



Biotecnología



XYLANOLYTIC SYSTEM PROTEINS DESORPTION FROM *Aspergillus flavipes* FP-500 CULTURES WITH AGROWASTES

DESORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL SISTEMA XILANOLÍTICO DE *Aspergillus flavipes* FP-500 PRODUCIDAS EN CULTIVOS CON RESIDUOS AGRO-INDUSTRIALES

L.R. Torres-Barajas y G. Aguilar-Osorio*

Departamento de Alimentos y Biotecnología. Conjunto E, Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Ciudad Universitaria. 04510 Coyoacán, México D.F. México.

Recibido 22 de Febrero de 2013; Aceptado 8 de Mayo de 2013

Resumen

Las enzimas degradadoras de carbohidratos que los hongos del género *Aspergillus* son capaces de producir, han cobrado gran interés debido, entre otras cosas, a su aplicación en los procesos de obtención de etanol a partir de materias primas de bajo costo, como los residuos agroindustriales. Buena parte de las proteínas del sistema xilanolítico secretadas durante el cultivo de *Aspergillus flavipes* FP-500 en olote de maíz son adsorbidas en el sólido residual, a diferencia de las que se producen en cultivos con salvado de trigo, donde prácticamente no se adsorben. La recuperación de proteínas con soluciones de lavado a partir de ambos residuos indica que el incremento del pH favorece la desorción de las proteínas. Así mismo, la adsorción de las proteínas del sistema xilanolítico es más selectiva en salvado de trigo que en olote de maíz y puede verse influenciada por más de un mecanismo, ya que además de la adsorción debida a la interacción aleatoria de las proteínas con la superficie de los residuos, estas también podrían establecer interacciones específicas con ciertas regiones expuestas de los polisacáridos debidos a la presencia de dominios de unión a carbohidrato en la secuencia de algunas de las proteínas involucradas.

Palabras clave: xilanasas, olote de maíz, proteína, desorción, *Aspergillus*.

Abstract

Carbohydrate degrading enzymes produced by fungus such as *Aspergillus* are interesting due to its application into process of ethanol production using cheap materials such as agro-wastes. Proteins of xylanolytic system which are secreted during *Aspergillus flavipes* FP-500 culture with corn cobs as a carbon source, are adsorbed in the solid matrix of cobs unlike wheat bran in which virtually are non-absorbed. Recovery of proteins with washing solutions from both agro-wastes and protein sequences of some of these proteins shows: that increase of pH improves protein desorption, adsorption of xylanolytic system proteins is pretty much selective in wheat bran than in corn cobs and the adsorption of that proteins could be influenced by random interaction between protein and polysaccharide surface as well as specific interactions of proteins with polysaccharides by carbohydrate binding domains of certain involved proteins.

Keywords: xylanases, corn cobs, protein, desorption, *Aspergillus*.

1 Introducción

Los hongos son un grupo de microorganismos con un impacto importante en la actividad humana. Particularmente, los hongos filamentosos secretan una gran variedad de proteínas de interés biológico con

aplicaciones muy diversas (Ng, 2004).

Aspergillus es un género que ha sido clave en el desarrollo de la biotecnología moderna, debido a la diversidad de enzimas que es capaz de secretar y el uso que se le ha dado a las mismas.

*Autor para la correspondencia. E-mail: gao@unam.mx

En 1894, Jokichi Takamine realizó estudios con diastasas (hoy conocidas como amilasas) de *Aspergillus oryzae* para utilizarlas en la preparación de alimentos de la cocina tradicional japonesa. A partir de entonces, diversas cepas de *Aspergillus* han sido empleadas en una gran variedad de procesos, (Flores y col., 2011); como la producción de ácido cítrico por parte de *Aspergillus niger* o la obtención de fármacos como mevalonina y ácido itacónico por parte de *Aspergillus terreus* (Benet, 1998).

En 2009 el mercado de enzimas de interés industrial alcanzó una demanda que está cerca de los 5.1 billones de dólares (Arora y col., 2009). Las enzimas con actividad sobre la pared celular vegetal son un grupo que ha captado fuertemente la atención, debido a su aplicación en una amplia gama de procesos industriales. Particularmente las xilanasas se emplean en procesos de clarificación de jugos, elaboración de detergentes, blanqueo de pulpa Kraft y recientemente en la conversión de materiales lignocelulósicos a combustibles (Arora y col. 2009).

La necesidad de producir a gran escala y bajo costo este tipo de enzimas generó la búsqueda de materiales económicos que funcionaran como medios de cultivo para los organismos productores de estas enzimas. Diversos residuos agro-industriales poco valorados hasta ahora han sido utilizados para diversos fines (Bolio y col., 2011) y como una alternativa viable frente al uso de cereales utilizados anteriormente como fuentes de carbono en cultivos de microorganismos (Gonçalves y col. 2010; Kadam y Mc Millan, 2003). Se estima que en los Estados Unidos de Norteamérica se generan anualmente cerca de 500 millones de toneladas de estos residuos, por lo que su abundancia los convierte en una opción muy rentable para disminuir los costos de producción de enzimas.

Se sabe que la invasión de los hongos en este tipo de residuos agroindustriales favorece el crecimiento superficial del micelio y la fácil recuperación de los productos de cultivo utilizando soluciones tamponadas (Nigam y Pandey, 2009). Sin embargo, estos materiales poseen la capacidad de adsorber distintos tipos de moléculas, entre las que se encuentran las proteínas gracias a la exposición de grupos carboxilos y grupos fenólicos presentes en los polisacáridos así como en la lignina de la pared celular vegetal. Dada la composición definida; es decir el porcentaje de celulosa, hemicelulosa, lignina y demás componentes poliméricos de los residuos, estos pueden poseer distinta capacidad de adsorción, que a su vez es susceptible a modificación por medio de mecanismos de deslignificación,

esterificación o hidrólisis (Demirbas, 2008). Sin duda, esta característica representa un problema durante la recuperación de enzimas producidas cuando se utilizan residuos agroindustriales en los cultivos de hongos productores de enzimas lignocelulósicas.

El presente trabajo tiene como objetivo demostrar que una parte importante de las proteínas producidas durante los cultivos de *Aspergillus flavipes* FP-500 son adsorbidas en los residuos agroindustriales utilizados como fuentes de carbono y que esta capacidad varía de acuerdo con el tipo de residuo empleado. Además, señalar que la retención de estas proteínas podría estar sujeta no solo a mecanismos de adsorción debida a interacciones aleatorias entre el sólido y las proteínas, sino a uniones específicas debidas a la presencia de dominios de unión a carbohidratos.

2 Materiales y métodos

2.1 Cultivo de *A. flavipes* FP-500 y selección de condiciones de lavado de olote de maíz y salvado de trigo residual.

Se obtuvieron cultivos de *A. flavipes* FP-500 en medio líquido utilizando 100 mL de medio basal (K_2HPO_4 0.2 %, K_2HPO_4 0.2%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 %) con olote de maíz y salvado de trigo 1% en matraces Erlenmeyer de 500 mL. Cada cultivo tuvo una duración de 64 h y se mantuvo a 37°C con agitación orbital de 200 rpm con un inoculo de 10^6 esp/mL. Al cabo del tiempo de cultivo se separaron los sólidos residuales (olote ó salvado+ biomasa) y el líquido por filtración con papel filtro Whatman No. 1. Los sólidos fueron divididos en tres partes, cada una lavada tres veces con una solución diferente: buffer PBS pH = 6.8 (NaCl 136 mM, KCl 2.68 mM, $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 4.29 mM, KH_2PO_4 1.47 mM), solución 1M NaCl y buffer de extracción (Buffer de fosfatos 50 mM, pH 7.5, MgCl 5 mM, β -mercaptoetanol 5mM, EDTA 1.71 mM). Se utilizó la misma muestra de sólidos de olote de maíz y salvado de trigo en cada desorción ya fuera para la sucesión de tres o cuando el número de desorciones se extendió a diez. Durante cada desorción, los sólidos fueron agitados por inversión de los tubos de centrífuga en los que fueron depositados y posteriormente el volumen de solución de lavado fue colectado para realizar las determinaciones correspondientes de proteína y actividad xilanólítica. Una alícuota de la solución recuperada después de cada desorción fue empleada para la obtención del SDS-PAGE correspondiente. Al

cultivo líquido filtrado y libre de células antes citado se le denominará cultivo líquido a lo largo de este texto, para diferenciarlo de la proteína desorbida por medio del lavado de los sólidos residuales.

2.2 Determinación de proteína

La proteína desorbida, así como la del cultivo líquido se cuantificó utilizando el reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich Co L.L.C St. Louis Mo); determinando el cambio de absorbancia de las muestras a 595 nm. Se usó una curva estándar de suero de albúmina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich Co L.L.C St. Louis Mo) utilizando un espectrofotómetro Varian de doble haz UV-Vis Cary 50.

2.3 Determinación de actividad xilanolítica

La actividad xilanolítica de la proteína desorbida, así como en el cultivo líquido se determinó mediante el cambio de absorbancia de las muestras a 575 nm utilizando la técnica de azúcares reductores descrita (Miller, 1959). Se utilizó una curva estándar de xilosa y se empleó el mismo espectrofotómetro citado en el apartado anterior. Una unidad de actividad xilanolítica se define como la cantidad necesaria de enzima que se requiere para liberar 1 μmol de sustrato por mL en 20 minutos de reacción.

2.4 Análisis de integridad del micelio

Se analizó la integridad del micelio por microscopía confocal. Se colectaron muestras de olote residual del cultivo de *A. flavipes* FP 500 sometidas a una serie de 5 lavados con buffer PBS y muestras del mismo sin lavar. Se utilizó un microscopio confocal de escaneo laser Olympus Fluoview FV-1000.

2.5 Efecto del pH en la desorción de proteínas en olote de maíz residual

Se tomaron alícuotas del cultivo de *A. flavipes* FP 500 en olote de maíz con una cantidad de sólido equivalente a 0.21 g/peso seco y se colocaron en tubos de centrifuga. A cada alícuota le fue ajustado el pH *in situ* para alcanzar valores de 2, 4, 6, 8 y 10, con excepción de un control al que se le mantuvo con el pH final del medio de cultivo. Los tubos se agitaron por inversión durante 5 minutos y posteriormente el sólido fue retirado por centrifugación y al sobrenadante le fue determinada la cantidad de proteína y actividad xilanolítica.

2.6 Obtención de SDS-PAGE

Las alícuotas provenientes de la proteína desorbida fueron precipitadas dentro de un baño de hielo utilizando una solución 10% de ácido tricloroacético (TCA) en acetona y 0.07% de β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich Co L.L.C St. Louis Mo). El precipitado se recuperó centrifugando las muestras a 14,000 rpm y posteriormente fue lavado tres veces utilizando una solución de acetona y 0.07% de β -mercaptoetanol. La acetona residual se dejó evaporar hasta sequedad. El precipitado se re suspendió en una solución 0.1 N de NaOH y se mezcló con buffer de carga para su separación en geles de acrilamida 15% de acuerdo con el protocolo de Laemmli (1970). Las muestras de proteína del cultivo líquido obtenidas tanto a partir de los cultivos en olote como en salvado también fueron precipitadas por el mismo método. Además se obtuvo un zimograma de actividad xilanolítica en SDS-PAGE 15% teñido con rojo Congo a partir de las muestras de proteína sin precipitar provenientes del cultivo líquido en olote de maíz.

2.7 ESI-MS/MS y análisis de los péptidos

Las tres bandas seleccionadas a partir del SDS-PAGE 15% con muestras de proteínas del cultivo líquido de *A. flavipes* FP-500 fueron escindidas del gel y separadas por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (Electrospray LC-ESI-MS/MS) utilizando un equipo LTQ orbitrap de Thermo (Thermo Electron Corporation, MA, USA). La identificación de las secuencias obtenidas se realizó por alineamiento con otras secuencias de enzimas glucósido hidrolasas públicamente disponibles en las bases de datos del NCBI y Uniprot utilizando el software BLASTp y CLUSTALW. Así mismo, se realizó la búsqueda de dominios de proteína en las secuencias que mayor similitud mostraron con los péptidos hallados; utilizando la base de datos de dominios conservados CDD del NCBI.

3 Resultados y discusión

3.1 Retención de proteína en olote de maíz y salvado de trigo residual de los cultivos de *A. flavipes* FP-500

Durante la recuperación de proteína secretada en los cultivos líquidos de *A. flavipes* en olote de maíz se observó que la concentración de ésta presentaba

Tabla 1. Concentración de proteína y actividad xilanolítica. Desorción de proteína con tres soluciones de lavado a partir de olote y salvado residual de los cultivos de *A. flavipes* FP-500

| Solución de lavado | Olote de maíz | | | Salvado de trigo | | |
|----------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|---|-------------------------------------|-----------------------------------|---|
| | Proteína $\mu\text{g/g}^{\ddagger}$ | Actividad U/g^{\ddagger} | Actividad específica $(\text{U}/\mu\text{g})$ | Proteína $\mu\text{g/g}^{\ddagger}$ | Actividad U/g^{\ddagger} | Actividad específica $(\text{U}/\mu\text{g})$ |
| Buffer PBS | 1367 ± 1 | 1018 ± 7 | 0.74 | 79 ± 1 | 74 ± 1 | 0.93 |
| NaCl 1M | 1234 ± 15 | 864 ± 6 | 0.7 | $< 5\mu\text{g}^{\text{¥}}$ | 57 ± 3 | — |
| Buffer de Extracción | 624 ± 39 | 767 ± 13 | 1.22 | $< 5\mu\text{g}^{\text{¥}}$ | 75 ± 1 | — |

‡ Proteína y unidades de actividad xilanolítica determinadas por gramo en peso seco de olote de maíz residual

$^{\text{¥}}$ Sensibilidad del método de determinación de proteína (Bradford, 1976)

valores promedio de $159 \pm 63 \mu\text{g/mL}$, aun cuando se utilizaba la misma concentración de inóculo, fuente de carbono y volumen de medio de cultivo y fueron sometidas a tratamientos idénticos antes de la determinación de proteína. No obstante, esta variación tan grande no se observaba en los cultivos líquidos de *A. flavipes* con salvado de trigo, en los que se obtenían concentraciones de proteína de $81 \pm 12 \mu\text{g/mL}$. Gracias a experimentos adicionales realizados en xilano de abedul (datos no mostrados) se identificó que los sólidos residuales de los cultivos eran capaces de retener buena parte de la proteína que se secretaba durante el cultivo, dando lugar a las grandes variaciones detectadas. Con el fin de obtener un método que permitiera la recuperación de la proteína adsorbida en el sólido residual, se seleccionaron tres condiciones de lavado. En cada una se determinó la cantidad de proteína y actividad xilanolítica recuperada y se obtuvo el perfil de proteínas resultante en cada condición. La Tabla 1 muestra los valores de proteína, actividad xilanolítica y actividad específica calculada a partir de los valores de proteína y actividad referidos a los lavados de olote de maíz y salvado de trigo residual de los cultivos de *A. flavipes* FP-500 con buffer PBS, solución 1M de NaCl y buffer de extracción respectivamente.

Los resultados muestran que tanto en olote de maíz como en salvado de trigo residual se obtiene mayor recuperación de proteína y actividad xilanolítica cuando se utiliza buffer PBS. El uso de solución salina disminuye ligeramente la cantidad de proteína recuperada en olote de maíz y reduce aún más los valores de actividad xilanolítica. En salvado de trigo se reduce tanto la cantidad de proteína como de actividad. Por otra parte, el uso de buffer de extracción en olote de maíz residual no solo reduce de manera importante la recuperación de proteína, sino también la actividad xilanolítica, mientras que en salvado de trigo a pesar de que la concentración de proteína

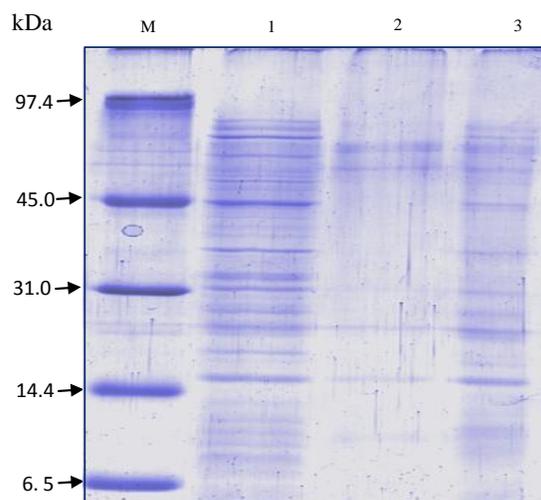


Fig. 1. SDS-PAGE de la proteína desorbida a partir del olote residual del cultivo de *A. flavipes* FP-500, lavando con 1) Buffer PBS, 2) Solución 1M NaCl, 3) Buffer de Extracción.

recuperada es sumamente baja, los niveles de actividad no poseen diferencia con respecto a los observados en buffer PBS. Sin embargo, en general se aprecia que la cantidad de proteína desorbida a partir de olote de maíz residual es considerablemente mayor a la que se recupera a partir de salvado de trigo, pues la concentración de proteína recuperada por gramo de sólido es mínima. La Fig. 1, muestra el perfil de proteínas en SDS-PAGE obtenido a partir del lavado de olote residual del cultivo de *A. flavipes* FP-500 en cada una de las soluciones de lavado. Los perfiles de proteína muestran que utilizando buffer PBS se obtuvo un mayor número de bandas que se distribuyen a lo largo de todos los pesos moleculares a comparación de la solución de NaCl en la que se observaron menos bandas y éstas se encuentran mayoritariamente en

pesos moleculares entre 45 y 97 KDa. El buffer de extracción mostró un patrón de proteínas semejante al observado en PBS, aunque es menos efectivo en la recuperación cuantitativa de proteína.

Las soluciones de lavado se seleccionaron con el fin de aumentar la fuerza iónica mediante la adición de una sal y un agente desnaturizante (NaCl y β -mercaptoetanol respectivamente) para modificar la conformación de las proteínas y favorecer así la desorción de las mismas. Estos criterios han sido ampliamente utilizados en el diseño de estrategias de purificación de proteínas (Feramisco y Burrige 1980). Cuando se obtuvo la actividad específica de las proteínas desorbidas a partir de ambos sólidos residuales con cada solución de desorción (Tabla 1), se observa que la actividad específica de la proteína desorbida a partir de olote de maíz con buffer PBS y NaCl es muy semejante (0.74 y 0.70 respectivamente), mientras que la observada en buffer de extracción es de 1.22. Esto indica que con menos proteína se recupera mayor actividad xilanolítica, es decir, que la desorción de proteínas en buffer de extracción es selectiva a las proteínas con actividad xilanolítica, mientras que tanto PBS como NaCl, desorben todo tipo de proteína secretada durante el cultivo. Sin embargo, el β -mercaptoetanol presente en el buffer de extracción, es un agente desnaturizante, por lo que reduce considerablemente la actividad xilanolítica después de la exposición prolongada incluso si este compuesto es eliminado por diálisis. Por otra parte, en salvado de trigo la concentración de proteína determinada en la soluciones de NaCl y buffer de extracción está por debajo de la sensibilidad del método, por lo que la actividad específica no fue calculada salvo para el buffer buffer PBS con el que se obtuvo un valor de 0.93. Por tales razones, para continuar los estudios de desorción se utilizó buffer PBS.

Para asegurar que la proteína determinada se debía exclusivamente a la desorción de la misma a partir del sólido y no a la liberación de proteína intracelular debida al rompimiento del micelio; se realizaron lavados sucesivos al olote de maíz residual del cultivo de *A. flavipes* FP-500 y se analizó la integridad del micelio. La Fig. 2 muestra la sucesión de imágenes obtenidas de *A. flavipes* FP-500 cultivado en olote de maíz obtenidas por microscopía confocal. Las muestras fueron: a) Control no lavado, b) y c) lavado con buffer PBS. Las imágenes muestran integridad del micelio semejante en ambas condiciones. A pesar de que la longitud de las hifas puede variar en función del estadio de crecimiento, no se observó falta de proporción entre la longitud de las mismas o detalles

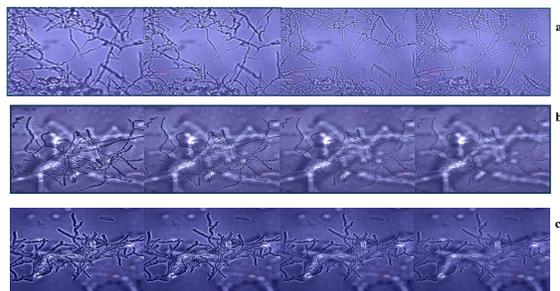


Fig. 2. Fotografías de microscopía confocal que muestran la integridad del micelio de *A. flavipes* FP-500 a) micelio sin lavar, b) y c) micelio lavado con PBS.

que revelen un daño importante ni liberación de proteína intracelular, que es un criterio importante para asegurar que toda la proteína determinada después de cada desorción se debiera únicamente a la proteína secretada.

3.2 Retención de proteína y actividad xilanolítica en olote de maíz y salvado de trigo residual de los cultivos de *A. flavipes* FP-500

Con el fin de analizar el número de desorciones necesarias para recuperar la mayor parte de la proteína adsorbida en ambos residuos, se extendió la sucesión de lavados realizados con buffer PBS hasta un número de diez. La Fig. 3a muestra los valores de proteína y actividad xilanolítica determinados a las muestras de proteína extraída a partir de olote de maíz residual después de cada desorción. La proteína recuperada posee un patrón irregular hasta el lavado número siete, valor después del cual comienza a decrecer. La actividad por otra parte posee la tendencia a disminuir. La Fig. 3b muestra los valores de proteína y actividad acumulada, así como el ajuste de ambas curvas, en las que se observa que la recuperación de proteína se ajusta a un modelo polinomial de segundo grado.

De acuerdo con la predicción de este ajuste, se requieren hasta 44 lavados para que el nivel de proteína total recuperada a partir del sólido alcance su valor máximo. Mientras que la curva de actividad se ajusta más a un modelo logarítmico; este predice que el número de lavados necesarios para desorber toda la proteína con actividad xilanolítica se extiende hasta un número infinito. La Fig. 4 muestra el SDS-PAGE de: a) proteína obtenida a partir de los lavados 1-9 de olote residual, E corresponde al perfil de proteínas

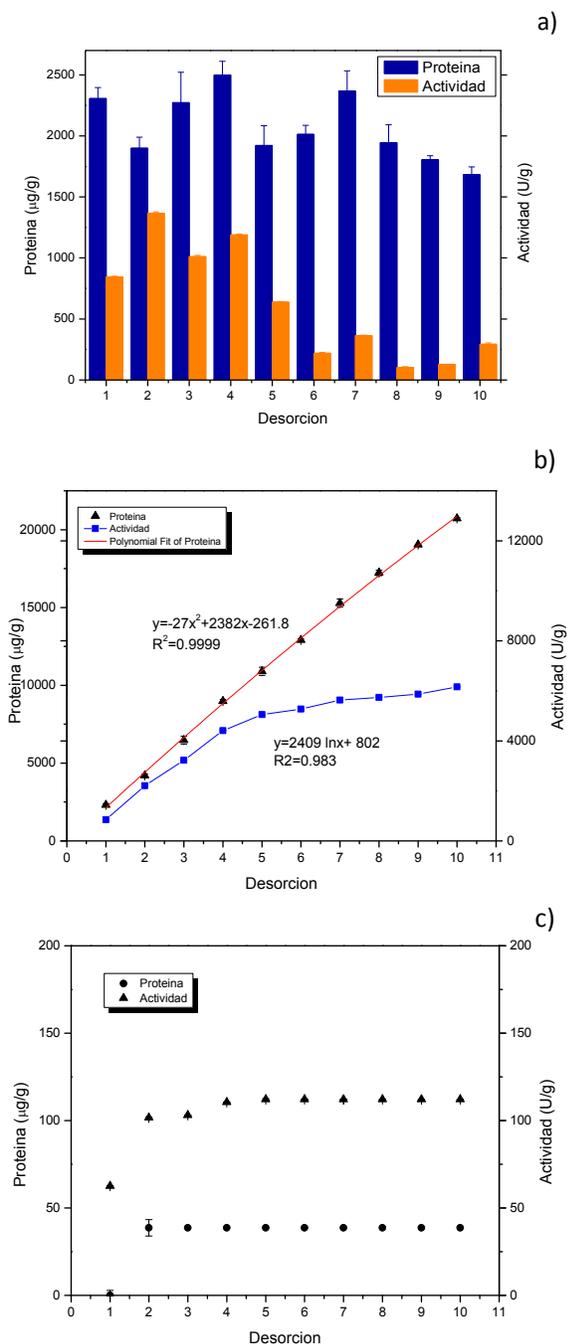


Fig. 3. Secuencia de desorción de proteína a partir del olote residual del cultivo de *A. flavipes* FP-500 a) Proteína y Actividad xilanolítica determinada en cada desorción, b) Proteína y actividad xilanolítica aditiva en olote de maíz. c) Secuencia de desorción de proteína y actividad xilanolítica aditiva en salvado de trigo.

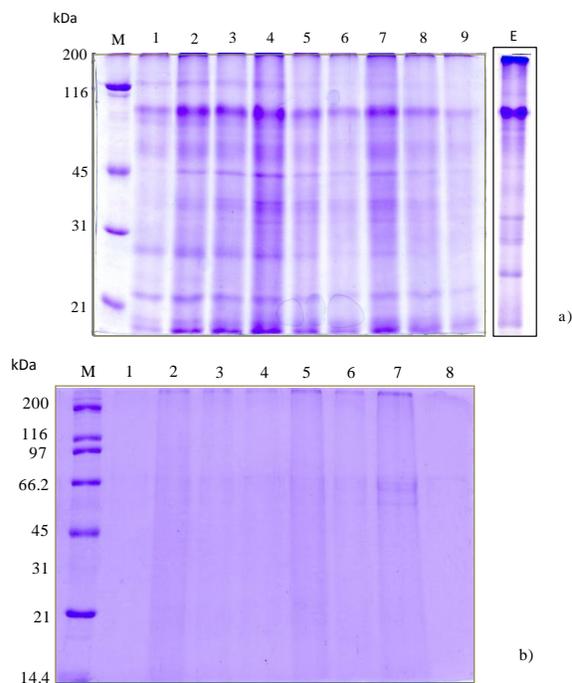


Fig. 4. SDS-PAGE de la desorción de proteína a partir de olote de maíz residual del cultivo de *A. flavipes* FP-500; a) Líneas de 1 a 9, proteína desorbida; línea M, marcadores de masa molecular y línea E, proteína secretada en el cultivo líquido. b) Líneas 1-8, proteína desorbida a partir de salvado de trigo residual.

obtenido a partir del cultivo líquido. Adicionalmente se determinó la concentración de proteína que se desorbe a partir de los lavados de un medio de cultivo con 1% de olote de maíz sin inóculo y se obtuvo el SDS-PAGE del mismo que se muestra en la Fig. 1A (material adicional). Los valores de proteína determinados ($5.00 \pm 0.45 \mu\text{g/g}$ de sólido), así como el SDS-PAGE correspondiente indican que la desorción de proteína a partir de la matriz del sólido sin inóculo es mínima debido a que no hay proteína y que aquella que es desorbida a partir del olote de maíz residual proviene exclusivamente de la que es secretada por *A. flavipes*. La intensidad de las bandas se asocia con una mayor concentración de proteínas; en los carriles correspondientes a los lavados 4 y 7 de la Fig. 4a, se observan incrementos en la intensidad total de las bandas, que coinciden también con un máximo de proteína en la curva de la Fig. 3a antes descrita. Los resultados muestran que el perfil obtenido con la proteína desorbida es muy semejante al que se obtiene a partir del cultivo líquido; lo que indica que la proteína desorbida proviene únicamente de la que se secreta durante el cultivo.

Tabla 2. Comparación de los valores de proteína y actividad obtenidos a partir de la proteína desorbida de olote de maíz y salvado de trigo residual de los cultivos de *A. flavipes* FP-500

| Muestra | Proteína ($\mu\text{g/g}$) [‡] | Actividad (U/g) [‡] | Actividad Específica (U/ μg) |
|--|---|------------------------------|--|
| Olote de maíz (cultivo líquido) | 12,410 \pm 14 | 13,117 \pm 5 | 1.056 |
| Proteína desorbida a partir de Olote de maíz [‡] | 20,714 \pm 141 | 6,159 \pm 6 | 0.29 |
| Salvado de trigo (cultivo líquido) | 8927 \pm 7 | 6513 \pm 5 | 0.729 |
| Proteína desorbida a partir de Salvado de trigo [‡] | 38 \pm 5 | 112 \pm 1 | 2.94 |

[‡] Suma de los valores de proteína y actividad de los 10 lavados

[‡] Proteína y unidades de actividad determinadas por gramo en peso seco de residuo

Cuando se realizó este mismo análisis a la proteína desorbida a partir de salvado de trigo residual y se comparó con los datos obtenidos en olote de maíz; el resultado fue muy distinto. La Fig. 3c) muestra los valores de proteína y actividad acumulada, ambos determinados a partir de salvado de trigo residual. En esta se observa que durante las primeras desorciones se recupera la totalidad de la proteína adsorbida en el material, ya que en las desorciones sucesivas no se observa ningún cambio. La Tabla 2 por otra parte, presenta los valores de proteína y actividad xilanolítica determinados tanto en el cultivo líquido como a la suma de las diez desorciones realizadas en olote de maíz y salvado de trigo residual, así como la actividad específica calculada a partir de estos valores. Al comparar la proteína determinada en el caldo de cultivo y la recuperada a partir de las desorciones de olote de maíz residual, se observa una cantidad importante de proteína y actividad xilanolítica que es retenida en el sólido. Se calculó que la proteína estimada al final de las diez desorciones era 1.66 veces mayor que la toda la proteína que se recuperó en el caldo de cultivo. Esto indicó que casi dos terceras partes de la proteína total secretada por el hongo es retenida en la matriz sólida del olote y no puede ser recuperada a menos que se emplee un medio adecuado para hacerlo. Cuando se realizó el mismo análisis en salvado de trigo y se compararon los valores de la proteína recuperada a partir del cultivo líquido contra los de proteína desorbida; se encontró que la proteína recuperada en el cultivo líquido es 234 veces mayor que la que se desorbió a partir del sólido. La actividad xilanolítica también es mucho mayor en el cultivo líquido que la desorbida a partir del sólido residual,

lo que indica que la proteína y actividad retenida en salvado de trigo no alcanzó valores importantes. En la Fig.4b se muestra el SDS-PAGE obtenido con proteína desorbida a partir de salvado de trigo residual del cultivo de *A. flavipes* FP-500. A excepción de un pequeño grupo de bandas que se observan, la cantidad de proteína que fue retenida en salvado de trigo es insignificante. Sin embargo, cuando se compararon las actividades específicas de los caldos de cultivo y la proteína desorbida a partir de ambos residuos, se determinó que en el caldo que proviene del cultivo en olote se obtiene mayor actividad específica con respecto a la proteína desorbida a partir del sólido residual, es decir; hay más proteínas con actividad xilanolítica en el caldo de cultivo que en la proteína que se desorbe. Mientras que en salvado de trigo, la actividad específica de la proteína que se desorbe es muy alta, lo que indica que a pesar de que es muy poca la proteína que puede adsorberse en salvado, la mayor parte de ella posee actividad xilanolítica, lo que indica que la selectividad de estas proteínas a unirse a alguno de los sólidos es mayor para salvado de trigo.

La hemicelulosa tiene una presencia importante en la composición de ambos residuos, ya que representa cerca del 42% del peso total del olote de maíz y apenas el 25% en salvado de trigo. La presencia de almidón es menor en olote de maíz que en salvado de trigo, no así celulosa, que tiene una presencia mayor en olote de maíz como se muestra en la tabla A1 (material adicional). La composición del salvado es más heterogénea que la de olote, constituida mayoritariamente por celulosa y hemicelulosa.

Tabla 3. Comparación de la proteína y actividad desorbidas a diferentes valores de pH de las muestras de olote de maíz y salvado de trigo residual de los cultivos de *A. flavipes* FP-500

| pH | Proteína ($\mu\text{g/g}$) [‡] | Actividad (U/g) [‡] |
|----------------------|---|------------------------------|
| Control [‡] | < 5 μg [‡] | 1849 \pm 7 |
| 2 | < 5 μg [‡] | 1942 \pm 2 |
| 4 | < 5 μg [‡] | 1890 \pm 1 |
| 6 | 420 \pm 5 | 1945 \pm 3 |
| 8 | 497 \pm 3 | 1854 \pm 1 |
| 10 | 2463 \pm 3 | 1871 \pm 1 |

[‡] Control= Posee el pH del medio de cultivo= 2.8

[‡] Proteína y unidades de actividad determinadas por gramo en peso seco de residuo

[‡] Sensibilidad del método de determinación de proteína (Bradford, 1976)

También la relación arabinosa/xilosa difiere ampliamente en olote y salvado (0.12 y 0.7 respectivamente). Esto tiene un efecto directo en la capacidad que cada residuo posee para exponer sus grupos funcionales. La presencia de sustituyentes en la cadena principal de polisacáridos y la concentración de los polisacáridos son factores determinantes para establecer sus mecanismos de unión, ya que la adsorción del xilano y celulosa requiere de un menor grado de sustitución de xilano con cadenas de arabinosa o de grupos acetilo y concentraciones mucho menores del mismo pueden interactuar mejor con celulosa (Kabel y col. 2007). Considerando que la presencia de cada polisacárido es diferente en ambos residuos al igual que su concentración, es posible que también su grado exposición sea diferente, lo que traería como consecuencia que la capacidad de interacción entre unos polisacáridos y otros o de polisacáridos con otras moléculas (como las proteínas) difiera en función del tipo de residuo y su composición, explicando así las diferencias observadas con respecto a la adsorción selectiva de proteínas en ambos residuos.

3.3 Efecto del pH en la desorción de proteína y actividad xilanolítica del olote de maíz residual

Dado que olote de maíz demostró retener una cantidad importante de proteínas, a diferencia de lo observado con salvado de trigo, se planteó un

experimento adicional con el fin de determinar el efecto que la modificación del pH tiene en la desorción de proteínas retenidas en el sólido residual. En este se determinó la cantidad de proteína y actividad xilanolítica recuperada a partir de olote de maíz residual a diferentes valores de pH. La Tabla 3 presenta los valores de proteína y actividad xilanolítica determinados en alícuotas de olote de maíz recuperadas de los cultivos de *A. flavipes* FP-500. Los niveles de proteína observados a pH ácido se mantienen cerca del límite de detección del método, por lo que no pueden ser cuantificados. A pesar de esto, se observa que a medida que el pH aumenta también lo hace la concentración de proteína. Por otra parte, se observó que los valores de actividad xilanolítica determinados en cada uno de los pH's probados fueron muy semejantes (Tabla 3), mientras que la actividad específica calculada a partir de estos datos para pH 6, 8 y 10 disminuye conforme el pH aumenta (4.70, 3.73 y 0.76, U/ μg de proteína, respectivamente). Esto indica que si bien se desorbe más proteína a pH's alcalinos, ésta no presenta abundancia de proteínas con actividad xilanolítica, por lo que la desorción a valores altos de pH se vuelve menos selectiva para las proteínas del sistema xilanolítico. Las proteínas presentan mayor adsorción a una superficie cuando el pH del medio en el que están inmersas es cercano a su punto isoeléctrico; por lo tanto, la desorción de la misma también aumenta cuando el pH es mayor, porque aumentan las fuerzas de repulsión de la proteína, incrementando la libertad rotacional, disminuyendo la estabilidad de la misma (Quiquampoix, 2002). Esto puede explicar el hecho de que las proteínas adsorbidas en olote de maíz se desorben cuando el pH se hace más alcalino, puesto que a pesar de que se tiene una muestra compleja de proteínas que poseen puntos isoeléctricos diferentes, en general el punto isoeléctrico de proteínas de hongos como *Aspergillus* poseen valores ligeramente ácidos.

Como se señaló anteriormente, las diferencias de retención de proteína mostradas por olote de maíz y salvado de trigo pueden entonces estar relacionadas con su composición química, (material adicional). Las diferencias más importantes halladas en estos residuos son principalmente la presencia de proteína cruda y almidón que son más abundantes en salvado de trigo, mientras que en olote de maíz, el contenido de fibra total es más elevado. Sin embargo, la fibra total en olote de maíz y que es evaluada como celulosa y hemicelulosa alcanza los 319 y 342 g/kg respectivamente (Okeke y Obi, 1994); mientras que posee un valor de 256 y 250 g/kg en salvado de trigo

(Graham y col., 1986) señalando que la composición de biopolímeros es más heterogénea en salvado de trigo.

La interacción de celulosa con otros polisacáridos se ve favorecida con la concentración de ambos, así como el área expuesta de celulosa. La unión xilano-celulosa por ejemplo, se favorece cuando las cadenas de xilano están menos sustituidas por arabinosa o grupos acetilo y su concentración es baja (Kabel y col., 2007). La compactación de la celulosa también posee un efecto en la interacción, pues la celulosa amorfa es más susceptible a generar interacciones y a adsorber otras moléculas, mientras que la celulosa cristalina es menos accesible y reactiva (Mogollón y col., 2008). De acuerdo con la composición química de los residuos utilizados en este trabajo, es evidente que la proporción en la que se presentan sus componentes es muy diferente en cada uno, modificando la interacción de los biopolímeros presentes, así como la capacidad de adsorción que estos materiales presentan. Esto ha sido ampliamente descrito en la adsorción de metales en distintos residuos agroindustriales como bagazo de uva, residuos de manzana o cáscara de coco (Farinella y col., 2007), pero a nuestro conocimiento, no hay referencias previas a este trabajo que describan la adsorción selectiva de proteínas del sistema xilanolítico en residuos agroindustriales. Los valores de proteína y actividad xilanolítica determinados, señalan que las interacciones que se presentan en la matriz sólida de olote de maíz favorecen la adsorción de las diversas proteínas que son secretadas durante el cultivo de *A. flavipes*, mientras que las interacciones que se presentan en salvado de trigo permiten la adsorción selectiva de proteínas, aunque en una cantidad mucho menor.

3.4 Análisis de péptidos y dominios de unión a carbohidratos (CBM)

Después de observar las diferencias tan marcadas en el patrón de desorción de proteína total y proteínas con actividad xilanolítica, se planteó la posibilidad de que algunas de estas poseyeran dominios de unión a carbohidratos (CBM por sus siglas en inglés). Tres bandas con peso molecular de 23, 27 y 33 KDa respectivamente, fueron seleccionadas a partir de un SDS-PAGE con muestras de proteína del cultivo de *A. flavipes* FP-500 en olote de maíz. Estas bandas habían

demostrado poseer actividad xilanolítica presentando zonas de hidrolisis en zimogramas (Fig. 2A, material adicional) y fueron escindidas del gel para su análisis por espectrometría de masas acoplado a masas (MS/MS). La Tabla 4 presenta las proteínas que fueron identificadas a partir de un SDS-PAGE con proteína del cultivo de *A. flavipes* FP-500 en olote de maíz. La identidad de las mismas indica que la proteína de 23 kDa es semejante a la xilanasa de *A. terreus* y la proteína de 27 kDa es semejante a la xilanasa de *A. usarii*; mientras que la tercera es semejante a una acetilxilano esterasa también de *A. terreus*. Las secuencias completas de las proteínas con las cuales fueron identificadas se alinearon con las secuencias de: 1) un dominio de unión a celulosa (CBM) de *A. clavatus* (No. de acceso Uniprot A1CC3_ASPCL), 2) una proteína de fusión con la secuencia de xilanasa III y CBM de la familia 9 (No. de acceso NCBIACR54951.1). El péptido1 (23 KDa) tuvo una semejanza del 57% y un $e = 0.25$ frente a la secuencia de CBM de *A. clavatus*. El péptido 2 mostró una identidad del 93% y $e = 5 \times 10^{-110}$ al ser alineada con la proteína de fusión, mientras que el péptido 3 mostró una identidad del 67% y $e = 10^{-9}$ al ser alineada con el CBM de *A. clavatus*. Estos resultados indican que al menos dos de las tres proteínas que poseen mayor semejanza con las que se hallaron en el cultivo de *A. flavipes* pueden poseer dominios de unión a carbohidratos.

La presencia de estos dominios en las proteínas del sistema xilanolítico de *A. flavipes* representa un factor adicional que puede afectar la adsorción de las mismas. Los dominios de unión a carbohidrato poseen secuencias ricas en aminoácidos como: prolina, glicina e hidroxil aminoácidos (Black y col., 1997; Kiyohara y col., 2009). No poseen actividad catalítica; sin embargo, facilitan la hidrólisis de sus sustratos específicos por interacción con algunos de los carbohidratos adyacentes, proporcionándoles soporte y facilitando el contacto con sus sustratos, han sido hallados no solo en secuencias de proteínas con actividad celulolítica, sino xilanolítica y de enzimas accesorias (Gordillo y col., 2006). El número de secuencias de CBM's identificadas hasta el día de hoy se ha incrementado de manera importante, tanto que existen 29, 727 módulos distribuidos en 67 familias de dominios de unión a carbohidrato de acuerdo con la clasificación de la base de datos de CAZy (<http://www.cazy.org/>) (Cantarel y col., 2009).

Tabla 4. Proteínas identificadas a partir del cultivo de *A. flavipes* FP-500 en olote de maíz.

| Péptido | Identidad | Número de Acceso | Identidad | Valor-e |
|------------------|--|---------------------------|-----------|---------------------|
| No.1 (23 KDa) | Endo-1,4-beta-xylanase A precursor <i>Aspergillus terreus</i> NIH2624 | XP 001216082.1 (NCBI) | 94% | 2×10^{-7} |
| No.2 (27 KDa) | Endo-1,4-beta-xylanase <i>Aspergillus usamii</i> | ABR 14629.1 (NCBI) | 70% | 3×10^{-12} |
| No.3 (33 Kda) | Acetilxylanesterase <i>Aspergillus terreus</i> NIH 2624/ FGSC A1156 | Q0CNM5_ASPTN (Uniprot) | 94% | 9×10^{-5} |

La presencia de CBM's en enzimas secretadas por miembros del género *Aspergillus* demostró que no solo la actividad enzimática mejora de manera importante, sino que la sensibilidad a la acción de proteasas disminuye gracias a la protección que estos dominios y las secuencias de unión (linkers) le proporcionan. También, Paldi (2003) demostró que aunque la afinidad (K_d) de un CBM puede ser la misma en polisacáridos de diversos orígenes, la concentración máxima de unión de estos (B_{max}) puede variar de manera considerable en función del origen del polisacárido; esto fue observado al comparar los parámetros cinéticos de unión de CBM's de glucoamilasas de *A. niger* en los cuales B_{max} fue casi siete veces mayor en almidón de maíz con respecto al de papa. Esto indica que la unión de un mismo tipo de CBM se puede unir cuantitativamente de forma distinta de acuerdo con el tipo de polisacárido, lo que podría explicar la gran diferencia observada en los perfiles de desorción de proteínas a partir del olote de maíz y salvado de trigo residual.

Así, la presencia de CBM's en las enzimas del sistema xilanolítico de *A. flavipes* FP 500, puede ser un factor adicional en la adsorción de proteínas en ambos residuos. Es decir, que la adsorción observada en los residuos probados se debe a la interacción aleatoria de las proteínas con los grupos funcionales expuestos en los polisacáridos, pero también a la interacción específica de los dominios de algunas proteínas con regiones particulares de los polisacáridos. La curva de desorción con valores acumulados de proteína y actividad mostrada en la Fig. 3b en el que ambas curvas poseen modelos de ajuste diferentes indica que las proteínas con actividad xilanolítica presentan un comportamiento distinto al del resto de las proteínas secretadas. Que se requiera un número muy grande de desorciones para recuperar las proteínas con actividad xilanolítica, mientras que solo se requieran 44 para desorber la de proteína total, sugiere que las proteínas asociadas con la actividad xilanolítica presentan una interacción más fuerte con el sólido y que podría asociarse directamente con la presencia de dominios

de unión a carbohidratos.

Los dominios de unión a carbohidrato que han sido informados en *Aspergillus* poseen mayoritariamente sitios de unión a celulosa, pero también a xilano y xiloglucano (Fernández y col., 1999; Luis y col., 2013); algunos de estos CBM's presentan mayor afinidad por regiones de celulosa más ordenadas, otras por la celulosa amorfa y otros no presentan diferencias importantes (Quentin y col., 2002). Así, la composición de los residuos agroindustriales utilizados como fuentes de carbono en los cultivos de *A. flavipes* podría ser el factor clave que afecta directamente los mecanismos de adsorción de estas proteínas.

Conclusiones

De acuerdo con los resultados observados, la adsorción de las proteínas secretadas durante los cultivos de *A. flavipes* FP-500 en olote de maíz y salvado de trigo es diferente. Los valores determinados de proteína, actividad xilanolítica y actividad específica, indican que cuantitativamente la proteína total secretada por *A. flavipes* establece una interacción mucho mayor con olote de maíz que con salvado de trigo. Sin embargo, la adsorción selectiva de proteínas del sistema xilanolítico es mayor en la matriz sólida de salvado de trigo, a pesar de que cuantitativamente una menor cantidad de proteínas se adsorben en él. Mientras que en olote de maíz, la mayor parte de las proteínas que pueden ser desorbidas no pertenecen al sistema xilanolítico, por lo que la adsorción es menos selectiva. El pH tiene un efecto importante en la desorción de proteínas retenidas en olote de maíz, no así en la desorción selectiva de proteínas con actividad xilanolítica. La posible presencia de dominios de unión a sustrato en las enzimas del sistema xilanolítico de *A. flavipes* puede tener un efecto adicional en la interacción que estas proteínas establecen con los sólidos residuales del cultivo, ya que podrían estarse estableciendo dos

tipos de interacción: una aleatoria entre los grupos funcionales expuestos por parte de la proteína total y los polisacáridos presentes en los residuos; así como una específica establecida entre las proteínas que poseen dominios de unión a carbohidrato con regiones específicas de los polisacáridos. Es importante considerar todo esto durante la selección de residuos agroindustriales que puedan ser empleados como sustratos en algún cultivo, ya que de existir interacciones entre las proteínas producidas y el sólido como en el caso aquí descrito en olote de maíz, se corre el riesgo de aumentar los costos del proceso debido a la adecuada recuperación de proteínas y perder así el valor agregado que originalmente se le da al aprovechamiento de estos residuos.

Agradecimientos

El primer autor agradece el apoyo al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para cursar el doctorado en Ciencias Bioquímicas dentro del programa de doctorado de la Universidad Nacional Autónoma de México, incluido en el padrón de Postgrados de Excelencia.

Referencias

- Arora, N., Kumar, A., Mutyala, S., Suryanarayana, U. (2009). Comparative characterization of commercially important xylanase enzymes. *Bioinformation* 3, 446-453
- Benett, J.W. (1998). Review article. Mycotechnology: The Role of fungi in fitotechnology. *Journal of Biotechnology* 66, 101-107
- Black, G., Rixon, J., Clarke, J., Hazlewood, G., Ferreira, L., Bolam, D., Gilbert, H. (1997). Cellulose binding domains and linker sequences potentiate the activity of hemicellulases against complex substrates. *Journal of Biotechnology* 57, 59-69
- Bolio, G., Valadez, A., Veleva, L., Andreeva, A. (2011). Cellulose whiskers from agro-industrial banana wastes: isolation and characterization. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 10, 291-299
- Cantarel, B., Coutinho, P., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZyme database (CAZy): An expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Research* 37, D233-D238. (Carbohydrate Active Enzymes database, disponible en <http://www.cazy.org/>).
- Demirbas, A. (2008). Heavy metal adsorption onto agro-based waste materials: A review. *Journal of Hazardous Materials* 157, 220-229.
- Douglas, J., Johnson, H., Granick, S. (1993). A simple kinetic model of polymer adsorption and desorption. *Science* 262, 2010-2012
- Farinella, N.V., Matos, G.D., Arruda, M.A.Z. (2007). Grape bagasse as potential biosorbent of metals in effluent treatments. *Bioresource Technology* 98, 1940-1946.
- Feramisco, J., Burrige, K. (1980). A rapid purification of α -actinin, filamin and 130,000-dalton protein from smooth muscle. *The Journal of Biological Chemistry* 255, 1194-1199
- Fernandes, A., Fontes, C., Gilbert, H., Hazlewood, G., Fernandes T., Ferreira, L. (1999). Homologous xylanases from *Clostridium thermocellum*: evidence for bifunctional activity, synergism between xylanase catalytic modules and the presence of xylan-binding domains in enzyme complexes. *Biochemistry Journal* 342, 105-110.
- Flores, T., Gutiérrez, M., Revah, S., Favela, E. (2011). Estudio comparativo de oxigenasas producidas por *Aspergillus niger* ATCC 9642 en fermentación en estado sólido y sumergido. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 10, 189-207
- Gonçalves, F., Gonçalves, A., Gonçalves, E., Azevedo, M., Pinto, B., Duque, P., Sobral, L., Souza, E., Félix, C., Ferreira, E. (2010). Evaluation of hollocelulase production by plant-degrading fungi grown on agro-industrial residues. *Biodegradation* 21, 815-824
- Gordillo, F., Caputo, V., Peirano, A., Chavez, R., van Beeumen, J., Vandenberghe I., Claeysens, M., Bull, P., Ravanal, M., Eyzaguirre, J. (2006). *Penicillium purpurogenum* produces a family 1 acetyl xylan esterase containing a carbohydrate binding domain: characterization of the protein and its gene. *Micological Research* 110, 1129-1139.

- Graham, H., Hesselman, K., Aman, A. (1986). The influence of wheat bran and sugar-beet pulp on the digestibility of dietary components in a cereal-based pig diet. *The Journal of Nutrition* 116, 242-251
- Kabel, M., Borne, H., Vincken, J.P., Voragen, A.G.J., Schols, H. (2007). Structural differences of xylans affect their interaction with cellulose. *Carbohydrate Polymers* 69, 94-105.
- Kadam, K., McMillan, J. (2003). Availability of corn stover as a sustainable feedstock for bioethanol production. *Bioresource Technology* 88, 17-25.
- Kiyohara, M., Sakaguchi, K., Yamaguchi, K., Araki, T., Ito, M. (2009). Characterization and application of carbohydrate-binding modules of b-1,3 xylanase XYL 4. *The Journal of Biochemistry* 146, 633-641.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Luis, A., Venditto, I., Temple, M., Rogowsky A., Baslé, A., Xu, J., Know, P., Prates, J., Ferreira, L., Fontes, C., Najmudin, S., Gilbert, H. (2013). Understanding how non catalytic carbohydrate binding modules can display specificity for xyloglucan. *The Journal of Biological Chemistry* 288, 4799- 4809.
- Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31, 426-428.
- Mogollón, G., García, J.A., León, W. (2008). Materias primas fibrosas. En: Panorama de la industria de celulosa y papel en Iberoamérica (Ma.C. Areaedit), Pp 15-60. Red Iberoamericana de docencia e investigación en celulosa y papel, Argentina.
- Ng, T.B. (2004). Peptides and Proteins from Fungi. *Peptides* 25, 1055-1073
- Nigam, P., Pandey, A. (2009). *Solid state fermentation technology for bioconversion of biomass of agricultural residues*. En: *Biotechnology for Agro industrial Residues Utilization* (P.S. Nigam, A. Pandey eds.), Pp 197-221. Springer Science + Bussines Media.
- Okeke, B.C., Obi, S.K. (1994). Lignocellulose and sugar composition of some agro-waste materials. *Bioresource Technology* 47, 283-284
- Paldi, T., Levy, I., Shosheyov, O. (2003). Glucoamylase starch binding-domain in *Aspergillus niger* B1: molecular cloning and functional characterization. *Biochemistry Journal* 372, 905-910.
- Quentin, M., Ebbelaar, M., Derksen, J., Mariani, C., van der Valk, H. (2002). Description of a cellulose-binding domain and a linker sequence from *Aspergillus* fungi. *Applied Microbial Biotechnology* 58, 658-662.
- Quiquampoix, H. (2002). Enzyme adsorption on soil mineral surfaces and consequences for the catalytic activity. En: *Enzymes in the Environment. Activity, Ecology and Applications* (R. Burns and R. Dick eds.) Pp 285-306. Marcel Dekker Inc, New York.
- Van Tassel, P., Viot, P., Tarjus, G. (1997). A kinetic model of partially reversible protein adsorption. *Journal of Chemical Physical* 106, 961-770

Apéndice

Tabla A1. Composición química de olote de maíz y salvado de trigo

| Componente | Olote de maíz (g/kg) | Salvado de trigo (g/kg) |
|---------------------------|----------------------|-------------------------|
| Cenizas | 18 | 61 |
| Proteína cruda | 32 | 151 |
| Almidón | 143 | 229 |
| Fibra total | 662 | 527 |
| Celulosa [¥] | 319 | 256 |
| Hemicelulosa [¥] | 342 | 250 |
| Fibra soluble | 26 | 92 |
| Lignina (Klason) | 67 | 109 |

Salvador, V., Cherbut, Ch., Barry, J., Bertrand, D., Bonnet, Ch., Delort-Laval, J. (1993). Sugar composition of dietary fibre and short chain fatty acid production during in vitro fermentation by human bacteria. *British Journal of Nutrition* 70, 189-197.

[¥]Datos calculados a partir de Okeke, B.C., Obi, S.K. (1994). Lignocellulose and sugar composition of some agro-waste materials. *Bioresource Technology* 47, 283-284

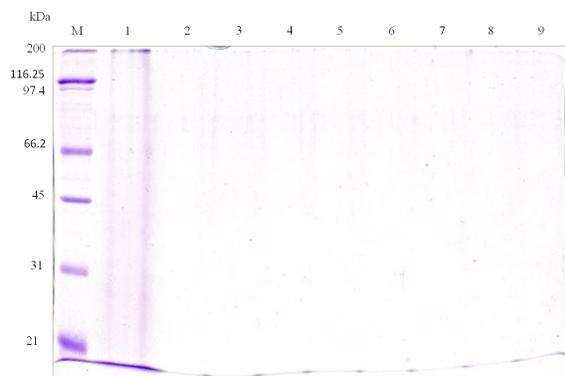


Fig. A1. SDS-PAGE. Proteína desorbida a partir de olote de maíz 1% en medio basal sin inóculo. Líneas 1-8, proteína desorbida; línea M marcadores de masa molecular.

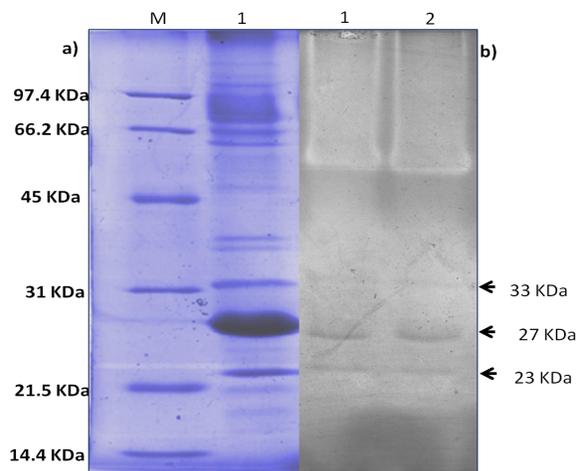


Fig. A2. Proteína obtenida a partir del cultivo líquido de *A. flavipes* FP-500 con olote de maíz; a) SDS-PAGE Línea 1, proteína teñida con azul de Coomassie; línea M, marcadores de masa molecular. b) Líneas 1 y 2, zimograma de actividad xilanolítica en gel de acrilamida teñido con rojo congo.