

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN
FACULTAD DE CIENCIAS

Escuela Profesional de Biología - Microbiología

**Caracterización y evaluación del potencial biotecnológico de la
xilanasa recombinante de *Paenibacillus* sp. R-01**

TESIS

Presentada por:

Bach. Lizbet Huanacuni Quispe

Para optar el Título Profesional de

BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

TACNA – PERÚ

2026



ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS Nro. 465

En la ciudad de Tacna, en el auditorium de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann; siendo las 11:10 horas del día lunes 13 de abril del 2026 estando presente el jurado calificador nominado con Resolución de Facultad Nro. 11690 - 2026 FACI-UNJBG, conformado por los siguientes docentes:

<u>Dr. Daladier Miguel Castillo Cotrina</u>	(Presidente)
<u>Dr. Carlos Francisco Tito Vargas</u>	(Secretario)
<u>Mgr. Rocio Murguextio Gómez</u>	(Vocal)

Acto seguido, se dio lectura a la Resolución correspondiente, y del mismo modo se informa a la (al) Bachiller que el acto de sustentación constará de dos partes: (I) exposición y sustentación de la tesis, (II) absolución de preguntas del jurado. Todo ello en un tiempo no mayor a 60 minutos ni menor a 30 minutos. A continuación, el presidente del Jurado instó a la (al) Bachiller:

Lizbet Huanacuni Quispe
a exponer la Tesis titulada:

"Caracterización y evaluación del potencial biotecnológico de la xilanasa recombinante de Paenibacillus sp. R-01"

para optar el Título Profesional de Biólogo Microbiólogo

Siendo las 11:45 horas, la (el) tesista concluye su exposición, luego se procedió a la formulación de las preguntas por parte de los miembros del jurado calificador, terminado este proceso, se invitó al público presente a abandonar la sala de sustentación para que los miembros del jurado emitan su calificación de acuerdo a reglamento. El promedio de la calificación dio el siguiente resultado:

Aprobado por unanimidad, con nota de dieciocho, de

acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann - Tacna.

Siendo las 12:05 horas, se dio por concluido el acto de sustentación de la tesis, firmando los miembros del jurado calificador, en señal de conformidad.

Dr. Daladier Miguel Castillo Cotrina
Presidente

Dr. Carlos Francisco Tito Vargas
Secretario

Mgr. Rocio Murguextio Gómez
Vocal

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo Mgr. Rocío Murgueytio Gomez en mi condición de asesor acreditado por la Resolución de Facultad N° 11170-2025-FACI-UN/JBG de la tesis titulada: “Caracterización y evaluación del potencial biotecnológico de la xilanasa recombinante de *Paenibacillus* sp. R-01” Presentado por la Bachiller Lizbet Huanacuni Quispe para optar el título de BIÓLOGO MICROBIÓLOGO. Habiendo cumplido con lo establecido en el reglamento de originalidad y de similitud de trabajos de investigación y producción intelectual, considerando que según la revisión, evaluación y análisis realizado a través del software de similitud textual TURNITIN cuenta con el nivel de similitud permitido cuyo porcentaje es 4%. Por lo que CERTIFICO LA SIMILARIDAD de la tesis está de acuerdo al nivel PERMITIDO, para continuar con los trámites correspondientes y para su publicación en el repositorio Institucional.

Se emite el presente certificado con fines de continuar con los trámites respectivos para su obtención del grado/ título/ especialidad.



ASESOR

Mgr. Rocío Murgueytio Gomez

DNI: 00506624



TESISTA

Lizbet Huanacuni Quispe

DNI: 75833183

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, por el financiamiento de la presente tesis, otorgado mediante Resolución Rectoral N° 15110-2025-UNJBG, que hizo posible su ejecución.

A mis asesores, la Mgr. Rocío Murgueytio, por su tiempo, paciencia y valiosa orientación; y al Blgo. Heber Ramírez, por su dedicación y acompañamiento continuo, fundamentales para el desarrollo de este estudio.

Al Dr. Roberto Castellanos y al Dr. Alonso Poma, por permitirme llevar a cabo el presente trabajo y abrirme las puertas del Laboratorio de Biotecnología Enzimática. Asimismo, al equipo de investigación que lo integra, por el apoyo constante y gran disposición, los cuales fueron claves para la culminación de esta investigación.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE CONTENIDO	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Planteamiento del problema.....	1
1.2. Justificación.....	2
1.3. Objetivos	4
1.3.1. Objetivo general	4
1.3.2. Objetivos específicos.....	4
1.4. Antecedentes	5
1.5. Marco teórico	9
1.5.1. Xilano	9
1.5.2. Xilanasas.....	11

1.5.3.	Caracterización bioquímica enzimática.....	16
1.5.4.	Aplicaciones biotecnológicas de las xilanasas	19
II.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
2.1.	Tipo y diseño de investigación.....	22
2.2.	Material biológico	22
2.3.	Reactivos	23
2.4.	Materiales e instrumentos	23
2.5.	Equipos.....	25
2.6.	Métodos.....	26
III.	RESULTADOS.....	35
3.1.	Producción y purificación de la xilanasa recombinante.....	35
3.2.	Caracterización bioquímica de la xilanasa recombinante	37
3.2.1.	Efecto del pH en la actividad de la xilanasa recombinante	37
3.2.2.	Efecto de la temperatura en la actividad de la xilanasa recombinante	39
3.2.3.	Efecto de iones metálicos en la actividad de la xilanasa recombinante	43
3.2.4.	Cinética enzimática	45

3.3. Evaluación del potencial biotecnológico en la obtención de azúcares reductores	47
IV. DISCUSIÓN	50
V. CONCLUSIONES.....	62
VI. RECOMENDACIONES.....	64
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
VIII. ANEXOS	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Reacción para medición de actividad enzimática de xilanasa</i>	27
Tabla 2 Etapas de purificación de la xilanasa recombinante de <i>Paenibacillus</i> sp. R-01	36
Tabla 3 Efecto del pH en la actividad relativa de la xilanasa recombinante y grupos de diferencia significativa según prueba Tukey	38
Tabla 4 Efecto de la temperatura en la actividad relativa de la xilanasa recombinante y grupos de diferencia significativa según prueba Tukey	40
Tabla 5 Termoestabilidad de la xilanasa recombinante	42
Tabla 6 Efecto de los iones metálicos sobre la actividad residual de la xilanasa	44
Tabla 7 Parámetros cinéticos en el ajuste de Michaelis Menten para la xilanasa recombinante	46
Tabla 8 Obtención de azúcares reductores mediante hidrólisis enzimática del bagazo de caña.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Enzimas xilanolíticas implicadas en la degradación del xilano	9
Figura 2 Mecanismo de acción de la xilanasa.....	15
Figura 3 Electroforesis en gel SDS-PAGE de las etapas de purificación de la xilanasa.....	37
Figura 4 Actividad relativa de la xilanasa recombinante en función del pH	38
Figura 5 Actividad relativa de la xilanasa recombinante en función a la temperatura	40
Figura 6 Actividad residual de la xilanasa frente a la temperatura durante 240 minutos.....	42
Figura 7 Efecto de los iones metálicos sobre la actividad residual (%) de la xilanasa recombinante	44
Figura 8 Cinética enzimática mediante ajuste no lineal de la xilanasa recombinante	46
Figura 9 Obtención de azúcares reductores en la hidrólisis enzimática de bagazo de caña de azúcar	49

RESUMEN

La xilanasa es una enzima clave en la degradación de hemicelulosa, especialmente del xilano, y desempeña un papel fundamental en la valorización de residuos lignocelulósicos para la obtención de productos de valor agregado en la industria biotecnológica. En este contexto, el presente estudio tuvo como objetivo caracterizar la xilanasa recombinante de *Paenibacillus* sp. R-01 para evaluar su potencial biotecnológico.

La enzima fue producida y purificada, alcanzando una actividad específica de 54,138 U/mg y un peso molecular de 48,7 kDa. Presentó un pH óptimo de 7, temperatura óptima de 60 °C y mostró estabilidad térmica a 40 °C y 50 °C, manteniendo aproximadamente el 50 % de su actividad residual entre 90 y 120 minutos. Los iones Cu^{2+} y Fe^{2+} inhibieron significativamente la actividad enzimática y el análisis cinético indicó valores de K_m de 1,271 mg/mL y V_{max} de 73,073 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. Asimismo, se demostró la capacidad de liberar azúcares reductores del xilano natural presente en el bagazo de caña de azúcar, evidenciando su potencial en la valorización de residuos lignocelulósicos.

Palabras clave: Xilanasa recombinante; *Paenibacillus*; xilano; caracterización enzimática; biotecnología.

ABSTRACT

Xylanase is a key enzyme in the degradation of hemicellulose, especially xylan, and plays a fundamental role in the valorization of lignocellulosic waste for obtaining value-added products in the biotechnology industry. In this context, the present study aimed to characterize recombinant xylanase from *Paenibacillus* sp. R-01 to evaluate its biotechnological potential.

The enzyme was produced and purified, achieving a specific activity of 54,138 U/mg and a molecular weight of 48.7 kDa. It exhibited an optimum pH of 7, an optimum temperature of 60 °C, and showed thermal stability at 40 °C and 50 °C, maintaining approximately 50 % of its residual activity between 90 and 120 minutes. Cu^{2+} and Fe^{2+} ions significantly inhibited enzyme activity, and kinetic analysis indicated K_m values of 1,271 mg/mL and V_{max} values of 73,073 $\mu\text{mol/min/mg}$. Furthermore, the enzyme demonstrated the ability to release reducing sugars from the natural xylan present in sugarcane bagasse, highlighting its potential for the valorization of lignocellulosic waste.

Keywords: Recombinant xylanase; *Paenibacillus*; xylan; enzyme characterization; biotechnology.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Planteamiento del problema

La biomasa lignocelulósica es una de las fuentes de carbono más abundante en la naturaleza y su aprovechamiento eficiente es clave para el desarrollo de bioprocesos sostenibles. Sin embargo, su degradación es de interés biotecnológico debido a la compleja estructura de la lignina, la celulosa y la hemicelulosa. Dentro de esta última, los xilanos constituyen un componente esencial cuya descomposición requiere la acción de enzimas específicas, como las xilanasas. Por lo tanto, es un tema de gran interés, impulsado por la búsqueda de alternativas sostenibles y rentables para la conversión de la biomasa para la producción de biocombustibles, biomateriales y compuestos bioactivos.

En el Perú, el sector agroindustrial genera grandes cantidades de residuos lignocelulósicos provenientes de la caña de azúcar, maíz, arroz y trigo los cuales se gestionan de manera ineficiente y podrían aprovecharse en la obtención de productos de alto valor agregado mediante procesos enzimáticos eficientes.

Bajo este contexto, la xilanasa recombinante de *Paenibacillus* sp. R-01 surge como una alternativa con alto potencial para catalizar la hidrólisis del xilano en la industria alimentaria, farmacéutica y energética. Sin embargo, es crucial caracterizar

sus propiedades bioquímicas y evaluar su potencial biotecnológico. Por ello, surge la siguiente interrogante:

¿Cuáles son las características bioquímicas y el potencial biotecnológico de la xilanasas recombinante de *Paenibacillus* sp. R-01?

1.2. Justificación

Las xilanasas son enzimas importantes que convierten el xilano, un componente principal de la hemicelulosa de las paredes celulares de las plantas, en unidades de xilosa. Comprender la estructura y la función de las xilanasas es esencial para los avances en la catálisis enzimática y la especificidad del sustrato. *Paenibacillus* sp. es una fuente de nuevas xilanasas, no obstante, los estudios detallados sobre las propiedades fisicoquímicas y cinéticas de las xilanasas de esta bacteria aún son limitados. Este proyecto contribuirá a la comprensión del comportamiento de las enzimas en diferentes condiciones de temperatura, pH, agentes químicos y concentraciones de sustrato; proporcionando información sobre su estabilidad, actividad e interacción.

Por otro lado, especialmente en el contexto de las aplicaciones biotecnológicas, las xilanasas se utilizan en una variedad de industrias, incluida la producción de alimentos, piensos, papel y pulpa. Se proyecta que el mercado mundial de xilanasas crecerá, impulsado por la demanda de procesos industriales sostenibles y eficientes.

Mediante la caracterización de la xilanasa de *Paenibacillus* sp. R-01 expresada en la cepa *E. coli* (DE3), este estudio tiene como objetivo desarrollar un sistema de producción eficiente para que esta enzima pueda utilizarse en diversas industrias. Por lo tanto, los resultados del estudio brindarán una base sólida para la aplicación de la xilanasa recombinante en la optimización de procesos específicos. Esto incluye su uso en la industria alimentaria, aprovechando los productos de la hidrólisis enzimática de residuos orgánicos, los cuales tienen potenciales efectos prebióticos.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Caracterizar la xilanasa recombinante de *Paenibacillus* sp. R-01 para evaluar su potencial biotecnológico.

1.3.2. Objetivos específicos

- Producir y purificar la enzima xilanasa recombinante de *Paenibacillus* sp. R-01.
- Caracterizar las propiedades bioquímicas de la xilanasa recombinante de *Paenibacillus* sp. R-01.
- Evaluar el potencial biotecnológico de la xilanasa recombinante en la obtención de azúcares reductores a partir del xilano.

1.4. Antecedentes

En la investigación de Saleem et al. (2021) titulada *Biochemical characterization and molecular docking of cloned xylanase gene from Bacillus subtilis RTS expressed in E. coli* describe la clonación, secuenciación y caracterización del gen de una xilanasa de *B. subtilis* aislada del suelo. Para ello, clonó el gen de la xilanasa en *Escherichia coli* BL21 empleando el sistema de expresión pET21c. El gen pertenece a la familia G11 con un peso molecular de 23 kDa con una actividad óptima a 60 °C y pH 6,5. Respecto a la estabilidad, la xilanasa se mostró altamente estable a diferentes iones metálicos, detergentes no iónicos, solventes orgánicos y termoestables a 30 °C hasta 60 °C. Estos resultados sugieren que esta enzima tiene potencial para aplicaciones en biocombustibles. También el autor destaca la relevancia de la modificación genética para obtener enzimas con propiedades mejoradas para aplicaciones industriales específicas. El análisis de acoplamiento molecular proporciona información valiosa para el diseño de mutantes de enzimas con mayor actividad y estabilidad.

Kiribayeva et al. (2022) en su estudio titulado *Cloning, expression, and characterization of a recombinant xylanase from Bacillus sonorensis* T6. Obtuvieron la xilanasa recombinante clonando el gen de la xilanasa XynT6 en *E. coli* (rXynT6-E) para obtenerla en su forma no glicosilada y en *P. pastoris* para la forma glicosilada. Los resultados mostraron que esta enzima pertenece a la familia GH11 con un peso

molecular de 23,3 kDa. La xilanasa expresada en *E. coli* tiene como parámetros óptimos un pH 7.0, la temperatura óptima es de 55 °C, la actividad específica fue de 1030,2 U/mg y el ión metálico Mn^{2+} aumentó su actividad. En cuanto a la xilanasa expresada en *P. pastoris* esta tiene como pH óptimo 6,0, temperatura de 47 °C, actividad específica de 873,8 U/mg y aumentó su actividad con Mg^{2+} , Ca^{2+} y Mn^{2+} . En suma, *E. coli* produjo una xilanasa con mayor actividad específica y estabilidad en condiciones ácidas extremas, mientras que la expresión de la enzima glicosilada en *P. pastoris* resultó con mayor estabilidad térmica y apta para la producción a gran escala siendo la más prometedora para industria alimentaria de animales y el procesamiento de biomasa lignocelulósica.

Zhu et al. (2022) en su trabajo *Characteristics of recombinant xylanase from camel rumen metagenome and its effects on wheat bran hydrolysis* estudiaron los efectos de la xilanasa (CrXyn) expresada en *E. coli* y encontraron que la enzima tiene máxima actividad a 40 °C y pH 7.0. Utilizaron el xilano de paja de trigo como sustrato y obtuvo que el valor de K_m es de 5,98 g/L y V_{max} 179,9 μ mol xilosa/min/mg proteína. Además, Mn^{2+} aceleró y mejoró significativamente la actividad enzimática logrando una eficiente liberación de azúcares fermentables del salvado de trigo. Asimismo, la enzima toleró altas concentraciones de etanol, destacando su potencial para procesos de bioetanol y el aprovechamiento de residuos agrícolas.

Liu et al. (2024) en su estudio *Biochemical characterization of an organic solvent-and salt-tolerant xylanase and its application of arabinoxylan-oligosaccharides production from corn fiber gum*. Caracterizaron la endoxilanas (Scxyn5) de *Schizophyllum commune* DB01 expresada en *P. pastoris* en donde la enzima purificada retuvo más del 80 % de actividad en DMSO al 10 % y el 90 % de actividad máxima en NaCl 5 M sobre el xilano de abedul (BirX). Además, hallaron que el NaCl de 1 a 5 M actúa significativamente diferente en la actividad enzimática de Scxyn5 en diferentes sustratos, aumentando entre 1,3 y 2,03 veces cuando se utilizó la goma de fibra de maíz. En la hidrólisis de goma de fibra de maíz lograron mayor actividad catalítica a una temperatura de 50 °C, pH de 6,0 y NaCl 4M. Los resultados demostraron su eficacia en la producción de oligosacáridos arabinoxilanos a partir de la goma de fibra de maíz, con aplicaciones potenciales en la industria alimentaria.

Akpınar, Z., & Karaoglu, H. (2024) en su investigación titulada *Characterization of a highly thermostable recombinant xylanase from Anoxybacillus ayderensis*, los autores caracterizaron una xilanas recombinante extremadamente termoestable obtenida de la bacteria termófila *A. ayderensis* expresada en *E. coli* BL21(DE3), utilizaron el plásmido recombinante pETAyXYN329. Hallaron que la xilanas tiene un peso molecular de 38,6 kDa, la actividad máxima se obtuvo a pH 6,5 y 65 °C con una vida media de 72 horas a 65 °C. Respecto a los parámetros cinéticos

calcularon $K_m = 4,09824 \pm 0,2245 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, $V_{\text{max}} = 75,05 \pm 0,03 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína, $k_{\text{cat}} = 96,75 \text{ l/s}$ y $k_{\text{cat}}/K_m = 23,61 \text{ l/mMs}^{-1}$. Además, el compuesto orgánico DTT y los iones metálicos Sn^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} , Co^{2+} y Na^+ mostraron efectos activadores sobre la enzima. Entonces estos resultados indican que la enzima puede degradar eficientemente el xilano de diversas fuentes vegetales siendo ideal en la industria para la producción de papel y biocombustibles.

1.5. Marco teórico

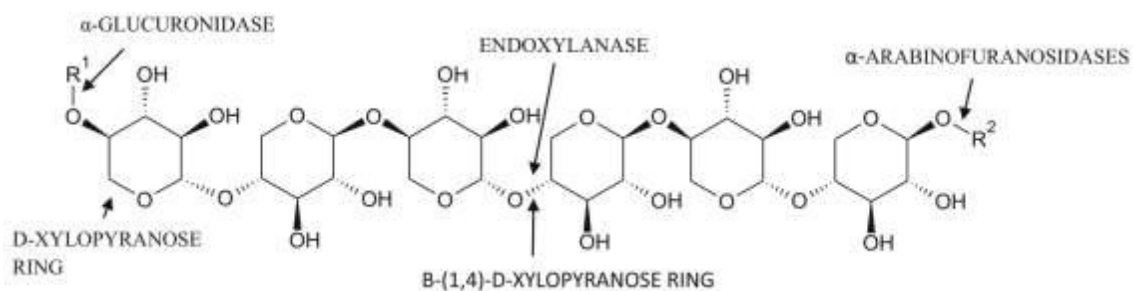
1.5.1. Xilano

1.5.1.1. Definición y estructura

El xilano se encuentra en angiospermas, gimnospermas así como en plantas anuales en grandes cantidades. Exactamente, en la pared celular secundaria de las plantas y en la pared celular primaria de las monocotiledóneas. Están formados por una cadena lineal de unidades de β - (1,4)-D-xilopiranosas, que pueden estar sustituidas con diferentes grupos laterales, como L-arabinosa, ácido glucurónico y acetilo. La estructura de los xilanos varía según la fuente vegetal, lo que influye en la actividad de las xilanasas necesarias para su degradación (Figura 1) (Alokika & Singh, 2019).

Figura 1

Enzimas xilanolíticas implicadas en la degradación del xilano



Nota: R1: p Ácido cumárico, Ácido α -D-glucurónico, α -D-arabinofuranosa. R2: Grupo acetilo, α -D-glucuranopiranososa, 4-O-Metil- α -D-glucuranopiranososa, α -L-Arabinfuranosa. Obtenido de Alokika y Singh (2019).

En función a su origen vegetal, se reconocen diferentes tipos de xilanos.

- Maderas duras: predominan los O-acetil-4-O-metilglucurono-xilanos, caracterizados por un alto grado de acetilación.
- Maderas blandas: los glucuronoarabinoxilanos presentan un mayor contenido de residuos de arabinosa y ácido glucurónico.
- En los cereales y plantas herbáceas, los arabinoxilanos son los más comunes, con extensa ramificación en la posición O-2 y O-3 de los residuos de xilosa.

Estas variaciones en su estructura influyen en la reactividad del polímero y en su degradación por enzimas específicas como las xilanasas, siendo los arabinoxilanos particularmente importantes por su aplicación en la industria alimentaria.

El xilano cumple funciones esenciales en la pared celular vegetal, donde contribuye a la estabilidad estructural, la resistencia mecánica y la regulación de la porosidad. Además, interactúa con la lignina y la celulosa formando una matriz compleja de difícil degradación, lo cual ha motivado intensas investigaciones en el campo de la biotecnología

1.5.2. Xilanasas

1.5.2.1. Clasificación y familias

Las xilanasas son enzimas hidrolíticas que despolimerizan el xilano, el segundo polisacárido vegetal más abundante del planeta. Aunque la principal fuente comercial de xilanasas son los hongos filamentosos, estas enzimas también son producidas por bacterias, levaduras, algas marinas, protozoos, caracoles, crustáceos, insectos, semillas, entre otros (Liu & Kokare, 2017).

La degradación completa una variedad de enzimas xilanolíticas (Alokika & Singh, 2019), se incluyen:

- Endo-1,4- β -xilanasas: Rompe los enlaces β -1,4-glicosídicos internos del xilano, produciendo xilooligosacáridos como xilosa, xilobiosa y xilotriosa. Son producidas por bacterias (*Streptomyces* sp., *Bacillus* sp.) y hongos (*Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp.) y sus condiciones óptimas son pH 4.0-6.5, 40-80 °C.
- β -Xilosidasas: Rompe los enlaces no reductores de los xilooligosacáridos, liberando residuos de xilosa. Producida por bacterias y hongos en un pH entre 4.0 a 5.0 y temperatura de 40 a 80 °C.

- α -Glucuronidasa: Rompe el enlace α -1,2-glicosídico entre el ácido D-glucurónico o su éter 4-O-metílico y la unidad terminal no reductora de xilooligosacáridos. Es producida en bacterias, hongos y se encontró en el jugo digestivo de caracoles. Sus condiciones óptimas son pH 5,0-7,0 y temperatura de 40-60 °C.
- α -Arabinofuranosidasa: Hidroliza los residuos terminales α -1,2-, α -1,3- y α -1,5- α -L- arabinofuranosil de los oligosacáridos y polisacáridos como arabinoxilano y arabinanos. Bacterias, hongos y plantas. Sus condiciones óptimas con pH 4,0-6,0 y temperatura de 40-60 °C.

Álvarez-Cervantes et al. (2016) indican que las xilanasas son generalmente monoméricas, tienen su peso molecular y punto isoelectrico variable. En la actualidad las xilanasas se clasificaron en más de 100 familias glicosil hidrolasas (GH) de acuerdo a su similitud en el plegamiento terciario, aminoácidos catalíticos conservados y mecanismos catalíticos. Según esta clasificación las xilanasas se agrupan en las familias 10 y 11:

- La familia GH10:

Tienen un dominio catalítico, un dominio de unión a carbohidratos, una masa molecular alta (>30 kDa) y un punto isoelectrico bajo. En cuanto a su estructura presentan un pliegue de barril (α/β)₈.

- La Familia GH11:

Muestran una estructura globular, un dominio catalítico único, masa molecular baja (<30 kDa) y un punto isoelectrico alto. Estructuralmente presenta un pliegue de rollo de gelatina β e incluye una hélice α y dos láminas β empaquetadas una contra la otra.

1.5.2.2.Mecanismo de acción

Según Abena y Simachew (2024) en el proceso de hidrólisis del xilano intervienen los siguientes mecanismos:

- Mecanismo de retención:

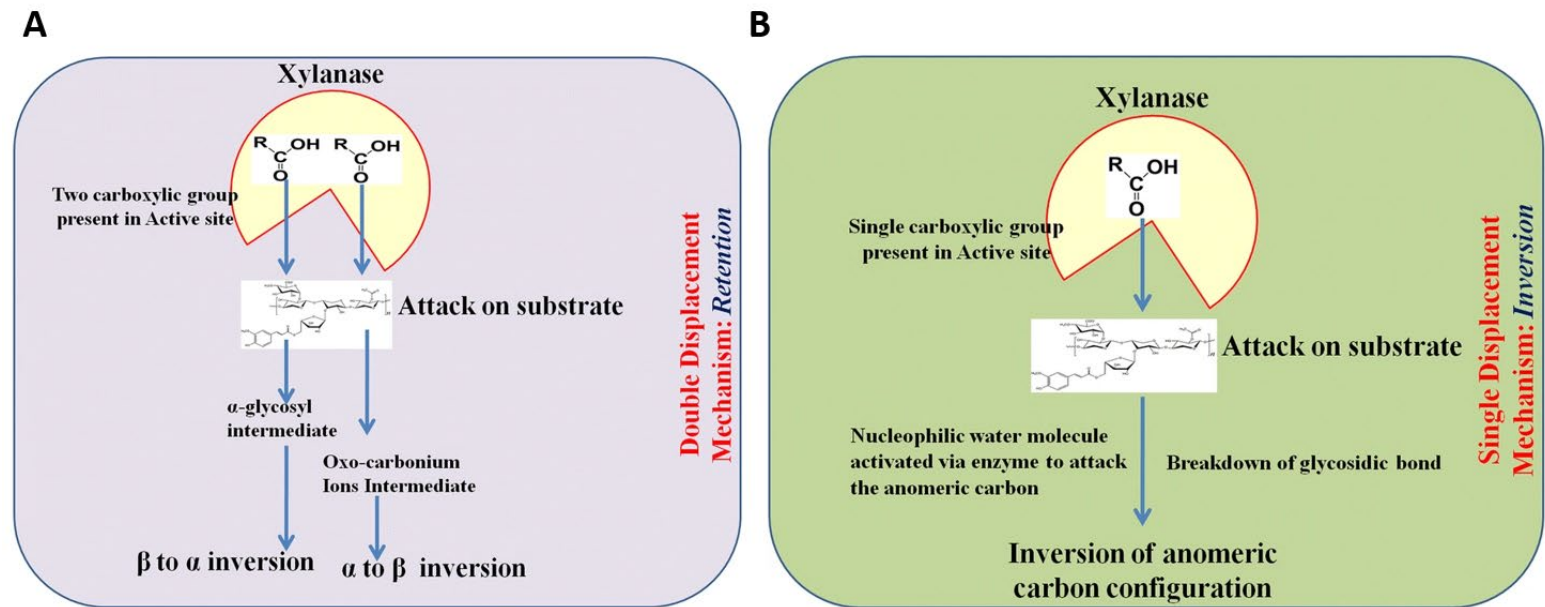
En este mecanismo de doble desplazamiento, las xilanasas tienen dos residuos de ácido carboxílico en su sitio activo. Un residuo actúa como catalizador ácido protonando el sustrato y el otro ejecuta un ataque nucleofílico dando forma al intermedio α - glicosil-enzima. En el siguiente desplazamiento, el carbono anomérico da lugar al producto de la configuración β mediante un estado de transición que involucra iones de oxo-carbonio. El oxo-carbonio es un intermedio de alta energía que facilita la ruptura del enlace glucosídico y la obtención del producto final.

- Mecanismo de inversión:

Este mecanismo es un desplazamiento simple en el que solo un ion carboxilato facilita la salida del grupo catalizado por ácido. Las xilanasas que utilizan este mecanismo, como las de las familias 8 y 43, invierten el centro anomérico con glutamato y aspartato como los principales residuos catalíticos. Estos residuos también actúan como base para activar una molécula de agua nucleofílica que ataca el carbono anomérico para romper los enlaces glicosídicos y realizar la inversión de la configuración del carbono anomérico.

Figura 2

Mecanismo de acción de la xilanasa



Nota: (A) Mecanismo de retención; (B) Mecanismo de inversión. Tomado de Bhardwaj et al. (2019)

1.5.3. Caracterización bioquímica enzimática

La caracterización de la xilanasa recombinante es crucial en la comprensión de sus potenciales aplicaciones biotecnológicas. Este proceso incluye la evaluación de varios aspectos de la enzima, que ayudan a determinar su estabilidad y eficiencia en diferentes procesos industriales (Collins et al., 2005).

1.5.3.1. Determinación de proteínas totales

La medición de proteínas totales es de relevancia para determinar el rendimiento y la pureza de la enzima. El ensayo de Bradford es utilizado por su alta sensibilidad y rápida ejecución, el cual consiste en la unión del azul brillante de Coomassie G-250 a las proteínas. Por otro lado, el método de Lowry es una alternativa, en donde la reducción del reactivo de Folin- Ciocalteu por residuos de tirosina y triptófano, brindan alta precisión en la cuantificación de proteínas totales (Lowry et al., 1951). Estos métodos se utilizan para correlacionar la concentración de enzimas con la actividad para optimizar los procesos de producción y purificación.

1.5.3.2. Determinación de actividad enzimática

La medición de la actividad enzimática generalmente se realiza mediante ensayos cromogénicos que cuantifican la liberación de azúcares reductores. El ensayo de ácido dinitrosalicílico (DNS) es un método ampliamente usado para detectar los

azúcares liberados de sustratos de xilano (Miller, 1959). La actividad enzimática se expresa en unidades internacionales (UI), definidas como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de azúcares reductores por minuto en condiciones óptimas (Bailey et al., 1992). Además, factores como la temperatura, el tiempo de reacción y la especificidad del sustrato influyen en la medición (Polizeli et al., 2005).

1.5.3.3. Parámetros fisicoquímicos y cinéticos

- Temperatura y Termoestabilidad:

La temperatura juega un papel importante en la actividad y estabilidad de la enzima. En el caso de las xilanasas, la mayoría se encuentra en un rango óptimo de 40 °C a 70 °C, mientras que las termófilas mantienen su actividad a temperaturas mayores a 80 °C (Collins et al., 2005). Las adaptaciones estructurales de la enzima contribuyen a su resistencia a altas temperaturas, tales como; el aumento de enlaces de hidrógeno, puentes disulfuro e interacciones hidrofóbicas (Haki & Rakshit, 2003). De este modo, comprender las propiedades térmicas de las xilanasas es crucial para sus aplicaciones en la industria.

- pH:

El pH es un factor crucial que influye en la actividad enzimática. Algunas enzimas presentan una actividad óptima en condiciones ácidas, con rangos de pH entre 4,0 y 6,5, mientras que otras funcionan mejor en condiciones alcalinas, con pH entre 7,0 y 9,0 (Polizeli et al., 2005). La estabilidad del pH está determinada por la composición de aminoácidos y las interacciones electrostáticas dentro del sitio activo. En la industria, esta capacidad es altamente valorada para garantizar la actividad de la xilanasa en condiciones variables (Beg et al., 2001).

- Iones metálicos:

Los iones metálicos pueden inhibir o estimular la actividad de la xilanasa. A menudo, los cationes divalentes de Ca^{2+} y Mg^{2+} estabilizan la estructura de la enzima con lo cual mejoran la estabilidad y eficiencia catalítica (Biely et al., 1997). En cambio, Hg^{2+} , Cu^{2+} y Ag^+ tienden a inhibir la actividad al interactuar con grupos tiol u otros residuos funcionales en el sitio activo (Beg et al., 2001). Entonces, reconocer los efectos de los iones metálicos permite la optimización en los procesos industriales.

- Cinética enzimática:

La cinética enzimática sigue el modelo de Michaelis-Menten, en donde hay dos parámetros importantes: K_m y V_{max} . K_m es la constante de Michaelis e indica la afinidad de la enzima por el sustrato, mientras que V_{max} muestra la velocidad máxima de la reacción. Estos parámetros cinéticos proporcionan información sobre la eficiencia enzimática (Lineweaver & Burk, 1934). En el sector industrial, las xilanasas de alta afinidad con valores bajos de K_m son las preferidas debido a su eficacia en la hidrólisis del sustrato a bajas concentraciones (Bailey et al., 1992).

1.5.4. Aplicaciones biotecnológicas de las xilanasas

- Industria del papel y pulpa:

En el proceso convencional de blanqueamiento se utilizan agentes químicos, pero estos tienen potentes efectos cancerígenos y mutágenos que además causan contaminación ambiental. Por lo tanto, el bioblanqueo es una alternativa para reducir costos de producción y mejorar la calidad del papel, así mismo, se evita dañar la pulpa.

- Industria alimentaria y de piensos:

Es utilizado para mejorar la calidad del pan; aumenta su volumen, retrasan la formación de migajas en el horneado y aumentan su contenido nutricional. En

la industria de jugos y vino se emplearon en conjunto con enzimas amilasas, pectinasas y celulasas permitiendo mejorar el rendimiento, cantidad y calidad de los productos. Por ejemplo; la xilanasa de *Pediococcus acidilactici* GC25 se usó para la clarificación de jugos de frutas (Adiguzel et al., 2019). Además, los piensos de animales mejoraron su valor nutricional, en las dietas basadas en soya y trigo siendo la xilanasa de Cfl Xyn11A de *Cellulomonas flavigena* la adecuada para esta industria (Amaya-Delgado et al., 2010).

- Producción de biocombustibles:

La producción de los combustibles inicia con un pretratamiento de la biomasa lignocelulósica, que consiste en la deslignificación para liberar celulosa y hemicelulosa. Luego, la hidrólisis enzimática para producir azúcares y se fermentan las mezclas de pentosa y hexosa para producir etanol. Sin embargo, la mejor manera para obtener etanol es por medio de la aplicación de cocteles enzimáticos para el pretratamiento. *Basfia succiniciproducens* BPP7 mejora la producción de azúcares fermentados. Además, las xilanasa y celulasa se pueden utilizar para la producción de xilooligosacáridos (XOS) para prebióticos y monómeros.

- Desentintado de papel usado:

La eliminación de partículas de tinta produce residuos peligrosos, pero actualmente se emplean las enzimas xilanasa y lacasa debido a que aumentan la blancura, brillo, factor de rasgado y factor de estallido de manera significativa. Las xilanasa y celulosa de *Trichoderma longibrachiatum* aumentó el brillo en 9.6 % respecto al control.

- Producción de xilooligosacáridos:

Los xilooligosacáridos se producen en la hidrólisis del xilano presente en la leche, miel, verduras y frutas, entre otros. Los cuales actúan como prebióticos, mejorando la salud intestinal al estimular el crecimiento de bacterias beneficiosas en el tracto gastrointestinal. Un candidato para uso prebiótico es la xilanasa producida por *Bacillus subtilis* RTS expresado en *E. coli* el cual aumento la masa celular de *Lactobacillus*. Por lo tanto, se generó un gran interés para la aplicación de xilooligosacáridos (XOS) en la producción de alimentos, bebidas y suplementos dietéticos (Saleem et al., 2021).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Tipo y diseño de investigación

El presente estudio corresponde a un estudio de tipo cuantitativo, debido a que se fundamenta en la obtención y análisis de datos medibles. Desde el punto de vista metodológico, se clasifica como investigación de tipo descriptiva, ya que se centra en detallar las características bioquímicas y funcionales de la xilanasa recombinante obtenida a partir de *Paenibacillus* sp. R-01. Así mismo, presenta un diseño experimental de laboratorio, ya que se desarrollaron procedimientos controlados dirigidos a la producción, purificación y evaluación de la actividad enzimática bajo condiciones definidas (pH, temperatura, presencia de iones metálicos y concentraciones de sustrato)

2.2. Material biológico

Se utilizó la cepa *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) transformada para la expresión de la xilanasa proveniente de la cepa R-01 de *Paenibacillus* sp. Esta cepa bacteriana forma parte de la colección del Laboratorio de Biotecnología Enzimática de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

2.3. Reactivos

- Medio Luria Bertani (LB)
- Kanamicina (50 µg/mL)
- Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG)
- Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)
- Reactivo de Bradford
- Albúmina sérica bovina (BSA)
- Xilosa
- Xilano de madera de haya
- Poliacrilamida
- Dodecil sulfato de sodio (SDS)
- Resina Ni-NTA
- Imidazol
- Marcador de peso molecular de proteínas
- Agua destilada estéril

2.4. Materiales e instrumentos

- Matraz Erlenmeyer de 50, 100, 250 y 500 mL
- Probetas de 50, 100 y 250 mL
- Vaso de precipitado de 50, 100, 250 y 500 mL

- Placas Petri
- Tubos de ensayo
- Tubos de centrifuga cónico
- Microtubos para centrifuga
- Microplacas de fondo plano
- Puntas de plástico para micropipetas
- Piseta
- Gradilla para tubos y microtubos
- Papel aluminio y craft
- Cinta Parafilm
- Algodón
- Alcohol
- Guantes de nitrilo
- Filtros Millipore de 0,22 μm
- Tela muselina sintética
- Micropipeta de 100 a 1000 μL
- Micropipeta de 10 a 100 μL
- Micropipeta de 0,1 a 10 μL
- Probetas de 100, 250 y 1000 mL

- Vaso de precipitado

2.5. Equipos

- Incubadora orbital
- Incubadora estática
- Lector de microplaca
- Termomixer
- Autoclave
- Balanza analítica
- Centrífuga
- Fotodocumentador
- Cámara de electroforesis
- pHmetro
- Microscopio óptico

2.6. Métodos

2.6.1. Determinación de proteínas totales

Se cuantificó la concentración de proteínas totales en cada etapa de purificación de la xilanasa previa construcción de una curva de calibración empleando solución albúmina de suero bovino (BSA) a 1 mg/ml como patrón. Las reacciones se realizaron por triplicado en microplacas transparentes de fondo plano a 595 nm con 20 µL de la muestra enzimática o agua destilada como blanco de reacción y 200 µl del reactivo de Bradford (1976). Se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$Proteína\ total\ (mg/mL) = \frac{|muestra| - |blanco|}{Factor\ de\ calibración}$$

2.6.2. Medición de la actividad enzimática de la xilanasa

La actividad enzimática de la xilanasa recombinante se midió mediante la reducción de azúcares liberados en la reacción mediante el método ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Para ello se realizó una curva de calibración empleando D-xilosa como estándar a 7.206 mg/ml. Las reacciones se hicieron por triplicado en microplaca transparente de fondo plano y se realizó la lectura a 540 nm.

Tabla 1

Reacción para medición de actividad enzimática de xilanasa

Reactivos	BR	BS	BE	ES
Agua destilada (μL)	50	10	10	10
Tampón fosfato de sodio pH 7 a 100 mM (μL)	-	10	30	-
Xilano de madera de haya 0.5 % (μL)	-	30	-	30
Xilanasa (μL)	-	-	10	10
Incubar a 60 °C por 15 minutos				
Reactivo DNS (μL)	100	100	100	100
Baño de agua hirviendo por 5 min y enfriar en baño de agua fría.				
Trasvasar 100 μL de reacción a la microplaca para lectura a 540 nm				

Nota: (BR) blanco de reactivo; (BS) blanco de sustrato; (BE) blanco de enzima; (ES) reacción enzima sustrato.

La actividad enzimática se expresó en U/mL donde una unidad de actividad de la xilanasa (U) se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de azúcares reductores por minuto de reacción, utilizando xilosa como estándar. El cálculo se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad enzimática U/mL} = \frac{AR (\mu\text{mol/mL}) \times Vol_{rx} \times D^{-1}}{Vol_{enz} \times T_{min}}$$

Donde:

AR = Azúcares reductores producidos en la reacción enzimática ($\mu\text{mol/mL}$)

Vol_{rx} = Volumen total de la reacción enzimática (μL)

D^{-1} = Factor de dilución aplicado a la enzima

Vol_{ens} = Volumen de la enzima utilizada en la reacción (μL)

T_{min} = Tiempo de incubación (min)

Además, se calculó la actividad específica de la xilanasa (U/mg) dividiendo la actividad enzimática total (U) entre la cantidad de proteínas totales presentes en la muestra (mg). Por otro lado, en los ensayos de caracterización bioquímica de la xilanasa, la actividad relativa (%) se expresó como el porcentaje obtenido respecto a la máxima actividad enzimática registrada en las condiciones del ensayo. De manera

similar, la actividad residual (%) se expresó como el porcentaje de actividad enzimática de la muestra respecto a la actividad medida en el control correspondiente.

2.6.3. Producción de la xilanasa recombinante

La producción de la xilanasa se inició con la reactivación de 10 μ L de la cepa *E. coli* BL21 Star (DE3) [PET-TRX1-LIC / XylC] la cual se cultivó en 5 mL de medio Luria Bertani (LB) suplementado con kanamicina (50 μ g/mL) y se incubó a 37 °C a 150 rpm durante toda la noche. Posteriormente, este cultivo inicial fue inoculado en 500 mL de medio LB hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de aproximadamente 0,6. Seguidamente, se indujo la expresión de la xilanasa añadiendo isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) al medio de cultivo a una concentración final de 0,15 mM y se incubó a 30 °C durante 12 horas a 150 rpm.

Posterior a la incubación, las células se recolectaron por centrifugación a 8500 rpm por 10 minutos a 15 °C y el sobrenadante fue descartado. El sedimento celular se resuspendió en 50 mL de buffer pH 7 (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol). Después, se procedió a la lisis celular mediante sonicación con una amplitud del 65 %, aplicando tres ciclos de 5 minutos con pausas de 1 minuto entre cada uno. La mezcla resultante se centrifugó a 9500 rpm por 10 minutos a 15 °C para la obtención de la fracción soluble. Finalmente, la expresión de la xilanasa recombinante se

confirmó mediante determinación de actividad enzimática sobre xilano de madera de haya (Verma y Satyanarayana, 2012).

2.6.4. *Purificación de la enzima xilanasa*

Se mezcló el volumen recuperado de fracción soluble con una solución de resina de Ni^{2+} al 50 % (v/v) y se incubó a 4 °C durante 12 horas a 15 rpm. Después se centrifugó a 3000 x g por 5 minutos para conservar a 4 °C la fracción soluble no retenida. La resina fue transferida a una columna de purificación para ser lavada con 3 a 5 volúmenes de tampón de enlace y se eluyó la enzima con buffer de elución a pH 7 (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol).

Posteriormente, se hizo el ultrafiltrado tangencial con un tamaño de corte de 10 kDa. Se tomó una alícuota del eluido y se sometió a un proceso de lavado con 3 a 5 volúmenes de tampón fosfato de sodio a 25 mM, ajustado a su pH óptimo. El concentrado enzimático fue almacenado a 4 °C para su posterior caracterización bioquímica (Baindara et al., 2016).

Finalmente, para verificar la pureza de la enzima xilanasa se realizó electroforesis con gel de poliacrilamida al 12 % con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) en condiciones desnaturalantes, así mismo, se determinó su peso molecular.

2.6.5. Caracterización bioquímica de la xilanasa recombinante

2.6.5.1.pH óptimo

El pH óptimo se determinó incubando la enzima a un pH variable de 4.0 a 10.0 utilizando tampones a 100 mM incluido el tampón de acetato de sodio (pH 4 y 5), fosfato de sodio (pH 6.0–7.0), tris-HCL (pH 8) y glicina-NaOH (pH 9 y 10) en donde los resultados se informaron como actividad relativa (%).

2.6.5.2.Temperatura óptima y termoestabilidad

El valor de temperatura óptima se evaluó midiendo la actividad de xilanasa en un rango de 30 a 80 °C, con incrementos de 10 °C. La termoestabilidad de la xilanasa recombinante se evaluó tomando muestras a los 15, 30, 60, 90, 120 y 240 minutos de preincubación. Los experimentos se informaron como actividad relativa (%) para temperatura óptima y actividad residual (%) para termoestabilidad.

2.6.5.3.Efecto de iones metálicos

El efecto de los iones metálicos sobre la actividad de la xilanasa recombinante se determinó mediante la preincubación de la enzima por 30 minutos a temperatura ambiente con soluciones de $MnCl_2$, $MgCl_2$, $CaCl_2$, KCl , $FeSO_4$, $CuSO_4$, empleadas a concentraciones de 1 mM y 10 mM sobre la actividad residual (%) de la enzima

2.6.5.4.Cinética enzimática

Los parámetros cinéticos se calcularon con diferentes concentraciones del xilano de madera de haya de 1 a 5 mg/ml en condiciones óptimas por 10 minutos. Los valores cinéticos de K_m y V_{max} se calcularon mediante un ajuste no lineal con la ecuación de Michaelis-Menten:

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_m + [S]}$$

Donde:

V = Velocidad de reacción

$V_{m\acute{a}x}$ = Tasa máxima alcanzada por el sistema

$[S]$ = Concentración del sustrato (xilano de madera de haya)

K_m = Constante de Michaelis-Menten

2.6.6. Evaluación del potencial biotecnológico en la obtención de azúcares reductores

2.6.6.1.Extracción del xilano

La extracción de xilano se hizo a partir del bagazo de caña de azúcar para lo cual se lavó cinco veces con agua y se secó en la estufa a 40 °C por 48 horas. Posteriormente, se trituró hasta obtener partículas con un tamaño inferior a 1 mm. El pretratamiento con una solución de soda caustica al 20 % (p/v), en una relación sólido-líquido de 1:20. La mezcla se autoclavó durante 20 min a 121 °C y luego se filtró a través de tela de muselina sintética.

El residuo sólido se lavó repetidamente con agua purificada tipo II para eliminar los restos de soda cáustica y se ajustó el pH a neutro. Finalmente, se secó a 50 °C hasta obtener un peso constante y se almacenó a temperatura ambiente (Kaur et al., 2019; De Oliveira Nascimento et al., 2022).

2.6.6.2.Obtención de azúcares reductores

La hidrólisis del xilano se realizó en condiciones óptimas para la xilanasa recombinante en un matraz Erlenmeyer de 50 mL con 20 mL de buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7, bagazo de caña de azúcar 2 % p/v y 200 U de xilanasa. Las muestras se tomaron durante 24 horas, se centrifugó a 10000 x g por 5 minutos y se cuantificó la producción de azúcares reductores mediante el método DNS (De Oliveira Nascimento et al., 2022)

2.6.6.3.Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se procesaron con el software OriginPro. Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de $p < 0,05$ para identificar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. En los casos que se detectó efecto significativo se aplicaron la prueba de Tukey para la comparación múltiple entre las medias de los distintos grupos.

III.RESULTADOS

3.1. Producción y purificación de la xilanasa recombinante

En la Tabla 2 se presentan las etapas de purificación de la xilanasa recombinante. La fracción soluble obtuvo una actividad específica de 22,966 U/mg, posterior a ello se purificó la enzima con resina de níquel en donde la actividad específica aumentó a 35,809 U/mg, finalmente con la etapa de ultrafiltrado con 10 kDa de corte se obtuvo una actividad de 54,138 U/mg con un rendimiento de 54,3 %. Estos resultados muestran que el protocolo aplicado fue eficiente para concentrar la enzima xilanasa activa y removiendo proteínas contaminantes sin una excesiva pérdida del rendimiento global.

La Figura 3 muestra la electroforesis en gel SDS-PAGE al 12 % de las fracciones obtenidas en las etapas de purificación de la xilanasa recombinante (carriles 1-3). En el carril FS, correspondiente a la fracción soluble, se observa una banda más marcada con proteínas acompañantes. En los carriles E y UF, las proteínas acompañantes van disminuyendo, mientras que la banda que corresponde a la xilanasa se muestra más intensa y definida. El peso molecular de esta banda se estimó en 48,7 kDa. Estos resultados confirman la expresión y el aumento progresivo de la pureza de la xilanasa recombinante de *Paenibacillus* sp. R-01.

Tabla 2

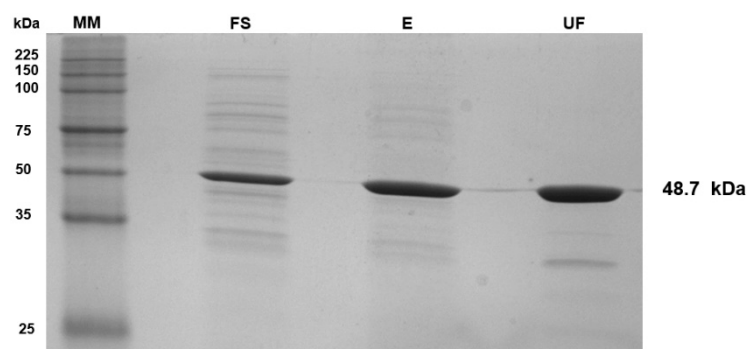
Etapas de purificación de la xilanasa recombinante de Paenibacillus sp. R-01

Etapas	Volumen (mL)	Actividad enzimática (U/ml)	Actividad Total (U)	Proteínas (mg/ml)	Proteína Total (mg)	Actividad específica (U/mg)	R (%)	FP
Fracción soluble	50	118,041	5902,041	5,140	256,995	22,966	100,000	1,000
IMAC	10	380,050	3800,500	10,613	106,133	35,809	64,393	1,559
Ultrafiltrado	10	320,747	3207,467	5,925	59,246	54,138	54,345	2,357

Nota: (R) Rendimiento; (FP) factor de purificación.

Figura 3

Electroforesis en gel SDS-PAGE de las etapas de purificación de la xilanasa



Nota: MM: Marcador molecular de proteínas de 10 a 225 kDa; carril FS: Fracción soluble; carril E: Eluído; carril UF: ultrafiltrado.

3.2. Caracterización bioquímica de la xilanasa recombinante

3.2.1. Efecto del pH en la actividad de la xilanasa recombinante

Para evaluar el efecto del pH sobre la actividad relativa de la xilanasa recombinante se trató la enzima con diferentes buffers con pH 4 hasta 10 en donde se obtuvo una mayor actividad enzimática con pH neutro. En el análisis de varianza (ANOVA) se obtuvo un valor- $F(6;14) = 826,564$ y $p < 0,0001$ lo que indica que hay diferencia significativa entre los diferentes valores de pH. Estos resultados sugieren mejor estabilidad estructural bajo condiciones fisiológicas neutras y la hace adecuada para aplicaciones biotecnológicas en procesos que operan en este rango de pH (Tabla 3; Figura 4).

Tabla 3

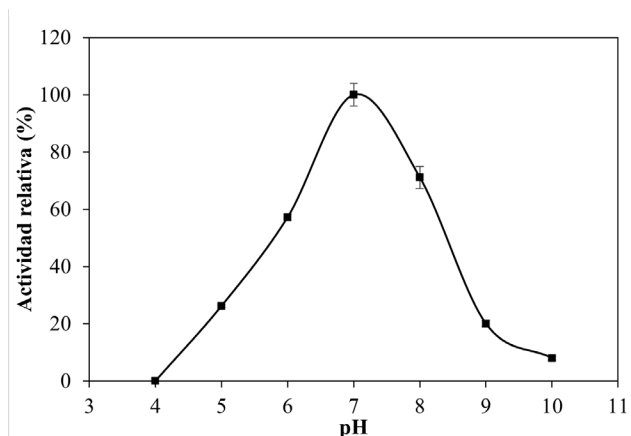
Efecto del pH en la actividad relativa de la xilanasa recombinante y grupos de diferencia significativa según prueba Tukey

pH	Actividad relativa (%)	DE	CV	Grupos
7	100,00	4,010	0,040	A
8	71,11	3,910	0,055	B
6	57,23	1,092	0,019	C
5	26,21	0,470	0,018	D
9	20,01	1,150	0,058	D
10	8,00	0,680	0,085	E
4	0,96	0,108	0,149	E

Nota: Letras distintas tienen diferencia significativa de $p < 0,5$. DE: desviación estándar; CV: Coeficiente de variación

Figura 4

Actividad relativa de la xilanasa recombinante en función del pH



3.2.2. Efecto de la temperatura en la actividad de la xilanasa recombinante

La actividad relativa mostró un incremento hasta los 60 °C, donde se alcanzó la máxima actividad relativa (100 %), disminuyendo rápidamente a temperaturas superiores. A 70 °C, la actividad se redujo a menos del 10 % (Figura 5). Esto indica que la xilanasa recombinante es mesófilo-termotolerante, con un rango óptimo entre 50 y 60 °C, características deseables para su aplicación en procesos industriales moderadamente térmicos. El análisis de varianza (ANOVA) mostró diferencias altamente significativas ($F(5;12) = 372,73$; $p < 0,0001$) en la actividad relativa de la xilanasa recombinante a diferentes temperaturas. Lo cual indica que la temperatura tuvo un efecto significativo sobre la actividad enzimática. En la tabla 4 se observan los resultados obtenidos con las temperaturas evaluada en la prueba Tukey, en donde se indican los grupos con diferencia significativa.

Tabla 4

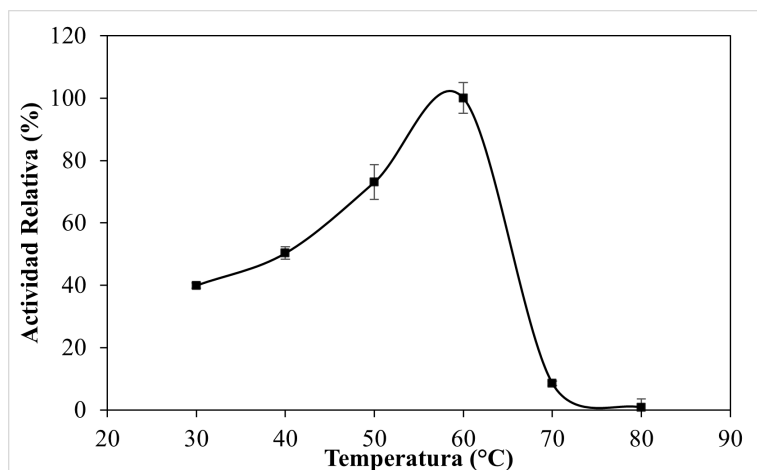
Efecto de la temperatura en la actividad relativa de la xilanasa recombinante y grupos de diferencia significativa según prueba Tukey

Temperatura (°C)	Actividad Relativa (%)	DE	CV	Grupos	
60	100,000	4,936	0,049	A	
50	73,062	5,631	0,077	B	
40	50,284	2,017	0,040	C	
30	39,934	0,866	0,022	D	
70	8,554	0,699	0,082		E
80	0,756	2,772	3,666		E

Nota: Letras distintas tienen diferencia significativa de $p < 0,5$. DE: desviación estándar; CV: Coeficiente de variación

Figura 5

Actividad relativa de la xilanasa recombinante en función a la temperatura



Respecto a la estabilidad térmica de la xilanasa se observó una alta estabilidad a 40 °C, manteniendo más del 88 % de actividad enzimática por 60 minutos. A partir de 90 minutos se observa una disminución gradual hasta alcanzar alrededor del 50 % de actividad residual, en donde la actividad se estabiliza entre los 120 y 240 minutos.

A 50 °C, la xilanasa muestra un ligero incremento de la actividad inicial a los 15 minutos por posible activación térmica, después de los 30 minutos, sigue un patrón similar al descrito a 40 °C con intervalos de 48 % y 57 % de actividad a los 120 a 240 minutos, lo que indica moderada estabilidad térmica.

Sin embargo, a 60 °C la enzima mostró alta pérdida de estabilidad, descendiendo la actividad residual a nula posterior a 15 minutos de incubación, que significa la xilanasa es termolábil a temperatura igual o mayores a 60 °C (Tabla 5; Figura 6).

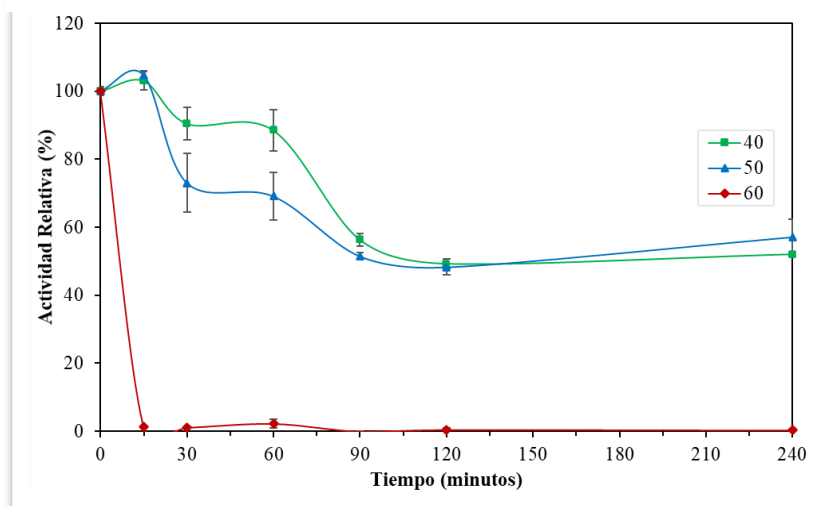
Tabla 5

Termoestabilidad de la xilanasa recombinante

Tiempo (min)	Actividad residual (%)					
	40 °C		50 °C		60 °C	
0	100,000	± 1,220	100,000	± 1,220	100,000	± 1,220
15	103,103	± 2,706	104,690	± 1,409	1,375	± 0,305
30	90,515	± 4,785	71,227	± 8,599	1,164	± 0,220
60	88,540	± 6,055	70,980	± 7,027	2,292	± 1,203
90	56,329	± 1,925	51,534	± 0,983	-0,018	± 0,122
120	49,277	± 1,444	48,325	± 2,260	0,476	± 0,589
240	52,063	± 0,428	57,140	± 5,251	0,335	± 0,244

Figura 6

Actividad residual de la xilanasa frente a la temperatura durante 240 minutos



3.2.3. Efecto de iones metálicos en la actividad de la xilanasa recombinante

En la tabla 6 se muestra el efecto de iones metálicos sobre la actividad de la xilanasa recombinante a 1 mM y 10 mM. A 1 mM la enzima se mostró estable en presencia de iones Ca^{2+} , K^{+} y Mg^{2+} con valores residuales entre 92,639 y 96,861 %. Por el contrario, los iones Cu^{2+} , Fe^{2+} y Mn^{2+} inhibieron la actividad de la enzima hasta 83,333 %, 47,889 % y 64,167 %, respectivamente.

A una concentración de 10 mM los iones Cu^{2+} , Fe^{2+} y Mn^{2+} ejercen un alto efecto inhibitorio en la xilansa, mientras que con Ca^{2+} , K^{+} y Mg^{2+} mantiene relativa estabilidad con una actividad residual entre 89,472 % y 97,028 %. Estos resultados demuestran que los iones evaluados ejercen efectos diferenciados en la actividad residual de la xilanasa recombinante de *Paenibacillus* sp R-01 respecto al control en ausencia de iones (Tabla 6; Figura 7).

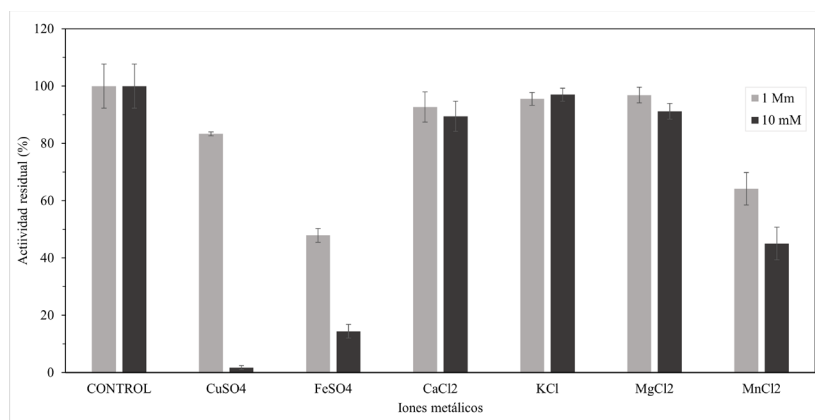
Tabla 6

Efecto de los iones metálicos sobre la actividad residual de la xilanasa

Aditivo	Actividad residual (%)					
	1 mM			10 mM		
Control	100,000	±	7,694	100,000	±	7,694
CuSO ₄	83,333	±	5,252	1,722	±	0,674
FeSO ₄	47,889	±	3,537	14,389	±	2,417
CaCl ₂	92,639	±	3,084	89,472	±	5,271
KCl	95,528	±	5,534	97,028	±	2,263
MgCl ₂	96,861	±	4,602	91,194	±	2,710
MnCl ₂	64.167	±	4.333	45.056	±	5.670

Figura 7

Efecto de los iones metálicos sobre la actividad residual (%) de la xilanasa recombinante



3.2.4. Cinética enzimática

En la evaluación de la cinética enzimática de la xilanasa recombinante el ajuste no lineal al modelo de Michaelis–Menten mostró una relación hiperbólica con la concentración de sustrato. Respecto a los parámetros calculados, el valor de $V_{\max}$ fue de $73,07 \pm 1,57 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, lo que indica que la xilanasa posee una elevada capacidad catalítica cuando el sustrato se encuentra en concentraciones saturantes. Además, el K_m obtenido fue de $1,27 \pm 0,075 \text{ mg}/\text{mL}$, lo que indica una afinidad moderada-alta por el sustrato. Por lo tanto, este valor indica que la xilanasa puede operar eficazmente incluso en sistemas donde el sustrato está presente a concentraciones relativamente bajas. Este comportamiento resulta conveniente en procesos industriales en donde la disponibilidad del sustrato puede ser limitada o variable.

Por otro lado, el valor R^2 fue de 0,9908, lo que evidencia un excelente ajuste entre los valores experimentales y el modelo teórico (Figura 8; Tabla 7). Lo cual sugiere que la enzima se mantuvo estable en las condiciones evaluadas, por ende, los datos obtenidos son consistentes y reproducibles. En conjunto, estos parámetros confirman que la xilanasa recombinante evaluada posee características adecuadas para su uso en procesos de bioconversión de xilano y obtención de azúcares reductores

Figura 8

Cinética enzimática mediante ajuste no lineal de la xilanasa recombinante

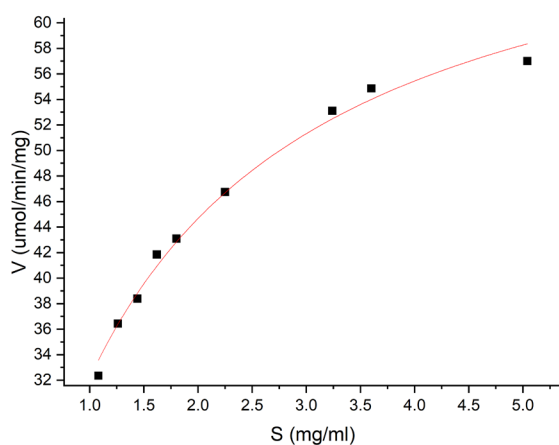


Tabla 7

Parámetros cinéticos en el ajuste de Michaelis Menten para la xilanasa recombinante

Modelo	Michaelis Menten
Ecuación	$y = V_{max} * x / (K_m + x)$
V_{max}	$73,07289 \pm 1,57173$
K_m	$1,27153 \pm 0,07526$
Reduced Chi-Sqr	0,78814
R-Square (COD)	0,99082
Adj. R-Square	0,98951

3.3. Evaluación del potencial biotecnológico en la obtención de azúcares reductores

Durante la evaluación del potencial biotecnológico para la obtención de azúcares reductores se inició con el pretratamiento alcalino del bagazo de caña, empleado como material lignocelulósico. Tras la etapa del tratamiento alcalino con soda caustica, el bagazo mostró un cambio evidente en su apariencia, adquiriendo una textura más blanda y homogénea, con fibras de un tono más pálido y tamaño cercano a 1 mm. Este material pretratado se dispersó en buffer fosfato de sodio a 50 mM para la posterior hidrólisis enzimática.

Durante la hidrólisis del xilano, la producción de azúcares reductores aumentó de forma dependiente del tiempo, alcanzando aproximadamente 1 $\mu\text{mol/mL}$ a las 24 horas (Tabla 8; Figura 9). Estos resultados confirman que la xilanasa recombinante posee actividad hidrolítica efectiva sobre el xilano de origen natural, lo que respalda su potencial biotecnológico para la obtención de xilooligosacáridos (XOS) con posible aplicación como prebiótico o aditivo funcional en la industria alimentaria.

Tabla 8

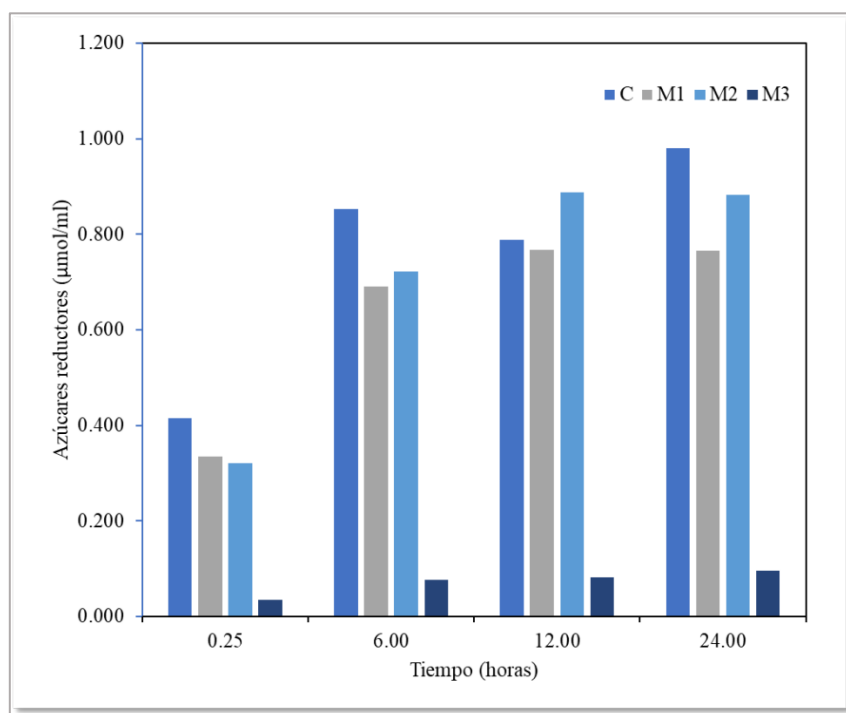
Obtención de azúcares reductores mediante hidrolisis enzimática del bagazo de caña

Azúcares reductores (μmol/ml)				
Tiempo (h)	M1	M2	M3	Control
0	0,415 ± 0,035	0,335 ± 0,012	0,321 ± 0,044	0,035 ± 0,013
6	0,852 ± 0,081	0,690 ± 0,074	0,721 ± 0,039	0,076 ± 0,055
12	0,787 ± 0,055	0,767 ± 0,117	0,887 ± 0,120	0,082 ± 0,021
24	0,981 ± 0,052	0,766 ± 0,046	0,883 ± 0,067	0,095 ± 0,007

Nota: M1-3 matraz con bagazo de caña pretratado y enzima xilanasas recombinantes:
Control: sin enzima

Figura 9

Obtención de azúcares reductores en la hidrolisis enzimática de bagazo de caña de azúcar



Nota: C; Control negativo, sin enzima; M1-3: matraz con bagazo de caña pretratado y enzima xilanasa recombinante.

IV. DISCUSIÓN

Producción y purificación

Se empleó un protocolo de purificación enzimática que incluyó la lisis celular, la cromatografía de afinidad por iones inmovilizados (IMAC) y la ultrafiltración para la purificación de la xilanasa recombinante, la cual demostró ser eficiente para obtener la xilanasa recombinante activa y purificada. La actividad específica de la fracción soluble fue de 22,966 U/mg lo que indica que la enzima se expresó de forma exitosa. La purificación mediante resina de níquel aumentó la actividad específica a 36,113 U/mg lo que evidencia que se eliminaron proteínas contaminantes y aumentó la pureza enzimática, tal como se ha reportado para el género *Paenibacillus* y otros géneros bacterianos (Lee & Lee, 2014; Dhaver et al., 2023; Kiribayeva et al., 2022). Finalmente, el ultrapurificado con un corte de 10 kDa llegó a una actividad específica de 54,138 U/mg con un rendimiento global de 54,3 %.

El rendimiento de la purificación enzimática se encuentra dentro de los valores esperados para una xilanasa bacteriana, donde suelen estar entre 22 % y 67 %. En donde la pérdida proteica se asocia con la adsorción inespecífica en la columna o a la

agregación de la enzima durante los cambios de buffer (Guimaraes & Bartlett, 2023; Brudar & Hribar-Lee, 2021; Beck et al., 2021). Sin embargo, la última etapa de ultrafiltrado resulta de gran utilidad no solo para la concentración de la enzima, sino también para la eliminación de péptidos truncados y sales de imidazol, manteniendo la integridad estructural de la xilanasa (Bajpai, 2014; Trusek-Holownia et al., 2016).

Por otro lado, en el análisis por SDS-PAGE, se validó la expresión de la enzima y se halló un peso molecular de 48,7 kDa. Este peso molecular es consistente con las xilanasas de la familia GH10 las cuales poseen un tamaño que oscila entre 35 y 50 kDa (Wang et al., 2019; Glekas et al., 2022). Las enzimas de este grupo poseen una estructura de barril (α/β)₈, la cual las diferencia estructuralmente con la familia GH11 y les otorga mayor versatilidad de sustrato y una gran ventaja competitiva para la degradación de biomasa lignocelulósica compleja (Mon et al., 2022; Wang et al., 2021). La pureza de la banda en la etapa de ultrafiltrado la hace idónea para estudios de caracterización y en aplicaciones que requieren actividad específica, como la producción de xilooligosacáridos (XOS), debido a que la presencia de proteínas contaminantes podría interferir con la eficiencia catalítica o la seguridad del producto (Alnoch et al., 2022; Glekas et al., 2022).

Caracterización bioquímica

Respecto a la caracterización bioquímica de la xilanasa recombinante de *Paenibacillus* sp R-01, se determinó su pH y temperatura óptimos, termoestabilidad, efecto de iones metálicos y parámetros cinéticos.

PH

La enzima mostró actividad óptima a pH 7, lo que la clasifica como neutrofílica. El presente resultado concuerda con lo reportado por diversos autores, los cuales coinciden en que la máxima actividad de la xilanasa ocurre con un pH neutro o cercano. Por ejemplo Liu et al., (2018) en su trabajo reportó que la xilanasa tiene su máxima actividad a pH 6,5. A la vez que, otras xilanasas de *Paenibacillus* sp. A59, *Paenibacillus campinasensis*, *Paenibacillus* sp. DG-22 y *Paenibacillus terrae* presentaron un pH óptimo entre 6,0 y 7,0; con buena estabilidad en un rango de pH neutro a ligeramente alcalino (Ghio et al., 2018; Lee & Lee, 2014; Song et al., 2014; L. Wang et al., 2022).

Según Sharma et al., (2013), enzimas similares de *Paenibacillus* sp ha mostrado mayor actividad en pH alcalino cercano a 8,6, con buena estabilidad entre pH 7 y 9 mientras que otras xilanasas bacterianas pueden ser neutrofílicas o incluso neutroácidas (Li et al., 2023). En contraste a las xilanasas fungales las cuales pueden

estar limitadas en ambientes neutros o alcalinos debido a que suelen tener actividades óptimas a pH más ácidos (pH 4-5). El pH afecta la ionización de residuos catalíticos y la interacción con el sustrato, optimizando la catálisis en condiciones neutras. Además, la presencia de dominios de unión a carbohidratos y regiones flexibles contribuye a la estabilidad estructural y funcional en este rango de pH. Enzimáticamente, esto permite una mayor eficiencia en la hidrólisis de xilanos bajo condiciones fisiológicas o industriales neutras. Este perfil funcional es altamente valorado para aplicaciones industriales, ya que muchos procesos biotecnológicos como la bioconversión de biomasa, producción de xilooligosacáridos, bioblanqueo y la alimentación animal, operan en este rango de pH, minimizando la necesidad de ajustes químicos y reduciendo costos.

TEMPERATURA

Los resultados muestran que la xilanasa recombinante de *Paenibacillus* sp. R-01 presenta máxima actividad a 60 °C y mantiene alta estabilidad a 40–50 °C, pero pierde estabilidad rápidamente a 60 °C, indicando un perfil mesófilo-termotolerante. Estos hallazgos son consistentes con xilanasas de *Paenibacillus campinasensis* y *Paenibacillus barengoltzii*, que también muestran máxima actividad entre 60–65 °C y buena estabilidad térmica en ese rango (Wang et al., 2022; Liu et al., 2018). Sin embargo, otras xilanasas de *Paenibacillus*, como la de *P. physcomitrellae*, presentan

óptimos más bajos, entre 40 y 50 °C, y menor termoestabilidad (Wang et al., 2024). Xilanasas de *Bacillus* y *Anoxybacillus* pueden alcanzar óptimos de 65–75 °C y mayor termoestabilidad, pero suelen ser de origen termofílico (Ulucay et al., 2022; Yadav et al., 2018). Por lo tanto, los resultados respaldan la tendencia de las xilanasas de *Paenibacillus* a ser mesófilas o moderadamente termotolerantes, aunque existen variantes más termoestables en otros géneros.

La termoestabilidad y temperatura óptima de las xilanasas dependen de su estructura proteica, especialmente de la presencia de dominios de unión a carbohidratos, puentes disulfuro y la composición de aminoácidos superficiales (Yang et al., 2024). En *Paenibacillus*, la presencia de dominios GH10 o GH11 y modificaciones como enlaces disulfuro pueden incrementar la estabilidad térmica (Wang et al., 2022; Wang et al., 2024). Sin embargo, la rápida desnaturalización a 60 °C sugiere que la xilanasas recombinante carece de suficientes interacciones estabilizadoras, como puentes salinos o enlaces disulfuro adicionales, que sí se han logrado mediante mutagénesis dirigida en otros estudios (Wang et al., 2024; Yang et al., 2024).

La actividad óptima a 50–60 °C y la estabilidad moderada a 40–50 °C hacen que esta xilanasas sea adecuada para procesos industriales que requieren condiciones térmicas moderadas, como la bioconversión de biomasa y la producción de

xilooligosacáridos (Wang et al., 2022; Ghio et al., 2018; Liu et al., 2018). Su perfil mesófilo-termotolerante permite eficiencia catalítica sin requerir condiciones extremas, facilitando su integración en bioprocesos y reduciendo costos energéticos

IONES METÁLICOS

La xilanasa recombinante mostró alta estabilidad en presencia de Ca^{2+} , K^{+} y Mg^{2+} (92–97 % de actividad residual) a 1 mM, mientras que Cu^{2+} , Fe^{2+} y Mn^{2+} inhibieron significativamente la actividad enzimática, efecto que se intensificó a 10 mM. Estos resultados coinciden parcialmente con estudios recientes. Por ejemplo, en *Paenibacillus* sp. NF1, Ca^{2+} y Ba^{2+} activan la xilanasa, mientras que Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} y Cu^{2+} la inhiben, y Mg^{2+} , K^{+} y Mn^{2+} no muestran efecto significativo a 1–10 mM (Zheng et al., 2014). En *Paenibacillus macquariensis*, Mn^{2+} y Co^{2+} estimulan la actividad, pero Hg^{2+} la inhibe (Sharma et al., 2013). En *Bacillus sonorensis*, Ca^{2+} y Mg^{2+} mantienen la actividad, pero Cu^{2+} y Fe^{3+} la inhiben parcialmente (Kiribayeva et al., 2022). Sin embargo, en *Thermomyces dupontii*, Cu^{2+} y Mg^{2+} activan la xilanasa, (Seemakram et al., 2020). Estas diferencias pueden deberse a variaciones en la estructura terciaria de la enzima, la fuente microbiana y las condiciones experimentales.

La estabilidad frente a Ca^{2+} , K^{+} y Mg^{2+} puede explicarse porque estos iones estabilizan la estructura enzimática y no interfieren con el sitio activo. Por el contrario, Cu^{2+} y Fe^{2+} pueden inducir cambios conformacionales o participar en reacciones redox

que desnaturalizan la enzima o bloquean el sitio catalítico (Zheng et al., 2014; Kiribayeva et al., 2022). Mn^{2+} puede actuar como cofactor en algunas xilanasas, pero en este caso parece inducir una conformación menos activa, posiblemente por competencia con otros iones esenciales o alteración de la geometría del sitio activo (Zheng et al., 2014; Sharma et al., 2013). La sensibilidad diferencial a los iones metálicos refleja la especificidad estructural de la xilanasa recombinante de *Paenibacillus* sp.

La caracterización de la sensibilidad iónica es crucial para aplicaciones industriales, ya que permite seleccionar condiciones óptimas para la actividad enzimática y anticipar posibles inhibiciones en matrices complejas. Además, estos datos contribuyen al diseño de procesos más robustos y eficientes en la producción de biocombustibles y bioproductos a partir de biomasa lignocelulósica (Zheng et al., 2014; Kiribayeva et al., 2022; Sharma et al., 2013).

CINETICA ENZIMÁTICA

La xilanasa recombinante mostró una cinética tipo Michaelis-Menten con un K_m de 1,27 mg/ml y un V_{max} de 73,7 $\mu\text{mol/min/mg}$, indicando alta afinidad y eficiencia catalítica hacia el xilano de madera de haya bajo condiciones óptimas. El K_m obtenido es comparable o incluso menor que el reportado para otras xilanasas bacterianas y fúngicas, como la de *Paenibacillus barengoltzii* ($K_m = 2,04$ mg/ml) (Liu

et al., 2018), *Nocardiopsis halotolerans* ($K_m = 2,16 \text{ mg/ml}$) (Lisov et al., 2024), y *Trichoderma harzianum* ($K_m = 5,56 \text{ mg/ml}$) (Dhaver et al., 2022). Además, el V_{max} es similar al de otras xilanasas bacterianas, aunque menor que algunas fúngicas que alcanzan valores superiores (por ejemplo; $608,65 \mu\text{mol/min/mg}$ en *Trichoderma asperellum* (Zheng et al., 2022)). En comparación con la xilanasas de *Paenibacillus brasilensis* ($K_m = 1,13 \text{ mg/ml}$, $V_{max} = 5124,3 \mu\text{mol/min/mg}$) (Kalinina et al., 2019), el K_m es similar, pero el V_{max} es considerablemente menor, lo que puede deberse a diferencias en la estructura enzimática, condiciones de ensayo o naturaleza del sustrato. Estas diferencias pueden estar relacionadas con variaciones en la fuente microbiana, modificaciones recombinantes, o condiciones experimentales específicas (De Queiroz Brito Cunha et al., 2018; Lisov et al., 2024).

El bajo K_m indica una alta afinidad de la xilanasas recombinante por el xilano de haya, lo que sugiere una eficiente interacción enzima-sustrato, probablemente facilitada por dominios de unión a carbohidratos presentes en muchas xilanasas de *Paenibacillus* (Liu et al., 2018; Lee & Lee, 2014). La eficiencia catalítica observada puede estar relacionada con la arquitectura del sitio activo y la flexibilidad estructural, factores que han sido asociados con la adaptación a diferentes condiciones ambientales y sustratos (Jiao et al., 2024; Ghio et al., 2018). Además, la especificidad hacia xilanos

de madera de haya puede deberse a la complementariedad entre el sitio activo de la enzima y la estructura del polisacárido (Liu et al., 2018; Lisov et al., 2024)

La caracterización cinética demuestra que la xilanasa recombinante de *Paenibacillus* sp. R-01 es una candidata prometedora para aplicaciones industriales, como la producción de xilooligosacáridos y la bioconversión de biomasa lignocelulósica, gracias a su alta afinidad y eficiencia catalítica bajo condiciones suaves (Liu et al., 2018; Zheng et al., 2022; Lisov et al., 2024). Estos resultados respaldan el potencial biotecnológico de enzimas bacterianas en procesos sostenibles y eficientes.

Evaluación del potencial biotecnológico en la obtención de azúcares reductores

En la evaluación del potencial biotecnológico de la xilanasa recombinante para la obtención de azúcares reductores a partir del bagazo de caña de azúcar previo tratamiento alcalino permitió demostrar que la presente enzima es capaz de hidrolizar eficientemente un sustrato lignocelulósico de origen natural. El pretratamiento alcalino con soda cáustica al 20 % como primer paso, generó cambios físico visibles en el bagazo de caña de azúcar, tales como ablandamiento, homogeneidad y un tono más claro. Estos hallazgos coinciden con los estudios previos que indican que este tratamiento desestabiliza la matriz lignocelulósica al solubilizar la lignina, hinchar las

fibras y aumentar la porosidad del material, lo cual favorece al acceso enzimático al xilano contenido en la hemicelulosa (Kaur et al., 2019; De Oliveira Nascimento et al., 2022). Por lo tanto, el pretratamiento realizado habría contribuido significativamente a la susceptibilidad del sustrato frente a la hidrólisis enzimática.

En condiciones óptimas de reacción para la xilanasa recombinante (pH 7 y 50 mM de fosfato de sodio), la producción de azúcares reductores aumentó de manera dependiente del tiempo durante las primeras 24 horas de incubación. Los valores obtenidos, cercanos a 1 $\mu\text{mol/mL}$, evidencian una actividad hidrolítica efectiva sobre el xilano del bagazo de caña, incluso sin recurrir a métodos más intensivos de fraccionamiento o purificación del sustrato. Esta tendencia temporal es consistente con lo reportado por De Oliveira Nascimento et al. (2022), quienes observaron una acumulación progresiva de azúcares durante la hidrólisis enzimática de bagazo pretratado, atribuida al incremento en la disponibilidad de enlaces glucosídicos accesibles.

El comportamiento observado sugiere que la xilanasa además de liberar xilosa y xilooligosacáridos (XOS), presenta estabilidad suficiente para mantener su actividad durante largos periodos de reacción, lo que constituye una ventaja en procesos industriales. La ligera variabilidad entre los tres matraces con la enzima podría estar relacionada con diferencias en la dispersión del bagazo, variaciones mínimas en la

carga enzimática efectiva o microheterogeneidad del sustrato, características comunes en materiales lignocelulósicos.

Asimismo, la producción obtenida se alinea con reportes que destacan el uso de xilanasas bacterianas para generar XOS con propiedades prebióticas y potencial aplicación en alimentos funcionales. Se ha documentado que los XOS derivados de residuos agrícolas favorecen el crecimiento de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, poseen estabilidad térmica y tienen buena tolerancia digestiva, características que incrementan su valor biotecnológico. Por lo tanto, los resultados de este estudio respaldan la aplicabilidad de la xilanasa recombinante de *Paenibacillus* sp. R-01 como una herramienta útil para la obtención de azúcares reductores y posiblemente XOS a partir de bagazo de caña, un residuo agrícola abundante y de bajo costo.

En conjunto, los hallazgos confirman que la combinación de un pretratamiento alcalino adecuado y una xilanasa recombinante con actividad optimizada constituye una estrategia eficiente para la valorización de residuos lignocelulósicos. Las investigaciones futuras podrían profundizar en la caracterización del producto liberado mediante métodos cromatográficos, optimizar parámetros como la carga enzimática y la relación sólido-líquido, o integrar procesos de co-enzimología con β -xilosidasas para incrementar el rendimiento global de azúcares fermentables o XOS específicos (Bragatto et al., 2013; Capetti et al., 2024).

En conjunto los resultados obtenidos demuestran que la xilanasa recombinante de *Paenibacillus* sp R-01 muestra propiedades bioquímicas adecuadas, presentando actividad óptima en condiciones neutras y temperaturas moderadas, y con suficiente estabilidad térmica para ser aplicada en procesos biotecnológicos controlados. Del mismo modo, se confirmó que su actividad frente al xilano natural del bagazo de caña de azúcar permite la obtención de azúcares reductores los cuales se alinean con la valorización de residuos lignocelulósicos. La enzima muestra un perfil mesófilo-termotolerante con una moderada afinidad por el sustrato, lo que la hace competitiva en aplicaciones donde no son necesarias condiciones extremas. Sin embargo, la limitada resistencia a temperaturas superiores a 60 °C podría provocar limitaciones en el uso de esta enzima en procesos altamente térmicos.

De esta forma, la xilanasa recombinante de *Paenibacillus* sp. R-01 se perfila como una alternativa aplicable en la producción xilooligosacáridos con potencial prebiótico y su posible uso en procesos de bioconversión para la obtención de azúcares fermentables en la industria de biocombustibles.

V. CONCLUSIONES

- Se produjo y purificó la xilanasa recombinante proveniente de *Paenibacillus* sp R-01 mediante cromatografía de afinidad y ultrafiltración, obteniendo una actividad específica final de 54,138 U/mg y se estimó el peso molecular mediante electroforesis SDS-PAGE un valor de 48,7 kDa, lo que sugiere su pertenencia a la familia GH10 y se confirma la eficiencia del sistema de expresión.
- Se caracterizó bioquímicamente la xilanasa recombinante, determinándose que su pH y temperatura óptimos son 7 y 60 ° C, con estabilidad térmica a 40 °C y 50 °C manteniendo aproximadamente el 50 % de su actividad residual luego de 90 a 120 minutos de incubación, lo que indica un perfil mesófilo-termotolerante. Asimismo, los iones Cu^{2+} y Fe^{2+} actúan como inhibidores de la actividad enzimática, y parámetros cinéticos con un K_m de 1,271 mg/mL y un V_{max} de 73,073 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, lo que indica una afinidad moderada alta por el sustrato.
- Se obtuvo liberación de azúcares reductores a partir de la hidrólisis de un xilano de origen natural proveniente de bagazo de caña de azúcar pretratado alcalinamente, demostrando la capacidad de la enzima para actuar sobre sustratos lignocelulósicos.
- En conjunto, las propiedades bioquímicas y funcionales de esta xilanasa recombinante de *Paenibacillus* sp. R-01 la posicionan como candidata para aplicaciones relacionadas con la valorización de residuos lignocelulósicos, la

producción de xilooligosacáridos (XOS) con potencial prebiótico y su posible uso en procesos de bioconversión para la obtención de azúcares fermentables en la industria de biocombustibles, contribuyendo al desarrollo de bioprocesos sostenibles.

VI. RECOMENDACIONES

- Optimizar el proceso de purificación de la xilanasa recombinante en la etapa de cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC) mediante un protocolo de elución escalonada, a fin de mejorar la recuperación y pureza de la enzima.
- Evaluar el efecto de diferentes agentes químicos sobre la actividad de la xilanasa recombinante de *Paenibacillus* sp. R-01, con el propósito de identificar potenciales activadores o inhibidores relevantes.
- Ajustar la relación de enzima – sustrato en la hidrólisis enzimática del xilano de origen natural para maximizar la liberación de azúcares reductores, así como caracterizar el hidrolizado obtenido para determinar su aplicabilidad como prebiótico y/o antioxidante.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abena, T., & Simachew, A. (2024). A review on xylanase sources, classification, mode of action, fermentation processes, and applications as a promising biocatalyst. *BioTechnologia*, 105(3), 273–285. <https://doi.org/10.5114/bta.2024.141806>
- Adiguzel, G., Faiz, O., Sisecioglu, M., Sari, B., Baltaci, O., Akbulut, S., Genc, B., & Adiguzel, A. (2019). A novel endo- β -1,4-xylanase from *Pediococcus acidilactici* GC25; purification, characterization and application in clarification of fruit juices. *International Journal of Biological Macromolecules*, 129, 571–578. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.054>
- Akpinar, Z. & Karaoglu, H. (2024). Characterization of a highly thermostable recombinant xylanase from *Anoxybacillus ayderensis*. *Protein Expression and Purification*, 219, 106478–106478. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2024.106478>
- Alnoch, R. C., Alves, G. S., Salgado, J. C. S., de Andrades, D., Freitas, E. N. de, Nogueira, K. M. V., Vici, A. C., Oliveira, D. P., Carvalho-Jr, V. P., Silva, R. N., Buckeridge, M. S., Michelin, M., Teixeira, J. A., & Polizeli, M. de L. T. M. (2022). Immobilization and Application of the Recombinant Xylanase GH10 of *Malbranchea pulchella* in the Production of Xylooligosaccharides

- from Hydrothermal Liquor of the Eucalyptus (*Eucalyptus grandis*) Wood Chips. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21). <https://doi.org/10.3390/ijms232113329>
- Alokika, N., & Singh, B. (2019). Production, characteristics, and biotechnological applications of microbial xylanases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(21-22), 8763–8784. <https://doi.org/10.1007/s00253-1600-1619>. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/si/3b/12>
- Álvarez-Cervantes, J., Domínguez-Hernández, E. M., Mercado-Flores, Y., O'Donovan, A., & Díaz-Godínez, G. (2016). Mycosphere Essay 10: Properties and characteristics of microbial xylanases. *Mycosphere*, 7(10), 1600-1619. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/si/3b/12>
- Amaya-Delgado, L., Mejía-Castillo, T., Santiago-Hernández, A., Vega-Estrada, J., Amelia, F., Xoconostle-Cázares, B., Ruiz-Medrano, R., Del Carmen Montes-Horcasitas, M., & Hidalgo-Lara, M. E. (2010). Cloning and expression of a novel, moderately thermostable xylanase-encoding gene (Cfl xyn11A) from *Cellulomonas flavigena*. *Bioresource Technology*, 101(14), 5539-5545. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.057>
- Bailey, M. J., Biely, P., & Poutanen, K. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, 23(3), 257-270. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(92\)90074-J](https://doi.org/10.1016/0168-1656(92)90074-J)

- Bajpai, P. (2014). *Chapter 6. Purification of Xylanases*.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801020-4.00006-810.1007/s13213-011-0323-5>
- Beck, J., von Lieres, E., Zaghi, N., Leweke, S., Carta, G., & Hahn, R. (2021). Patterns of protein adsorption in ion-exchange particles and columns: Evolution of protein concentration profiles during load, hold, and wash steps predicted for pore and solid diffusion mechanisms. *Journal of Chromatography A*, 1653. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462412>
- Beg, Q. K., Kapoor, M., Mahajan, L., & Hoondal, G. S. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(3-4), 326–338. <https://doi.org/10.1007/s002530100704>
- Bhardwaj, N., Kumar, B., & Verma, P. (2019). A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. In *Bioresources and Bioprocessing* (Vol. 6, Issue 1). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1186/s40643-019-0276-2>
- Biely, P., Vrsanská, M., Tenkanen, M., & Kluepfel, D. (1997). Endo- β -1,4-xylanase families: Differences in catalytic properties. *Journal of Biotechnology*, 57(1-3), 151-166. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)00096-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)00096-5)

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bragatto, J., Segato, F. y Squina, F. (2013). Producción de xilooligosacáridos (XOS) a partir de bagazo de caña de azúcar deslignificado mediante el proceso de peróxido-HAc utilizando xilanasa recombinante de *Bacillus subtilis*. *Cultivos y Productos Industriales*, 51, 123-129. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.062>.
- Brudar, S., & Hribar-Lee, B. (2021). Effect of buffer on protein stability in aqueous solutions: A simple protein aggregation model. *Journal of Physical Chemistry B*, 125(10), 2504–2512. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.0c10339>
- Capetti, C. C. de M., Ontañón, O., Navas, L. E., Campos, E., Simister, R., Dowle, A., Liberato, M. V., Pellegrini, V. de O. A., Gómez, L. D., & Polikarpov, I. (2024). Sugarcane bagasse derived xylooligosaccharides produced by an arabinofuranosidase/xylobiohydrolase from *Bifidobacterium longum* in synergism with xylanases. *Carbohydrate Polymers*, 339, 122248. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.122248>
- Collins, T., Gerday, C., & Feller, G. (2005). Xylanases, xylanase families, and

extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(1), 3-23.
<https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.06.005>

De Oliveira Nascimento, C. E., De Oliveira Simões, L. C., De Cassia Pereira, J., Da Silva, R. R., De Lima, E. A., De Almeida, G. C., Penna, A. L. B., Boscolo, M., Gomes, E., & Da Silva, R. (2022). Application of a recombinant GH10 endoxylanase from *Thermoascus aurantiacus* for xylooligosaccharide production from sugarcane bagasse and probiotic bacterial growth. *Journal Of Biotechnology*, 347, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.02.003>

De Queiroz Brito Cunha, C. C., Gama, A., Cintra, L., Bataus, L., & Ulhoa, C. (2018). Improvement of bread making quality by supplementation with a recombinant xylanase produced by *Pichia pastoris*. *PLoS ONE*, 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192996>

Dhaver, P., Pletschke, B., Sithole, B., & Govinden, R. (2022). Optimization, purification, and characterization of xylanase production by a newly isolated *Trichoderma harzianum* strain by a two-step statistical experimental design strategy. *Scientific Reports*, 12. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22723-x>

Dhaver, P., Sithole, T., Pletschke, B., Sithole, B., & Govinden, R. (2023). Enhanced

production of a recombinant xylanase (XT6): optimization of production and purification, and scaled-up batch fermentation in a stirred tank bioreactor. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-48202-5>

Ghio, S., Ontañón, O., Piccinni, F. E., Marrero Díaz de Villegas, R., Talia, P., Grasso, D. H., & Campos, E. (2018). *Paenibacillus* sp. A59 GH10 and GH11 Extracellular Endoxylanases: Application in Biomass Bioconversion. *Bioenergy Research*, 11(1), 174–190. <https://doi.org/10.1007/s12155-017-9887-7>

Glekas, P. D., Kalantzi, S., Dalios, A., Hatzinikolaou, D. G., & Mamma, D. (2022). Biochemical and Thermodynamic Studies on a Novel Thermotolerant GH10 Xylanase from *Bacillus safensis*. *Biomolecules*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/biom12060790>

Guimaraes, G. J., & Bartlett, M. G. (2023). Managing nonspecific adsorption to liquid chromatography hardware: A review. In *Analytica Chimica Acta* (Vol. 1250). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.340994>

Haki, G. D., & Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: A review. *Bioresource Technology*, 89(1), 17-34. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00033-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00033-6)

- Jiao, Sun, Z., Ni, Z., Qi, Y., Sun, Q., Hu, Y., & Li, C. (2024). Molecular Identification and Engineering a Salt-Tolerant GH11 Xylanase for Efficient Xylooligosaccharides Production. *Biomolecules*, 14. <https://doi.org/10.3390/biom14091188>
- Kalinina, A., Gordeeva, T., & Sineoky, S. (2019). Expression of the Xylanase Gene from *Paenibacillus brasilensis* X1 in *Pichia pastoris* and Characteristics of the Recombinant Enzyme. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 55, 797–804. <https://doi.org/10.1134/s0003683819080064>
- Kiribayeva, A., Mukanov, B., Silayev, D., Akishev, Z., Ramankulov, Y., & Khassenov, B. (2022). Cloning, expression, and characterization of a recombinant xylanase from *Bacillus sonorensis* T6. *PLoS ONE*, 17(3 March). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265647>
- Lee, S. H., & Lee, Y. E. (2014). Cloning and characterization of a multidomain GH10 xylanase from *paenibacillus* sp. DG-22. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(11), 1525–1535. <https://doi.org/10.4014/jmb.1407.07077>
- Lineweaver, H., & Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56(3), 658-666. <https://doi.org/10.1021/ja01318a036>

- Lisov, A., Belova, O., Belov, A., Lisova, Z., Nagel, A., Shadrin, A., Andreeva-Kovalevskaya, Z., Nagornykh, M., Zakharova, M., & Leontievsky, A. (2024). Expression in *Pichia pastoris* of Thermostable Endo-1,4- β -xylanase from the Actinobacterium *Nocardiopsis halotolerans*: Properties and Use for Saccharification of Xylan-Containing Products. *International Journal of Molecular Sciences*, 25. <https://doi.org/10.3390/ijms25169121>
- Liu, X., & Kokare, C. (2017). Microbial Enzymes of Use in Industry. *Biotechnology of Microbial Enzymes*, 267–298. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803725->
- Liu, X., Liu, Y., Jiang, Z., Liu, H., Yang, S., & Yan, Q. (2018). Biochemical characterization of a novel xylanase from *Paenibacillus barengoltzii* and its application in xylooligosaccharides production from corncobs. *Food Chemistry*, 264, 310–318. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.023>
- Liu, Y., Guo, C., & Wang, C. (2024). Biochemical characterization of an organic solvent- and salt-tolerant xylanase and its application of arabinoxylan-oligosaccharides production from corn fiber gum. *International Journal of Biological Macromolecules*, 136146–136146. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.136146>
- Miller, G.L. (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of

- Reducing Sugar. *Journal of Analytical Chemistry*, 31, 426-428. – References
Scientific Research Publishing. (2015). Scirp.org.
<http://dx.doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mon, M. L., Marrero Díaz de Villegas, R., Campos, E., Soria, M. A., & Talia, P. M.
(2022). Characterization of a novel GH10 alkali-thermostable xylanase from a
termite microbiome. *Bioresources and Bioprocessing*, 9(1).
<https://doi.org/10.1186/s40643-022-00572-w>
- Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., &
Amorim, D. S. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial
applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(5), 577–591.
<https://doi.org/10.1007/s00253-005-1904-7>
- Saleem, A., Waris, S., Ahmed, T., & Tabassum, R. (2021). Biochemical
characterization and molecular docking of cloned xylanase gene from *Bacillus*
subtilis RTS expressed in *E. coli*. *International journal of biological*
macromolecules, 168, 310–321. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.001>
- Seemakram, W., Boonrung, S., Aimi, T., Ekprasert, J., Lumyong, S., & Boonlue, S.
(2020). Purification, characterization and partial amino acid sequences of
thermo-alkali-stable and mercury ion-tolerant xylanase from *Thermomyces*
dupontii KCU-CLD-E2-3. *Scientific Reports*, 10.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-78670-y>

- Sharma, M., Mehta, S., & Kumar, A. (2013). Purification and Characterization of Alkaline Xylanase Secreted from *Paenibacillus macquariensis*; *Advances in Microbiology*, 03(01), 32–41. <https://doi.org/10.4236/aim.2013.31005>
- Song, H. Y., Lim, H. K., Kim, D. R., Lee, K. I., & Hwang, I. T. (2014). A new bi-modular endo- β -1,4-xylanase KRICT PX-3 from whole genome sequence of *Paenibacillus terrae* HPL-003. *Enzyme and Microbial Technology*, 54(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2013.09.002>
- Trusek-Holownia, A., Lech, M., & Noworyta, A. (2016). Protein enzymatic hydrolysis integrated with ultrafiltration: Thermolysin application in obtaining peptides. *Chemical Engineering Journal*, 305, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.05.087>
- Ulucay, O., Gormez, A., & Ozic, C. (2022). For biotechnological applications: Purification and characterization of recombinant and nanoconjugated xylanase enzyme from thermophilic *Bacillus subtilis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 44. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102478>
- Verma, D., & T. Satyanarayana. (2012). Molecular approaches for ameliorating microbial xylanases. *Bioresource Technology*, 117, 360–367.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.034>

- Wang, J., Liang, J., Li, Y., Tian, L., & Wei, Y. (2021). Characterization of efficient xylanases from industrial-scale pulp and paper wastewater treatment microbiota. *AMB Express*, *11*(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01178-1>
- Wang, K., Cao, R., Wang, M., Lin, Q., Zhan, R., Xu, H., & Wang, S. (2019). A novel thermostable GH10 xylanase with activities on a wide variety of cellulosic substrates from a xylanolytic *Bacillus* strain exhibiting significant synergy with commercial Celluclast 1.5 L in pretreated corn stover hydrolysis. *Biotechnology for Biofuels*, *12*(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1389-8>
- Wang, L., Wang, Y. Y., Chen, Z., & Li, Y. (2024). Enzymatic characterization and thermostability improvement of an acidophilic endoxylanase PphXyn11 from *Paenibacillus physcomitrellae* XB. *Protein Expression and Purification*, 106482. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2024.106482>
- Wang, L., Wang, Y., Chang, S., Gao, Z., Ma, J., Wu, B., He, B., & Wei, P. (2022). Identification and characterization of a thermostable GH11 xylanase from *Paenibacillus campinasensis* NTU-11 and the distinct roles of its carbohydrate-binding domain and linker sequence. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *209*. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112167>

- Yadav, P., Maharjan, J., Korpole, S., Prasad, G., Sahni, G., Bhattarai, T., & Sreerama, L. (2018). Production, Purification, and Characterization of Thermostable Alkaline Xylanase From *Anoxybacillus kamchatkensis* NASTPD13. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00065>
- Yang, Y., Zhang, C., Lu, H., Wu, Q., Wu, Y., Li, W., & Li, X. (2024). Improvement of thermostability and catalytic efficiency of xylanase from *Myceliophthora thermophila* by N-terminal and C-terminal truncation. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1385329>
- Zheng, F., Basit, A., Zhuang, H., Chen, J., Zhang, J., & Chen, W. (2022). Biochemical characterization of a novel acidophilic β -xylanase from *Trichoderma asperellum* ND-1 and its synergistic hydrolysis of beechwood xylan. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.998160>
- Zheng, H.-C., Sun, M.-Z., Meng, L.-C., Pei, H., Zhang, X., Yan, Z., Zeng, W.-H., Zhang, J.-S., Hu, J., Lu, F., & Sun, J. (2014). Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Paenibacillus* sp. NF1 and its application in xylooligosaccharides production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24 4, 489–496. <https://doi.org/10.4014/jmb.1312.12072>

Zhu, L., Liu, C., Li, Y., Pan, K., Ouyang, K., Song, X., Xiong, X., Qu, M., & Zhao, X.
(2022). Characteristics of recombinant xylanase from camel rumen
metagenome and its effects on wheat bran hydrolysis. *International Journal of
Biological Macromolecules*, 220, 1309–1317.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.08.146>

VIII. ANEXOS

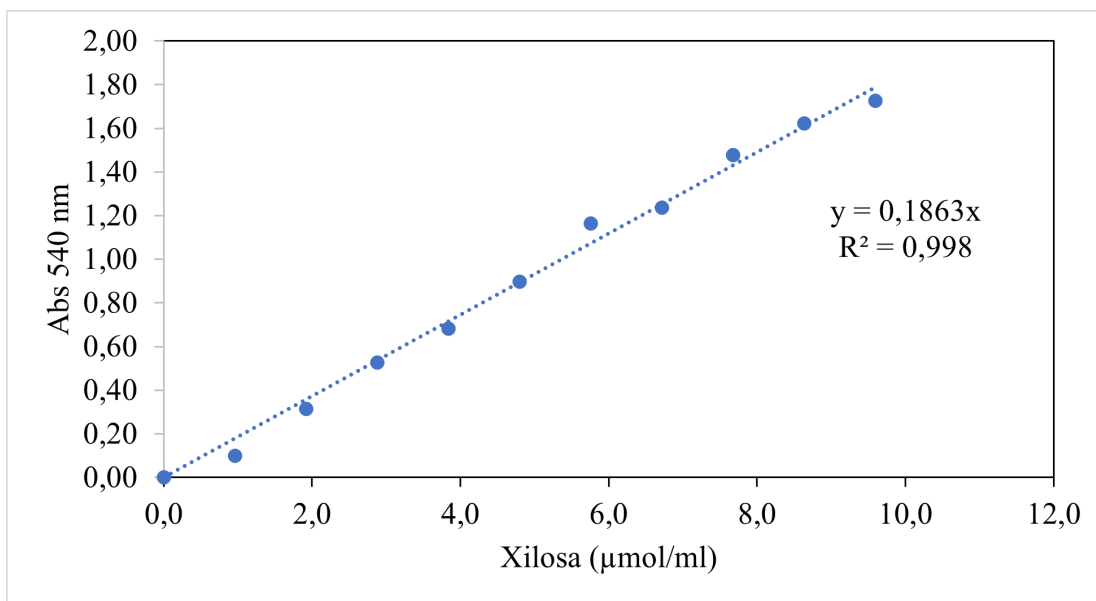
Anexo 1

Construcción de la curva patrón de xilosa

Concentración final xilosa (μmol/ml)	Xilosa 48 μmol/ml (μL)	Agua (μL)	Tampón (μL)	Reactivo DNS (μL)	Volumen final (μL)
0	0	20	30	100	150
0,96	1	19	30	100	150
1,92	2	18	30	100	150
2,88	3	17	30	100	150
3,84	4	16	30	100	150
4,8	5	15	30	100	150
5,76	6	14	30	100	150
6,72	7	13	30	100	150
7,68	8	12	30	100	150
8,64	9	11	30	100	150
9,6	10	10	30	100	150

Anexo 2

Curva patrón de xilosa



Anexo 3

Componentes del reactivo DNS

Componentes	Cantidad
Ácido 3,5 Dinitrosalicílico $C_7H_4N_2O_7$ (g)	3,743
Hidróxido de sodio NaOH (g)	6,992
Tartrato de sodio y potasio $KNaC_4H_4O_6$ (g)	108,051
Fenol C_6H_6O (ml)	2,684
Metabisulfito de sodio $Na_2S_2O_5$ (g)	2,931
Agua destilada (ml)	500,000

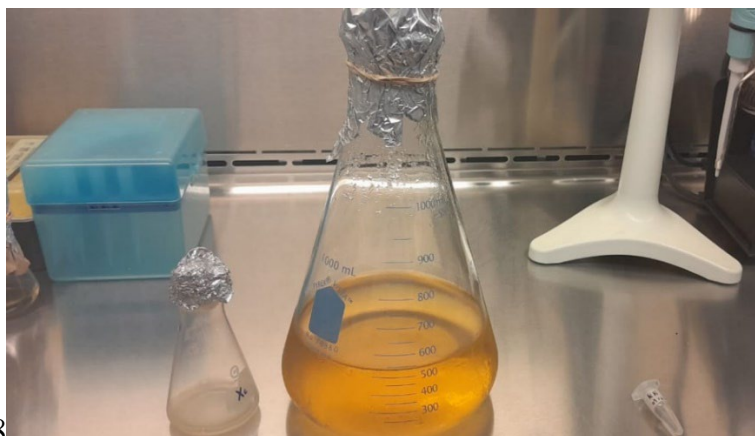
Anexo 4

Reactivo DNS preparado



Anexo 5

Masificación para producción de la xilanasa recombinante



8

Anexo 6

Lisis celular mediante sonicación



Anexo 7

Obtención de la fracción soluble de xilanas recombinante



Anexo 8

Purificación enzimática mediante IMAC



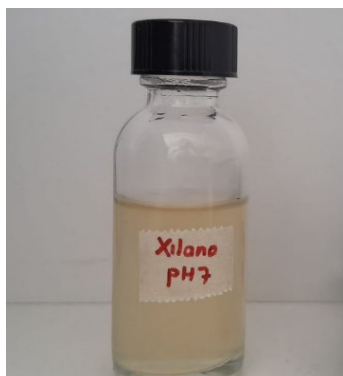
Anexo 9

Ultrafiltrado con dispositivo de corte de 10 kDa



Anexo 10

Xilano de madera de haya al 0.5 %



Anexo 11

Pretratamiento alcalino del bagazo de caña de azúcar



Anexo 12

Obtención de azúcares reductores por hidrólisis del bagazo de caña de azúcar

