

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN
FACULTAD DE CIENCIAS

Escuela Profesional de Biología Microbiología

Expresión y caracterización funcional de la xilanasas de
Paenibacillus barengoltzii en Escherichia coli

TESIS

Presentada por:

Bach. Juan Jesus Lopez Villafuerte

Para optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

TACNA - PERÚ

2025



ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS Nro. 449

En la ciudad de Tacna, en el auditorium de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann; siendo las 10:00 horas del día jueves 17 de Julio del 2025, estando presente el jurado calificador nominado con Resolución de Facultad Nro. 11342 y 11334 - 2025 FACI-UNJBG, conformado por los siguientes docentes:

Dra. Soledad Amparo Bornás Acosta (Presidente)
Dr. Carlos Francisco Tito Vargas (Secretario)
Dr. Roberto Castellanos Cabrera (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:

Juan Jesus Lopez Villafuerte

a exponer la Tesis titulada:

"Expresión y caracterización funcional de la xilanasas de Paenibacillus barengoltzii en Escherichia coli"

para optar el Título Profesional de Biologo Microbiólogo

Siendo las 11:14 h 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 con nota sobresaliente, con nota de diecinueve (19), de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann - Tacna.

Siendo las 11:36 horas, se dio por concluido el acto de sustentación de la tesis, firmando los miembros del jurado calificador, en señal de conformidad.

Dra. Soledad Amparo Bornás Acosta
Presidente

Dr. Carlos Francisco Tito Vargas
Secretario

Dr. Roberto Castellanos Cabrera
Vocal

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Roberto Castellanos Cabrera, en mi calidad de asesor de la tesis titulada: **“Expresión y caracterización funcional de la xilanas de *Paenibacillus Barengoltzii* en *Escherichia coli*”**, elaborada por el Bach. Juan Jesus Lopez Villafuerte, de la Escuela Profesional de Biología - Microbiología, hago constar lo siguiente:

Luego de realizar el análisis de similitud mediante el software **Turnitin**, la tesis presentó un **5 %** de similitud general. En tal sentido, **CERTIFICO QUE LA SIMILITUD** se encuentra dentro del nivel **PERMITIDO**, por lo cual se puede continuar con los trámites correspondientes y proceder con su publicación en el repositorio institucional.

Se expide el presente certificado para los fines que estime conveniente.

Tacna, 04 de agosto del 2025



ASESOR

Dr. Roberto Castellanos Cabrera
DNI: 00417795



TESISTA

Bach. Juan Jesus Lopez Villafuerte
DNI: 71023413



DEDICATORIA

A mi familia, en especial a mi madre Enrrica Villafuerte, por su apoyo constante en mis buenos y malos momentos, por siempre estar ahí presente pese a la distancia, gracias por tu tiempo.

A todos los animales que formaron parte de mi tiempo de vida, en especial a mi gato Tarzán, fuiste muy especial para mí, leal y cariñoso, siempre te tendré presente en mis recuerdos.

A todas las personas que creyeron y depositaron su confianza en mí, que, gracias a sus críticas, lograron mejorar mis defectos y virtudes, impulsando un cambio positivo en varios aspectos de mi persona.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, el Dr. Roberto Castellanos Cabrera, por su apoyo, confianza y motivación depositada en mi persona.

A mi co-asesor, Dr. Alonso Poma Ticona, por las sugerencias y enfoque crítico, que permitió la mejora sustancial de este trabajo.

Agradezco al proyecto de investigación “Aplicación de tecnología del ADN recombinante en la generación de cócteles enzimáticos para la biodegradación de residuo orgánico vegetal”, aprobado mediante R.R. N.º 11174-2023-UNJBG, así como al cuerpo técnico que, en conjunto, me brindó orientación para la elaboración de este trabajo.

Contenido

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE DE TABLAS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Planteamiento del problema.....	3
1.2. Hipótesis	4
1.3. Justificación	4
1.4. Objetivos	6
1.4.1. Objetivo general.....	6
1.4.2. Objetivos específicos	6
1.5. Marco teórico	7
1.5.1. Biomasa lignocelulósica	7
1.5.2. Xilano.....	11
1.5.3. Visión general de xilanasas	14
1.5.4. Microorganismos productores de xilanasas	20
1.5.5. Transformación de <i>Escherichia coli</i>	23
1.5.6. Expresión de proteínas recombinantes en <i>Escherichia coli</i>	25
1.5.7. Estrategias de purificación de proteínas recombinantes	27
1.5.8. Caracterización funcional de proteínas recombinantes.....	31
II. MARCO METODOLÓGICO	33
2.1. Materiales.....	33
2.1.1. Material biológico	33
2.1.2. Equipos	33

2.1.3. Instrumentos.....	34
2.1.4. Reactivos químicos	34
2.2. Diseño de la investigación	36
2.3. Métodos.....	37
2.3.1. Transformación y detección de clones con actividad xilanasa	37
2.3.2. Producción y purificación por cromatografía de afinidad	40
2.3.3. Caracterización funcional	42
III. RESULTADOS	44
3.1. Transformación y detección de clones con actividad xilanasa	44
3.2. Fases de purificación enzimática	47
3.3. Caracterización funcional de la xilanasa recombinante.....	51
IV. DISCUSIÓN.....	58
V. CONCLUSIONES.....	70
VI. RECOMENDACIONES.....	71
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
VIII. ANEXOS	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Composición porcentual de la biomasa lignocelulósica</i>	11
Tabla 2 <i>Diferencias principales de las xilanasas miembros de la familia GH11 y GH11</i>	19
Tabla 3 <i>Bacterias reportadas en la producción de xilanasas y sus características</i>	22
Tabla 4 <i>Actividad enzimática tipo xilanasas de cuatro clones transformados</i>	46
Tabla 5 <i>Fases de purificación de la enzima xilanasas recombinante</i>	49
Tabla 6 <i>Efecto de la concentración de agentes químicos en la actividad enzimática</i>	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 <i>Componentes y estructura de la lignocelulosa de la pared celular vegetal</i>	10
Figura 2 <i>Estructura del xilano y principales enzimas xilanolíticas asociadas en su degradación</i>	15
Figura 3 <i>Clasificación y características de la familia glicosilhidrolasa de acuerdo a la base de datos CAZy</i>	18
Figura 4 <i>Mecanismos de acción enzimática por retención e inversión de glicosilhidrolasas</i>	20
Figura 5 <i>Métodos de transformación bacteriana in vitro</i>	25
Figura 6 <i>Células transformadas de Escherichia coli con vector de expresión [pET-TRX1-LIC/EndoxylA] y valores de actividad enzimática (U/mL) para cada Clon</i>	45
Figura 7 <i>Actividad enzimática y proteínas totales en las fases de purificación</i>	48
Figura 8 <i>SDS – PAGE de las fases de purificación enzimática</i>	50
Figura 9 <i>Perfil de temperatura óptima y estabilidad térmica a distintas temperaturas</i>	52
Figura 10 <i>Perfil de pH óptimo y estabilidad a distintos pHs</i>	54
Figura 11 <i>Efecto de diferentes concentraciones de agentes químicos sobre la actividad enzimática xilanasa</i>	56

RESUMEN

Las xilanasas son enzimas importantes en la degradación de la biomasa vegetal, principalmente sobre los componentes de la hemicelulosa, permitiendo la liberación de xilooligosacáridos y xilosa.

En este estudio, se logró la transformación de *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) con un plásmido que contuvo el gen de la xilanasas de *Paenibacillus barengoltzii*. El clon más eficiente alcanzó una actividad catalítica de 1129 U/mL. Posteriormente, se realizó un escalamiento del cultivo, obteniendo valores de actividad específica de 319,84 U/mg en la fracción soluble y 2478,064 U/mg en el ultrafiltrado. La caracterización funcional de la enzima mostró una actividad máxima a 60 °C y pH 7. En cuanto a la estabilidad térmica, la enzima mantuvo más del 72 % de su actividad tras 240 minutos a 40 °C, aunque a temperaturas de 60 a 80 °C, la actividad residual decayó rápidamente. Respecto a la estabilidad frente al pH, se conservó valores entorno al 100 % de actividad residual tras 4 horas en pH 6 y 7, mientras que a pH 4 y 8, se observó una pérdida notable de actividad residual. El análisis frente a agentes químicos reveló que K⁺ mantuvo un comportamiento activador sostenido hasta 150,81 % a 10 mM. El Mn²⁺ y Cu²⁺ también incrementaron notablemente la actividad residual, alcanzando 132,64 % y 168,51 % a 1 mM, respectivamente.

Estos resultados demuestran que la expresión recombinante de la xilanasas de *P. barengoltzii* en *E. coli* BL21 Star (DE3) fue exitosa, y que la enzima presenta características funcionales atractivas para su aplicación en procesos biotecnológicos en la industria alimentaria.

ABSTRACT

Xylanases are key enzymes in the degradation of plant biomass, acting primarily on hemicellulose components to release xylooligosaccharides and xylose.

In this study, *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) was successfully transformed with a plasmid carrying the xylanase gene from *Paenibacillus barengoltzii*. The most efficient clone exhibited a catalytic activity of 1129 U/mL. Subsequently, scale-up of the culture led to specific activity values of 319,84 U/mg in the soluble fraction and 2478,064 U/mg in the ultrafiltrated. Functional characterization of the enzyme revealed a maximum activity at 60 °C and pH 7. Regarding thermal stability, the enzyme retained over 72% of its activity after 240 minutes at 40 °C, although residual activity declined rapidly at temperatures between 60 and 80 °C. In terms of pH stability, the enzyme maintained nearly 100% residual activity after 4 hours of preincubation at pH 6 and 7, whereas a notable loss of activity was observed at pH 4 and 8. The effect of chemical agents showed that K⁺ sustained a consistent activating effect, reaching up to 150,81% at 10 mM. Mn²⁺ and Cu²⁺ also significantly increased the residual activity, reaching 132,64% and 168,51% at 1 mM, respectively.

These results demonstrate the successful recombinant expression of *P. barengoltzii* xylanase in *E. coli* BL21 Star (DE3) and highlight its promising functional properties for potential applications in biotechnological processes in the food industry.

I. INTRODUCCIÓN

Los procesos industriales sostenibles han impulsado la investigación en alternativas que logren valorizar la biomasa lignocelulósica (Collins et al., 2005). Este heteropolímero, constituido en su mayoría por celulosa, hemicelulosa y lignina, proviene de fuentes renovables como residuos agrícolas, forestales y desechos de la industria alimentaria (Zoghiami & Paës, 2019). En gran parte del mundo, este compuesto está presente en elevada cantidad, que con su bajo costo, la colocan como una materia prima para su transformación mediante tecnologías verdes en productos de valor agregado, como bioetanol, bioplásticos, azúcares fermentables, entre otras (Qaseem et al., 2021).

Una propiedad importante que considerar es su naturaleza recalcitrante, lo que implica una hidrólisis previa dirigida a la celulosa y la hemicelulosa, dando como productos los monómeros de carbohidratos de interés para aplicaciones biotecnológicas (Maurya et al., 2015). En este contexto, las enzimas se consideran como herramientas clave, ya que realizan este proceso y ofrecen ventajas tanto ambientales como económicas frente a métodos químicos o físicos tradicionales (Bhalla et al., 2013).

Para la hidrólisis de la hemicelulosa, que representa entre el 30 % y 40 % de la biomasa lignocelulósica, requiere la acción sinérgica de múltiples enzimas asociadas al complejo hemicelulasas, entre las cuales destacan las xilanasas. Esta clase de enzimas pueden hidrolizar el xilano con alta especificidad, minimizando

las pérdidas de sustrato y generación de subproductos contaminantes, en comparación con los procesos químicos (Marcolongo et al., 2015). Su aplicación se extiende a industrias como la papelera, alimentaria, farmacéutica y de biocombustibles, donde se requieren enzimas estables bajo condiciones industriales de temperatura, pH y salinidad (de Sales et al., 2017).

Dentro de las xilanasas, las de origen bacteriano destacan por su versatilidad y resistencia, mostrando un amplio rango de estabilidad bajo condiciones adversas (Chakdar et al., 2016). Las xilanasas termoestables son particularmente deseables, ya que ofrecen mayor eficiencia en la hidrólisis, menor riesgo de contaminación biológica y estabilidad estructural. Bacterias termófilas como *Geobacillus*, *Bacillus* y *Paenibacillus* han sido ampliamente estudiadas por su capacidad para producir este tipo de extremozimas (Cripps et al., 2009; Bhalla et al., 2015; Wang et al., 2022). En ese contexto, las xilanasas se han posicionado como herramientas esenciales en diferentes procesos industriales, no solo por su capacidad para mejorar la eficiencia y calidad de productos derivados de la biomasa, sino también por reducir el consumo energético y de agua (Nigam, 2013).

Por ello, este estudio sobre la expresión y caracterización funcional de la xilanasas de *Paenibacillus barengoltzii* en *Escherichia coli* busca contribuir a este campo, aumentando el espectro de biocatalizadores que podrían implementarse en diversas aplicaciones industriales y ecológicas.

1.1. Planteamiento del problema

El rápido incremento de la población y el crecimiento económico han impulsado grandes inversiones en diversos sectores, destacando especialmente la industria alimentaria y agrícola. Sin embargo, la intensificación de la actividad industrial en estos campos ha generado un aumento considerable en la producción de residuos lignocelulósicos, representando un desafío ambiental significativo (Collins et al., 2005). Estos residuos, si bien son abundantes y renovables, requieren procesos eficientes y sostenibles para su aprovechamiento.

Entre las estrategias más prometedoras para la revalorización de estos desechos, se encuentra la hidrólisis enzimática mediante enzimas del complejo celulasa, hemicelulasa y ligninasa. La hidrólisis de la hemicelulosa, el segundo polisacárido renovable más abundante en la naturaleza, se da a través del complejo hemicelulasa, que son capaces de liberar azúcares fermentables envueltos en la producción de bioetanol, bioplásticos y otros bioproductos de interés industrial (Marcolongo et al., 2015). No obstante, la eficacia de este proceso está condicionada por la estabilidad, especificidad y resistencia de las xilanasas a condiciones extremas como temperatura, pH o presencia de inhibidores, factores clave para su uso en entornos industriales reales.

Aunque en diversos lugares del mundo se han identificado y caracterizado enzimas con estas propiedades, en el contexto nacional y local la información sobre xilanasas bacterianas, tanto nativas como recombinantes, sigue siendo limitada.

Esta carencia restringe el desarrollo de soluciones biotecnológicas adaptadas a condiciones específicas de nuestra realidad.

En ese sentido, el estudio de enzimas provenientes de bacterias termófilas como *Paenibacillus barengoltzii*, reconocidas por su potencial termoestable, representa una alternativa relevante para el diseño de procesos más eficientes y sostenibles. Sin embargo, sus propiedades funcionales tras la expresión heteróloga aún no han sido exploradas adecuadamente.

En base a ello, se plantea la siguiente pregunta de investigación:
¿Cuáles son las características funcionales de la xilanasa de *Paenibacillus barengoltzii* expresada en *Escherichia coli*?

1.2. Hipótesis

La xilanasa de *Paenibacillus barengoltzii* expresada en *Escherichia coli* presenta estabilidad y actividad enzimática óptimas bajo diferentes condiciones de pH, temperatura y agentes químicos, adecuadas para aplicaciones biotecnológicas

1.3. Justificación

La elevada capacidad de degradación eficaz a través de la enzima xilanasa, tiene diversas aplicaciones industriales. En la industria de la cerveza, mejoran la filtración del mosto; en la industria panadera, regulan y mejoran la textura y el sabor del pan; y en la producción de piensos, aumentan la digestibilidad de los nutrientes

en los alimentos balanceados (Wang et al., 2016; Carvalho et al., 2017; Juturu y Wu, 2012). En la naturaleza, existen diversas fuentes de xilanasas termoestables que se desarrollan a partir de nichos termófilos, destacando aquellas producidas por bacterias como *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Paenibacillus* spp. (Wang et al., 2022).

Dado que la producción natural de xilanasas es limitada y ciertamente costosa, es necesario el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan su producción a gran escala y a costos relativamente bajos. En respuesta a ello, la aplicación de la tecnología del ADN recombinante es altamente empleada para sostener y responder los requerimientos de producción enzimática a gran escala siendo (Beg et al., 2001; Dhaver et al., 2023).

En particular, *Paenibacillus barengoltzii* ha sido identificado como una fuente prometedora de xilanasas, aunque la información sobre potencial catalítico y estabilidad funcional para este grupo bacteriano aún es escasa, especialmente cuando se expresa en sistemas heterólogos como *Escherichia coli*, que no requiere sistemas de cultivo complejos.

En este contexto, la caracterización funcional de la xilanasas de *P. barengoltzii* en *E. coli* resulta fundamental para comprender su estabilidad y eficiencia catalítica bajo distintos parámetros fisicoquímicos, lo que permitiría optimizar su aplicación en diferentes industrias y contribuyendo al desarrollo de biocatalizadores más robustos.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

- Caracterizar las propiedades funcionales la xilanasa de *Paenibacillus barengoltzii* expresada en *Escherichia coli*.

1.4.2. Objetivos específicos

- Transformar y detectar clones de *Escherichia coli* con actividad xilanasas
- Producir y purificar la proteína recombinante xilanasas mediante cromatografía de afinidad
- Determinar las características funcionales de la xilanasas recombinante óptimas frente a la temperatura y pH, estabilidad térmica, estabilidad al pH y resistencia a agentes químicos

1.5. Marco teórico

1.5.1. Biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica presenta de manera natural un comportamiento de resistencia a la degradación enzimática y microbiana, constituyendo un desafío para su revalorización industrial como bioenergía y bioproductos, por ello, comprender aspectos químicos y estructurales de la pared celular vegetal, resulta esencial para optimizar su descomposición (Zoghlami & Paës, 2019).

1.5.1.1. Celulosa

La celulosa es el polímero más abundante en la biomasa lignocelulósica (40 – 60 % en peso) y está formado por unidades de β -D-glucopiranososa unidas por enlace β -1-4, con unidades repetitivas de celobiosa. Estas cadenas de glucosa se agrupan formando microfibrillas que se ensamblan en fibrillas de celulosa altamente ordenadas e incrustadas en una matriz lignocelulósica densa (Robak & Balcerek, 2018).

Respecto a su accesibilidad, un factor importante es el grado de polimerización, que se encuentra asociado con cadenas más largas de glucosa y mayores enlaces de hidrógeno, lo que dificulta su hidrólisis. Por otro lado, cadenas cortas tienden a tener enlaces más débiles, repercutiendo positivamente en la hidrólisis enzimática (Meng et al., 2017). Adicionalmente, factores como la

cristalinidad y la porosidad, aumentan la recalcitrancia de este polímero al estar estrechamente relacionado con el grado de polimerización.

1.5.1.2. Hemicelulosa

La hemicelulosa es el segundo polímero más abundante en la biomasa lignocelulósica (20-35 % en peso) y está compuesto por diversos polisacáridos ramificados tales como xilanos, mananos, xiloglucanos y glucomananos (Chandel et al., 2018). En comparación con la celulosa, este polímero posee un menor grado de polimerización y tiene una estructura menos rígida, posicionándola como más susceptible a hidrólisis por ácidos diluidos, bases suaves o enzimas tipo hemicelulasa (Mota et al., 2018).

La principal función de este polímero es la protección física, que limita el acceso enzimático a la celulosa subyacente. Diversos estudios demostraron que la remoción parcial de hemicelulosa mediante tratamientos con explosión de vapor o uso de ácidos diluidos, mejoran la exposición de celulosa al aumentar la porosidad de la biomasa, y por lo tanto, aumentando la superficie disponible para el ataque enzimático (Santos et al., 2018; Krueyanski et al., 2019). Algunos autores reportan que la lignina, es un importante agente restrictivo en la función enzimática para la hidrólisis (Gao et al., 2015).

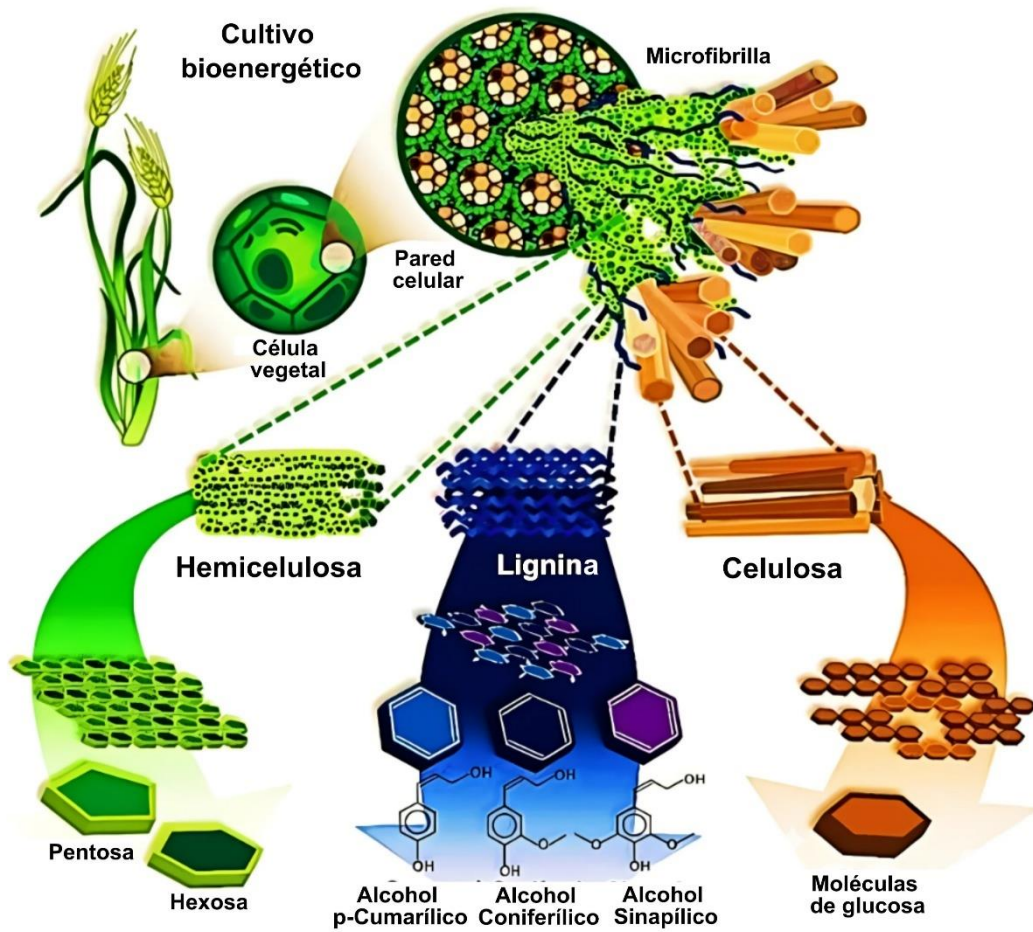
1.5.1.3. Lignina

Es un heteropolímero amorfo altamente complejo en forma y estructura, formado por unidades fenólicas derivadas de alcoholes, entre ellos el p-cumarílico, coniferílico y sinapílico (Agbor et al., 2011). La principal función biológica radica en conferir hidrofobicidad, rigidez estructural y actuar como agente intercalante entre la hemicelulosa y celulosa de la pared celular vegetal.

Algunos estudios demostraron que este heteropolímero tiene un efecto adverso sobre la eficacia en la hidrólisis enzimática de la celulosa mediante la adsorción irreversible a las enzimas mediante interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno, grupos metoxilo y estructuras poliaromáticas (Kumar & Wyman, 2009; Zeng et al., 2014). La correlación lignina y digestibilidad enzimática ha sido negativa en diversas especies vegetales no tratadas como álamo, paja de trigo y arroz transgénico (Meng et al., 2017; Yoo et al., 2017; Huang et al., 2017). En respuesta a ello, pretratamiento que mejoran la porosidad del material, reduce los sitios de adsorción, lo cual facilitaría la actividad enzimática (Pihlajaniemi et al., 2016). Por otro lado, una relación interesante es la planteada para la proporción entre sinapilo (S) y coniferilo (G) implicados en la recalcitrancia. Guo et al. (2014) reporta que una mayor proporción de G está asociada a una mayor adsorción de celulasas.

Figura 1

Componentes y estructura de la lignocelulosa de la pared celular vegetal



Nota: Adaptado de Insight into Pretreatment Methods of Lignocellulosic Biomass to Increase Biogas Yield: Current State, Challenges, and Opportunities (p. 3), por Hernández-Beltrán et al. (2019), *Applied Sciences*, 9.

Tabla 1

Composición porcentual de la biomasa lignocelulósica

Biomasa	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Grass bermuda	47,8	13,3	19,4
Mazorca de maíz	35,0 – 39,0	38,0 – 42,0	4,5-6,6
Paja de arroz	41,0	21,5	9,9
Bagazo	38,1	26,9	18,4
Pulpa de café	24,0	8,9	19,4
Fibra de coco	17,7	2,2	34,0
Cáscara de arroz	24,0 – 29,0	12,0 – 14,0	11,0 – 13,0
Paja de trigo	36,6	24,8	14,5
Serrín	45,0	15,1	25,3

Nota: Adaptado de Microbial Xylanases: Sources, Types, and Their Applications (p.152), por El Enshasy et al. (2016), *Biofuel and Biorefinery Technologies*, 3.

1.5.2. Xilano

El xilano, uno de los principales componentes de la hemicelulosa, es uno de los polisacáridos más abundantes de la naturaleza y representa una parte importante de la biomasa vegetal, que constituye aproximadamente el 20-30% del peso seco

de las paredes celulares secundarias en las dicotiledóneas, incluidos los árboles de madera dura, y hasta el 50% en las gramíneas como forrajes y cereales (Curry et al., 2023).

Por otro lado, la evolución del complejo β -1,4 xilano fue un acontecimiento fundamental en la evolución de las plantas, que coincidió con la colonización de la tierra por las plantas al estar presente en la interfaz entre la lignina y la celulosa en la pared celular vegetal (Kang et al., 2019), donde desempeña un papel crucial en la cohesión de las fibras y la integridad estructural general de la pared celular. Además, la alta diversidad de estructuras químicas de los xilanos derivados de material vegetal, requiere una amplia variedad de xilanasas con diferentes actividades hidrolíticas y propiedades fisicoquímicas (Scheller & Ulvskok, 2010).

1.5.2.1. Estructura y distribución

Se encuentra en proporciones significativas en la madera dura de angiospermas (15-30% de la pared celular) y en la madera blanda de gimnospermas (7-10%), así como en plantas anuales (menos del 30%) (Singh et al., 2003). Estructuralmente, los xilanos se pueden describir como polímeros de carbohidratos con cadenas principales de β -1,4-xilosil, aunque también se han identificado xilanos con estructuras de β -1,3-xilosil y enlaces mixtos de β -1,4-1,3 en algas (Deniaud et al., 2003). Además, según

la naturaleza de sus grupos sustituyentes, los xilanos pueden clasificarse en cuatro familias principales.

- **O-acetilglucuronoxilano (AcGX):** Este tipo de xilano se encuentra mayormente en las gruesas paredes celulares secundarias lignificadas de las maderas duras y en especies dicotiledóneas herbáceas, como *Populus alba* (álamo) y *Arabidopsis thaliana* (arabidopsis) (Jacobs et al., 2001). Además, residuos de xilosa en la cadena principal están acetilados en O-2, O-3 o en ambos, siendo la sustitución más frecuente en este tipo de xilano.
- **Arabinoglucuronoxilano (AGX):** Los AGX se encuentran en las paredes celulares de la mayoría de las gimnospermas, como los pinos, y suelen estar con grupos de ácido 4-O-metil- α -D-glucurónico en O-2 y residuos de α -L-arabinofuranosa en O-3, aproximadamente cada diez unidades de xilosa (Sjöholm et al., 2000). A diferencia de los AcGX, generalmente no presentan acetilaciones.
- **O-acetilglucuronoarabinoxilano (AcGAX):** Este xilano es característico de las gramíneas. Los AcGAX contienen residuos de ácido glucurónico o ácido 4-O-metilglucurónico en O-2, pero sus principales sustituciones son los residuos de α -L-arabinofuranosa en O-3. Además, en los AcGAX de las paredes primarias, los residuos de arabinosa

pueden estar sustituidos en O-2 o O-3, o en ambos, por otros residuos de α -L-arabinofuranosa o xilosa (Mazumder et al., 2012).

- **O-acetilarabinoxilano (AcAX):** Los AcAX se encuentran en las paredes celulares de los granos de cereales almidonosos, constituido por una cadena principal de xilosa unidas por enlace β -1,4. Presenta ramificaciones de arabinosa (α -1,2 o α -1,3), y grupos acetilo unidos a la xilosa en posiciones C-2 o C-3 (Motta et al., 2013). En menor proporción, residuos de arabinosa pueden estar esterificados con ácidos ferúlico o p-cumárico en O-5, lo que facilita la formación de enlaces cruzados entre diferentes moléculas de xilano o entre xilano y lignina. (Grabber et al., 2000).

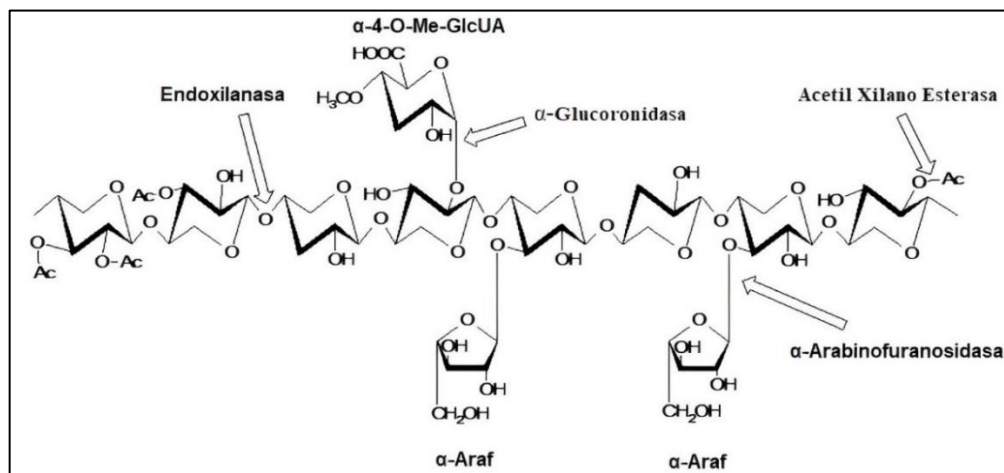
1.5.3. *Visión general de xilanasas*

El sistema enzimático xilanolítico responsable de la hidrólisis del xilano está compuesto por un conjunto de enzimas, que incluyen endoxilanasas (endo-1,4- β -xilanasas, E.C.3.2.1.8), β -xilosidasas (xilano-1,4- β -xilosidasas, E.C.3.2.1.37), α -glucuronidasas (α -glucosiduronasas, E.C.3.2.1.139), α -arabinofuranosidasas (α -L-arabinofuranosidasas, E.C.3.2.1.55) y acetilxilano esterasas (E.C.3.1.1.72) (Juturu & Chuan, 2012). Entre ellas, las endoxilanasas son particularmente relevantes debido a su papel directo en la ruptura de los enlaces glicosídicos y la liberación de

xilooligosacáridos (Verma & Satyanarayana, 2012). Debido a su tamaño y estructura compleja del xilano, no puede asimilarse directamente en la pared celular de los microorganismos. Sin embargo, sus productos de degradación como xilosa, xilobiosa, xilooligosacáridos y heterodisacáridos generados por acción de enzimas microbianas o por condiciones naturales del entorno, pueden actuar como inductores en la biosíntesis de xilanasas al activar vías regulatorias asociadas a la presencia de estos compuestos (Motta et al., 2013).

Figura 2

Estructura del xilano y principales enzimas xilanolíticas asociadas en su degradación



Nota: Ac: Grupo acetilo; α-Araf: α-arabinofuranosa; α-4-O-Me-GlcA: α-4-O-ácido metilglucurónico. Adaptado de Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria (p. 143) por Sunna & Antranikian (1997), *Critical Reviews in Biotechnology*. 17(1).

La endo- β -1,4-xilanasas cataliza la hidrólisis aleatoria de los enlaces glucosídicos β -1,4 que unen los residuos de D-xilosa en la cadena principal del xilano. Este mecanismo libera xilooligosacáridos de diversos tamaños, como xilobiosa, xilotriosa y xilotetraosa, los cuales corresponden a fragmentos lineales del polímero inicial (Kulkarni et al., 1999). Para completar la degradación del xilano hasta xilosa monomérica, se requiere la participación de β -xilosidasas, que escinden los extremos no reductores de los xilooligosacáridos, liberando unidades individuales de xilosa (Kulkarni et al., 1999). Sin embargo, debido a que el xilano vegetal frecuentemente está sustituido con grupos acetilo en su cadena principal, se requiere la acción sinérgica de enzimas accesorias como la acetilxilan esterasa. Esta enzima remueve los grupos acetilo unidos a los residuos de D-xilosa, lo que permite una hidrólisis más eficiente del polímero por parte de las xilanasas (Coughlan & Hazlewood, 1993).

1.5.3.1. Clasificación y características de las xilanasas

Las endo- β -1,4-xilanasas, pertenecientes a las familias de glicosil hidrolasas (GH) 10 y 11, son enzimas capaces de hidrolizar la cadena principal del xilano (Lombard et al., 2014). Las enzimas GH10 se caracterizan por una mayor eficiencia de hidrólisis en heteroxilanos y menor

sensibilidad frente a enlaces β -1,3 en la estructura del xilano (Méndez-Líter et al., 2021). En contraste, las GH11 muestran una alta especificidad, ya que actúan exclusivamente sobre enlaces β -1,4 (Biey et al., 1997). Sin embargo, se ha reportado que, en ciertas ocasiones, las GH11 pueden superar a las GH10 en la hidrólisis de sustratos insolubles (Méndez-Líter et al., 2021).

De acuerdo con la base de datos CAZy (The Carbohydrate-Active EnZymes database) indicada por Elodie et al. (2022), clasifica las enzimas xilanasas basándose en diversos parámetros estructurales y funcionales, las β -xilosidasas están agrupadas en las familias 1, 2, 3, 5, 10, 30, 39, 43, 51, 52, 54 y 120 de las glicosil hidrolasas (GHs), con representantes arqueales en la mitad de estas familias (1, 2, 3, 5, 10, 39, 43 y 51). De manera similar, las endo-xilanasas se encuentran en las familias GH 5, 6, 8, 10, 11, 26, 30, 43 y 98, siendo las endoxilanasas arqueales presentes solo en 5 de estas familias: 5, 10, 11, 26 y 43.

Figura 3

Clasificación y características de la familia glicosilhidrolasa de acuerdo a la base de datos CAZy

	GH-1	GH-2	GH-3	GH-5	GH-10	GH-30
β-xylosidases	GH-A Retaining (β/α) ₃ 98% Bacteria 0,9% Archaea 0,8% Eukaryota	GH-A Retaining (β/α) ₃ 98% Bacteria 0,5% Archaea 1% Eukaryota	- Retaining (β/α) ₃ 99% Bacteria 0,5% Archaea 0,8% Eukaryota	GH-A Retaining (β/α) ₃ 95% Bacteria 0,9% Archaea 4% Eukaryota	GH-A Retaining (β/α) ₃ 96% Bacteria 0,6% Archaea 4% Eukaryota	GH-A Retaining (β/α) ₃ 97% Bacteria 0% Archaea 3% Eukaryota
	GH-39	GH-43	GH-51	GH-52	GH-54	GH-120
	GH-A Retaining (β/α) ₃ 98% Bacteria 0,5% Archaea 1% Eukaryota	GH-F Inverting 5-fold β-propeller 98% Bacteria 0,2% Archaea 1% Eukaryota	GH-A Retaining (β/α) ₃ 97% Bacteria 0,9% Archaea 2% Eukaryota	GH-O Retaining (α/α) ₆ 100% Bacteria 0% Archaea 0% Eukaryota	GH-B Retaining β-jelly roll 74% Bacteria 0% Archaea 26% Eukaryota	- Retaining Parallel β-helix 100% Bacteria 0% Archaea 0% Eukaryota
	GH-5	GH-6	GH-8	GH-10	GH-11	GH-26
Endo-xylanases	GH-A Retaining (β/α) ₃ 95% Bacteria 0,9% Archaea 4% Eukaryota	- Inverting (β/α) ₃ 9% Bacteria 0% Archaea 3% Eukaryota	GH-M Inverting (α/α) ₆ 100% Bacteria 0% Archaea 0% Eukaryota	GH-A Retaining (β/α) ₃ 96% Bacteria 0,6% Archaea 4% Eukaryota	GH-C Retaining β-jelly-roll 93% Bacteria 0,9% Archaea 6% Eukaryota	GH-A Retaining (β/α) ₃ 98% Bacteria 0,7% Archaea 1% Eukaryota
	GH-30	GH-43	GH-98			
	GH-A Retaining (β/α) ₃ 97% Bacteria 0% Archaea 3% Eukaryota	GH-F Inverting 5-fold β-propeller 98% Bacteria 0,2% Archaea 1% Eukaryota	- Inverting (α/β) ₃ 100% Bacteria 0% Archaea 0% Eukaryota			

Nota: Adaptado de Xylanases from thermophilic archaea: A hidden treasure (p. 4), por Saavedra-Bouza et al. (2023), *Current Research in Biotechnology*, 5.

Tabla 2

Diferencias principales de las xilanasas miembros de la familia GH11 y GH10

Familia GH 10	Familia GH 11
Masa molecular alta > 30 kDa	Masa molecular baja < 30 kDa
Punto isoeléctrico bajo	Punto isoeléctrico alto
Presenta un dominio de unión a carbohidratos	No presenta dominio de unión a carbohidratos
Plegamiento común (α/β)8 barrel	Plegamiento común β -jelly roll
Interactúan con celulosa y otros polisacáridos	No interactúan sobre sustratos celulósicos y otros polisacáridos
Activa sobre xilanos ramificados y no ramificados	Activa sobre xilanos no ramificados

Nota: Adaptado de Thermophilic xylanases: from bench to bottle (pp. 991 – 992) por Basit et al. (2018), *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(7).

1.5.3.2. Mecanismo molecular de las xilanasas

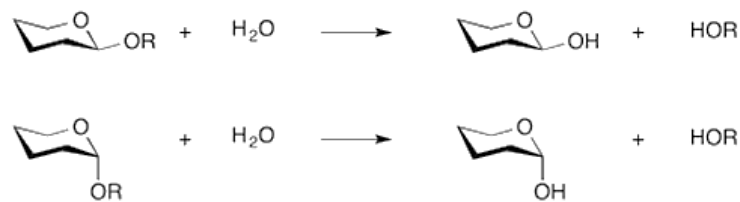
Las endoxilanasas y las β -xilosidasas catalizan la hidrólisis de los enlaces glicosídicos mediante dos mecanismos: retención o inversión de la configuración anomérica (Pollet et al., 2010). Para el mecanismo de inversión, se propone que dos residuos de glutamato/aspartato (separados por 10,5 Å) actúan de manera sinérgica, uno activa la molécula de agua y el otro protona el grupo abandonador (Knob et al., 2009). Por otro lado, en el

mecanismo de retención, un residuo ácido protona el oxígeno glicosídico, a su vez que un nucleófilo ataca el carbono anomérico, formando el complejo glicosil-enzima (inversión temporal $\alpha \rightarrow \beta$). Luego, una molécula de agua activada hidroliza este complejo intermediario, restableciendo la configuración original de $\beta \rightarrow \alpha$ (Davies & Henrissat, 1995).

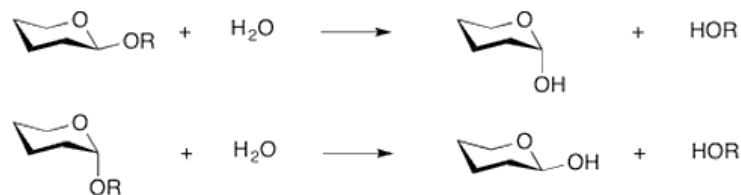
Figura 4

Mecanismos de acción enzimática por retención e inversión de glicosilhidrolasas

Mecanismo de retención de glicosilhidrolasas



Mecanismo de inversión de glicosilhidrolasas



Nota: Adaptado de β -Glucosidasas (p. 3398) por Ketuda & Esen (2010), *Cellular and Molecular Life Sciences*. 67.

1.5.4. Microorganismos productores de xilanasas

Los microorganismos productores de xilanasas, como hongos y bacterias, desempeñan un papel fundamental en la degradación de

hemicelulosas, particularmente el xilano. Las xilanasas tienen amplias aplicaciones industriales en sectores como la producción de bioenergía, la industria alimentaria y del papel, debido a su capacidad para catalizar la hidrólisis de xilano en xilooligosacáridos y xilosa (Phuyal et al., 2023). En este contexto, los microorganismos nativos de nichos extremos, como los nichos termófilos, tanto hongos como bacterias, son de particular interés debido a su habilidad para mantener la actividad enzimática a elevadas temperaturas, condición requerida en diversos procesos industriales.

1.5.4.1. Bacterias productoras de xilanasas

Dentro del grupo de bacterias productoras de xilanasas, las especies del género *Bacillus* son particularmente importantes debido a su capacidad para producir enzimas termoestables que pueden hidrolizar xilano en xilosa y xilobiosa (Bhardwaj et al., 2019). En general, el pH óptimo de las xilanasas bacterianas es ligeramente más alto que el de las xilanasas fúngicas, lo que las hace adecuadas para aplicaciones industriales, especialmente en las industrias de papel y pulpa (Khasin et al., 1993). Al considerar la temperatura, se han reportado xilanasas que muestran actividad óptima a temperaturas elevadas de varios microorganismos, como *Geobacillus thermoleovorans*, *Streptomyces* sp. S27, *Bacillus firmus*, *Actinomadura* sp. y *Saccharopolyspora pathunthaniensis*, todas las cuales

producen xilanasas activas entre 65 y 90 °C (Verma & Satyanarayana, 2012). Además, investigaciones han explorado la clonación de genes de xilanasas de *Bacillus* en organismos modelo como *Escherichia coli* para optimizar su producción y facilitar su uso a nivel industrial (Jhamb & Sahoo, 2012).

Tabla 3

Bacterias reportadas en la producción de xilanasas y sus características

Organismos	pH óptimo	Temperatura óptima (°C)
<i>Caldicoprobacter algeriensis</i> TH7C1(T)	11,0	70
<i>Microcella alkaliphila</i> JAM-AC0309	8,0	65
<i>Acinetobacter jhonsonii</i>	6,0	55
<i>Streptomyces griseorubens</i> LH-3	5,0	60
<i>Aeromonas caviae</i> ME1	7,0	50
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	9,0	70
<i>Bacillus sp.</i> 41-1(36)	9,0	50
<i>Bacillus sp.</i> TAR-1	6,0	75
<i>Bacillus stearothermophilus</i> T-6	6,5	75

Nota: Adaptado y modificado de Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application (p. 40), por Subramaniyan & Prema (2002), *Critical Reviews in Biotechnology*, 22(1).

1.5.5. Transformación de Escherichia coli

La transformación bacteriana es un procedimiento importante en biotecnología que se utiliza para introducir ADN exógeno en bacterias, como en *Escherichia coli*, con la finalidad de modificar genéticamente, con el fin de expresión de proteínas en gran cantidad empleando medios de cultivo económicos, clonación, producción de metabolitos o investigación funcional de las propiedades de la molécula diana. Esta transferencia de genes se realiza comúnmente mediante plásmidos, que son moléculas circulares de ADN autorreplicable y extracromosómico, que pueden transportar genes de interés y que son ampliamente utilizados como vectores para la ingeniería genética.

Los procesos de transformación se clasifican en dos tipos generales: químicos y físicos. En los procesos químicos, las células competentes de *E. coli* se incuban con cloruro de calcio (CaCl_2), lo que permite neutralizar las cargas negativas tanto del ADN plasmídico como de la membrana celular. Posteriormente, un choque térmico (generalmente 42 °C durante 30-60 segundos) desencadena la aparición de poros transitorios en la membrana, lo que permite la entrada del plásmido con el gen de interés, dentro del citoplasma (Dagert y Ehrlich, 1979). Este proceso se utiliza con frecuencia debido a su simplicidad y eficiencia en cepas químicamente competentes.

Así mismo, los métodos físicos para el proceso del ADN son la electroporación, que consiste en aplicar pulsos eléctricos cortos pero intensos que

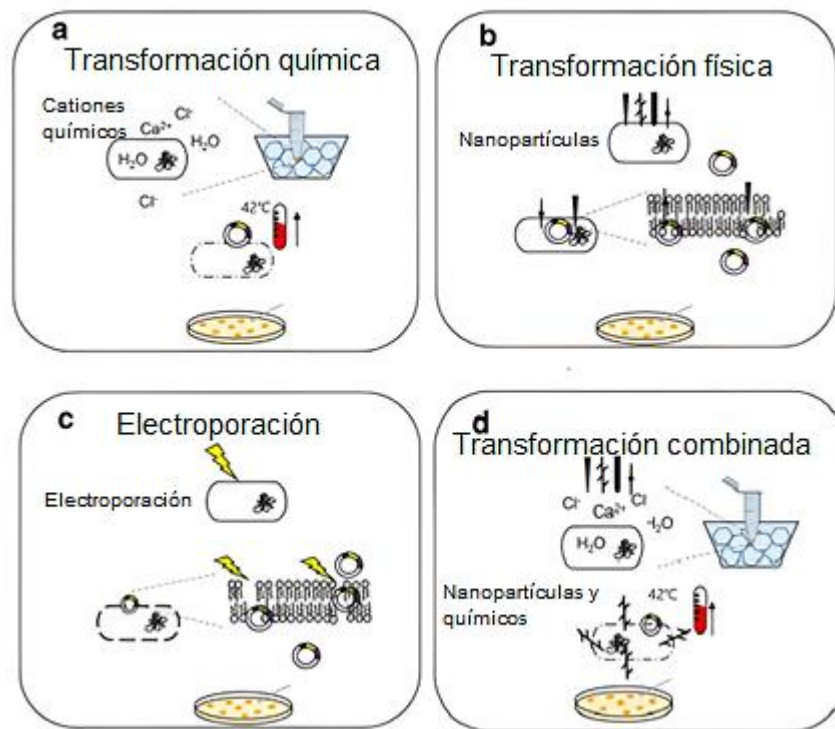
inducen poros transitorios en la membrana celular, permitiendo una incorporación más eficiente del ADN (Ren et al., 2017). También se han propuesto tecnologías emergentes que utilizan nanomateriales, como nanotubos de carbono o fibras de asbesto, los cuales perforan la membrana bacteriana formando canales que permiten el ingreso del ADN (Yoshida & Sato, 2009). Por lo tanto, estas estrategias representan alternativas prometedoras, especialmente para ser aplicadas en cepas que presentan baja eficiencia de transformación.

Para mejorar la eficiencia de transformación, se han desarrollado enfoques combinados. Por ejemplo, en *Corynebacterium glutamicum*, la combinación de electroporación con choque térmico ha demostrado duplicar la tasa de transformación en comparación con métodos individuales (Ren et al., 2017). Por otra parte, la sinergia del catión rubidio (RbCl) con sepiolita (estructura de nanofibra) es capaz de formar nanocanales transitorios que facilitan el paso del ADN a la célula, haciéndolo mucho más eficiente en diferentes especies bacterianas (Rest et al., 1999).

En conjunto, estos métodos representan herramientas clave en la biotecnología microbiana, siendo la transformación de *E. coli* un paso esencial para la expresión de proteínas recombinantes, estudios funcionales de genes y desarrollo de sistemas de producción a escala.

Figura 5

Métodos de transformación bacteriana in vitro



Nota: Adaptado de Artificial transformation methodologies for improving the efficiency of plasmid DNA transformation and simplifying its use (p. 9210), por Jun et al. (2019), *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103. Springer.

1.5.6. Expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*

La expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli* es una técnica muy utilizada debido a su crecimiento acelerado, bajo coste y sistema genético bien caracterizado. Este proceso comienza con la inserción del gen que se desea expresar en un vector de expresión, que añade elementos reguladores necesarios para la transcripción (como promotores y

operadores) y la traducción, como regiones ribosómicas Shine-Dalgarno y codones de inicio (Allet et al., 1998).

Una vez que las células han sido infectadas con el vector, la expresión del gen insertado se inicia mediante la adición de compuestos inductores. En sistemas como el promotor T7, uno de los más comunes en *E. coli*, es el isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), que es un análogo de la lactosa no metabolizable. El IPTG inactiva el represor lacI, permitiendo la transcripción del gen bajo control del promotor lac o T7 acetilado a lacO, activando así la maquinaria de transcripción de la ARN polimerasa T7 y dando lugar a una expresión génica fuerte y específica (Studier y Moffatt, 1986).

Los parámetros que regulan la eficacia de la expresión son: La concentración de IPTG, la densidad óptica en la inducción (normalmente $OD_{600} \approx 0,6$), la temperatura posterior a la inducción (normalmente entre 16 °C y 37 °C en función de la solubilidad prevista de la proteína), la agitación (para mantener una oxigenación adecuada) y el tiempo de incubación, que suele variar entre 2 y 20 horas en función del sistema y el objetivo (Terpe, 2006).

La correcta optimización de estos parámetros es esencial, ya que la sobreexpresión puede conducir a una acumulación de proteínas mal plegadas y a la formación de cuerpos de inclusión, estructuras agregadas que

inactivan la proteína de interés (Wingfield, 2015). Aunque este problema es común, puede mitigarse mediante estrategias como el uso de temperaturas postinducción más bajas, la reducción de la concentración de IPTG o la coexpresión de chaperonas moleculares que ayudan al correcto plegamiento de las proteínas (Fersht, 1998).

Por otro lado, *E. coli* presenta limitaciones en la formación de enlaces disulfuro, necesarios para la estabilidad estructural de muchas proteínas. Dado que su citoplasma es un entorno reductor, las proteínas con estos enlaces tienden a no plegarse correctamente. Sin embargo, se han desarrollado cepas mutantes como Origami™ o Rosetta-gami™, que permiten un entorno oxidante en el citoplasma, facilitando así la formación de enlaces disulfuro (Missiakas y Raina, 1997).

1.5.7. Estrategias de purificación de proteínas recombinantes

1.5.7.1. Purificación de Proteínas Solubles

(a) Ruptura Celular: La ruptura de las células es un paso inicial crucial para liberar las proteínas solubles al lisado celular. Los métodos comunes incluyen homogeneización a alta presión para volúmenes de 40 a 250 ml, sonicación para volúmenes menores a 100 mL, así como de manera alternativa, el empleo de agentes enzimáticos para las paredes celulares y

posterior tratamiento con detergentes o sonicación (Burgess & Jendrick, 1975).

(b) Clarificación del Lisado: Una vez rotas las células, el lisado se clarifica por centrifugación a baja velocidad para eliminar células no rotas y desechos grandes, seguido de una centrifugación a alta velocidad para eliminar material ribosomal y otros particulados (Wingfield, 2015). Por otro lado, se pueden utilizar técnicas como el fraccionamiento con sulfato de amonio o polietilenglicol, partición de fases, y filtración de membrana para clarificar el extracto (van Reis & Zydney, 2001).

(c) Cromatografía de Intercambio Iónico: Dependiendo de la carga neta de la proteína objetivo, puede emplearse una cromatografía de intercambio aniónico o catiónico. El principio radica en la interacción electrostática entre las proteínas cargadas y una resina con grupos funcionales de carga opuesta. Al ajustar el pH y la fuerza iónica del tampón, se puede modificar la interacción entre la proteína y la resina, permitiendo su elución de manera controlada, mejorando la resolución y la pureza de la proteína purificada (le Maire et al., 2000).

(d) Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados: Se basa en la interacción entre algunos aminoácidos de la proteína de interés, principalmente histidinas, cisteínas y triptófanos, e iones metálicos de transición (Zn, Cu, Ni y Co) que han sido inmovilizados en una matriz

cromatográfica mediante agentes quelantes como el nitrilotriacético (NTA). En base a este principio, esta técnica ha sido altamente aprovechada para la purificación específica de proteínas recombinantes que están marcadas con etiquetas de polihistidina, las cuales pueden unirse con alta afinidad en la interacción con la matriz (Block et al., 2009). Para la recuperación de la proteína, no se elimina mediante lavados, sino por competencia con imidazol.

(e) Filtración en Gel: La filtración en gel, también conocida como cromatografía de exclusión por tamaño, es una técnica que separa moléculas en función a su tamaño hidrodinámico. La matriz utilizada está compuesta por partículas porosas que permiten el paso de moléculas pequeñas en su interior, mientras que las de mayor tamaño quedan excluidas. De esta forma, las proteínas más grandes eluyen más rápido, y luego las de menor tamaño. De esta forma, es usada comúnmente como paso final en procesos de purificación proteica, ya que permite eliminar moléculas de tamaño no deseado y otras impurezas. Cabe recalcar que este método nos permite el intercambio de buffer, permitiendo ajustar la proteína purificada bajo condiciones óptimas para su conservación o aplicación (Wingfield, 2015).

1.5.7.2. Purificación de Proteínas Insolubles

(a) Formación de Cuerpos de Inclusión: Las proteínas insolubles suelen agregarse en cuerpos de inclusión dentro del citoplasma de *E. coli*. Estos cuerpos de inclusión se pueden aislar en la fracción del pellet después de la ruptura celular y la centrifugación a baja velocidad. Para extraer estas proteínas, se utilizan condiciones de desnaturalización con agentes como guanidina - HCl o urea (Bibi & Beja, 1994).

(b) Solubilización de Proteínas: Una vez aisladas, las proteínas en cuerpos de inclusión se solubilizan con agentes desnaturalizantes. La proteína desnaturalizada puede purificarse mediante métodos como la filtración en gel, utilizando el mismo agente desnaturalizante para mantener la proteína en solución (Burgess & Knuth, 1996).

(c) Replegamiento de Proteínas: Se lleva a cabo reduciendo gradualmente la concentración de agentes desnaturalizantes bajo condiciones controladas, en presencia de aditivos como sales, tioles de bajo peso molecular, y cosolventes para mantener la solubilidad durante el proceso de replegamiento (De Bernáñez et al., 1999). Posteriormente, las proteínas refoldadas a menudo requieren purificación adicional para eliminar agregados y proteínas mal plegadas.

1.5.8. Caracterización funcional de proteínas recombinantes

La caracterización funcional de proteínas recombinantes es un paso importante para validar de manera experimental la eficiencia catalítica, estabilidad estructural y sus aplicaciones en diferentes aspectos industriales como el alimentario, papelerero, agrícola o bioenergético (Walsh & Jefferis, 2006). En el caso particular de las endoxilanasas, desempeñan un rol esencial en la degradación de xilanos, permitiendo la liberación de xilooligosacáridos y xilosa. Caracterizar funcionalmente a estas enzimas permite evaluar su capacidad hidrolítica en condiciones controladas, así como su idoneidad para procesos industriales específicos los cuales sea apropiada.

El proceso inicial empieza con la evaluación de la actividad catalítica sobre sustratos como xilano de madera de haya, lo que nos permite determinar parámetros cinéticos fundamentales clave como la constante de Michaelis-Menten (K_m) y la velocidad máxima (V_{max}), indicador que reflejan el grado de afinidad y eficiencia catalítica, respectivamente (Michaelis & Menten, 1913).

Factores experimentales cruciales como el pH y la temperatura influyen diferencialmente en la actividad enzimática, ya que pueden alterar la estructura tridimensional de la proteína, modificando el estado del sitio activo o promoviendo la desnaturalización (Suzuki et al., 2015). Por ello, es de importancia determinar el perfil de actividad frente al pH y a la temperatura, así como los rangos óptimos de

pH, lo que nos permitirá predecir el comportamiento de la enzima en condiciones industriales.

La xilanasa de *Aspergillus fumigatus* R1 muestra una actividad óptima a pH 5 y 50 °C, manteniendo más del 90 % de su actividad en un rango de pH de 4 a 10 y temperaturas entre 40 y 60 °C (Deshmukh et al., 2016). De manera similar, la xilanasa de *Bacillus oceanisediminis* SJ3, presenta una amplia estabilidad en un rango de pH de 5 a 10, reteniendo el 80 % de actividad a niveles de pH 10 (Boucherba et al., 2017).

La presencia de iones metálicos también se ha demostrado que ejercen efecto sobre la actividad enzimática. Iones como Ca^{2+} y Mn^{2+} pueden actuar como cofactores, estabilidad la estructura proteica y protegiendo la desnaturalización térmica (Abdella et al., 2021). Sin embargo, metales pesados como Hg^{2+} , Cu^{2+} y Pb^{2+} pueden inhibir la actividad de las xilanasas al interactuar con grupos funcionales específicos, alterando su configuración y funcionalidad (Pereira et al., 2016). Por lo tanto, su análisis permite identificar cofactores esenciales, inhibidores o condiciones desfavorables que deben de evitarse durante la aplicación biotecnológica.

II. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Materiales

2.1.1. *Material biológico*

La cepa *Escherichia coli* BL21, y el plásmido recombinante [pET-TRX1-LIC-EndoxylA], que codifica el gen de una xilanasa de *Paenibacillus barengoltzii*, fue proporcionado para el desarrollo de esta tesis por el Laboratorio de Investigación en Biotecnología Enzimática de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

2.1.2. *Equipos*

- Incubadora estática
- Incubadora con agitación orbital
- Lector de microplaca EPOCH-2
- Vórtex
- Termomezclador C - Eppendorf
- Cocinilla eléctrica
- Máquina de hielo en escamas
- Destilador de agua tipo II
- Refrigeradora/congeladora
- Cabina de bioseguridad clase II tipo A2
- Autoclave vertical
- Horno esterilizador
- Ultracongeladora
- Balanza analítica
- Centrífuga refrigerada

- Sonicador
- Baño maría
- pHmetro digital
- Cámara de electroforesis vertical
- Fuente de poder

2.1.3. Instrumentos

- Papel filtro Whatman N°1
- Papel aluminio
- Microplacas termorresistentes
- Microplacas de lectura
- Gradillas de microtubos
- Microtubos de PCR (200 μ L)
- Microtubos de centrifuga (1,5 y 2 mL)
- Tubos falcon (12 y 50 mL)
- Guantes de nitrilo M
- Matraces Erlenmeyer (50, 250 y 500 mL)
- Dispositivo Amicon 10 kDa
- Micropipetas monocanal (0,5-10, 10-100, 20-200; 100-1000 μ L)

2.1.4. Reactivos químicos

- Buffer McIlvaine
- Agua UltraPura
- Peptona
- Cloruro de sodio
- Extracto de levadura

- Cloruro de calcio
- Cloruro de potasio
- Cloruro de magnesio
- Sulfato de magnesio
- D-Glucosa
- D-Xilosa
- Kanamicina
- Agar bacteriológico
- Nitrógeno líquido
- Ácido 3,5-dinitrosalicílico
- Reactivo de Bradford
- Albúmina sérica bovina
- Isopropil β -d-1-tiogalactopiranosido
- Trizma base
- Ácido clorhídrico
- Imidazol
- Glicina
- Resina de Ni-NTA
- Dodecil sulfato de sodio
- Poliacrilamida
- Bis acrilamida
- Tetrametiletildiamina

2.2. Diseño de la investigación

La presente tesis se desarrolló bajo un tipo de investigación básico-descriptivo. En base a ello, a lo largo de todo el estudio se aplicaron estadísticos descriptivos, que incluyeron la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV).

En la detección de clones transformados, la actividad enzimática xilanasa se midió y se presentó en gráficos de barras como U/mL \pm DS para cada clon. Durante la etapa de producción y purificación de la xilanasa, se elaboraron gráficos de líneas que mostraron el ln(U/mL), ln(U/mg) y mg/mL \pm , correspondientes a la actividad enzimática, actividad específica y proteínas totales, respectivamente. Para la determinación de la temperatura y pH óptimos se realizaron gráfico de líneas que representaron la actividad relativa (%), seguido de un ajuste no lineal mediante la ecuación de Gauss (fórmula 1) para determinar el valor óptimo. En los ensayos de estabilidad térmica y al pH, se emplearon gráficos de líneas múltiples para representar la actividad residual tras los tratamientos. Para el análisis del efecto de agentes químicos, se utilizaron gráficos de barras con desviación estándar. Todos los ensayos se realizaron por cuadruplicado. Los análisis y gráficos se realizaron en OriginPro 2024b v10.15.

$$y = ae^{-2\left(\frac{x-x_c}{w}\right)^2} \quad (1)$$

Donde:

y = actividad relativa (%)

a = actividad máxima alcanzada por la enzima

x = temperatura o pH de ensayo (°C o unidades de pH)

x_C = temperatura (°C) o pH donde se alcanza la actividad máxima

w = ancho a mitad de altura

2.3. Métodos

2.3.1. Transformación y detección de clones con actividad xilanasas

2.3.1.1. Transformación de *Escherichia coli* BL21 Star (DE3)

Para la transformación de *Escherichia coli* BL21 Star (DE3), se realizó según lo indicado por Inoue y colaboradores (1990), con ciertas modificaciones. En un microtubo de 1,5 mL se agregó 100 μ L de células competentes con 1 μ L del vector recombinante y se incubó en hielo por 30 minutos. Posteriormente, se llevó a shock térmico a 42 °C durante 90 segundos y se colocó en hielo. Para la recuperación celular, se añadió 1 mL de medio SOC (0,5% extracto de levadura, 2 % triptona, 10 mM CaCl₂, 2,5 mM KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM MgSO₄ y 20 mM de glucosa) a la mezcla y se llevó a 37 °C por 1 hora a 400 RPM (revoluciones por minuto) en un termomezclador. Finalmente, se tomó 100 μ L de cultivo transformado y se vertió en placas con medio agar LB+ (10 g/L peptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl, 50 μ L de glucosa 40% y 100 μ L de MgCl₂ 1M) con kanamicina (50 μ g/mL) y se incubó a 37 °C durante 18 horas.

Al día siguiente, se seleccionó aleatoriamente 4 colonias por picadura con tips de micropipeta, se colocó en caldo Luria Bertani (LB) (10 g/L peptona, 5 g/L extracto de levadura y 10 g/L NaCl) con kanamicina y se llevaron a incubación a 37 °C durante 18 horas. Las células se recolectaron y conservaron a -80 °C.

2.3.1.2. Detección de clones con actividad xilanasa

Para la detección de clones con actividad xilanasa, se realizó según lo indicado por Liu et al. (2019), con ciertas modificaciones. Se reactivaron 4 clones criopreservados y se cultivaron en 5 mL de caldo Lennox (10 g/L Triptona, 5 g/L NaCl, 5 g/L Extracto de levadura) con kanamicina a 37 °C durante 18 horas a 180 RPM. Luego, este cultivo iniciador se empleó como inóculo al 1 % (v/v) en 50 mL de caldo Lennox para cada clon. Se agregó IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 0,1 mM cuando el cultivo llegó a una D.O. \geq 0,6. Tras ello, se incubaron a 30 °C durante 12 horas a 180 RPM. Se midió la actividad enzimática tipo xilanasa de la fracción soluble (FS) (ver Sección 2.3.1.3). Un único clon que mostró mayor actividad enzimática tipo xilanasa se empleó para posteriores ensayos.

2.3.1.3. Medición de actividad xilanasa

La actividad de la xilanasa se midió utilizando el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959). Se añadió 10 μ L de solución enzimática con 100 μ L de xilano de madera de haya al 0,5 % (p/v) preparado en buffer McIlvaine pH 7 a 50 mM y se incubó durante 10 minutos a 60 °C.

Posteriormente, se agregó 100 μL de DNS, seguido de un calentamiento a 100 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos. La reacción se enfrió a temperatura ambiente por 2 minutos y se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro de microplacas EPOCH-2 y se calculó la lectura neta (LN). Una unidad (U) de actividad de xilanasa se definió como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μmol de azúcares reductores equivalente a xilosa, por minuto. Todas las mediciones se realizaron por cuádruplicado. Los valores de absorbancia se registraron para el cálculo de la actividad enzimática, utilizando la fórmula (2).

$$\text{Actividad} \left(\frac{U}{\text{mL}} \right) = \frac{AR \times V_r \times Fd}{V_{enz} \times T_r} \quad (2)$$

Donde:

AR = Azúcares reductores liberados ($\mu\text{mol}/\text{mL}$)

V_r = Volumen de reacción (mL)

Fd = Factor de dilución

V_{enz} = Volumen de enzima (mL)

T_r = Tiempo de reacción (min)

2.3.1.4. Medición de proteínas totales

La medición de proteínas totales se llevó a cabo según el método descrito por Bradford (1976). Se mezcló 20 μL de muestra enzimática con 200 μL de reactivo Bradford (Sigma, USA) y se dejó incubar durante 5 minutos y luego se

midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro EPOCH-2. Todas las mediciones se realizaron por cuadruplicado.

2.3.2. Producción y purificación por cromatografía de afinidad

2.3.2.1. Producción y obtención de fracción soluble

Un único clon se llevó a escalamiento en 500 mL de caldo Lennox, utilizando un inóculo del 1 % (v/v) y se incubó a 37 °C a 180 RPM hasta que alcanzó a una D.O. $\geq 0,6$. Luego, el cultivo se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos y se agregó IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 0,1 mM. El cultivo se incubó a 30 °C durante 12 horas a 180 RPM. Tras el tiempo de inducción, el cultivo se centrifugó durante 10 minutos a 10 °C por 9 000 RPM, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron con 25 mL de buffer de enlace pH 7,5 (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl y 10 mM imidazol). Después, el resuspendido se llevó a sonicación con cuatro ciclos de 2,5 minutos, intervalos de 30 segundos de descanso con 50 % de amplitud. La FS se recuperó del lisado por centrifugación durante 15 minutos a 14 000 RPM a 10 °C (Verma & Satyanarayana, 2012). La actividad enzimática de esta fase se midió por cuadruplicado. La expresión se confirmó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio al 12% (SDS – PAGE). La FS se conservó a 4 °C para la purificación.

2.3.2.2. Purificación enzimática

La purificación se realizó según lo indicado por Xu et al. (2015) con ciertas modificaciones. La FS se mezcló con resina de alta afinidad cargada con Ni²⁺ (GE Healthcare, EE. UU.) y se incubó en agitación rotatoria durante 12 horas a 4 °C. Luego, la mezcla se centrifugó a 3 000 RPM durante 5 minutos y se descartó el excluido (sobrenadante). La resina se transfirió a una columna cromatográfica equilibrada y se lavó dos veces con cuatro volúmenes de buffer de enlace. Luego de ello, el eluido se obtuvo por interacción durante 5 minutos con cuatro volúmenes de buffer de elución (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 500 mM imidazol). La actividad enzimática de esta fase se evaluó por cuadruplicado. El eluido se almacenó a 4 °C.

2.3.2.3. Ultrafiltración enzimática

La ultrafiltración se realizó utilizando un dispositivo Amicon® (Cat. UFC801024; Millipore, EE. UU) con un corte molecular de 10 kDa. El procedimiento se realizó según lo indicado por Aspelund & Glatz (2010), con ciertas modificaciones. Brevemente, el eluido se lavó con cuatro volúmenes de buffer de reacción McIlvaine pH 7 a 25 mM, y se centrifugó a 8 000 RPM las veces que fuera necesario. La actividad enzimática de esta fase se evaluó por cuadruplicado. El concentrado obtenido se almacenó a 4 °C para los ensayos de caracterización.

2.3.3. Caracterización funcional

2.3.3.1. Temperatura óptima y estabilidad térmica

Para la determinación de la temperatura óptima, se incubó la mezcla de reacción entre 40 y 80 °C durante 15 minutos, y la actividad más alta se consideró como el 100 %. La determinación de la temperatura óptima se realizó con el ajuste no lineal mediante la función de Gauss (3). Para el ensayo de estabilidad térmica, la enzima se incubó a temperaturas entre 40 °C y 80 °C durante 0,25, 0,5, 1, 2 y 4 horas (Bhardwaj et al., 2019). Los resultados se expresaron como actividad residual, considerando como 100 % la reacción bajo condiciones óptimas. Todas las reacciones se realizaron por cuadruplicado.

2.3.3.2. pH óptimo y estabilidad al pH

Para la determinación del pH óptimo, se incubó la mezcla de reacción a la temperatura óptima en un rango de pH de 3 a 8 utilizando el sistema tampón McIlvaine 50 mM, y de pH 9 a 10 con el sistema tampón Glicina–NaOH 50 mM, durante 15 minutos. La actividad más alta se consideró como el 100 %. La determinación del pH óptimo se realizó con el ajuste no lineal mediante la función de Gauss (4). Para el ensayo de estabilidad al pH, la enzima se preincubó a 25 °C con Buffer McIlvaine 50 mM en un rango de pH de 4 a 8 durante 2 y 4 horas (Liu & Liu, 2007). Los resultados se expresaron como actividad residual, considerando como 100 % la reacción bajo condiciones óptimas. Todas las reacciones se realizaron por cuadruplicado.

2.3.3.3. Efecto de agentes químicos

Se evaluó el efecto de iones metálicos (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Fe^{2+} y Cu^{2+}), DMSO, SDS y EDTA, a concentraciones finales de 1, 5 y 10 mM, sobre la actividad enzimática de la xilanasa, siguiendo el protocolo de Zhang et al. (2023) con ciertas modificaciones. Se preincubó 10 μ L de la enzima con 50 μ L de buffer McIlvaine pH 7 a 100 mM que contuvo el agente químico y la concentración respectiva, durante 30 minutos a 25 °C. Luego, se agregó 50 μ L de xilano de madera de haya al 1 % y se incubó a 60 °C durante 15 minutos. La reacción se detuvo con DNS y se procedió como se indicó anteriormente en la sección 2.3.1.3. Los resultados se expresaron como actividad residual, considerando como 100 % la reacción basal sin químicos. Todas las reacciones se realizaron por cuadruplicado.

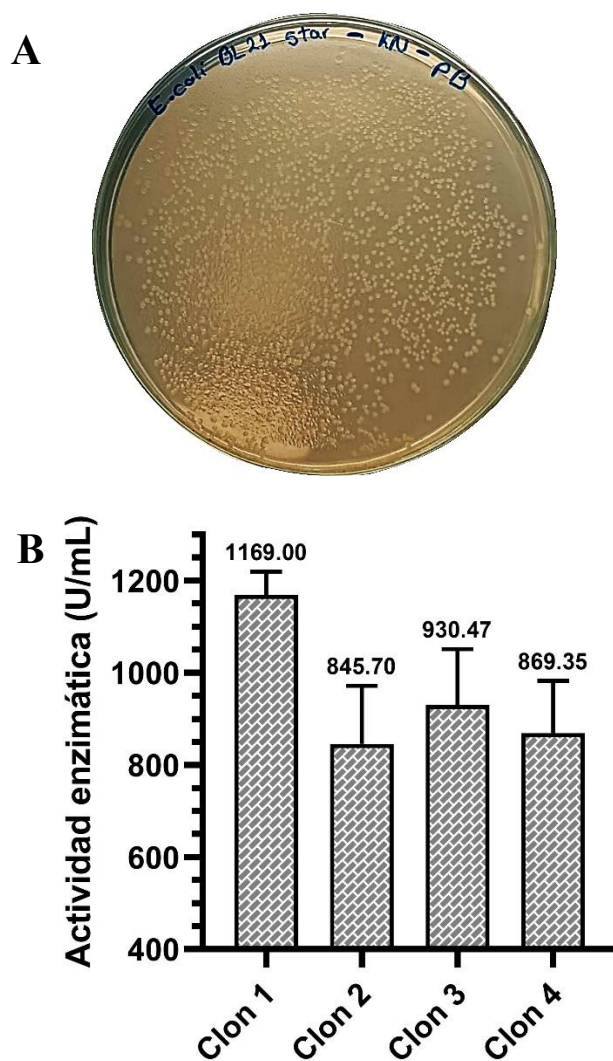
III. RESULTADOS

3.1. Transformación y detección de clones con actividad xilanasa

La transformación de *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) químicamente competente, se evidenció a través de la proliferación celular reflejada en presencia de kanamicina (Figura 6A). Sin embargo, este procedimiento no permite verificar la presencia del gen de interés, por ello, se realizó un cribado aleatorio de clones y ensayos de detección de actividad xilanasa, utilizando xilano de madera de abedul al 0,5 % como sustrato. Todos los clones exhibieron actividad xilanasa, pero el clon 1 destacó con un valor de ~1169 U/mL, seguido de valores de 930,47, 869,35 y 845,70 U/mL para los clones 3, 4 y 2, respectivamente (Figura 6B). En base a estos resultados, el clon 01 se perfila como candidato para ensayos de inducción celular, purificación y caracterización enzimática. Los valores en detalle para cada clon se muestran en la tabla 4.

Figura 6

Células transformadas de *Escherichia coli* con vector de expresión [pET-TRX1-LIC/EndoxylA] y valores de actividad enzimática (U/mL) para cada Clon



Nota: Colonias de *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) en medio Luria Bertani tras 20 horas de incubación a 37 °C (A). Gráfico de barras que representa la actividad enzimática (U/mL) de los 4 clones (B). Las barras de error están calculadas con el promedio de 4 réplicas de medición.

Tabla 4

Actividad enzimática tipo xilanasa de cuatro clones transformados

Clones	Volumen (mL)	Actividad enzimática (U/mL)	Proteínas totales (mg/mL)	Actividad total (U)	Proteínas totales (mg)
Clon 1	2,4	1168,996	3,531	2805,590	8,475
Clon 2	2,5	845,699	3,829	2114,248	9,573
Clon 3	2,7	930,466	3,829	2512,258	10,339
Clon 4	2,8	869,355	3,230	2434,194	9,239

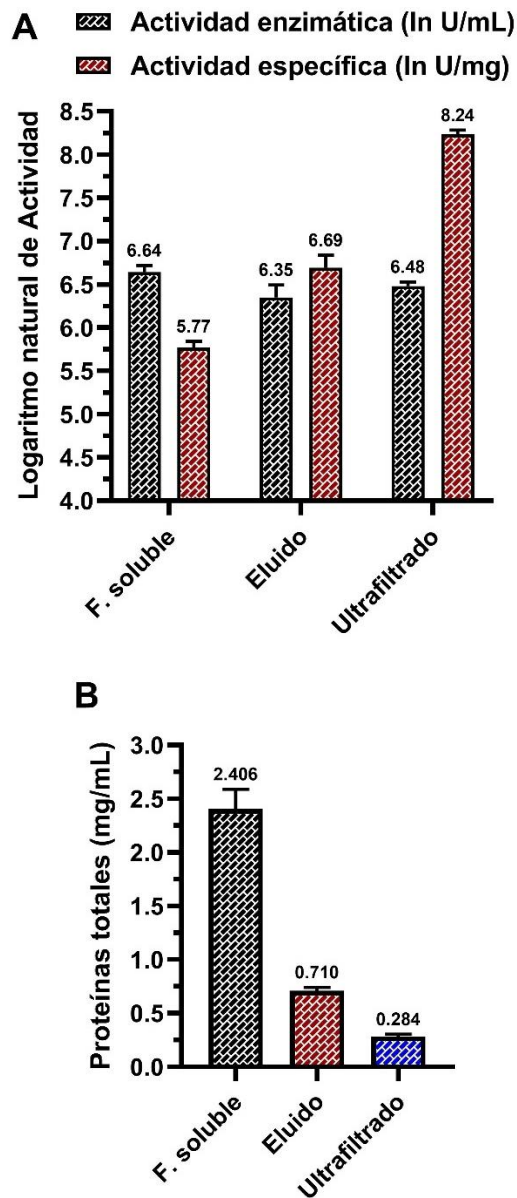
Nota: Valores de actividad enzimática tipo xilanasa para los cuatro clones de *E. coli* BL21 Star (DE3) evaluados. Los valores presentados fueron obtenidos por la media de cuatro réplicas.

3.2. Fases de purificación enzimática

La lisis celular por sonicación liberó la proteína recombinante en el sobrenadante, pero la actividad enzimática se vio afectada por impurezas en la solución. La figura 7 muestra la variación de la actividad enzimática (7A) y actividad específica (7B) durante las etapas de purificación. El análisis muestra que la actividad enzimática se mantiene estable relativamente con valores de 6,644, 6,350 y 6,480 (ln U/mL) para la fracción soluble, purificado y ultrafiltrado, respectivamente. Por su contraparte, la actividad específica aumentó de 5,768 a 8,236 ln U/mg, relacionándose de esta forma con la exclusión de impurezas, reforzado con las mediciones de proteínas totales para cada fase: fracción soluble (2,406 mg/mL), eluido (0,710 mg/mL) y ultrafiltrado (0,284 mg/mL). Así mismo, en la tabla 5, se aprecia que la actividad específica aumenta significativamente, desde las 319,844 hasta 2478,064 U/mg para la fracción soluble y ultrafiltrado, respectivamente. También, el rendimiento se mantiene cercano al 38%, demostrando que el proceso concentra la enzima sin una pérdida excesiva de la actividad enzimática total. Los valores sin transformación logarítmica se aprecian en la tabla 5.

Figura 7

Actividad enzimática y proteínas totales en las fases de purificación



Nota: En (A) muestra los valores transformados en logaritmo natural de la actividad enzimática (ln U/mL) y actividad específica (ln U/mg). En (B) se aprecian los valores de proteínas totales en mg/mL. Las barras de error en ambas figuras se obtuvieron mediante la desviación estándar de 4 réplicas de medición.

Tabla 5*Fases de purificación de la enzima xilanasa recombinante*

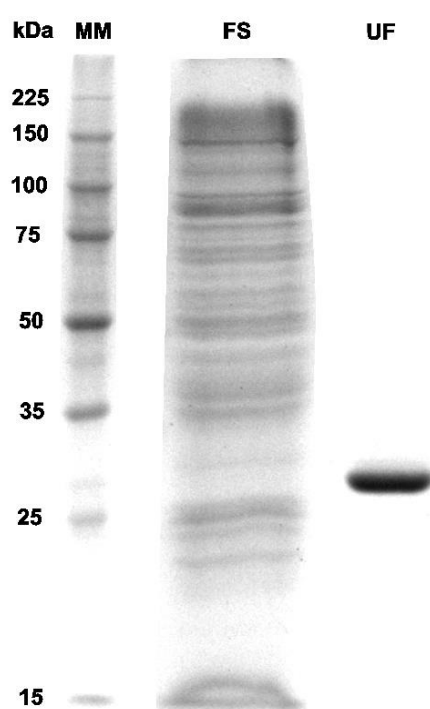
	Volumen (mL)	A. enzimática (U/mL)	Proteínas totales (mg/mL)	A. total (U)	Proteínas totales (mg)	A. específica (U/mg)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Fracción soluble	22	769,662	2,406	16932,535	52,924	319,844	1	100
Eluido	11	576,190	0,710	6338,095	7,809	811,640	2,538	37,431
Ultrafiltrado	10	652,650	0,284	6526,450	1,729	2478,064	7,748	38,544

Nota: Resumen de las etapas de purificación de la xilanasa recombinante. La actividad específica se expresa en unidades por miligramo de proteína (U/mg). El rendimiento (%) se calculó en relación con la actividad total de la fracción soluble. El factor de purificación representa la razón entre la actividad específica de cada etapa entre la fracción soluble. Todas las mediciones se realizaron por cuadruplicado.

Complementario al estudio de las fases de purificación, se realizó un SDS-PAGE al 12 % para visualizar los perfiles proteicos de las fases de purificación (Figura 8). El análisis mediante curva de calibración ($R^2 = 0,9532$) reveló que el peso molecular estimado de la xilanasa recombinante ultrafiltrada fue de 30,3 kDa.

Figura 8

Electroforesis en gel de poliacrilamida de las fases de purificación enzimática



Nota: Marcador de Peso Molecular (MM), fracción soluble (FS) y ultrafiltrado (UF).

3.3. Caracterización funcional de la xilanasa recombinante

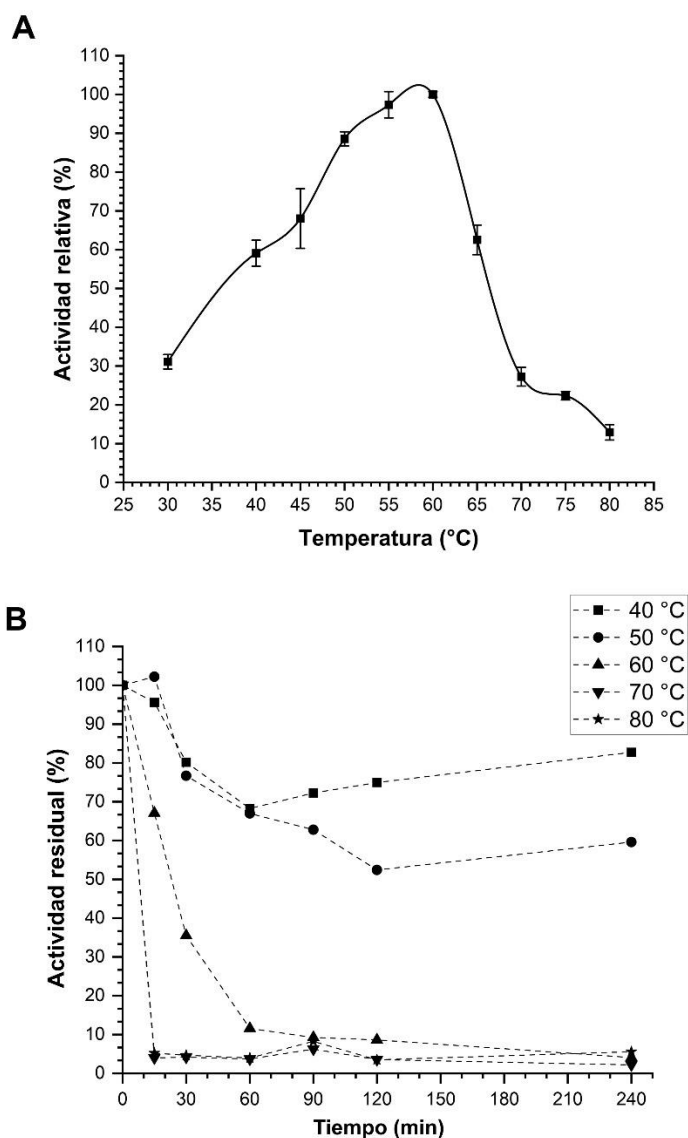
3.3.1. Temperatura óptima y estabilidad térmica

En la figura 9, se presenta el perfil de temperatura óptima (A) y estabilidad térmica (B) de la enzima xilanasa. En (A), la actividad enzimática aumenta de manera gradual desde 30 °C hasta los 60 °C, donde alcanza su actividad máxima (100 %). Un aumento a 65 °C demuestra que la actividad se reduce a 62,54 %, y a 80 °C conserva solo un 12,93 %. El ajuste no lineal mediante la función Gaussiana (2) determinó una temperatura óptima de $55,60 \pm 0,76$ °C, con un R^2 ajustado de 0,9562. En (B), la estabilidad térmica muestra que la enzima mantiene más del 72,25 % de su actividad residual tras 240 minutos a 40 °C. A 50 °C, la actividad disminuye gradualmente hasta alcanzar un 52,43 % después de 120 minutos. En contraste, a 60 °C, la actividad cae rápidamente dentro de los primeros 60 minutos hasta un 11,57 %. A temperaturas de 70 y 80 °C, la actividad se reduce drásticamente en los primeros 15 minutos.

$$y = 20,34552 + 91,87 e^{-2\left(\frac{x-55,60097}{15,63062}\right)^2} \quad (3)$$

Figura 9

Perfil de temperatura óptima y estabilidad térmica a distintas temperaturas



Nota: Perfil de temperatura óptima en buffer citrato fosfato pH 7 a 50 mM con barras de error que representan la desviación estándar (A). Perfil de termoestabilidad hasta los 240 minutos (B). Todos las mediciones se realizaron por cuadruplicado.

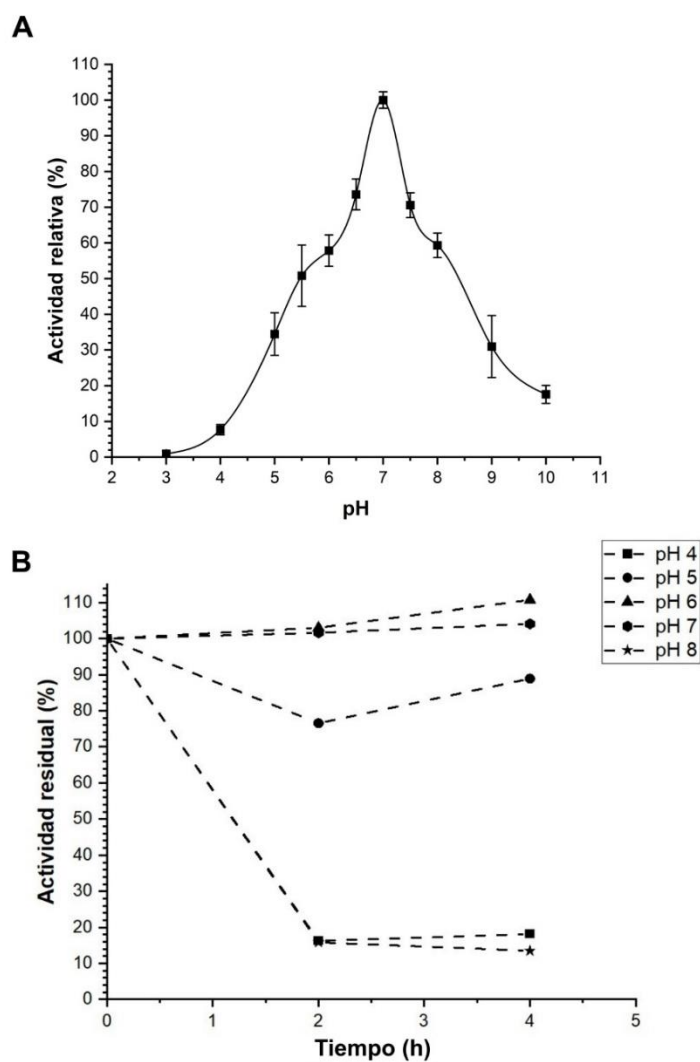
3.3.2. pH óptimo y estabilidad al pH

La figura 10A muestra que la actividad relativa aumenta gradualmente desde pH 3 hasta alcanzar una actividad máxima a pH 7 (100 %). A partir de este punto, se evidencia una caída significativa en pH 9 (28,68 %) y pH 10 (20,50 %). El ajuste no lineal mediante la función Gaussiana (3) arrojó un valor de pH óptimo a $6,99 \pm 0,16$ con un R^2 ajustado de 0,96055. En cuanto a la estabilidad al pH, la figura 10B muestra una actividad residual superior al 100 % tras 2 y 4 horas de preincubación para pH 6 (103,027 % y 110,739 %) y pH 7 (101,625 % y 104,111 %). A pH 5, la actividad residual fue moderada tras 4 horas de preincubación (88,91 %). Por otro lado, se redujo drásticamente la actividad residual a pH 4 y 8, con valores de 18,164 % y 13,480 % tras 4 horas, respectivamente.

$$y = 0,81223 + 69,96 e^{-2\left(\frac{x-6,98592}{2,63537}\right)^2} \quad (4)$$

Figura 10

Perfil de pH óptimo y estabilidad a distintos pHs



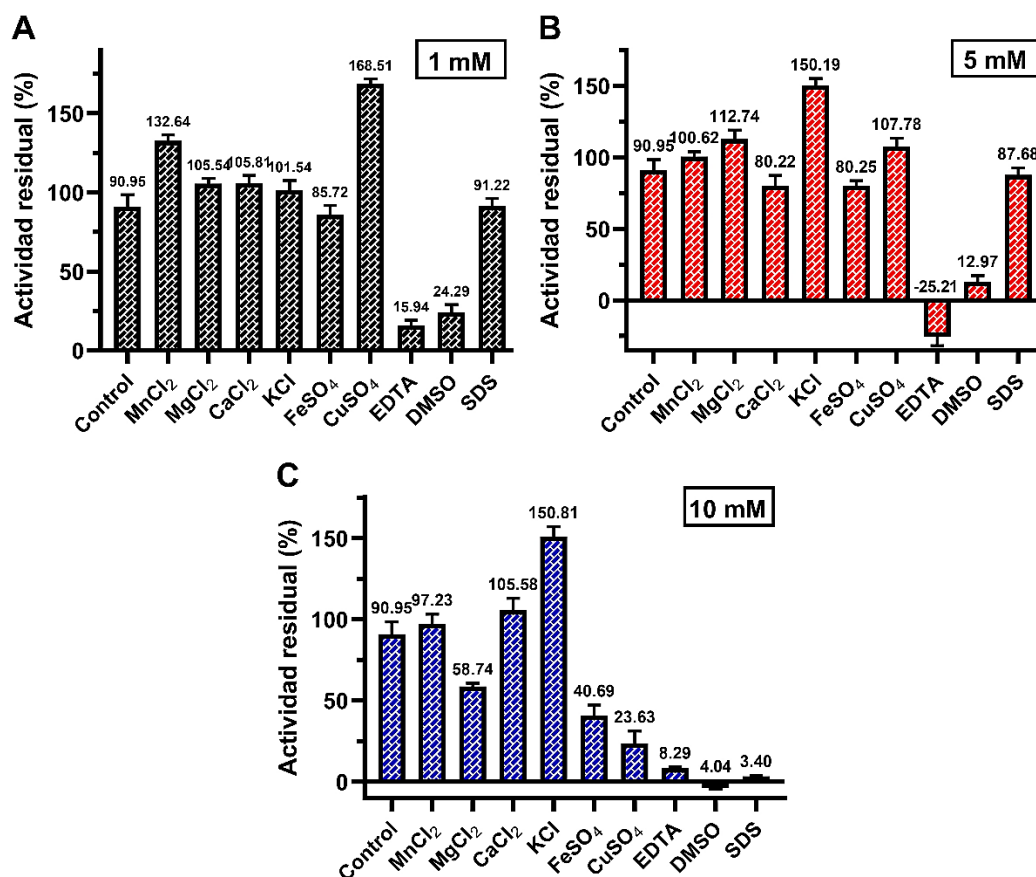
Nota: El perfil de pH óptimo y estabilidad al pH, se determinó en buffer Citrato-Fosfato desde pH 3 hasta pH 8 y glicina-NaOH de pH 9 a 10 a 50 mM a una temperatura de 60 °C. Todas las mediciones se realizaron por cuadruplicado.

3.3.3. Efecto de agentes químicos

Algunos iones metálicos y reactivos químicos afectan de manera significativa la actividad xilanasa, por ello, se evaluó el efecto de diferentes sales metálicas (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Fe^{2+} y Cu^{2+}), un solvente orgánico (DMSO), surfactante aniónico (SDS) y un agente quelante (EDTA), a concentraciones finales de 1 mM, 5 mM y 10 mM sobre la actividad de la xilanasa ultrafiltrada. En la figura 11 se muestra el efecto de diferentes concentraciones de agentes químicos a 1 mM (A), 5 mM (B) y 10 mM (C). Los resultados indican que ciertos iones metálicos actúan como activadores aparentes, destacando Mn^{2+} y Cu^{2+} a 1 mM con valores de $132,64 \pm 3,84 \%$ y Cu^{2+} $168,51 \pm 3,40 \%$, respectivamente. Por el contrario, su efecto activador disminuye a mayores concentraciones. Por otro lado, K^+ mantiene una activación sostenida hasta $150,81 \pm 6,23 \%$ a 10 mM. En todos los casos, EDTA, SDS y DMSO muestran un efecto inhibitorio en todas las concentraciones evaluadas. Los valores detallados se muestran en la tabla 6.

Figura 11

Efecto de diferentes concentraciones de agentes químicos sobre la actividad enzimática xilanasa



Nota: Las barras muestran la actividad relativa (%) tras la incubación con diversas sustancias a tres concentraciones: (A) 1 mM, (B) 5 mM y (C) 10 mM, respecto al control sin aditivos (100%). Se evaluaron sales metálicas (MnCl₂, MgCl₂, CaCl₂, KCl, FeSO₄, CuSO₄), un agente quelante (EDTA), un solvente orgánico (DMSO) y un detergente aniónico (SDS). Las barras de error representan la desviación estándar de 4 réplicas.

Tabla 6*Efecto de la concentración de agentes químicos en la actividad enzimática*

Ión	Químico	Actividad relativa		
		1 mM	5 mM	10 mM
Control	-	90,95 ± 8,31	90,95 ± 8,31	90,95 ± 8,31
Mn ²⁺	MnCl ₂	132,64 ± 3,84	100,62 ± 3,41	97,23 ± 6,03
Mg ²⁺	MgCl ₂	105,54 ± 3,30	112,74 ± 6,29	58,74 ± 2,01
Ca ²⁺	CaCl ₂	105,81 ± 6,03	80,22 ± 7,21	105,58 ± 7,31
K ⁺	KCl	101,54 ± 6,05	150,19 ± 4,99	150,81 ± 6,23
Fe ²⁺	FeSO ₄	85,72 ± 6,01	80,25 ± 3,47	40,69 ± 6,57
Cu ²⁺	CuSO ₄	168,51 ± 3,40	107,78 ± 5,74	23,63 ± 7,65
-	EDTA	15,93 ± 3,30	-25,21 ± 6,29	-41,03 ± 3,83
-	DMSO	24,29 ± 4,83	12,97 ± 4,40	45,65 ± 6,46
-	SDS	91,22 ± 4,90	87,68 ± 4,99	41,96 ± 9,28

Nota: EDTA: ácido etilendiaminotetraacético, DMSO: dimetilsulfóxido, SDS: dodecil sulfato de sodio. La actividad del control fue determinada como el 100 % sin la presencia de aditivos. La actividad residual para todos los agentes químicos se expresó como porcentaje respecto al control. Todos los experimentos se realizaron por cuadruplicado y se expresaron como el promedio para cada agente químico y desviación estándar.

IV. DISCUSIÓN

Transformación y detección de actividad xilanasa

La selección del clon recombinante con mayor actividad enzimática es un punto crítico en estudios de expresión recombinante, ya que nos permite detectar la variante con mayor potencial catalítico para su posterior caracterización funcional.

En el presente trabajo, todos los clones transformados de *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) mostraron actividad xilanasa. Sin embargo, el clon 1 presentó la mayor actividad enzimática (1169 U/mL), lo que justificó su selección como clon candidato para continuar con los ensayos de caracterización.

Esta estrategia es consistente con lo reportado por Kiribayeva et al. (2022), quienes seleccionaron al clon número 3 de *Pichia pastoris* X-33 por presentar la mayor actividad xilanasa (U/mg) entre varios clones transformados con el vector pPICZ α /XynT6. Del mismo modo, Amore et al. (2014) evaluaron 93 microorganismos para detectar actividad xilanasa y celulasa, seleccionando un único aislado, *Bacillus* sp. XR44A, como el mayor productor de xilanasa (10,5 U/mL).

Una estrategia similar fue empleada por Xu et al. (2015), quienes evaluaron la expresión de una xilanasa recombinante usando los sistemas de expresión pET y pCold. Tras transformar *E. coli* BL21 (DE3) con 210 variantes que contenían el plásmido pET-baxA, no detectaron actividad xilanasa, pero si la expresión visualizada por SDS-PAGE y Western blot. Por el contrario, uno de los clones

transformados con el plásmido pCold con el gen denominado reBaxA2, mostró una actividad xilanasa mayor, por lo que fue seleccionado para escalamiento, purificación y caracterización, lo que refuerza la importancia de seleccionar no solo en función de la presencia del gen recombinante, sino también considerando la actividad enzimática. Estas variaciones en la actividad enzimática tras la transformación en una misma línea celular de *Escherichia coli* se puede deber principalmente a la variabilidad en el número de plásmidos incorporados, diferencias en la eficiencia de expresión o estado fisiológico individual de cada célula (Lüthi et al., 1990; Lozano et al., 2021; Alikelayeh et al., 2022).

Producción y purificación

La endo- β -1,4-xilanasa recombinante de *Paenibacillus barengoltzii* expresada en *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) presentó una actividad específica de 319,84 U/mg en la fracción soluble. Tras la purificación mediante cromatografía de afinidad con resina de Ni-NTA, se logró obtener 811,64 U/mg y calcular un factor de purificación de 2,538. Posteriormente, el concentrado por ultrafiltración alcanzó una actividad específica de 2478,064 U/mg, con un factor de purificación de 7,748 y un rendimiento global del 38,54 %. Al realizar la comparación con estudios realizados, se observa que Kiribayeva et al. (2022) reportaron una actividad específica de 110 U/mg en la fracción soluble, incrementándose hasta 939,1 U/mg tras la purificación, con un factor de 8,5 y un rendimiento del 27,8 %.

Si bien el factor de purificación es superior, la actividad específica obtenida en nuestro estudio fue aproximadamente cuatro veces. Por otro lado, Liu et al. (2021) reportaron una actividad específica de 292,5 U/mg en la enzima purificada, con un factor de purificación de 2,7 y rendimiento del 49,6 %. En este caso, aunque se alcanzó un mayor rendimiento, los valores de pureza enzimática fueron significativamente inferiores, siendo la actividad específica obtenida en el presente trabajo más de doce veces superior. Además, la enzima de Liu presentaba un peso molecular de 114 kDa, notablemente mayor al valor estimado de 30,33 kDa en nuestro estudio, lo que podría explicarse por diferencias en la naturaleza del gen clonado o la presencia de regiones adicionales.

Zheng et al. (2012) lograron una actividad específica de 2856,5 U/mg en su xilanasas recombinante, con un factor de purificación de 1,5 y un peso molecular de 41 kDa. Aunque estos valores son destacables, la actividad específica final reportada en nuestro estudio fue mayor, además de lograrse un mayor grado de purificación, lo que resalta la eficiencia de la estrategia basada en Ni-NTA y ultrafiltración.

En estudios que utilizaron protocolos más complejos, como el de Akpinar y Karaoglu (2024), se obtuvieron actividades específicas significativamente menores (133,04 U/mg en la etapa final de purificación), pese al uso de cromatografía de intercambio iónico, interacción hidrofóbica y diálisis. En contraste, los valores

obtenidos en este trabajo fueron superiores en todas las etapas del proceso, resaltando la simplicidad y efectividad del método aplicado.

Finalmente, Bhardwaj et al. (2019) emplearon una estrategia combinada de Ni-NTA e intercambio aniónico, alcanzando una actividad específica final de 1037,3 U/mg, con un factor de purificación de 1,8 y rendimiento global de 71,4 %. Si bien su rendimiento fue mayor, el enriquecimiento fue notablemente inferior al obtenido en el presente estudio. Además, la actividad específica obtenida tras ultrafiltración en nuestra investigación fue más de tres veces mayor.

Estudios han reportado que la presencia de contaminantes residuales, como proteínas de choque térmico, pueden co-purificarse reduciendo la pureza e interfiriendo en la actividad específica medida (Maity et al., 2013). Por otro lado, el peso molecular de nuestra xilanasas (30,33 kDa) es inferior al reportado en la mayoría de los estudios comparados previamente. Esta diferencia puede deberse al origen genético del gen clonado, a la ausencia de dominios accesorios, o a una menor longitud de la proteína madura, lo cual también podría estar relacionado con una mayor eficiencia catalítica específica, al evitar dominios regulatorios o estructurales no esenciales para la actividad hidrolítica (Bastawade, 1992).

Caracterización funcional

Temperatura óptima y estabilidad térmica

La temperatura es uno de los principales factores que afecta la actividad enzimática, ya que influye en la velocidad de catálisis y en la estabilidad estructural de la enzima.

La xilanasa de *P. barengoltzii* expresada en *E. coli* BL21 Star (DE3) mostró una actividad máxima a 60 °C, y óptima de $55,60 \pm 0,76$ °C, según el ajuste gaussiano. Estos resultados coinciden con los valores reportados para la xilanasa XynNTU y sus variantes truncadas (CDLS y CD), provenientes de *Paenibacillus campinensis* NTU-11 (Wang et al., 2022), XylX de *Paenibacillus campinasensis* BL11 (Ko et al., 2010) y X3 de *Bacillus* sp. Asc6BA (Contreras et al., 2021). En comparación, nuestra enzima presenta una temperatura óptima más baja que las xilanasas altamente termoactivas, como Xyn11A de *Caldicellulosiruptor kronoskyensis* (75 °C) (Qiao et al., 2014), XYN35 de *Caldicellulosiruptor algeriensis* (70 °C) (Amel et al., 2016) y XynST11 de *Streptomyces* sp. B6 (70 °C) (Mingyuan et al., 2020), cuyos óptimos superan ampliamente los 60 °C.

Respecto a la estabilidad térmica, la xilanasa estudiada mostró una buena retención de actividad residual a 40 °C durante 240 minutos (más del 72 %) y una estabilidad considerable a 50 °C durante 120 minutos (52,43 % de actividad residual). Sin embargo, su estabilidad disminuyó significativamente a 60 °C (11,57 % tras 60 minutos), lo que indica una menor tolerancia térmica. En un

estudio realizado por Kim et al. (2016), se reportó que la enzima XynA mantuvo una actividad residual mayor al 80 % tras la incubación a 40, 50 y 60 °C. No obstante, a temperaturas más elevadas, su actividad disminuyó bruscamente, similar a lo observado en nuestro estudio, alcanzando solo el 20 % durante los primeros 10 minutos a 80 °C y tras 60 minutos a 70 °C. Por otro lado, Wang et al. (2022) reportaron una resistencia térmica considerablemente mayor en la xilanasas XynNTU-CDLS, que retuvo el 91,4 % de su actividad entre 50 y 60 °C, y más del 50 % luego de 6 horas a 70 °C y de 1 hora a 80 °C. Asimismo, las variantes XynNTU y XynNTU-CD conservaron el 58,4 % y 26,7 % de su actividad tras 48 horas de incubación a 60 °C, respectivamente.

Estos resultados reflejan que, con el aumento de la temperatura, la actividad enzimática se ve modulada positivamente debido al incremento de la energía cinética en la interacción enzima-sustrato. Por otro lado, valores por encima del óptimo reducen rápidamente la actividad, lo que sugiere una pérdida de la estructura secundaria y terciaria, seguida de una posible agregación proteica (Koh et al., 2014).

pH y estabilidad al pH

Estrechamente relacionado a la temperatura, el pH es un factor crucial que regula la actividad catalítica de las enzimas, ya que influye en el estado de ionización de los residuos activos y en la conformación tridimensional de la proteína.

La enzima mostró máxima actividad a pH 7 y un pH óptimo de 6,99 según el ajuste Gaussiano, en concordancia con lo reportado para rXynT6-E de *Bacillus sonorensis* T6 (Kiribayeva et al., 2022), Xyn10A de *Bacillus* sp. SN5 (Bai et al., 2012) y Xylanase X-II de *Bacillus licheniformis* 77-2 (Damiano et al., 2006). Sin embargo, se observó una marcada reducción de actividad en condiciones alcalinas, con solo un 28,68 % a pH 9 y 20,50 % a pH 10. Este comportamiento contrasta con las variantes XynNTU-CDLS y XynNTU-CD, que mantuvieron alta actividad relativa entre pH 7,0 y 10,0; atribuida a la influencia del dominio CBM6 (Wang et al., 2022). Diversos estudios han reportado una amplia variabilidad en el pH óptimo de xilanasas bacterianas, como una actividad máxima a pH 9,0 en una xilanasas metagenómica del rumen de camello (Ariaeenejad et al., 2019), actividad sostenida entre pH 6,0–9,0 en *Paenibacillus campinasensis* G1–1 (Zheng et al., 2012), y retención superior al 70 % entre pH 5,0–9,0 en *Alicyclobacillus kamchatkensis* (Punam et al., 2018). En contraste, otras enzimas mostraron una actividad óptima a pH 6, con retención cercana al 70 % a pH 7 (Daas et al., 2017).

Respecto a su estabilidad frente al pH, la enzima retuvo el 100 % de su actividad tras 4 horas de incubación a pH 6 y 7 a 25 °C. Sin embargo, su actividad disminuyó significativamente a pH 4 y 8, con una retención menor al 20 % después de 4 horas. Estudios previos reportan una mayor tolerancia. Por ejemplo, Xu et al. (2015) describieron que reBaxA2 conservó más del 60 % de actividad tras 1 hora de incubación entre pH 4 y 8. De manera similar, Ulucay et al. (2022) reportaron

que la actividad residual no disminuyó por debajo del 60 % a pH 5,5 y 8, tras 3 días de incubación a 30 °C. Por su parte, Wang et al. (2022) mostraron que XynNTU y sus variantes truncadas conservaron más del 60 % de actividad enzimática entre pH 5 y 9 durante 3 horas a temperatura ambiente.

Con base en estos análisis, se evidencia que niveles de pH alejados del óptimo afectan negativamente la actividad y estabilidad enzimática, probablemente debido a la inducción de repulsiones electrostáticas entre cargas similares en la superficie de la enzima, lo cual compromete sus propiedades funcionales y favorece una desnaturalización parcial (Cooper, 2013).

Efecto de agentes químicos

Los resultados obtenidos con agentes químicos reafirman que la xilanasa presenta una sensibilidad altamente específica a cationes metálicos e inhibidores, destacando su fuerte activación por K^+ y Mn^{2+} , pero también su sensibilidad ante compuestos desestabilizantes como EDTA, SDS y Cu^{2+} a concentraciones elevadas.

Entre los cationes probados, el Cu^{2+} a 1 mM mostró la mayor activación enzimática ($168,51 \pm 3,40$ %), aunque su efecto disminuyó con el aumento de la concentración a 10 mM ($23,63 \pm 7,65$ %). Este patrón sugiere que, a bajas concentraciones, iones divalentes como el Cu^{2+} y Mn^{2+} , podrían estabilizar la conformación catalítica al neutralizar cargas superficiales y formación de puentes salinos con residuos ácidos (Kumar et al., 2000), sin embargo, a concentraciones

elevadas, su pequeño radio iónico y alta carga podrían provocar interacciones excesivas con aminoácidos clave (Asp/Glu) del proceso catalítico (Hernández et al., 2015). Este efecto bifásico también fue observado por Lee et al. (2008), quienes reportaron una activación a 5 mM (120 %), pero una fuerte inhibición a 10 mM (28 %), y por Akpınar & Karaoglu (2024), con una activación del 118 % a 1 mM, reducida al 87,6 % a 10 mM. De forma similar, Kiribayeva et al. observaron solo un 57 % de actividad residual a 5 mM, mientras que Qiao et al. (2014) informaron una inhibición más leve, con una recuperación parcial del 95,1 % a la misma concentración.

Un comportamiento similar se observó con Mn^{2+} , que activó la enzima en un $132,64 \pm 3,84$ % a 1 mM, pero descendió progresivamente hasta $97,23 \pm 6,03$ % a 10 mM. Esto contrasta con Qiao et al. (2014), quienes reportaron una fuerte inhibición (35 % a 1 mM y solo 2,7 % a 5 mM), mientras que Ko et al. (2010) y Kiribayeva et al. (2022) también observaron inhibición (65,4 % y 82 % de actividad residual, respectivamente, a 5 mM). En cambio, Lee et al. (2008) y Li et al. (2022) evidenciaron una activación moderada y sostenida (hasta 110 % en el caso de Li et al. (2022)).

Por otro lado, el ion potasio (K^+) mostró un efecto activador sostenido y creciente, alcanzando hasta $150,81 \pm 6,23$ % a 10 mM, siendo el único en mantener una activación positiva a todas las concentraciones. Esto sugiere que, debido a su carga monovalente y tamaño iónico relativamente grande de 1,33 Å, puede reducir

la repulsión entre grupos cargados negativamente en el sitio activo de la enzima (Evans, 1963). Esta característica contrasta con Qiao et al. (2014), quienes reportaron una inhibición leve (89–94 %), y Li et al. (2022), quienes observaron un descenso progresivo (de 102,9 % a 80,5 %), aunque en ningún caso se presentó inhibición severa, similar a lo reportado por Ko et al. (2010), que conservaron una buena actividad residual tras el tratamiento (98 % a 5 mM).

El Ca^{2+} presentó un efecto bifásico, con una ligera reducción a 5 mM ($80,22 \pm 7,21$ %), pero una recuperación a 10 mM ($105,58 \pm 7,31$ %). Esto es similar a lo reportado por Ko et al. (2010) y Kiribayeva et al. (2022), quienes observaron una conservación del 88 % y 92 % de actividad residual a 5 mM, respectivamente. Por otro lado, Lee et al. (2008) mostraron una activación moderada (116 % a 5 mM), mientras que Qiao et al. (2014) y Li et al. (2022) observaron una leve inhibición (alrededor del 92 %).

El Mg^{2+} estimuló la actividad a bajas concentraciones ($112,74 \pm 6,29$ % a 5 mM), pero la redujo marcadamente a 10 mM ($58,74 \pm 2,01$ %). En contraste, Ko et al. (2010) y Kiribayeva et al. (2022) observaron inhibición (hasta 92 % de reducción a 5 mM), mientras que Lee et al. (2008) reportaron una activación significativa (127 % a 10 mM). Qiao et al. (2014) evidenciaron un efecto inhibitorio progresivo (de 91,5 % a 75,2 %), similar a lo reportado por Li et al. (2022), con valores de 101,2 % a 1 mM y 86,2 % a 5 mM. Este comportamiento inhibitorio sugiere que podría

estar induciendo rigidez estructural que limita los movimientos conformacionales necesarios para la catálisis (Hou et al., 2023).

El Fe^{2+} mostró inhibición en todas las concentraciones, hasta un $40,69 \pm 6,57$ a 10 mM. Esto coincide con Ko et al. (2010), quienes observaron una inhibición moderada (45 %), y con Li et al., quienes reportaron una disminución progresiva hasta 43,9 %. Sin embargo, Lee et al. (2008) encontraron una ligera activación (107 %), lo que indica una respuesta variable entre enzimas de distintos orígenes. Este efecto, sumado a su gran radio iónico 0,78, puede deberse a la generación de especies reactivas de oxígeno que oxidan residuos de aminoácidos críticos en la catálisis enzimática (Wei et al., 2018).

Entre los inhibidores evaluados, el EDTA generó una marcada pérdida de actividad enzimática, alcanzando inhibiciones casi totales. En este trabajo se registraron valores de inhibición total a 5 y 10 mM, mientras que Li et al. (2022) reportaron un 24 % de actividad residual a 5 mM y Ko et al. una reducción al 50 %. Qiao et al. (2014) observaron una inhibición leve (~86 %). Curiosamente, Kiribayeva describió un aumento de actividad (116,4 %). El SDS también mostró un efecto inhibitorio variable: en este estudio, la inhibición fue significativa a 10 mM (42,56 %), mientras que los estudios de Kiribayeva et al. (28,4 %), Li et al. (~24 %) y Qiao et al. (hasta 2,7 %) reportaron efectos más severos incluso a concentraciones menores.

En base a ello, estas propiedades térmicas y de pH sugieren de cierta manera su aplicación en industrias alimentarias, panaderas o de piensos animales, donde la presencia de iones es común (K^+ , Mn^{2+} y Mg^{2+}) y el ambiente pueda mantenerse estable. Por ejemplo, en el ámbito de la panadería, podría actuar en la catálisis de compuestos como arabinosilanos naturales de la harina, reduciendo su viscosidad y por ende, mayor expansión del gas durante el proceso fermentativo.

V. CONCLUSIONES

- Se logró transformar *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) con el plásmido que contuvo el gen de la xilanasa de *Paenibacillus barengoltzii*, detectándose clones recombinantes con actividad xilanasa, de los cuales, el Clon 01 alcanzó una actividad enzimática de 1129 U/mL.
- La producción de la xilanasa recombinante en *E. coli* reveló una actividad específica de 319,84 U/mg en la fracción soluble. La estrategia de purificación empleada, basada en cromatografía de afinidad (IMAC) seguida de ultrafiltración, fue eficiente, elevando la actividad específica a 2478,064 U/mg y logrando un factor de purificación de 7,748.
- La xilanasa recombinante alcanzó su mayor actividad a pH 7 y 60 °C. Mostró buena estabilidad en condiciones neutras y temperaturas moderadas, manteniendo su actividad en un rango funcional amplio. Asimismo, se observó que la enzima fue activada por algunos iones metálicos (Cu^{2+} , K^+ , Mn^{2+}) e inhibida fuertemente por EDTA, DMSO y SDS, lo que evidencia su resistencia y susceptibilidad diferencial a agentes químicos.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda a los interesados en optimización, evaluar medio de cultivo en base a requisitos específicos del sistema de expresión para mejorar la producción de la xilanasa.
- A los interesados en purificación de proteínas recombinantes, se sugiere realizar una optimización del proceso de purificación mediante un gradiente de elución con imidazol en la cromatografía IMAC, así como una cromatografía por filtración en gel o de intercambio iónico.
- Se recomienda investigar y optimizar el potencial catalítico de la xilanasa frente a residuos vegetales, mediante la obtención de productos hidrolizados que puedan emplearse como la producción de biogás o bioetanol.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdella, A., Ramadan, S., Hamouda, R. A., Saddiq, A. A., Alhazmi, N. M., & Al-Saman, M. A. (2021). *Paecilomyces variotii* xylanase production, purification and characterization with antioxidant xylo-oligosaccharides production. *Scientific Reports*, *11*(1), 16468. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95965-w>
- Agbor, V. B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., & Levin, D. B. (2011). Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*, *29*(6), 675–685. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.005>
- Akpinar, Z., & Karaoglu, H. (2024). Characterization of a highly thermostable recombinant xylanase from *Anoxybacillus ayderensis*. *Protein Expression and Purification*, *219*, 106478. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2024.106478>
- Allet, B., Pyaton, M., Mattaliano, R., Gronenborn, A., Clore, G. & Wingfield, P. (1988). Purification and characterization of the DNA-binding protein Ner of bacteriophage Mu. *Gene*. *65*(2). 259 – 268. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90462-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90462-3)
- Aspelund, M. T., & Glatz, C. E. (2010). Purification of recombinant plant-made proteins from corn extracts by ultrafiltration. *Journal of Membrane Science*, *353*(1–2), 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2010.02.036>

- Basit, A., Liu, J., Rahim, K., Jiang, W. & Lou, H. (2017). Thermophilic xylanases: from bench to bottle. *Critical Reviews in Biotechnology*. 38(7). 989-1002. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1425662>
- Beg, Q., Kapoor, M., Mahajan, L. & Hoondal, G. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 56. 326-338. <https://doi.org/10.1007/s002530100704>
- Bhalla, A., Bansal, N., Kumar, S., Bischoff, K. & Sani, R. (2013). Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. *Bioresource Technology*. 128. 751-759. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.145>
- Bhalla, A., Bischoff, K. & Kumar, R. (2015). Highly thermostable xylanase production from a thermophilic *Geobacillus* sp. strain WSUCF1 utilizing lignocellulosic biomass. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 3. 1-8.
- Bhardwaj, N., Kumar, B. & Verma, P. (2019). A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. *Bioresources and Bioprocessing*. 6(40). <https://doi.org/10.1186/s40643-019-0276-2>
- Bibi, E. & Béja, O. (1994). Membrane topology of multidrug resistance protein expressed in *Escherichia coli*. N-terminal domain. *Journal of Biological Chemistry*. 269(11). 19910 – 19915. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)32106-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)32106-3)

- Boucherba, N., Gagaoua, M., Bouanane-Darenfed, A., Benayad, T., & El-Hadj-Khelil, A. (2017). Biochemical properties of a new thermo- and solvent-stable xylanase recovered using three phase partitioning from the extract of *Bacillus oceanisediminis* strain SJ3. *Bioresources and Bioprocessing*, 4(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0161-9>
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 7(2). [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Burgess, R. & Jendrisak, J. (1975). Procedure for the rapid, large-scale purification of *Escherichia coli* DNA-dependent RNA polymerase involving polymin P precipitation and DNA-cellulose chromatography. *Biochemistry*. 14(21). 285 – 290. <https://doi.org/10.1021/bi00692a011>
- Burgess, R. R., & Knuth, M. W. (1996). Purification of a recombinant protein overproduced in *E. coli*. En D. Marshak, J. Kadonaga, R. Burgess, M. Knuth, W. Brennan Jr., & S.-H. Lin (Eds.), *Strategies for protein purification and characterization: A laboratory manual* (pp. 219–274). Cold Spring Harbor Press. <https://www.cshlpress.com/default.tpl?action=full&--eqskudatarq=127>
- Carvalho, E., dos Santos, L., Uetanabaro, A., Paranhos, E., Brito, L., Priminho, C. & da Costa, A. (2017). Thermoresistant xylanases from *Trichoderma*

stromaticum: Application in bread making and manufacturing xylo-oligosaccharides. *Food Chemistry*. 221. 1499-1506. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.144>

Chandel, A. K., Garlapati, V. K., Singh, A. K., Antunes, F. A. F., & da Silva, S. S. (2018). The path forward for lignocellulose biorefineries: Bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization. *Bioresource Technology*, 264, 370–381. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.004>

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>

Coughlan, M. & Hazlewood, G. (1993). Beta-1,4-D-xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 17(3). 259 – 289. <https://doi.org/10.1111/j.1470-8744.1993.tb00244.x>

Cripps, R., Eley, K., Leak, D., Rudd, B., Taylor, M., Todd, M., Boakes, S., Martin, S. & Atkinson, T. (2009). Metabolic engineering of *Geobacillus thermoglucosidasius* for high yield ethanol production. *Metabolic engineering*. 11(6). 398-408. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2009.08.005>

Curry, T., Peña, M. & Urbanowicz, B. (2023). An update on xylan structure, biosynthesis, and potential commercial applications. *The Cell Surface*. 9. 1 – 4. <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2023.100101>

- Dagert, M. & Ehrlich, S. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene*. 6(1). 23 – 28. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(79\)90082-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(79)90082-9)
- Davies, G. & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*. 3(9). 853 – 859. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00220-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00220-9)
- De Bernández, E., Schwarz, E. & Rudolph, R. (1999). Inhibition of aggregation side reactions during in vitro protein folding. *Methods in Enzymology*. 309. 217 – 236. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)09017-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)09017-5)
- de Sales, A., de Souza, A., Oliveira, R., Ferreira-Leitão, V., Schwan, R. & Ribeiro, D. (2017). Use of lignocellulose biomass for endoxylanase production by *Streptomyces termitum*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. 47(5). 1-17. <https://doi.org/10.1080/10826068.2016.1275015>
- Deniaud, E., Quemener, B., Fleurence, J. & Lahaye, M. (2003). Structural studies of the mix-linked β -(1→3)/ β -(1→4)-d-xylans from the cell wall of *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *International Journal of Biological Macromolecules*. 33(1-3). 9 – 18. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(03\)00058-8](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(03)00058-8)
- Deshmukh, R. A., Jagtap, S., Mandal, M. K., Das, K., & Ghosh, S. (2016). Purification, biochemical characterization and structural modelling of

alkali-stable β -1,4-xylan xylanohydrolase from *Aspergillus fumigatus* R1 isolated from soil. *BMC Biotechnology*, 16, 11. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0242-4>

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. 20895. 1-18. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-48202-5>

El Enshasy, H., Kandiyil, S., Malek, R. & Othman, N. (2016). Microbial Xylanases: Sources, Types, and Their Applications. En Gupta, V. (Ed.) *Microbial Enzymes in Bioconversions of Biomass. Biofuel and Biorefinery Technologies*. 3. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43679-1_7

Elodie, D., Garron, M., Dogan, S., Lombard, V., Henrissat, B. & Terrapon, N. (2022). The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. *Nucleic Acids Reseach*. 50(1). 571 – 577. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1045>

Fersht, A. (1998). *Structure and mechanism in protein science. A guide to enzyme catalysis and protein folding*. (1ra ed.). Freeman and Company, New York. https://onesearch.nihlibrary.ors.nih.gov/discovery/fulldisplay?vid=01NIH_INST%3AANH&docid=alma991000229239704686&context=L

- Gao, Y., Xu, J., Zhang, Y., Yu, Q., Yuan, Z., & Liu, Y. (2013). Effects of different pretreatment methods on chemical composition of sugarcane bagasse and enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, *144*, 396–400. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.036>
- Grabber, J., Ralph, J. & Hatfield, R. (2000). Cross-Linking of Maize Walls by Ferulate Dimerization and Incorporation into Lignin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. *48*(12). 6106 – 6113. <https://doi.org/10.1021/jf0006978>
- Guo, F., Shi, W., Sun, W., Li, X., Wang, F., Zhao, J., et al. (2014). Differences in the adsorption of enzymes onto lignins from diverse types of lignocellulosic biomass and the underlying mechanism. *Biotechnology for Biofuels*, *7*, 38. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-38>
- Hernández-Beltrán, J. U., Hernández-De Lira, I. O., Cruz-Santos, M. M., Saucedo-Luevanos, A., Hernández-Terán, F., & Balagurusamy, N. (2019). *Insight into pretreatment methods of lignocellulosic biomass to increase biogas yield: Current state, challenges, and opportunities*. *Applied Sciences*, *9*(18), 3721. <https://doi.org/10.3390/app9183721>
- Huang, J., Li, Y., Wang, Y., Chen, Y., Liu, M., Wang, Y., et al. (2017). A precise and consistent assay for major wall polymer features that distinctively determine biomass saccharification in transgenic rice by near-infrared spectroscopy.

Biotechnology for Biofuels, 10, 294. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0983-x>

Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96(1), 23–28. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90336-P](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90336-P)

Jacobs, A., Larsson, P. & Dahlman, O. (2001). Distribution of Uronic Acids in Xylans from Various Species of Soft- and Hardwood As Determined by MALDI Mass Spectrometry. *Biomacromolecules*. 2(3). 979 – 990. <https://doi.org/10.1021/bm010062x>

Janson, J. (2011). *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications*. Wiley. <https://www.wiley.com/enes/Protein+Purification%3A+Principles%2C+High+Resolution+Methods%2C+and+Applications%2C+3rd+Edition-p-9780471746614>

Jhamb, K. & Sahoo, D. (2012). Production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*: Effects of process conditions and chaperone co-expression on cell growth and production of xylanase. *Bioresource Technology*. 123. 135 – 143. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.011>

Jun, R., Sandeep, K., Hyang-Min, L., Seung, M. & Dokyun, N. (2019). Artificial transformation methodologies for improving the efficiency of plasmid DNA

transformation and simplifying its use. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 103. 9205 – 9215. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10173-x>

Juturu, V. & Chuan, J. (2012). Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. *Biotechnology Advances*. 30(6). 1219- 1227. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.11.006>

Kang, X., Dickwella, M., Mentink-Vigier, F., Cosgrove, D. & Wang, T. (2019). Lignin-polysaccharide interactions in plant secondary cell walls revealed by solid-state NMR. *Nature Communications*. 10(347). 1 – 9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08252-0>

Ketuda, J. & Esen, A. (2010). β -Glucosidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 67. 3389 – 3405. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0399-2>

Khasin, A. & Alchanati, I. & Shoham, Y. (1993). Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(6). 1725 – 1730. <https://doi.org/10.1128/aem.59.6.1725-1730.1993>

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), e0265647. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265647>

- Knob, A., Terrasan, C. & Carmona, E. (2009). β -Xylosidases from filamentous fungi: an overview. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 26. 389 – 407. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0190-4>
- Ko, C.-H., Tsai, C.-H., Tu, J., Lee, H.-Y., Ku, L.-T., Kuo, P.-A., & Lai, Y.-K. (2010). Molecular cloning and characterization of a novel thermostable xylanase from *Paenibacillus campinasensis* BL11. *Process Biochemistry*, 45(10), 1638–1644. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.06.015>
- Kruyeniski, J., Ferreira, P. J., Carvalho, M. G. V. S., Vallejos, M. E., Felissia, F. E., Area, M. C., & et al. (2019). Physical and chemical characteristics of pretreated slash pine sawdust influence its enzymatic hydrolysis. *Industrial Crops and Products*, 130, 528–536. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.075>
- Kulkarni, N., Shendye, A. & Rao, M. (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*. 23(4). 411 – 456. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(99\)00006-6](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(99)00006-6)
- Kumar, R., & Wyman, C. E. (2009a). Effect of enzyme supplementation at moderate cellulase loadings on initial glucose and xylose release from corn stover solids pretreated by leading technologies. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(2), 457–467. <https://doi.org/10.1002/bit.22068>

- Le Maire, M., Champeil, P. & Moller, J. (2000). Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 1508 (1-2). 86 – 111. [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(00\)00010-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(00)00010-1)
- Lee, C. C., Kibblewhite-Accinelli, R. E., Smith, M. R., Wagschal, K., Orts, W. J., & Wong, D. W. (2008). Cloning of *Bacillus licheniformis* xylanase gene and characterization of recombinant enzyme. *Current Microbiology*, 57(4), 301–305. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9193-x>
- Li, Y., Zhang, X., Lu, C., Lu, P., Yin, C., Ye, Z., & Huang, Z. (2022). Identification and characterization of a novel endo- β -1,4-xylanase from *Streptomyces* sp. T7 and its application in xylo-oligosaccharide production. *Molecules*, 27(8), 2516. <https://doi.org/10.3390/molecules27082516>
- Liu, M. & Liu, G. (2008). Expression of recombinant *Bacillus licheniformis* xylanase A in *Pichia pastoris* and xylooligosaccharides released from xylans by it. *Protein Expression & Purification*. 57(2). 101 – 107. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2007.10.020>
- Liu, M., Li, J., Rehman, A., Xu, X., Gu, Z. & Wu, R. (2019). Laboratory Evolution of GH11 Endoxylanase Through DNA Shuffling: Effects of Distal Residue Substitution on Catalytic Activity and Active Site Architecture. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 7(350). 1 – 14. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00350>

- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic acids research*, 42(Database issue), D490–D495. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>
- Marcolongo, L., La Cara, F., Morana, A., Di Salle, A., del Monaco, G., Paixão, S., Alves, L. & Ionata, E. (2015). Properties of an alkali-thermo stable xylanase from *Geobacillus thermodenitrificans* A333 and applicability in xylooligosaccharides generation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 31. 633-648. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1818-1>
- Maurya, D., Singla, A. & Negi, S. (2015). An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. 3 *Biotech*. 5. 597-609. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0279-4>
- Mazumder, K., Peña, M., O'Neill, M. & York, W. (2012). Structural Characterization of the Heteroxylans from Poplar and Switchgrass. En Himmel, M. (Eds). Biomass Conversion. *Methods in Molecular Biology* (pp. 215 – 228). Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-956-3_19
- Méndez-Líter, J. A., de Eugenio, L. I., Nieto-Domínguez, M., Prieto, A., & Martínez, M. J. (2021). Hemicellulases from *Penicillium* and *Talaromyces*

- for lignocellulosic biomass valorization: A review. *Bioresource Technology*, 324, 124623. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124623>
- Meng, X., Pu, Y., Yoo, C. G., Li, M., Bali, G., Park, D. Y., Gjersing, E., Davis, M. F., Muchero, W., Tuskan, G. A., Tschaplinski, T. J., & Ragauskas, A. J. (2017). An in-depth understanding of biomass recalcitrance using natural poplar variants as the feedstock. *ChemSusChem*, 10(1), 139–150. <https://doi.org/10.1002/cssc.201601303>
- Michaelis, L. & Menten, M. (1913). Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift*. 49. 333–369. https://www.chem.uwec.edu/Chem352_Resources/pages/readings/media/Michaelis_&_Menton_1913.pdf
- Miller, G. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. 31(3). <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac60147a030>
- Missiakas, D. & Raina, S. (1997). Protein folding in the bacterial periplasm. *Journal of Bacteriology*. 179(8). 2465 – 2471. <https://doi.org/10.1128/jb.179.8.2465-2471.1997>
- Mota, T. R., Oliveira, D. M., Marchiosi, O. R., Ferrarese-Filho, O., & Santos, W. D. (2018). Plant cell wall composition and enzymatic deconstruction. *Bioengineering*, 5(1), 63–77. <https://doi.org/10.3934/bioeng.2018.1.63>

- Motta, F., Andrade, C. & Santana, M. (2013). A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications. En Chandel, A. & da Silva, S. (Eds.), *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization*. (pp. 252 – 270). Intechopen. <https://doi.org/10.5772/53544>
- Nigam, P. S. (2013). Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. *Biomolecules*, 3(3), 597-611.
- Pereira, J. de C., Giese, E. C., Moretti, M. M. de S., Gomes, A. C. dos S., Perrone, O. M., Boscolo, M., da Silva, R., Gomes, E., & Bocchini Martins, D. A. (2017). Effect of metal ions, chemical agents and organic compounds on lignocellulolytic enzymes activities. En M. Senturk (Ed.), *Enzyme inhibitors and activators* (cap. 6). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/65934>
- Phuyal, M., Budhathoki, U., Bista, D., Shakya, S., Shrestha, R., Kumar, A. (2023). Xylanase-Producing Microbes and Their Real-World Application. *International Journal of Chemical Engineering*. 2023. 1 – 14. <https://doi.org/10.1155/2023/3593035>
- Pihlajaniemi, V., Sipponen, M. H., Liimatainen, H., Sirviö, J. A., Nyssölä, A., Laakso, T., et al. (2016). Weighing the factors behind enzymatic hydrolyzability of pretreated lignocellulose. *Green Chemistry*, 18(5), 1295–1305. <https://doi.org/10.1039/C5GC01861G>

- Pollet, A., Delcour, J. & Courtin, M. (2010). Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. *Critical Reviews in Biotechnology*. 30(3). 176 – 191. <https://doi.org/10.3109/07388551003645599>
- Qaseem, M. F., Shaheen, H., & Wu, A.-M. (2021). Cell wall hemicellulose for sustainable industrial utilization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 144, 110996. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.110996>
- Ren, J. Lee. H., Yoo, S., Yu, M., Park, H. & Na, D. (2017). Combined chemical and physical transformation method with RbCl and sepiolite for the transformation of various bacterial species. *Journal of Microbiology Methods*. 135. 48 – 51. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.02.001>
- Rest, M., Lange, C. & Moleenar, D. (1999). A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 52(4). 541 – 545. <https://doi.org/10.1007/s002530051557>
- Robak, K., & Balcerk, M. (2018). Review of second generation bioethanol production from residual biomass. *Food Technology and Biotechnology*, 56(2), 174–187. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.02.18.5428>
- Saavedra-Bouza, A., Escuder-Rodríguez, J., de Castro, M., Becerra, M. & Gonzáles, M. (2023). Xylanases from thermophilic archaea: A hidden

- treasure. *Current Research in Biotechnology*. 5. 1 – 6.
<https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2022.11.003>
- Santos, V. T. O., Siqueira, G., Milagres, A. M. F., & Ferraz, A. (2018). Role of hemicellulose removal during dilute acid pretreatment on the cellulose accessibility and enzymatic hydrolysis of compositionally diverse sugarcane hybrids. *Industrial Crops and Products*, 111, 722–730.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.053>
- Scheller, H. & Ulvskok, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*. 61. 263 – 289. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>
- Singh, S., Madlala, A. & Prior, B. (2003). *Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulose. *FEMS Microbiology Reviews*. 27(1). 3 – 16.
[https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00018-4](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00018-4)
- Sjöholm, E., Gustafsson, K., Berthold, F. & Colmsjö, A. (2000). Influence of the carbohydrate composition on the molecular weight distribution of kraft pulps. *Carbohydrate Polymers*. 41(1). 1 – 7. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(99\)00066-1](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(99)00066-1)
- Sørensen, H. & Mortensen, K. (2005). Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*. 4(1). 1-8.
<https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-1>

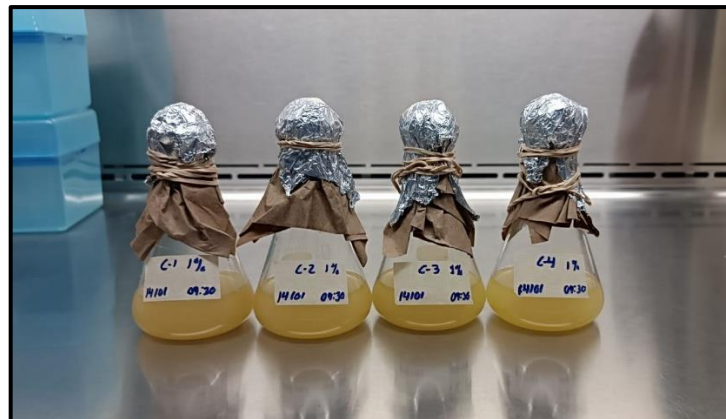
- Studier, F. W., & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189(1), 113–130. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2)
- Subramaniyan, S. & Prema, P. (2002). Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Critical Reviews in Biotechnology*. 22(1). 33-64. <https://doi.org/10.1080/07388550290789450>
- Sunna, A. & Antranikian. G. (1997). Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*. 17(1). 39 – 67. <https://doi.org/10.3109/07388559709146606>
- Suzuki, H. (2015). Effect of pH, temperature, and high pressure on enzymatic activity. En *How enzymes work: From structure to function* (pp. 53–74). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780429341441-4>
- Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(2), 211–222. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0465-8>
- van Reis, R. & Zydney, A. (2001). Membrane separations in biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. 12(2). 208 – 211. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00201-9](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00201-9)

- Verma, D. & Satyanarayana, T. (2012). Molecular approaches for ameliorating microbial xylanases. *Bioresource Technology*. 117. 360 – 367.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.034>
- Walsh, G. & Jefferis, R. (2006). Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nature Biotechnology*. 24(10). 1241-1252.
<https://doi.org/10.1038/nbt1252>
- Wang, L., Wang, Y., Chang, S., Gao, Z., Ma, F., 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. 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112167>
- Wang, X., Luo, H., Yu, W., Ma, R., You, S., Liu, W., Hou, L., Zheng, F., Xie, X. & Yao, B. (2016). A thermostable *Gloeophyllum trabeum* xylanase with potential for the brewing industry. *Food Chemistry*. 199. 516-523.
- Wingfield, P. (2015). Overview of the Purification of Recombinant Proteins. *Current Protocols in Protein Science*. 80. 1 – 50.
<https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0601s80>
- Wingfield, P. (2015). Overview of the Purification of Recombinant Proteins. *Current Protocols in Protein Science*. 80. 1 – 50.
<https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0601s80>

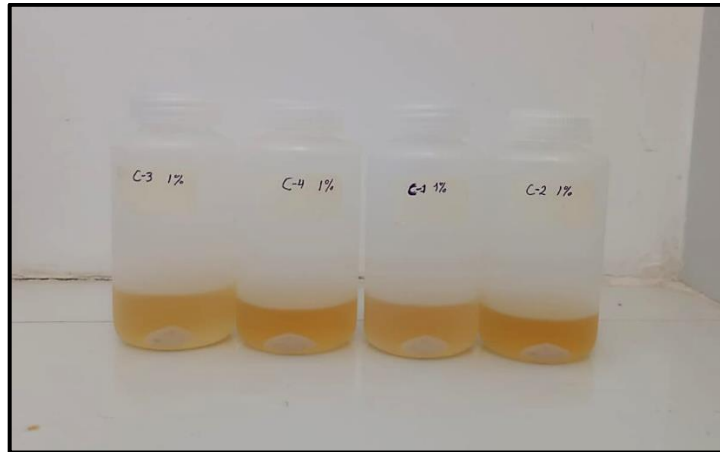
- Xu, X., Liu, M. & Dai, X. (2015). Expression of Recombinant *Bacillus amyloliquefaciens* Xylanase A in *Escherichia coli* and Potential Application in Xylan Hydrolysis. *BioResources*. 10(3). 4694 – 4710. <https://doi.org/10.15376/biores.10.3.4694-4711>
- Yoo, C. G., Dumitrache, A., Muchero, W., Natzke, J., Akinosho, H., Li, M., et al. (2017). Significance of lignin S/G ratio in biomass recalcitrance of *Populus trichocarpa* variants for bioethanol production. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(2), 2162–2168. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b03586>
- Yoshida, N. & Sato, M. (2009). Plasmid uptake by bacteria: a comparison of methods and efficiencies. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 83. 791 – 798. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2042-4>
- Zeng, Y., Zhao, S., Yang, S., & Ding, S.-Y. (2014). Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.09.008>
- Zooglami, A. & Paës, G. (2019). Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis. *Frontiers in Chemistry*. 7. 1-11. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00874>

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Cultivos celulares de los cuatro clones de *E. coli* en caldo Lennox tras 20 horas de incubación a 37 °C y 180 RPM



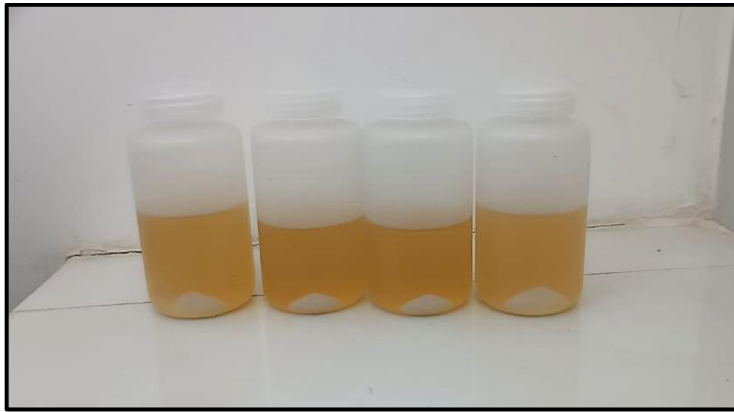
Anexo 2. Sobrenadante celular de los cuatro clones obtenidos para detección de actividad xilanasas



Anexo 3. Matraz de escalamiento en 500 mL con cultivo de *E. coli* (clon 01) al 1 % v/v en caldo Lennox tras inducción con IPTG por 12 horas



Anexo 4. Sobrenadante celular de cultivo de *E. coli* (clon 01) obtenido de un cultivo de 500 mL en caldo Lennox



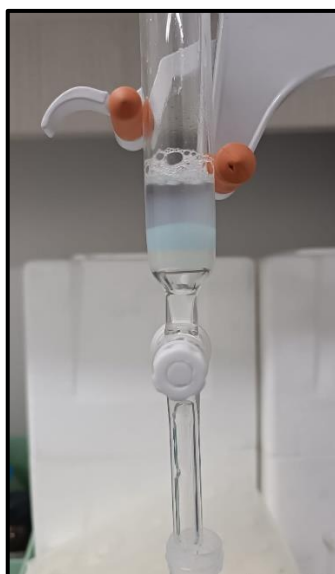
Anexo 5. Sonicador empleado para lisis celular



Anexo 6. Interacción giratoria a 4 °C del complejo resina de Ni-NTA-fracción soluble



Anexo 7. Etapa de elución de resina de Ni-NTA con xilanasa en columna cromatográfica



Anexo 8. Agentes químicos en concentración stock 50 mM

