

Evaluación de la estabilidad de un extracto enzimático, obtenido de *Penicillium* sp. HC1, con actividad endoxilanasas bajo condiciones de almacenamiento.

Angie Paola Flórez Wilches

Director: Balkys Quevedo Hidalgo

Codirector: Catalina García Castillo

Pontificia Universidad Javeriana

Facultad de Ciencias

Microbiología Industrial

Bogotá D.C, Colombia

2018

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución Número 13 de Julio de 1946 “La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

Agradecimientos a:

Profesora Balkys Quevedo por sus enseñanzas y su bondad

Catalina García por su paciencia y carisma

Profesora Ivonne Gutiérrez por su apoyo y cortesía

Tabla de contenido

1. Introducción , justificación y planteamiento del problema	6
2. Marco teórico	9
2.1. Estabilidad de enzimas	9
2.2. Factores que afectan la estabilidad de las enzimas	9
2.3. Métodos de conservación de las enzimas	12
2.3.1. Modificaciones de microentorno.....	12
2.3.2. Modificaciones de macroentorno(Aplicación de aditivos)	12
2.3.2.1. Azucares	13
2.3.2.2. Polioles	14
2.3.2.3. Surfactantes	14
2.3.2.4. Sales	16
3. Objetivos	17
3.1. Objetivo general	17
3.2. Objetivos específicos	17
4. Metodología	18
4.1. Obtención del extracto enzimático con actividad endoxilanasas	18
4.1.1. Inoculo.....	18
4.1.2. Cultivo discontinuo y obtención del extracto.....	18
4.2. Evaluación del efecto del pH sobre la estabilidad del extracto	19
4.3. Almacenamiento del extracto en presencia de diferentes aditivos	19
4.4. Evaluación del aditivo con mejor efecto estabilizante a diferentes concentraciones	20
4.5. Métodos analíticos. Actividad enzimática	21
4.6. Análisis estadístico	21
5. Resultados	22
6. Discusión	27
7. Conclusiones	33
8. Recomendaciones	34
9. Bibliografía	35
10. Anexos	40

Lista de figuras

- Figura 1.** Efecto de diferentes valores de pH sobre la estabilidad del extracto con actividad endoxilanasas obtenido de *Penicillium* sp. HC1. Las pruebas se llevaron a cabo por 24 horas a temperatura ambiente23
- Figura 2.** Efecto del glicerol 5 % v/v, glicerol 5 % v/v con NaCl 5 % p/v, buffer citrato 0,1 M, Sacarosa 0,3 M, tritón X-100 0,02 % p/v sobre la estabilidad enzimática, durante 6 semanas. A. tratamientos evaluados a 4 °C. B. tratamientos evaluados a – 20 °C24
- Figura 3.** Efecto de cada aditivo en la estabilidad del extracto enzimático con actividad endoxilanasas, bajo dos temperaturas. Los datos pertenecen a la actividad relativa medida en la semana 6. Las letras indican el grupo al que pertenece cada tratamiento, organizado por la prueba post Hoc, utilizando el modelo Tukey de comparaciones múltiples, donde las barras con igual letra pertenecen al mismo subconjunto homogéneo, siendo diferentes estadísticamente entre grupos.25
- Figura 4.** Efecto de la concentración de glicerol, sulfato de manganeso y cloruro de calcio sobre la actividad relativa en diferentes tiempos. (A-B) semana 4, (C-D) semana 6, (E-F) semana 8.....27

Lista de tablas

- Tabla 1.** Diseño experimental tipo central compuesto.....20

Resumen

Las endoxilanasas son enzimas que hidrolizan los enlaces glicosídicos presentes en el xilano que compone la hemicelulosa, polímero complejo, presente en la pared de las células vegetales. Como resultado de esta hidrólisis se obtienen diferentes compuestos que pueden aplicarse para elaborar productos de interés industrial. La xilosa es uno de dichos compuestos, la cual se utiliza en la producción de xilitol, alcohol que presenta potenciales aplicaciones en la industria alimentaria y en el tratamiento de algunas afecciones óseas y respiratorias. La producción de xilitol ha sido el enfoque del proyecto “Producción de xilitol a partir de cascarilla de cebada, residual del proceso cervecero”, llevado a cabo en Laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Pontificia Universidad Javeriana.

Durante los procesos de estudio, se utilizan estas enzimas en forma de extracto enzimático, el cual es almacenado en congelación (-20 °C) o refrigeración (4 °C) con el fin de prolongar su vida útil, dado que su obtención tarda 3 semanas. Este almacenamiento ha generado inconvenientes debido a la pérdida rápida de actividad enzimática bajo estas condiciones. Existen varias metodologías de estabilización de proteínas, aun así una de las más aplicadas es el uso de aditivos, donde la sacarosa, el tritón X-100, el glicerol y glicerol con NaCl, se reportan como efectivos en el aumento de la vida útil de dichas moléculas.

En el presente estudio se evaluó la capacidad de los aditivos mencionados de mantener la actividad endoxilanasasa del extracto enzimático durante dos meses. Para esto, se produjeron las enzimas a partir del cultivo de *Penicillium* sp. HC1 con cascarilla de cebada. Una vez obtenido el extracto, en primer lugar se realizó una prueba de estabilidad para conocer el pH que permite a la enzima conservar su actividad. Posteriormente el efecto de los aditivos sobre el extracto enzimático fue evaluado y finalmente se seleccionó el glicerol, dado su buena capacidad estabilizante, además de su fácil manejo en comparación con la sacarosa que arrojó resultados similares.

Seguidamente, se realizó la optimización de la concentración del glicerol en presencia de cloruro de calcio y sulfato de manganeso, cuya habilidad de mejorar la estabilidad de las proteínas ha sido reportada previamente. No obstante, estas sales evidenciaron efectos negativos sobre la actividad enzimática, reduciendo la eficiencia del glicerol e impidiendo su optimización.

1. Introducción justificación y planteamiento del problema

Las endoxilanasas son enzimas hemicelulolíticas, que permiten la degradación de los polímeros heteroxilanos que hacen parte de la pared ligninocelulósica de las células vegetales. Dichos compuestos son abundantes en los tejidos de las plantas, y su proporción varía entre las diferentes especies (Paës et al. 2012). Estas enzimas hidrolizan el xilano presente en estos polímeros, obteniendo como productos finales xilooligosacáridos en forma de xilosa y celobiosa, compuestos de interés en varios procesos de fermentación en biotecnología y en la industria de alimentos funcionales (Li et al. 2012).

Un gran campo de aplicaciones biotecnológicas involucra la participación de las xilanasas. En la industria del papel se ha visto interés por su capacidad de actuar como agente bio blanqueador, evitando el uso de cloro en estos procesos con el fin de reducir el impacto ambiental (Li et al. 2010). Por otro lado, estas enzimas han evidenciado ser un suplemento dietario en los piensos de animales, junto con cocteles multienzimáticos, que mejoran la digestión de animales de granja (Nagar et al. 2012). Adicionalmente, las xilanasas presentan un uso potencial en la producción de jugos, mediante su participación en la extracción de azúcares y en los procesos de mejoramiento de la turbidez y viscosidad previo a su comercialización (Dhiman et al. 2011). También se ha visto interés en su aplicación como vía para la liberación de xilosa, sustrato en procesos de producción biotecnológica de polialcoholes de interés comercial como el xilitol (Chen, et al. 2010). Este alcohol tiene propiedades preventivas de patologías dentales, infecciones respiratorias y osteoporosis (Silva & Chandel 2012), además es una alternativa al azúcar convencional como la sacarosa, dado a sus características edulcorantes y menor aporte calórico (Albuquerque et al. 2014).

Esta última aplicación ha sido el tema central del proyecto “Producción de xilitol a partir de cascarilla de cebada, residual del proceso cervecero”. Las endoxilanasas son obtenidas a partir del cultivo de *Penicillium* sp HC1 en cascarilla de cebada al 3 %, y se utilizan en forma de extracto enzimático (Correa 2016). Este es aplicado sobre dicho material vegetal, liberando xilosa, la cual es el sustrato utilizado para producir xilitol. El almacenamiento de dicho extracto se realiza sin ninguna modificación, a temperaturas de refrigeración (4 °C) o congelación (-20 °C). Sin embargo se ha evidenciado la pérdida de actividad catalítica en menos de una semana (Bernal & Gómez 2016). Esto implica una

producción constante del extracto enzimático a partir del cultivo de *Penicillium* sp HC1, alargando los procesos de estudio, como consecuencia del tiempo requerido para la obtención de las enzimas, aproximadamente 3 semanas.

Esta pérdida de actividad catalítica está asociada con la estabilidad de la enzima cuando es almacenada bajo determinadas condiciones. Dicha estabilidad, consiste en mantener la función enzimática durante el tiempo entre su producción y su correspondiente uso (Fágáin 2003). También se ha definido como la capacidad de la enzima de mantener inalterada su actividad bajo determinadas condiciones de almacenamiento (Gianfreda & Scarfi 1991). La pérdida de estabilidad enzimática es causada por factores físicos (radiación, temperatura, fuerzas mecánicas), químicos (ácidos, álcalis, quelantes, metales pesados, solventes orgánicos, entre otros), o biológicos (proteasas) (Schmid 1979). Esto conlleva a procesos de inestabilidad física como desnaturalización, agregación y formación de partículas insolubles; e inestabilidad química como oxidación, deamidación, alteración de puentes disulfuro, que generan en conjunto pérdida total de la integridad estructural de la enzima, alterando su actividad catalítica (Hoon 2012).

Existen varias metodologías enfocadas en mantener y mejorar la estabilidad enzimática en almacenamiento. Algunas de estas abarcan modificaciones químicas, ingeniería de proteínas, inmovilización y tratamientos con aditivos (Shah & Madamwar 2005). Esta última consiste en la modificación del macroambiente en el cual está embebida la proteína, alterando sus propiedades mediante la adición de compuestos como polioles, osmolitos (azúcares y sales) y surfactantes (Balcao & Vila 2015). Dichos compuestos alteran la estabilidad mediante su interacción directa o indirecta con la proteína en solución (Hoon 2012). Esta metodología es una de las más tradicionales y se ha empleado en la conservación de proteínas a nivel general y en comparación con las demás, se consideraría la más simple, viable así como la más práctica y económica. (Shah & Madamwar 2005).

Aunque estos estudios se han realizado sobre la estabilidad de enzimas en su mayoría previamente purificadas, como amilasas (Yoon et al. 2005; Takeda & Hizukuri 1972), órgano fosfato hidrolasa (Iyengar et al. 2015), fosforilasas (Srirangsan et al. 2011), lacasas (Azimi et al. 2016), entre otras ; y también algunas proteínas como anticuerpos (Chang et al. 2005) y hemoglobina (Kerwin et al. 1998), no hay reportes de estudios de estabilidad

en almacenamiento de un extracto con actividad endoxilanasas en presencia de algunos de los compuestos previamente mencionados. Mientras que existen varios estudios de mejoramiento de termoestabilidad (Irwin et al. 1994; Gupta et al. 2014; Singh et al. 2000), donde las estrategias utilizadas son las mismas y se basan en la aplicación de aditivos que impiden la desnaturalización de la enzima y por tanto la pérdida de actividad. Por lo anterior, el objetivo de este proyecto fue evaluar la estabilidad de un extracto enzimático con actividad endoxilanasas bajo condiciones de almacenamiento, utilizando diferentes aditivos reportados con efecto estabilizante sobre las proteínas almacenadas.

2. Marco teórico

2.1. Estabilidad de enzimas

Las enzimas son proteínas que catalizan reacciones biológicas en los diversos grupos de organismos. La estabilidad de las proteínas se describe mediante los diferentes fenómenos dados sobre su estructura y funcionalidad, cuando dicha molécula es sometida a condiciones de reacción o de almacenamiento (Iyer & Ananthanarayan 2008). La conformación de las proteínas está dada por la estructura primaria (secuencias de aminoácidos), las cuales involucran enlaces covalentes (enlaces peptídicos y puentes disulfuro) y otras estructuras más complejas (secundaria, terciaria y cuaternaria) donde intervienen interacciones no covalentes (puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y de tipo Van der Waals). La funcionalidad de las proteínas está directamente implicada con el balance de estas últimas clases de interacción no covalentes, las cuales son vulnerables a los cambios del ambiente y por tanto son fácilmente alteradas (Hoon 2012).

Las proteínas presentan una conformación de baja estabilidad termodinámica. Esta característica hace referencia a las interacciones no covalentes mencionadas previamente, que intervienen de forma intermolecular, (estructura terciaria o cuaternaria), y entre la proteína y su entorno (solvente) (Castronuovo 1991). Para las proteínas monoméricas, estructura terciaria está involucrada en dichas interacciones, en el caso de las proteínas multiméricas, la estructura cuaternaria es la directamente implicada (Balcão & Vila 2015). Estas interacciones son susceptibles de ser alteradas por factores físicos y químicos, favoreciendo el paso de la forma nativa (proteína plegada) al estado desnaturalizado (desplegada) de la proteína, lo que se traduce en la inestabilidad estructural, con la consecuente pérdida de su actividad catalítica (Murphy et al. 1992).

2.2. Factores que afectan la estabilidad de las enzimas

La pérdida de estabilidad enzimática es causada por factores físicos (radiación, temperatura, fuerzas mecánicas), químicos (ácidos, álcalis, quelantes, metales pesados, solventes orgánicos, variaciones de pH), o biológicos (proteasas) (Schmid 1979) que pueden llevar a procesos de inestabilidad física como desnaturalización, agregación y formación de partículas insolubles e inestabilidad química como oxidación, deamidación, alteración de puentes disulfuro, que generan en conjunto pérdida total de la integridad

estructural de la enzima y por tanto su actividad (Hoon 2012). A continuación se da una breve explicación del efecto de cada uno de los factores sobre las proteínas.

Temperatura: temperaturas elevadas conllevan a la desnaturalización irreversible de varios grupos de proteínas. Un reducido número de estas moléculas, es capaz de retornar a su estado nativo en condiciones extremas de temperatura, la gran mayoría no presenta esta capacidad. Los puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, fuerzas de van der Waals, fuerzas electrostáticas (repulsión, apareamiento de iones) y propiedades intrínsecas (interacciones de péptidos locales), están en contra del incremento de la entropía conformacional de la molécula. Aun así, estas fuerzas son débiles y pueden ser fácilmente afectadas por los incrementos de temperatura (Hoon 2012), perturbando la conformación nativa de la proteína hasta el punto que favorece eventos de desnaturalización y agregación entre las moléculas. Este fenómeno es consecuencia de la exposición de los diferentes grupos hidrofóbicos e hidrofílicos hacia el medio, permitiendo las interacciones entre proteínas con la consecuente formación de agregados (Chi et al. 2003).

Por otro lado a bajas temperaturas (0 - 20°C), varias enzimas son menos activas y por tanto evidencian una reducción considerable de la actividad enzimática. Adicional a esto, hay una reducción de las interacciones hidrofóbicas que alteran el núcleo catalítico de la enzima, y en algunos casos genera disociación de las estructuras cuaternarias, facilitando la formación de agregados (Schmid 1979).

pH: La proteínas presentan un elevado grado de estabilidad dentro de determinados rangos de pH, y por tanto si el solvente en el que se encuentra la molécula excede dichos rangos podrían generarse fenómenos de agregación rápidamente (Chi et al. 2003). Cada proteína presenta sus propios rangos de estabilidad y por tanto distintos buffers para lograr los valores de pH adecuados. Esto está relacionado con el número de grupos cargados presentes en la proteína, los cuales pueden aumentar por el incremento en la acidez o basicidad de la solución. Este aumento en las cargas genera elevados fenómenos de repulsión dentro de la misma molécula, lo que altera la conformación de la estructura nativa de la proteína, causando precipitación o desnaturalización de la misma. A este fenómeno se le denomina repulsión no específica (Hoon 2012).

Radiación: varios aminoácidos que componen las proteínas como cisteína, histidina y triptófano son sensibles a fenómenos de fotooxidación dado a las reacciones fotoquímicas que pueden desencadenarse sobre dichas estructuras, y formar radicales que generan cambios sobre la configuración química de cada grupo. También pueden verse alterados los puentes disulfuro y demás enlaces que mantienen las estructuras conformacionales de la proteína, lo que en conjunto genera alteraciones de la actividad catalítica (Schmid 1979).

Presencia de otros compuestos: la presencia de ácidos o álcalis pueden alterar el pH del medio que rodea la enzima y desarrollar los fenómenos mencionados anteriormente. Por otro lado, agentes oxidantes pueden interactuar con los aminoácidos y generar cambios conformacionales que impiden la función catalítica correspondiente; agentes quelantes pueden secuestrar cofactores vitales para la función enzimática; y diferentes sales pueden generar deshidratación de la molécula y evidenciar fenómenos de precipitación. Adicionalmente, algunos solventes orgánicos pueden romper los puentes de hidrógeno que hacen parte de la estructura secundaria y terciaria y generar eventos de desnaturalización (Schmid 1979).

El mejoramiento de la estabilidad proteica consiste así, en preservar la estructura química y tridimensional de la cadena polipeptídica bajo las condiciones extremas que puedan presentarse (Balcão & Vila 2015). La arquitectura tridimensional y los movimientos de las moléculas protéicas están determinadas por las propiedades del macroambiente, como las anteriormente descritas (Fernández-Lafuente 2009), todas interfieren con la estabilidad estructural y funcional de la proteína. Siendo así, existen diversos métodos de estabilización que tienen como fin evitar los efectos que favorecen el estado desnaturalizado de estas moléculas, y abarcan desde simples modificaciones a nivel de macroambiente como la presencia de aditivos, hasta técnicas de ingeniería de proteínas y biología molecular. A continuación se hará una breve descripción de los métodos más destacados y se tendrá especial énfasis en las modificaciones a nivel de macroambiente referido al uso de aditivos, ya que es el punto de interés de este trabajo.

2.3. Métodos de conservación de enzimas

A nivel general existen diversos métodos de conservación de enzimas, aun así pueden agruparse en aquellos que se enfocan en modificaciones del microentorno de la proteína y los enfocados en el macroentorno.

2.3.1. Modificaciones de microentorno:

Ingeniería de proteínas: Estos métodos están enfocados en el diseño de proteínas por mutación al azar o por mutación dirigida, con el fin de alterar la secuencia de los genes correspondientes para modificar la secuencia de aminoácidos que serán codificados. Esto permite desarrollar proteínas más estables y menos susceptibles a los factores denaturantes. La introducción de aminoácidos de prolina y puentes disulfuro a través del intercambio de aminoácidos móviles o extensiones de cadenas polipeptídicas son algunos ejemplos (Fàgàin 2003).

Modificaciones químicas: Estos métodos se enfocan en la alteración de la estructura de la proteína con otros grupos químicos para favorecer su estabilidad. Estos incluyen procesos de metilación, alquilación, acilación, adición de carbohidratos a la cadena terminal y formación de enlaces cruzados con glutaraldehído o algunos polímeros, entre otros (Davis 2003).

Inmovilización: Esta técnica es ampliamente utilizada y una de las más preferidas en el ámbito biotecnológico. El almacenamiento de las enzimas bajo este método, no solo implica mantener su actividad enzimática por más tiempo, sino que también trae consigo otras ventajas. Una de estas es la reutilización de dicho catalizador, además de que permite una fácil purificación y hace más flexible los diseños del reactor donde serán aplicadas (Spikermann et al. 2014). La microencapsulación (vesículas lipídicas), atrapamientos (matrices poliméricas), nanoencapsulación, y formación de enlaces covalentes en soportes macroscópicos, son algunos ejemplos de métodos aplicados para inmovilizar diferentes enzimas (Balcão & Vila 2015).

2.3.2. Modificaciones de macroentorno (Utilización de aditivos)

Entre los varios métodos disponibles para mejorar la estabilidad enzimática, la aplicación de compuestos de bajo peso molecular que modifican las

características del macroambiente de la proteína, ha sido uno de los más estudiados y utilizados en el campo biotecnológico dado que es sencillo, fácil, económico así como también práctico (Shah & Madamwar 2005). A lo largo de los años, los aditivos han sido extensamente utilizados para alargar la estabilidad en el almacenamiento de las enzimas que se encuentran en medio acuoso; o para proteger péptidos contra los efectos de la liofilización (Spikermann et al. 2014).

Los grupos de compuestos más estudiados, que han demostrado un efecto estabilizante, pertenecen al grupo de: polioles, azúcares, detergentes o surfactantes y sales. La modificación del macroambiente mediante la aplicación de estos aditivos, conduce a la inhibición de la agregación de la proteína y por tanto a su estabilización mediante interacciones preferenciales (Iyer & Ananthanarayan 2008). Dichas moléculas favorecen la estabilidad, en la mayoría de casos, sin interactuar directamente con la proteína, alterando las propiedades del solvente que la rodea y por tanto las interacciones solvente – proteína (Balcão & Vila 2015).

2.3.2.1. Azúcares

Dentro de este grupo se han estudiado principalmente la sacarosa y la trehalosa. La sacarosa ha demostrado tener un efecto estabilizante a diferentes concentraciones en varias proteínas como: hemoglobina (Kerwin et al. 1998), anticuerpos (Chang et al. 2005), subtilisina de *Bacillus lentus* (Depaz et al. 2002), alcohol deshidrogenasa (Spikermann et al. 2014), monooxigenasa (Beek et al. 2015), y fosforilasa (Srirangsan et al. 2011).

Por otra parte la trehalosa ha logrado mantener hasta un 91 % actividad inicial de la enzima organofosfato hidrolasa después de 60 días (Iyengar et al. 2015) y ha protegido la estructura conformacional de la lisozima después de procesos de deshidratación para su posterior conservación (Liao et al. 2002). Sin embargo el efecto estabilizante de este grupo de moléculas sobre xilanasas en almacenamiento no ha sido estudiado previamente.

Se han descrito dos mecanismos para este grupo que podrían estar implicados en el mejoramiento de la estabilidad enzimática en almacenamiento. En primer lugar está “el reemplazo de agua”, se basa en la habilidad de los azúcares de formar

enlaces tipo puente de hidrógeno, en la superficie de las estructuras proteicas. Dado que la estructura tridimensional de la proteína en solución depende de la estabilización de la misma mediante una capa de moléculas de agua unidas por puentes de hidrogeno a la superficie de la molécula, cuando el agua es removida, el azúcar reemplaza su función. Este mecanismo explica el efecto estabilizante de ciertos azúcares contra el daño generado en los procesos de congelación y desecación cuando el agua es retirada o alterada físicamente (Balcão & Vila 2015; Srirangsan et al. 2011).

En segundo lugar, está el mecanismo de “exclusión preferencial”, en el cual las moléculas de los azúcares, son excluidas de la superficie de la proteína dado a la diferencia de tamaño con respecto al agua (moléculas más pequeña), dando paso a esta última para que puedan interactuar de manera preferencial con la entidad proteica y así estabilizar la molécula. Como consecuencia de este fenómeno, las unidades de azúcar que se establecen inmediatamente después de la capa de hidratación, forman una especie de escudo protector alrededor de dichas moléculas en interacción (proteína – agua), favoreciendo estado nativo de la molécula (Balcão & Vila 2015; Kawai & Suzuki 2007; Kerwin et al. 1998).

2.3.2.2. Polioles

Este grupo ha evidenciado buenos efectos estabilizantes en diferentes grupos de enzimas, incluyendo las endoxilanasas. A pesar de que la mayoría de estudios están enfocados en termoestabilidad, su objetivo es el mismo de impedir la alteración de la estructura terciaria, es decir evitar eventos de desnaturalización, favoreciendo los estados nativos funcionales. El glicerol a concentraciones de 5, 10 y 50 % v/v, se reporta como uno de los más efectivos para mantener la estabilidad enzimática obteniendo porcentajes de actividad relativa superiores al 90 % y aumento de los valores de vida media a temperaturas entre 60 y 70 °C, por intervalos de tiempo de hasta 16 horas (Irwin et al. 1994; Gupta et al. 2014; Singh et al. 2000).

Adicionalmente el sorbitol y el xilitol, también han evidenciado efectos estabilizantes a concentraciones de 2 M, con resultados de actividad relativa de 100% por un tiempo aproximado de 4 horas a 50 °C (Solorzano et al. 2000). Por otro lado, un estudio de estabilidad de Iyengar et al. (2015) demostró el efecto

del manitol al 0,5 M sobre la enzima organofosfato hidrolasa durante 60 días bajo temperatura de 25 °C, logrando mantener un 91% de la actividad inicial.

En términos generales se dice que los polioles tienen la facultad de formar puentes de hidrógeno que brindan soporte y estabilidad a la conformación nativa de la enzima con más resistencia frente a la desnaturalización térmica (Bankeeree et al. 2014). Más concretamente, el glicerol incrementa la estabilidad dado a su capacidad de fortalecer las interacciones hidrofóbicas y disminuir la tensión superficial del agua, además de permitir la hidratación preferencial potenciando la organización de los grupos hidrofóbicos de la proteína (Zhang et al. 2002; Balcão & Vila 2015). Este ordenamiento molecular se traduce en una disminución de la entropía de la capa de agua alrededor de la superficie de la proteína favoreciendo el estado nativo de la molécula (Balcão & Vila 2015).

2.3.2.3. Surfactantes

Se han evaluado varios detergentes incluyendo SDS (sodio duodecil sulfato), CTAB (bromuro cetrimetilamonio), AOT (sodio di-2-etilhexilsulfosuccinato), Tween 80, entre otros (Nicanuzia et al. 2006; Azimi et al. 2016). Sin embargo el más estudiado de este grupo es el Tritón X-100. Estudios de termoestabilidad sobre enzimas como α -amilasa (Yoon & Robyt 2005), β -amilasa (Takeda & Hizukuri 1972), lacasas (Azimi et al. 2016) y lipasas (Nicanuzia et al. 2006), han demostrado que se mantiene entre un 80 y 110 % de actividad inicial bajo concentraciones entre 0,02% y 10 % p/V, siendo la primera una de las más utilizadas.

Los mecanismos descritos difieren entre el tipo de surfactante, si es iónico o no iónico. Las interacciones entre la enzima y el surfactante involucran interacciones electrostáticas e hidrofóbicas entre los grupos hidrofílicos y las cadenas alquílicas de los surfactantes con los aminoácidos cargados y los residuos hidrofóbicos de la enzima, respectivamente. Dichas interacciones pueden favorecer el estado nativo de la proteína y estabilizar su estructura (Azimi et al. 2016). Adicionalmente, también evita fenómenos de adsorción a las superficies que tienen contacto con la proteína, previniendo así la formación de agregados (Hoon 2012). Por otro lado, se ha propuesto que estos aditivos permiten un estado

conformacional tipo barril compacto que forma una estructura más rígida, mediante los enlaces formados con los grupos expuestos de la proteína impidiendo su desnaturalización (Yoon & Robyt 2005).

2.3.2.4. Sales

Se ha reportado estudios previos de termoestabilidad, para la enzima purificada, a 50 °C por 30 minutos utilizando KCl (50mM), CaCl₂ (50mM), una actividad relativa aproximadamente del 130 % para actividad xilanasa de *Aspergillus foetidus* (Shah & Madamwar 2005). Por otro lado, el NaCl también ha evidenciado efectos estabilizantes sobre endoxilanasas de *Mellanocarpus albomyces* (Gupta et al 2014).

La presencia de iones en solución evidencian efectos sobre la estabilidad física de la proteína, modificando su estructura conformacional mediante el equilibrio de la solubilidad (efecto salting in / salting out) y la disminución de la tasa de formación de agregados de la proteína no nativa (desnaturalizada), mediante la interacción de los grupos cargados con los iones en solución (Chi et al 2003).

3. Objetivos

3.1. Objetivo General

Evaluar la estabilidad de un extracto enzimático con actividad endoxilanasas, obtenido de *Penicillium* sp HC1.

3.2. Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto del pH sobre la estabilidad del extracto enzimático.
2. Evaluar la estabilidad del extracto bajo condiciones de almacenamiento, empleando Tritón X-100, glicerol, sacarosa, glicerol con NaCl y buffer citrato como aditivos.
3. Evaluar diferentes concentraciones del aditivo con mayor efecto estabilizante bajo condiciones de almacenamiento.

4. Metodología

4.1. Obtención del extracto enzimático con actividad endoxilanasasa

4.1.1. Inóculo

Para la producción del extracto de interés se utilizó la cepa *Penicillium* sp. codificada como HC1, aislada de suelo rizosférico de un cultivo de arroz en Tolima, Colombia (Gutiérrez et al. 2012). A partir del banco de trabajo proveniente del cepario del Laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Pontificia Universidad Javeriana se reactivó este microorganismo en medio sólido agar papa dextrosa (PDA), incubando a 28 °C por un periodo de 8 días. Posteriormente se hizo una suspensión de conidios mediante la adición de 10 mL de solución salina (0,85% p/v) con Tween 80 (0,1% v/v) a cada caja sembrada para desprender los conidios; dicha suspensión fue filtrada a través de algodón estéril en jeringa para retirar los residuos de micelio. Al filtrado obtenido se le realizaron tres lavados sucesivos con solución salina (0,85% p/v) con el fin de retirar trazas del medio de cultivo. Una vez culminado este proceso, se ajustó la suspensión de conidios a una concentración del orden de 10^6 conidios/mL mediante recuentos en cámara de Neubauer. Dicha solución fue el inóculo para la producción de las enzimas de interés.

4.1.2. Cultivo discontinuo y obtención del extracto enzimático

La producción del extracto enzimático se realizó en matraces Erlenmeyer de 1L con un volumen efectivo de trabajo del 20 %. En cada matraz se adicionó 3 % de cascarilla de cebada junto con 180 mL de solución de sales compuesta de: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g/ L; KH_2PO_4 0,3 g/ L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,83 g /L; CaCl_2 0,3 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,005 g/ L; MnSO_4 1,56 mg/ L y ZnSO_4 1,4 mg/ L (Mandels & Weber 1969) ajustada a pH 6. Una vez esterilizado el medio, éste fue inoculado con 20 mL de la suspensión de conidios mencionada en el numeral 4.1.1. y se llevó a incubar por un lapso de 10 días a 150 rpm a 28 °C (Correa 2016). Culminado el tiempo de incubación, el cultivo fue centrifugado a 8000 rpm durante 20 min a 7°C en una centrífuga Sorvall RC 6 Plus Thermo Scientific Co (Waltham, MA, USA). El sobrenadante obtenido se filtró por papel filtro tipo whatman y posteriormente bajo condiciones de esterilidad, por membranas de 0,45 μm y 0,22 μm sucesivamente. Para los extractos obtenidos se determinó actividad enzimática endoxilanasasa como se describe en el ítem 4.5.

Adicionalmente, se realizaron pruebas cualitativas para la detección de actividad proteolítica presente en dicho extracto enzimático. Se tomaron 10 µl del extracto para ser dispuestos sobre agar leche cuya composición era: leche descremada 1 % p/v, glucosa 1 g/L, cloruro de calcio 0,5 g/L, sulfato de amonio 1 g/L, extracto de levadura 1 g/L, fosfato de sodio monobásico 0,5 g/L, fosfato de sodio dibásico 0,5 g/L. Estas cajas fueron incubadas a 55 y 37 °C, haciendo seguimiento durante 3 días. La presencia de proteasas se evidenciaba por la formación de halos de hidrólisis alrededor de la muestra.

4.2. Evaluación del efecto del pH sobre la estabilidad del extracto enzimático

Una vez obtenido el extracto con actividad endoxilanasas, se hicieron pruebas de estabilidad enzimática con diferentes valores de pH a temperatura ambiente por 24 horas. Los siguientes buffers fueron utilizados para cada valor de pH: buffer citrato de sodio 0,1 M/ ácido cítrico 0,1 M pH 3, 4, 5, 6 y buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 7, 8, 9 (Wu et al. 2017). Para la prueba de estabilidad se mezcló 1 mL de extracto enzimático previamente filtrado por membrana de 0,22 µm, con 1 mL del correspondiente buffer, bajo condiciones de esterilidad, y se almacenó a temperatura ambiente por 24 horas. Cada tratamiento se realizó por triplicado y se determinó la actividad endoxilanasas tanto al inicio como al final de la prueba con el fin de evidenciar el efecto del pH sobre la estabilidad del extracto mediante el porcentaje de actividad relativa. La medición de dicha actividad se llevó a cabo de la forma descrita en el numeral 4.5.

4.3. Almacenamiento del extracto enzimático con diferentes aditivos

Teniendo en cuenta el pH que permita mantener la mayor actividad endoxilanasas se realizaron las pruebas de estabilidad con diferentes aditivos bajo condiciones de almacenamiento. Los compuestos evaluados fueron los siguientes: Tritón X.-100 0,02 % (p/v) (Yoon & Robit 2005), glicerol 5% (v/v) (Irwin et al. 1994), glicerol 5 % (v/v) más NaCl 5% (p/v) (Gupta et al. 2014) y sacarosa 0,3 M (Spickermann et al. 2014; Kerwin et al. 1998). Dado que los aditivos fueron preparados en el buffer con el valor de pH previamente seleccionado, se realizó un tratamiento únicamente con buffer, como control; además se hizo un control negativo solo con extracto enzimático, sin ningún aditivo. Cada tratamiento se realizó por triplicado y fueron almacenados bajo dos temperaturas: -20 °C y 4 °C.

Para cada tratamiento, incluyendo el buffer, se hizo un stock compuesto por el aditivo correspondiente mezclado con el extracto enzimático. Este stock fue distribuido en tubos Eppendorf bajo condiciones de esterilidad, almacenando en cada tubo, 1 mL de dicha mezcla. Durante dos meses se tomaron los respectivos tubos de cada tratamiento para realizar monitoreo de la actividad endoxilanas (numeral 4.4): 0, 2, 4, 6, 8 semanas. El efecto de cada aditivo sobre la estabilidad enzimática fue evaluado mediante el porcentaje de actividad relativa.

4.4. Evaluación del aditivo con mejor efecto estabilizante a diferentes concentraciones.

Una vez finalizado los monitoreos, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, además de la practicidad de manejo del aditivo, se seleccionó aquel que permitiera mantener mayor actividad enzimática para ser estudiado en diferentes concentraciones. Simultáneamente se determinó la capacidad del cloruro de calcio (CaCl_2) y del sulfato de manganeso (MnSO_4), de mejorar la estabilidad en presencia de glicerol (Knob et al. 2013).

De esta manera con tres factores a evaluar: glicerol, cloruro de calcio y sulfato de manganeso, sobre la estabilidad enzimática, teniendo como variable respuesta el porcentaje de actividad relativa, se realizó un diseño central compuesto (DCC), establecido mediante el programa estadístico Desing-Expert 9.0.6. Así pues, se evaluaron los factores mencionados, cada uno con 2 niveles (+1 y -1), 2 puntos axiales (+1,5 y -1,5) y un punto central (0), resultando en un total de 15 tratamientos y 47 experimentos con sus respectivas réplicas (cinco réplicas para el punto central y tres para los puntos axiales y los niveles) (Tabla 1). Todos los tratamientos se realizaron a la temperatura seleccionada en el numeral 4.3 y fueron monitoreados en 5 tiempos, siendo estos: 0, 2, 4, 6, 8 semanas.

Tabla 1. Diseño experimental tipo central compuesto

Punto	Glicerol % v/v	CaCl_2 mM	MnSO_4 mM
-1,5	0,8	0	0

-1	2,5	2	2
0	5	6	6
+1	7,5	10	10
+1,5	9	13	13

4.5. Métodos Analíticos. Actividad enzimática

El procedimiento para medir actividad endoxilanasas o endo-1,4-B-D-xilano xilohidrolasa (EC 3.2.1.8), en unidades por litro de muestra (U/L), se llevó a cabo mezclando 50 µl de muestra con 450 µl de xilano de beechwood al 1% (p/v) en buffer citrato 50 mM (pH 5.3). La reacción enzimática se realizó a 50°C por 5 minutos, según el método modificado de Bailey et al. (1992). La cantidad de azúcares reductores liberados se determinó por la técnica de DNS ácido 3,5 dinitro salicílico (Miller 1959) empleando xilosa como estándar (Anexo 1). Una unidad de actividad endoxilanasas fue definida como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de azúcares reductores equivalentes a xilosa por minuto bajo las condiciones del ensayo. La actividad relativa, fue calculada con respecto a la actividad inicial (Ec.1)

$$\% \text{ Actividad relativa} = \frac{\text{unidades enzimáticas finales}}{\text{unidades enzimáticas iniciales}} * 100 \quad \text{Ec.1}$$

4.6. Análisis estadístico

Para la prueba de selección inicial del aditivo bajo dos temperaturas, se hizo un análisis de varianza ANOVA a los resultados del monitoreo final. Además, se aplicaron pruebas post Hoc para realizar comparaciones múltiples entre los resultados. Adicionalmente se realizó una prueba de t- student para confirmar si existían diferencias significativas entre los datos de las temperaturas para cada aditivo. Por otro lado, los datos obtenidos en el diseño central compuesto fueron analizados conforme al modelo obtenido.

5. Resultados

Efecto del pH sobre la estabilidad del extracto enzimático

Antes de realizar las pruebas de estabilidad se evaluó la presencia de proteasas en el extracto. De esta manera se siguió la metodología descrita en el numeral 4.1.2 sin evidenciar halos de hidrólisis alrededor de la muestra después del tiempo de incubación. Esto indica ausencia de actividad proteolítica en el extracto y por tanto se descarta su efecto sobre la estabilidad de las enzimas en estudio.

Se evaluó la estabilidad del extracto con actividad endoxilanasas bajo diferentes valores de pH; utilizando el porcentaje de actividad relativa como variable respuesta. En la Figura 1, se muestra el efecto de cada pH sobre la estabilidad enzimática y se observa que a partir del pH 5 hasta el 9 la capacidad catalítica de la enzima en el extracto sobrepasa el 100% de actividad inicial. Los valores más altos de actividad relativa corresponden a los obtenidos bajo el pH 6 y 7 (135 % y 137 % respectivamente); en contraste a pH 3 se obtuvo el menor valor con un porcentaje de 87 %. Teniendo en cuenta que los valores de pH menores o iguales a 6 se ajustaron con buffer citrato y a partir de 7 con buffer fosfato, se optó por seleccionar el buffer de pH 6 para los siguientes experimentos. El protocolo de medición de actividad enzimática está diseñado con buffer citrato y por esta razón se tuvo preferencia por dicho valor de pH.

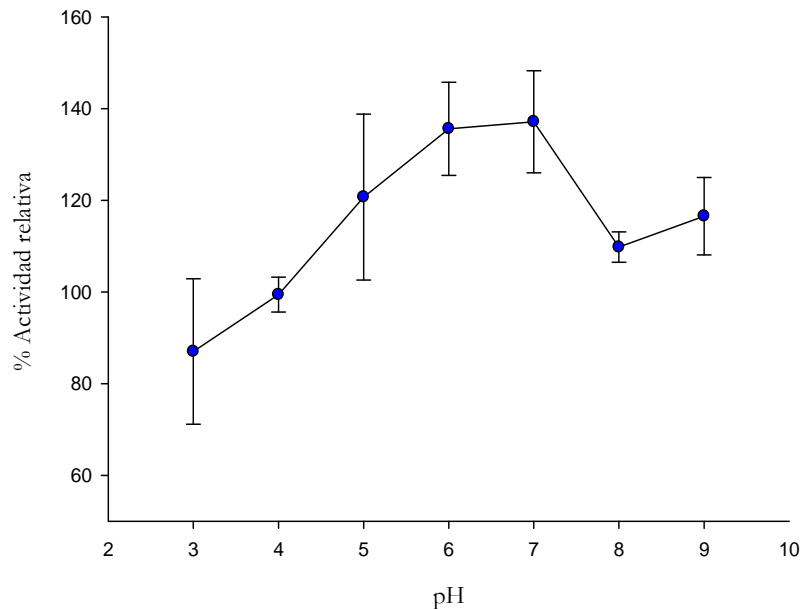


Fig.1. Efecto de diferentes valores de pH sobre la estabilidad del extracto con actividad endoxilanasas obtenido de *Penicillium* sp. HC1. Las pruebas se llevaron a cabo por 24 horas a temperatura ambiente. Promedio de tres réplicas.

Almacenamiento del extracto enzimático con diferentes aditivos.

En la Figura 2 se aprecia el comportamiento de la estabilidad enzimática con respecto al tiempo en presencia de glicerol al 5 % v/v, Tritón X-100 0,02 % p/v, sacarosa 0,3 M, glicerol 5 % v/v con NaCl al 5 % p/v, buffer citrato y un control sin aditivo que consta únicamente de extracto enzimático. Aunque el experimento estaba dirigido hasta la semana 8, se decidió terminar en la semana 6 dado que la actividad relativa estaba por debajo del 50 %. El comportamiento de la actividad relativa bajo las dos temperaturas muestra una tendencia descendente frente al incremento en el tiempo. La presencia de los aditivos en todos los tratamientos muestra comportamientos distintos con respecto al extracto sin aditivo (control).

En la semana 2 a 4 °C, la actividad del control fue de 82 % mientras que en los tratamientos con tritón X-100, glicerol, glicerol con NaCl y sacarosa es de 113 %, 103 %, 91 %, y 104 % respectivamente, siendo el tritón el de mayor efecto positivo sobre la estabilidad. A -20 °C, la presencia de aditivos mantiene la actividad relativa en 85 %, 91%, 96 % y 104 % respectivamente, a diferencia del control que muestra un valor de 82 %, siendo así en este caso, la sacarosa con mejor efecto para esta temperatura. Los resultados obtenidos con el buffer citrato: 83 % y 79 % a 4 y -20 °C, respectivamente, son menores en comparación con los demás aditivos.

Por otro lado, en la semana 4 el tritón X-100 sigue siendo el de mayor efecto estabilizante a 4 °C a diferencia de los tratamientos a -20 °C, donde la sacarosa y el glicerol se equiparan en sus efectos, obteniendo resultados cercanos (50 % y 48 %, respectivamente). En este caso el tritón logra mantener un 60 % de actividad relativa superando a los demás en este tiempo a -20 °C. Respecto al control sin aditivo, se aprecia que su comportamiento no es diferente del extracto con buffer citrato, ambas gráficas presentan igual tendencia en la pérdida de actividad. Con esto se evidencia que la enzima pierde su función desde la semana 2 bajo las dos temperaturas y que en presencia del buffer citrato la actividad no es conservada en el tiempo.

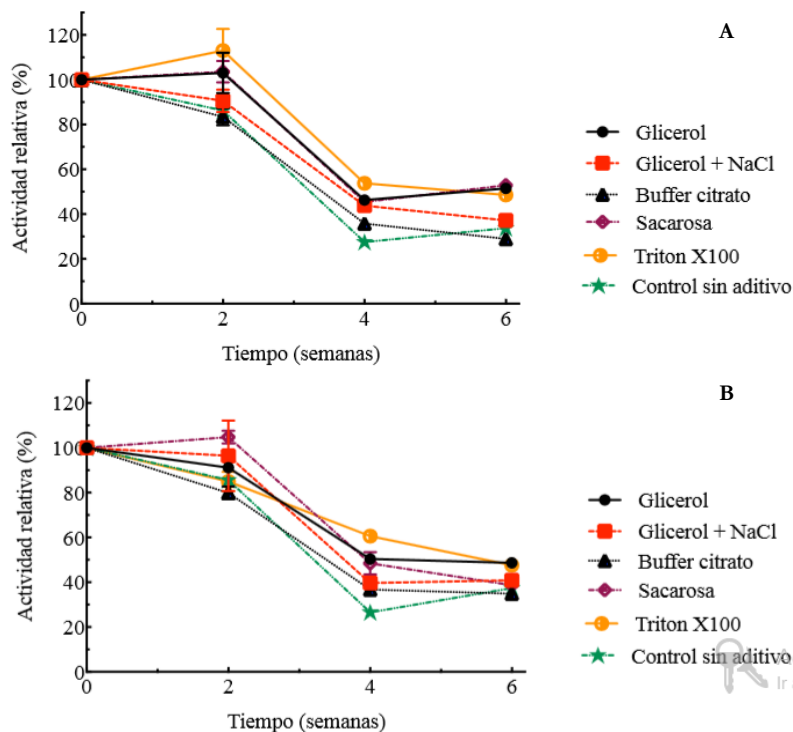


Fig.2. Efecto del glicerol 5 % v/v, glicerol 5 % v/v con NaCl 5 % p/v, buffer citrato 0,1 M, Sacarosa 0,3 M, tritón X-100 0,02 % p/v sobre la estabilidad enzimática, durante 6 semanas. A. tratamientos evaluados a 4 °C. B. tratamientos evaluados a -20 °C.

Para el tiempo final (semana 6) se hizo un análisis de varianza ANOVA para determinar si había diferencias significativas y después se llevaron a cabo pruebas post Hoc de comparaciones múltiples (Figura 3). La presencia del aditivo en el extracto evidencia un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre la estabilidad enzimática, en comparación con la temperatura ($p = 0,096$). La sacarosa y el glicerol a 4 °C permiten obtener la mayor actividad relativa (52 % y 53% respectivamente) entre todos los tratamientos y, con respecto al control, evidencia diferencias significativas ($p < 0,05$). Por otro lado, el buffer citrato a 4 °C disminuye la estabilidad, siendo el de menor efecto entre todos los tratamientos.

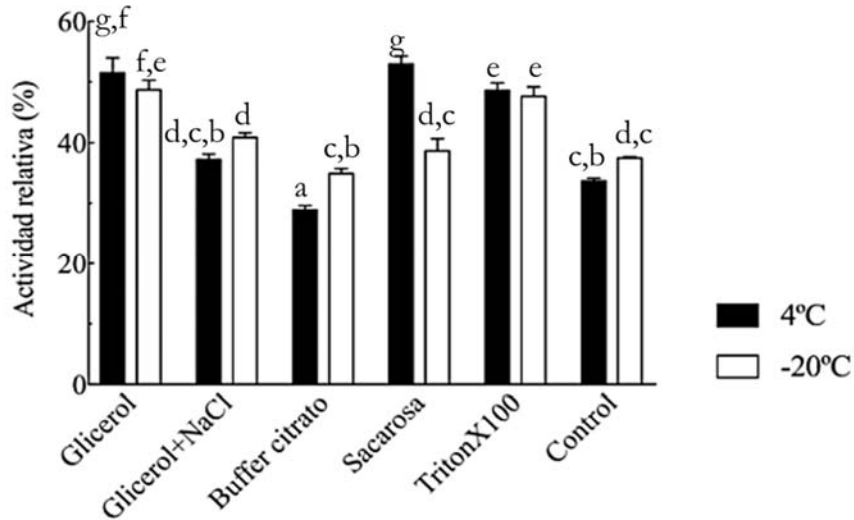


Fig.3. Efecto de cada aditivo en la estabilidad del extracto enzimático con actividad endoxilanasas, bajo dos temperaturas. Los datos pertenecen a la actividad relativa medida en la semana 6. Las letras indican el grupo al que pertenece cada tratamiento, organizado por la prueba post Hoc, utilizando el modelo Tukey de comparaciones múltiples, donde las barras con igual letra pertenecen al mismo subconjunto homogéneo, siendo diferentes estadísticamente entre grupos.

Para cada aditivo se realizó una prueba t student para comprar los resultados entre las temperaturas. Se obtuvo que el glicerol y el tritón X-100 no evidencian diferencias significativas al ser aplicado tanto a 4 como a -20 °C. En contraste la sacarosa, el glicerol con NaCl y el buffer citrato presentan diferencias significativas, así como el control sin aditivo (extracto enzimático).

Teniendo en cuenta esto y debido a que entre los tratamientos con mejor efecto estabilizante (glicerol y sacarosa), no existen diferencias significativas, ambos podrían evidenciar el mismo impacto sobre el extracto. Aun así, el glicerol fue seleccionado como aditivo para optimizar su concentración, por su fácil manejo en el proceso de preparación.

Evaluación del aditivo con mejor efecto estabilizante a diferentes concentraciones.

Una vez seleccionado el glicerol como el aditivo que permite mantener mayor porcentaje de actividad enzimática en el tiempo, teniendo en cuenta su practicidad de manejo, se realizó la optimización de este en presencia de sulfato de manganeso y cloruro de calcio. Estas sales han evidenciado efectos positivos sobre la estabilidad de varias enzimas,

incluyendo las endoxilanasas, así pues con el propósito de elevar la capacidad estabilizante del aditivo, se evaluaron dichas sales en combinación con el glicerol. Para esto fue realizado un diseño central compuesto (DCC), mediante el programa Design Expert 9.0.6, teniendo como factores la concentración de MnSO_4 (mM), CaCl_2 (mM) y de glicerol (% v/v), y el porcentaje de actividad relativa como variable respuesta.

Finalizado el tiempo de prueba (8 semanas), los resultados obtenidos en la semana 4, 6 y 8 ajustaron a un modelo cuadrático, siendo los valores de R^2 : 0,6653, 0,7305, 0,7130, respectivamente. Además, al realizar el ANOVA para cada modelo, se obtuvo un valor de $p < 0,0001$ en los tiempos mencionados, indicando estadísticamente la validez de cada uno. Por otro lado, los resultados de la semana 0 y 2, no se ajustaron a ningún modelo. El comportamiento de la actividad relativa con respecto a las diferentes concentraciones del aditivo y las sales, fue visualizado por la gráfica superficie respuesta construida de acuerdo al modelo obtenido para cada tiempo (Figura 4).

Según los resultados obtenidos por el análisis ANOVA, en la semana 4, la concentración del glicerol y la concentración del sulfato de manganeso afectan de manera significativa la actividad relativa de la enzima ($p < 0,0001$ y $p = 0,0028$, respectivamente). En la semana 8 se obtiene el mismo efecto del glicerol con un valor de $p < 0,0001$, aunque, el cloruro de calcio ($p = 0,0114$) se muestra como el otro factor con efecto significativo sobre la actividad relativa. Así mismo, las interacciones entre estas variables en sus respectivos tiempos, son significativas. No obstante, el factor que mayor incide sobre la variable respuesta es la concentración de glicerol, teniendo el valor F más alto para la semana 4, 6 y 8 (21,77 y 57, 71, respectivamente) (ver Anexo 2).

Adicionalmente, las ecuaciones determinadas para cada modelo, evidencian que la presencia de glicerol en combinación con las sales muestra un efecto negativo sobre la actividad relativa. Esto es posible apreciarlo en el comportamiento de las gráficas de superficie (Figura 4). Se observa que en todos los tiempos de monitoreo, el punto más alto de actividad relativa se encuentra en la mínima concentración de glicerol. Además, aunque los puntos axiales -1,5 y + 1,5 no se encuentran graficados, es importante resaltar que en el nivel -1,5 del glicerol (0,8 % v/v), evidenció el mayor porcentaje de actividad relativa en todos los tiempos monitoreados.

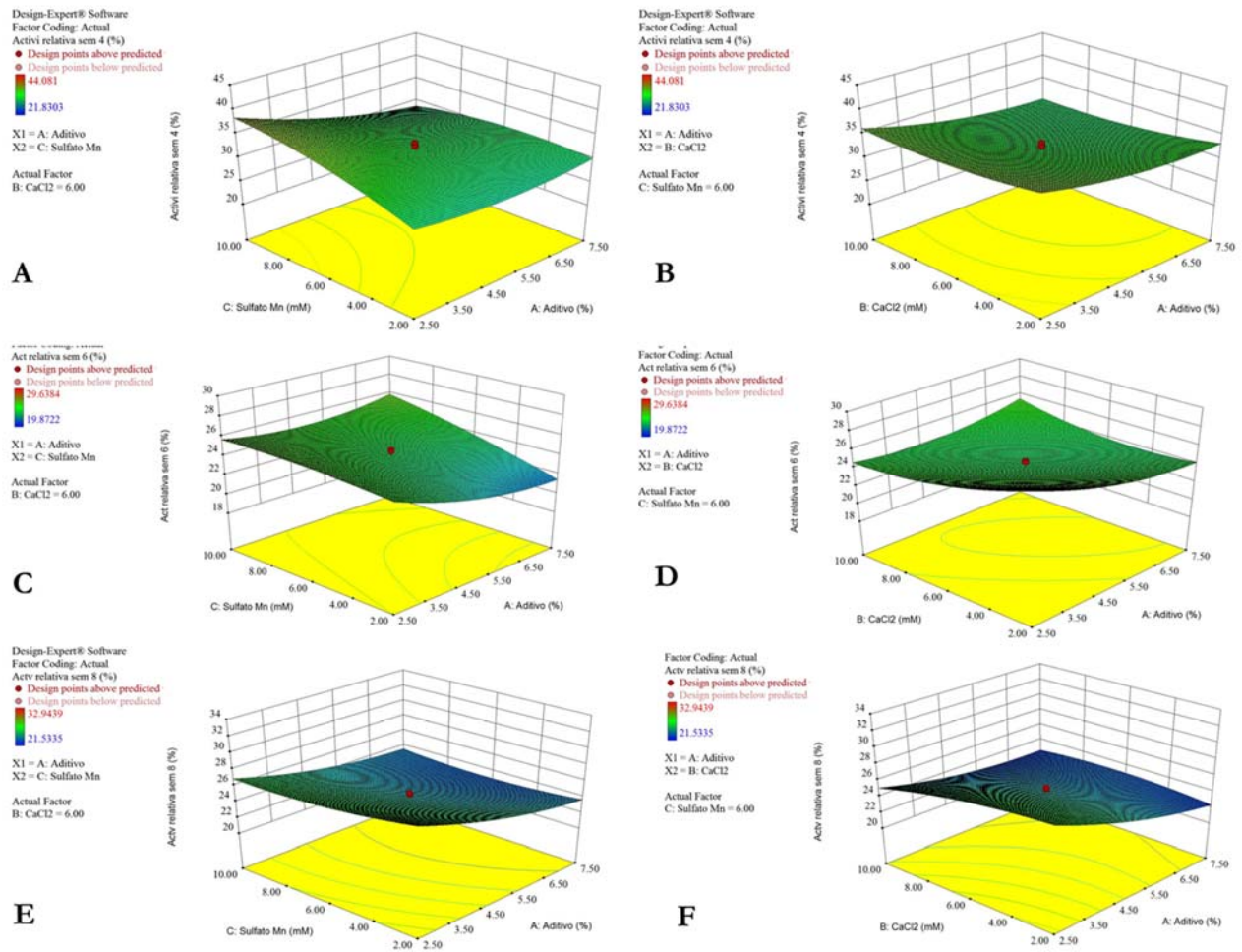


Fig. 4. Efecto de la concentración de glicerol, sulfato de manganeso y cloruro de calcio sobre la actividad relativa en diferentes tiempos. (A-B) semana 4, (C-D) semana 6, (E-F) semana 8.

6. Discusión

La estabilidad enzimática se ve influenciada por factores como temperatura y pH. Este último desempeña un papel importante en las aplicaciones industriales que presentan las endoxilasas (Collins et al. 2005). El efecto del pH sobre la estabilidad del extracto, fue evaluado en las condiciones ya mencionadas. Las enzimas producidas por *Penicillium* sp HC1, presentan un amplio rango de estabilidad de pH que va desde 3 hasta 9, donde el mínimo valor de actividad relativa es de 87 % (Figura 1). En otros estudios, se ha evidenciado estabilidad entre 4-8 durante 24 horas (Silva et al. 2015), 6-10 durante 1 hora (Maitan-Alfenas et al. 2016) y 5-8 por 3 horas (Carvalho et al. 2017) para xilasas producidas por *Trichoderma inbatum*, *Asperegillus niger* y *Trichoderma stomaticum*, respectivamente. Aunque para otros hongos como *Penicillium purpurogenum*, las xilasas

son estables dentro de un rango más reducido (4,5-5,5) por un tiempo de 24 horas (Belancic et al. 1995). Estas discordancias se atribuyen a las diferencias entre las estructuras proteicas sintetizadas por diferentes cepas. A pesar de ser una proteína con la misma actividad catalítica, existen variaciones en las secuencias de aminoácidos que conforman la enzima dando lugar a comportamientos variables frente a determinadas condiciones (Anad et al. 1990).

La reducción de la actividad enzimática a pH 3, se atribuye a la desnaturalización de la proteína o modificación de residuos de aminoácidos de los sitios activos por la concentración de hidrogeniones (Pandey & Pandey 2002). Además de esto, se aprecia que a partir del pH 5, la actividad se encuentra por encima del 100% con respecto a la inicial. Aunque la presencia de hidrogeniones o iones hidroxilo pueden alterar las cargas de los aminoácidos, los iones presentes en las soluciones amortiguadoras estarían formando puentes salinos, que dan lugar a la formación de una estructura más rígida y estable, además de actuar como posibles cofactores que podrían estar causando el aumento de la actividad enzimática por encima de la inicial (Collins et al. 2005; Spickermann et al. 2014).

Una vez establecido el pH que favorece la estabilidad de la enzima, se evaluaron los aditivos reportados en la literatura: glicerol, glicerol con NaCl, sacarosa, tritón X-100 y el mismo buffer citrato seleccionado previamente. De acuerdo con el análisis de varianza, la temperatura no presentó un efecto significativo sobre la actividad relativa. El glicerol y la sacarosa evidenciaron los mejores efectos estabilizantes al mantener la actividad del extracto durante seis semanas en un 53 y 52%, respectivamente a 4 °C (Figura 3). La efectividad del glicerol para mantener la actividad catalítica ha sido reportada para diferentes enzimas como β -manasa (Zhang et al. 2002), pirofosfatasa (Zancan & Sola-Penna 2005) y xilanasas (Singh et al. 2000), donde este aditivo ha logrado mantener, entre un 80 y 100% la actividad inicial, a diferentes temperaturas. El glicerol es un poliol que favorece las interacciones hidrofóbicas y la hidratación preferencial de las proteínas (Zhang et al. 2002). Este reordenamiento de las moléculas de agua en la superficie de la proteína genera una capa rígida a su alrededor, favoreciendo dichas interacciones en los centros catalíticos de la enzima, mejorando la estabilidad (Balcao & Vila 2015; Chong et al 2014; Costa et al. 2002).

De la misma forma, la sacarosa demostró un efecto estabilizante en los tiempos monitoreados (Figura 2). Este azúcar es frecuentemente aplicado en la conservación de anticuerpos liofilizados (Chang et al. 2005) y se ha encontrado que presenta un efecto positivo en el almacenamiento de fosforilasa (Srirangsan et al. 2011), luciferasa (Mehrabi et al. 2008), alcohol deshidrogenasa (Spickermann et al. 2014) y lactato deshidrogenasa (Kawai & Suzuki 2007), obteniendo más de un 80% de actividad relativa después de un periodo de tiempo entre 9 y 25 semanas. A este aditivo, también se le atribuye el mecanismo de hidratación preferencial para conservar la conformación nativa de las proteínas (Balcao & Vila 2015). Sin embargo, dado a las concentraciones que se deben utilizar para lograr buenos resultados, el manejo en el laboratorio se hace dispendioso, por lo que su aplicación no sería la más apropiada.

Con respecto al tritón X-100, se comprobó su efecto positivo en la estabilidad del extracto (Figura 3), y la actividad relativa presente no supera a aquellos aditivos ya mencionados. Diferentes estudios han demostrado el efecto estabilizante de este detergente, sobre diversas enzimas, tal es el caso de las lacasas (Azimi et al 2016) y amilasas (Yoon & Robit 2005; Takeda & Hizukuri 1972), las cuales han evidenciado actividades relativas del 80 y 100% respectivamente. El tritón X-100, es un surfactante no iónico que interactúa con la enzima a través de fuerzas hidrofóbicas generadas por la cadena alquilo y fuerzas electrostáticas mediadas por el grupo funcional del detergente. Las cadenas alquilo interactúan con los residuos hidrófobos de las proteínas, mientras que el grupo funcional interactúa con los residuos de aminoácidos cargados. Estas interacciones inducen cambios en la conformación de la enzima, donde el detergente forma una estructura tipo barril alrededor de la molécula, disminuyendo la entropía y por tanto fenómenos de desnaturalización que pueden llevar a la pérdida de la actividad (Azimi et al 2016; Yoon & Robit 2005).

Aún cuando el glicerol mostró un efecto estabilizante, se esperaba que la combinación con NaCl, permitiera mejorar esta capacidad, así como se ha reportado en otros estudios (Ban et al 2017; Gupta et al 2014). Sin embargo, a pesar que en las primeras semanas (Figura 2) logra mantener la actividad inicial de las enzimas por encima del 80 %, en la semana 6, no hay diferencias significativas con respecto al control bajo las dos temperaturas, en comparación con los demás aditivos (Figura 3). Esto podría ser consecuencia de la interacción de los iones de las sales a los enlaces peptídicos de la

proteína. Estos enlaces interactúan como fuerzas dipolo-dipolo; debido a la carga parcial positiva sobre el grupo amino y la carga parcial negativa en el oxígeno del grupo carbonilo. Los iones pueden unirse a dichos enlaces, desestabilizándolos y desencadenando posibles rompimientos que conllevan a la perturbación del estado nativo de la proteína y por tanto a la pérdida de su función (Chi et al 2003; Schmid 1979).

Si bien en diferente grado, todos los aditivos evaluados presentaron un efecto positivo sobre la estabilidad, el buffer citrato no mostró ningún efecto, siendo su tendencia igual a la evidenciada por el control sin aditivo (extracto enzimático) (Figura 3). Esto comprueba que el efecto estabilizante es resultado de la presencia de los aditivos evaluados y no del buffer citrato utilizado como solvente en la preparación de los mismos. En contraste con estos resultados, se ha reportado la conservación de la actividad catalítica inicial de xilanasas almacenadas a 4 °C, entre 1 y 6 meses, en presencia de buffer citrato (Shah & Madamwar 2005 ; Matsuo & Yasui, 1988; Stuttgen & Sahn, 1982). Sin embargo, la enzima utilizada en dichos estudios se encuentra purificada, lo que difiere de los tratamientos realizados en este trabajo, donde esta se utilizó en forma de extracto enzimático. Además como se mencionó anteriormente, la variación en la composición de aminoácidos entre enzimas de igual actividad catalítica, influyen directamente en la conformación de la proteína haciéndola más o menos propensa a fenómenos desnaturalización (Anad et al. 1990; Collins et al. 2005).

Como se ha visto, los aditivos presentan efecto directo en la estabilidad de la enzima durante el tiempo evaluado a las dos temperaturas. Tanto el glicerol como el tritón X-100 no evidencian diferencias significativas entre las dos temperaturas, siendo posible aplicarlos tanto a 4 como a -20 °C, ampliando las posibilidades de uso. Sin embargo, a 4 °C es rápido el proceso de análisis dado que no es necesario descongelar la muestra. Con respecto a los tratamientos en presencia de glicerol con NaCl existen diferencias significativas de acuerdo a la prueba t- student. Esto puede ser consecuencia de la presencia del NaCl que afectaría la conformación de la enzima al someterse a temperaturas de congelación.

Este mismo fenómeno podría estar sucediendo en presencia del buffer citrato. Dado que esta solución solo presenta los iones que componen el buffer es posible que al ser congelada la muestra, estos no contrarresten los efectos de la temperatura sobre la enzima, dando lugar a la pérdida de actividad. Bajo estas condiciones, las interacciones

hidrófobas de la proteína se ven alteradas y se afecta su conformación, perdiendo capacidad enzimática (Schmid 1979). Por otro lado la sacarosa también evidenció diferencias significativas entre las dos temperaturas, siendo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ menor la actividad relativa conservada con respecto a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. La formación de cristales durante la congelación podría alterar el efecto estabilizante de la sacarosa evitando mantener la conformación de la proteína y así conservar su función (Kerwin et al. 1998).

Ahora bien, una vez seleccionado el glicerol como aditivo para la optimización de su concentración, dado que permitió mantener la mayor actividad relativa durante el tiempo evaluado (Figura 2 y Figura 3) y teniendo en cuenta que el cloruro de calcio y sulfato de manganeso han presentado efectos positivos en la estabilidad de xilanasas, potenciando su actividad relativa por encima del 100 % (Knob et al. 2013; Silva et al. 2015), se realizó un diseño central compuesto teniendo como factores glicerol, cloruro de calcio y sulfato de manganeso. Para cada tiempo, excepto el inicial y la semana 2, se ajustó un modelo cuadrático (Anexo 2). En todos los tiempos hubo una influencia significativa de los tres factores sobre la actividad relativa, principalmente del glicerol. Se esperaba que en presencia de estas sales el efecto estabilizante fuera mejorado, sin embargo los resultados mostraron lo contrario. En la Figura 1 se aprecia que en la semana 6, la actividad relativa en presencia glicerol al 5% v/v es del 53 % y en la Figura 4, en presencia de las sales, a esta misma concentración, en lugar de aumentar la respuesta como se tenía previsto, disminuye hasta un 22 %. Esto indica que la presencia de iones en dicho poliol conlleva a una alteración de la enzima que puede ser dada por cambios en su conformación por los fenómenos previamente mencionados, los cuales conducen a la reducción de la actividad catalítica.

Es importante resaltar que en los estudios de Knob et al. (2013) y Silva et al. (2015), las xilanasas utilizadas han sido purificadas. Siendo así ocurre la misma situación previamente citada, donde la forma de aplicación de la enzima altera los resultados, en este caso, en el extracto podrían haber residuos de la solución de sales que componen el medio, donde el sulfato de manganeso y el cloruro de calcio hacen parte de su composición. Es posible que al adicionar estas dos como parte del proceso de estabilización de las enzimas, haya un exceso de iones disueltos que contribuyen a la reducción de la actividad enzimática. Una elevada concentración de estos compuestos puede generar alteración en la distribución de las cargas superficiales (Ban et al 2017),

cambios en los puentes de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas de ciertas zonas de la macromolécula, pero especialmente desarrollar cambios conformacionales en los sitios activos que generan el descenso de la actividad enzimática (Janati-Fard et al. 2018).

Por otro lado, vale destacar nuevamente que el tipo de aminoácidos que conforman las enzimas desempeñan un papel vital en su estabilidad (Collins et al. 2005, Lanyi et al. 1974, Madern et al. 2000). La presencia de cargas negativas, positivas y grupos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos contribuye por un lado a la formación de enlaces no covalentes que darán lugar a la estructura funcional y por otro lado, pueden interactuar con iones o macromoléculas, que dependiendo de las concentraciones, favorecen o alteran la conformación nativa de la proteína (Hoon 2012). Estos eventos son frecuentes cuando la enzima es almacenada en soluciones que no han sido previamente purificadas y por tanto se desconoce su composición.

7. Conclusiones

Las endoxilanasas producidas por *Penicillium* sp HC1 presentan un rango de estabilidad a diferentes valores de pH que abarca tanto valores ácidos como alcalinos, lo que pueden ser de interés a nivel industrial.

El glicerol y la sacarosa son aditivos que permiten prolongar la estabilidad de las endoxilanasas presentes en el extracto enzimático obtenido de *Penicillium* sp HC1, bajo condiciones de almacenamiento.

El cloruro de calcio y el sulfato de manganeso intervienen de una forma negativa en el efecto estabilizante del glicerol, impidiendo mantener la actividad enzimática del extracto durante el periodo de almacenamiento.

8. Recomendaciones

Realizar la optimización de la concentración de glicerol como aditivo en ausencia de cloruro de calcio y sulfato de manganeso con el fin de establecer si mejora la estabilidad de las endoxilanasas presentes en el extracto proveniente del cultivo de *Penicillium* sp.

Dado que cada extracto enzimático de endoxilanasas obtenido a partir del cultivo con *Penicillium* sp. puede presentar unidades iniciales enzimáticas diferentes, se recomienda evaluar si dichas unidades altas (alrededor de 100.000) puede presentar diferencias con uno de baja actividad (aproximadamente 20.000 unidades) con el aditivo y bajo las condiciones seleccionadas en este trabajo.

9. Bibliografía

- Albuquerque T, Silva I, and Ribeiro G, et al. Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: A review, *Process Biochemistry*, 49(11): 1779-1789, 2014.
- Anad L, Krishnamurthy S & Vithayathil P. Purification and properties of xylanase from the Thermophilic fungus, *Humicola lanuginosa* (Griffon and Maublanc) Bunce, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 276 (2): 546-553, 1990.
- Azimi M, Nafissi N, Mogharabi M, et al. Study of lacasse activity and stability in the presence of ionic and non-ionic surfactants and the bioconversion of indole in lacasse- TX-100 system, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 126: 69-75, 2016.
- Bailey M, Biely P, Poutanen K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity, *Journal of Biochnology* , 23:257-270, 1992.
- Balcão V & Vila M. Structural and functional stabilization of protein entities: state-of-the-art, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 93: 25-41, 2015. doi.org/10.1016/j.addr.2014.10.005
- Ban X, Dhoble A, Li C, et al. Potassium and sodium ions enhance the activity and thermostability of 1,4--glucan branching enzyme from *Geobacillus thermoglucosidasius* in the presence of glycerol, *International Journal of Biological Macromolecules*, 102: 712-717, 2017.
- Bankeeree W, Lotrakul P, Prasongsuk S, et al. Effect of polyols on thermostability of xylanase from a tropical isolate of *Aureobasidium pullulans* and its application in prebleaching of rice straw pulp, *SpringerPlus*, 3(37): 2-11, 2014.
- Beek H, Bayer N, Janssen D, et al. Lyophilization conditions for the storage of monooxygenases, *Journal of Biotechnology*, 203: 41-44, 2015.
- Bernal, M., & Gómez, L. Hidrólisis parcial de cascarilla de cebada mediante el uso del extracto enzimático producido por *Penicillium* sp. HC1 para la obtención de xilosa. Tesis de pregrado. Facultad de ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia, 2016.
- Belancic A, Scarpa J, Peirano A, et al. *Penicillium purpurogenum* produces several xylanases: Purification and properties of two of the enzymes, *Journal of Biotechnology*, 41: 71-79, 1995.
- Carvalho E, Góes L, Uetanabaro A, et al. Thermoresistant xylanases from *Trichoderma stromaticum*. Application in bread making and manufacturing xylo-oligosaccharides, *Food Chemistry*, 221: 1499-1506, 2017.
- Castronuovo G. Proteins in aqueous solutions. Calorimetric studies and thermodynamic characterization. *Thermochimica Acta*, 193: 363-390, 1991. doi.org/10.1016/0040-6031(91)80193-M
- Chang L, Shepherd D, Sun J, et al. Mechanism of protein stabilization by sugars during freezing-drying and storage : native structure preservation , specific interaction , and / or immobilization in a glassy Matrix ?, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94(7): 1427-1444, 2005.
- Chen X, Jiang Z, Chen S. Microbial and Bioconversion Production of D-xylitol and Its Detection and Application, *International Journal of Biological Sciences*, 6(7), 834-844, 2010.

- Chi E, Krishnan S, Randolph T, Carpenter J. Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation, *Pharmaceutical Research*, 20(9): 1325 - 1336, 2003.
- Chong B, Harrison M & O'Hara I. Stability of endoglucanases from mesophilic fungus and thermophilic bacterium in acidified polyols, *Enzyme and Microbial Technology*, 61-62: 55-60, 2014. doi: 10.1016/j.enzmictec.2014.04.015
- Collins T, Gerday C & Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases, *FEMS Microbiology Reviews*, 29 : 3-23, 2005.
- Correa, A. Evaluación de la producción de celulasas y xilanasas empleando *Penicillium* sp. HC1 en cultivo sumergido sobre cascarilla de cebada. Tesis de pregrado. Facultad de ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia, 2016
- Costa S, Tzanov T, Carneiro A, et al. Studies of stabilization of native catalase using additives, *Enzyme and Microbial Technology*, 30: 387–391, 2002.
- Davis B. Chemical modification of Biocatalysts, *Current opinion in Biotechnology*, 14 :379-386, 2003.
- Depaz R, Dale D, Barnett C, et al. Effects of drying methods and additives on the structure, function, and storage stability of subtilisin: role of protein conformation and molecular mobility, *Enzyme and Microbial Technology*, 31: 765-774, 2002.
- Dhiman S, Garg G, Sharma J, et al. Characterization of statistically produced xylanase for enrichment of fruit juice clarification process, *New Biotechnology*, 2(6): 746-755, 2011. doi.org/ 10.1016/j.nbt.2010.11.004.
- Fàgàin C. Review Enzyme stabilization—recent experimental progress, *Enzyme and Microbial Technology*, 33: 137–149, 2003. doi:10.1016/S0141-0229(03)00160-1
- Fernández-Lafuente R. Stabilization of multimeric enzymes: strategies to prevent subunit dissociation, *Enzyme and Microbial Technology*, 45: 405–418, 2009. doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.08.009
- Gianfreda L & Scarfi M. Enzyme stabilization: state of the art, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 100: 97-128, 1991. doi.org/10.1007/BF00234161
- Gupta G, Sahai V , Gupta R. Thermal stability and thermodynamics of xylanase from *Melanocarpus albomyces* in presence of polyols and salts, *Bio Resources*, 9(4): 5801-5816, 2014.
- Gutiérrez I, Matiz A, Aguirre M, et al. Estimación de poblaciones de microorganismos ligninolíticos y celulolíticos, y β -glucosidasa en agrosistemas de arroz. En: Uribe D, Melgarejo L (ed) Ecología de microorganismos rizosféricos asociados a cultivos de arroz de Tolima y Meta. Editorial Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia, pp 89 – 109, 2012.
- Hoon S. Analytical methods and formulation factors to enhance protein stability in solution, *Archives of Pharmacal Research*, 35 (11): 1871-1886, 2012. doi : 10.1007/s12272-012-1103-x

- Irwin D, Jung E, Wilson D. Characterization and sequence of a *Thermonospora fusca* Xylanase, *Applied and Environmental Microbiology*, 60(3): 763-770, 1994.
- Iyengar A, Tripathy R, Bajaj P, et al. Improving storage stability of recombinant organophosphorous hydrolase, *Protein Expression and Purification*, 111: 28-35, 2015.
- Iyer P & Ananthanarayan L. Enzyme stability and stabilization- Aquos and no aquos environment, *Process Biochemistry*, 43: 1019-1032, 2008.
- Janati-Fard F, Housaindokht M, Monhemi H, et al. How a multimeric macromolecule is effected by divalent salts? Experimental and simulation study, *International Journal of Biological Macromolecules*, 106: 284-292, 2018.
- Kawai K & Suzuki T. Stabilizing Effect of four types of disaccharide on the enzymatic activity of freeze-dried lactate dehydrogenase: step-by-step, *Pharmaceutical Research*, 24(10): 1883-1890, 2007. doi:10.1007/s11095-007-9312-6
- Kerwin B, Heller M, Levin S, et al. Effects of Tween 80 and sucrose on Acute short-term stability and long- term storage at -20 C of a recombinant hemoglobin, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87(9): 1-17,1998.
- Knob A, Michelz S, Fortkamp D, et al. Production, Purification, and Characterization of a Major *Penicillium glabrum* Xylanase Using Brewer's Spent Grain as Substrate, *BioMed Research International*, 2013: 1-8, 2013.
- Lanyi J. Salt-Dependent Properties of Proteins from Extremely Halophilic Bacteria, *Bacteriological Reviews*, 38 (3) : 272-290, 1974.
- Li X, Li E, Zhu Y, et al. A typical endoxylanase from *Streptomyces ramosus* L2001 and its unique characteristics in xylooligosaccharide production, *Carbohydrate Research*, 359(10):30-36, 2012.
- Li X, She Y, Sun B, et al. Purification and characterization of cellulase-free, thermostable xylanase from *Streptomyces ramosus* L2001 and its biobleaching effect on wheat straw pulp, *Biochemical Engineering Journal*, 52(1):71-78, 2010.
- Liao Y, Brown M, Nazir T, et al. Effects of sucrose and trehalose on the preservation of the native structure of Spray- dried lysozyme, *Pharmaceutical Research*, 19(12): 1847-1853, 2002.
- Madern D, Ebel C & Zacci G. Halophilic adaptation of enzymes, *Extremophiles*, 4: 91-98, 2000.
- Mandels M, Weber J, The production of cellulases, *Advances in Chemistry*, 95:391-414, 1969.
- Maitan-Alfenas G, Oliveira M, Nagem R, et al. Characterization and biotechnological application of recombinant xylanases from *Aspergillus nidulans*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 91: 60-67, 2016.
- Matsuo M & Yasui T. Xylanase of *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea*, *Methods In Enzymology*, 160: 671-674, 1988.
- Mehrabi M, Hosseinkhani S & Ghobadi S. Stabilization of firefly luciferase against thermal stress by osmolytes, *International Journal of Biological Macromolecules*, 43: 187-191, 2008.

- Miller G .Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3):426-428, 1959. doi: 10.1021/ac60147a030
- Murphy K, Bhakuni V, Xie D, Freire E. Molecular basis of cooperativity in protein folding. III. Structural identification of cooperative folding units and folding intermediates, *Journal of Molecular Biology*, 227: 293–306, 1992. doi.org/10.1016/0022-2836(92)90699-K
- Nagar S, Mittal A, Kumar D, et al. Immobilization of xylanase on glutaraldehyde activated aluminium oxide pellets for increasing digestibility of poultry feed, *Process Biochemistry*, 47(9): 1402-1410, 2012.
- Nicanuzia J, Aparecida J, Pastore G. Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity, *Brazilian Journal of Microbiology*, 37: 505-509, 2006.
- Paës G, Berrin J, Beaugrand J. GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications, *Biotechnology Advances*, 30: 564-592, 2012. doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.10.003
- Pandey P & Pandey A. Production of cellulase-free thermostable xylanases by an isolated strain of *Aspergillus niger* PPI, utilizing various lignocellulosic wastes, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 18: 281–283, 2002.
- Schmid R. Stabilized soluble enzymes. In: *Advances in Biomedical Engineering. Advances in Biochemical Engineering*, 12th. Springer, Berlin, Heidelberg; 1979. doi.org/10.1007/3540092625_7
- Shah A & Madamwar D. Xylanase production by a new isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization, *Process Biochemistry*, 40: 1763-1771, 2005.
- Silva L , Fanchini C & Cano E. Purification and characterization of xylanases from *Trichoderma inhamatum*, *Electronic Journal of Biotechnology*, 18: 307–313, 2015. doi: 10.1016/j.ejbt.2015.06.001
- Silvério da Silva S & Kumar Chandel A. D-Xylitol: Fermentative Production, Application and Commercialization, 2012.
- Singh S, Pillay B , Prior B. Thermal stability of Beta-xylanases produced by different *Thermomyces lanuginosus* strains, *Enzyme and Microbial Technology*, 26: 502-508, 2000.
- Solorzano J, Bon E, Ebole M, et al. Thermal stability of xylanases produced by *Aspergillus awamori*, *Brazilian Journal of Microbiology*, 31: 206-211, 2000.
- Spickermann D, Kara S, Barackov I, et al. Alcohol dehydrogenase stabilization by additives under industrially relevant reaction conditions, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 103:24-28, 2014. doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.11.015
- Srirangsan, P, Kawai K, Hamada N, et al. Stabilizing effects of sucrose - polymer formulations on the activities of freeze-dried enzyme mixtures of alkaline phosphatase, nucleoside phosphorylase and xanthine oxidase, *Food Chemistry*, 125: 1188-1193, 2011.

Stuttgen E & Sahm H. Purification and Properties of Endo-1,4-fl-Xylanase from *Trichosporon cutaneum*, *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 15: 93-99, 1982.

Takeda Y & Hizukuri S. Effect of Triton X-100 on sweet potato β -Amylase, *Biochimica et Biophysica Acta*, 268: 175-183, 1972.

Wu H, Cheng X, Zhu Y, et al. Purification and characterization of a cellulase-free, thermostable endo-xylanase from *Streptomyces griseorubens* LH-3 and its use in biobleaching on eucalyptus kraft pulp, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2(2): 1-7, 2017.

Yoon H. & Robyt J. Activation and stabilization of 10 starch - degrading enzymes by Triton X-100, polyethylene glycols and polyvinyl alcohols, *Enzyme and Microbial Technology*, 37: 556-562, 2005.

Zancan P & Sola-Penna M. Trehalose and glycerol stabilize and renature yeast inorganic Pyrophosphatase inactivated by very high temperatures, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444: 52-60, 2005.

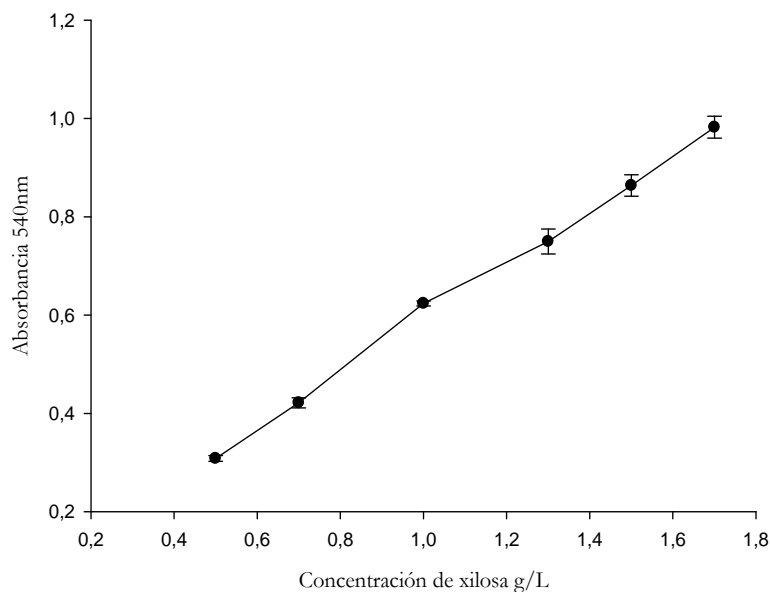
Zhang J, He M, He Z. Operational and storage stability of neutral β -mannanase from *Bacillus licheniformis*, *Biotechnology Letters*, 24: 1611-1613, 2002.

10. Anexos

10.1. Anexo 1. Curva patrón de xilosa con DNS

Esta curva se usó para la cuantificación de actividad enzimática de endoxilasas

$$y = 0,554x + 0,0396 \quad R^2 = 0,9965$$



10.2. Anexo 2. Análisis estadístico ANOVA para los modelos cuadráticos

Response 2 Activi relativa sem 4

ANOVA for Response Surface Quadratic model

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value
Model	840.16	9	93.35	8.17	< 0.0001 significant
A-Aditivo	248.63	1	248.63	21.77	< 0.0001
B-CaCl2	40.65	1	40.65	3.56	0.0671
C-Sulfato Mn	116.86	1	116.86	10.23	0.0028
AB	3.51	1	3.51	0.31	0.5825
AC	130.86	1	130.86	11.46	0.0017
BC	83.32	1	83.32	7.30	0.0104
A^2	46.80	1	46.80	4.10	0.0502
B^2	29.22	1	29.22	2.56	0.1182
C^2	44.71	1	44.71	3.91	0.0553
Residual	422.59	37	11.42		
Lack of Fit	208.34	5	41.67	6.22	0.0004 significant
Pure Error	214.25	32	6.70		
Cor Total	1262.75	46			

Response 4 Act relativa sem 6

ANOVA for Response Surface Quadratic model

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value	Prob > F
Model	248.68	9	27.63	11.14	< 0.0001	significant
A-Aditivo	28.95	1	28.95	11.67	0.0016	
B-CaCl2	15.68	1	15.68	6.32	0.0164	
C-Sulfato Mn	66.76	1	66.76	26.92	< 0.0001	
AB	38.20	1	38.20	15.40	0.0004	
AC	20.09	1	20.09	8.10	0.0072	
BC	25.94	1	25.94	10.46	0.0026	
A^2	19.82	1	19.82	7.99	0.0075	
B^2	19.76	1	19.76	7.97	0.0076	
C^2	1.93	1	1.93	0.78	0.3828	
Residual	91.75	37	2.48			
Lack of Fit	69.28	5	13.86	19.73	< 0.0001	significant
Pure Error	22.47	32	0.70			
Cor Total	340.43	46				

Response 3 Actv relativa sem 8

ANOVA for Response Surface Quadratic model

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value	Prob > F
Model	295.84	9	32.87	10.21	< 0.0001	significant
A-Aditivo	185.74	1	185.74	57.71	< 0.0001	
B-CaCl2	22.85	1	22.85	7.10	0.0114	
C-Sulfato Mn	10.66	1	10.66	3.31	0.0769	
AB	17.68	1	17.68	5.49	0.0246	
AC	4.37	1	4.37	1.36	0.2513	
BC	3.49	1	3.49	1.08	0.3047	
A^2	13.57	1	13.57	4.22	0.0471	
B^2	8.16	1	8.16	2.54	0.1198	
C^2	8.34	1	8.34	2.59	0.1159	
Residual	119.09	37	3.22			
Lack of Fit	98.53	5	19.71	30.67	< 0.0001	significant
Pure Error	20.56	32	0.64			
Cor Total	414.93	46				