

El rol y las aplicaciones de las enzimas fúngicas que degradan los desechos agrícolas

The role and applications of fungal enzymes that degrade agricultural wastes

Ravanel, M.C.^{a*}, Ulloa, P.E.^b, Chávez, R.^c

^a Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTAL), Facultad de Ciencias Agrarias y Alimentarias, Universidad Austral de Chile, Avda. Julio Sarrazín s/n, Isla Teja, Valdivia 5090000, Chile.

^b Núcleo de Investigaciones Aplicadas en Ciencias Veterinarias y Agronómicas, Universidad de Las Américas, Avenida Manuel Montt 948, Santiago 7500975, Chile.

^c Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile (USACH), 9170022 Santiago, Chile.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25.01.2022

Accepted 31.03.2022

Keywords:

Biomass

Saccharification

Carbohydrates

Lignocellulose

Xylan

Review Article,

Food Science

*Corresponding author:

María Cristina Ravanel

E-mail address:

maria.ravanel@uach.cl

ABSTRACT

Agricultural waste is an excellent source of renewable organic matter and its main compound is lignocellulose which is made up of lignin, pectin, cellulose and hemicelluloses. Xylan is the main component of hemicelluloses and is the second most abundant natural renewable polysaccharide available on earth. It is a complex heteropolysaccharide formed by different monosaccharides such as D-xylose, L-arabinose, D-galactose, D-mannose and organic acids such as acetic acid, ferulic acid, glucuronic acid interlinked with the help of ester and glycosidic bonds. Xylan biodegradation is a complex process that requires the participation of a series of esterases and glycosyl hydrolases. The suitability of glycosyl hydrolases for applications in paper and pulp, feed, and biorefinery has led to increasing demand for these enzymes worldwide. The present review provides an insight into the biochemistry and use of fungal glycosyl hydrolases in the industry as an emerging ecological tool.

RESUMEN

Los desechos agrícolas son una excelente fuente de materia orgánica renovable y su principal compuesto es la lignocelulosa formada por lignina, pectina, celulosa y hemicelulosas. El xilano es el principal componente de las hemicelulosas y es el segundo polisacárido renovable natural más abundante disponible en la tierra. Es un heteropolisacárido complejo formado por diferentes monosacáridos como D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa y ácidos orgánicos como ácido acético, ácido ferúlico, ácido glucurónico entrelazados con la ayuda de enlaces éster y glicosídico. La biodegradación del xilano es un proceso complejo que necesita la participación de una serie de esterasas y glicosil hidrolasa. La idoneidad de las glicosil hidrolasa para su aplicación en papel y pulpa, alimentos, biorrefinería ha llevado a un aumento en la demanda de estas enzimas a nivel mundial. La presente revisión da una idea de la bioquímica y el uso de las glicosil hidrolasas fúngicas en la industria como una herramienta ecológica emergente.

Palabras clave: Biomasa, Sacarificación, Carbohidratos, Lignocelulosa, Xilano.

INTRODUCCIÓN:

Actualmente se elimina enormes cantidades de biomasa vegetal, producto de los desechos de procesos agroindustriales, generando problemas ambientales. Debido al bajo costo de esta materia prima, se han realizado grandes esfuerzos para encontrar nuevos usos y mejorar los procesos para su utilización. La biomasa vegetal, compuesta por plantas leñosas y no leñosas, está formada mayoritariamente por lignocelulosa, la

cual puede potencialmente convertirse en productos con valor agregado, incluyendo biocombustibles y compuestos químicos (Malherbe y Cloete, 2003).

La lignocelulosa presente en la pared celular vegetal provee la flexibilidad necesaria que facilita el crecimiento y desarrollo de la planta, dándole la fuerza y rigidez que necesita para enfrentar los ataques físicos y microbianos. La lignocelulosa, como su nombre lo indica, consisten en lignina (15-20%), hemicelulosas (25-30%) y celulosa (40-50%) (Gray *et al.*, 2006; Singla *et*

al., 2012). Estos componentes juntos forman una red compleja tridimensional con la ayuda de interacciones covalentes y no covalentes (Sánchez, 2009).

El xilano es el segundo polisacárido más abundante que cubre el 33% de la biomasa lignocelulósica total que se encuentra en el mundo (Walia et al., 2017). La degradación del xilano es un proceso complejo que requiere de diferentes enzimas que comprenden xilanasas, xilosidasas, glucuronidasas, acetilxilano esterasas, arabinofuranosidasas, feruloil esterasas entre otras (Walia et al., 2017; Romero-Fernández et al., 2018). Debido a que existe la necesidad de seleccionar microorganismos potentes para la producción de estas enzimas, se crecen estos microorganismos en diferentes fuentes de carbono de bajo costo, como lo son los residuos agroindustriales (Castilho et al., 2000; Panagiotou et al., 2003). La purificación del extracto crudo es un requisito previo para obtener enzimas puras y su caracterización ayuda a dilucidar su estabilidad y especificidad hacia diferentes sustratos. Esto permite la selección del proceso industrial adecuado en que pueden ser utilizadas. Esta revisión da una visión de la clasificación de estas enzimas, su modo de acción y da un enfoque biotecnológico de la utilización de estas enzimas en la industria.

Composición estructural de la lignocelulosa.

Celulosa: Es el principal polisacárido de la pared celular, y consiste en un homopolímero lineal de residuos de β -D-glucopiranosas. Este polisacárido, que es insoluble en agua, se dispone en cadenas paralelas formando una estructura cristalina y también presenta regiones no cristalinas (Lin et al., 1987).

Hemicelulosas: Son los polisacáridos más abundantes y ampliamente distribuidos en el reino vegetal después de la celulosa. Este grupo de heteropolisacáridos, extraíbles por álcali, se puede clasificar en arabinanos, mananos, galactanos o xilanos dependiendo del monómero del cual está constituida su cadena central (Whistler y Richards, 1970); a su vez, esta cadena principal puede tener diversas sustituciones. Las hemicelulosas se asocian con la celulosa mediante puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals (Fillingham, 1999).

Lignina: Es un polifenol heterogéneo, cuyo principal monómero es el p-hidroxifenilpropano, el cual al entrelazarse genera productos aromáticos complejos. La lignina presenta entrecruzamiento con la celulosa y las hemicelulosas. Dos tipos de enlaces covalentes han sido identificados en plantas (Fry, 1986): el entrecruzamiento formado por ácido diferúlico, que se encuentra por ejemplo entre lignina y xilano de trigo (Bach Tuyet Lam et al., 1992) y el entrecruzamiento tipo éster,

entre ácido glucurónico del xilano y lignina, que se ha identificado en el xilano de madera de haya (Imamura et al., 1994).

Proteínas estructurales: Se encuentran en una menor proporción con respecto a los polisacáridos ya mencionados; éstas se clasifican según el aminoácido que se encuentre de forma predominante. Así, es posible encontrar glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGP), en glicina (GRP) o en prolina (PRP) (Taiz y Zeiger, 2006).

Dentro de estos componentes de los residuos agroindustriales, nos centraremos en las hemicelulosas y su principal representante que es el xilano.

Degradación enzimática del xilano.

La degradación de hemicelulosas es un proceso complejo, debido a su composición heterogénea y la variada estructura de los polisacáridos que la conforman. El xilano es uno de los componentes principales de las hemicelulosas. Es un heteroglicano compuesto por una cadena principal de residuos de xilopiranosas unidos por enlaces β (1 \rightarrow 4), con una variedad de sustituyentes unidos por enlaces glicosídicos o éster. En el caso de la paja de cereales, el principal sustituyente es la L-arabinosa (arabinoxilano). Sustituyentes adicionales son los ácidos cinámicos, que están unidos a los residuos de arabinosa (Kabel et al., 2007).

Para llevar a cabo la degradación se requiere de enzimas capaces de hidrolizar los enlaces glicosídicos y ésteres presentes en él (ver Figura 1).

Glicosil Hidrolasas.

Las glicosil hidrolasas (glicanasas) comprenden: a) Endo- β -xilanasas (E.C 3.2.1.8): cortan al azar residuos de la cadena principal de xilano, generando una mezcla de xilooligosacáridos (Collins et al., 2005; Chávez et al., 2006), b) β -xilidasas (E.C 3.2.1.37): hidrolizan disacáridos y oligosacáridos pequeños de xilosa (Ravanal et al., 2013; Faúndez et al., 2019) c) α -glucuronidasas (E.C 3.2.1.139): remueven los residuos de metil glucuronato (Rosa et al., 2013). d) α -L-arabinofuranosidasas (E.C 3.2.1.55): liberan arabinosa de las ramificaciones del xilano (Ravanal et al., 2010; Ravanal y Eyzaguirre, 2015).

Esterasas.

Las esterasas incluyen: a) Acetil xilano esterasas (E.C 3.1.1.72): hidrolizan grupos acetatos (Gordillo et al., 2006). b) Feruloil esterasas (E.C 3.1.1.73): liberan ácido ferúlico o cumárico de las ramificaciones del xilano (Williamson et al., 1998).

Dentro de estos dos grupos nos enfocaremos en las enzimas que degradan los enlaces glicosídicos.

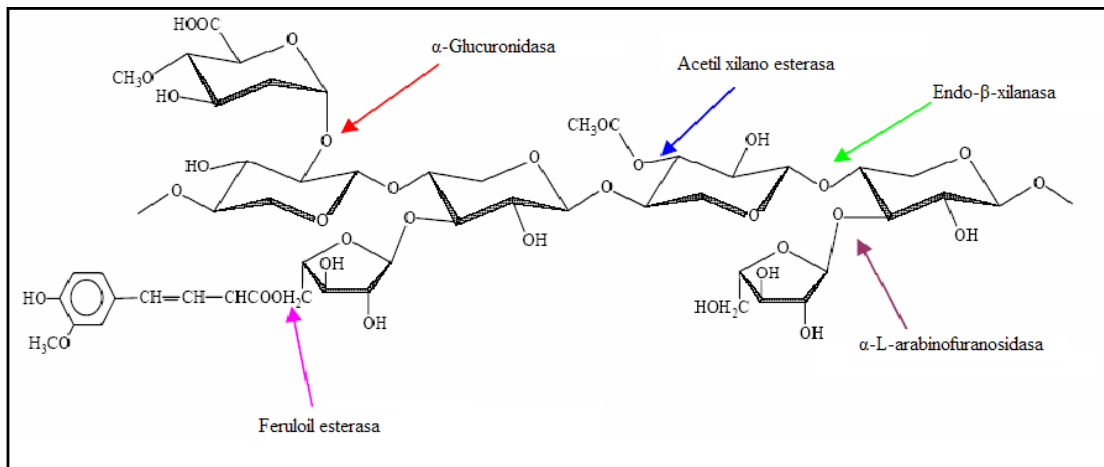


Figura 1. Estructura simplificada del xilano indicando las enzimas involucradas en su degradación. Éste se compone de una cadena principal de residuos de xilosa unidos por enlaces β (1 \rightarrow 4) y por sustituciones de arabinosa, ácido acético, ácido ferúlico o cumárico y ácido metilglucurónico unido a la xilosa de cadena principal. (Adaptado de Shallom y Shoham, 2003).

Figure 1. Simplified structure of xylan indicating the enzymes involved in its degradation. It is composed of a backbone of xylose residues linked by β (1 \rightarrow 4) bonds and by substitutions of arabinose, acetic acid, ferulic or coumaric acid, and methylglucuronic acid linked to the backbone xylose. (Adapted from Shallom and Shoham, 2003).

Mecanismo de acción de las enzimas glicosil hidrolasas.

La hidrólisis del enlace glicosídico catalizada por las distintas variedades de glicosil hidrolasas, está mediada por la acción de dos residuos catalíticos (grupos carboxilo de aspartato o glutamato) presentes en el sitio activo: uno actúa como dador de protones y el otro como nucleófilo o base. El enlace glicosídico puede hidrolizarse de dos formas distintas, basándose en la configuración del carbono anomérico resultante de la hidrólisis. Si la configuración anomérica se mantiene, el mecanismo de acción es con retención (Figura 2a), mientras que en el mecanismo de inversión la configuración anomérica cambia (Figura 2b).

Las glicosil hidrolasas que retienen su configuración, tienen una distancia de separación de los dos carboxilos catalíticos de aproximadamente 5,5 Å, mientras que en las enzimas que invierten su configuración, su distancia es de alrededor de 10 Å (Rye y Withers, 2000).

Aplicaciones en la industria de las glicosil hidrolasa.

En la actualidad son numerosos los residuos y desechos que se generan a partir de procesos agroindustriales, como lo es en la industria azucarera, del arroz, maíz y cereales. Dentro de estos residuos podemos encontrar sustratos particularmente útiles para el desarrollo y crecimiento de hongos como la coseta de remolacha, la paja de trigo y de arroz, coronta de maíz, cáscara de

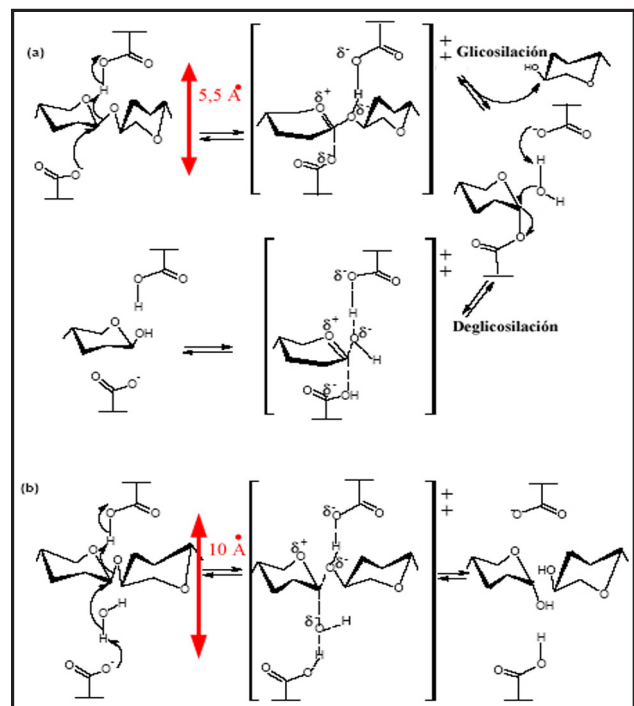


Figura 2. Mecanismo de hidrólisis del enlace glicosídico. El esquema representa lo que ocurre en el sitio catalítico de las glicosil hidrolasas que opera mediante (a) mecanismo de retención (b) mecanismo de inversión. Adaptado de Rye y Withers (2000).

Figure 2. Mechanism of glycosidic bond hydrolysis. The diagram represents what happens in the catalytic site of glycosyl hydrolases that operates through (a) retaining mechanism (b) inverting mechanism. Adapted from Rye and Withers (2000).

plátano, bagazo de caña de azúcar y otras frutas que son ricas en celulosa, hemicelulosas y pectinas (John et al., 2007; Cintra et al., 2020).

Los cultivos de hongos resultan promisorios para este tipo de aplicaciones ya que se ha descubierto un enorme potencial para optimizar la producción de enzimas de interés biotecnológico (Sanghi et al., 2008). Brasil, una potencia agroindustrial, le ha dado especial importancia al cultivo de hongos utilizando como sustratos residuos provenientes de la agroindustria (Castilho et al., 2000; Panagiotou et al., 2003). Esto ha sido motivado por la búsqueda de soluciones energéticas tales como la producción de biocombustibles, la producción de biopesticidas, compuestos aromáticos, etc. (Soccol y Vanderberghe, 2003).

Los hongos de los géneros *Aspergillus* y *Trichoderma* son bien conocidos por ser potentes productores de glicosil hidrolasas y más ampliamente utilizado para la producción comercial de estas enzimas. También se encuentran estudios con *Tielavia terrestris*, (García-Huante et al., 2017), *Achaetomium* sp. X2-8 (Chadha et al., 2019), *Rhizomucor pusillus* (Hüttner et al., 2018), *Rasamsonia emersonii*, (Martínez et al., 2016), *Talaromyces leycettanus* (Wang et al., 2017), *Aspergillus oryzae* LC1 (Bhardwaj et al., 2019), *Aspergillus fumigatus* MA28 (Bajaj y Abbass, 2011) y *Cladosporium oxysporum* (Guan et al., 2016) entre otros.

La industria panadera y la calidad del pan.

El trigo es una de las plantas alimenticias de más extenso cultivo en el mundo, y es consumido en diferentes formas. El pan es el principal producto del trigo y debe ser almacenado para su posterior consumo. El endure-

cimiento del pan es probablemente el principal problema en la industria panadera, lo que lleva a cuantiosas pérdidas económicas. Los arabinoxilanos son componentes importantes del pan y su rol en la textura y dureza de éste han sido estudiados (Gobbetti et al. 1999).

Los arabinoxilanos son polímeros heterogéneos y se ha propuesto diferentes estructuras para el arabinoxilano del trigo. Por ejemplo, Gruppen et al. (1993) propusieron la existencia de dos regiones: una región muy sustituida con residuos de arabinosa unidos al carbono 2 y/ó 3 de la xilosa y una región que presenta algunas ramificaciones de arabinosa. Estos arabinoxilanos pueden ser escasamente hidrolizados por enzimas presentes en la harina de trigo, por lo cual es importante la adición de enzimas xilanolíticas: xilanasas, xilosidasas y arabinofuranosidasas para la mayor producción de xilosa y arabinosa (Figura 3). Estos monosacáridos son posteriormente fermentados por la bacteria ácido láctica *Lactobacillus hilgardii*, aumentando la producción de ácido acético y CO₂, responsables del sabor y la porosidad del pan (Fessas y Schiraldi, 1998; Jiménez y Martínez-Anaya, 1999; Gobbetti et al., 1999). Así, las arabinofuranosidasas y β-xilosidasas mejoran la calidad del pan y retrasan su endurecimiento, otorgando beneficios económicos a la industria panadera (Martínez-Anaya y Devesa, 1999).

La industria vitivinícola y el aroma de los vinos.

El carácter varietal de los vinos está dado por terpenos, los cuales son los componentes mayoritarios que conforman el aroma. Los terpenos están presentes en dos fracciones distintas: una libre, que contribuye directamente al aroma y otra ligada a azúcares.

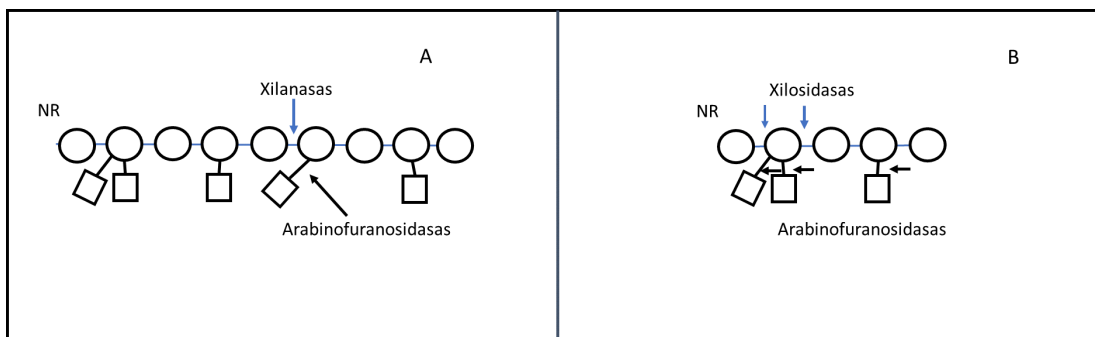


Figura 3. Acción de enzimas xilanolíticas sobre arabinoxilano del trigo: La cadena principal del arabinoxilano es de residuos de xilosa (○—○) unido a residuos de arabinosa en el carbono 2 (◻), en el carbono 3 (◻) y en ambos carbonos 2, 3 (◻). En (A) se señala los sitios de corte de las xilanasas y arabinofuranosidasas. En (B) se indica los sitios de corte por β-xilosidasas y arabinofuranosidasas sobre un producto de la acción de las xilanasas. NR: extremo no reductor. Adaptado de Lee et al., 2003.

Figure 3. The action of xylanolytic enzymes on wheat arabinoxylan: The main chain of arabinoxylan is xylose residues (○—○) linked to arabinose residues at carbon 2 (◻), at carbon 3 (◻) and at both carbons 2, 3 (◻). In (A) the cleavage sites of the xylanases and arabinofuranosidasas are indicated. In (B) the sites of cleavage by β-xylosidasas and arabinofuranosidasas on a product of the action of the xylanases are indicated. NR: non-reducing end. Adapted from Lee et al., 2003.

Esta segunda forma es cuantitativamente superior a la primera y casi no sufre cambios durante el proceso de fermentación de los mostos, llevado a cabo por *Saccharomyces cerevisiae*. Así, el tratamiento con diferentes glicosil hidrolasas, entre las que se encuentran las α -L-arabinofuranosidasas y β -D-xilosidasas, puede ser usado para promover las propiedades organolépticas del vino. Actualmente las enzimas producidas a escala industrial y usadas en la aromatización de vinos y otras bebidas alcohólicas provienen del hongo *Aspergillus niger* (Biskup *et al.*, 1993).

Los terpenos ligados a azúcares siempre están unidos a glucosa (monoglicósidos), a su vez, este monosacárido puede estar unido a arabinosa, ramnosa, xilosa o apiosa (diglicósidos). Estos precursores no volátiles de los aromas se muestran en la Figura 4.

Los terpenos glicosilados pueden ser potencialmente aprovechados para incrementar el aroma del vino. La acción secuencial de dos glicosil hidrolasas sobre los terpenos diglicosilados produce la liberación de terpenos. En un primer paso, dependiendo de la naturaleza del azúcar, actúan las α -L-arabinofuranosidasa, α -L-ramnosidasa, β -D-xilosidasa o β -D-apiosidasa, liberándose arabinosa, ramnosa, xilosa o apiosa. Posteriormente actúan las β -glucosidasas que cortan el enlace entre los terpenos y la glucosa, liberándose así los monoterpenos responsables del aroma (Günata *et al.*, 1988). Los monoterpenos presentes en estos glicósidos son geraniol, nerol, citronelol, linalol y α -terpineol, entre otros.

La industria papelera y el bioblanqueamiento de la pulpa de celulosa.

Tradicionalmente se requieren dos procesos para la obtención de una pulpa de celulosa pura: cocimiento y blanqueamiento. Estos procesos utilizan principalmente hidróxido de sodio y dióxido de cloro, para degradar la lignina presente en la pulpa y responsable del color. La mayoría de las industrias que producen celulosa no recuperan los compuestos organoclorados, los que son altamente tóxicos y mutagénicos. Las regulaciones medioambientales incluyen restricciones en el uso de compuestos clorados en la industria de la celulosa, especialmente en Europa Occidental y Norte América (Araújo *et al.*, 1999). Por ello ha surgido un especial interés en el bioblanqueamiento, como una buena alternativa en el pre-blanqueo de la celulosa.

En el bioblanqueamiento se ha utilizado xilanasas que permiten un reemplazo de 5-7 kg de dióxido de cloro por tonelada de pulpa y una disminución de 2-4 unidades del número Kappa, índice del contenido de lignina en la pulpa de celulosa. La eficiencia de las xilanasas de diferentes hongos ha sido descrita en: *Aspergillus kawachii* (Tenkanen *et al.*, 1997); *Aspergillus oryzae* (Christov *et al.*, 1999); *Aspergillus nidulans* KK-99 (Taneja *et al.*, 2002). También se ha observado sinergismo entre xilanasas y arabinofuranosidasas de *Bacillus stearothersophilus* en la remoción de un 19% de lignina de la pulpa kraft en condiciones alcalinas (Bezalel *et al.*, 1993). La forma exacta en que actúan las enzimas

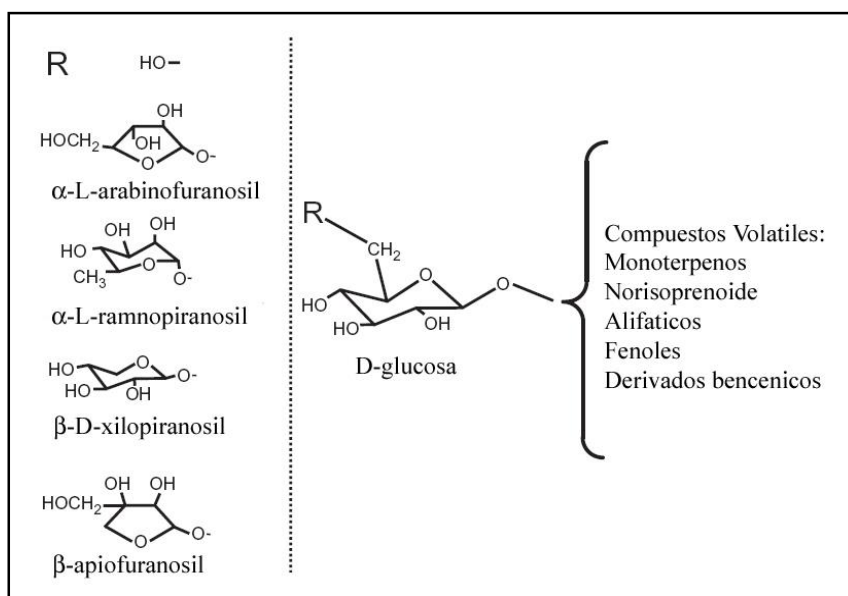


Figura 4. Representación esquemática de terpenos glicosilados: Mono y diglicósidos han sido identificados como precursores del aroma. Adaptado de Williams *et al.*, 1993.

Figure 4. Schematic representation of glycosylated terpenes: Mono and diglycosides have been identified as aroma precursors. Adapted from Williams *et al.*, 1993.

xilanolíticas en el proceso de bioblanqueamiento no está clara, pero existen algunas hipótesis para explicarla. Una de ellas apunta a que estas enzimas remueven el xilano que se encuentra en la superficie de la pulpa, y de esta manera aumenta la permeabilidad de la fibra facilitando el acceso a la lignina (Viikari *et al.*, 1994). Una segunda teoría, basada en el estudio de la estructura de la madera, indica que la lignina está ligada a polisacáridos a través de complejos, por ejemplo, lignina-xilano, así al actuar las enzimas xilanolíticas arrastran también la lignina unida (Buchert *et al.*, 1992).

La industria de los biocombustibles y producción de bioetanol.

La producción de bioetanol a partir de almidón de maíz fue introducida en Estados Unidos en 1900, estableciéndose como una energía segura y generando un positivo impacto en el área rural (Bothast y Schlicher, 2005). Esta corresponde a la primera generación de agrocombustibles, que se obtiene a partir de cultivos como caña de azúcar, maíz y soya.

Por otra parte, también es posible obtener etanol celulósico, llamado de “segunda generación”, que comprende la conversión enzimática de celulosa y hemicelulosas en monosacáridos para su posterior fermentación. La complejidad y heterogeneidad de los arabinoxilanos de las hemicelulosas requiere de complejos sistemas enzimáticos que conviertan estos sustratos en azúcares fermentables. Tal complejo enzimático debe incluir enzimas desramificantes que hidrolicen las cadenas laterales a monosacáridos. La acción sinérgica de las arabinofuranosidasas con otras enzimas lignocelulolíticas, las convierte en agentes adecuados en la sacarificación de varios residuos agrícolas para la producción de biocombustibles (Saha, 2003).

Industria de la producción de alimento para animales.

Las hemicelulosas (principalmente xilanos) representan entre el 30 y 40% de los carbohidratos totales del forraje. Su contribución a la energía dietaria disponible para los animales está a menudo disminuida debido a la baja digestibilidad del forraje (Dehority, 1965). El incremento en su digestibilidad está correlacionado con la disminución del grado de sustitución de los polímeros de hemicelulosas. Por tanto, la presencia de residuos de L-arabinosa dificulta la hidrólisis total de los xilanos y además restringe la acción de otras glicanasas (Greve *et al.*, 1984; Kormelink y Voragen, 1993). Se ha visto que el uso comercial de preparaciones enzimáticas que contienen arabinofuranosidasas aumenta la efectividad de las endoxilanasas debido a que estas últimas prefieren regiones no sustituidas del xilano como sustrato, lo que resulta

en la disminución de la viscosidad de estos alimentos (Mathlouthi *et al.*, 2002).

La industria acuícola y los prebióticos para peces.

El término prebiótico se refiere a fibras no digeribles que estimulan el crecimiento de las bacterias intestinales beneficiosas en el huésped y activan el sistema inmunológico (Roberfroid, 2005). Son agentes naturales que se utilizan para controlar enfermedades y mejorar la salud del animal (Silva y Nornberg, 2003; Huebner *et al.*, 2007). Algunos de los prebióticos más comúnmente aislados de la agricultura incluyen: 1) inulina (Buclaw, 2016); 2) fructooligosacáridos (FOS) presentes en cebada, trigo y centeno (Fuller y Gibson, 1998); 3) xilooligosacáridos (XOS), producidos a partir de algunos desechos agroindustriales (mazorcas de maíz, cáscaras de arroz y paja de cebada) por la acción de xilanasas y arabinofuranosidasas sobre el xilano (Nabarlatz *et al.*, 2007); 4) arabinoxilooligosacáridos (AXOS) contenidos en la pared celular de muchos cereales producto de la hidrólisis de xilanasas sobre el xilano (Grootaert *et al.*, 2007). Los efectos directos de los prebióticos sobre la activación del sistema inmunológico de los peces son de dos formas: A) mediante la estimulación directa del sistema inmunológico innato, o B) mediante la mejora del crecimiento del microbiota comensal (Song *et al.*, 2014).

CONCLUSIÓN

La degradación enzimática del xilano presente en los desechos agrícolas requiere de la acción sinérgica de las xilanasas y otras enzimas desramificantes. Estas enzimas actúan como una alternativa “verde” a los procesos industriales ya existentes para el procesamiento de xilano en diferentes productos de importancia industrial como papel, alimentos y biocombustibles entre otros. La aplicación de estas glicosil hidrolasas en la producción de los productos mencionados anteriormente puede regular la economía global del proceso. Por lo tanto, el método ya existente se puede mejorar más o se pueden desarrollar nuevas estrategias para una producción mejorada y rentable de estas enzimas con las características deseadas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer al Dr. Jaime Eyzaguirre (Universidad Andrés Bello), por sus valiosos comentarios y revisión del manuscrito.

REFERENCIAS

Araújo, J.H.B., Moraes, F.F., Zanin, G.M., 1999. Bleaching of kraft pulp with commercial xylanases. Applied Bioche-

- mistry and Biotechnology 79, 713–722. <https://doi.org/10.1385/abab:79:1-3:713>
- Bach Tuyet Lam, T., Iiyama, K., Stone, B.A., 1992. Cinnamic acid bridges between cell wall polymers in wheat and phalaris internodes. *Phytochemistry* 31, 1179–1183. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)80256-E](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)80256-E)
- Bajaj, B.K., Abbass, M., 2011. Studies on an alkali-thermostable xylanase from *Aspergillus fumigatus* MA28. *3 Biotech* 1, 161–171. <https://doi.org/10.1007/s13205-011-0020-x>
- Bezalel, L., Shoham, Y., Rosenberg, E., 1993. Characterization and delignification activity of a thermostable α -L-arabinofuranosidase from *Bacillus stearothermophilus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 40, 57–62. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00170429>
- Bhardwaj, N., Kumar, B., Agarwal, K., Chaturvedi, V., Verma, P., 2019. Purification and characterization of a thermoacid/alkali stable xylanases from *Aspergillus oryzae* LC1 and its application in xylo-oligosaccharides production from lignocellulosic agricultural wastes. *International journal of biological macromolecules* 122, 1191–1202. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.070>
- Biskup, S., Inert, F., Holthnuijzen, J., Stengele, M., Schultz, G., 1993. Glycosically bound volatiles- A review 1986–1991. *Flavour and Fragrance Journal* 8, 61–80. <https://doi.org/10.1002/ffj.2730080202>
- Bothast, R.J., Schlicher, M.A., 2005. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67, 19–25. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1819-8>
- Buchert, J., Ranua, M., Kantelinem, A., Viikari, L., 1992. The role of two *Trichoderma reesei* xylanases in the bleaching of kraft pulp. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37, 825–829. <https://doi.org/10.1007/BF00174853>
- Buclaw, M., 2016. The use of inulin in poultry feeding: a review. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 100, 1015–1022. <https://doi.org/10.1111/jpn.12484>
- Castilho, L., Polato, C., Baruque, E., Sant' Anna Jr, G., Freire, D., 2000. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid- state and submerged fermentations. *Biochemical Engineering Journal* 4, 239–247. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(99\)00052-2](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(99)00052-2)
- Chadha, B.S., Kaur, B., Basotra, N., Tsang, A. and Pandey, A., 2019. Thermostable xylanases from thermophilic fungi and bacteria: current perspective. *Bioresour Technol* 277, 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.044>
- Chávez, R., Bull, P., Eyzaguirre, J., 2006. The xylanolytic enzyme system of the genus *Penicillium*. *Journal of Biotechnology* 123, 413–433. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.12.036>
- Cintra, L., da Costa, I., Moreira, de Oliveira, I., Fernandes, A., Faria, S., Jesuino, R., Ravanal, M.C., Eyzaguirre, J., Ramos, L., de Faria, F., Ulhoa, C., 2020. The boosting effect of recombinant hemicellulases on the enzymatic hydrolysis of steam-treated sugarcane bagasse. *Enzyme and Microbial Technology* 133, 109447. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109447>
- Collins, T., Gerday, C., Feller, G., 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 3–23. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.06.005>
- Dehority, B., 1965. Degradation and utilization of isolated hemicellulose by pure cultures of cellulolytic rumen bacteria. *The Journal of Bacteriology* 89, 1515–1520. <https://doi.org/10.1128/jb.89.6.1515-1520.1965>
- Faúndez, C., Pérez, R., Ravanal, M.C., Eyzaguirre, J., 2019. *Penicillium purpurogenum* produces a novel, acidic, GH3 beta-xylosidase: Heterologous expression and characterization of the enzyme. *Carbohydrate research* 482, 107738. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.06.017>
- Fessas, D., Schiraldi, A., 1998. Texture and staling of wheat bread crumb: effects of water extractable proteins and pentozans. *Thermochimica Acta* 323, 17–26. <https://doi.org/10.1016/S0040-6031%2898%2900473-0>
- Filligham, J., Kroon, P., Williamson, G., Gilbert, H., Hazlewood, G., 1999. A modular cinnamoyl ester hydrolase from the anaerobic fungus *Piromyces equi* acts synergistically with xylanase and is part of a multiprotein cellulose-binding cellulase-hemicellulase complex. *Biochemical Journal* 343, 215–224. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3430215>
- Fry, S.C., 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annual Review of Plant Physiology* 37, 165–186. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pp.37.060186.001121>
- Fuller, R., Gibson, G.R., 1998. Probiotics and prebiotics: microflora management for improved gut health. *Clinical microbiology and infection* 4, 477–480. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.1998.tb00401.x>
- García-Huante, Y., Cayetano-Cruz, M., Santiago-Hernández, A., Cano-Ramírez, C., Marsch-Moreno, R., Campos, J.E., Aguilar-Osorio, G., Benitez-Cardoza, C.G., Trejo-Estrada, S., Hidalgo-Lara, M.E., 2017. The thermophilic biomass-degrading fungus *Thielavia terrestris* Co3Bag1 produces a hyperthermophilic and thermostable β -1, 4-xylanase with exo- and endo-activity. *Extremophiles* 21, 175–186. <https://doi.org/10.1007/s00792-016-0893-z>
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Arnaut, P., Tossut, P., Corsetti, A., Lavermicocca, P., 1999. Added pentosans in breadmaking: fermentations of derived pentoses by sourdough lactic bacteria. *Food Microbiology* 16, 409–418. <https://doi.org/10.1006/fmic.1998.0254>
- Gordillo, F., Caputo, V., Peirano, A., Chavez, R., Van Beeumen, J., Vandenbergh, I., Claeysens, M., Bull, P., Ravanal, M.C., Eyzaguirre, J., 2006. *Penicillium purpurogenum* produces a family acetyl xylan esterase containing a carbohydrate-binding module: Characterization of the protein and its gene. *Mycological Research* 110, 1129–1139. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycres.2006.07.003>
- Gray, K.A., Zhao, L.S., Emptage, M., 2006. Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biology* 10, 141–146. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.02.035>
- Greve, L., Labavitch, J., Hungate, R., 1984. α -L-arabinofuranosidase from *Ruminococcus albus* 8: purification and possible roles in hydrolysis of alfalfa cell wall. *Applied and Environmental Microbiology* 47, 1135–1140. <https://doi.org/10.1128/aem.47.5.1135-1140.1984>
- Grootaert, C., Delcour, J., Courtin, C., Broekaert, W., Verstraete, W., Van de Wiele, T., 2007. Microbial metabolism and prebiotic potency of arabinoxylan oligosaccharides in

- the human intestine. Trends Food Science Technology 18, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.08.004>
- Gruppen, H., Kormelink, F.J.M., Voragen, A.G.J., 1993. Water-unextractable cell wall material from wheat flour: A structural model of arabinoxylans. Journal of Cereal Science 18, 111–128. <https://doi.org/10.1006/JCRS.1993.1040>
- Guan, G.Q., Zhao, P.X., Zhao, J., Wang, M.J., Huo, S.H., Cui, F.J., Jiang, J.X., 2016. Production and partial characterization of an alkaline xylanase from a novel fungus *Cladosporium oxysporum*. Biomed Research International 2016, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2016/4575024>
- Günata, Z., Bitteur, S., Brillouet, J.M., Bayonove, C., Cordonnier, R., 1988. Sequential enzymic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. Carbohydrate Research 184, 138–149. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(88\)80012-0](https://doi.org/10.1016/0008-6215(88)80012-0)
- Huebner, J., Wehling, R.L., Hutkins, R.L., 2007. Functional Activity of Commercial Prebiotics. International Dairy Journal 17, 770–775. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.10.006>
- Hüttner, S., Granchi, Z., Nguyen, T.T., van Pelt, S., Larsbrink, J., Thanh, V.N., Olsson, L., 2018. Genome sequence of *Rhizomucor pusillus* FCH 5.7, a thermophilic zygomycete involved in plant biomass degradation harbouring putative GH9 endoglucanases. Biotechnology Reports 20, e00279. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00279>
- Imamura, T., Watanabe, K.M., Koshijima, T., 1994. Ester linkages between lignin and glucuronic acid in lignin-carbohydrate complexes from *Fagus crenata*. Phytochemistry 37, 1165–1173. <https://doi.org/10.1007/BF00386018>
- Jiménez, T., Martínez-Anaya, M., 1999. Enzymes, a key to improve bread and dough quality: degradation by products and relationship with quality. In Abstracts of the 17th ICC Conference of the Cereal Across the Continents, 6–9 June. Instituto de Agroquímica Tecnológica de Alimentos. Valencia.
- John, R.P., Nampoothiri, K.M., Pandey, A., 2007. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. Applied Microbiology and Biotechnology 74, 524–534. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0779-6>
- Kabel, M.A., van den Borne, H., Vincken, J.P., Voragen, A.G.J., Schols, H.A., 2007. Structural differences of xylans affect their interaction with cellulose. Carbohydrate Polymers 69, 94–105. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.09.006>
- Kormelink, F., Voragen, A., 1993. Degradation of different [(glucurono)arabino]xylans by combination of purified xylan degrading enzymes. Applied Microbiology Biotechnology 38, 688–695. <https://doi.org/10.1007/BF00182811>
- Lee, R.C., Hrmova, M., Burton, R.A., Lahnstein, J., Fincher, G.B., 2003. Bifunctional Family 3 Glycoside Hydrolases from Barley with α -L-arabinofuranosidase and β -D-xylosidase Activity. The Journal of Biological Chemistry 278, 5377–5387. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210627200>
- Lin, J.S., Tang, M.-Y., Fellers, J.F., 1987. Fractal analysis of cotton cellulose as characterized by small-angle X-ray scattering. American Chemical Society Symposium Series 340, 233–254.
- Malherbe, S., Cloete, T., 2003. Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications: A review. Environmental Science and Biotechnology 1, 105–114. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1020858910646>
- Martínez-Anaya, M., Devesa, A., 1999. Enzymes and sourdough starters govern bread and dough quality: influence on dough-bread pentosans. Abstracts of the 17th ICC Conference of the Cereal Across the Continents. Valencia.
- Martínez, P.M., Appeldoorn, M.M., Gruppen, H., Kabel, M.A., 2016. The two *Rasamsonia emersonii* α -glucuronidases, ReGH67 and ReGH115, show a different mode-of-action towards glucuronoxylan and glucuronoxyloligosaccharides. Biotechnology for biofuels 9, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0519-9>
- Mathlouthi, N., Saulnier, L., Quemener, B., Araier, L., 2002. Xylanase and α -glucanase and other side enzymatic activities have greater effects on the viscosity of several feedstuffs than xylanase and α -glucanase used alone or in combination. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50, 5121–5127. <https://doi.org/10.1021/jf011507b>
- Nabarlatz, D., Ebringerova, A., Montane, D., 2007. Autohydrolysis of agricultural byproducts for the production of xylo-oligosaccharides. Carbohydrate Polymers 69, 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.08.020>
- Panagiotou, G., Topakas, E., Economou, L., Kekos, D., Marcris, B.J., Christakopoulos, P., 2003. Induction, purification, and characterization of two extracellular α -L-arabinofuranosidases from *Fusarium oxysporum*. Canadian Journal of Microbiology 49, 639–644. <https://doi.org/10.1139/w03-077>
- Ravanal, M.C., Alegría-Arcos, M., González-Nilo, F.D., Eyzaguirre, J., 2013. *Penicillium purpurogenum* produces two GH family 43 enzymes with β -xylosidase activity, one monofunctional and the other bifunctional: Biochemical and structural analyses explain the difference. Archives of Biochemistry and Biophysics 540, 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.10.017>
- Ravanal, M.C., Callegari, E., Eyzaguirre, J., 2010. A novel bifunctional α -L-arabinofuranosidase/xylobiohydrolase (ABF3) from *Penicillium purpurogenum*. Applied and Environmental Microbiology 76, 5247–5253. <https://doi.org/10.1128/aem.00214-10>
- Ravanal, M.C., Eyzaguirre, J., 2015. Heterologous expression and characterization of α -L-arabinofuranosidase 4 from *Penicillium purpurogenum* and comparison with the other isoenzymes produced by the fungus. Fungal Biology 119, 641–647. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.04.001>
- Roberfroid, M.B., 2005. Introducing inulin-type fructans. British Journal Nutrition 93, 13–26. <https://doi.org/10.1079/bjn20041350>
- Romero-Fernández, M., Moreno-Perez, S., Orrego, A.H., de Oliveira, S.M., Santamaría, R.I., Díaz, M., Guisan, J.M., Rocha-Martin, J., 2018. Designing continuous flow reaction of xylan hydrolysis for xylooligosaccharides production in packed-bed reactors using xylanase immobilized on methacrylic polymer-based supports. Bioresource tech-

- nology 266, 249–258. <https://doi.org/10.1016/j.bior-tech.2018.06.070>
- Rosa, L., Ravanal, M.C., Mardones, W., Eyzaguirre, J., 2013. Characterization of a recombinant α -glucuronidase from *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Biology* 117, 380–387. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.04.002>
- Rye, C., Withers, S., 2000. Glycosidase mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology* 4, 573–580. [https://doi.org/10.1016/s1367-5931\(02\)00380-0](https://doi.org/10.1016/s1367-5931(02)00380-0)
- Saha, B., 2003. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30, 279–291. <https://doi.org/10.1007/s10295-003-0049-x>
- Sánchez, C., 2009. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversión by fungi. *Biotechnology Advances* 27, 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>
- Shallom, D., Shoham, Y., 2003. Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology* 6(3), 219–228. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(03\)00056-0](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(03)00056-0)
- Silva, L.P., Nornberg, J.L., 2003. Prebiotics in the Nutrition of Non-Ruminants. *Ciencia Rural* 33, 983–990.
- Singla, A., Paroda, S., Dhamija, S.S., Goyal, S., Shekhawat, K., Amachi, S., Inubushi, K., 2012. Bioethanol production from xylose: problems and possibilities. *Journal of Biofuels* 3, 1–17. <http://dx.doi.org/10.5958/j.0976-3015.3.1.004>
- Song, S., Beck, B., Kim, D., Park, J., Kim, J., Kim, H., Ringo, E., 2014. Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: A review. *Fish & Shellfish Immunology* 1, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.06.016>
- Taneja, K., Gupta, S., Kuhad, R.C., 2002. Properties and application of a partially purified alkaline xylanase from an alkalophilic fungus *Aspergillus nidulans* KK-99. *Bioresource Technology* 85, 39–42. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00064-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00064-0)
- Tenkanen, M., Makkonen, M., Perttula, M., Viikari, L., Telemán, A., 1997. Action of *Trichoderma reesei* mannanase on galactoglucomannan in pine kraft pulp. *Journal of Biotechnology* 57, 191–204. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(97\)00099-0](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(97)00099-0)
- Viikari, L., Kantelinen, A., Sundquist, J., Linko, M., 1994. Xylanases in bleaching-from an idea to the industry. *FEMS Microbiology Reviews* 13, 335–350. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00053.x>
- Walia, A., Guleria, S., Mehta, P., Chauhan, A., Parkash, J., 2017. Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. *3 Biotech* 7, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0584-6>
- Wang, X., Ma, R., Xie, X., Liu, W., Tu, T., Zheng, F., You, S., Ge, J., Xie, H., Yao, B., Luo, H., 2017. Thermostability improvement of a *Talaromyces leycettanus* xylanase by rational protein engineering. *Scientific Reports* 7, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12659-y>
- Whistler, R., Richards, E., 1970. The Carbohydrates, Chemistry and Biochemistry, 2ª edición, in: Pigman, W., Horton, D. (Eds.), Academic Press, New York, pp. 447–469.
- Williams, P.J., 1993. Hydrolytic flavor release in fruit and wines through hydrolysis of non-volatile precursors, in Acree, T.E., Teranishi, R. (Eds.), *Flavor Science Sensible Principles and Techniques*. ACS Professional Reference Book Series. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 287–303.
- Williamson, G., Kroon, P., Faulds, C., 1998. Hairy plant polysaccharides: a close shave with microbial esterases. *Microbiology* 144, 2011–2023. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-144-8-2011>

