre 50°C y 80°C, o mayores en el caso de los extremófilos, y capaces de producir xilanasas termoestables, como son bacterias, hongos y arqueas. Debido a la dificultad de cultivo de los microorganismos termófilos (o extremófilos) y a la necesidad de aumentar los rendimientos y propiedades de estabilidad de las xilanasas con fines industriales, surge la necesidad de recurrir a mejoras biotecnológicas a través del uso de técnicas como el ADN recombinante y la ingeniería de proteínas. Dentro de este contexto, el objetivo de este seminario es revisar los últimos avances en el conocimiento sobre las familias de xilanasas y sus mecanismos de acción, con un enfoque en aquellas provenientes de microorganismos termófilos, la expresión heteróloga y su importancia en diferentes aplicaciones industriales.

Palabras claves: endo-xilanasas, extremófilos, familia GH11, hemicelulosa, xilanasas recombinantes.

Abstract

The plant cell wall is composed mainly of cellulose, lignin, and hemicelluloses. Hemicelluloses are heteropolysaccharides found in the cellulose-lignin interface, with xylan being the most abundant of them. This is mainly degraded in nature by the action of the enzymes endo-1, 4- β -D-xylanases (EC 3.2.1.8), which break the β -1,4-glycosidic bonds between the D-xylose units through two mechanisms of action, retention or inversion of the anomeric carbon configuration. Endo-1,4- β -D-xylanases are enzymes classified within the family of glucohydrolases (GH), highlighting here the families GH10 and GH11, since they are the enzymes that present greater specificity on the substrate (xylan) and have greater catalytic activity. These enzymes have applications in several industries, such as food and beverages, detergents, textiles, biofuels and pulp and paper. However, to be efficient in these industries, xylanases must be able to resist extreme conditions of temperature and pH, and this is where finding xylanases from thermophilic microorganisms is essential. The importance of thermostable enzymes lies in their ability to increase the solubility of the substrate and the product, and reduce hydrolysis times, among other characteristics that make them more attractive and advantageous than the enzymes from mesophilic microorganisms. Among the sources of microbial xylanases, thermophilic microorganisms capable of growing in temperatures between 50°C and 80°C, or higher in the case of extremophiles, and of producing thermostable xylanases, such as bacteria, fungi, and archaea, stand out. Due to the difficulty of cultivating thermophilic (or extremophilic) microorganisms and the need to increase yields and stability properties of xylanases for industrial purposes, the need arises to resort to biotechnological improvements using techniques such as recombinant DNA and protein engineering. In this context, the aim of this seminar is to review the latest advances in knowledge about the families of xylanases and their mechanisms of action, focusing on those from thermophilic microorganisms, the heterologous expression and their importance in different industrial applications.

Keywords: endo-xylanase, extremophiles, GH11 family, hemicellulose, recombinant xylanase.

1.- Introducción

Las maderas blandas y maderas duras difieren en su composición y estructura. En las maderas duras hay una gran cantidad de vasos y células de parénquima, y son más densas en comparación con las maderas blandas. Las maderas duras tienen una mayor proporción de celulosa, hemicelulosas y extractivos en comparación con las maderas blandas, pero estas últimas tienen un mayor contenido de lignina (Demirbas 2009).

Entre los componentes de la madera la celulosa existe como un homopolímero no ramificado, que confiere soporte estructural a la madera y es el componente principal de la pared celular vegetal (Bajpai 2020). Otro componente importante de la madera es la hemicelulosa, que a diferencia de la celulosa, es muy heterogénea en su composición química (Bajpai 2016). La hemicelulosa es un heteropolímero de naturaleza ramificada, que consta de azúcares de 5 carbonos (C) del tipo pentosas (ej.: xilosa, arabinosa) y azúcares de 6C del tipo hexosas (ej.: glucosa, galactosa, manosa), de las cuales la xilosa es la más abundante (Srivastava *et al.* 2020). En la naturaleza, el xilano es la hemicelulosa más abundante que comprende residuos de β -D-xilopiranosido unidos por enlaces β -D-1,4-glicosídicos (Beg *et al.* 2001). La presencia de xilano es predominante en la pared celular secundaria, junto con la celulosa y la lignina, y por lo tanto es el componente polimérico prominente de la pared celular (Kulkarni *et al.* 1999). Este polisacárido es el más común en las paredes celulares de las plantas terrestres y se encuentra en mayores cantidades en las maderas duras de angiospermas (15 - 30% del contenido de la pared celular) y en menor abundancia en maderas blandas de gimnospermas (7 - 12%) (Haltrich *et al.* 1996). El xilano, la lignina y la celulosa están unidos a través de enlaces covalentes y no covalentes que forman la estructura de la pared celular, donde el xilano está presente en la interfaz de la lignina y la celulosa y dicha posición se considera muy importante para mantener la integridad de la pared celular y para la cohesión de las fibras (Beg *et al.* 2001). La degradación del polímero de xilano en la naturaleza se produce mediante la acción coordinada y sinérgica de enzimas xilanolíticas como las endo-1,4- β -xilanasas, que escinden el esqueleto del xilano en xilooligosacáridos más pequeños, reduciendo el grado de polimerización del sustrato, y β -xilosidasas, que escinden los xilooligosacáridos en residuos de D-xilosa (Heinen *et al.* 2017). Las enzimas

xilanólicas pueden ser producidas por muchos microorganismos incluidas bacterias, levaduras y hongos filamentosos (Fan *et al.* 2012; Le y Wang 2014).

Las endo-1,4- β -D-xilanasas y las β -xilosidasas son enzimas pertenecientes a las familias proteicas de las glucosidasas (GH) (Srivastava *et al.* 2020). Estas enzimas no solo desempeñan un papel importante en los organismos vivos, sino también en diversas industrias que las incluyen en sus procesos productivos, como son las industrias de lácteos, detergentes, alimentos y bebidas, biocombustibles y pulpa y papel (Garg 2016). La aplicación industrial de enzimas xilanólicas exige que éstas sean capaces de resistir las severas condiciones de trabajo tales como ambientes muy ácidos o alcalinos y temperaturas elevadas. Las xilanasas alcalinas por ejemplo, son ampliamente requeridas para el blanqueo de pulpa Kraft, mientras que las xilanasas preferidas en la alimentación avícola deben ser activas en condiciones de pH ácido o neutro, que corresponden a las condiciones predominantes en el intestino (Chadha *et al.* 2019). Es por esto que la bioprospección de xilanasas termoestables, considerando también los óptimos de pH y de temperatura, son los principales criterios a evaluar para su aplicación industrial, además de la resistencia a proteasas y iones metálicos, entre otros (Chadha *et al.* 2019). Dentro de este contexto, es fundamental encontrar xilanasas provenientes de organismos extremófilos, específicamente termófilos, ya que son de gran utilidad en diversas industrias. Los microorganismos termófilos son fuentes naturales de enzimas con mayor estabilidad a altas temperaturas (Basit *et al.* 2018 a).

Las xilanasas termoestables pueden ser ventajosas para diversas prácticas industriales ya que las altas temperaturas aumentan la solubilidad del sustrato y del producto, reducen los tiempos de hidrólisis y la viscosidad del sustrato y minimizan el riesgo de contaminación microbiana (Badiyan *et al.* 2011). Entre los microorganismos termófilos hay tres grupos principales que se destacan por la producción de xilanasas termoestables: las bacterias, las arqueas y los hongos filamentosos (Basit *et al.* 2018 a). De estos grupos de microorganismos la mayoría produce xilanasas pertenecientes a las familias G10 y G11, que son las familias que tienen una mayor eficiencia catalítica y un mayor rango de temperatura y pH de reacción. Las xilanasas de estas dos familias a menudo exhiben propiedades termofílicas que las hacen más adecuadas para aplicaciones industriales (Zheng *et al.* 2011).

El objetivo del presente seminario bibliográfico es revisar los últimos avances en el conocimiento sobre las familias de xilanasas y sus mecanismos de acción, con un

enfoque en aquellas provenientes de microorganismos termófilos, su expresión heteróloga e importancia en diferentes aplicaciones industriales.

2.- Componentes de la pared celular

La biomasa vegetal se compone principalmente de tres polímeros: celulosa, hemicelulosas y lignina (Fig. 1), junto con menores cantidades de pectinas, proteínas, extractivos y cenizas. La composición de estos componentes puede variar de una especie vegetal a otra (Bajpai 2016), e incluso las proporciones dentro de una misma planta pueden variar con la edad, etapa de crecimiento y otras condiciones. Estos polímeros se asocian entre sí en diferentes grados formando una heteromatriz, y con una composición relativamente variable según el tipo, la especie e incluso la fuente de la biomasa (Carere *et al.* 2008). La celulosa es el componente principal de la pared celular vegetal y está presente tanto en forma cristalina como amorfa. La celulosa cristalina altamente ordenada corresponde a la mayor proporción de la celulosa, mientras que un pequeño porcentaje de cadenas desorganizadas forman la celulosa amorfa. La celulosa en su forma amorfa es más susceptible a la degradación enzimática que las regiones cristalinas (Bajpai 2016). Otros componentes de la pared celular son las hemicelulosas o poliosas, las cuales son una clase de polímeros basados en azúcares del tipo pentosas y hexosas, o combinaciones de ambos, en los que el xilano es el polisacárido más abundante entre los constituyentes hemicelulósicos (Heinen *et al.* 2017). En cuanto a la lignina, esta es un polímero de naturaleza fenólica y estructura compleja que se encuentra en las paredes celulares de las plantas vasculares, principalmente en las paredes secundarias engrosadas de los vasos del xilema y las traqueidas y en las fibras del esclerénquima y del xilema (Terret y Dupre 2019). La lignina ha sido identificada como una importante barrera para la hidrólisis enzimática de la biomasa lignocelulósica debido a su estrecha asociación con las microfibrillas de celulosa (Avgerinos y Wang 1983). La digestibilidad de la biomasa lignocelulósica aumenta con la disminución de lignina en la pared celular (Chang y Holtzapple 2000).

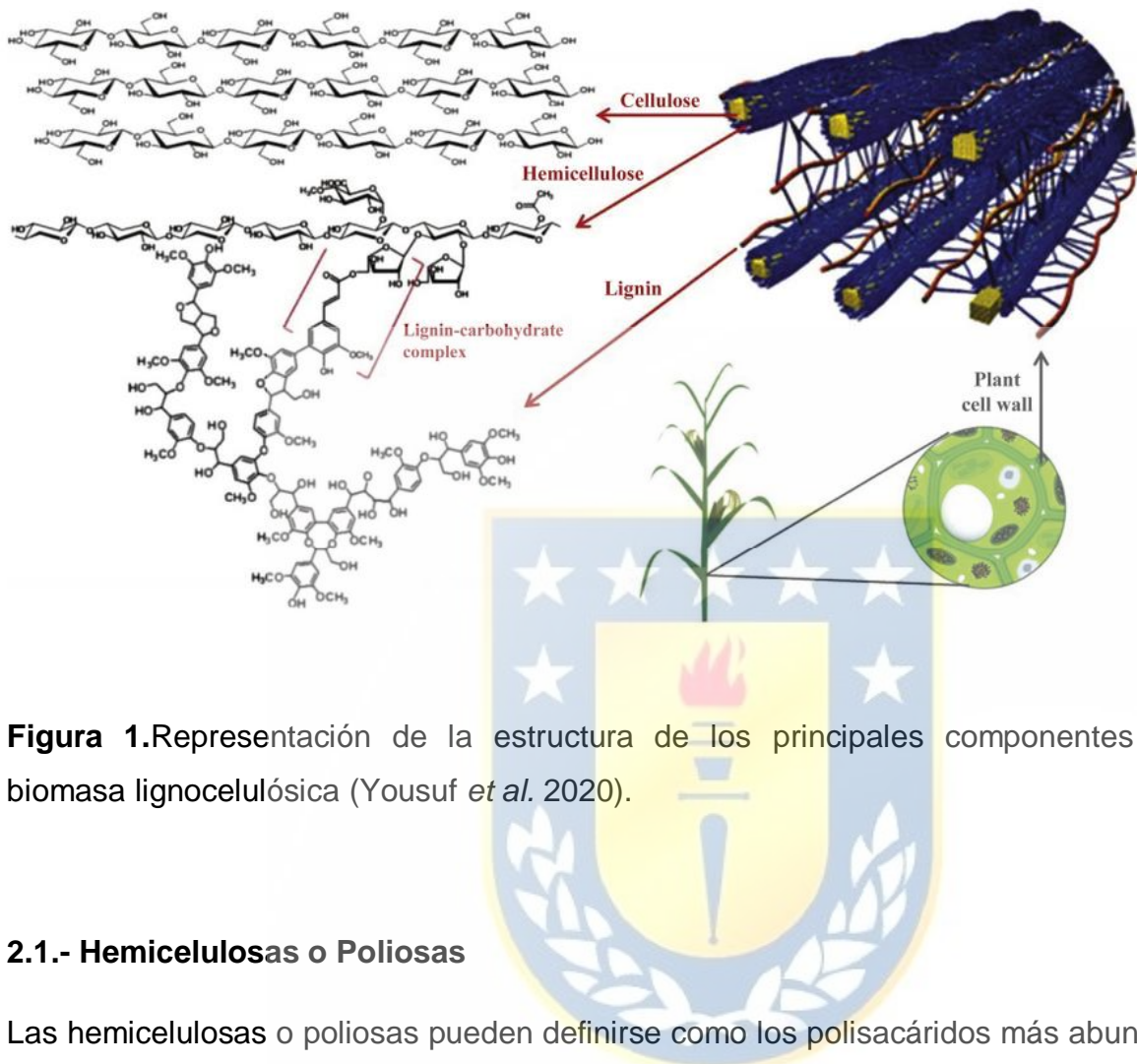


Figura 1. Representación de la estructura de los principales componentes de la biomasa lignocelulósica (Yousuf *et al.* 2020).

2.1.- Hemicelulosas o Poliosas

Las hemicelulosas o poliosas pueden definirse como los polisacáridos más abundantes en la pared celular vegetal (10-30 %) después de la celulosa. Están presentes en la pared celular de las plantas en estrecha asociación con la celulosa y la lignina para contribuir a su rigidez (De Freiras *et al.* 2019). Las hemicelulosas son heteropolisacáridos que incluyen xiloglucanos, xilanos, mananos, glucanos y glucomananos (Scheller y Ulvskov 2010). Las hemicelulosas tienen un peso molecular menor en comparación con la celulosa y presentan cadenas laterales cortas que se hidrolizan fácilmente (Saha 2003), con un grado de polimerización que varía entre 100-200. La estructura de estos polisacáridos y su abundancia varían ampliamente entre diferentes especies vegetales (Scheller y Ulvskov 2010). Por lo general, contienen una columna vertebral que consta de unidades monoméricas de azúcares que se repiten enlazadas por uniones del tipo β -(1 \rightarrow 4)-glicosídicos con puntos de ramificación en posición α -(1 \rightarrow 2), α -(1 \rightarrow 3) y/o α -(1 \rightarrow 6) (Rowell *et al.* 2012). Además, las hemicelulosas pueden tener cierto grado de acetilación, como por ejemplo en el caso de los heteroxilanos (Bajpai 2020).

Los xiloglucanos son las hemicelulosas más abundantes en las paredes primarias de los espermatofitos, excepto en las gramíneas (Scheller y Ulvskov 2010). El patrón de ramificación de los xiloglucanos es de importancia tanto funcional como taxonómica. Los xiloglucanos están hechos de unidades repetitivas de glucosa que están unidos por enlaces β -(1 \rightarrow 4)-glucosídicos y con inserción de D-xilosa en las cadenas laterales mediante enlaces α -(1 \rightarrow 6) (Fry *et al.* 1993). Los xiloglucanos menos ramificados son menos solubles y esto puede correlacionarse con aspectos funcionales en aquellas familias con xiloglucanos poco sustituidos (Scheller y Ulvskov 2010).

En cuanto a los mananos y glucomananos también presentan enlaces del tipo β -(1 \rightarrow 4)-glucosídicos, con una columna vertebral que puede consistir exclusivamente de manosa, como en el caso de mananos y galactomananos, o con manosa y glucosa en un patrón no repetitivo como en el caso de glucanos y galactoglucomanos. En las gimnospermas, los galactoglucomananos son los componentes principales de las paredes secundarias (Scheller y Ulvskov 2010).

Los xilanos son un grupo diverso de hemicelulosas con la característica común de una cadena principal de residuos de D-xilosa enlazados en posición β -(1 \rightarrow 4). Una modificación común de los xilanos es la sustitución con residuos de glucuronopiranosil y 4-O-metil-D-glucuronopiranosil enlazados en posición α -(1 \rightarrow 2). Los xilanos con predominio de este tipo de sustitución se conocen como glucuronoxilanos y son los que se encuentran mayoritariamente en las maderas duras (15-30%) de peso seco, aunque su porcentaje varía dependiendo de la especie de madera dura (Peng *et al.* 2012). En las maderas blandas, las hemicelulosas más abundantes son los galactoglucomananos parcialmente acetilados, que están compuestos por unidades de D-glucopiranososa y D-manopiranososa unidas mediante enlaces β -(1 \rightarrow 4), distribuidas al azar en la cadena principal. Los galactoglucomananos representan del 10 al 25% del total de hemicelulosas que se encuentran en las maderas blandas y pueden constituir hasta el 10% en peso seco de la madera (Peng *et al.* 2012). En las maderas duras, la principal hemicelulosa es el O-acetil-4-O-metilglucurono- β -D-xilano o glucuronoxilano (Fig. 2), cuyos residuos de D-xilosa se encuentran acetilados en posición C2 y C3 alrededor del 70% (Gírio *et al.* 2010). Este polisacárido consta generalmente de 150-200 residuos de D-xilopiranosido, y a cada diez residuos aparece un residuo de 4-O-metil-D-glucuronopiranosil, lo que les confiere solubilidad parcial en agua (Coughlan y Hazlewood 1993). Los glucuronoxilanos son la principal hemicelulosa de las maderas

duras, como el álamo temblón (*Populus tremula*), abedul (*Betula pendula*) y haya (*Fagus sylvatica*).

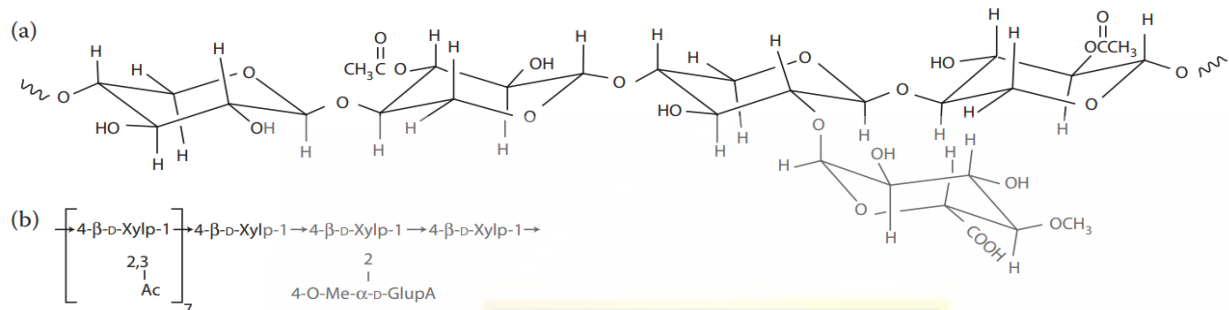


Figura 2. Estructura molecular parcial (a) y representación de la estructura (b) de O-acetil-4-O-metilglucuronoxilano presente en maderas duras (Rowel *et al.* 2012).

3.- Enzimas xilanolíticas

Debido a la heterogeneidad y la compleja naturaleza química del xilano, su hidrólisis completa requiere la acción de varias actividades enzimáticas que actúan de manera cooperativa y sinérgica para convertir el xilano en los azúcares monoméricos de origen (Bajpai 2014; Srivastava *et al.* 2020). Estas enzimas tienen diversas especificidades y modos de acción (Bajpai 2014), donde algunas están encargadas de actuar sobre la cadena principal del sustrato y otras sobre las cadenas laterales o ramificaciones. Las enzimas responsables de la hidrólisis del xilano, son conocidas genéricamente como “enzimas xilanolíticas” o “xilanasas”, pertenecen a la familia de las glucohidrolasas (GH) y suelen estar compuestas por varias enzimas hidrolíticas como son: endo-1,4-β-D-xilanasas (EC 3.2.1.8), β-D-xilosidasas (EC 3.2.1.37), α-L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.99), α-glucuronidasas (EC 3.2.1.139) y acetil-xilanoesterasas (EC 3.1.1.6) (Fig. 3).

Las endo-1,4-β-D-xilanasas, comúnmente conocidas como xilanasas, actúan sobre los enlaces glicosídicos de la columna vertebral del xilano, en tanto que la α-L-arabinofuranosidasahidroliza las cadenas laterales de arabinosa, la acetil-xilanoesterasa elimina los grupos acetilos, y la α-glucuronidasahidroliza los enlaces α-(1,2)-glicosídicos entre residuos de xilosa y ácido glucurónico o ácido 4-O-metil-D-glucurónico en glucuronoxilano y/o glucuronoarabinoxilano. Las feruloilesterasas (EC

3.1.1.73) y las esterasas del ácido p-cumárico (EC 3.1.1.x) escinden los enlaces éster entre los residuos de ácido ferúlico y L-arabinosa y los residuos de ácido p-cumárico y L-arabinosa de xilano, respectivamente. Finalmente, las β -D-xilosidasas actúan hidrolizando xilobiosa o xilooligosacáridosa partir del extremo no reductor, hasta unidades de D- xilosa (Wong *et al.* 1988).

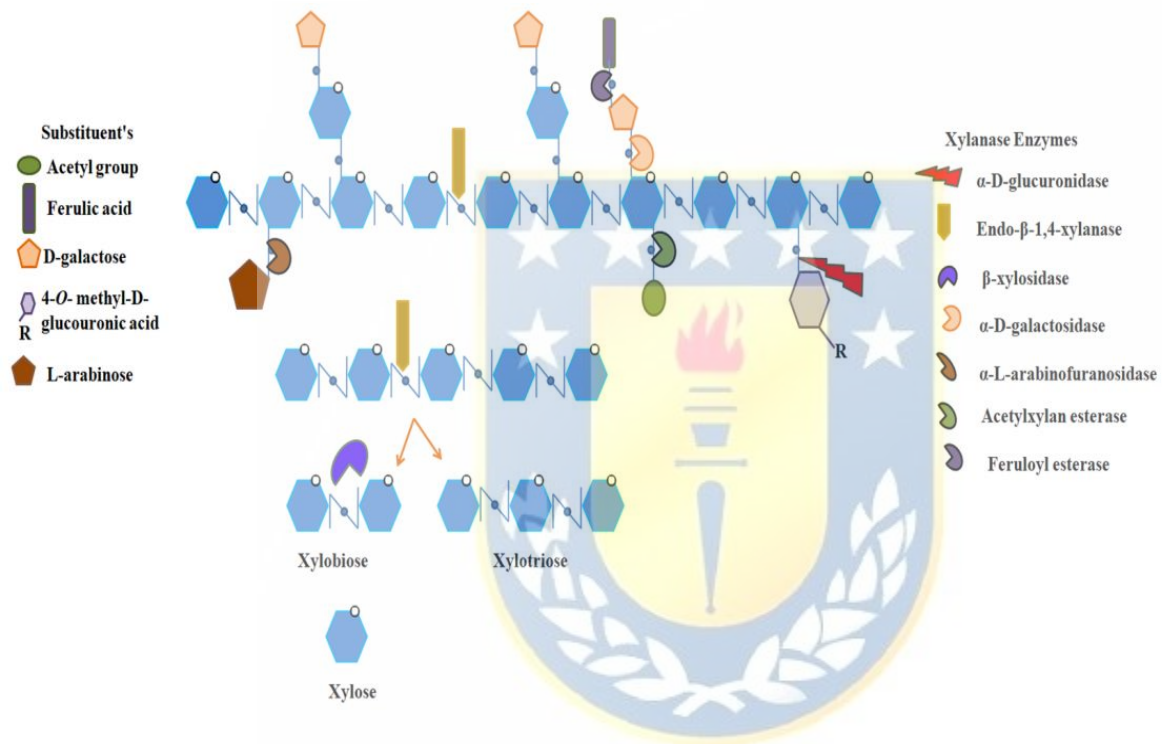


Figura 3. Representación del polímero de xilano mostrando los puntos de ataque por las diferentes enzimas xilanolíticas para su completa hidrólisis hasta xilosa (Bhardwaj *et al.* 2019).

3.1.- Mecanismos de acción de Xilanasas

Las endo-1,4- β -D-xilanasas (1,4- β -D-xilanoxilohidrolasa; EC 3.2.1.8) son las enzimas más importantes en la degradación del xilano. Estas enzimas rompen los enlaces glucosídicos en la columna vertebral del xilano y reducen el grado de polimerización del sustrato (Bajpai 2014). El xilano no es atacado al azar, sino que los enlaces seleccionados para la hidrólisis dependen de la naturaleza de la molécula del sustrato (Liab *et al.* 2000), es decir, de la longitud de la cadena, del grado de ramificación y de la presencia de sustituyentes (Bajpai 2014). En general, las endo-1,4- β - D-xilanasas no hidrolizan la xilobiosa y la hidrólisis de la xilotriosa es en la mayoría de los casos

insignificante o al menos limitada (Heinen *et al.* 2017). Tanto la longitud como el tipo de productos liberados dependen del modo de acción de cada xilanasas (Bajpai 2009), pero en general los principales productos de la hidrólisis son inicialmente oligómeros de β -D-xilopiranosil, pero en etapas posteriores, moléculas pequeñas como mono-, di- y trisacáridos de β -D-xilopiranosil.

En cuanto al mecanismo de acción utilizado por estas enzimas se sabe que hidrolizan el xilano rompiendo los enlaces glucosídicos mediante un mecanismo catalítico de inversión o retención, en el que el carbono (C) anomérico está invertido o conserva su configuración estereoquímica, respectivamente (Lombard *et al.* 2014). En aquellas xilanasas que catalizan la hidrólisis del xilano con retención de la configuración anomérica, están implicados dos residuos de glutamato (Glu) del sitio catalítico (Motta *et al.* 2013) y un mecanismo de doble desplazamiento, con formación de un intermediario α -glicosil y un iónoxo-carbonium de la enzima (Fig. 4) (Bhardwaj *et al.* 2019; Motta *et al.* 2013). Un grupo ácido carboxílico del Glu actúa como catalizador ácido, protonando el sustrato mientras que el segundo grupo realiza un ataque nucleofílico, que da como resultado la formación del intermedio α -glicosil de la enzima (inversión de β a α) (Motta *et al.* 2013; Bhardwaj *et al.* 2019). Enseguida, un grupo carboxilato actúa como una base extrayendo un protón de una molécula de agua nucleofílica que ataca al C anomérico, dando como resultado un nuevo cambio en la configuración del C (inversión de α a β), a través de un estado de transición de oxo-carbonium de la enzima (Fig. 4 A, Fig. 5) (Motta *et al.* 2013; Collins *et al.* 2005; Lombard *et al.* 2014).

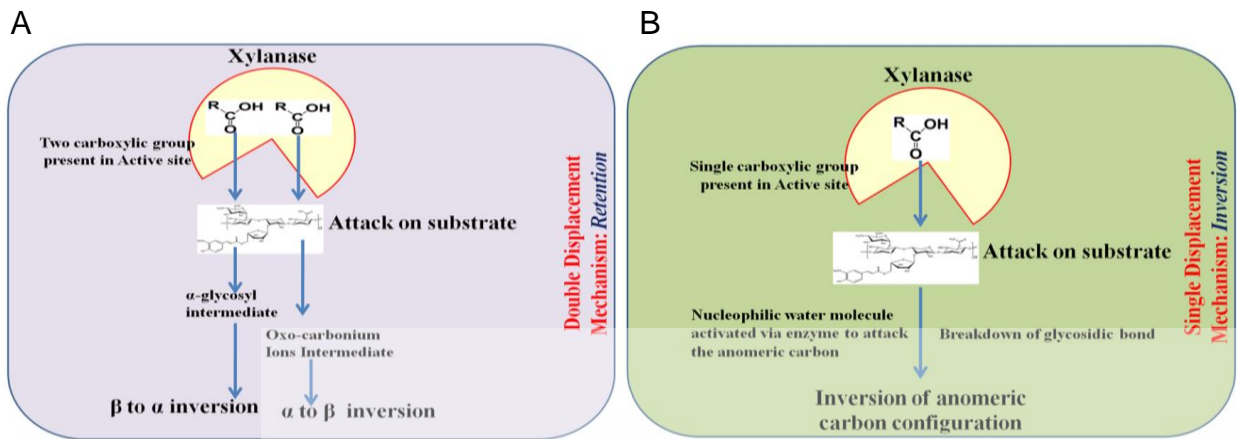


Figura 4. (A) Mecanismo de acción de las xilanasas con doble desplazamiento y con retención del C anomérico, característico de las familias GH 5, 7, 10 y 11; (B) Mecanismo de acción de las xilanasas con inversión del C anomérico, característico de las enzimas pertenecientes a las familias GH 8 y 43 (Bhardwaj *et al.* 2019).

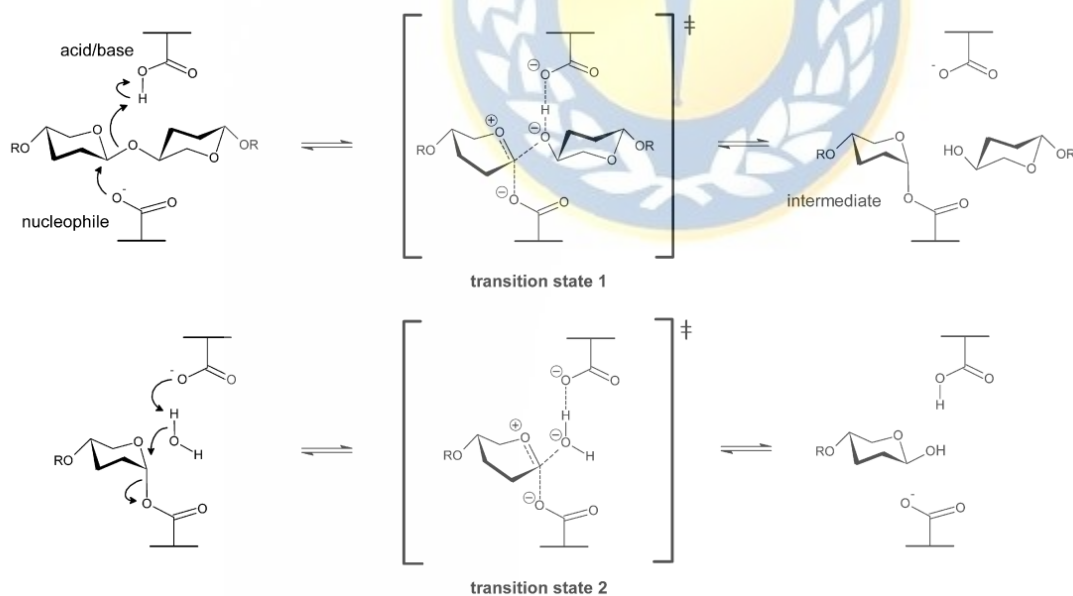


Figura 5. Modelo hipotético del mecanismo catalítico de las xilanasas que actúan con doble desplazamiento y retención de la configuración del C anomérico (Heinen *et al.* 2017).

En el mecanismo de acción de xilanasas con inversión del C anomérico participan residuos de Glu y aspartato (Asp) del sitio catalítico (Collins *et al.* 2005; Bhardwaj *et al.* 2019). En este mecanismo de acción hay un desplazamiento único, en donde solo un

grupo carboxilato actúa como catalizador ácido (Fig. 4 B) (Bhardwaj *et al.* 2019). Aquí la enzima también actúa sobre una molécula de agua nucleofílica que ataca el C anomérico, rompiendo el enlace glucosídico, con inversión en la configuración del C (Collins *et al.* 2005; Motta *et al.* 2013; Lombard *et al.* 2014).

3.2.-Familias de xilanasas

Las endo-1,4- β -xilanasas se han clasificado con base en al menos tres criterios: (1) peso molecular y punto isoeléctrico, (2) estructura cristalina y (3) propiedades catalíticas y cinéticas (Bhardwaj *et al.* 2019). Sin embargo, esta clasificación presenta problemas, ya que no siempre las xilanasas producidas por una variedad de organismos pueden agruparse con facilidad en una u otra categoría. Como un avance al sistema de clasificación Henrissat y Coutinho (2001) hicieron una clasificación que donde se incluye la estructura primaria, comparación del dominio catalítico con características mecánicas como la cinética, la propiedad catalítica, la especificidad del sustrato y la descripción del producto y colocaron las enzimas en familias que tienen secuencias relacionadas. La información disponible sobre estas enzimas se encuentra en Carbohydrate-active enzyme CAZY (<http://www.cazy.org/>), la cual es una base de datos actualizada periódicamente y contiene información genómica, estructural y funcional de estas enzimas como miembros de la familia de las glucohidrolasas (GH) (Motta *et al.* 2013).

Las familias que incluyen xilanasas en esta plataforma son las GH5, GH7, GH8, GH9, GH10, GH11, GH12, GH16, GH26, GH30, GH43, GH44, GH51, GH52, GH62, GH98, GH115, GH116, GH120 y GH140. De éstas, las enzimas que pertenecen a las familias GH 5,7,8,10,11 y 43 muestran un dominio catalítico distintivo y presentan actividad de endo-1,4- β -D-xilanasas, a diferencia de las enzimas pertenecientes a las familias GH 16,51 y 62 que muestran dos dominios catalíticos y por lo tanto son bifuncionales. El resto de las enzimas que se clasifican en las familias GH 9,12,26,30,44,98 y 115 tienen una actividad de xilanasas secundaria o residual, es decir que no rompen los enlaces β -1,4 del xilano, y pueden presentar actividad de endoglucanasa (Collins *et al.* 2005; Motta *et al.* 2013). Por otro lado, las xilanasas de las familias GH 5, 7, 8, 10, 11 y 43 difieren en sus propiedades fisicoquímicas, estructura, especificidad por sustrato y modo de acción (Taibi *et al.* 2012). Generalmente, su modo de acción da como resultado la liberación de productos con retención (familias GH 5, 7, 10 y 11) o

inversión (familias GH 8 y 43) de la configuración del C anomérico del sustrato (Collins *et al.* 2005; Motta *et al.* 2013; Heinen *et al.* 2017).

Basado en el análisis de agrupamiento hidrofóbico de los dominios catalíticos junto con estudios de similitudes de secuencias de aminoácidos, las xilanasas se han clasificado principalmente como GH 10 y GH 11 (Verma y Satyanarayana 2012). Las propiedades catalíticas de las familias GH 10 y GH 11 se han estudiado ampliamente porque estas enzimas tienen actividad de endo-1,4- β -xilanasas y son las responsables de hidrolizar la columna vertebral del xilano, por lo tanto son las que tienen un mayor interés industrial. Además, estas familias muestran una mayor eficiencia catalítica, un mayor rango de temperatura y pH de acción, y la mayoría de las xilanasas que provienen de microorganismos mesófilos o extremófilos producen xilanasas de estas familias (Basit *et al.* 2018 a).

La familia GH 10 consta de endo- β -D- 1,4-xilanasas (EC 3.2.1.8), endo-1,3- β -xilanasas (EC 3.2.1.32), tomatinasa (EC 3.2.1.-), xilano-endotransglicosilasa (EC2.4.2.-) y endo- β -1,4-glucanasa (EC 3.2.1.4) (Collins *et al.* 2005; CAZy), siendo las principales enzimas de esta familia las endo-1,4- β -D-xilanasas. Sin embargo, los estudios de especificidad de sustrato han revelado que éstas pueden no ser completamente específicas para el xilano y también pueden ser activas en sustratos de celulosa de baja masa molecular (Biely 2003; Srivastava *et al.* 2020). Los miembros de la familia GH10 pertenecen al clan GHA y tienen una estructura de pliegue en barril (α / β) 8 TIM, que es una estructura conservada en las proteínas, y se denomina TIM porque se descubrió por primera vez en una triosa fosfato-isomerasa. Esta estructura está formada por 8 láminas β y 8 α -hélices (Burton 2018), con bucles extendidos que crean una hendidura catalítica que contiene de cuatro a siete subsitios de unión a xilosa (Pollet *et al.* 2010) (Fig. 6). La mayoría de las enzimas de esta familia presenta un peso molecular superior a 30 kDa, pero hay estudios que muestran algunas con un bajo peso molecular (< 30 kDa), con un punto isoeléctrico (pI) generalmente alcalino, en un rango de 8,0-9,5 (Basit *et al.* 2018; Motta *et al.* 2013).

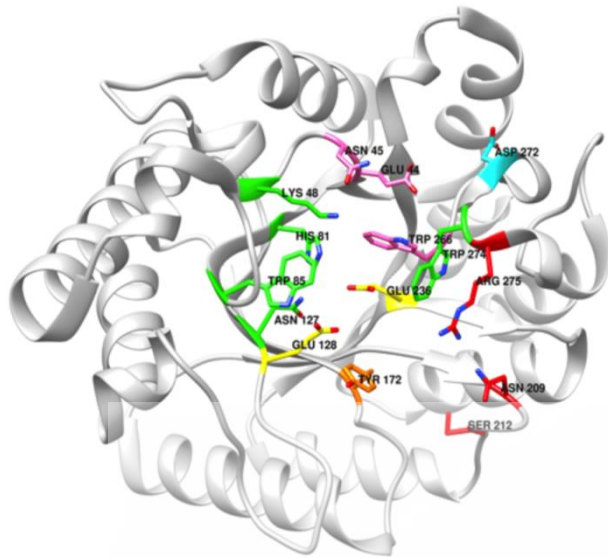


Figura 6. Estructura tridimensional característica de las xilanasas de la familia GH10 (Collins *et al.* 2005).

La familia GH11 consta sólo de enzimas endo- β -D-1,4-xilanasas (EC 3.2.1.8) y endo- β -1,3 xilanasas (EC 3.2.1.32). Los miembros de esta familia muestran monoespecificidad hacia su sustrato y actúan exclusivamente sobre sustratos que contienen D-xilosa, por lo que se consideran como "xilanasas verdaderas" (Collins *et al.* 2005). Las enzimas de esta familia pertenecen al clan GHC, tienen un peso molecular bajo (< 30 kDa) y valores de pI bajos (Alvarez-Cervantes *et al.* 2016). En comparación con las enzimas de la familia GH 10, esta familia tiene una menor versatilidad catalítica (Collins *et al.* 2005). Estas enzimas son más activas sobre xilooligosacáridos con mayor grado de polimerización. De hecho, se ha encontrado que tienen hendiduras de unión al sustrato más grandes que las xilanasas de mayor peso molecular (Biely *et al.* 1997; Shrinivas *et al.* 2010; Motta *et al.* 2013). La estructura tridimensional, compacta y globular, de esta familia se denomina β -jelly-roll (Fig.7). El sitio activo está en una hendidura larga que abarca toda la molécula, y en el medio de la hendidura hay un sitio catalítico compuesto por dos residuos de Glu que actúan como nucleófilo y catalizador ácido/base (Basit *et al.* 2018 a).

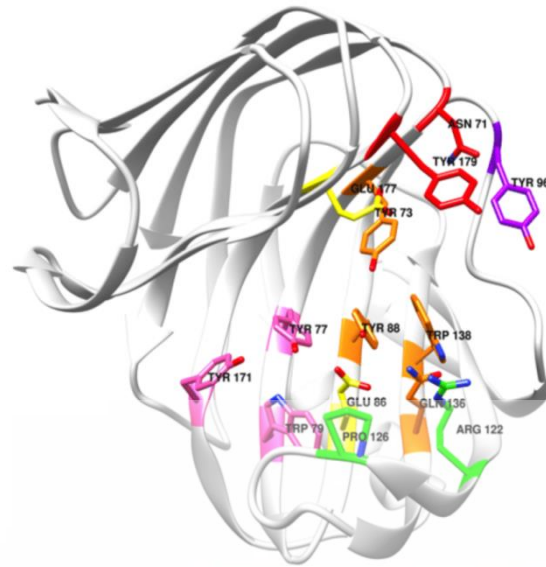


Figura 7. Estructura tridimensional característica de las xilanasas de la familia GH 11 (Collins *et al.* 2005).

4.- Xilanasas producidas por microorganismos termófilos

Los microorganismos de ambientes extremos pueden soportar temperaturas bajas o altas, elevadas concentraciones salinas y un rango de valores de pH extremos (2-11) (Bassit *et al.* 2018 a). Para muchas aplicaciones industriales, las altas temperaturas de trabajo en el rango de 60-90 °C, son de uso frecuente, así como también condiciones extremas de pH (Sani y Krishnaraj 2017). Por este motivo, disponer de catalizadores biológicos como xilanasas que puedan trabajar bajo estas exigentes condiciones es un desafío biotecnológico que debe incluir la búsqueda de microorganismos capaces de producir enzimas eficientes para su uso en condiciones extremas o que puedan ser manipulados para conseguir mejorarlos (los microorganismos y/o sus enzimas).

Existe una gran variedad de microorganismos productores de xilanasas, como hongos filamentosos, levaduras, bacterias, actinomicetos, entre otros. De estos microorganismos se han aislado algunos que son termófilos, los cuales crecen en una temperatura óptima de entre 50°C y 80°C, y están también los extremófilos o hipertermófilos que crecen en temperaturas superiores a 80°C (Kumar *et al.* 2018 b). Las xilanasas provenientes de estos microorganismos tienen gran importancia dado que se pueden utilizar en procesos industriales como el de pulpa y papel, procesamiento textil, producción de alimentos y raciones animales, biocombustibles, entre otros. La mayoría de estos procesos industriales se realizan a temperaturas altas

y rangos de pH extremos, por lo que obtener enzimas termoestables y estables en condiciones alcalinas o ácidas extremas a partir de microorganismos extremófilos es un área de investigación de gran interés desde el punto de vista de la tecnología enzimática (Bassit *et al.* 2018 a). En la Tabla 1 se muestra una lista de xilanasas que provienen de microorganismos termófilos e hipertermófilos y sus características cinéticas principales.



Tabla 1. Microorganismos termófilos e hipertermófilos productores de xilanasas termoestables. Se destacan en gris las xilanasas producidas por microorganismos hipertermófilos.

Fuente de	Especie	Familia GH	Temperatura óptima (°C)	pH óptimo	t _{1/2}	Referencia
Bacteria	<i>Clostridiumthermocellum</i>	10	60	n.i. ¹		(Leggio <i>et al.</i> 1999)
Bacteria	<i>Caldicellulosiruptor</i> sp.	10	75	6.6		(Ying <i>et al.</i> 2013)
Bacteria	<i>Bacillusstearothermphilus</i>	10	65	n.i.		(Abou-Hachem <i>et al.</i> 2003)
Bacteria	<i>Thermotogasp.</i>	10	105	6.2	90min a 95°C	(Wintherhalter <i>et al.</i> 1995).
Bacteria	<i>Caldicoproba</i> algeriensis.	11	70	11.0		(Ying <i>et al.</i> 2013)
Bacteria	<i>Dictyoglomu</i> sthermophilum	11	80 -85	n.i.		(Kumar <i>et al.</i> 2018)
Bacteria	<i>Microcella</i> alkaliphila	10	65	8.0		(Kuramochi <i>et al.</i> 2016)
Bacteria	<i>Planococcus</i> sp.	10	70	7.0		(Huang <i>et al.</i> 2015)
Bacteria	<i>Geobacillus</i> sp.	10	65	7.0	12 dias a 70°C	(Mitra <i>et al.</i> 2014)
Bacteria	<i>Actinomadura</i> sp.	11	80	10.0		(Bassit <i>et al.</i> 2018a)
Hongo	<i>Aspergillus niger</i>	11	50	5.0		(Zheng <i>et al.</i> 2013).
Hongo	<i>Paecilomyces</i> thermophila	11	75	7.0		(Fan <i>et al.</i> 2012).
hongo	<i>Talaromyces</i> thermophiles	n.i	50	n.i	60 min a 100°C	(Maleej <i>et al.</i> 2009)
Hongo	<i>Nonomuraea flexuosa</i>	11	80-85	n.i.		(Hakulinen <i>et al.</i> . 2003)
Hongo	<i>Malbranchea</i> cinnamomea	11	80	6.5		(Fan <i>et al.</i> 2014).
Hongo	<i>Thermomyces</i> lanuginosus	11	50-80	6.0	337 min a 70°C	(Bassit <i>et al.</i> , 2018a).
Arquea	<i>Pyrodictium</i> abyssi	n.i.	95	6.0		(Andrade <i>et al.</i> 2001).
Arquea	<i>Sulfolobus</i> solfataricus	12	95	3.0		(Maurelli <i>et al.</i> 2008).
Arquea	<i>Thermococcus</i> zilligi	n.i.	75	6.0		(Uhl y Daniel. 1999)
Arquea	<i>Thermofillum</i> sp	3	95	3.5		(Li <i>et al.</i> 2012)

¹n.i.: No informado.

4.1.- Importancia de xilanasas termoestables

La termoestabilidad de las enzimas es una característica que se requiere en las industrias para sus diferentes procesos. Por lo tanto, mejorar esta característica en las xilanasas es primordial, y una manera de lograr esto es mediante la ingeniería de enzimas, la cual permite mejorar la actividad y la estabilidad de una enzima existente o diseñar una nueva enzima con determinadas propiedades (Singh *et al.* 2017).

La mayoría de las xilanasas producidas por microorganismos termófilos pertenecen a las familias GH 10 y GH 11 (Chadha *et al.* 2019). Las xilanasas provenientes de organismos mesófilos y termófilos son similares según lo indicado por estudios de mutagénesis, análisis de estructura cristalina y estudios de alineación de secuencias (Kumar *et al.* 2018 b). La elevada termoestabilidad de las xilanasas, estaría más relacionada con modificaciones estructurales menores en la cantidad de puentes de hidrógeno y salinos, residuos superficiales cargados, elevado empaquetamiento interno, e introducción de puentes disulfuro, principalmente en los extremos C- o N-terminales o en regiones de α -hélice (Kumar *et al.* 2018 b).

En general, la estabilidad de las enzimas a altas temperaturas es el resultado de interacciones intermoleculares e intramoleculares (como enlaces puente de hidrógeno y disulfuro), interacciones con unidades de unión a carbohidratos y extremos C- y N-terminales estabilizados (Basit *et al.* 2018 a). A través de estas interacciones, la región N-terminal aumenta la estabilidad conformacional y previene la desestabilización de proteínas a temperaturas más altas (Cheng *et al.* 2014). Dado que las regiones terminales de las proteínas son generalmente más flexibles que otras partes de la estructura, una mayor flexibilidad terminal puede mejorar el proceso de desnaturalización y promover la agregación irreversible (Basit *et al.* 2018 a). Por lo tanto, la formación de un enlace disulfuro aumenta el pKa superficial y los enlaces de hidrógeno para estabilizar la estructura aleatoria N-terminal, que son los determinantes clave para la actividad catalítica en condiciones de alta temperatura y también elevado pH (Boonyapakron *et al.* 2017).

Las xilanasas termotolerantes son requeridas para un bioprocesamiento óptimo en las industrias de pulpa y papel y en las biorrefinerías, donde las materias primas se someten a un pretratamiento inicial a temperaturas elevadas. Como resultado, el uso de enzimas termoestables elimina la necesidad de enfriar el sistema antes de la adición del biocatalizador, ahorrando así cantidades significativas de tiempo y energía (Kumar

et al. 2016). Además, las temperaturas de operación más altas, en general, mejoran la solubilidad del sustrato y del producto, minimizan la resistencia a la difusión, y minimizan el riesgo de contaminación microbiana (Zarafeta *et al.* 2020).

Diversos estudios han demostrado resultados prometedores al utilizar ingeniería de enzimas para aumentar la termoestabilidad de las xilanasas. En la Tabla 2 se muestran algunos ejemplos de xilanasas modificadas por ingeniería de enzimas y los cambios producidos en su termoestabilidad.



Tabla 2. Técnicas de ingeniería de enzimas aplicadas para aumentar la termoestabilidad de xilanasas (modificada de Kumar *et al.* 2018).

Fuente de xilanasas	Nombre de xilanasas	Familia GH	Técnica aplicada	Efecto producido	Referencias
<i>Penicillium canescens</i>	PcXylA	GH10	Mutagenesis sitio-dirigida.	Aumento de $t_{1/2}$ entre 2-2,5 veces a 50 -60°C	(Denisenko <i>et al.</i> 2017)
<i>Thermoascus aurantiacus</i> CBMAI 756	XynA	GH10	Mutagenesis sitio-dirigida	Aumento de termoestabilidad de 1,8-2,5 veces a 70°C y de 2,6-2,8 a 75°C	(De Souza <i>et al.</i> 2016).
<i>Orpinomyces</i> sp. PC-2	Endo- β -1,4-xilanasas	GH11	Evolución dirigida mediante PCR propensa a errores	Aumento $t_{1/2}$ a 209, 33,2, 401 y 15,3 min a 60°C para los mutantes M1, M2, M3 y M4, respectivamente, respecto al tipo salvaje, con $t_{1/2}$ de 7,92 min a 60°C	(Mattos <i>et al.</i> 2012).
<i>Trichoderma reesei</i>	Xyn 2	GH11	Introducción de dos enlaces disulfuro mediante mutagénesis dirigida	Aumento de 2,5-1,8 veces en $t_{1/2}$ a 60 °C	(Tanget <i>et al.</i> 2017).
<i>Orpinomyces</i> sp. PC-2		GH11	Eliminación de 27 residuos de aminoácidos del N-terminal.	Promueve una mayor termoestabilidad y actividad enzimática.	(Zandonade <i>et al.</i> 2018).
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	XynA	GH11	PCR propensa a errores.	71% actividad residual a 80°C durante 60 min	(Stephens <i>et al.</i> 2007)

5.-Xilanasas recombinantes

La rentabilidad, la facilidad de uso y el cuidado con el medio ambiente son factores que justifican el uso de las enzimas como biocatalizadores en procesos industriales. Para cumplir con ciertos requisitos industriales, una xilanasas ideal debe tener propiedades específicas, como estabilidad en una amplia gama de valores de pH y temperaturas, alta actividad catalítica, especificidad por el sustrato y resistencia a iones metálicos y a reactivos químicos. Sin embargo, la mayoría de las xilanasas reportadas no poseen todas estas características fisicoquímicas y funcionales requeridas por las industrias. Además, las enzimas producidas de forma natural no son suficientes para abastecer la demanda, debido principalmente a los bajos rendimientos y la incompatibilidad de los procesos de fermentación industrial estándar (Motta *et al.* 2013). Muchas veces, los microorganismos productores de las enzimas de interés son muy exigentes en cuanto a condiciones de fermentación u otras veces no es posible cultivarlos en el laboratorio por tratarse de extremófilos. En todos estos casos, se utilizan diferentes enfoques biotecnológicos para mejorar el rendimiento e impartir propiedades características a la enzima deseada. Estos enfoques muchas veces implican manipulación genética como mutagénesis dirigida y tecnologías de ADN recombinante (Bhardwaj *et al.* 2019).

Escherichia coli es el organismo procarionta más utilizado para expresar proteínas recombinantes. Este huésped, como plataforma de expresión recombinante, tiene múltiples ventajas, tales como un rápido crecimiento en medios nutritivos de bajo costo, técnicas simples requeridas para su transformación, fácil aislamiento y purificación de las enzimas expresadas (Basit *et al.* 2018 a). Sin embargo, *E. coli* no proporciona una expresión heteróloga eficaz y funcional de muchas xilanasas (Heinen *et al.* 2017), lo que puede deberse a la aparición repetitiva de codones raros y al requisito de modificaciones de traducción específicas (formación de enlaces disulfuro y glicosilación). Otro de los problemas importantes asociados con *E. coli* es la presencia de endotoxinas (lipopolisacáridos) que hacen que el proceso de purificación de proteínas sea tedioso (Bhardwaj *et al.* 2019). Mhiri y colaboradores (2020) realizaron expresión heteróloga de una xilanasas GH 10 XynBCA, proveniente de la bacteria Gram (+) termófila *Caldicoprobacter algeriensis* en *E.coli* BL21, y los resultados obtenidos mostraron que la enzima se producía libre de celulasas, era activa en un amplio rango de pH (3-10), con un pH óptimo a 6,5 y una temperatura óptima de 80°C. Los autores realizaron además un tratamiento de bioblanqueo con la enzima recombinante y

demonstraron que el tratamiento mejoraba la calidad del papel y a su vez disminuía el uso de reactivos químicos (Mhiri *et al.* 2020).

Las levaduras también se utilizan para expresar proteínas de manera heteróloga debido a que son muy atractivas por la capacidad que tienen para realizar modificaciones post-traduccionales y para crecer a elevadas densidades celulares, con la capacidad de secretar enzimas en el sistema de fermentación (Bhardwaj *et al.* 2019). Una levadura de gran interés como sistema de expresión es *Pichia pastoris*, ya que puede crecer a densidades celulares muy altas, heredar promotores fuertes y estrictamente regulados y producir altos títulos de proteína recombinante (g/L), tanto de forma intracelular como extracelular (Ahmad *et al.* 2014). Basit y colaboradores (2018 b) llevaron a cabo la clonación de dos genes de xilanasa GH11, MYCTH_56237 y MYCTH_49824, del hongo termófilo *Myceliophthora thermophila* y los expresaron en *P. pastoris*. Los resultados demostraron que las xilanasas recombinantes tenían estabilidad en condiciones extremas de pH y temperatura, y una alta eficiencia para la sacarificación de biomasa.

Los hongos filamentosos se pueden usar de manera eficiente para la expresión de genes heterólogos y homólogos, lo que da como resultado un alto rendimiento de productos génicos recombinantes (Nevalainen *et al.* 2018). La aplicación de hongos como sistema de expresión también tiene ventajas asociadas con la rentabilidad del proceso general debido a los sustratos de bajo costo utilizados y al procesamiento posterior. Además, los hongos ya se han sometido a muchos procedimientos de mejoramiento de cepas para incrementar la producción de xilanasas. Por lo tanto, la maquinaria de expresión de xilanasas nativas se puede usar de manera eficiente para la expresión funcional de genes de xilanasas exógenos (Bardhwaj *et al.* 2019). A pesar de los beneficios que tienen los hongos filamentosos, la mayor producción de xilanasas recombinantes para la aplicación industrial en el último tiempo se realiza mediante el uso de bacterias o levaduras, como son *E.coli* y *P.pastoris*, respectivamente, como sistemas de expresión.

En la Tabla 3 se muestran algunos estudios de producción de xilanasas recombinantes con el área de la potencial aplicación industrial.

Tabla 3. Estudios de xilanasas recombinantes con su posible aplicación industrial.

Fuente de xilanasas	Huésped	Nombre de xilanasas	Familia GH	Características de la xilanasas recombinante	Potencial aplicación industrial	Referencia
<i>Thermoanaerobacterium sp.</i>	<i>E.coli</i>	XynDZ5 *	GH 10	Tolerancia a altas temperaturas (65-75°C) y pH 7,5	Preblanqueo enzimático de la pulpa.	(Zarafeta <i>et al.</i> 2020).
<i>Bacillus subtilis</i> RTS	<i>E.coli</i> BL21	pET21c-xyn	GH 11	t _{1/2} 30 min a 60°C, pH 6,5. Tolerancia a iones metálicos, detergentes no iónicos y disolventes orgánicos.	Biocombustibles.	(Saleem <i>et al.</i> 2021).
<i>Aspergillus oryzae</i> VTCC-F187	<i>A.niger</i> VTCC-F017	G2	GH 11	Actividad óptima a 55 °C y pH 6,5. Iones como K ⁺ y EDTA aumentaron ligeramente la actividad. La xilanasas recombinante fue inhibida por Tween 20, SDS, iones de metales pesados como Ag ⁺ y Hg ²⁺ , y disolventes orgánicos.	Alimentación avícola.	(Tuyen <i>et al.</i> 2021)
<i>Caldicoprobacter algeriensis</i>	<i>E.coli</i> BL21	XynBCA	GH 10	t _{1/2} 20 min a 80°C, activa en rangos de pH 3-10, con un óptimo de 6,5. Producida libre de celulasas.	Industria de bioblanqueo de pulpa.	(Mhiri <i>et al.</i> 2020).
Suelo salino	<i>P.pastoris</i>	Xyn11-1	GH 11	Resistencia combinada a altas concentraciones de sal y pH alto. Resistencia a etanol. T _{1/2} 30°C por 60 min.	Bioblanqueo y biopulpaje Producción de bioetanol.	(Wang <i>et al.</i> 2017).
<i>Myceliophthora thermophila</i>	<i>P.pastoris</i>	MYCTH_56 237 MYCTH_49 824	GH 11	Estabilidad en un rango de pH 2,0 – 9,0 y temperatura de hasta 70°C, con un óptimo de 60°C.	Producción de biocombustibles.	(Basit <i>et al.</i> 2018 b)
<i>Chaetomium sp</i>	<i>P.pastoris</i>	CsXynBop*	GH 10	Enzima termoestable con una temperatura óptima de 85°C y un pH de 6,5.	Industria cervecera dado que CsXynBop disminuye sustancialmente el tiempo de filtración y la viscosidad de la malta.	(Yu <i>et al.</i> 2021).

6.- Utilización de xilanasas en el tratamiento de materiales lignocelulósicos

En los últimos años, el interés por las xilanasas de microorganismos ha aumentado rápidamente y aún más por las xilanasas provenientes de microorganismos extremófilos, debido a su aplicación potencial en la bioconversión de materiales lignocelulósicos en productos de valor agregado, así como las aplicaciones tradicionales en las industrias de alimentos, farmacéutica, de pulpa y papel, textil y de biocombustibles (Heinen *et al.* 2017; Srivastava *et al.* 2020). Estas enzimas no solo hacen que el proceso sea ambientalmente favorable, sino que también juegan un papel importante en mejorar la productividad y reducir el costo de la generación del producto (Motta *et al.* 2013).

Industria de pulpa y papel

En la industria de la pulpa y papel, la eliminación de la lignina residual en la pulpa kraft se realiza mediante un proceso de blanqueo de varias etapas que utiliza compuestos de cloro. El efluente que sale de los procesos de blanqueo de pulpa contiene lignina clorada e intermediarios polifenólicos degradados como una fuente importante de contaminación ambiental (Raj *et al.* 2014; Haq *et al.* 2017). Por lo tanto, el desarrollo de un proceso de blanqueo alternativo para reducir el consumo de compuestos de cloro es necesario para resolver el problema. Los métodos de bioblanqueo, que implican el tratamiento previo de la pulpa con enzimas microbianas como las xilanasas, han surgido como opciones viables (Kumar *et al.* 2017). Hasta ahora, el pretratamiento de pulpa con xilanasas ha sido reconocido como una tecnología respetuosa con el medio ambiente y económicamente viable para las industrias del papel. La pulpa producida durante el proceso de fabricación de pasta kraft en rangos de temperatura y pH elevados requiere de enzimas xilanasas termoestables y alcalinas para esta finalidad (Raj *et al.* 2018).

Raj y colaboradores (2018), realizaron un estudio de producción y caracterización de xilanasas de la bacteria Gram (+) alcalófila *Bacillus licheniformis* Alk-1, aislada de un suelo contaminado con efluentes de la industria de pulpa y papel. La enzima purificada de esta bacteria mostró una actividad óptima a pH 9,0 y temperatura de 60°C. Se probó además la actividad enzimática en el pretratamiento de pulpa kraft de eucalipto, para determinar el potencial de aplicación industrial en esta área (Tabla 4) y se realizó una

microscopía electrónica de barrido (SEM) para determinar el efecto del tratamiento enzimático sobre la morfología de las fibras de la pulpa (Figura 8).

Tabla 4. Efecto del pre-tratamiento con xilanasadeuna pulpa kraft de eucalipto sin blanquear (Raj *et al.* 2018)

Parámetros	Control	Pretratada*
Número Kappa	13,7 ±0,3	11,1±0,2
Azúcares reductores	102±3,05	403±5,03
A _{237nm}	0,460±0,051	1,560±0,105
A _{465nm}	0,080±0,010	0,220±0,051
Reducción N° Kappa (%)	-	19%

*Se realizó un pretratamiento de pulpa con xilanasasa en condiciones optimizadas (dosis de enzima 20 UI/g de pulpa secada al horno, consistencia de pulpa 10% a pH 9,0 y 60 °C durante 2 h).

El pretratamiento de la pulpa con xilanasasa en condiciones optimizadas condujo a una reducción significativa del número Kappa (19%) y liberó 4,0, 3,9 y 3,4 veces más de azúcares reductores, compuestos fenólicos (A_{237nm}) y compuestos hidrofóbicos (A_{465nm}), respectivamente, en comparación con el control (Raj *et al.* 2018). Estos efectos son fenómenos interrelacionados y pueden correlacionarse con la disociación del complejo lignina-carbohidrato desde las fibras de la pulpa (Khandeparkar y Bhosle. 2007). Los resultados aquí obtenidos son similares a los obtenidos en Kumar y colaboradores (2018 a), donde también se observó una disminución en el número Kappa, cuando la pulpa fue tratada con xilanasas. Los análisis por SEM mostraron claramente cambios morfológicos en las superficies de las fibras después del tratamiento con xilanasasa (Fig. 8). Además, las fibras de la pulpa tratada con enzimas mostraron pérdida de compacidad, y este cambio en la superficie de la pulpa tratada con enzima se correlacionó con la acción de la xilanasasa. La observación de la pérdida de compacidad de las fibras de pulpa en el presente estudio puede hacerlas más susceptibles al blanqueo químico.

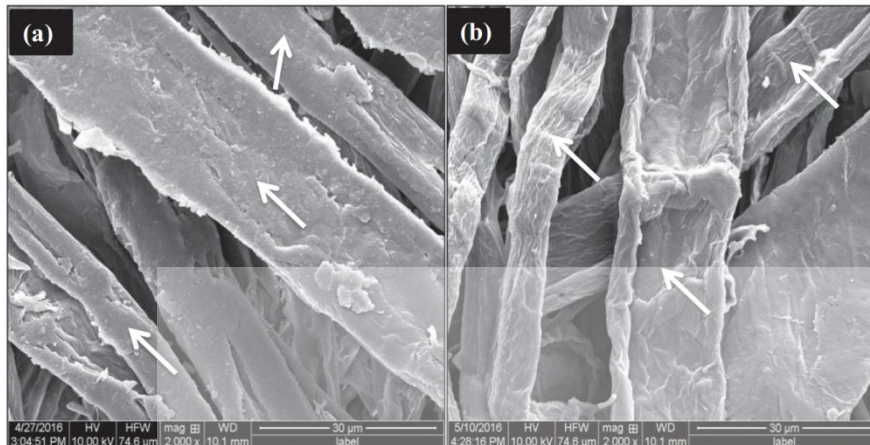


Figura 8. Imagen SEM de la pulpa sin tratar (a) y tratada con xilanasa (b) después de la etapa final del blanqueo (aumento 2000x). La flecha indica las superficies lisas (a) y rugosas (b) en la pulpa (Raj *et al.* 2018).

Angural y colaboradores (2021), realizaron un estudio para mejorar el blanqueo de la pulpa de madera, utilizando un co-cultivo de dos microorganismos alcalófilos productores de xilanasas y mananasas. Los microorganismos utilizados fueron *Bacillus* sp. NG-27, productor de una xilanasas con una temperatura y pH óptimos de 70°C y 8,4, respectivamente; y *B. nealsonii* PN-11, productor de una mananasas con una temperatura y pH óptimos de 65°C y 8,8, respectivamente. Los autores realizaron un estudio con las enzimas purificadas para evaluar su actividad y posteriormente aplicaron las enzimas en el tratamiento de blanqueo en la pulpa. En este estudio hubo una reducción del 45,64% del número Kappa, un aumento del 11% de brillo del papel y un aumento de 75% en la blancura del papel. Los autores también demostraron que utilizando la mezcla de enzimas se puede obtener la misma calidad del papel que se fabrica a partir de la pulpa tratada con productos químicos, pero con un 30% menos de uso de cloro. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que el uso de un cóctel de enzimas, xilanasas-mananasas, es más eficiente que los métodos convencionales.

Otra aplicación que tienen las xilanasas en la industria de pulpa y papel es en el destintado de papel para reciclaje, la cual consiste en remover la tinta de los residuos de papel usado para poder ser reciclado y reutilizado (Bardwaj *et al.* 2019). En este contexto, Liu y colaboradores (2021), caracterizaron una nueva xilanasas (Pg-Xyn) recombinante expresada en *E.coli*. Esta nueva xilanasas pertenece a la familia GH 10,

proveniente de la bacteria psicotolerante *Planomicrobium glaciei* CHR43 aislada de una región fría desértica y que presenta una actividad óptima a 80°C y pH 9,0. Los autores realizaron un ensayo de destintado enzimático para evaluar la actividad de Pg-Xyn y se obtuvo como resultado que esta enzima tiene una actividad de destintado del 298%, lo que es superior al 239% producido por una xilanasa purificada de *Bacillus* sp. CKBx1D. Las xilanasas pueden provocar un aumento de la hidrofobicidad relativa de la superficie del papel y con ello facilitar la separación de las partículas de tinta adsorbidas (Liu *et al.* 2021).

Industria de biocombustibles.

La conversión eficiente de biomasa lignocelulósica en etanol de grado combustible se ha convertido en una prioridad mundial para producir energía renovable y amigable con el medio ambiente. El proceso de bioconversión de la biomasa lignocelulósica requiere la hidrólisis de la biomasa pretratada para la conversión de los carbohidratos complejos en monómeros simples que se convertirán posteriormente en etanol por fermentación (Bhardwaj *et al.* 2019). La degradación enzimática del xilano de la biomasa genera productos que son de gran interés biotecnológico, donde destacan el bioetanol y los xilooligosacáridos (Veiga *et al.* 2020).

Veiga y colaboradores (2020), utilizaron una xilanasa GH10 (Tc Xyn10A), proveniente de la bacteria Gram (-) aeróbica *Thermobacillus composti*, termotolerante, aislada de un reactor de compostaje. Esta enzima es halotolerante y tiene una actividad óptima en un rango de pH de 6-8 y una temperatura óptima de 50°C. La enzima libera una gran cantidad de xilooligosacáridos 29,09% desde el glucoroxilano de madera de haya y 16,98% desde el arabinoxilano de centeno, lo que significa que esta enzima puede contribuir al desarrollo de tecnologías de combustibles renovables.

Aftab *et al.* (2018) realizaron un estudio donde se evaluó el potencial de sacarificación de la enzima xilanasa de *B. licheniformis* en *E. coli* BL21 (DE3) frente a la biomasa vegetal para la producción de bioetanol. Se estudió la expresión del gen clonado y se optimizaron las condiciones para su producción a gran escala. La xilanasa recombinante tiene la capacidad de descomponer el xilano de la madera de abedul para liberar xilosa, así como el potencial para tratar la biomasa vegetal, como paja de trigo, paja de arroz y bagazo de caña de azúcar. La capacidad de sacarificación de esta enzima se optimizó mediante el estudio de varios parámetros como pH, temperatura y

tiempo de incubación. El porcentaje máximo de sacarificación (84%) se logró cuando se utilizaron 20 μ de xilanasa recombinante con 8% de bagazo de caña de azúcar a 50 °C después de 6 horas de incubación en agitación. Los resultados indicaron que la bioconversión de biomasa natural por xilanasa recombinante en azúcares simples se puede utilizar para la producción de biocombustible (bioetanol) (Aftab *et al.* 2018). Este proceso puede reemplazar el uso de combustibles fósiles y el uso de bioetanol puede reducir significativamente la emisión de gases tóxicos.

7.- Proyecciones futuras.

La búsqueda de xilanasas que cumplan con todas las características deseadas para su aplicación en la industria todavía está en continuo desarrollo, por lo tanto, la selección de nuevas fuentes microbianas con la capacidad de producir xilanasas altamente activas y estables se está llevando a cabo por diferentes grupos de investigación en el mundo. Las cepas aisladas de diferentes hábitats extremos pueden tener aplicaciones potenciales, ya que estas cepas poseen la capacidad natural de soportar diferentes tipos de estrés, como condiciones extremas de temperatura y pH, lo que las hace de interés para diferentes procesos industriales (Bhardwaj *et al.* 2019).

El avance en las herramientas y técnicas biotecnológicas (tecnología de ADN recombinante, ingeniería genética, ingeniería de proteínas, entre otras) brinda la oportunidad de seleccionar el gen responsable de la producción de xilanasas, que se puede aislar y transferir de manera eficiente a un sistema de expresión apropiado. Estos sistemas de expresión se pueden regular para mejorar la producción de xilanasas con la propiedad deseada para aplicaciones industriales específicas, como por ejemplo la termoestabilidad. La disponibilidad de una gran cantidad de datos genómicos, proteómicos y metabolómicos se puede utilizar a través de diferentes herramientas bioinformáticas para desarrollar diferentes enfoques para mejorar la producción de xilanasas termoestables (Fig. 9). A través de la combinación de nuevos enfoques, como la biología sintética y la tecnología de ADN recombinante convencional, se podrán obtener nuevas xilanasas con las características deseadas.

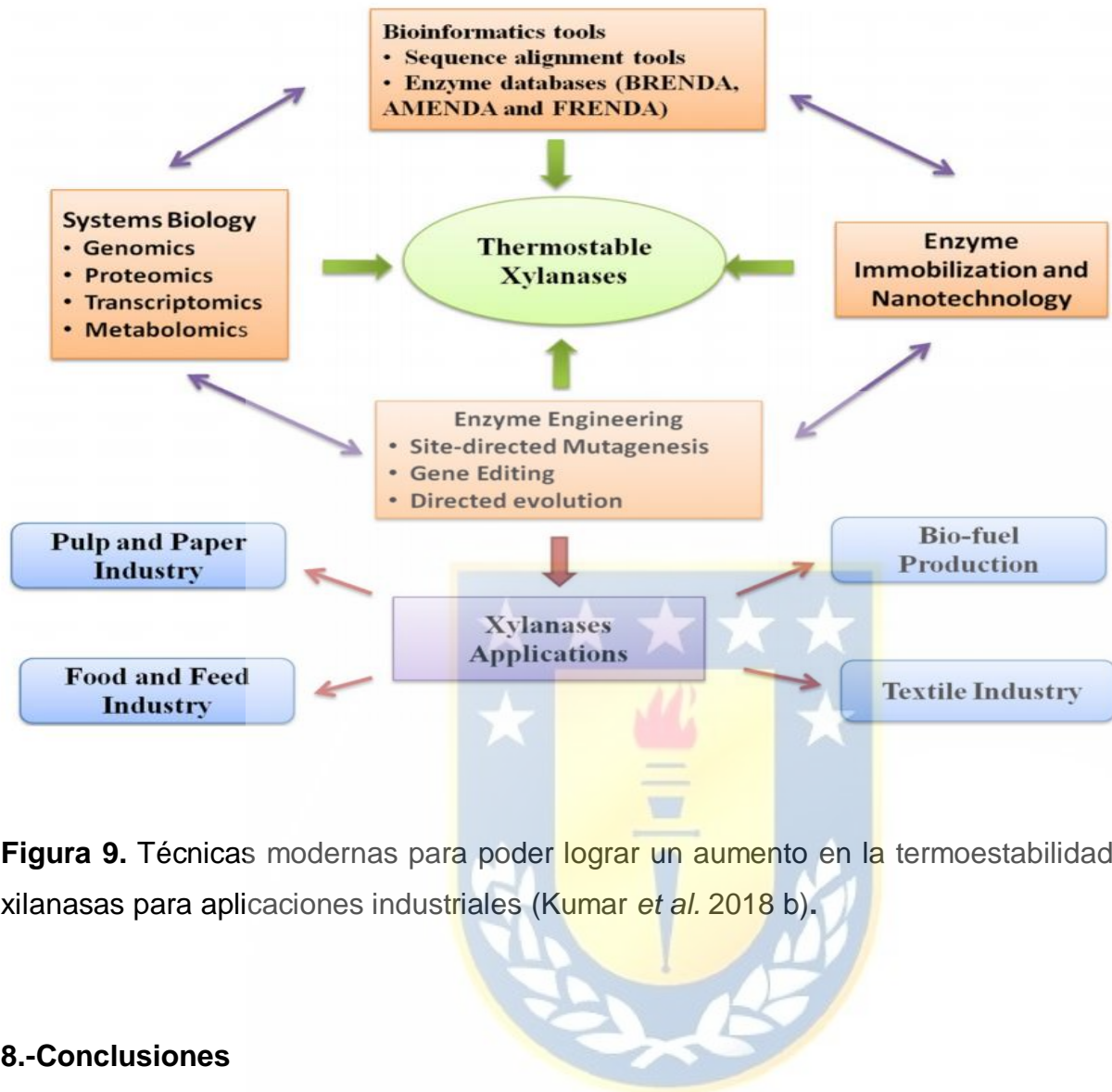


Figura 9. Técnicas modernas para poder lograr un aumento en la termoestabilidad de xilanasas para aplicaciones industriales (Kumar *et al.* 2018 b).

8.-Conclusiones

- Las endo-1,4- β -xilanasas, son producidas por una gran diversidad de microorganismos; éstas pertenecen a la familia de las glucohidrolasas (GH), y son de gran importancia ya que son las encargadas de degradar el xilano, en los azúcares que lo componen. Aunque existe una variedad de enzimas pertenecientes al sistema xilanólico microbiano, las únicas que atacan de manera exclusiva el xilano son las xilanasas que pertenecen a las familias GH10 y GH11.

- La búsqueda de xilanasas en microorganismos termófilos e hipertermófilos es un área de investigación de interés creciente, ya que éstos son fuente de proteínas con características inusuales en mesófilos, como son la elevada termoestabilidad y eficiencia en pH extremos, propiedades muy requeridas cuando la finalidad de la enzima será su aplicación en procesos industriales.

-Cuando las xilanasas no tienen las características requeridas para su aplicación industrial, se recurre a las herramientas biotecnológicas para potenciarlas, y además

con la ayuda de la tecnología del ADN recombinante es posible producir xilanasas de forma eficiente usando el sistema de expresión apropiado.

- La producción heteróloga de xilanasas recombinantes ha sido un gran aporte biotecnológico, debido a que las nuevas xilanasas producidas tienen mejores características que las xilanasas nativas y por lo tanto su aplicación en diversas áreas industriales ha significado un aumento de eficiencia en los procesos.

- El futuro de las xilanasas es prometedor dado a su utilidad en diversas industrias, como la textil, alimentaria, raciones animales, biocombustibles, celulosa y papel; ya que con su uso no solo se optimizan los procesos, sino que también se consigue una reducción en la generación de residuos o efluentes contaminantes.



9.- Bibliografía

- Abou-Hachem M, Olsson F, Nordberg E (2003) Probing the stability of the modular family 10 xylanase from *Rhodothermus marinus*. *Extremophiles* **7**:483-491
- Aftab M, Zafar A, Iqball, KaleemA, Zia K, Awan A (2018) Optimization of saccharification potential of recombinant xylanase from *Bacillus lichenniformis*. *Bioengineered* **9**:159-165
- Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H (2014) Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *App.Microbiol.Biotechnol.***98**:5301-5317
- Alvarez- Cervantes J, Díaz-Godínez G, Díaz G, Mercado Y, Kumar V, Anducho M (2016) Phylogenetic analysis of β -xylanase SRXL₁ OF *Sporisorium reilianum* and its relationship with families (GH10 and GH 11) of Ascomycetes and Basidiomycetes. *SciRep* **6**:1-9
- Andrade C, Bucker W and Antranikian G (2001) Physiological aspects involved in production of xylanolytic enzymes by deep-sea Hyperthermophilic archaeon *Pyrodictium abyssi*. *Biotechnol.Appl.Biochem* **91**:655-669
- Angural S, Bala I, Kumar A, Kumar D, Jassal S, Gupta N (2021) Bleachenhancement of mixed wood pulp by mixture of thermo-alkali-stable xylanase and mannanase derived through co-culturing of Alkalophilic *Bacillus sp.* NG-27 and *Bacillus nealsonii* PN-11. *Helyion* **7**: 1-10
- Avgerinos GC, Wang D (1983) Selective solvent delignification for fermentation enhancement. *Biotechnol. Bioeng.***25**:67-83
- Badiyan S, Bevan D, Zhang C (2011) Study and design of stability in GH5 cellulases. *Biotechnol.Bioeng* **109**:31-34
- Bajpai P (2009) Xylanases. *Encyclopedia of Microbiolofy* **3**:600-612
- Bajpai P (2014) Charpter 3- Microbial Xylanolytic Systems and Their Properties. *Xylanotic Enzymes*. 19-36 pp
- Bajpai P (2016) Charpter 4: Pretreatment of lignocellulosic Biomasss. *Pretreatment of lignocellulosic biomass for Biofuel Production*. 17-70 pp.

- Bajpai P (2020) Chapter4: Biomass composition. Biomass to Energy Conversion Technologies. 31- 40 pp.
- Basit A, Liu J, Rahim K, Jiang W, Lou H (2018 a) Thermophilic xylanases: from bench to bottle. Crit. Rev. Biotechnol. **38**: 1-15
- Basit A, Liu J, Miao T, Zheng F, Rahim K, Lou H, Jiang W (2018 b) Characterization of two endo- β -1,4 xylanase from *Myceliphthora thermophila* and their saccharification efficiencies, synergistic with commercial cellulase. Front. Microbiol **9**:1-11
- Beg Q.K., Kapoor M, Mahajan L, Hoondal G.S (2001) Microbial xylanases and their industrial applications: a review. Appl. Microbiol. Biotechnol **56**: 326–338
- Bhardwaj N, Kumar B, Verma P (2019) A detailed overview of xylanases an emerging biomolecule for current and future prospective. BIOB **6**:1-36
- Biely P, Vrsanska M, Kluepfel M, Tenkanen M (1997) Endo- β -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. J. Biotechnol **57**:151-166
- Biely P (2003) Chapter 21. Diversity of microbial Endo- β - 1,4- xylanases. Applications of Enzymes to Lignocellulosics, 361-380 pp.
- Boonyapakorn K, Nimchua T, Champreda V, Jaruwat A, Kiwnaree B, Chitnumsub P (2017) Structure-based protein engineering for thermostable and alkaliphilic enhancement of endo- β -1,4-xylanase for applications in pulp bleaching. J. Biotechnol **259**: 95-102
- Burton Z (2018) Chapter 11- α/β Proteins. Evolution Since Coding. 33-43 pp.
- Carere C, Sparling R, Cicek N, Levin D (2008) Third Generation Biofuels via Direct Cellulose Fermentation. Int. J. Mol. Sci **9**:1342-1360
- Chadha BS, Kaur B, Basotra N, Tsang A, Pandey A (2019) Thermostable xylanases from thermophilic fungi and bacteria: Current Perspective. Bioresource. Technol **277**:195-203
- Chang V, Holtzapfel M (2000) Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. Biotechnol. Appl. Biochem **84**:5-37

Cheng YS, Chen CC, Huang Ch, Ko T, Luo W, Huang J, Liu J, Guo R, (2014) Structural analysis of a glycoside hydrolase family 11 xylanase from *Neocallimatis patriciarum* Insights into the molecular basis of a Thermophilic Enzyme. J. Biol. Chem **289**:11020-11028

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

Coughlan M, Hazlewood G (1993) Beta-1,4-D-xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. Biotechno. Appl. Biochem **17**:259-289

Demirbas A (2009). Biorefineries: For Biomass Upgrading Facilities. Springer-Verlag, London.

De Freitas C, Carmona E, Brienza M (2019) Xylooligosaccharides production process from lignocellulosic biomass and bioactive effects. Bioact.Carbohydr.Diet.Fibre **18**: 1-8

Denisenko Y, Gusakov A, Rhozhkova A, Zorov I, Osivop D, Yu V, Uporov I, Sinistsyn A (2017) Site-directed mutagenesis of GH10 xylanase A from *Penicillium canescens* for determining factors affecting the enzyme thermostability. Int. J. Biol. Macromol. **104**: 665-671

De Souza A, Araujo G, Franco F, Torres F, Mertens J, Bowman M, Gomez E, Da Silva R (2016) Engineering increased thermostability in the GH-10 endo-1,4- β -xylanase from *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756. Int. J. Biol. Macromol. **93**:20-26

Fan G, Katriola P, Jia H, Yang S, Yan Q, Jian Z (2012) High-level expression of a xylanase gene from the thermophilic fungus *Paecilomyces thermophila* in *Pichia pastoris*. Biotechnol. Lett. **34**:2043-2048

Fan G, Yang S, Yan Q, Guo Y, Li Y, Jia Z (2014) Characterización of a highly thermostable glycoside hydrolase family 10 xylanase from *Malbranchea cinnamomea*. Int. J. Biol. Macromol. **70**:482-489

Fan G, Yang S, York W, Albersheim P, Darvill A, Hayashi T, Joseleau J, Kato Y, Perez E, Maclachlan G, McNeil M (1993) An ambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. Physiol. Plant. **89**:1-3

- Garg S (2016) Xylanase: Applications in Biofuel Production. *Current Metabolomics* **4**:23-37
- Girio F, Fonseca C, Carvalheiro F, (2010) Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresour.Technol* **101**:4775-4800
- Hakulinen N, Turunen O, Janis J, Leisola M, Rouvinen J (2003) Three-dimensional structures of thermophilic beta-1.4 xylanases from *Chaetomium thermophilum* and *Nonomuraea flexuosa*. Comparison of twelve xylanases in relation to their thermal stability. *Eur J.ournal of Biochem.* **270**:1399-1412
- Haltrich D, Nidetzky B, Kulbe K, Steiner W, Zupancic S (1996) Production of fungal xylanases. *Bioresour.Technol* **58**: 137-161
- Haq I, Kumar S, Raj A, Lohani M, Satyabarayana G (2017) Genotoxicity assessment of pulp and paper mill effluent before and after bacterial degradation using *Allium cepa* test. *Chemosphere* **169**:642-650
- Heinen P, Betini J, Polizeli M LTM (2017). Xylanases. *Encyclopedia of Microbiology* **4**: 604-615
- Henrissat B, Coutinho P (2001) Classification of glycoside hydrolases and glycosyl transferases from hyperthermophiles. *MethodsEnzymol.***330**:183-203
- Huang X, Lin J, Ye X, Wang G (2015) Molecular characterization of a thermophilic and salt- and alkaline-tolerant xylanase from *Planococcus* sp. LS4, a strain from the sediment of a soda lake. *Micribiol.***5**:662-671
- Khandeparkar R, Bhosle N (2007) Application of thermo alkalophilic xylanase from *Arthrobacter* sp. MTCC5214 in biobleaching of Kraft pulp. *Bioresour. Techno***98**:897-903
- Kulkarni N, Shendye A, Rao M (1999) Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol* **23**: 411-456
- Kuramochi K, Uchimura K, Kurata A, Usami R, Hirose Y, Kobayashi T (2016) A high-molecular-weight, alkaline, and thermostable β -1,4-xylanase of a subseafloor *Microcella alkaliphila*. *Extremophiles* **4**:471-478

Kumar N, Rani M, Gunaseeli R, Kannan N (2018 a) Paper pulp modification and deinking efficiency of cellulase-xylanase complex from *Escherichia coli* SD5. International Int. J. Biol. Macromol. **111**:289-295

Kumar V, Kumar A, Shukla P (2018 b) Engineering Thermostable Microbial Xylanases Toward its industrial applications. Mol. Biotechnol **3**:226-235

Kumar S, Haq I, Prakash I, Kumar S, Mishra S, Raj A (2017) Purification, characterization and thermostability improvement of xylanase from *Bacillus amylobliquefaciens* and its application in pre-bleaching of kraft pulp. Biotech **7**:1-12

Kumar V, Baweja M, Singh P, Shukla P (2016) Recent Developments in Systems Biology and Metabolic Engineering of Plant–Microbe Interactions. Front. PlantSci. **7**:1-12

Le Y, Wang H (2014) High level soluble expression of a thermostable xylanase from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* in *Escherichia coli* via fusion with OsmY protein. ProteinExpr. Purif. **99**: 1-5

Leggio L, Kalogiannis K, Bhat K, Pickersgill W (1999) High Resolution Structure and sequence of *T. aurantiacus* xylanase I: Implications for the Evolution of Thermostability in Family 10 xylanase and Enzymes with $\beta\alpha$ -Barrel Architecture. Proteins: Structure, Functions and Genetics **36**:295-306

Li D, Li X, Dang W, Tran L, Park S, Oh B, Hong W, Lee J, Park K (2012) Characterization and application of an acidophilic and thermostable β -glucosidase from *Thermophilum pendens*. J. Biosci. Bioeng **5**:490-496

Liab K, Azadi P, Collins R, Eriksson K, Tolan J, Sunwoo J, (2000) Relationships between activities of xylanases and xylans structures. Enzyme Microb. Technol. **27**:89-94.

Liu Z, Shao T, Li Y, Wu B, Jia H, Hao N (2021) Expression, Characterization and Its Deinking Potential of a Thermostable Xylanase From *Planomicrobium glaciei* CHR43. Front. Bioeng Biotechnol. **9**: 1-9

Lombard V, Ramulu H, Drula E, Coutinho P, Henrissat B (2014) The carbohydrate-active enzymes database (CAZy). Nucleic Acids Res **42**:490-495

- Maalej I, Belhaj I, Fourati N, Belghith H (2009) Highly Thermostable xylanase of the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*: purification and characterization. *Biotechnol. Appl. Biochem* **158**:200-212
- Mattos L, Zandonade R, Tavares S, Silva F, Monteze V (2012) Thermostability improvement of *Orpinomyces* sp. Xylanase by directed evolution. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **81**, 12-18
- Maurelli L, Giovane A, Esposito A, Moracci M, Fiume I, Rossi M, Morana A (2008) Evidence that xylanase activity from *Sulfolobus solfataricus* O alpha is encoded by the endoglucanase precursor gene (sso1354) and characterization of the associated cellulase activity. *Extremophiles* **5**:689-700
- Mhiri S, Jemli S, Neifar S, Bejar S, Darenfed A, Bouacem K, Meezghani M, Ameri R (2020) A thermophilic and thermostable xylanases from *Caldicoprobacter algeriensis*: Recombinant expression characterization and application in paper biobleaching. *Int. J. Biol. Macromol.* **164**:808-817
- Mitra S, Mukhopadhyay B, Rahaman A, Prasad A, Chakrabarty K, Kanti G, Krishna P (2014) Cloning, overexpression, and characterization of a novel alkali-thermostable xylanase from *Geobacillus* sp. *J. Basic Microbiol.* **55**:527-537
- Motta L, Andrade CCP, Santana MHA (2013) Chapter 10: A review of xylanase production by the fermentation of xylan: Classification, characterization and applications. *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass- Techniques, Applications and Commercialization* 251-276 pp
- Nevalainen H, Curach N, Peterson R (2018) Overview of gene expression using filamentous fungi. *Curr. Protoc. Protein. Sci.* **92**: 1-10
- Peng F, Peng F, Xu F, Sun R (2012) Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. *Biotechnol. Adv* **30**:879-903
- Pollet A, Delcour J, Courtin C (2010) Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. *Crit. Rev. Biotechnol.* **30**:176-191

Raj A, Kumar S, Haql, Singh S (2014) Bioremediation and toxicity reduction in pulp and paper mill effluent by new lyisolated ligninolytic *Paenibacillus sp.* *Ecol.Eng.***71**:355-362

Raj A, Kumar S, Singh S, Prakash J (2018) Production and purification of xylanase from alkaliphilic *Bacillus licheniformis* and its pretreatment of eucalyptus kraft pulp. *ISBAB.*:199-209

Rowell M, Rogger P, Tshabalala M (2012) Charppter 3: Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites. *Cell Wall Chemistry.*3-70 pp

Saha B (2003) Hemicellulose bioconversion. *J IndMicrobiolBiotechnol* **30**:279-291

Saleem A, Tabassum R, Waris S, and Ahmed T (2021) Biochemical characterization and molecular docking of cloned xylanase gene from *Bacillus subtilis* RTS expressed in *E. coli*. *Int. J. Biol. Macromol.***168**: 310-321

Sani R, Rathinam N (2017) Extremophilic Enzymatic Processing of Lignocellulosic Feedstocks to Bioenergy. Springer International Publishing

SchellerH, Ulvskov P (2010) Hemicelluloses. *Rev. Plant Biol.***61**:263-289

Shrinivas D, Savitha G, Raviranjana K, Ramchandra G (2010) A Highly Thermostable Alkaline Cellulase-Free Xylanase from a Thermoalkalophilic *Bacillus sp.* JB Purification and Characterization. *Biotechnol. Appl. Biochem.***162**: 2049-2057

Singh P, Kumar V, Yadav R, and Shkla P (2017) Bioengineering for Microbial Inulinases: Trends and Applications. *Curr. ProteinPept.Sci.***18**:966-972

Srivastava N, Mishra P.K, Upadhyay S.N (2020) Charppter 6: Xylanases: For digestion of hemicellulose. *Industrial Enzymes for Biofuels Production*, 101-132pp

Stephens D, Rumbold K, Permaul K, Prior B, Singh S (2007) Directed evolution of the thermostable xylanase from *Thermomyces lanuginosus*. *J. Biotechnol.***127**:348-354

Taibi Z, Saoudi B, Boudelaa M, Trigui H, Belghith H, Gargouri A, Ladjama A (2012) Purification and Biochemical Characterization of a Highly Thermostable Xylanase from *Actinomadura sp.* strain Cpt20 Isolated from Poultry Compost. *Biotechnol. Appl. Biochem.***166**:663-679

Tang F, Cheng D, Yu B, Luo Y, Zheng P, Mao X, Yu J, He J (2017) Improving the thermostability of *Trichoderma reesei* Xylanase 2 by introducing disulfide bonds. *ElectronicJ.Biotechnol.***26**:52-59

Terret O, Dupree P (2019) Covalent interaction between lignin and hemicelluloses in plantsecondarycellwalls.COBIOT.. 97-104

Tuyen D, Cuong N, Thanh N, Thao N, Trung N (2021) Cloning, Expression, and Characterization of Xylanase G2 from *Aspergillus oryzae* VTCC-F187 in *Aspergillus niger* VTCC-F017.BioMed Res. Int. 1-9

Uhl M, Daniel M (1999) The first description of an archeal hemicellulase: the xylanase from *Thermococcus zilligii* strain AN1. *Extremophiles* **4**:363-367

Verma D, Satyanarayana T (2012) Molecular approaches for a meliorating microbial xylanases. *Bioresour. Technol.***117**:360-367

Veiga A, Pellegrinir V, Briganti L, Polikarpov I (2020) Transformation of xylan into value-added biocommodities using *Thermobacillus composti* GH10 xylanase. *Carbohydr. Polym.***247**:1-14

Wang J, Li Y, Wei Y, Liang J, Tian L (2021) Characterization of efficient xylanases from industrial-scale pulp and paper waste water treatment microbiota. *AMB express***11**:11-19

Winterhalter C, Heinrich P, Candussio A (1995) Identification of a novel cellulose-binding domain the multidomain 120kDa Xylanase Xyn A of the Hyperthermophilic bacterium *Thermotoga marítima*. *Mol.* **15**: 431-444

Wong K, Tan L, Saddler J (1988) Multiplicity of β -1,4-Xylanase in Microorganism: Functions and Applications.MMBR **52**: 305-317

Ying Y, Meng D, Chen X, Li F (2013) An extremely thermophilic anaerobic bacterium *Caldicellulosiruptor* sp. F32 exhibits distinctive properties in grow thand xylanases during xylan hydrolysis. *EnzymeMicrob. Technol.***53**:194-199

Yousuf A, Pirozzi D, Sannino F (2020) Charppter1: Fundamentals of lignocellulosic biomass. *Lignocellulosic Biomass to Liquid Biofuels*, AcademicPress 1-15pp.

Yu J, Liu X, Yan Q, Yan S, Guan L, Jiang Z (2021) High-level expression and enzymatic properties of a novel thermostable xylanase with high arabinoxylan degradation ability from *Chaetomium* sp. suitable for beer mashing. *Int. J. Biol. Macromol.* **168**:223-232

Zandonade R, Mattos L, dos Santos M (2018) Impact of the removal of N-terminal non-structured amino acids on activity and stability of xylanases from *Orpinomyces* sp. PC-2. *Int. J. Biol. Macromol.* **106**: 312-319

Zarafeta D, Leni M, Chegkazi M, Skretas G (2020) Xyn DZ5: A new Thermostable GH 10 Xylanase. *Front. Microbiol.* **11**:1-14

Zheng H, Guo B, Chen X (2011) Improvement of the quality of wheat bread by addition of glycoside hydrolase family 10 xylanases. *Applied, Microbiol. and Biotechnology* **90**: 509-515

Zheng J, Guo N, Wu L, Tian J, Zhou H (2013) Characterization and constitutive expression of a novel endo- β -D-xylanohydrolase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.* **35**: 1433-1440

