

Identificación de Xilanasas GH10 en las cepas 2 y Mz5 de *Pseudobutyrvibrio xylanivorans*

D.J. Grilli^{ae}; J. Mrázek^b; M.E. Cerón^c; V. Egea^d; S. Paez Lama^d,
M. Sosa Escudero^e y G.N. Arenas^e

Recursos Humanos en Formación: D. Carcaño, N. Sohaefer y A. Fernández

^aFacultad de Ciencias Veterinarias y Ambientales, Universidad Juan Agustín Maza,
Mendoza, Argentina

^bInstitute of Animal Physiology and Genetics. Academy of Sciences of
the Czech Republic Praha, Czech Republic

^cCentro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas, Instituto Nacional de Tecnología
Agropecuaria (INTA), Castelar, Buenos Aires, Argentina

^dInstituto Argentino de Investigaciones de las Zonas Áridas, Centro Científico y Tecnológico,
Mendoza, Argentina

^eFacultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina
dieogrilli@yahoo.com.ar

Palabras Claves: rumen; cabra Criolla; xilanasas; gen; xilano; *Pseudobutyrvibrio xylanivorans*; *Pseudobutyrvibrio ruminis*

Resumen

El rumen contiene una población bacteriana encargada de la degradación del xilano, el principal componente de la hemicelulosa presente en la pared celular vegetal de los forrajes que consumen las cabras. Las bacterias del rumen, principalmente los géneros *Butyrvibrio* y *Pseudobutyrvibrio*, sintetizan una gama de enzimas xilanólíticas para la digestión eficaz de los componentes de la pared celular. Los genes que codifican para xilanasas pertenecientes a la familia glicosil hidrolasa 11 (GH11) y la actividad xilanasas asociada han sido identificados en la cepa tipo (Mz5) de *P. xylanivorans*. Por el contrario, poco se sabe acerca de la diversidad y distribución de los genes xilanasas GH10 en otras cepas de *Pseudobutyrvibrio*. // El objetivo del presente estudio fue identificar genes xilanasas GH10 en *P. ruminis* 153, *P. xylanivorans* 2 y Mz5. Además, se evaluó la degradación y utilización de xilano por las cepas aisladas del rumen de cabras Criollas. Se identificó un gen xilanasas (*xynAPx*) en *P. xylanivorans* 2 y otro gen xilanasas diferente (*xynBMz5*) en *P. xylanivorans* Mz5. Estos genes se relacionaron con enzimas presentes en especies de *Butyrvibrio*. *P. xylanivorans* 2 fue capaz de utilizar hasta el 53% de las pentosas totales presentes en el xilano de la madera de abedul (BWx) y utilizar hasta el 62% del BWx. // La presencia de genes xilanasas GH10 y la actividad xilanasas reportada en *P. xylanivorans* 2, permitió concluir el rol funcional de esta cepa en la degradación de la hemicelulosa presente en forrajes con abundante contenido de fibra vegetal. Esta característica podría ser uno de los mecanismos de adaptación de los

caprinos Criollos para el aprovechamiento de forrajes de baja calidad nutricional que consumen en el campo natural.

Introducción

La población bacteriana del rumen trabaja sinérgica-mente para hidrolizar eficientemente los polisacáridos de la pared celular vegetal mediante la producción de diferentes enzimas, tales como celulasas, hemicelulasas, oxidasas, etc. (Flint y Bayer, 2008; Brulc *et al.*, 2009). La hidrólisis de la pared celular vegetal es un proceso complejo en el que la digestión de la hemicelulosa es el paso inicial para la posterior hidrólisis de la celulosa (Ohgren *et al.*, 2007). El xilano es el componente principal de la hemicelulosa y su hidrólisis completa requiere de la enzima β -1,4-D-xilanasas para escindir al xilano en pequeños xilooligosacáridos de diferentes longitudes (Collins *et al.*, 2005). // El microambiente ruminal contiene una población bacteriana encargada específicamente de la degradación del xilano y es un ambiente ideal para estudiar la diversidad genética de las xilanasas funcionales. Las bacterias del rumen, principalmente representadas por los géneros *Butyrvibrio* y *Pseudobutyrvibrio*, sintetizan una amplia gama de enzimas xilanólíticas para la digestión eficaz de los componentes polisacáridos de la pared celular de los forrajes (Dehority, 1967; Hespell *et al.*, 1987; Mannarelli *et al.*, 1990; Lin y Thomson, 1991; Hespell y Cotta, 1995; Cotta y Zeltwanger, 1995; van Gylswyk *et al.*, 1996; Marinšek-Logar *et al.*, 2000; Zorec *et al.*, 2001;

Kopečný *et al.*, 2003; Čepeljnik *et al.*, 2004). //A partir de las especies bacterianas *B. fibrisolvans* y *P. xylanivorans* se han aislado y caracterizado sólo unas pocas xilanasas (Lin y Thompson, 1991; Cepeljnik *et al.*, 2002; Cepeljnik *et al.*, 2004). La cepa tipo de *P. xylanivorans* (Mz5) produce múltiples xilanasas (Zorec *et al.*, 2000; 2001; Čepeljnik *et al.*, 2004) responsables de la mayor actividad xilanolítica entre las bacterias del rumen analizadas hasta el presente (Marinšek-Logar *et al.*, 2000). Muy poca información está disponible sobre la capacidad de otras cepas de *P. xylanivorans* para degradar xilano y utilizar los productos metabolizados para su crecimiento. //Recientemente, Grilli *et al.* (2013) reportaron dos cepas bacterianas de las especies bacterianas ruminales *P. xylanivorans* 2 y *Pseudobutyrvibrio ruminis* 153, aisladas a partir del rumen de cabras Criollas alimentadas con forrajeras nativas. No se dispone aún información acerca de la presencia de genes codificantes para enzimas xilanasas en estas cepas recientemente reportadas. //Las herramientas moleculares que permiten la identificación y secuenciación de genes también se han utilizado para explorar la diversidad genética de estas enzimas fibrolíticas producidas por las bacterias ruminales (Flint *et al.*, 1994; Dalrymple *et al.*, 1999). Esto ha permitido una mayor comprensión de la diversidad de genes que codifican para estas enzimas, su distribución en las diversas bacterias y sus roles en la degradación de los polisacáridos de la pared celular vegetal (Flint *et al.*, 2008; Qi *et al.*, 2008; Berg Miller *et al.*, 2009). //Wang *et al.* (2011a), a partir del contenido ruminal de cabras, informaron recientemente un gran número de fragmentos de genes que codifican para xilanasas que pertenecen a la familia 10 (GH10) y 11 (GH11) de enzimas glicosil hidrolasa. Estas dos familias de enzimas presentan diferentes propiedades físico-químicas, cinéticas y catalíticas, y sus diferentes distribuciones podrían explicar sus distintos roles en la degradación del xilano en el rumen (García Campayo *et al.*, 1993; Biely *et al.*, 1997). //Las secuencias de xilanasas GH 10 relacionadas al género *Bacteroides* fueron dominantes en el rumen de las cabras, y la mitad de estas secuencias estuvieron estrechamente relacionadas con las xilanasas de *Prevotella* spp. (Flint *et al.*, 2008), uno de los géneros bacterianos más importantes involucrados en la degradación del xilano en el rumen (Gasparic *et al.*, 1995). *B. fibrisolvans* también juega un rol importante en la degradación del xilano y de la hemicelulosa contenida en la pared celular de diversas especies vegetales forrajeras (Hespell y Cotta, 1995), aunque las secuencias de genes xilanasas de *B. fibrisolvans* u otras especies bacterianas similares a los butyrvibrios aún no han sido identificadas en el rumen de las cabras. //Los genes que codifican para xilanasas han sido identificados en diferentes cepas de *B. fibrisolvans* y *P. ruminis* (Mannarelli *et al.*, 1990; Lin y Thomson, 1991; Dalrymple *et al.*, 1999). Estas bacterias ruminales producen sólo xilanasas GH10 (Dalrymple *et al.*, 1999). A su vez, *P. xylanivorans* Mz5 posee un potente sistema enzimático xilanolítico (Čepeljnik *et al.*, 2004) y los genes que codifican para xilanasas GH11 fueron identificados a partir de esta cepa (Čepeljnik *et al.*, 2004; 2006), aunque todavía no se han identificado genes que codifican para

xilanasas GH10 en esta especie. //El objetivo del presente trabajo fue identificar y caracterizar el repertorio de genes endógenos que codifican para hemicelulasas (xilanasas) en las cepas wild type (*P. ruminis* 153 y *P. xylanivorans* 2), aisladas del rumen de cabras Criollas y en la cepa tipo (Mz 5) de la especie *P. xylanivorans*. //Por otro lado, se pretende evidenciar la actividad hemicelulolítica de las enzimas codificadas por dichos genes mediante ensayos in vitro de degradación de la hemicelulosa (xilano) por las cepas aisladas del contenido ruminal de cabras Criollas.

Metodología

Se utilizaron las cepas de bacterias, anaerobias estrictas, hemicelulolíticas aisladas a partir del rumen de caprinos de biotipo Criollo alimentados con forrajeras nativas del NE de Lavalle (Grilli *et al.*, 2013). Dichas cepas, denominadas *Pseudobutyrvibrio ruminis* 153 y *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* 2 se mantuvieron en el laboratorio a -20 °C y periódicamente se reactivaron en un medio anaerobio (RGM medium) que contenía 0,2% de celobiosa como fuente de energía (Hespell *et al.*, 1987). //Los experimentos para evaluar la degradación y utilización del xilano en diferentes periodos de tiempo fueron iniciados con el cultivo de las cepas *P. ruminis* 153 y *P. xylanivorans* 2 congeladas, previamente reactivadas. Para ello, las cepas fueron inicialmente inoculadas en el medio RGM e incubadas a 39 °C durante 24

h. Posteriormente, las mismas fueron inoculadas (0,3 mL) en un medio de cultivo que contenía 0,4 g L⁻¹ de xilano proveniente de la madera del abedul (BWV, Sigma, USA). Los cultivos fueron incubados a 39 °C desde el tiempo 0 (control) y durante 2, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h. El crecimiento bacteriano en los cultivos fue cuantificado mediante la medición de las concentraciones de proteína celular bacteriana (Lowry *et al.*, 1951), desde lisados celulares (NaOH 0,1 M, 70 °C, 20 min) y utilizando albúmina sérica bovina (Sigma, USA) como proteína estándar. //Los carbohidratos presentes en las muestras de cultivo fueron separados en: carbohidratos solubles en una solución de etanolácido acético (xilooligosacáridos) y carbohidratos precipitables en la solución de alcohol ácido (xilano sin degradar). //Para precipitar el xilano, una fracción del cultivo fue tratada con 3 volúmenes de solución fría de ácido acéticoetanol (95 % etanol y 5 % de ácido acético glacial). La mezcla se mantuvo en hielo por 30 min y luego fue centrifugada (16.000 x g, 4 °C, 10 min). El sobrenadante fue fraccionado como xilano soluble en alcoholácido (XSA). El precipitado fue lavado con la solución fría de ácido acéticoetanol y nuevamente centrifugado (16.000 x g, 4 °C, 10 min). El sobrenadante fue descartado y el precipitado fue resuspendido en 5% de NaOH. Esta suspensión fue centrifugada a 16.000 x g, 10 min y el sobrenadante recuperado fue utilizado como la fracción insoluble en alcoholácido (XIA). Los carbohidratos presentes en las fracciones XSA y XIA fueron analizados para determinar el contenido de pentosas totales según el método del orcinol, utilizando xilosa como estándar (Schneider, 1957). //La utilización del xilano se calculó desde la pérdida total de pentosas y la degradación fue estimada a partir de la cantidad de pentosas presentes en el xilano

que se convierten desde una forma insoluble a una forma soluble en el alcohol acidificado (Dehority, 1967). La actividad xilanasas fue medida en las cepas seleccionadas luego de cultivarlas en el medio xilano durante 48 h. El sobrenadante del medio de cultivo fue recuperado por centrifugación (12,500 x g, 30 min, 4 °C). Posteriormente, 20 µL del sobrenadante fueron agregados a 230 µL de una suspensión de xilano al 1 % en buffer fosfato de sodio 50 mM. Esta mezcla se incubó a 37 °C durante 3 h. //La actividad xilanasas fue determinada por la medición de la liberación de azúcares reductores y expresada como nanomoles de azúcares reductores liberados por segundo por miligramo de proteína (nkat mg⁻¹). El contenido de azúcares reductores fue cuantificado por el método de Somogyi como lo describió Nelson (1944), con la utilización de xilosa como estándar. // Las cepas *P. ruminis* 153, *P. xylanivorans* 2 y la cepa tipo (Mz5) de *P. xylanivorans* fueron utilizadas para la identificación de genes xilanasas GH10. La cepa Mz5 fue gentilmente aportada por los Dres. Jan Kopečný y Jakub Mrázek del laboratorio de Microbiología Anaerobia del Instituto de Fisiología y Genética Animal (Praga, República Checa). //Las cepas seleccionadas fueron reactivadas en el medio SFR e incubadas a 39°C durante 24 h en condiciones de anaerobiosis. Las bacterias fueron sedimentadas por centrifugación a 5.000 x g, 5 min y el "pellet" fue resuspendido en 3 mL de Tris-EDTA 5 mM (pH 8,0) y nuevamente centrifugado (5.000 x g, 5 min). El "pellet" final resultante fue almacenado a -20 °C. El ADN bacteriano fue extraído y purificado a partir del "pellet" bacteriano utilizando el kit *DNeasy Blood and Tissue* (Qiagen, USA) según el protocolo para bacterias Gram positivas provisto por el fabricante. //Dos pares de "primers" específicos para genes xilanasas GH10: gen *xynA* (forward 5'-ACTATGGACGAACGTCTT-GA-3' y reverse 5'-CCTTTTACCCTGGTTGAT-3') y gen *xynB* (forward 5'-AAGTGGTTTTCTGCGA-3' y reverse 5'-TAATGAAGTCTCTTTTCC-3'), fueron utilizados para amplificar estos fragmentos a partir del ADN purificado según el sistema de reacción y las condiciones de PCR informadas por Dalrymple et al. (1999). Los productos de PCR de las cepas evaluadas fueron visualizados en un gel de agarosa y las bandas del tamaño esperado (315 pb, aproximadamente) fueron cortadas y purificadas con el kit *NucleoTraP@CR* para purificación de ADN en gel de agarosa (Macherey-Nagel, Alemania). //El ADN purificado fue secuenciado con el kit BigDye Terminator v3.1 (Life, USA) como se indica en el protocolo del fabricante. Las mezclas de reacción para secuenciación fueron analizadas por electroforesis en el secuenciador de ADN Applied Biosystems 373A. Para cada gen evaluado, el producto de PCR se secuenció completamente en ambas direcciones de la hebra de ADN ("forward" y "reverse"). //Los productos fueron secuenciados en el laboratorio de Genómica del Instituto de Biotecnología, perteneciente al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) en Castelar, Buenos Aires. Después de editar, las secuencias de los genes *xynA* y *xynB* presentes en las cepas aisladas se compararon con secuencias relacionadas, reportadas por Dalrymple et al. (1999) y publicadas en la base de datos de nucleótidos del EMBL y del GenBank (NCBI). //Para

la realización del análisis filogenético las secuencias fueron alineadas con MUSCLE (v3.7) configurado para una mayor precisión (Edgar, 2004). Después de la alineación, las posiciones con "gaps" fueron retiradas del alineamiento. El árbol filogenético fue construido utilizando el método "neighbor joining" del paquete PHYLIP (v3.66) (Felsenstein, 1989). El número de remuestreos ("bootstrap") utilizados fue 1000. Las distancias filogenéticas se calcularon utilizando FastDist y el modelo de sustitución Kimura 2 parámetros (Elias y Lagergren, 2007). La representación gráfica y la edición del árbol filogenético se realizaron con TreeDyn (v198.3) (Chevenet et al., 2006).

Resultados y Discusión

Las cepas *P. xylanivorans* 2 y *P. ruminis* 153 fueron evaluadas por su actividad xilanolítica. Para ello, la utilización de las pentosas totales fue analizada mediante el cultivo de las cepas en un medio con xilano como la única fuente de energía. Aproximadamente el 53 % del xilano presente en el medio de cultivo fue utilizado dentro de las primeras 12 h por la cepa *P. xylanivorans* 2 y este valor se mantuvo constante hasta las 72 h de incubación. La utilización del xilano alcanzó su máximo valor 6 h después que la cepa *P. xylanivorans* 2 inició la degradación del xilano. Esto coincide con lo reportado por Dehority (1967) para varias cepas de *B. fibrisolvans*. //La máxima utilización del xilano por *P. xylanivorans* 2 ocurrió a las 12 h de incubación, lo que coincide con lo reportado para la cepa H17c de *B. fibrisolvans* (Hespell y Cotta, 1995), mientras que la utilización máxima del xilano alcanzada por la cepa B14 de la bacteria ruminal *Prevotella bryantii*, ocurrió luego de 24 h de incubación (Miyazaki et al., 1997). *P. xylanivorans* 2 degradó la mayor parte del xilano (48%) durante las primeras 6 h y alcanzó la máxima degradación (62%) luego de 24 h de incubación para mantenerse en valores relativamente constantes hasta las 72 h. Estos datos fueron similares a los obtenidos utilizando otras fuentes de xilano para algunas cepas de *Butyrivibrio fibrisolvans* (Dehority, 1967). //Cotta y Zeltwanger (1995) informaron que las bacterias ruminales *B. fibrisolvans* y *Selenomonas ruminantium* degradaron el 52 y 55% del xilano en las primeras 3 y 8 h, respectivamente, mientras que la cepa B14 de *Prevotella bryantii* degradó el 46% del xilano en las primeras 15 h de incubación (Miyazaki et al., 1997). La utilización del xilano por la cepa *P. ruminis* 153 apenas superó el 10% luego de las primeras 6 hs de incubación (Gráfico 2). //Debido a que la mayoría de las cepas de *P. ruminis* reportadas por Dalrymple et al. (1999) y Kopečný et al. (2003) no son xilanolíticas, los valores poco significativos de utilización y degradación del xilano de la cepa *P. ruminis* 153, la ubican en la clasificación de estos autores. La cepa pudo haber crecido en este medio debido a la presencia de pequeñas cantidades de xilooligosacáridos y otros carbohidratos presentes en el fluido ruminal con el que se preparó el medio de cultivo con xilano (Hespell et al., 1987). //La Figura 1 muestra la utilización de las pentosas presentes en las fracciones solubles e insolubles en alcoholácido del xilano y la cuantificación del crecimiento de la cepa *P. xylanivorans* 2 mediante la evaluación del contenido de proteína celular.

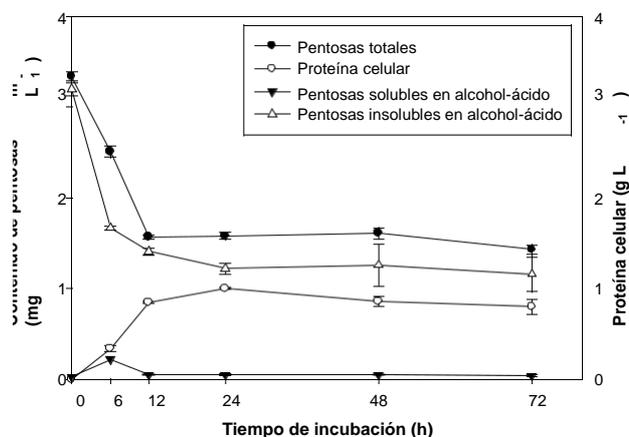


Figura 1. Utilización de las fracciones solubles e insolubles en alcohol-ácido del xilano según el tiempo de incubación de la cepa *P. xylanivorans 2*

La escasa acumulación de pentosas solubles en alcohol acidificado (xilooligosacáridos) durante el crecimiento de la cepa *P. xylanivorans 2* en el medio que contiene xilano (Figura 1), sugiere que los productos de degradación fueron metabolizados tan rápidamente como fueron generados y que esta cepa bacteriana fue capaz de aprovechar la mayoría de los xilooligosacáridos generados por la hidrólisis del xilano. La actividad xilanolítica de las xilanasas secretadas en el sobrenadante del medio cultivo fue $1,04 \pm 0,30$ nkat mg⁻¹. Este valor representó sólo el 5% de la actividad xilanolítica de la enzima *XynA11* de *P. xylanivorans Mz5* reportada por Čepeljnik *et al.* (2004), que utilizó la misma fuente de xilano y las mismas condiciones de cultivo. //Mediante el uso de dos pares de "primers" específicos, fueron amplificados fragmentos de aproximadamente 315 pb de genes xilanasas GH10 a partir del ADN genómico de *P. xylanivorans 2* y *P. xylanivorans Mz5*. A partir del ADN extraído de la cepa *P. ruminis 153* no hubo amplificación de ningún fragmento del gen xilanasas GH10. Los productos de PCR de las cepas *P. xylanivorans 2* (*xynAPx*) y *Mz5* (*xynBMz5*) fueron secuenciados y sus secuencias fueron depositadas en el GenBank con el número de acceso **JQ948036** y **JX136954**, respectivamente. El análisis filogenético realizado permitió la construcción de un dendrograma (Figura 2) con las secuencias obtenidas y las secuencias homólogas seleccionadas por Dalrymple *et al.* (1999).

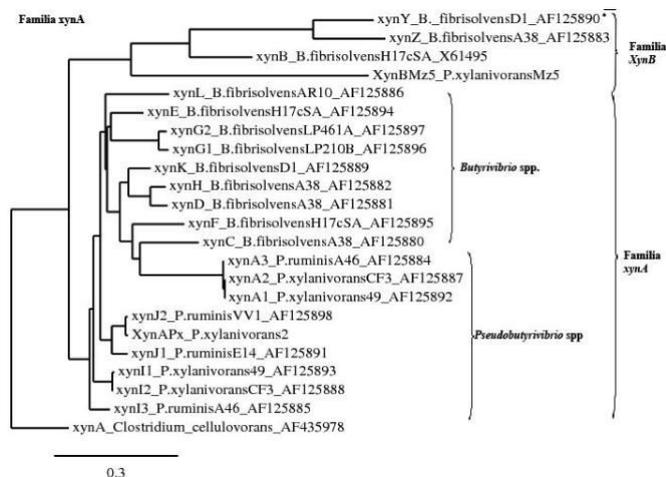


Figura 2. Árbol filogenético que muestra las relaciones de los genes xilanasas GH 10 de diferentes cepas de *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Pseudobutyrvibrio ruminis* y *Pseudobutyrvibrio xylanivorans*. Barra, 30 sustituciones por cada 100 nucleótidos. El árbol se construyó utilizando el análisis "neighbour-joining" a partir de una matriz de distancias obtenida del alineamiento múltiple de las secuencias. El gen *xynA* de *Clostridium cellulovorans* se utilizó como una secuencia exo-grupo. *Número de acceso al GenBank para las secuencias de nucleótidos de genes xilanasas.

El gen *xynBMz5* de *P. xylanivorans Mz5* fue designado a la familia de genes *xynB* y claramente formó un grupo aparte junto a las secuencias de genes *xynB*, *xynZ* y *xynY* obtenidos a partir de diversas cepas de *B. fibrisolvens*. El análisis filogenético permitió la división de los genes homólogos a *xynA* en dos grupos. El primer grupo contiene el gen *xynAPx* y todas las secuencias de genes xilanasas de la familia *xynA* de las especies de *Pseudobutyrvibrio* recientemente reclasificadas. //Las cepas A46, E14 y VV1 que pertenecían al género *Butyri-vibrio* fueron reclasificadas por Dalrymple *et al.* (1999) dentro de la especie *P. ruminis*. Del mismo modo, las cepas CF3 y 49 que pertenecían al género *Butyrivibrio* fueron reclasificadas por Kopečný *et al.* (2003) dentro de la especie *P. xylanivorans*. El segundo grupo contiene genes xilanasas de la familia *xynA* presentes en varias cepas de *Butyrivibrio fibrisolvens*.

La secuencia de nucleótidos del gen *xynAPx* de *P. xylanivorans 2* fue muy similar a la secuencia del gen *xynJ2* de *P. ruminis VV1* reportada por Dalrymple *et al.* (1999). No ha sido determinada la actividad xilanasas de *P. ruminis VV1* y no ha sido reportada la actividad de la enzima que codifica el gen *xynJ2*. El gen *xynAPx* se relacionó con la familia de genes *xynA* que codifican para la enzima *XynA* identificada en la bacteria ruminal *P. xylanivorans 49*, recientemente reclasificada (Kopečný *et al.*, 2003). //Mannarelli *et al.* (1990) reportaron que la enzima *XynA* permanece asociada a las células bacterianas y no posee actividad arabinosidasa, celulasa, β -glucosidasa o xilosidasa. Esto es característico de las verdaderas endoxilanasas reportadas por Reilly (1981). Hespell *et al.* (1987) informaron que la actividad xilanasas de *XynA* fue constitutiva y que la enzima fue secretada al medio de cultivo. //La actividad xilanasas evaluada en la cepa *P. xylanivorans 2* a partir del sobrenadante del

cultivo, sugiere la posible participación de xilanasas extracelulares en la digestión del xilano. La secuencia de nucleótidos del gen *xynBMz5* de *P. xylanivorans* Mz5 fue designada a la familia de genes *xynB*. El producto predicho del gen *xynB* podría ser una enzima intracelular denominada XynB (Lin y Thomson, 1991). //Dalrymple et al. (1999) propusieron que las enzimas XynA y XynB pueden desempeñar diferentes roles en la degradación de la fibra vegetal. El gen *xynAPx* de *P. xylanivorans* 2 se distanció filogenéticamente del gen *xynBMz5* de *P. xylanivorans* Mz5 y se clasificó en una familia de genes diferente. Esto sugiere que estas cepas poseen diferentes genes xilanasas pero derivan de un ancestro en común. Estos genes pudieron evolucionar de manera independiente porque las cepas de *P. xylanivorans* 2 y *P. xylanivorans* Mz5 fueron aisladas desde dos ambientes ruminales diferentes, pertenecientes a diferentes animales hospedadores (caprinos y bovinos, respectivamente). //Recientemente, Wang et al. (2011a; 2011b) obtuvieron genes xilanasas GH10 a partir del ADN metagenómico del contenido ruminal de cabras. Las similitudes entre la secuencia del gen *xynAPx* con las secuencias del gen *xynGR40* (82%) y *xynGR67* (76%) pueden explicarse debido a que estos genes fueron encontrados en el contenido ruminal de la misma especie hospedadora. La degradación y la utilización del xilano por la cepa *P. xylanivorans* 2 permitió entender el posible papel funcional de la enzima codificada por el gen xilanasas *xynAPx*. Futuros estudios sobre la enzima xilanasas codificada por el gen *xynAPx* serán necesarios para confirmar estos hallazgos. //Dadas las probables limitaciones de los "primers" utilizados en nuestro estudio y la imposibilidad de diseñar un único conjunto de "primers" para PCR, que sean universales para todos los genes que codifican para enzimas xilanasas, no se puede descartar que existan genes aún no identificados que puedan codificar para enzimas xilanasas de la familia GH10 o GH 11 en *P. xylanivorans* 2. //Las enzimas xilanasas GH10 y GH11 son diferentes tanto en su estructura tridimensional (Biely et al., 1997) como en su mecanismo de acción (Jeffries, 1996). Los productos de las xilanasas GH11 pueden ser hidrolizados por las enzimas GH10 (Collins et al., 2005). Por lo tanto, las diferentes distribuciones de estas dos familias explican sus diferentes roles en la degradación del xilano en el rumen (Wang et al., 2011a).

Conclusiones

La actividad xilanasas reportada en la cepa *P. xylanivorans* 2, permite concluir el rol funcional de esta cepa en la degradación de la hemicelulosa presente en la pared celular vegetal. La acción de esta enzima probablemente se relacione con la capacidad de esta cepa para fermentar forrajes con abundante contenido de fibra vegetal. Esta característica podría ser uno de los mecanismos de adaptación de los caprinos Criollos para el aprovechamiento de forrajes de baja calidad nutricional que consumen en el campo natural. //La comparación entre la actividad xilanólítica de *P. xylanivorans* 2 y *P. xylanivorans* Mz5 permite confirmar que la cepa tipo es la principal responsable de la actividad xilanólítica, entre las bacterias del rumen analizadas hasta la actualidad. El rol fun-

cional de *P. ruminis* 153 en el ecosistema ruminal de las cabras Criollas es aún incierto, ya que esta cepa evidenció una escasa actividad xilanólítica. En esta cepa, sólo se ha observado la fermentación de azúcares simples, lo que permite concluir que *P. ruminis* 153 probablemente sobreviva en el ambiente ruminal a expensas de la metabolización de azúcares simples o productos intermedios de la degradación de los polisacáridos presentes en el contenido ruminal. //En este trabajo se identificó uno de los genes responsables de la actividad xilanasas de *P. xylanivorans* 2. Este gen se denominó *xynAPx* y codifica para una enzima xilanasas perteneciente a la familia glicosil hidrolasa GH10. Este es el primer reporte de identificación de genes que codifican para xilanasas GH10 en la especie bacteriana ruminal *P. xylanivorans*. Además, este gen se encuentra relacionado con genes similares, que codifican para enzimas xilanasas XynA, identificados en las especies ruminales *B. fibrisolvens*, *P. ruminis* y *P. xylanivorans*. //La secuencia del gen xilanasas *xynBMz5* de *P. xylanivorans* Mz5 fue asignada a la familia *xynB* de enzimas glicosilhidrolasa GH10. Esta información amplía el repertorio de genes xilanasas presentes en *P. xylanivorans* Mz5. Este hallazgo podría contribuir con la explicación de la importante actividad xilanólítica desarrollada por esta cepa. Se puede concluir que los genes *xynAPx* y *xynBMz5* derivan de un ancestro común, pero están filogenéticamente distanciados. Aparentemente evolucionaron de forma independiente, y se adaptaron a las particulares condiciones de ecosistema ruminales pertenecientes a diferentes especies hospedadoras. // Los resultados de este trabajo proporcionan un marco para la manipulación de la fermentación ruminal en las cabras Criollas. La actividad xilanólítica en el ambiente ruminal podría ser modificada mediante la incorporación de la cepa *P. xylanivorans* 2 o mediante la adición de las enzimas xilanasas producidas por esta cepa al ecosistema ruminal de los caprinos Criollos. Para ello serán necesarios mayores estudios que determinen la capacidad de *P. xylanivorans* 2 para ser utilizada como cepa probiótica o para la utilización de las enzimas xilanasas como aditivos alimentarios. //Por lo tanto, se propone determinar las propiedades probióticas de esta cepa. Para ello, pretendemos determinar la viabilidad de *P. xylanivorans* 2 en condiciones parciales de anaerobiosis, para evaluar su posible manipulación como cepa probiótica y además, evaluar la adhesión de *P. xylanivorans* 2 a las células epiteliales del rumen caprino para estimar el establecimiento de esta bacteria probiótica en el ecosistema ruminal. //Las investigaciones propuestas, también pretenden continuar con los estudios de utilización y degradación de la hemicelulosa por las cepas aisladas, pero esta vez utilizando hemicelulosa como sustrato energético, la cual puede estar contenida en forrajes tradicionales (por ejemplo, el heno de alfalfa) o en los forrajes autóctonos seleccionados por las cabras en pastoreo. De esta manera, se avanzará en el conocimiento del aprovechamiento de los nutrientes contenidos en las forrajeras autóctonas por la microbiota ruminal de los caprinos Criollos y se continuará así con los estudios que intentan comprender los procesos de adaptación de estos animales a los ambientes áridos.

Agradecimientos

Los autores de este trabajo agradecen a la Universidad Juan A. Maza por el apoyo y la fuente de financiamiento para la realización del presente trabajo. También agradecen a Silvio Cravero, Dora Rojas y Marcos Trangoni por su asesoramiento durante los ensayos realizados en Instituto de Biotecnología, perteneciente al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) en Castelar, Buenos Aires y a los bioquímicos Stella Galfré y Sergio Milone del Laboratorio Central de la Universidad Maza y a la Bqca. Marisa Pellegrina y Vet. Laura Martín, por su excelente predisposición para el trabajo y por toda la ayuda brindada.

Bibliografía

- Berg Miller M**, Antonopoulos D, Rincon M, Band M, Bari A. 2009. Diversity and strain specificity of plant cell wall degrading enzymes revealed by the draft genome of *Ruminococcus flavefaciens* FD-1. *PLoS ONE* 4, e6650.
- Biely P**, Vrsanska M, Tenkanen M, Kluepfel D. 1997. Endo- β -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *J Biotechnol* 57, 151–166.
- Bruic J**, Antonopoulos D, Miller M, Wilson M, Yannarell A. 2009. Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 1948–1953.
- Čepeljnik T**, Zorec M, Nekrep F, Marinšek-Logar R. 2002. Isolation of endoxylanases from anaerobic bacterium *Butyrivibrio* sp. Mz5 is possible by anion exchange chromatography on CIM® DEAE-8 monolythic column. *Acta Chim Slov* 49, 401–408.
- Čepeljnik T**, Krizaj I, Marinšek-Logar R. 2004. Isolation and characterization of the *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5T xylanase XynT-the first family 11 endoxylanase from rumen *Butyrivibrio*-related bacteria. *Enzyme Microb Technol* 34, 219–227.
- Čepeljnik T**, Rincón M, Flint H, Marinšek-Logar R. 2006. Xyn11A, a multidomain multicatalytic enzyme from *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5T. *Folia Microbiol* 51 (4), 263–267.
- Chevenet F**, Brun C, Banuls A, Jacq B, Chisten R. 2006. TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinformatics* 7, 439.
- Collins T**, Gerday C, Feller G. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol Rev* 29, 3–23.
- Cotta M**, Zeltwanger R. 1995. Degradation and utilization of xylan by the ruminal bacteria *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Selenomonas ruminantium*. *Appl Environ Microbiol* 61, 4396–4402.
- Dalrymple B**, Swadling Y, Layton I, Gobius K, Xue G. 1999. Distribution and evolution of the xylanase genes xynA and xynB and their homologues in strains of *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Appl Environ Microbiol* 65, 3660–3667.
- Dehority B**. 1967. Rate of isolated hemicellulose degradation and utilization by pure cultures of rumen bacteria. *Appl Microbiol* 15, 987–993.
- Edgar R**. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32 (5), 1792–1797.
- Elias I**, Lagergren J. 2007. Fast computation of distance estimators. *BMC Bioinformatics* 8, 89.
- Felsenstein J**. 1989. PHYLIP: phylogeny inference package (Version 3.2). *Cladistics* 5, 164–166.
- Flint H**, Zhang J, Martin J. 1994. Multiplicity and expression of xylanases in the rumen cellulolytic bacterium *Ruminococcus flavefaciens*. *Curr Microbiol* 29, 139–143.
- Flint H**, Bayer E. 2008. Plant cell wall breakdown by anaerobic microorganisms from the mammalian digestive tract. *Ann NY Acad Sci* 1125, 280–288.
- Flint H, Bayer E, Rincon M, Lamed R, White B. 2008. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nat Rev Micro* 6, 121–131.
- García Campayo V**, McCrae S, Zhang J, Flint H, Wood T. 1993. Mode of action, kinetic properties and physicochemical characterization of two different domains of a bifunctional (1,4)- β -D-xylanase from *Ruminococcus flavifaciens* expressed separately in *Escherichia coli*. *Biochem J* 296, 235–243.
- Gasparic A**, Martin J, Daniel A, Flint H. 1995. A xylan hydrolase gene cluster in *Prevotella ruminicola* B14: sequence relationships, synergistic interactions, and oxygen sensitivity of a novel enzyme with exoxylanase and β -(1,4)-xylosidase activities. *Appl Environ Microbiol* 61, 2958–2964.
- Grilli D**, Cerón M, Paez Lama S, Egea V, Schnittger L, Cravero S, Sosa Escudero M, Allegretti L, Arenas GN. 2013. Isolation of *Pseudobutyrvibrio ruminis* and *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* from rumen of Creole goats fed native forage diet. *Folia Microbiol*, 58 (5): 367–373.
- Hespell R**, Wolf R, Bothast R. 1987. Fermentation of xylans by *Butyrivibrio fibrisolvens* and other ruminal bacteria. *Appl Environ Microbiol* 53, 2849–2853.
- Hespell R**, Cotta M. 1995. Degradation and utilization by *Butyrivibrio fibrisolvens* H17c of xylans with different chemical and physical properties. *Appl Environ Microbiol* 61, 3042–3050.
- Jeffries T**. 1996. Biochemistry and genetics of microbial xylanases. *Curr Opin Biotechnol* 7, 337–342.
- Kopečný J**, Zorec M, Mrázek J, Kobayashi Y, Marinšek Logar R. 2003. *Butyrivibrio hungatei* sp. nov. and *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* sp. nov., butyrate producing bacteria from the rumen. *Int J Sys Bacteriol* 53, 1–9.
- Lin L**, Thomson J. 1991. Cloning, sequencing and expression of a gene encoding a 73 kDa xylanase enzyme from the rumen anaerobe *Butyrivibrio fibrisolvens* H17c. *Mol Gen Genet* 228, 55–61.
- Lowry O**, Rosebrough J, Farr L, Randall J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265–275.
- Mannarelli B**, Evans S, Lee D. 1990. Cloning, sequencing, and expression of a xylanase gene from the anaerobic ruminal bacterium *Butyrivibrio*

fibrisolvans. *J Bacteriol* 172, 4247–4254.

Marinšek-Logar R, Zorec M, Nekrep F. 2000. Isolation and characterization of *Butyrivibrio*-like rumen bacteria possessing high xylanolytic activity. *Reprod Nutr Dev* 40, 191–192.

Miyazaki K, Martin J, Marinšek-Logar R, Flint H. 1997. Degradation and utilization of xylans by the rumen anaerobe *Prevotella bryantii* (formerly *P. ruminicola* subsp. *brevis*) B14. *Anaerobe* 3, 373–381.

Nelson N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J Biol Chem* 153, 375–380.

Ohgren K, Bura R, Saddler J, Zacchi G. 2007. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. *Bioresour Technol* 98, 2503–2510.

Qi M, Nelson K, Daugherty S, Nelson W, Hance I. 2008. Genomic differences between *Fibrobacter succinogenes* S85 and *Fibrobacter intestinalis* DR7, identified by suppression subtractive hybridization. *Appl Environ Microbiol* 74, 987–993.

Reilly P. 1981. Xylanases: structure and function. En: Hollaender A. (Ed). *Trends in the biology of fermentations*, Plenum Publishing Corp, New York, USA. pp. 11–129.

Schneider W. 1957. Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. *Methods Enzymol* 3, 680–684.

Van Gylswyk N, Hippe H, Rainey F. 1996. *Pseudobutyrvibrio ruminis* gen. nov., sp. nov., a butyrate-producing bacterium from the rumen that closely resembles *Butyrivibrio fibrisolvans* in phenotype. *Int J Sys Bacteriol* 46, 559–563.

Wang G, Luo H, Meng K, Wang Y, Huang H. 2011a. High genetic diversity and different distributions of glycosyl hydrolase family 10 and 11 xylanases in the goat rumen. *PLoS ONE*, 6, e16731.

Wang G, Luo H, Wang Y, Huang H, Shi P, Yang P, Meng K, Bai Y, Yao B. 2011b. A novel cold-active xylanase gene from the environmental DNA of goat rumen contents: direct cloning, expression and enzyme characterization. *Bioresour Technol* 102, 3330–3336.

Zorec M, Marinšek-Logar R, Čepeljnik T, Nekrep F. 2000. The influence of substrate concentration and growth phase on expression of *Butyrivibrio* sp. Mz5 endoxylanases. *Agric Zootech* 76, 199–206.

Zorec M, Čepeljnik T, Nekrep F, Marinšek-Logar R. 2001. Multiple endoxylanases of *Butyrivibrio* sp. *Folia Microbiol* 46, 94–96.