

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

**DESARROLLO DE HERRAMIENTAS
MOLECULARES
PARA ESTRATEGIAS DE BIOREFINERÍA:
Obtención, purificación y caracterización
funcional de enzimas recombinantes para la
degradación de lignocelulosa**

Lic. Alem Storani

Director de Tesis: Dr. Alberto A. Iglesias

Co-Director de Tesis: Dr. Sergio A. Guerrero

Lugar de realización: Laboratorio de Enzimología Molecular- Instituto de
Agrobiotecnología del Litoral - Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas-
Universidad Nacional del Litoral

-2022-

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a las instituciones que hicieron posible el desarrollo de este trabajo de Tesis. A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral y al Instituto de Agrobiotecnología del Litoral por darme el espacio. Agradezco a CONICET por la beca doctoral otorgada que me permitió realizar este trabajo de Tesis.

Quiero agradecer al Dr. Alberto A. Iglesias por dirigir este trabajo y permitirme ser parte de su grupo en el Laboratorio de Enzimología Molecular, por la confianza puesta en mí para llevar a cabo este proyecto, y por los comentarios y sugerencias que me ayudaron al desarrollo personal y profesional durante estos años.

A mí co-director, el Dr. Sergio A. Guerrero por confiar en mí y dirigir este trabajo. Por todos sus aportes, experticias y consejos que han impulsado el desarrollo de este trabajo de Tesis.

A los diferentes integrantes de los laboratorios del Instituto de Agrobiotecnología del Litoral por sus aportes, predisposición y equipamiento compartido que permitieron el desarrollo de este trabajo. Particularmente quiero agradecer a la Directora del IAL, Dra. Raquel L. Chan por su amabilidad y predisposición, como así también a Emilio por estar siempre disponible y ayudar a solucionar los problemas con diversos trámites.

A los compañeros del laboratorio, por las tantas horas compartidas y estar siempre presentes para los momentos serios de discusión de resultados y cuando las infinidad de veces las cosas no funcionan para dar sus aportes y posibles soluciones, como también los momentos de distensión extra-laboratorio compartidos.

Gracias a Ana, por estar siempre dispuesta a escuchar, y se preocuparse por el bienestar de todos. Por las largas anécdotas compartidas de la vida en los pueblos, y por supuesto por deleitarnos con sus habilidades culinarias. Su torta de bollos merece una Tesis aparte.

A Diego, por las sugerencias, consejos y ayudas recibidas a lo largo de estos años, como así también todos los “datos de interés” que aportan a nuestra cultura general. Y por inculcarnos a todos el orden y limpieza en el laboratorio y tu toc por alinear todo que nos deleita todos los días.

A Mati que paso de jurado de Tesina a compañero y amigo, por tu gran personalidad y todas las sugerencias, ayudas y consejos personales y profesionales que me brindaste durante estos años.

A Carlos y Matías por su colaboración y sugerencias para el desarrollo de mi trabajo y formación.

A los que estuvieron en los inicios de esta Tesis pero que hoy no se encuentran en el lab Robert, Nati, Anto, Ceci, Danisa, y Romina. A Robert por ser un gran compañero, tenerme paciencia y ayudarme con todo en mis comienzos en el laboratorio. Nati, gran compañera de laboratorio y amiga, por tantos momentos y vueltas a la city compartidas y tu infinidad de frases célebres que aún hoy seguimos recordando y riéndonos como el primer día!! A Danisa, Ceci y Anto agradecerles por su carisma y buena onda desde el primer día, además encargarse de mantener todo y a todos en orden en el laboratorio y organizarnos cada juntada al detalle. A Romi por ser una gran compañera, vecina y amiga, ni hablar por tus enseñanzas en programación de los que tanto aprendí (Ctrl+GRRRRRR).

A los que me acompañaron en el día a día en el laboratorio hasta hoy: Bruno, Rodri, Nadia, Franco, Tomas, Vicky, Paula y Mariana por ser excelentes compañeros de laboratorio, compartir alegrías, tristezas y tantas anécdotas y vivencias dentro y fuera del laboratorio, y por hacer que todos los días sean más divertidos.

Por último, agradecer a mi familia por todo el apoyo y acompañamiento brindado todos estos años.

GRACIAS!!

APORTES CIENTÍFICOS Y TECNOLÓGICOS

Parte de los resultados de esta Tesis fueron publicados en:

- On the functionality of the N-terminal domain in xylanase 10A from *Ruminococcus albus* 8. Alem Storani, Sergio A. Guerrero, Alberto A. Iglesias. *Enzyme and Microbial Technology* -Volume 142-December 2020-Article Number 109673

ÍNDICE

4.	ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	9
5.	RESUMEN.....	12
6.	ABSTRACT	14
7.	INTRODUCCIÓN	16
7.1.	Biorefinerías	16
7.2.	Biomasa lignocelulósica.....	17
7.3.	Enzimas lignocelulolíticas.....	20
7.4.	Dominios de unión a carbohidratos (CBM)	23
7.5.	Organización de las enzimas lignocelulolíticas.....	24
7.6.	Sinergia	24
7.7.	Síntesis enzimática de polisacáridos	25
7.8.	Microorganismos con riqueza de CAZy	27
7.8.1.	<i>Ruminococcus albus</i>	28
8.	OBJETIVOS	31
8.1.	Objetivos generales	31
8.1.1.	Objetivos específicos.....	31
9.	MATERIALES Y MÉTODOS	32
9.1.	Microorganismos, plásmidos, medios de cultivos y antibióticos	32
9.1.1.	Cepas bacterianas utilizadas.....	32
9.1.2.	Medios de cultivo	33
9.1.3.	Plásmidos	33
9.1.4.	Antibióticos	34
9.2.	Oligonucleótidos utilizados.....	34
9.3.	Métodos generales de biología molecular	35
9.3.1.	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	35
9.3.2.	Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa	35
9.3.3.	Tratamiento con <i>Taq</i> ADN polimerasa	35
9.3.4.	Clonado de los genes amplificados por PCR	35

9.3.5.	Ligación.....	36
9.3.6.	Transformación de bacterias competentes	36
9.3.7.	Minipreparación de ADN plasmídico	36
9.3.8.	Secuenciación de ADN	37
9.3.9.	Digestión de ADN con enzimas de restricción.....	37
9.3.10.	Precipitación de ADN	37
9.3.11.	Electroforesis de ADN en geles de agarosa	37
9.3.12.	Creación de banco de células	38
9.3.13.	Optimización de condiciones de expresión	38
9.3.14.	Expresión de las proteínas recombinantes.....	38
9.3.15.	Purificación de las proteínas recombinantes	38
9.4.	Métodos bioquímicos básicos	39
9.4.1.	Cuantificación de proteínas	39
9.4.2.	Desalado y concentración de proteínas	39
9.4.3.	Electroforesis en gel de poliacrilamida	39
9.4.4.	Cromatografía de exclusión molecular: Determinación de masa molecular	40
9.4.5.	Ensayos de oxidación y reducción	40
9.4.6.	Determinación del potencial medio de reducción	41
9.5.	Metodología de análisis enzimático	41
9.5.1.	Sustratos	41
9.5.2.	Actividad celulasa	42
9.5.3.	Actividad xilanasa	42
9.5.4.	Actividad fosforilasa	43
9.5.5.	Determinación de parámetros cinéticos	43
9.5.6.	Determinación de procesividad de celulasas.....	44
9.5.7.	Determinación de condiciones óptimas y estabilidad al pH y la temperatura.....	44
9.6.	Capacidad de unión a sustratos insolubles	45
9.6.1.	Determinación de los parámetros de adsorción.....	45
9.7.	Cromatografía en capa delgada (TLC).....	46

9.8.	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	46
9.9.	Cuantificación de celo-oligosacáridos insolubles	46
9.10.	Alineamientos múltiples de secuencias	47
9.11.	Modelado molecular	47
9.12.	Ensayo de corrimiento de estabilidad térmica	47
9.13.	Diseños experimentales de superficie respuesta	48
10.	RESULTADOS	50
10.1.	Caracterización de celulasas de <i>R. albus</i> 8	51
10.1.1.	Análisis de secuencias de amino ácidos y construcción de modelos 3D	51
10.1.2.	Clonado y expresión recombinante	55
10.1.3.	Determinación de las condiciones de temperatura y pH óptimos	56
10.1.4.	Determinación de actividad enzimática y parámetros cinéticos	58
10.1.5.	Análisis de los productos de degradación	60
10.1.6.	Capacidad de adsorción a sustratos celulósicos	61
10.1.7.	Actividad sinérgica entre celulasas	63
10.2.	Caracterización de hemicelulasas de <i>R. albus</i> 8	65
10.2.1.	Análisis de secuencia aminoacídica	65
10.2.2.	Clonado, construcción de variantes y expresión recombinante	65
10.2.3.	Determinación de condiciones óptimas de pH y temperatura	67
10.2.4.	Determinación de actividad enzimática y parámetros cinéticos	68
10.2.5.	Ensayos de unión a sustratos celulósicos	69
10.2.6.	Modelo tridimensional	70
10.2.7.	Modificación redox de <i>RalXyn10A</i>	73
10.2.8.	Construcción de mutantes	73
10.2.9.	Análisis de estructura-función del dominio N34	76
10.3.	Caracterización de glicosil fosforilasas de <i>R. albus</i> 8	78
10.3.1.	Análisis de secuencias y construcción de variantes	78
10.3.2.	Producción recombinante de <i>RalCBP</i> , <i>RalCDP</i> y construcción de variantes	80
10.3.3.	Modelado molecular y comparación de estructuras	82

10.3.4.	Propiedades fisicoquímicas de las enzimas	84
10.3.5.	Caracterización de propiedades bioquímicas	85
10.3.6.	Ensayos de corrimiento de estabilidad térmica	90
10.3.7.	Capacidad de unión a polisacáridos	92
10.4.	Uso de enzimas como herramientas para la degradación de material lignocelulósico y la síntesis de celo-oligosacáridos	93
10.4.1.	Actividad sinérgica celulasas-hemicelulasas sobre un sustrato lignocelulósico .	93
10.4.2.	Uso de las variantes de CDP como herramientas en la síntesis de celo-oligosacáridos y la generación de azúcares-1P	96
11.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	100
12.	CONCLUSIONES	111
13.	BIBLIOGRAFÍA.....	113

4. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

×g	fuerza centrífuga relativa
°C	grados Celsius
2ME	β-mercaptoetanol
4MGlcX	4-O-metil-D-glucurono-xilano
AX	arabinoxilano
BG	β-glucosidasa
BSA	albúmina sérica bovina
BX	xilano de <i>Beachwood</i>
C2	celobiosa
C3	celotriosa
C4	celotetraosa
C5	celopentaosa
CAZy	enzima activa sobre carbohidratos
CBH	celobiohidrolasa/exoglucanasa
CBP	celobiosa fosforilasa
CBM	módulo de unión a carbohidratos
CDP	celodextrina fosforilasa
CMC	carboximetil celulosa
CO ₂	dióxido de carbono
COS	celo-oligosacáridos
Cys	cisteína
DMSO	dimetilsulfóxido
DTT	ditiotreitól
DO	densidad óptica

E_{ads}	enzima adsorbida
E_m	potencial medio de reducción
EG	endoglucanasa
E_{Max}	capacidad máxima de adsorción
GH	glicosil hidrolasa
Glc	glucosa
Glc-1P	α -glucosa-1-fosfato
GlcN-1P	α -glucosamina-1-fosfato
GlcNAc-1P	α -N-acetilglucosamina-1-fosfato
GP	glicosil fosforilasa
GS	grado de sinergismo
GSSG	glutación disulfuro
H_2O_2	peróxido de hidrógeno
H_2Od	agua destilada
$H_2OmiliQ$	agua desionizada
HEDS	disulfuro de hidroxietilo
IMAC	cromatografía de afinidad por metal inmovilizado
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
K_{av}	coeficiente de partición
k_{cat}	constante catalítica
kDa	kiloDalton
K_d	constante de disociación
K_M	constante de Michaelis-Menten
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LBP	laminaribiosa fosforilasa
LPMO	monooxigenasas líticas de polisacáridos

MMM	marcador masa molecular
MOPS	ácido 3-[N-morfolino] propano sulfónico
NDOs	oligosacáridos no digeribles
p/v	peso en volumen
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PASC	<i>Phosphoric Acid Swollen Cellulose</i>
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDB	código de <i>Protein Data Bank</i>
Pi	ortofosfato inorgánico
SDS	dodecil sulfato de sodio
TAE	solución Tris-acético-EDTA
TB	<i>Terrific Broth</i>
U	unidades internacionales de actividad enzimática
v/v	volumen en volumen
V _{max}	velocidad máxima

5. RESUMEN

La biorrefinería surge como una alternativa ecológica y sustentable a los procesos petroquímicos tradicionales para la producción de biocombustibles y bioproductos a partir de materias primas de origen biológico y con características de biodegradabilidad. La biomasa lignocelulósica representa una excelente fuente para estos procesos, pero sus características estructurales hacen que sea recalcitrante a la degradación hasta azúcares simples. Sin embargo, diversos microorganismos son capaces de llevar a cabo este proceso a partir de la producción de una amplia gama de enzimas con actividad complementaria.

En este trabajo de Tesis se llevó a cabo la caracterización bioquímica y estructural de enzimas involucradas en la descomposición y metabolismo de la lignocelulosa pertenecientes a *Ruminococcus albus* 8, uno de los microorganismos ruminales con mayor capacidad de degradación. Específicamente, se abordó el análisis de glicosil hidrolasas de diferentes familias como la endoglucanasa GH5 (*RalCel5G*), la celobiohidrolasa GH48 (*RalCel48A*), una xilanasa GH10 (*RalXyn10A*) y dos glicosil fosforilasas de la familia GH94 (*RalCBP* y *RalCDP*). Esta información es sumamente valiosa para el desarrollo de diversas aplicaciones biotecnológicas tales como la producción de biocombustibles, biopolímeros y/u otros materiales.

Particularmente, *RalCel5G* posee de un dominio catalítico de la familia GH5 seguido de dos dominios de unión a carbohidratos de la familia 37 (CBM37) con una baja similitud de secuencia entre sí. De la misma manera, la secuencia de *RalCel48A* presentó un dominio de la familia GH48 seguido de un CBM37, en este caso con elevada similitud con sólo uno de los CBMs de *RalCel5G*. El mayor número de CBM presentes en *RalCel5G* y las variaciones en las secuencias aminoacídicas de los mismos se correspondieron con una mayor capacidad de adsorción a sustratos insolubles y de reconocimiento de diferentes sustratos. La caracterización cinética de estas enzimas con sustratos celulósicos de diferente grado de compactación y el análisis de sus productos de reacción confirmó que *RalCel5G* es una endoglucanasa procesiva y *RalCel48A* una celobiohidrolasa. El uso de combinaciones de estas enzimas en ensayos de degradación de celulosa reveló que la acción simultánea de las mismas tiene un efecto sinérgico en su actividad, siendo máximo a bajas proporciones de *RalCel5G* respecto de *RalCel48A* (1:4), acorde con la comprensión convencional de la sinergia endo-exo.

Por otro lado, analizando la secuencia de aminoácidos de la xilanasa *RalXyn10A* se identificó un dominio de 34 aminoácidos en el extremo N-terminal del dominio catalítico. La caracterización de la enzima trunca en este dominio (*RalΔN34Xyn10A*) mostró una disminución del 50% en la actividad enzimática y una reducción en la capacidad de unión a los polisacáridos

insolubles, lo que sugiere que este dominio presentaría una función similar a un CBM. La actividad de *RalXyn10A* se vio disminuida por agentes reductores y pudo ser recuperada por agentes oxidantes, característica ausente en *RalΔN34Xyn10A*. La generación de un modelo 3D y la construcción de mutantes puntuales en residuos de cisteína a partir del mismo, permitieron identificar que la cisteína presente en el dominio N-terminal participa de la modulación redox de la actividad. Otra de las mutantes en cisteína generadas, exhibió insensibilidad a los agentes reductores y oxidantes e incluso presentó un incremento en su actividad enzimática. La aplicación de esta hemicelulasa en combinación con las celulasas *RalCel5G* y *RalCel48A* mostró un incremento sustancial en la capacidad de hidrólisis de sustratos lignocelulósicos complejos respecto a la utilización únicamente de celulasas. Se determinó que este efecto se debe a la acción sinérgica entre *RalXyn10A* y *RalCel5G*, lo que sugiere un mecanismo sinérgico entre endoglucanasas y xilanasas.

Dentro de las dos glicosil fosforilasas de la familia GH94 identificadas en *R. albus*, *RalCBP* presentó una elevada similitud de secuencia con otras CBPs; mientras que *RalCDP* mostró diferencias estructurales respecto a otros miembros de la familia GH94. Ambas proteínas presentaron un elevado nivel de conservación en su extremo N-terminal, el cual, a partir del análisis de los modelos 3D y de la construcción de la mutante trunca (*RalΔN63CDP*), se confirmó que está involucrado en la conformación de la estructura cuaternaria de estas proteínas. La caracterización cinética determinó que *RalCBP* presenta una elevada eficiencia catalítica para la síntesis y la fosforólisis de la celobiosa. En cambio, la actividad de *RalCDP* incrementa conforme se aumenta el grado de polimerización del sustrato utilizado, incluso con polisacáridos de cadena larga. A diferencia de estas, *RalΔN63CDP* mostró la mayor eficiencia catalítica en la síntesis de celotriosa, mientras que su capacidad de fosforólisis disminuyó considerablemente debido a una marcada reducción en la afinidad por el Pi. Además, se construyó la proteína quimérica *RalCDP-CBM37* con el objetivo de incrementar su actividad sobre polisacáridos de cadena larga. La fusión del CBM37 a *RalCDP* incrementó la capacidad de unión de la enzima a polisacáridos celulósicos insolubles. Esto derivó en un incremento de la capacidad catalítica sobre estos sustratos, principalmente en la fosforólisis. Finalmente, se comparó la capacidad de síntesis de oligosacáridos de cadena corta por la mutante *RalΔN63CDP* y *RalCDP*. El análisis de los productos de reacción reveló una acumulación de celotetraosa en las reacciones catalizadas por la mutante; mientras que para *RalCDP* se observó una distribución de los productos de reacción entre celotriosa, celotetraosa y oligosacáridos de mayor tamaño, aunque en menores proporciones.

Los avances logrados en el conocimiento de estas enzimas a nivel molecular y sobre los mecanismos de acción e interacciones con los diferentes sustratos, facilitan futuros enfoques para el diseño de mejoras en la funcionalidad y la versatilidad de estas enzimas como biocatalizadores para la degradación de la biomasa lignocelulósica y/o la biosíntesis de biopolisacáridos.

6. ABSTRACT

Biorefinery emerges as an ecological and sustainable alternative to traditional petrochemical processes for producing biofuels and bioproducts from raw materials of biological origin and with biodegradability characteristics. Lignocellulosic biomass represents an excellent source for these processes, but its structural characteristics make it recalcitrant to degradation to simple sugars. However, various microorganisms are capable of carrying out this process by producing a wide range of enzymes with complementary activity.

In this thesis work, we performed the biochemical and structural characterization of enzymes involved in the decomposition and metabolism of lignocellulose belonging to *Ruminococcus albus* 8, one of the rumen microorganisms with the highest degradation capacity. Specifically, the analysis of glycosyl hydrolases from different families such as endoglucanase GH5 (*RalCel5G*), cellobiohydrolase GH48 (*RalCel48A*), xylanase GH10 (*RalXyn10A*) and two glycosyl phosphorylases from the GH94 family (*RalCBP* and *RalCDP*). This information is extremely valuable for developing biotechnological applications such as the production of biofuels, biopolymers, and/or other materials.

Particularly, *RalCel5G* has a catalytic domain from the GH5 family followed by two carbohydrate binding domains from family 37 (CBM37) with low sequence similarity to each other. In the same way, the *RalCel48A* sequence presented a CBM37 domain, in this case with high similarity with only one of the CBMs from *RalCel5G*. The greatest number of CBM present in *RalCel5G* and the variations in their amino acid sequences correspond with a higher adsorption capacity to insoluble substrates and recognition of diverse substrates. The kinetic characterization of these enzymes with cellulosic substrates with different compaction degrees and the analysis of their reaction products confirmed that *RalCel5G* is a processive endoglucanase and *RalCel48A* is a cellobiohydrolase. The use of combinations of these enzymes in cellulose degradation assays revealed that their simultaneous action has a synergistic effect on their activity, being maximum at low proportions of *RalCel5G* concerning *RalCel48A* (1:4), consistent with the conventional understanding of endo-exo synergy.

On the other hand, analyzing the amino acid sequence of the *RalXyn10A* xylanase, we identified a 34 amino acid domain at the N-terminal end of the catalytic domain. The characterization of the truncated enzyme (*RalΔN34Xyn10A*) showed a 50 % decrease in enzyme activity and a reduction in the binding capacity to insoluble polysaccharides, suggesting that this domain performs a CBM-like function. *RalXyn10A* activity was decreased by reducing agents and could be recovered by oxidizing agents, a feature absent in *RalΔN34Xyn10A*. The generation

of a 3D model and the construction of mutants in cysteine residues allowed us to identify that the cysteine present in the N-terminal domain participates in the redox modulation of the enzyme activity. Another cysteine mutant exhibited insensitivity to reducing and oxidizing agents and even presented an increase in its enzymatic activity. Applying this hemicellulase in combination with the cellulases *RalCel5G* and *RalCel48A* showed a substantial increase in the hydrolytic capacity of complex lignocellulosic substrates to use cellulases alone. It was determined that this effect is due to the synergistic action between *RalXyn10A* and *RalCel5G*, which suggests a synergistic mechanism between endoglucanases and xylanases.

Within the two glycosyl phosphorylases of the GH94 family identified in the *R. albus* proteome, *RalCBP* presented a high sequence similarity with previously characterized CBPs; while *RalCDP* showed structural differences for other members of the GH94 family. Both proteins presented a high level of conservation at their N-terminus. The analysis of the 3D models and the construction of the truncated mutant (*RalΔN63CDP*) confirmed that this domain is involved in the conformation of the quaternary structure of these proteins. The kinetic characterization determined that *RalCBP* has a high catalytic efficiency for the synthesis and the phosphorolysis of cellobiose. Instead, the activity of *RalCDP* increases as the polymerization degree of the substrate increases, even with long-chain polysaccharides. Unlike these, *RalΔN63CDP* showed the highest catalytic efficiency for cellotriose synthesis, while its phosphorolytic capacity was greatly reduced due to a marked reduction in Pi affinity. In addition, the chimeric protein *RalCDP-CBM37* was constructed with the aim of increasing its activity on long-chain polysaccharides. The fusion of CBM37 to *RalCDP* increased the binding capacity of the enzyme to insoluble cellulosic polysaccharides. This led to an increase in the catalytic ability of these substrates, mainly in phosphorolysis capacity. Finally, the ability to synthesize short-chain oligosaccharides by *RalΔN63CDP* and *RalCDP* was compared. Analysis of the reaction products revealed an accumulation of cellotetraose in the reactions catalyzed by the mutant; while for *RalCDP*, a distribution of the reaction products between cellotriose, cellotetraose, and larger oligosaccharides was demonstrated, although in smaller proportions.

The advances achieved in the knowledge of these enzymes at the molecular level and on the mechanisms of action and interactions with the different substrates, facilitate future approaches for the design of improvements in the functionality and versatility of these enzymes as biocatalysts for biomass degradation, lignocellulosic and/or biosynthesis of biopolysaccharides.

7. INTRODUCCIÓN

7.1. Biorefinerías

La química orgánica experimentó grandes desarrollos a lo largo de los siglos XIX y XX, principalmente en las áreas de la química sintética y petroquímica, las cuales modificaron marcadamente los procesos de fabricación tras la revolución industrial (1). Esto consolidó un medio para la producción de muchos materiales y compuestos que proporcionan la mayoría de los bienes y servicios de alto nivel tecnológico en la sociedad humana moderna. Sin embargo, estos materiales, producidos a partir de la refinería del petróleo, y que son ampliamente utilizados en la sociedad actual (plásticos y derivados) son muy resistentes a la degradación, lo que conlleva un inconveniente crucial por la falta de sustentabilidad y cuidado con la conservación del medio ambiente de estos procesos y materiales (2,3). Además de esto, la creciente demanda de energía y su fuerte dependencia con los combustibles fósiles ha derivado en una gran disminución en las reservas de petróleo, sumado a que el uso masivo de estas fuentes fósiles de carbono condujo a un incremento en la concentración de gases que provocan el efecto invernadero y el consiguiente cambio climático (4). El resultado es un escenario que es insostenible y que requiere una reconversión de los procesos industriales, especialmente los relacionados con los procedimientos para satisfacer las demandas de combustibles, polímeros y una variedad de materiales derivados del petróleo requeridos por la creciente población mundial (4,5).

Los nuevos procedimientos requieren utilizar un elevado componente “bio”, mediante la utilización de materias primas renovables, metodologías de bajo impacto ambiental (que incluyan el reciclado de subproductos) y la generación de materiales biodegradables y poco contaminantes del medio (4–6). En este contexto, la biomasa emerge como una alternativa de energía renovable, fundamental para satisfacer las necesidades actuales y futuras de la humanidad. La Agencia Internacional de Energía (*Bioenergy Task 42*) propone el concepto de biorefinerías, con el objetivo de maximizar la utilización de la biomasa y minimizar los desechos y las emisiones asociadas con la generación de productos bioenergéticos (7,8). Esta última definición introduce el concepto de sustentabilidad ecológica, ya que implica no sólo la utilización de materias primas renovables (principalmente biomasa), sino que las mismas materias deben, a su vez, ser procesadas empleando procesos y productos ecológicamente sustentables. El concepto de biorefinería implica una amplia gama de tecnologías capaces de separar a la biomasa en sus constituyentes estructurales, para luego convertirlos en productos de alto valor agregado (químicos/materiales) y energía (biocombustibles, calor, etc.) (7). Así mismo, atendiendo al origen de la materia prima utilizada, es posible clasificar a estos procesos como biorefinerías de primera, segunda y tercera generación (9).

Las biorefinerías de primera generación son las que utilizan como materia prima almidón y aceites vegetales de fuentes como la caña de azúcar, el maíz, el trigo, la cebada, el sorgo, el girasol y la soja, entre otras (10). La principal ventaja de los biocombustibles de primera generación es su fácil producción debido al alto contenido de azúcares y aceites de sus materias primas. Sin embargo, estos insumos biológicos también constituyen la base de la alimentación humana y animal, por lo que su utilización con fines energéticos provoca una competencia con proveer a necesidades críticas de la población, generando problemas éticos, políticos y ambientales por la utilización de estos recursos (7,11).

En cambio, las biorefinerías de segunda generación utilizan como materia prima a la biomasa lignocelulósica, obtenida como subproducto de la actividad agrícola, residuos forestales o directamente de vegetales no alimenticios (12,13). El abundante suministro, su amplia distribución geográfica y las características sustentables del material lignocelulósico lo convierten en la materia prima más atractiva para los procesos de biorrefinería, ya que, además de contribuir en aliviar la actual crisis de recursos, la producción de biocombustibles y productos químicos derivados de la lignocelulosa es beneficiosa para la mitigación de los gases de efecto invernadero (14). Además, en términos de uso de tierras agrícolas y protección del medio ambiente, los biocombustibles de segunda generación resultan más ventajosos que los de primera generación (15).

7.2. Biomasa lignocelulósica

La biomasa de lignocelulosa es el recurso orgánico más abundante de la Tierra, por lo que representa una excelente fuente de materia prima para los procesos de biorrefinería ya que, sumado a su bajo costo y amplia distribución geográfica, su explotación no interfiere con los suministros de alimento (7,16). Las fuentes de lignocelulosa incluyen desechos agrícolas (rastros de diferentes cultivos como maíz, sorgo y trigo), bagazo de caña de azúcar, residuos de la industria de la madera y el papel, desechos municipales y cultivos dedicados exclusivamente a este fin como el *miscanthus* y el *switchgrass* (pasto varilla) (17). La biomasa lignocelulósica está conformada principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, aunque sus proporciones varían considerablemente dependiendo del origen vegetal, como así también de la parte y la etapa madurativa de la planta (18,19). En la Figura 1 se dan detalles de las distintas estructuras químicas y ensamblajes moleculares que conforman las estructuras de la biomasa lignocelulósica.

La celulosa es el componente mayoritario (40-50%) del material lignocelulósico y se encuentra formando parte de la pared de las células vegetales en estructuras denominadas microfibrillas (Figura 1) (20). La celulosa es un homopolisacárido lineal constituido por alrededor de 500 a 15.000 unidades de glucosas conectadas por enlaces β -1,4-glicosídicos, siendo la unidad

repetitiva la celobiosa (disacárido de glucosas unidas mediante enlaces β -1,4). Los enlaces de hidrógeno intramoleculares e intermoleculares resultan de la orientación β -1,4 de los enlaces glucosídicos, lo que determinan que la celulosa sea extremadamente cristalina, insoluble y resistente. Sin embargo, algunas regiones de la estructura del polisacárido pueden ser de naturaleza amorfa, lo que lo hace más accesible a la degradación (21). Dado que aproximadamente la mitad del carbono orgánico en la biosfera está presente en forma de celulosa, su conversión en combustibles y productos químicos valiosos tiene una importancia primordial (22,23).

Por su parte, la hemicelulosa es más variada en estructura y composición que la celulosa, tal como se muestra en la Figura 1. Consiste en un polímero corto y altamente ramificado de pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-manosa, D-galactosa y D-glucosa) de 50 a 200 unidades. La hemicelulosa más abundante en la naturaleza es el xilano, que contiene principalmente residuos β -D-xilopiranosidos unidos por enlaces β -1,4-glicosídicos (24,25). El xilano forma una parte importante de las paredes celulares de las plantas, representando el 30 al 35% del peso seco total, aunque su abundancia exacta puede diferir entre las diferentes variedades de vegetales (24). La forma más abundante de xilano es el heteroxilano, que se compone de residuos de xilosa en la cadena principal con residuos de acetato, arabinosa y glucosa como sustituyentes comunes, aunque diferentes fuentes presentan grandes variaciones en su composición (26). Por ejemplo, en las plantas de madera dura (el sauce y el álamo), el xilano se presenta como o-acetil-4-o-metilglucuronoxilano con altos niveles de acetilación (24). Por el contrario, los xilanos de madera blanda (el abeto o el pino) no están acetilados y tienen un mayor contenido de manano (como galactoglucomanano) (27,28). El xilano no sólo se encuentra en plantas leñosas, sino también en especies anuales como el maíz y la caña de azúcar, donde puede constituir hasta el 30% de su masa total.

Las fibras de celulosa y hemicelulosa se encuentran inmersas en una matriz de lignina. Este es un polímero aromático heterogéneo, amorfo y muy resistente a la degradación, compuesto por diferentes tipos de monómeros: alcohol p-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico (29). La lignina se encuentra estrechamente vinculada a la celulosa y hemicelulosa a través de enlaces de hidrógeno y puentes de éster-éter, lo que hace que el material lignocelulósico sea muy recalcitrante, es decir, resistente a la descomposición biológica y química (30). El porcentaje de lignina es muy variable dependiendo del origen del material lignocelulósico, representando desde el 2% al 25% del peso seco total (31). Se ha demostrado que el nivel de lignina constituye el factor limitante más importante en la hidrólisis de la biomasa por las enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas (32,33).

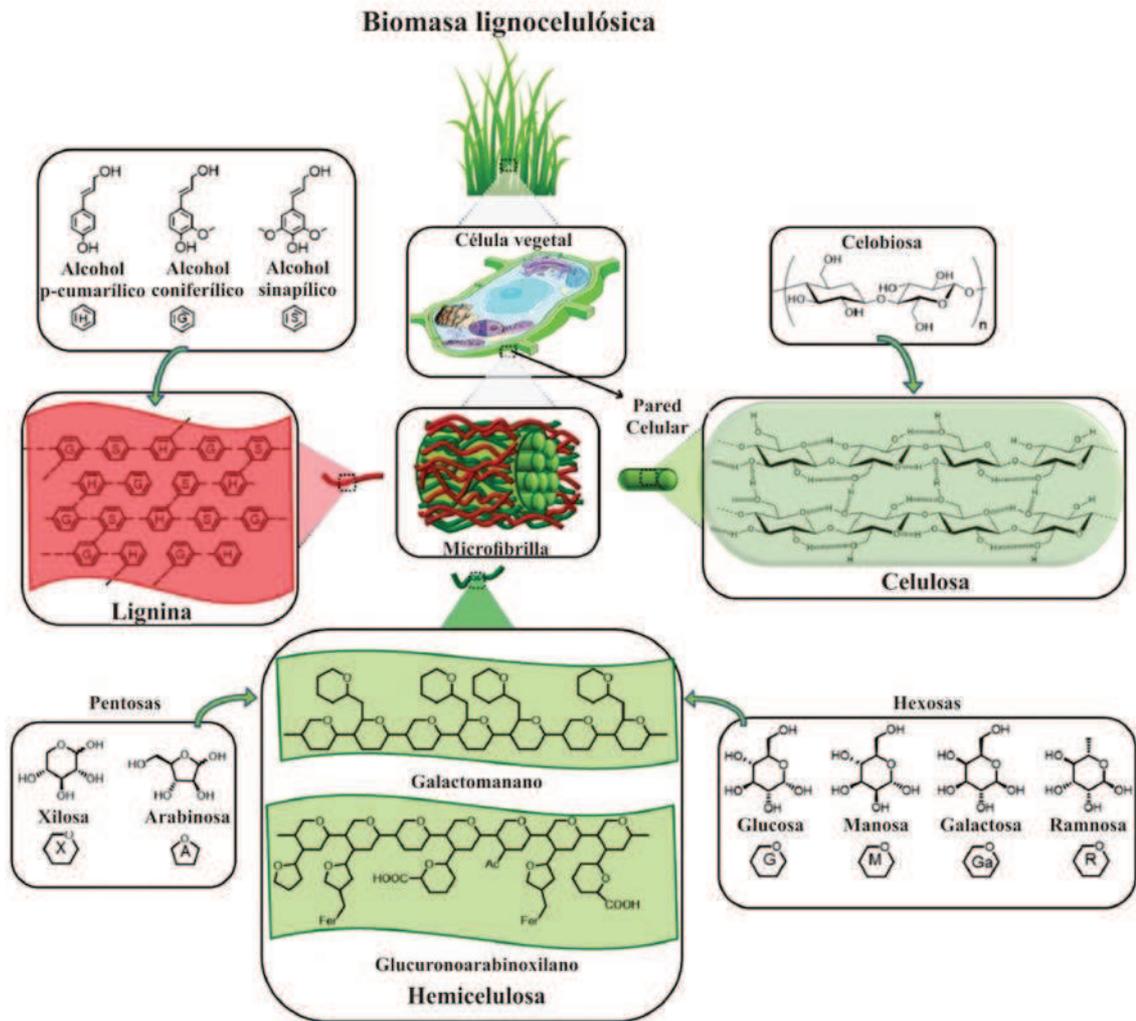


Figura 1. Composición estructural y química de la biomasa lignocelulósica. Adaptado de Isikgor y col., 2015 (34).

La correlación entre el aumento del contenido de lignina y la disminución en la liberación de azúcares desde los sustratos de lignocelulosa puede atribuirse a diversos motivos (32,35–39). Independientemente de la causa que provoque la reducción en la degradación, se ha establecido que el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica es esencial para la eliminación o ruptura de la lignina para su conversión eficaz en azúcares solubles (38). El pretratamiento consiste en diferentes métodos físicos (mecánicos, térmicos), químicos o enzimáticos que tienen como objetivo la reducción del porcentaje de lignina de los sustratos y, dependiendo del pretratamiento específico, se pueden observar distintos efectos sobre la biomasa que pueden contribuir a una mejor hidrólisis (38,40,41). La reducción mecánica del tamaño del sustrato mediante trituración o fresado suele ser el primer paso, ya que también hace que el pretratamiento sea más eficaz. La eliminación de la lignina por medios químicos se logra mediante la hidrólisis ácida, el procesado con vapor o en medio alcalino, que hacen que a la biomasa sea más susceptible a la degradación enzimática. La eliminación de lignina también se puede lograr mediante el uso de enzimas como

lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasas de diferentes orígenes, aunque la principal desventaja que presenta esta deslignificación biológica es la gran cantidad de espacio requerido y los largos tiempos de residencia (10 a 14 días) (42).

Debido a su amplia abundancia y accesibilidad, la biomasa lignocelulósica constituye un vasto suministro de azúcares simples (hexosas y pentosas) y compuestos fenólicos que pueden ser utilizados en la producción de biocombustibles (etanol, hidrógeno, metano) y otros bioproductos de valor agregado con el potencial para suplantar a aquellos combustibles y productos derivados del petróleo (34). Para ello, es necesario superar el carácter recalcitrante a la degradación que presenta la biomasa lignocelulósica a través de tecnologías de conversión adecuadas y respetuosas con el medio ambiente, para su implementación exitosa en estrategias de bioeconomía (43,44).

7.3. Enzimas lignocelulolíticas

La hidrólisis enzimática de los polisacáridos (celulosa y hemicelulosa), principales componentes de la lignocelulosa, ha emergido como la tecnología más prominente para la conversión de la biomasa en monómeros de azúcar para su subsecuente utilización en procesos de fermentación o de síntesis de distintos bioproductos. Debido a la elevada complejidad estructural y química que presenta la lignocelulosa, para su degradación se requiere la acción conjunta de una amplia variedad de enzimas con diferentes especificidades (45). Dentro de la base de datos de enzimas activas sobre carbohidratos (CAZy, por sus siglas en inglés *Carbohydrate Active Enzymes*), se destacan diferentes clases con actividad sobre la lignocelulosa como glicosil hidrolasas (GH), glicosil transferasas, polisacárido liasas, carbohidrato esterasas y enzimas con actividades auxiliares (46). La Figura 2 detalla la participación de las distintas clases de enzimas en la degradación de la celulosa y la hemicelulosa.

En general, las enzimas con capacidad para degradar la celulosa, comúnmente denominadas celulasas, se dividen en tres clases dependiendo de su modo de acción: endo- β -1,4-glucanasas (EG; EC 3.2.1.4), celobiohidrolasas o exoglucanasas (CBH; EC 3.2.1.91 y EC 3.2.1.176), y β -glucosidasas (BG; EC 3.2.1.21) (Figura 2A). Las celulasas pertenecen a la clase GH, las cuales, a su vez, son sub-clasificadas en diferentes familias en base a la estructura primaria de su dominio catalítico. Como la estructura primaria y el plegamiento están directamente relacionados, esta clasificación refleja tanto las características estructurales como los mecanismos catalíticos comunes a los miembros dentro de una familia (46,47). Las EG presentan actividad sobre los enlaces internos β -1,4-glicosídicos de la cadena de celulosa, principalmente en las regiones de celulosa amorfa, y de esta manera, exponen nuevos extremos reductores y no reductores (48). Las EG se agrupan principalmente dentro de las familias GH5, GH6, GH7, GH8,

GH9, GH10, GH12, GH26, GH44, GH45, GH48, GH51, GH124 y GH148 (46). Por otro lado, las CBH se caracterizan por hidrolizar la cadena de celulosa desde los extremos, liberando como producto de reacción al disacárido celobiosa. Estas enzimas pueden diferenciarse a partir de su modo de acción en CBH tipo I (EC 3.2.1.176) o tipo II (EC 3.2.1.91), dependiendo si actúan desde el extremo reductor o no reductor de la cadena de celulosa. Dentro de las primeras se encuentran las pertenecientes a las familias GH5, GH6 y GH9, mientras que dentro de las segundas se encuentran las familias GH7 y GH48 (46). En general, todas las CBHs son capaces hidrolizar las regiones de celulosa cristalinas tornándolas más amorfas, lo que facilita el acceso y accionar de las EG (49,50). Finalmente, las BG catalizan la hidrólisis de β -glucósidos desde su extremo no reductor con la liberación de glucosa. Generalmente, presentan actividad sobre los dímeros β -1,4 de glucosa (celobiosa), aunque también pueden presentar actividad sobre otros gluco-oligosacáridos de cadena corta como celotriosa, celotetraosa o β -D-galactósidos, α -L-arabinósidos, β -D-xilósidos, β -D-fucósidos. Estas enzimas pertenecen a las familias GH1, GH2, GH3, GH5, GH16, GH30, GH39, GH116, GH131(46). La acción simultánea de estas tres clases de enzimas es esencial para la degradación de la lignocelulosa. Sin embargo, otras enzimas, además de las celulasas, son necesarias para lograr la despolimerización completa del material lignocelulósico como, por ejemplo, las hemicelulasas y enzimas accesorias.

La hemicelulosa tiene una composición más variada en comparación con la celulosa y, por lo tanto, requiere una mayor variedad de enzimas para degradarla de manera completa y efectiva. Las enzimas que degradan este polímero se pueden dividir en despolimerizantes, que escinden la cadena principal, y desramificantes, que escinden las ramificaciones de la cadena principal (Figura 2B) (51). Las enzimas centrales en la degradación del xilano son las endo- β -1,4-xilanasas (EC 3.2.1.8), que degradan el esqueleto del xilano en oligosacáridos más cortos, y la β -1,4-xilosidasas (EC 3.2.1.37), que hidrolizan los xilo-oligosacáridos cortos hasta xilosa. Su clasificación, basada en la similitud de secuencia, ubica a la mayoría de estas xilanasas dentro de las familias GH10 y GH11, aunque existen en menor medida xilanasas de las familias GH5, GH7, GH8 y GH43 (52). La familia GH10 está compuesta mayormente por endo- β -1,4-xilanasas y en menor proporción endo- β -1,3-xilanasas. Este grupo de enzimas posee una gran versatilidad catalítica e incluso, pueden catalizar la hidrólisis de celulosa y aril- β -D-celobiosidos, y pueden tolerar la sustitución de uno o dos residuos de xilosa consecutivos por residuos de glucosa en el sustrato. Además, estas enzimas son muy activas en xilo-oligosacáridos cortos, lo que indica que poseen pequeños sitios de unión al sustrato (53). Los análisis de la estructura cristalina, la actividad cinética con los xilo-oligosacáridos y los productos finales de reacción han indicado que las xilanasas de la familia 10 suelen tener de cuatro a cinco sitios de unión al sustrato (54). Por su parte, los miembros de la familia GH11 son monoespecíficos, ya que consisten exclusivamente en endo- β -1,4-xilanasas cuya versatilidad catalítica es menor que la de los miembros de GH10,

y los productos de su acción pueden ser hidrolizados aún más por esta familia. Las xilanasas GH11 preferiblemente escinden regiones no sustituidas de la cadena principal, ya que no pueden atacar el enlace xilosídico hacia el extremo no reductor próximo a una xilosa ramificada (53). Finalmente, dentro de las enzimas desramificantes pueden distinguirse las α -L-arabinofurosidasas (EC 3.2.1.55) y las α -D-glucuronidasas (EC 3.2.1.139), que remueven sustituciones de arabinosa y ácido glucurónico, respectivamente, que pueden presentar obstáculos estéricos para las enzimas despolimerizantes de la cadena principal (51).

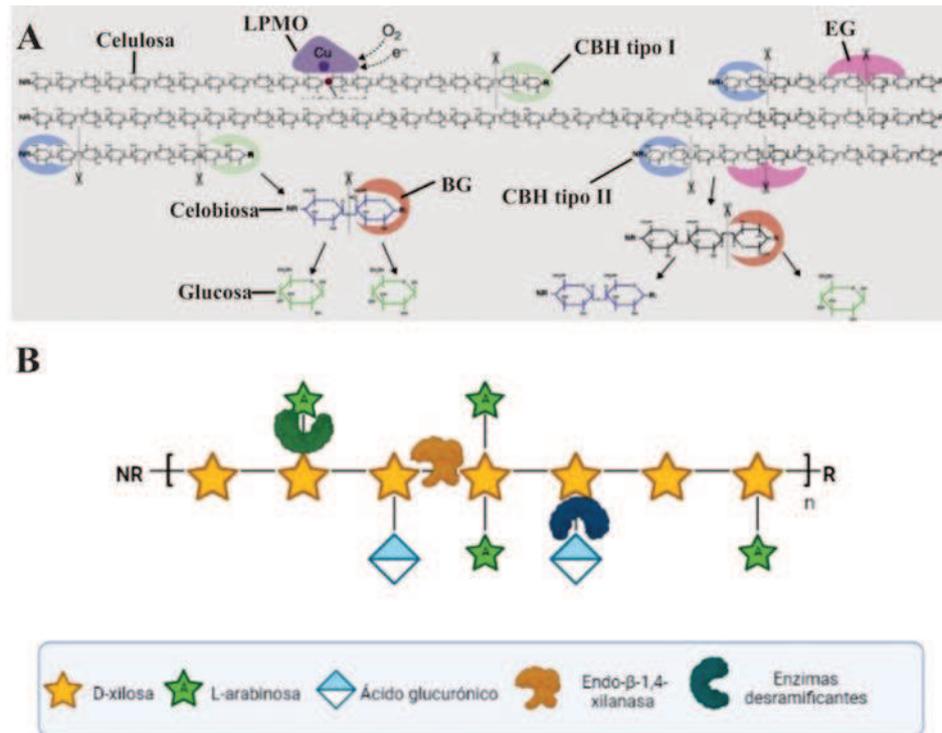


Figura 2. A: Modelo de degradación enzimática de la celulosa. **B:** Enzimas involucradas en la degradación de la hemicelulosa. Adaptado de Cragg y col., 2015 (55).

El reciente descubrimiento de procesos enzimáticos oxidativos que aumentan la degradación de la celulosa impulsó la introducción de una nueva familia CAZy, denominada "actividad auxiliar", las cuales se caracterizan por mejorar la hidrólisis de la lignocelulosa actuando de manera sinérgica con otras enzimas celulolíticas (56). Particularmente, las monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMO; CAZy: AA9) actúan mediante un mecanismo oxidativo sobre las regiones cristalina e insolubles de celulosa, lo que mejora en gran medida la degradabilidad general de este polímero (57–59). Por otro lado, los miembros de la familia AA10 exhiben actividad sobre celulosa o quitina y los miembros de las familias AA11 y AA13 son activos sobre quitina y almidón, respectivamente.

7.4. Dominios de unión a carbohidratos (CBM)

Las enzimas activas sobre carbohidratos comúnmente son multimodulares, es decir, están constituidas por un módulo catalítico y uno o más dominios de unión a carbohidratos (CBM) no catalíticos (60,61). Según la base de datos CAZy, un CBM se define como una secuencia de aminoácidos con un plegamiento discreto que posee actividad de unión a carbohidratos (46,60,62). Numerosos CBMs se han identificado experimentalmente y, basándose en la similitud de aminoácidos, se pueden identificar aún más probables CBMs. Actualmente, existen 48.756 CBMs divididos en 71 familias diferentes en función de la secuencia de aminoácidos, la especificidad de unión y su estructura (46,61). Dentro de las familias, los CBMs se agrupan en función de su plegamiento y estructura tridimensional, en donde el plegamiento predominante es el tipo β -sándwich, aunque esto no permite predecir su función. La topología del sitio de unión CBM-ligando también fue utilizada para subclasificar a los CBMs. Esta organización se basa en las similitudes estructurales y funcionales de los CBMs, y se identificaron tres “clases”: clase A (CBM “de unión a la superficie”), que se unen principalmente a sustratos cristalinos insolubles como la celulosa o quitina (60,62); de clase B (CBM de “unión a cadena de glicanos”), que interactúan con polisacáridos solubles (60,63); y de clase C (CBM “que se unen a los azúcares pequeños”), cuyos ligandos principales son mono-, di- o tri- sacáridos debido a la restricción estérica de su sitio de unión (64,65).

Los CBMs presentes en la mayoría de las enzimas activas sobre carbohidratos tienen tres funciones generales con respecto a la función del módulo catalítico asociado: efecto de proximidad y avidéz; selectividad del sustrato y función disruptiva en regiones cristalinas. Los CBMs promueven la asociación de la enzima con el sustrato, asegurando un contacto prolongado e incrementando la concentración efectiva de enzima sobre la superficie del polisacárido, mejorando así su actividad enzimática (60,62). Este efecto de proximidad ha sido comprobado por varios estudios donde se demostró que las CAZy pierden actividad sobre sus sustratos cuando el CBM es removido del dominio catalítico (62). Esta característica se observa principalmente en enzimas que actúan sobre sustratos insolubles y también en celulosomas (60). Los CBMs pueden presentarse individualmente, en tándem o incluso en repetidas copias dentro de la arquitectura de una CAZy, y el efecto de avidéz está relacionado con esta característica (66). La misma enzima puede estar unida a varios CBMs, cada uno con especificidades de unión similares o distintas. La presencia de una modularidad múltiple homogénea podría incrementar la avidéz de la enzima por un sustrato en particular, mientras que una heterogénea le permitiría a la enzima unirse a distintos sustratos. Se ha demostrado que la mayoría de los CBMs poseen una afinidad de sustrato específica, son capaces de reconocer diferentes polisacáridos cristalinos, amorfos, solubles e insolubles (61). Los datos disponibles sugieren que los CBMs pueden ser muy específicos,

identificando y distinguiendo entre sustratos con sutiles diferencias estructurales. Esta especificidad por el sustrato se ha demostrado en varios estudios y se ha aprovechado para su utilización en aplicaciones biotecnológicas. Por ejemplo, como herramientas para elucidar los mecanismos de interacción proteína-carbohidrato, como sondas moleculares para la localización de polisacáridos *in situ*, o como medio para identificar diferentes polisacáridos en las paredes celulares de las plantas (61,67). Algunos CBMs tienen la capacidad de desestructurar los polisacáridos cristalinos, lo que aumenta la accesibilidad al sustrato y en consecuencia aumenta la actividad de la enzima, sin embargo, este mecanismo de interrupción aún no es claro (68,69).

7.5. Organización de las enzimas lignocelulolíticas

Las enzimas lignocelulolíticas suelen actuar de forma simultánea durante la degradación, aunque la organización funcional varía entre los diferentes microorganismos (55). Los hongos y bacterias aeróbicas se caracterizan por secretar enzimas no complejas, compuestas por un único dominio catalítico, aunque con frecuencia, suelen tener asociado un CBM, el cual se conecta al dominio catalítico mediante un *linker* flexible (38). Los hongos filamentosos (por ejemplo, *Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger*) que secretan estos sistemas enzimáticos "libres" han sido los principales productores de enzimas lignocelulolíticas en la industria (70). Por otro lado, los hongos y bacterias anaeróbicas, son capaces de formar complejos multienzimáticos denominados "celulosomas", que se encuentran anclados a la membrana o pared celular. Las enzimas que los conforman, se encuentran unidas a proteínas "andamio" (*scalfold*) a través de interacciones específicas entre dominios *dockerin* y *cohesin* presentes en las enzimas y en las proteínas *scalfold*, respectivamente (71,72). Estos complejos, se unen a los sustratos mediante CBMs, localizando así, a las enzimas celulolíticas y a los productos de reacción, en las proximidades de la superficie celular (73). Además de estos dos sistemas de celulasas extensamente estudiados, algunas bacterias (por ejemplo, *Cytophaga hutchinsonii*) degradan la lignocelulosa a través de la acción combinada de enzimas extracelulares, asociadas a la membrana externa y periplasmática (74), mientras que algunos otros (por ejemplo, *Caldicellulosiruptor bescii*) secretan celulasas y hemicelulasas compuestas por múltiples dominios catalíticos y de unión a celulosa (75). Estas dos últimas formas de sistema celulolíticos son muy activas sobre la celulosa cristalina, lo que proporciona estrategias alternativas para la degradación industrial de la celulosa.

7.6. Sinergia

La degradación del material lignocelulósico a azúcares simples implica la acción de enzimas de múltiples especificidades de manera simultánea. La actividad combinada de estas enzimas conduce a una hidrólisis del sustrato más eficiente, generalmente denominada sinergia

enzimática (76). Esta última puede expresarse como grado de sinergia (GS), que es la relación entre la actividad de la mezcla enzimática sobre la suma de las actividades de las enzimas individuales (77,78). El efecto sinérgico más conocido y caracterizado involucra la acción conjunta de las EG y CBH e implica un modelo en el que las EG hidrolizan el interior del polímero de celulosa generando nuevos extremos reductores para la acción de las CBH. Sin embargo, este patrón podría ser una simplificación excesiva de la sinergia de las celulasas, ya que se ha propuesto también que las EG contribuirían disminuyendo el estancamiento de las CBHs, a partir de la eliminación de obstáculos para ayudar al movimiento procesivo de estas últimas (79–82). Existen además otros aspectos que influyen en el grado de sinergia, un factor importante es la proporción y concentración de celulasas en la mezcla de reacción. Otra característica que influye en la actividad sinérgica de la mezcla enzimática es su acceso a los sitios de unión. En este sentido, la eliminación del xilano asociado a la superficie de las fibras celulosa incrementaría la accesibilidad por parte de las celulasas a las mismas, aumentando su degradación (83,84). De hecho, se ha indicado que el efecto sinérgico de las xilanasas y celulasas podría mejorar significativamente la accesibilidad a la celulosa al aumentar la permeabilidad y la porosidad del sustrato (85). Además, la heterogeneidad física y química del sustrato influye en el grado de sinergia y se ha demostrado que cuando el sustrato es más recalcitrante la sinergia entre las celulasas en la producción de azúcares reductores disminuye (86). Debido a que la interacción entre las celulasas y la celulosa es un proceso complejo, la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados es esencial y requiere de mayor profundización en sus estudios.

7.7. Síntesis enzimática de polisacáridos

La producción de plástico a gran escala comenzó en la década de 1950 y actualmente continúa creciendo a nivel mundial. La persistencia de estos polímeros no biodegradables genera enormes problemas ambientales (2). Ante este escenario actual, el uso de polímeros biodegradables, como los polisacáridos derivados de la biomasa, es una alternativa atractiva a los plásticos de origen petroquímico, y en este punto, las enzimas juegan un papel esencial (87–89). En general, la catálisis enzimática exhibe características ventajosas como altas stereo-, regio-, enantio- y quimio- selectividades, que conducen a productos controlados estructuralmente; las reacciones transcurren en condiciones suaves, con una buena eficiencia y no se producen compuestos tóxicos [128–130]. Estas características de la catálisis enzimática generan expectativas para la producción precisa de oligo- y polisacáridos: (i) procesos ecológicos sin el uso de catalizadores nocivos como ácidos o bases fuertes y metales pesados y excluyendo la formación de subproductos; (ii) control selectivo en los enlaces glucosídicos, y (iii) producción de nuevos polisacáridos (incluso algunos no naturales) [131]. La síntesis precisa de polisacáridos se refiere a un mejor control sobre el grado de polimerización, así como a un amplio espectro de

modificaciones estructurales definidas que pueden introducirse en la cadena del polisacárido, lo que abre la posibilidad de generar nuevos materiales híbridos [130, 132].

Las glicosil fosforilasas (GP) son enzimas activas sobre carbohidratos que catalizan la degradación de glucanos con el uso de fosfato inorgánico (Pi), produciendo un azúcar-1P y un glucano de cadena más corta. La reacción de las GP es un equilibrio entre la fosforólisis y la reacción sintética inversa, ya que la energía libre resultante de la escisión del enlace glicosídico es similar a la liberada por la ruptura del éster de fosfato de azúcar (90). Las GP comprenden enzimas que pueden actuar sobre una amplia gama de enlaces glicosídicos, con la excepción de los enlaces α/β -(1 \rightarrow 6) y β -(1 \rightarrow 1). La mayoría de las GP utilizan como sustrato donante D-Glc-1P, formando disacáridos u oligosacáridos y muchas menos utilizan D-Gal-1P (91), D-GlcNAc-1P (92) o D-Man-1P (93,94). Las fosforilasas se han clasificado en diferentes familias dependiendo de la similitud de secuencia con las GH y las glicosil transferasas en la base de datos CAZy. La mayoría de las β -GP conocidas se clasifican en la familia GH94, que incluye diferentes especificidades de fosforilasas: β -1,2-oligoglucan (SOGP), laminaribiosa (LBP), celobiosa (CBP), celodextrina (CDP), quitobiosa (ChBP), entre otras. Mientras que las reacciones sintéticas de las GP se podrían utilizar para la síntesis de carbohidratos/glicomoléculas, las reacciones de fosforólisis de las GP se pueden aprovechar para la degradación de glicopolímeros, lo que conduce a la producción de azúcares-1P (95,96). Las fosforilasas se han explotado para la producción de compuestos glicosilados, carbohidratos de alto valor y polisacáridos, tanto naturales como no naturales (97–102). Las GP se pueden utilizar también para la glicosilación enzimática de aceptores que no sean carbohidratos (p. ej., fármacos) para aumentar su actividad, propiedades farmacocinéticas y solubilidad, o para reducir su toxicidad (90,103).

La biomasa lignocelulósica constituye una fuente importante de materia prima para producir polímeros al proporcionar pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (glucosa, manosa, galactosa, ramnosa) y sus muchos derivados, como glucaro- δ -lactona, metilglucósido y ácido glucurónico. Como se muestra en la Figura 3, existen diferentes rutas para la producción de polímeros a partir de la biomasa lignocelulósica, la más importante, consiste en la degradación de los polisacáridos constituyentes de la pared celular hasta sus constituyentes monoméricos para luego, convertirlos en una amplia gama de químicos de valor agregado y biopolímeros. En los últimos años, la obtención de oligosacáridos no digeribles (NDOs) a partir de la biomasa lignocelulósica mediante procesos enzimáticos, para la evaluación de sus propiedades y posibles aplicaciones industriales ha cobrado gran dinamismo (102). Los NDOs se definen como oligómeros no amiláceos, que pueden derivar de fracciones de matrices vegetales, como hemicelulosa y celulosa, de bajo grado de polimerización, que normalmente contienen de 3 a 10 unidades de azúcares, como fructosa, galactosa, manosa, arabinosa, xilosa y/o glucosa (104). Entre los principales representantes de este grupo se encuentran los fructo-oligosacáridos, los

xilo-oligosacáridos y los galacto-oligosacáridos, cuyas propiedades funcionales y aplicaciones ya son bien conocidas (105). Los celo-oligosacáridos (COS) son oligómeros de glucosa unidas por enlaces β -1,4, y su grado de polimerización va desde tres (celotriosa) a seis (celohexaosa) unidades de glucosa para los COS cortos que son solubles en agua, mientras que los COS más largos tienden a formar polímeros insolubles (104,106). Los COS solubles no son digeridos por humanos, y varios estudios respaldan sus propiedades prebióticas, estimulando el crecimiento *in vitro* de varias cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (104,106).

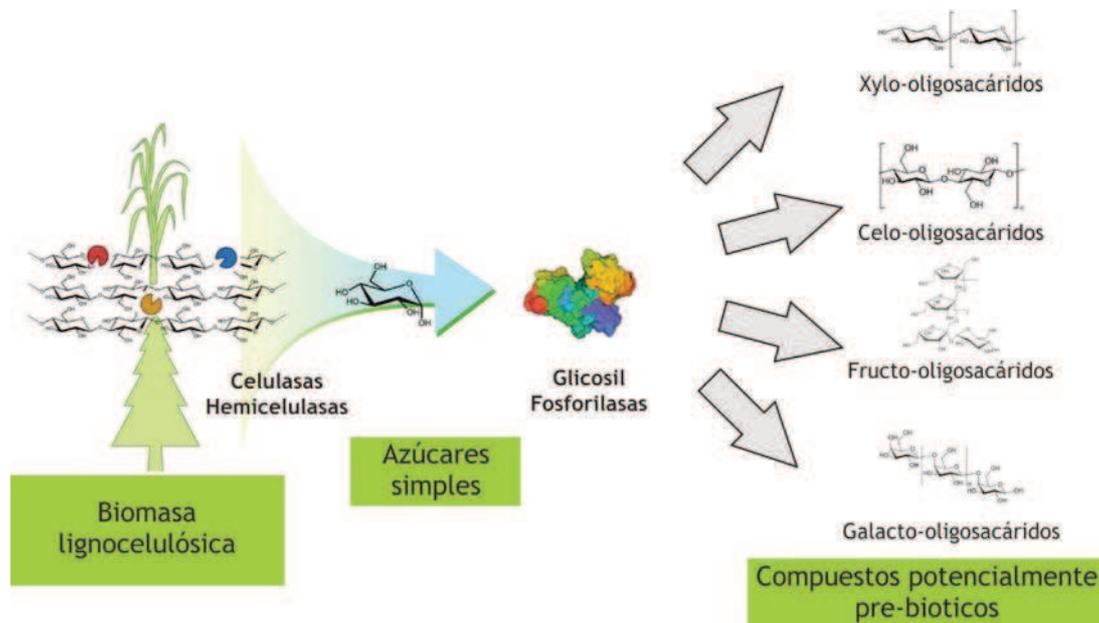


Figura 3. Síntesis enzimática de oligosacáridos no digeribles (NDOs).

7.8. Microorganismos con riqueza de CAZy

En la naturaleza, la lignocelulosa es descompuesta por comunidades microbianas que actúan sinérgicamente mediante el empleo de variados mecanismos catalíticos (107). En los diferentes géneros de bacterias y hongos celulolíticos, las CAZy producidas para la degradación de la lignocelulosa muestran perfiles muy variados, lo cual, sumado a diferencias en las arquitecturas moleculares y los mecanismos catalíticos de las mismas, reflejan la variabilidad de las maquinarias celulolíticas empleadas y su adaptación para trabajar en diferentes condiciones ambientales.

Los hongos aeróbicos se consideran los degradadores de biomasa vegetal más activos, principalmente los géneros *Trichoderma* y *Aspergillus*, siendo los principales productores de enzimas celulolíticas fúngicas, que han sido ampliamente investigados y utilizados en aplicaciones de biotecnología industrial (108). Además de los hongos celulolíticos, unas pocas bacterias pueden considerarse como verdaderamente celulolíticas y sólo alrededor del 50% de las

bacterias que poseen genes que codifican para celulasas poseen la capacidad de hidrolizar eficientemente los polisacáridos de la pared celular de las plantas en la naturaleza (109–111). Estas bacterias saprófitas están muy bien adaptadas y secretan una gran cantidad de enzimas con un comportamiento sinérgico distintivo. Sus sistemas enzimáticos altamente especializados, a menudo intrincados, incluyen celulasas, hemicelulasas, pectinasas y otras GH relacionadas. Estas enzimas degradan las fibras de celulosa a una mezcla de celobiosa, celotetraosa y otras celodextrinas, que son absorbidas por las células y degradadas por las BG, celobiosa fosforilasas y/o celodextrina fosforilasas. En ese contexto, los herbívoros dependen críticamente de los microorganismos gastrointestinales celulolíticos para la hidrólisis y fermentación efectiva de la biomasa vegetal. De hecho, se ha informado que el rumen de los bovinos tiene un potencial de degradación de biomasa lignocelulósica tres veces más eficiente que los digestores anaeróbicos (112). Esto se debe a que alberga un amplio consorcio de microorganismos que han evolucionado para degradar y fermentar eficazmente los polisacáridos de la pared celular vegetal.

Los microorganismos celulolíticos son de gran importancia para la producción de energía sostenible: degradan el material vegetal; producen una variedad de productos químicos de interés a través de la fermentación de la biomasa y proporcionan la información genética para la producción de una multitud de enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas que pueden usarse para su aplicación en muchos procesos industriales y biotecnológicos. Recientemente, las secuencias genómicas de una serie de especies celulolíticas se pusieron a disposición (*North American Consortium for Genomics of Fibrolytic Ruminal Bacteria* ([http:// www.jcvi.org/rumenomics](http://www.jcvi.org/rumenomics)) (110) y a partir de ellas, es posible detectar la presencia de enzimas potencialmente útiles y comprender mejor los mecanismos microbianos para metabolizar el material lignocelulósico.

7.8.1. *Ruminococcus albus*

Dentro de los microorganismos presentes en el rumen, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Ruminococcus albus* constituyen las especies predominantes y de mayor capacidad celulolítica (113,114). Los análisis genómicos y transcriptómicos de estas bacterias revelaron la presencia de múltiples CAZy con características particulares, que están implicadas en la degradación de la celulosa y la hemicelulosa, lo que demuestra que el rumen es una rica fuente de enzimas (115). Los mecanismos de descomposición de la pared celular vegetal por estas cepas son variados, incluyendo la conformación de celulosomas por *R. flavifaciens* (116) o la producción de vesículas de membrana externa enriquecidas con enzimas involucradas en la despolimerización de hemicelulosa y pectina, y la asociación directa con el material vegetal fibroso por parte de *F. succinogenes* S85 (117).

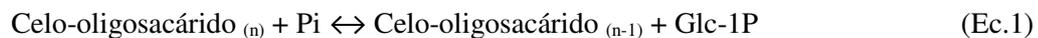
Hasta el momento, el proceso de degradación de celulosa mejor caracterizado es el de *R. flavefaciens*, habiéndose determinado que la adhesión y degradación de las fibras de

lignocelulosa está mediada en parte por los complejos multienzimáticos llamados celulosomas. Sin embargo, este mecanismo no se encuentra conservado en *R. albus*, ya que las diferencias genómicas entre *R. flavefaciens* y *R. albus*, analizadas a partir de la comparación de sus genomas con bacterias celulolíticas formadoras de celulosomas y bacterias no celulolíticas (118), mostraron claras diferencias en cuanto a los genes que codifican para los componentes principales del celulosoma. Si bien, las cepas de *R. albus* presentan secuencias codificantes para proteínas que contienen dominios *dockerin* (118–121), éstas carecen de representantes de la familia *dockerin* IPR002105, así como de proteínas de las familias *cohesin*. Adicionalmente, no se detectó la presencia de homólogos de las proteínas reconocidas como de andamiaje “*scalfold*” de *R. flavefaciens* FD-1 (Sca) y *C. thermocellum* ATCC 27405 (Cip) en ninguna de las cepas de *R. albus*. Por el contrario, se ha identificado que una proteína de la familia *Pili* estaría involucrada en la adherencia a las fibras de lignocelulosa en *R. albus* 8 (122,123). Sin embargo, los mecanismos de adherencia y degradación del material lignocelulósico de *R. albus* no han sido claramente definidos (124,125). De hecho, los estudios genómicos y funcionales realizados hasta el momento, establecen características particulares y exclusivas de *R. albus* en su mecanismo de adhesión y degradación de los sustratos lignocelulósicos. El análisis de mutantes de la cepa de *R. albus* 8 defectuosos en la degradación de la celulosa mostraron ser deficientes en la producción de dos celulasas (Cel48A y Cel9B) (126), que, además de sus dominios catalíticos (GH), poseen un CBM particular (en lo sucesivo denominado CBM37) con una amplia gama de especificidades de unión al sustrato (127). El análisis transcriptómico de *R. albus* 8 reveló que los quince transcritos codificantes para CAZy más expresados contenían un módulo CBM37, demostrando la importancia de estos CBMs en esta especie (128). También se ha identificado que el dominio CBM37 desempeña un papel en la retención de la enzima GH en la superficie celular, así como en la unión del sustrato (129); constituyendo la primer evidencia de que los CBMs podrían poseer funciones distintas de dirigir los dominios catalíticos de GH a su sustrato afín.

Por otro lado, la información sobre el accionar de las hemicelulasas de *R. albus* incluye la purificación de una α -L-arabinofuranosidasa desde el medio extracelular de cultivos de esta bacteria, a la cual se le determinó su actividad bioquímica (130). Un análisis a partir de una secuenciación parcial de genoma de *R. albus* 8, identificó la presencia de múltiples endoxilanasas con diversas composiciones modulares, entre ellas enzimas que incluían un dominio catalítico, un módulo de unión a carbohidratos y un módulo carbohidrato esterasa en una misma secuencia polipeptídica, además de la presencia de enzimas accesorias de la degradación del xilano como una β -xilosidasa, una α -L-arabinofuranosidasa y una α -glucuronidasa. Estos genes fueron expresados y se caracterizó bioquímicamente a las proteínas individualmente o en combinación con enzimas accesorias. Se identificó que las familias de endoxilanasas exhibieron diferentes patrones de liberación de productos, siendo la familia 11 de endoxilanasas la que produjo mayor

liberación de productos en sinergia con las enzimas accesorias a partir de los sustratos más complejos (131). A pesar de la caracterización de las enzimas de *R. albus* involucradas en la degradación de la celulosa, es escaso el conocimiento sobre la acción de sus hemicelulasas, y principalmente, de su interacción con las celulasas en la degradación de los compuestos lignocelulósicos.

Finalmente, la degradación intracelular de los celo-oligosacáridos metabolizados por *R. albus* 8 es catalizada por las enzimas celobiosa fosforilasa y celodextrina fosforilasa, a diferencia de la hidrólisis catalizada por BG, típica de otros organismos (132). Estas enzimas desempeñan un papel clave en el metabolismo de las celodextrinas, ya que catalizan la fosforólisis reversible de un glucósido para producir el correspondiente azúcar-1P (Ec. 1) (38,94,100,133–135).



Las GP han sido ampliamente utilizada en la síntesis enzimática de diferentes polisacáridos ya que poseen una amplia variedad de sustratos donantes y aceptores, lo que las convierte en una excelente herramienta para la biosíntesis de diversos polisacáridos (90,94,99,100,136,137).

Es por esto, que la comprensión de los mecanismos de degradación enzimática y metabolismo de la biomasa lignocelulósica por uno de los microorganismos ruminales con mayor capacidad hidrolítica, como lo es *R. albus*, podría proporcionar información valiosa para el desarrollo de diversas aplicaciones biotecnológicas tales como la formulación de mezclas enzimáticas relevantes para la producción industrial de biocombustibles y/o la síntesis de biopolímeros. Para ello, en este trabajo de Tesis, se produjeron en forma recombinante y caracterizaron celulasas, xilanasas y glicosil fosforilasas de *R. albus* 8 para el desarrollo de herramientas moleculares para la degradación de la biomasa lignocelulósica y su empleo en procesos de biorefinería.

8. OBJETIVOS

8.1. Objetivos generales

Diseñar y producir enzimas recombinantes como herramientas moleculares para realizar la degradación de residuos lignocelulósicos, a fin de desarrollar estrategias biotecnológicas para la generación de biocombustibles de segunda generación.

8.1.1. Objetivos específicos

- I. Realizar el clonado molecular de los genes, así como la expresión en sistema heterólogo de los mismos, la producción recombinante y purificación de celulasas, xilanasas, y glicosil fosforilasas de *R. albus*.
- II. Caracterización estructural, cinética y de estabilidad en entornos específicos de las enzimas recombinantes.
- III. Análisis computacional de dominios funcionales y diseño de enzimas mutadas para mejorar la eficiencia catalítica y la estabilidad de las enzimas degradativas de lignocelulosa por ingeniería de proteínas.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1. Microorganismos, plásmidos, medios de cultivos y antibióticos

9.1.1. Cepas bacterianas utilizadas

Para el clonado de los diferentes genes y la expresión recombinante de las distintas proteínas caracterizadas en este trabajo de Tesis, se emplearon las cepas de *E. coli* y los plásmidos que se disponen en nuestro grupo de trabajo, según lo detallado a continuación.

***Escherichia coli* Top10:** [*lacI^q* Tn10(*Tet^R*)] *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *deoR* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (*Str^R*) *endA1* *nupG*. Esta cepa fue empleada durante las etapas de biología molecular para generar las distintas construcciones génicas.

***Escherichia coli* BL21 (DE3):** F- *ompT* *hsdS* (r- m-) *gal dcm* (DE3). Se empleó para la expresión recombinante.

***Escherichia coli* BL21 (DE3) Codon Plus-RP:** es una cepa derivada de células de BL21 (DE3) que mejora la expresión de proteínas mediante el suministro de copias adicionales de tRNAs específicos que son raros en *E. coli* (gen *argU*, que reconoce los codones de arginina AGA y AGG, gen para el ARNt *proL* que reconoce el codón de prolina CCC. Estos codones aparecen frecuentemente en genomas ricos en GC). Los genes a expresar se encuentran bajo el control del promotor T7 inducible con IPTG. La cepa es resistente a cloranfenicol (Cm).

***Escherichia coli* BL21 SHuffle T7:** son células derivadas de la cepa de *E. coli* K12. Expresan constitutivamente una copia cromosomal de la proteína disulfuro isomerasa, la cual promueve la formación de puentes disulfuro y la correcta formación de las proteínas expresadas en forma recombinante. La forma citoplasmática de esta proteína también actúa como chaperona, asistiendo al correcto plegamiento de las proteínas, aunque estas no requieran la formación de puentes disulfuro. Es una cepa apta para la expresión de genes que se encuentren bajo el control del promotor T7.

***Escherichia coli* SoluBL21 (DE3):** F- *ompT* *hsdSB* (rB- mB-) *gal dcm* (DE3) es una cepa derivada de células de BL21 (DE3) mejorada para la expresión de proteínas tóxicas y proteínas de mamíferos en forma soluble. Los genes a expresar se encuentran bajo el control del promotor T7 inducible con IPTG.

9.1.2. Medios de cultivo

Medio Lysogeny Broth (LB): tripteína 10 g/L; extracto de levadura 5 g/L; NaCl 10 g/L;

Medio LB agar: medio LB con el agregado de 1,6% (p/v) de agar-agar.

Medio Terrific Broth (TB): KH₂PO₄ 2,3 g/L; K₂HPO₄ 12,5 g/L; tripteína 12 g/L; extracto de levadura 24 g/L; glicerol 5 g/L.

9.1.3. Plásmidos

Vectores de clonado de los productos de PCR generados con *Taq* ADN polimerasa o alternativamente generados con *Pfu* polimerasa o *Phusion* polimerasa:

- Vector pGEM®-T Easy (Promega), vector de clonado para productos de PCR generados con *Taq* ADN polimerasa. Presenta marcador de selección con resistencia a ampicilina.
- Vector pEASY®-Blunt (Trans), vector de clonado para productos de PCR con extremos romos (provenientes de *Phusion* o *Pfu* polimerasa). Presenta dos marcadores de selección con resistencia a ampicilina y kanamicina.

Vectores de expresión de sistemas bacterianos de *E. coli*. Todos los vectores mencionados a continuación son inducibles con IPTG:

- Vectores de la serie Duet (Novagen), estos vectores poseen dos sitios de múltiple clonado (SMC), con un promotor T7 y una secuencia de unión a ribosoma en cada uno para permitir la co-expresión de dos genes, quedando de este modo ambos genes de interés bajo el control transcripcional del promotor T7 y el operador lac. Además, los vectores de esta serie son compatibles entre ellos permitiendo la co-transformación. De esta serie se utilizó los vectores pETDuet-1 y pRSFDuet-1 inducibles por IPTG. Poseen marcador de selección por resistencia a antibióticos, en el caso de pETDuet-1 a ampicilina, mientras que el plásmido pRSFDuet-1 confiere resistencia a kanamicina.
- Vector pET28(c+) (Novagen), vector inducible por IPTG que permite incorporar una etiqueta de poli-histidinas (His-x6) en el extremo N-terminal de la proteína para facilitar su posterior purificación. Posee marcador de selección que confiere resistencia a kanamicina.
- Vector pET22b (Novagen) vector inducible por IPTG que permite incorporar una etiqueta de poli-histidinas (His-x6) en el extremo C-terminal de la proteína y posee el péptido señal pelB de secreción a periplasma. El marcador de selección otorga resistencia a ampicilina.

- Vector pET19-TEV, equivalente al pET19 (Novagen) modificado para contener un sitio de corte para la TEV proteasa entre la etiqueta de poli-histidinas (His-x6) ubicada en el extremo N-terminal y el sitio de múltiple clonado.

9.1.4. Antibióticos

- Ampicilina: concentración final 100 µg/ml.
- Kanamicina: concentración final 50 µg/ml.
- Cloranfenicol: concentración final 50 µg/ml.

9.2. Oligonucleótidos utilizados

Los oligonucleótidos cebadores se diseñaron convenientemente teniendo en cuenta secuencias disponibles en las bases de datos de los trabajos publicados. Además, en el diseño de los oligonucleótidos se tuvo en cuenta la adición de sitios blanco para enzimas de restricción en los extremos 5' y 3' del gen para su posterior subclonado en los vectores de expresión como se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados

Nombre	Secuencia (5'→3')	Sitios de Restricción	Tm (°C)
FwGHCBP	<u>GAGCTCGCCGATTGATATGGGTGGTCG</u>	<i>SacI</i>	58
RvGHCBP	<u>GTCGACGAGCTTTTACTCGAGACCC</u>	<i>SalI-XhoI</i>	60
FwGHCDP	<u>GAGCTCCATCGGCCTGCCGGGTCGTTAC</u> G	<i>SacI</i>	67
RvGHCDP	<u>GTCGACGAAGCTTTTACTCGAGACCCAT</u> AACAAACGG	<i>SalI-HindIII-XhoI</i>	62
FwCBM37_2	<u>GGATCCGTACCCGACCAACGTGCAGG</u>	<i>BamHI</i>	58
RvCBM37_2	<u>GCGGCCGCGGTCAGGTTTTTTCGGGG</u>	<i>NotI</i>	65
FwGHCEl5G	<u>GGATCCAGCCATGGGACATATGGCCACC</u> AGC	<i>BamHI-NcoI-NdeI</i>	69
RvGHCEl5G	<u>AAGCTTGCGGCCCGCCTCGAGGTCGTTCA</u> GGCACCAGAAGG	<i>HindIII-NotI</i>	59
FwGHCEl48A	<u>GAGCTCGGATCCGGGACATATGGCCGGT</u> ACCC	<i>SacI-BamHI-NdeI</i>	59
RvGHCEl48A	<u>GTCGACGCGGCCCGCCTCGAGCAGTTCTTT</u> AACCAGGTTGATAGC	<i>SalI-NotI-XhoI</i>	54
FwXyn10A	<u>GGATCCGATGCTCCTGACCGGCTGCGGT</u>	<i>BamHI</i>	68
RvXyn10A	<u>CCAAGCTTTTACTCGAGTTTTTCCGCC</u>	<i>HindIII-XhoI</i>	62
FwN34Xyn10A	<u>GGATCCCATATGACCGCGGATCTGCCG</u> CG	<i>BamHI-NdeI</i>	67
RvN34Xyn10A	<u>GCGGCCGCTTTGCTCGGGAAAACGAATT</u> CTTC	<i>NotI</i>	70
FwBG	<u>GAGCTCGATGATCAAGCTGGCAAAGTTC</u> CCT	<i>SacI</i>	62
RvBG	<u>GTCGACTCGAGGTCTTCAATGCCGTCG</u>	<i>SalI</i>	63

9.3. Métodos generales de biología molecular

9.3.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la amplificación de los genes se utilizaron oligonucleótidos específicos especificados en la Tabla 1. En general, la mezcla de reacción (25 μ l) contenía: 1 μ l de ADN como molde, 0,5 μ M de cada oligonucleótido, 0,2 mM de cada dNTP, 2,5 mM $MgCl_2$ y 1 U *Phusion* ADN polimerasa (New England BioLabs). El protocolo general de amplificación constó en un ciclo de desnaturalización inicial de 95 °C por 5 min., seguido de 30 ciclos de: I) fase de desnaturalización 30 s a 95 °C; II) fase de hibridación a la temperatura óptima para cada par de cebadores; III) fase de elongación 1 min. por cada 1 kpb a amplificar, a 72 °C, más una extensión final de 10 min. Para ello, se utilizó un termociclador T100™ *Thermal Cycler* (Bio-Rad). Las mezclas de reacción se separaron electroforéticamente en gel de agarosa al 1% (p/v) y se purificaron a partir del gel, para luego ligarlas al vector de clonado. Para el cálculo de la T_A óptima, se utilizó el servidor de New England BioLabs en: <http://tmcalculator.neb.com/#!/main>.

9.3.2. Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Para purificar fragmentos de ADN a partir del gel de agarosa se utilizó el sistema *Wizard®SV gel & PCR Clean up system* (Promega), siguiendo el protocolo especificado en el fabricante.

9.3.3. Tratamiento con *Taq* ADN polimerasa

La amplificación de ADN con la enzima *Phusion* ADN polimerasa no proporciona al amplicón las desoxi-adenosinas libres en ambos extremos, necesarios para el clonado en el vector pGEM®-T Easy. De esta manera, para poder insertar los fragmentos amplificados en este vector de clonado, a una alícuota del producto de PCR ya purificado se le realizó un tratamiento con *Taq* ADN polimerasa a 70 °C durante 30 min en un medio de reacción compuesto por 1 μ l *buffer Taq* 10X, 1 μ l $MgCl_2$ 25 mM, 6,5 μ l del producto de PCR purificado, 1 μ l dATP 2 mM, y 0,5 μ l *Taq* ADN polimerasa.

9.3.4. Clonado de los genes amplificados por PCR

Los genes amplificados por PCR se clonaron en el vector pGEM®-T *Easy* (Promega) adecuado para ser mantenidos, secuenciados y luego subclonados en los vectores de expresión correspondientes. Para el clonado de los genes amplificado con *Phusion* ADN polimerasa, se ligó al vector pGEM®-T *Easy* previo tratamiento con *Taq* ADN polimerasa. Alternativamente también se utilizó el vector de clonado para extremos romos pEASY-*Blunt* (TRANS) para los genes mayores a 1.800 pb donde la eficiencia de ligación al vector pGEM®-T *Easy* resultaba muy

baja. En ambos casos las reacciones se realizaron siguiendo las indicaciones especificadas por el fabricante.

9.3.5. Ligación

Las ligaciones se realizaron utilizando la enzima T₄ ADN ligasa (Promega), siguiendo las indicaciones del proveedor. En el caso de la ligación del producto de PCR amplificado al vector de clonado pGEM®-T *Easy*, se empleó una mezcla inserto:vector en una relación molar de 3:1 con el agregado de 2 U de ligasa en el *buffer* provisto por el fabricante. La ligación se dejó toda la noche a 16 °C y posteriormente esta mezcla se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* Top10.

9.3.6. Transformación de bacterias competentes

Para permitir la incorporación de ADN plasmídico exógeno, las células de *E. coli* se hicieron competentes utilizando el método de CaCl₂. Los pasos seguidos se indican a continuación. Un cultivo crecido durante toda la noche en medio LB se diluyó 1/50 en medio de cultivo fresco y se creció a 37 °C hasta una DO₆₀₀-0,4; se tomaron alícuotas de 1 ml en tubos *Eppendorf* de 1,5 ml, se centrifugaron a 5.000 ×g por 5 min y las células se suspendieron en 500 µl de solución ST1 [10 mM MOPS-NaOH pH 7,0; 10 mM KCl]. Se volvió a centrifugar en las mismas condiciones, para luego suspender las células en 500 µl de solución ST2 [100 mM MOPS-NaOH pH 6,5; 10 mM KCl; 100 mM CaCl₂] e incubarlas durante 15 min en hielo. Las células se centrifugaron nuevamente a 5.000 ×g por 5 min y se suspendieron en 100 µl de ST2. A las células competentes se les agregaron entre 2-5 µl de plásmido o de mezcla de ligación y se incubaron en hielo durante 60 min. Se realizó un choque térmico a 42 °C durante 40 s y luego se recuperaron las células adicionando 1 ml de medio LB e incubando durante 60 min a 37 °C. Por último, las células se volvieron a centrifugar a 5.000 ×g durante 5 min, se suspendieron en los 100 µl remanentes y se sembraron en placas de LB-agar suplementado con el/los antibióticos correspondientes para permitir la selección de las células transformadas. Las placas se incubaron toda la noche a 37 °C y se seleccionaron clones para continuar con el análisis.

9.3.7. Minipreparación de ADN plasmídico

Para la extracción de ADN plasmídico a partir de células transformadas de *E. coli*, los clones de interés se repicaron en 4 ml de medio LB líquido suplementado con el antibiótico correspondiente y se cultivaron toda la noche a 37 °C. Las células se cosecharon por centrifugación a 3.000 ×g durante 10 min y se extrajo el ADN plasmídico utilizando el sistema comercial *EasyPure Plasmid MiniPrep Kit* (TRANS), siguiendo el protocolo establecido en el mismo. La obtención del plásmido se corroboró por electroforesis en gel de agarosa.

9.3.8. Secuenciación de ADN

Los plásmidos que contenían los genes de interés se enviaron a secuenciar para corroborar que la secuencia del gen sea la correcta. Para esto una alícuota de una minipreparación de ADN plasmídico, de una concentración aproximada de 100 µg/µl se envió a la empresa Macrogen Inc (Corea) para ser secuenciada de forma automatizada utilizando oligonucleótidos específicos que hibridan en una región del plásmido cercana al sitio de inserción del gen.

9.3.9. Digestión de ADN con enzimas de restricción

Para realizar el subclonado de los genes, los mismos se liberaron a partir del vector de clonado con las enzimas de restricción que permitirán su incorporación de manera adecuada en el vector de expresión seleccionado, previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. Además, el análisis de restricción es útil para confirmar la presencia del gen de interés en el vector en estudio. Las reacciones de digestión comúnmente contenían: 1 a 2 µg de ADN plasmídico, el *buffer* de reacción correspondiente que provee el fabricante y de 10 a 20 U de la enzima de restricción. Esta mezcla se incubó durante 3 h a 37 °C. Las digestiones se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa y en el caso de utilizarse para subclonado el inserto liberado se purificó a partir del gel como se indica en el punto 9.3.2.

9.3.10. Precipitación de ADN

La precipitación de ADN se utiliza para eliminar todos los componentes no deseados de la mezcla de reacción durante el procesamiento químico del polímero. En nuestro caso se utilizó como paso intermedio de la digestión sucesiva con distintas enzimas de restricción, o en la purificación final de los vectores de expresión digeridos con el objeto de subclonar los genes de interés. Para precipitar una solución de ADN se agregaron dos volúmenes de etanol (absoluto) y 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M. La mezcla se incubó a 4 °C toda la noche. Posteriormente, se centrifugó la mezcla de precipitación a 15.000 ×g durante 15 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante, el precipitado de ADN se lavó con etanol 70% (v/v), se dejaron evaporar los restos de etanol 15 min a 25 °C y, por último, se suspendió el ADN en H₂O Milli-Q esterilizada.

9.3.11. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Los fragmentos de ADN fueron resueltos por electroforesis en gel de agarosa al 1-2% (p/v) (dependiendo del tamaño del fragmento) en solución TAE 1X (40 mM Tris-HCl pH 8,0; 40 mM ácido acético; 1 mM EDTA) con la adición de *Gel Green* a una concentración final de 0,3 µg/ml. Las muestras se acondicionaron antes de su corrida con glicerol 3% (v/v) y Azul de Bromofenol 0,05% (p/v). Se utilizó el sistema *Mini-Sub[®]Cell* GT (Bio-Rad) para la corrida propiamente dicha. Los fragmentos se visualizaron en un transiluminador *UltraSlim Led*

illuminator 470 nm (MaestroGen). La identificación de los productos se llevó a cabo por comparación con marcadores de masa molecular adecuados (100 pb, 400pb; *Lamda Ladder* PB-L Productos Bio-LogicosR).

9.3.12. Creación de banco de células

Con el objeto de normalizar las condiciones de cultivo y expresión de los distintos clones, se construyó un banco central de células para cada cepa de expresión. Las reservas de células se prepararon a partir del cultivo de una única colonia de cada clon de expresión y se almacenaron a -80 °C en medio LB suplementado con glicerol 25 %(v/v).

9.3.13. Optimización de condiciones de expresión

Un vial tomado del banco de células de expresión, conteniendo células transformadas con la construcción plasmídica que porta el gen de interés, se cultivó en 5 a 10 ml de medio suplementado con el antibiótico correspondiente, durante toda la noche a 37 °C y en agitación. Este cultivo se diluyó 1/50 con medio fresco suplementado con antibiótico y se incubó a 37 °C, con agitación a 200 rpm, hasta alcanzar una DO entre 0,5 y 0,6. Alcanzada la DO necesaria, se indujo la expresión de la proteína mediante el agregado del inductor (IPTG). La temperatura, el tiempo y la concentración del agente inductor se ajustaron de modo de optimizar la expresión de la proteína recombinante.

9.3.14. Expresión de las proteínas recombinantes

Optimizadas las condiciones de expresión para cada proteína en particular, se llevó a cabo su producción a mayor escala. Para ello, a partir de un vial del banco de células de expresión, se realizó el cultivo del clon productor durante toda la noche a 37 °C, en agitación y suplementado con el antibiótico correspondiente. Este cultivo se utilizó para inocular 1 L de medio de cultivo LB. El medio de cultivo inoculado se incubó a 37 °C en agitador orbital a 180 rpm hasta alcanzar una $DO_{600} \sim 0,6$. A partir de ese momento se agregó el inductor IPTG y se cultivó en las condiciones a 180 rpm durante 16 h determinadas previamente. Para cosechar las células, se centrifugó el cultivo a 5.000 $\times g$ durante 10 min y se conservaron a -20 °C hasta su uso.

9.3.15. Purificación de las proteínas recombinantes

Todas las proteínas recombinantes se expresaron como proteínas que tenían fusionada una etiqueta de poli-histidinas (His-X6). La etiqueta de poli-histidinas permite la purificación de las proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC). En cada caso, las células se resuspendieron en una cantidad adecuada de *buffer* H [Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM, glicerol 5 %(v/v)] y se sometieron a lisis con un

procesador ultrasónico de alta intensidad *VibraCell™* VCX 130 (Sonics). La suspensión resultante se centrifugó a 20.000 ×g durante 15 min a 4 °C para separar la fracción soluble de los detritos celulares y el resto de los componentes insolubles. La fracción soluble se sembró en una columna de IDA-Ni²⁺ (GE Healthcare) previamente equilibrada con el mismo *buffer H*. Finalizada la siembra, la columna se lavó con *buffer H* de siembra y luego para la elusión de las proteínas retenidas se realizaron un gradiente de concentración de imidazol (0-300 mM) en *buffer I* [Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 500 mM, imidazol 300 mM]. Las fracciones que contenían la proteína de interés se colectaron y concentraron hasta un volumen de 1,5 ml. Ese pool fue sembrado en una columna de exclusión molecular HiLoad 16/600 Superdex 200 pg (GE Healthcare), previamente equilibrada con *buffer G* (50 mM HEPES-NaOH pH 8,0, 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA), las fracciones que contenían actividad enzimática fueron colectadas y concentradas. Posteriormente, se les agregó glicerol 10% (v/v) (concentración final), se fraccionaron en pequeñas alícuotas y se conservaron a -80 °C. Las proteínas así conservadas mantuvieron su actividad biológica al menos durante 3 meses.

9.4. Métodos bioquímicos básicos

9.4.1. Cuantificación de proteínas

La concentración total de proteínas fue determinada por el método de Bradford (138). Para ello, se realizó una curva de calibrado utilizando concentraciones conocidas de la proteína albumina de suero bovino (BSA) y se determinó su absorbancia a 590 nm. La concentración de proteínas de la muestra incógnita se determinó por interpolación con esta curva de calibrado.

9.4.2. Desalado y concentración de proteínas

Para cambiar el medio de las soluciones proteicas y/o para concentrar las proteínas se emplearon dispositivos comerciales de ultrafiltración *Amicon* (Millipore) de *MWCO* apropiado para cada proteína y se procedió según las indicaciones del fabricante.

9.4.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida

La electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) se realizó siguiendo la técnica descripta (139). La concentración de acrilamida del gel de apilamiento fue de 4%, mientras que la concentración del gel de separación fue de entre 10-15%. Las muestras fueron desnaturalizadas antes de su siembra mediante el agregado de *buffer* de siembra SDS-PAGE 4X [SDS 1% (p/v), 2-mercaptoetanol 100 mM, en Tris-HCl 50 mM pH 6,8] y su posterior calentamiento a 100 °C durante 5 min. Una vez sembradas las muestras, la corrida electroforética se realizó aplicando una corriente de intensidad constante de 25 mA por

cada placa, en *buffer* de corrida [Tris-base 0,3% (p/v), glicina 1,44% (p/v), SDS 0,1% (p/v)], empleando un equipo *Mini Protean IV* (Bio-Rad). Finalizada la corrida electroforética, las proteínas en el gel se visualizaron por tinción con *Coomassie® Brilliant Blue R-250* en una solución de metanol 30% (v/v) y ácido acético 10% (v/v); y su posterior decoloración en una solución de metanol 5% (v/v) y ácido acético 7,5% (v/v). También se utilizó SDS-PAGE en condiciones no reductoras, utilizando el mismo procedimiento descrito, con la omisión del agente reductor en el *buffer* de siembra. En el caso de PAGE en condiciones nativas se omitió además la adición de SDS tanto en el *buffer* de siembra como en los geles poliacrilamida. En este caso la concentración de monómero utilizado fue de 7% p/v y se utilizó tinción con *Coomassie® Brilliant Blue R-250* para la visualización de las proteínas en el gel (140).

9.4.4. Cromatografía de exclusión molecular: Determinación de masa molecular

La cromatografía de exclusión molecular se utilizó con fines analíticos para la determinación de la masa molecular (MM) de las distintas proteínas. En el equipo *ÅKTA Explorer* (GE Healthcare) se conectó una columna Tricorn 10/300 (GE Healthcare) cargada con resina Superdex G-200 (GE Healthcare). Las corridas se realizaron a 0,5 ml/min en *buffer* G. Se empleó para la calibración de la columna un conjunto de patrones de masa molecular conocida (GE Healthcare). Los estándares analizados incluyeron: tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), aldolasa (158 kDa), conalbúmina (75 kDa), ovoalbúmina (44 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y ribonucleasa (13,7 kDa). El volumen muerto de la columna se determinó empleando una solución de azul de dextrano. Las masas moleculares se determinaron por interpolación de la curva logarítmica, donde se grafica el log de la MM de los marcadores comerciales *vs* K_{av} . K_{av} se obtiene a partir de la siguiente ecuación: $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_c - V_o)$; donde V_e es el volumen de elusión, V_o es el volumen muerto y V_c es el volumen de columna.

9.4.5. Ensayos de oxidación y reducción

Los ensayos de oxidación y reducción se realizaron incubando las enzimas (30 μ M) a 25°C en *buffer* B durante 20 min con 2-ME, DTT, diamida o H₂O₂ en diferentes concentraciones (0-30 mM). Después del tratamiento, se analizó la actividad de la enzima. Los datos experimentales se representaron como el porcentaje de actividad restante frente a la concentración de reactivo, tomando como control de referencia (100%) la enzima incubada en ausencia de reactivo redox en las mismas condiciones. Los puntos experimentales determinados de modificación redox son medias de al menos tres mediciones reproducibles dentro de \pm 10%.

Para la remoción del exceso de los agentes reactivos después del tratamiento, las muestras se desalaron utilizando una mini columna Bio-Gel P6 (Bio-Rad). Además, las mismas muestras

fueron utilizadas para corridas en el gel de poliacrilamida tanto en condiciones nativas como desnaturalizantes (con el agregado o no de reductor).

9.4.6. Determinación del potencial medio de reducción

El potencial medio de reducción (E_m) de una proteína es el potencial de reducción al que la concentración de sus formas oxidada y reducida son iguales (141). Los valores de E_m se determinaron mediante titulación redox con 2ME-HEDS, las especies reducidas y oxidadas de β -mercaptoetanol, respectivamente, que se intercambian según la reacción: $2ME \leftrightarrow 2H^+ + 2e^- + HEDS$. Se obtuvieron diferentes valores de potencial de reducción, variando la concentración relativa fijada a 25 mM, con la adición de HEPES 50 mM pH 8,0. Los valores de E_h se calcularon utilizando la ecuación de Nernst aplicada a la reacción de reducción indicada anteriormente: $E_h = E_{m,8,0} - RT/nF \ln ([2ME]^2 / [HEDS])$, donde $E_{m,8,0}$ es el E_m para 2ME/HEDS a pH 8,0 (-0,319 V) (142), R es la constante universal de gases ($8,314 \text{ J K}^{-1}\text{mol}^{-1}$), T es la temperatura absoluta (303 K), n es el número de moles de electrones transferidos en la reacción, y F es la constante de Faraday ($96,485 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ V}^{-1}$) (141). Las diferentes enzimas (5 μM) fueron incubadas por 1 h a temperatura ambiente en diferentes *buffers* redox y luego se determinó su actividad enzimática en condiciones estándares. Los valores de actividad enzimática se representaron en función del E_h y se ajustaron a la ecuación de Nernst usando el programa OriginPro 8.1 para calcular el E_m .

9.5. Metodología de análisis enzimático

9.5.1. Sustratos

Para la caracterización de las celulasas se utilizaron sustratos celulósicos de diferente grado de compactación (alto, medio y bajo). Se utilizó carboximetilcelulosa (CMC) obtenida de Sigma-Aldrich, un derivado de la celulosa que presenta grupos metilos enlazados a los hidroxilos de las glucosas que componen el polímero de celulosa, esto le confiere menor grado de compactación entre las cadenas de celulosa; celulosa en polvo de alto grado de compactación (ICN), a partir de la cual se preparó la celulosa permeabilizada con ácido fosfórico (PASC de sus siglas en inglés *Phosphoric Acid Swollen Cellulose*), según lo descrito anteriormente (143). Para ello se disolvieron 0,2 g de celulosa en polvo con 10 ml de ácido fosfórico al 85% (p/v) frío. La celulosa solubilizada se agitó durante 1 h a 4 °C y se precipitó mediante la adición de 40 ml de agua miliQ fría. Se lavó repetidas veces con agua miliQ fría, y posteriormente se neutralizó con 5 ml de una solución de bicarbonato de sodio 2 M, se volvió a lavar con agua miliQ repetidas veces y se resuspendió en *buffer* acetato de sodio 100 mM pH 6. Finalmente, se cuantificó la concentración final en mg equivalentes de unidades de glucosa por ml mediante el método fenol-sulfúrico (144). La determinación del grado de polimerización del sustrato, se basó en la relación

de moles de extremos reductores determinados mediante la técnica de Somogyi-Nelson (145), con las unidades de glucosa/mg de sólido determinadas por medio del método de fenol-sulfúrico (144,146).

Para la caracterización de las xilanasas se utilizaron tres xilanos diferentes: 4-O-metil-D-glucurono-xilano (4MGlcX) obtenido de Sigma Aldrich, xilano de *Beachwood* (BX) y arabinoxilano (AX) obtenidos de BIOSINTH® Carbosynth. El 4-O-metil-D-glucurono-xilano y el xilano de *Beachwood* son xilanos que poseen un contenido del 12% de ramificaciones α -1,2 de ácido glucurónico, mientras que el arabinoxilano posee un contenido del 33% de ramificaciones de arabinosa en posición α -1,2 y/o α -1,3.

Se analizó también la actividad de las enzimas sobre sustratos complejos como aserrín de madera de pino cedido por Instituto de Investigaciones en Catálisis y Petroquímica “Ing. José Miguel Parera”- INCAPE (FIQ, UNL-CONICET), el cual fue utilizado como sustrato sin pre-tratamiento previo, y pre-tratado con NaOH 10% a 120 °C por 1 h (20,147) , luego fue neutralizado con Na₂CO₃ 2M y lavado repetidas veces con H₂O miliQ.

9.5.2. Actividad celulasa

La actividad β -1,4-glucanasa se determinó a partir la cuantificación de azúcares reductores generados por la enzima a partir del sustrato mediante la técnica de Somogyi-Nelson (145) . La medida de actividad se llevó a cabo en volumen final de 50 μ l, donde se utilizó una dilución adecuada de enzima que asegure condiciones de velocidad de inicial (consumo de sustrato menor al 5%), en *buffer* acetato de sodio 100 mM a un valor de pH 5 y utilizando como sustrato los diferentes derivados de la celulosa mencionados anteriormente en el punto 9.5.1. Las medidas se realizaron en termobloque agitado con temperatura controlada (HCM-100Pro Dragon Lab) que permite mantener en agitación la muestra durante la incubación. Los valores obtenidos de azúcares reductores por la técnica de Somogyi-Nelson (145) fueron comparados con una curva de calibrado de glucosa. Una unidad de actividad (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para producir el equivalente reductor a 1 μ mol de glucosa en 1 min bajo las condiciones específicas para cada ensayo.

9.5.3. Actividad xilanasa

Del mismo modo que para la determinación de la actividad de las celulasas, para determinar actividad β -1,4-xylanasa se utilizó la cuantificación de azúcares reductores generados a partir del sustrato mediante la técnica de Somogyi-Nelson (145) . La medida de actividad se realizó en volumen final de 50 μ l, en donde se utilizó una dilución adecuada de enzima que asegure condiciones de velocidad inicial (consumo de sustrato menor al 5%), *buffer* acetato de sodio 100 mM pH 6 y utilizando como sustrato xilanos de diferentes fuentes y composición como

4-O-metil-D-glucurono-xilano, xilano de *Beachwood* y arabinoxilano. Las medidas se realizaron en termobloque agitado con temperatura controlada (HCM-100Pro Dragon Lab) que permiten mantener en agitación la muestra durante la incubación. Los valores obtenidos de azúcares reductores por la técnica de Somogyi-Nelson fueron comparados con una curva de calibrado de xilosa. Una unidad de actividad (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para producir el equivalente reductor a 1 μmol de xilosa en 1 min bajo las condiciones específicas para cada ensayo.

9.5.4. Actividad fosforilasa

La actividad de las enzimas GP se ensayó en ambos sentidos de reacción. La reacción de síntesis se determinó a partir del monitoreo de la liberación de Pi desde dador glucosilo de la reacción, utilizando un método colorimétrico de alta sensibilidad (148–150). El medio de reacción estándar estaba compuesto por *buffer* acetato de sodio 100 mM a pH 6,0, una dilución adecuada de la enzima y diferentes dadores como Glc-1P, GlcN-1P a una concentración de 10 mM, y diferentes aceptores como glucosa, celobiosa, celotriosa, celotetraosa, celopentosa, celohexaosa, xilosa, glucosamina a una concentración de 20 mM, todo esto en un volumen final de 50 μl . Las reacciones se incubaron en termobloque agitado con temperatura controlada (HCM-100Pro Dragon Lab) y se detuvo con la adición del reactivo verde de malaquita. El complejo formado con Pi se midió a 630 nm en un lector de microplacas Multiskan GO (Thermo Scientific). Para la determinación de la actividad fosforolítica, las medidas de actividad se llevaron a cabo en volumen final de 50 μl , en las que se utilizó una dilución adecuada de enzima, *buffer* acetato de sodio 100 mM a pH 6,0, 20 mM fosfato de sodio y 20 mM celobiosa. La reacción se detuvo incubando la mezcla a 100 °C por 5 minutos y la glucosa liberada producto de la fosforólisis de la celobiosa se cuantificó por el método glucosa oxidasa-peroxidasa (GOD-POD) (151). Cuando un oligosacárido ($n \geq 3$) fue utilizado como sustrato, se midió la arsenólisis, teniendo en cuenta que se determinó que la afinidad de las enzimas por el arseniato era igual a la del Pi (152), pero en este caso, generando un azúcar-1-arseniato inestable. Para ello, se incubó el sustrato en una mezcla de reacción de 50 μL que contenía *buffer* acetato de sodio 100 mM (pH 6,0), arseniato de sodio 20 mM y una dilución enzimática adecuada). La D-glucosa liberada como consecuencia de la inestabilidad del azúcar-1-arseniato producto de la arsenólisis, se cuantificó mediante el método GOD-POD (151). Una unidad de actividad (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de producto en 1 min bajo las condiciones específicas para cada ensayo.

9.5.5. Determinación de parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos V_{max} y K_M (siendo este último la concentración de sustrato a la que se alcanza el 50% de la velocidad máxima, V_{max}) fueron determinados realizando ensayos donde se hizo variar la concentración de uno de los sustratos, manteniendo los otros a

concentraciones fijas y saturantes (a menos que se indique lo contrario). El consumo de sustrato se mantuvo por debajo del 10% como control para asegurar la determinación adecuada de la velocidad inicial (v_0). Los datos cinéticos obtenidos se graficaron como velocidad inicial en $U \cdot mg^{-1}$, versus la concentración del sustrato variable en mM o $mg \cdot ml^{-1}$. Los parámetros cinéticos fueron calculados mediante ajuste por regresión no lineal utilizando la ecuación de Michaelis-Menten y el programa informático *OriginPro*TM 8.1. Los valores obtenidos implican un promedio de un mínimo de tres juegos de determinaciones independientes de los parámetros que fueran reproducibles dentro de un marco de variación de $\pm 10\%$.

9.5.6. Determinación de procesividad de celulasas

La procesividad de las celulasas se determinó midiendo la relación de las fracciones de azúcares reductores solubles e insolubles generadas a partir de sustratos insolubles como celulosa o papel de filtro (153,154). En resumen, la reacción se llevó a cabo con 10 mg/ml del sustrato correspondiente, 2 μM enzima en 50 mM de *buffer* acetato de sodio a pH 5, durante 20 min a 55 °C en un volumen de 0,25 ml. La reacción se detuvo incubando la mezcla en termobloque por 10 min a 100 °C. A continuación, la muestra fue centrifugada a 5.000 xg por 10 min y se separaron la fracción insoluble del sobrenadante. La cantidad de azúcares reductores en la fracción soluble fue medida directamente desde el sobrenadante mediante el método de Somogyi – Nelson (145). El precipitado se lavó exhaustivamente, y luego se suspendió en el volumen inicial de reacción (0,25 ml). La fracción de azúcares reductores insolubles se midió a partir de esta suspensión de la fracción insoluble, utilizando celobiosa como estándar.

9.5.7. Determinación de condiciones óptimas y estabilidad al pH y la temperatura

La condición de pH óptimo de actividad de cada enzima en particular se determinó midiendo la actividad enzimática como se describió en los puntos 9.5.2, 9.5.3 o 9.5.4 modificando las especies *buffer*, utilizando citrato de sodio/citrato en el rango de 3 a 5, acetato de sodio/acetato en el rango 4 a 6, y las especies fosfato de sodio/ fosfato en el rango de 6 a 9. Del mismo modo, se determinó la temperatura óptima de cada una de las enzimas, llevando a cabo la reacción a diferentes temperaturas en el rango de 20 a 70 °C.

Para el análisis de estabilidad de las enzimas frente al pH, la enzima fue incubada en 100 mM de las diferentes especies *buffer* mencionadas anteriormente durante 1 h, luego se realizó la dilución adecuada de la enzima y se determinó la actividad enzimática remanente en las condiciones óptimas de actividad. De la misma manera, se determinó la estabilidad térmica, incubando las enzimas en 100 mM de *buffer* acetato de sodio/ acetato pH 6, durante 1 h a diferentes temperaturas en el rango de 0 a 70 °C. La actividad residual de la enzima se determinó

en condiciones óptimas de reacción y se comparó con una muestra que no fue sometida a la incubación.

9.6. Capacidad de unión a sustratos insolubles

La capacidad de unión de cada enzima a diferentes polisacáridos insolubles se determinó incubando la enzima a analizar (0,1 mg) con 5 mg de polisacárido (1 % p/V) en un volumen de reacción de 0,5 mL conteniendo 100 mM de *buffer* acetato de sodio (pH 6,0) durante 1 h a 25 °C en agitación continua (800 rpm) en termobloque agitado con temperatura controlada (HCM-100Pro Dragon Lab). Luego del periodo de incubación, la muestra se centrifugo a 3.000 xg por 5 min, se separó el sobrenadante, y la proteína remanente en el sobrenadante fue cuantificada por el método de Bradford (138) y actividad enzimática correspondiente. El polisacárido insoluble remanente, fue lavado tres veces con *buffer* acetato de sodio (pH 6,0), y la proteína unida a éste, se eluyó con 0,5 ml de SDS 10 % (p/v) incubando a 90 °C por 10 min. El porcentaje de enzima unida a cada uno de los polisacáridos se determinó a partir de la diferencia entre la concentración de enzima en el control (enzima incubada en ausencia de sustrato) y la concentración de enzima remanente en el sobrenadante luego de la incubación con sustrato. Para el análisis del efecto de diferentes agentes (reductores, oxidantes, temperatura, etc.) sobre capacidad de unión, la enzima fue tratada con el agente correspondiente durante un período de tiempo determinado para luego llevar a cabo el ensayo de unión como fue previamente descrito. Se analizaron diferentes polisacáridos de naturaleza insoluble como celulosa, papel de filtro, aserrín de madera de pino, quitina y arabinosilano (fracción insoluble). Cada una de las fracciones (unida al sustrato y libre en sobrenadante) fue analizada por SDS-PAGE.

9.6.1. Determinación de los parámetros de adsorción

Los parámetros de adsorción fueron calculados de acuerdo a métodos descriptos anteriormente (155,156) a partir de las isothermas de adsorción de Langmuir utilizando la siguiente ecuación:

$$\frac{E_{ads}}{S} = \frac{E_{inicial} - E_{libre}}{S} = \frac{E_{Max} * E_{libre}}{K_d + E_{libre}} \quad (Ec.2)$$

Dónde: E_{ads}/S es la cantidad de enzima adsorbida al sustrato ($\mu\text{mol enzima /g sustrato}$); E_{libre} es la cantidad de enzima libre en solución ($\mu\text{mol enzima/L}$), E_{Max} es la máxima capacidad de adsorción ($\mu\text{mol enzima /g sustrato}$); K_d es la constante de disociación ($\mu\text{mol enzima/L}$) y A es una medida de la fuerza de adsorción de la enzima que se calcula a partir de E_{Max} y K_d ($A = E_{Max}/K_d$). Los datos de E_{ads}/S y E_{libre} fueron graficados y las isothermas de unión fueron ajustadas al modelo de Hill en el programa OriginPro 8.1, de donde se obtuvieron los parámetros E_{Max} y K_d .

9.7. Cromatografía en capa delgada (TLC)

El perfil de azúcares generado luego de las reacciones de hidrólisis se analizó cualitativamente por cromatografía en capa delgada en placas de sílica gel (Merk). Se sembraron 2 µl de las distintas muestras y de los estándares (5 mM) en un extremo de la placa, a 1 cm del borde inferior y con separación entre ellas de 1 cm. La placa sembrada se colocó en posición vertical dentro de una cuba de vidrio previamente saturada por incubación durante 2 h con una solución solvente de acetato de etilo: ácido acético: agua (4:3:2). Cada placa se incubó permitiendo el ascenso del solvente por la misma, hasta alcanzar 1 cm por debajo del borde superior de la placa (1 h aproximadamente), se retiró de la cuba y se dejó secar. Por último, las placas se rociaron con una solución de 0,25 mg orcinol (Sigma Aldrich) en 10 ml de etanol: ácido sulfúrico (95:5), se secaron y se revelaron por exposición al calor utilizando una pistola de calor, para la visualización de los azúcares (157).

9.8. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Los azúcares solubles se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución en un equipo Shimadzu LC-2050 (Merck, Darmstadt, Germany) usando una columna Luna Omega 3µm NH₂ (100 Å, 150 × 4,6 mm; Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) operada a 30 °C con un detector de índice de refracción (IR) RID-20A (30 °C). Se realizó una elusión isocrática con una solución de Acetonitrilo-H₂O (65:35, volúmenes) a un flujo de 1 ml/min. Para la cuantificación de los celo-oligosacáridos se construyó de una curva de calibrado utilizando estándares de celobiosa (C2), celotriosa (C3) y celotetraosa (C4) (CarboSynth).

Previo al análisis mediante HPLC, los sobrenadantes de reacción fueron filtrados y concentrados en una mini columna Bio-Gel P6 (Bio-Rad) (5 kDa) con el objetivo de eliminar las proteínas del medio de reacción.

9.9. Cuantificación de celo-oligosacáridos insolubles

Para la cuantificación de celo-oligosacáridos insolubles generados como producto de la síntesis enzimática mediada por las glucosil fosforilasas, se adaptó la técnica de fenol-ácido sulfúrico de Dubois 1956 (144). A 50 µl de la muestra incógnita del oligosacárido (previamente lavado y purificado), se le adicionan 2 µl de fenol al 80% (p/v) en H₂O, seguidamente se procede al agregado de 250 µl de ácido sulfúrico concentrado. Se homogeniza y se incuba durante 10 min a 40 °C. Por último, se dispensan 250 µl en placa de 96 pocillos y se lee a 492 nm. Las absorbancias obtenidas se compararon con una curva de calibrado de glucosa o celulosa.

9.10. Alineamientos múltiples de secuencias

La búsqueda de homólogos para realizar los alineamientos de secuencias fue realizada utilizando las opciones brindadas por la herramienta BLASTP del NCBI. En los casos que se requirieren alineamiento de proteínas con homología restringida a dominios, se utiliza la herramienta DELTA-BLAST (*Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST*) (158). Las bases de datos utilizadas dependieron de la comparación en cada caso (UniProtKB/Swiss-Prot; nr; PDB). Los parámetros del algoritmo fueron configurados de la siguiente manera: longitud de palabra de 3; matriz BLOSUM62; y un costo de GAP predeterminado. Los alineamientos fueron llevados a cabo mediante la herramienta *ClustalW* a partir del *software* BioEdit utilizando los parámetros predeterminados.

9.11. Modelado molecular

La construcción de los modelos tridimensionales a partir de la secuencia de aminoácidos de las proteínas de interés se realizaron a través de la plataforma *ColabFold* (159), la cual combina la búsqueda de secuencias homologas por MMseqs2 ya predicción de estructuras mediante AlphaFold2 (160) o RoseTTAFold (161), de donde se seleccionó el mejor modelo, de los cinco generados, a partir de los puntajes de los parámetros pLDDT, y pTM (162). Los modelos obtenidos para cada una de las enzimas fueron comparados con las estructuras cristalográficas de las proteínas homologas con mayor porcentaje de similitud y cobertura encontradas, obtenidas como se describió en el punto 9.10, en este caso, a través de la búsqueda por BLAST (163) contra la base de datos del PDB (164).

Para la visualización, manipulación de los modelos, superposición con las estructuras cristalográficas y cálculos de diferentes parámetros de las estructuras se utilizó el *software* *ChimeraX* (165).

9.12. Ensayo de corrimiento de estabilidad térmica

El esquema básico del ensayo de corrimiento de estabilidad térmica implica la incubación de la proteína plegadas en su forma nativa con SYPRO *Orange* en una placa de PCR de 96 pocillos. Mediante un aumento sistemático de la temperatura y la monitorización concomitante de la emisión de fluorescencia de SYPRO *Orange*, es posible monitorizar la desnaturalización térmica de la proteína en muchas condiciones simultáneamente. El aumento de la temperatura de fusión (T_m) en diferentes condiciones de *buffer* o diferentes concentraciones de analito da lugar a

un desplazamiento térmico que cuantifica la estabilización de la proteína. La misma propiedad se utiliza para identificar ligandos, que tienden a estabilizar las proteínas al unirse (166,167) .

Se utilizó un dispositivo de PCR en tiempo real (sistema *StepOne PLUS Real Time PCR*) para controlar la desnaturalización de las proteínas mediante el aumento de la fluorescencia del fluoróforo SYPRO *Orange* (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se incubaron muestras de proteína (0,15 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$) en *buffer* acetato de sodio 50 mM (pH 6,0) que contenían la concentración apropiada de ligando (1-10 mM) en un volumen de reacción de 20 μL en microplacas de 96 pocillos (MJ *Research*, Cambridge, MA) en el dispositivo de RT-PCR.

Las muestras se calentaron a 1 $^{\circ}\text{C}$ por min, desde 25 $^{\circ}\text{C}$ a 95 $^{\circ}\text{C}$. La intensidad de la emisión de fluorescencia se midió con el dispositivo a 570 nm. Las intensidades de fluorescencia se representaron gráficamente en función de la temperatura mediante el software del sistema de PCR en tiempo real *StepOne PLUS*. La temperatura de fusión se identificó fácilmente trazando la primera derivada de la emisión de fluorescencia en función de la temperatura ($-dF / dT$). Aquí, T_m se representa como la parte más baja de la curva.

9.13. Diseños experimentales de superficie respuesta

Para determinar las concentraciones óptimas de cada una de las enzimas para la degradación del sustrato lignocelulósico (aserrín de madera de pino), se llevó a cabo un diseño experimental correspondiente a una mezcla de componentes en el software *Desing Expert 7.0.0*. Los componentes de la mezcla optimizados corresponden a las concentraciones de las celulasas *RalCel15G* y *RalCel48A* y de la xilanasas *RalXyn10A*, cuyas concentraciones finales se establecieron en el rango de 0 a 10 μM para un volumen final de reacción 0,25 ml en tubos *Eppendorf* de 1,5 ml incubados a 800 rpm a 50 ± 1 $^{\circ}\text{C}$ durante 4 h, con una carga inicial de sustrato de 1 mg/ml. Las dieciséis corridas experimentales del diseño se detallan en la Tabla 2. Transcurrido el tiempo de reacción, las muestras fueron centrifugadas a 20.000 xg y se determinó la concentración de azúcares reductores del sobrenadante mediante el método de Somogyi - Nelson.

Tabla 2. Componentes evaluados en el modelo de superficie de respuesta

N°	Corrida	Componente 1: <i>RalCel5G</i> (μM)	Componente 2: <i>RalCel48A</i> (μM)	Componente 3: <i>RalXyn10A</i> (μM)
1	5	0,0	0,0	10,0
2	10	0,0	10,0	0,0
3	6	5,0	0,0	5,0
4	13	5,0	5,0	0,0
5	12	10,0	0,0	0,0
6	4	0,0	5,0	5,0
7	8	6,7	1,6	1,7
8	7	1,6	6,7	1,7
9	9	1,7	1,7	6,6
10	15	0,0	1,7	8,3
11	14	3,4	3,3	3,3
12	1	3,3	3,4	3,3
13	2	3,3	3,3	3,4
14	3	3,3	3,3	3,3
15	16	10,0	0,0	0,0
16	11	0,0	10,0	0,0

10. RESULTADOS

La biomasa lignocelulósica constituye la fuente mayoritaria de materia prima para proporcionar monosacáridos como xilosa, arabinosa, glucosa, manosa, galactosa, ramnosa para ser fermentados o utilizados para la síntesis de nuevos polímeros de estructura definida (34). Como se mencionó anteriormente, *R. albus* es una de las principales bacterias celulolíticas presentes en el rumen, capaz de degradar tanto la celulosa como la hemicelulosa, para lo cual expresa un amplio repertorio de enzimas. En el proteoma de *R. albus* 8 (ID: [UP000004259](#)) se identificaron numerosas secuencias codificantes para posibles glicosil hidrolasas, dentro de las que se diferenciaron endoglucanasas de la familia GH5, celobiohidrolasas pertenecientes a GH9 y GH48, hemicelulasas de las familias GH2, GH3, GH10, GH11, GH43, GH51 y GH67 y GP del tipo GH94 (128,131,168,169). Particularmente, se identificó que los transcritos pertenecientes a CAZy con mayor expresión en *R. albus*, codifican para proteínas que poseen al menos un CBM de la familia CBM37, siendo las secuencias de celulasas pertenecientes a GH9 (26%), GH48 (16%) y GH5 (7%), las mayormente expresadas (128).

Anteriormente, la principal atención se centró en las enzimas involucradas en la degradación de la celulosa. Por ejemplo, la caracterización de mutantes de *R. albus* 8 defectuosos en la adhesión a celulosa identificó que las glucanasas Cel48A y Cel9B, serían la potencial causa de tal fenotipo (126). Además, la caracterización bioquímica de glucanasas de la familia GH5 de *R. albus* 8 reveló que Cel5G (Ra0903) se destaca como la EG con mayor actividad [159]. En cambio, los estudios de las enzimas involucradas en la degradación de la hemicelulosa incluyen la caracterización de endoxilanasas de las familias GH10 y GH11, una β -xilosidasa, una α -L-arabinofuranosidasa y una α -glucuronidasa (168). En cuanto a los estudios bioquímicos de las GP de la familia GH94 de *R. albus*, la CBP de *R. albus* NE1 mostró un mecanismo inusual de inhibición por sustrato (170), mientras que en la caracterización de CDP de *R. albus* NE1 identificó muy baja afinidad por los sustratos Glc-1P y Pi, lo cual es inusual en este tipo de enzimas (171).

Hasta el momento, la información respecto a la interacción entre las enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas de ruminococos es escasa, a pesar de la importancia que ambas tienen en la degradación eficiente del material lignocelulósico. Es por ello que, en este trabajo de Tesis, se realizó la caracterización estructural y bioquímica de las enzimas celulíticas (Cel5G y Cel48A), la xilanasa (Xyn10A) y las glicosil fosforilasas (CBP y CDP) de *R. albus* 8. Además, se analizó la interacción entre estas enzimas y entre los distintos dominios estructurales identificados en las proteínas, con el objetivo de comprender como afectan a los rendimientos en la degradación de sustratos lignocelulósicos y en la síntesis de polisacáridos de composición definida.

10.1. Caracterización de celulasas de *R. albus* 8

10.1.1. Análisis de secuencias de amino ácidos y construcción de modelos 3D

Las secuencias aminoacídicas de las proteínas *RalCel5G* y *RalCel48A* se obtuvieron a partir de información almacenada en el proteoma de *R. albus* 8 (ID: [UP000004259](#)). Con ellas, se realizó una búsqueda de secuencias homólogas y un análisis de estructura primaria mediante la herramienta SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*) (172) para la identificación de los diferentes dominios estructurales que componen a cada una de las enzimas. Se identificó que *RalCel5G* está compuesta por un péptido señal de secreción de 24 aminoácidos, seguido por un dominio GH5 (aminoácidos 44 a 457) y hacia su extremo C-terminal, dos dominios del tipo fibronectina tipo 3, comprendidos entre los aminoácidos 500 a 583 y 591 a 682. Por otro lado, *RalCel48A* está constituida por un péptido señal de 24 aminoácidos, seguido de un dominio de la familia GH48 (aminoácidos 38 a 775) y en su extremo C-terminal también se identificó un dominio fibronectina tipo 3 comprendido entre los aminoácidos 782 a 872. Estos dominios del tipo fibronectina 3 fueron caracterizados como una nueva clase de CBM, agrupados en la familia 37 que, hasta el momento, sólo han sido identificados en *R. albus* y descriptos como módulos que poseen afinidad por una amplia gama de sustratos (127).

En cuanto a los dominios GH, se realizó una búsqueda de proteínas con homología restringida a dominios (DELTA-BLAST) contra la base de datos de secuencias de UniProtKB/SwissProt. Los resultados mostraron que el dominio GH de *RalCel5G* tiene una identidad de secuencia de entre 28 y 52% con las celulasas de la familia GH5. Dentro de este grupo de enzimas, se identificó que seis de ellas poseen actividad exclusivamente EG y una de ellas además presenta también actividad CBH. Por otro lado, el análisis de *RalCel48A*, mostró que el dominio catalítico presenta una identidad de secuencia de entre 40 y 42% con otras celulasas de la familia GH48, de las cuales cuatro presentan actividad EG y tres, actividad CBH (Tabla 3).

Tabla 3. Resultado de la búsqueda de proteínas homólogas mediante la herramienta DELTA-BLAST

Enzima	Número de acceso/ Código PDB	Actividad	Especie	E-value	Identidad (%)
GH5	Q05332.1	Endoglucanasa	<i>Acetivibrio thermocellus</i> ATCC 27405	9×10^{-72}	51,9
	P10474.1	Endoglucanasa/ exoglucanasa	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	1×10^{-58}	44,6
	P50400.1	Endo- β -1,4- glucanasa	<i>Cellulomonas fimi</i>	4×10^{-54}	41,1
	P04956.1	Endo- β -1,4- glucanasa	<i>Acetivibrio thermocellus</i> ATCC 27405	5×10^{-53}	39,9
	P23548.2	Endo- β -1,4- glucanasa	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	1×10^{-51}	32,2
	1ECE	Endo- β -1,4- glucanasa	<i>Acidothermus cellulolyticus</i> 11B	2×10^{-49}	29,6
	4TUF	Endo- β -1,4- glucanasa	<i>Xanthomonas campestris</i> str. ATCC 33913	1×10^{-46}	27,9
GH48	1L1Y	β -1,4- celobiohidrolasa	<i>Acetivibrio thermocellus</i>	0,0	42,6
	P50900.2	β -1,4- celobiohidrolasa II	<i>Thermoclostridium stercorarium</i>	0,0	42,4
	6D5D	Endo- β -1,4- glucanasa	<i>Caldicellulosiruptor danielii</i>	0,0	42,0
	P37698.2	Endo- β -1,4- glucanasa	<i>Ruminiclostridium cellulolyticum</i> H10	0,0	40,5
	P50899.1	β -1,4- celobiohidrolasa	<i>Cellulomonas fimi</i> ATCC 484	0,0	39,6
	1F9D	Endo- β -1,4- glucanasa	<i>Clostridium cellulolyticum</i>	2×10^{-153}	39,0
	5BV9	β -1,4- celobiohidrolasa	<i>Bacillus pumilus</i>	5×10^{-128}	36,7

A partir de la secuencia aminoacídica de cada una de las proteínas *RalCel5G* y *RalCel48A*, se generaron modelos tridimensionales mediante la herramienta AlphaFold 2, sin tener en cuenta las regiones péptido señal. Los modelos obtenidos mostraron claramente que *RalCel5G* y *RalCel48A* están compuestas por dominios independientes, como había sido predicho, y que en ambas proteínas los dominios CBM37 se encuentran conectados a los correspondientes dominios catalíticos por regiones de alta flexibilidad.

La similitud de secuencia entre los dominios CBM37 presentes en estas enzimas se analizó mediante el alineamiento de las secuencias aminoacídicas, en donde se encontró que el único dominio CBM37 de *RalCel48A* y el CBM37_2, ubicado hacia el extremo C-terminal de *RalCel5G* (aminoácidos 591 a 682), presentan un alto porcentaje de similitud (80%), mientras

que el CBM37_1 de *RalCel5G* (aminoácidos 500 a 583) presenta una similitud considerablemente menor con el CBM37_2 de *RalCel5G* (26 %) y el CBM37 de *RalCel48A* (25 %) (Figura 4A).

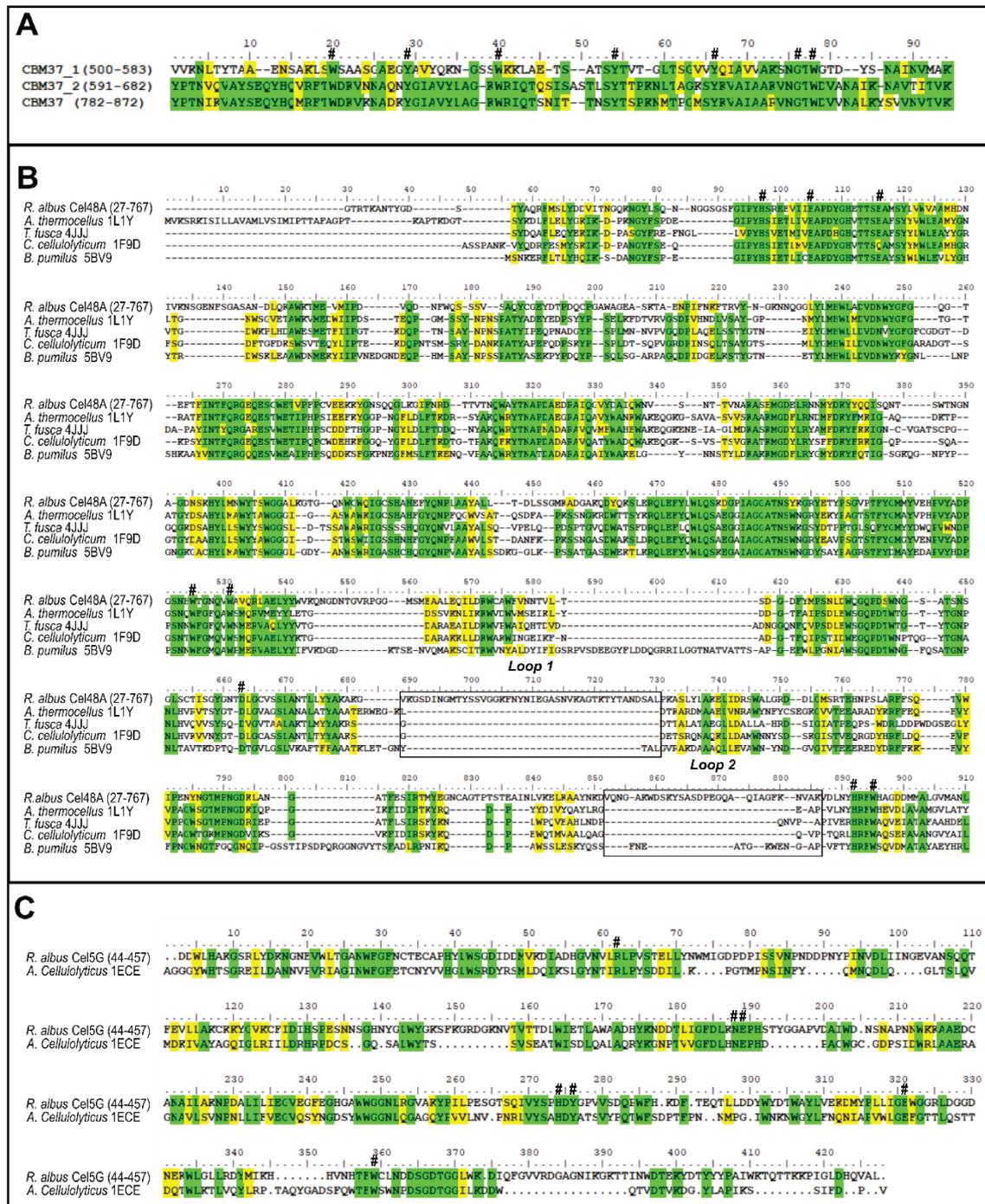


Figura 4. Alineamientos de secuencias de los diferentes dominios que conforman las celulasas *RalCel5G* y *RalCel48A*. **A:** Dominios de unión a carbohidratos de la familia 37; **B:** Dominio catalítico de la familia GH48 perteneciente a *RalCel48A*; **C:** Dominio catalítico de la familia GH5 perteneciente a *RalCel5G*. Los aminoácidos conservados involucrados en la interacción con el sustrato se marcan con #.

Los modelos de los tres dominios CBM37 presentes en estas enzimas fueron comparados mediante la superposición de sus estructuras, la cual presentó un RMSD global de 1,2 Å,

indicando que poseen una elevada conservación estructural a pesar de la baja similitud encontrada entre la secuencia aminoacídica del CBM37_1 de *RalCel5G* con los demás CBM37 presentes en estas proteínas. Cuando las secuencias aminoacídicas de estos CBMs se contrastaron con todas las secuencias pertenecientes a CBM37 de la base de datos de CAZy (46), se identificó que los aminoácidos W20, Y29, W40, Y54, Y66, G76 y W78 se encuentran altamente conservados. A partir de los modelos obtenidos para los CBM37 presentes en *RalCel5G* y *RalCel48A*, se observó que particularmente los aminoácidos W20, Y29, W40 e Y54 se ubican de manera alternada, formando una superficie plana e hidrofóbica, la cual podría conformar el sitio de unión al sustrato de esta familia de CBMs (Figura 5A).

En cuanto al modelo obtenido para *RalCel48A* presentó una estructura del tipo barril $(\alpha/\alpha)_6$ con un sitio catalítico en forma de túnel intrínsecamente estable (Figura 5B), la cual ha sido identificada en numerosos miembros de la familia GH48 (173–176). La comparación de la estructura obtenida con aquellas de diferentes enzimas ampliamente caracterizadas de la familia GH48 como la celobiohidrolasa CelS de *A. thermocellus* (PDB: 1L1Y) (173), la endoglucanasa procesiva de la familia GH48 CelF de *C. cellulolyticum* (PDB: 1F9D) (174), la *TfCel48A* de *T. fusca* (PDB: 4JJJ) (175) y la celulasa *BpumGH48* de *B. pumilus* (PDB: 5BV9) (176), evidenció que la estructura central se encuentra altamente conservada. Sin embargo, como se observa en la Figura 5B, existen diferencias en dos *loops* que se ubican en la región de la entrada del túnel catalítico, lo cual podría influir sobre la procesividad de la enzima, la liberación del producto y/o en la capacidad de la enzima de interactuar con el sustrato, modificando la actividad catalítica observada en otras CBH de la familia GH48.

En la Figura 5C se observa la superposición estructural entre el dominio GH5 del modelo obtenido para *RalCel5G* y la estructura cristalina de la endoglucanasa E1 de *A. cellulolyticum* (PDB: 1ECE), la cual fue cristalizada en presencia del sustrato celotetraosa con una resolución de 2,4 Å (177). Esta superposición reveló una elevada similitud entre las estructuras (RMSD: 0,85 Å), principalmente en la región del sitio de unión al sustrato. Como se muestra en la Figura 4C, el alineamiento entre las secuencias mostró que los aminoácidos del sitio de unión característicos a la familia GH5 se encuentran completamente conservados (R103, N229, E230, H314, Y316, E359, W390). Analizando la región del sitio activo, se puede evidenciar que la misma presenta una conformación tipo “canal”, con elevada accesibilidad del solvente (Figura 5C). En el alineamiento se observa también que los aminoácidos aromáticos que interactúan con la cara hidrofóbica de cada residuo de glucosa del polisacárido se encuentran en su mayoría conservados (F70, W390, W288), con la excepción de la mutación en el residuo tirosina 245 de 1ECE por serina (S321 en *RalCel5G*). Además, al igual que en la endoglucanasa E1 (177), existe una posible extensión del sitio activo debida a la presencia de un

residuo de triptófano (W83) que podría generar un sitio adicional de unión para las unidades de glucosa ubicadas hacia el extremo no reductor del polisacárido.

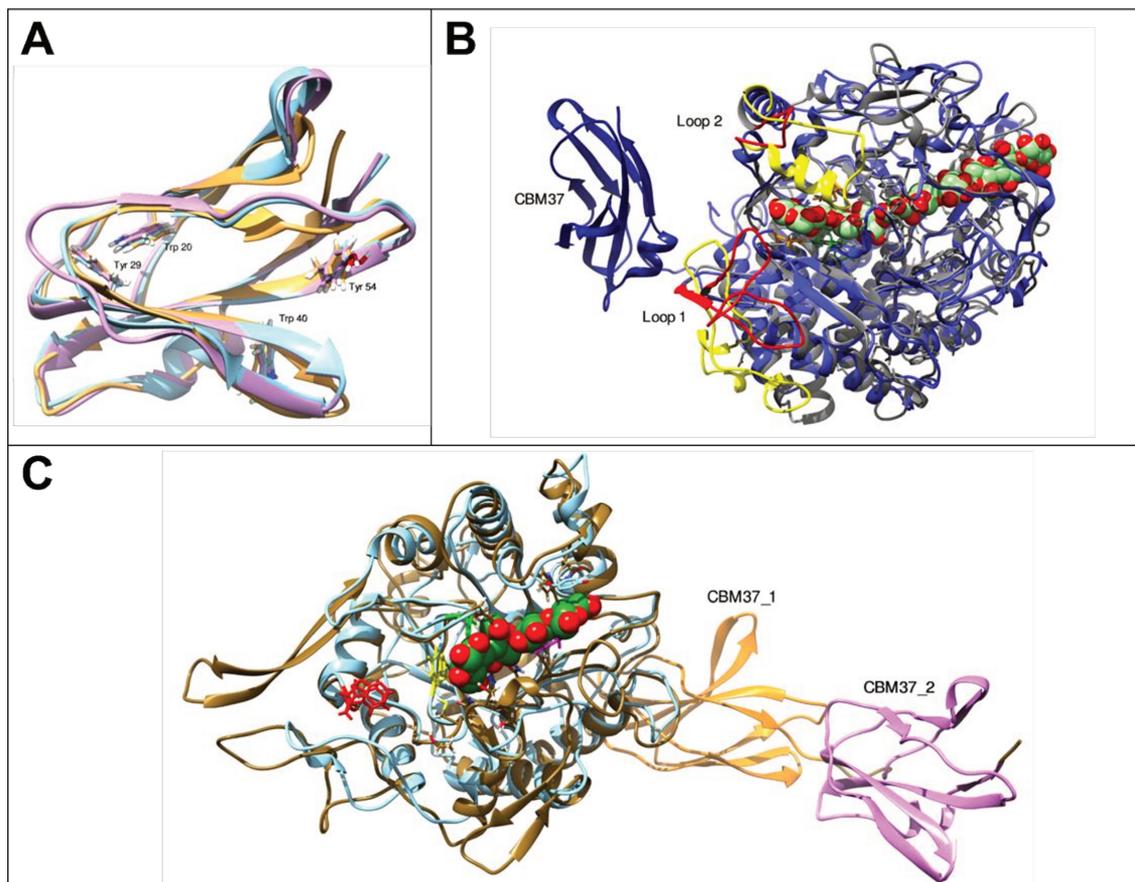


Figura 5. **A:** Superposición de los modelos tridimensionales obtenidos para el CBM37 de *RalCel48A* (celeste), CBM37_1 (naranja) y CBM37_2 (magenta) de *RalCel5G*; **B:** Superposición estructural del dominio GH de *RalCel48A* (azul) con la celulasa *BpumGH48* (PDB 5BV9) (gris), los *loops* de *RalCel48A* se marcan en amarillo y en rojo los de *BpumGH48*; **C:** Superposición estructural del dominio GH de *RalCel5G* (marrón) con el de la endoglucanasa E1 (PDB 1ECE) (celeste).

10.1.2. Clonado y expresión recombinante

Ambos genes codificantes para *RalCel5G* y *RalCel48A* se obtuvieron mediante síntesis *de novo* (Bio Basic Inc.), de acuerdo a la información obtenida previamente, excluyendo la secuencia correspondiente al péptido señal de ambas proteínas. Los genes fueron optimizados para la expresión recombinante en células de *E. coli* y se agregaron sitios para las enzimas de restricción *NdeI* y *HindIII* en los extremos 5' y 3', respectivamente. Tales sitios, fueron posteriormente utilizadas para el subclonado de los genes en el vector de expresión pET28c, el cual permite obtener altos niveles de producción de la enzima en forma recombinante, fusionada a una etiqueta de histidinas en el N-terminal, lo cual facilita su purificación mediante cromatografía IMAC.

Con las construcciones [pET28c/*ralcel5g*] y [pET28c/*ralcel48a*], se procedió a la transformación de células de diferentes cepas de *E. coli*, entre ellas BL21 (DE3), BL21 (DE3) Codon Plus, SHuffle T7, Rosetta Gami, SoluBL21. Con estas transformantes se buscaron las condiciones óptimas para la producción de la proteína recombinante, realizando ensayos de expresión en diferentes medios de cultivo, temperaturas y concentraciones de inductor (IPTG), con el objetivo de maximizar el rendimiento de la proteína de interés. Los mejores niveles de expresión y actividad enzimática de la proteína *RalCel5G* se obtuvieron en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus en medio LB inducidas con 0,2 mM de IPTG a 24 °C durante 16 h, mientras que para la proteína *RalCel48A*, los mejores rendimientos se obtuvieron en la cepa *E. coli* SoluBL21 en medio LB inducidas con 0,2 mM de IPTG a 20 °C durante 16 h.

Seguidamente se procedió al escalado a 2 L de cultivo en las condiciones determinadas previamente. Las células se cosecharon, se sonicaron y centrifugaron a 15.000 xg para conservar el sobrenadante, a partir del cual se realizó una purificación por cromatografía IMAC-Ni²⁺, seguida de cromatografía de filtración por gel Superdex G-200. Con las muestras conteniendo la mayor actividad enzimática se realizó un pool, se suplementó con 20% (v/v) de glicerol y se almacenó a -80°C, como se describió en el punto 9.3.15. El análisis por SDS-PAGE de las proteínas purificadas mostró una única banda de aproximadamente 70 kDa y 90 kDa, para *RalCel5G* y *RalCel48A*, respectivamente, lo cual se corresponde con la masa teórica de cada una de ellas. *RalCel5G* está conformada por 651 aminoácidos y posee una masa molecular teórica de 74,2 kDa, mientras que *RalCel48A* posee 848 aminoácidos con una masa teórica de 94,6 kDa, incluyendo la etiqueta de histidinas.

10.1.3. Determinación de las condiciones de temperatura y pH óptimos

Se determinaron las condiciones de temperatura y pH óptimos para la actividad de cada una de las enzimas, para lo se realizaron ensayos en el rango de 20 °C a 70 °C y en diferentes especies *buffer* entre pH de 3 y 9. Como se observa en la Figura 6A, las enzimas presentaron temperaturas óptimas similares, de 50 °C y 55 °C para *RalCel48A* y *RalCel5G*, respectivamente. Cuando la temperatura se incrementó por encima de la determinada como óptima, *RalCel5G* presentó un 70 % de su actividad enzimática a 60 °C y fue totalmente inactiva a 70 °C, mientras que la actividad de *RalCel48A* se conservó por encima del 50 % a temperaturas de 55 °C o mayores (hasta 70 °C). Del mismo modo, a temperaturas inferiores, *RalCel48A* preservó un 90 % de su actividad enzimática máxima en el rango de 40 °C a 50 °C, mientras que la actividad de *RalCel5G* fue cercana al 80 % entre 45 °C y 50 °C y menor al 40 % a temperaturas inferiores al 40 °C. Cuando se analizó la estabilidad térmica de ambas enzimas, se observó que la actividad enzimática disminuyó por debajo del 50 % cuando se incubaron por 1 h a temperaturas mayores a 60 °C, alcanzando un 80 % de inactivación a temperaturas de 65 °C para *RalCel5G* y 70 °C para

RalCel48A. Sin embargo, ambas enzimas conservaron más del 60 % de su actividad inicial, cuando se incubaron a temperaturas de 50 °C o inferiores (Figura 6B).

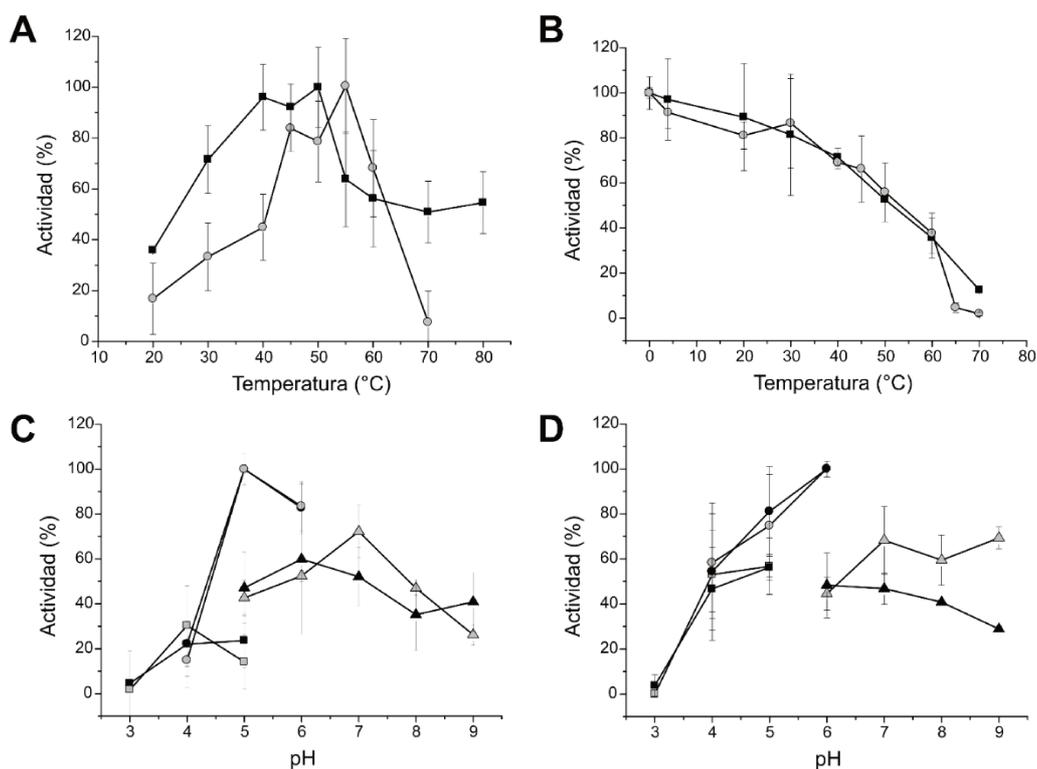


Figura 6. A y B: Condiciones óptimas de temperatura y estabilidad térmica para *RalCel5G* (gris) y *RalCel48A* (negro). **C y D:** Condiciones óptimas de pH y estabilidad al pH de *RalCel5G* (gris) y *RalCel48A* (negro). Ambas enzimas fueron incubadas por 1 h en las diferentes condiciones de temperatura o pH: *buffer* citrato de sodio/citrato (cuadrados), acetato de sodio/acetato (círculos), fosfato de sodio/fosfato (triángulos).

En cuanto a las determinaciones de pH óptimo, se utilizaron las especies *buffer* citrato de sodio/citrato en el rango de 3 a 5, acetato de sodio/acetato en el rango 4 a 6, y las especies fosfato de sodio/ fosfato en el rango de 6 a 9. Ambas enzimas presentaron máxima actividad en *buffer* acetato de sodio a pH 5 y una actividad superior al 80 % cuando se ensayó a pH 6 en la misma especie *buffer* (Figura 6C). No se observaron cambios significativos producidos por la estructura química particular de ninguno de los *buffers* utilizados. En cuanto a la estabilidad al pH, ambas enzimas conservaron más del 80 % de su actividad cuando fueron incubadas en *buffer* acetato de sodio en el rango de pH de 5 a 6. Del mismo modo, se logró conservar más del 60 % de la actividad enzimática cuando se incubaron en *buffer* fosfato de sodio en el rango de 6 a 9 para el caso de *RalCel5G* y en el rango de 6 a 8 para *RalCel48A*. Ambas enzimas presentaron una muy baja estabilidad a pH menores a 5, perdiendo aproximadamente el 80 % de su actividad principalmente cuando se utilizó *buffer* citrato de sodio o *buffer* acetato de sodio a pH 4 (Figura 6D).

10.1.4. Determinación de actividad enzimática y parámetros cinéticos

Se llevó a cabo la determinación de la actividad enzimática de las celulasas *RalCel5G* y *RalCel48A* utilizando diferentes polisacáridos como: celulosa (polímero de D-glucosa unidas mediante enlaces β -1,4-glucosídicos), almidón (polímero de glucosa con enlaces α -1,4), laminarina (polímero de glucosa de uniones β -1,3-glucosídicas) y quitosano (polímero formado mayormente por unidades de β - D-glucosamina y en menor proporción N-acetil-D-glucosamina unidas mediante enlaces β -1,4-glucosídicos). Ambas enzimas mostraron únicamente actividad hidrolítica sobre los polímeros con enlaces β -1,4-glucosídicos. Teniendo en cuenta esto, se procedió a realizar la caracterización cinética de las enzimas con sustratos celulósicos con diferente grado de compactación (alto, medio y bajo), para lo cual se utilizó celulosa en polvo (alto grado de compactación), celulosa amorfa permeabilizada con ácido fosfórico (PASC) preparada según se detalló en el punto 9.5.1 y carboximetilcelulosa (CMC), un derivado de la celulosa que presenta grupos metilos enlazados a los hidroxilos de las glucosas que componen el polímero de celulosa, lo cual le confiere menor grado de compactación entre las cadenas de celulosa. Los parámetros cinéticos obtenidos con cada uno de estos sustratos se muestran a continuación en la Tabla 4.

Tabla 4. Parámetros cinéticos de *RalCel5G* y *RalCel48A* para sustratos celulósicos con diferente grado de compactación

Enzima	Sustrato	Grado de polimerización	Grado de compactación	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (mg.ml ⁻¹)	k_{cat}/K_M (ml.mg ⁻¹ .s ⁻¹)
<i>RalCel5G</i>	Celulosa	~136	Alto	0,06 ± 0,01	4 ± 1	0,015
	PASC	~ 134	Medio	3,1 ± 0,5	1,5 ± 0,7	2,1
	CMC	~ 1300	Bajo	15 ± 1	11 ± 1	1,4
<i>RalCel48A</i>	Celulosa	~136	Alto	0,03 ± 0,02	2,3 ± 0,4	0,013
	PASC	~ 134	Medio	0,04 ± 0,01	3,2 ± 0,4	0,012
	CMC	~ 1300	Bajo	ND	ND	ND

Se determinó que *RalCel5G* es activa con todos los sustratos celulósicos ensayados, a pesar de los diferentes niveles de compactación de los mismos. Si bien la máxima k_{cat} se alcanzó cuando se utilizó CMC como sustrato, la eficiencia catalítica de esta enzima fue similar cuando se utilizó el sustrato PASC (Tabla 4). Esta similitud observada se debe a una afinidad relativa 10 veces mayor por el sustrato PASC con respecto al menos compacto, CMC. Notablemente,

RalCel5G presentó actividad también utilizando celulosa como sustrato, aunque en menor medida que para los demás polímeros de menor compactación. Esta capacidad de degradar sustratos con un alto grado de compactación no es común en endoglucanasas clásicas, sino que es una característica distintiva de endoglucanasas procesivas. Por ello, para evaluar tal característica de *RalCel5G*, se determinó la velocidad de aparición de extremos reductores en la fracción soluble e insoluble a partir de sustratos celulósicos insolubles como celulosa y papel de filtro. Se espera que la acción de una enzima procesiva, sobre un sustrato insoluble, produzca exclusivamente celodextrinas cortas que aparecen inicialmente en la fracción soluble; mientras que una endoglucanasa clásica debería, al menos inicialmente, producir nuevos extremos reductores exclusivamente en la fracción insoluble (178). Como se muestra en la Tabla 5, se determinó que la generación de azúcares solubles a partir de la celulosa es 15 veces mayor respecto a la aparición de extremos reductores en el interior de la cadena (3,22 vs. 0,21 μmol azúcares/ μmol enzima. min). Por otra parte, cuando se utilizó papel de filtro, la velocidad de generación de extremos reductores fue menor, pero también manteniendo una alta relación azúcares solubles/insolubles (0,09 vs. 0,015 μmol azúcares/ μmol enzima. min). Esta mayor velocidad en la generación de azúcares solubles sobre la de nuevos extremos reductores dentro de la cadena, contribuye con los datos de la caracterización cinética, que sugieren que *RalCel5G* posee actividad del tipo endoglucanasa procesiva.

Tabla 5. Análisis de procesividad de *RalCel5G* sobre diferentes polisacáridos

Sustrato	Azúcares reductores	Velocidad (μmoles extremos reductores / μmol enzima. min)	%	Procesividad (Sobrenadante / Pellet)
Celulosa	Precipitado	0,21	6	15,5
	Sobrenadante	3,22	94	
Papel	Precipitado	0,015	14	6,2
	Sobrenadante	0,092	86	

Por otro lado, se determinó que *RalCel48A* presentó actividad únicamente sobre los sustratos con mayor compactación, celulosa y PASC, alcanzando una eficiencia catalítica similar para ambos sustratos (Tabla 4). La ausencia de actividad frente al sustrato CMC, estaría explicada por la estructura del sitio activo de las CBH de la familia GH48, el cual determina su modo de acción puramente procesivo. En estas enzimas, el sitio activo se ubica una estructura “tipo túnel”, por lo que las modificaciones químicas del sustrato CMC (ramificaciones de grupos metilo) impedirían la translocación del polisacárido a través del túnel catalítico de *RalCel48A*.

10.1.5. Análisis de los productos de degradación

Con el objetivo de analizar e identificar los productos finales de reacción de *RalCel5G* y *RalCel48A*, se llevó a cabo una cromatografía de capa delgada (TLC) con los sobrenadantes de la hidrólisis del sustrato PASC por cada una de las enzimas. Se determinó que el único producto de hidrólisis de *RalCel48A* a partir de este sustrato es el disacárido celobiosa, lo que es compatible con la actividad de una CBH. En cambio, en la degradación llevada a cabo por *RalCel5G* se pudo evidenciar la presencia tanto de celobiosa como del trisacárido celotriosa (Figuras 7 A y B).

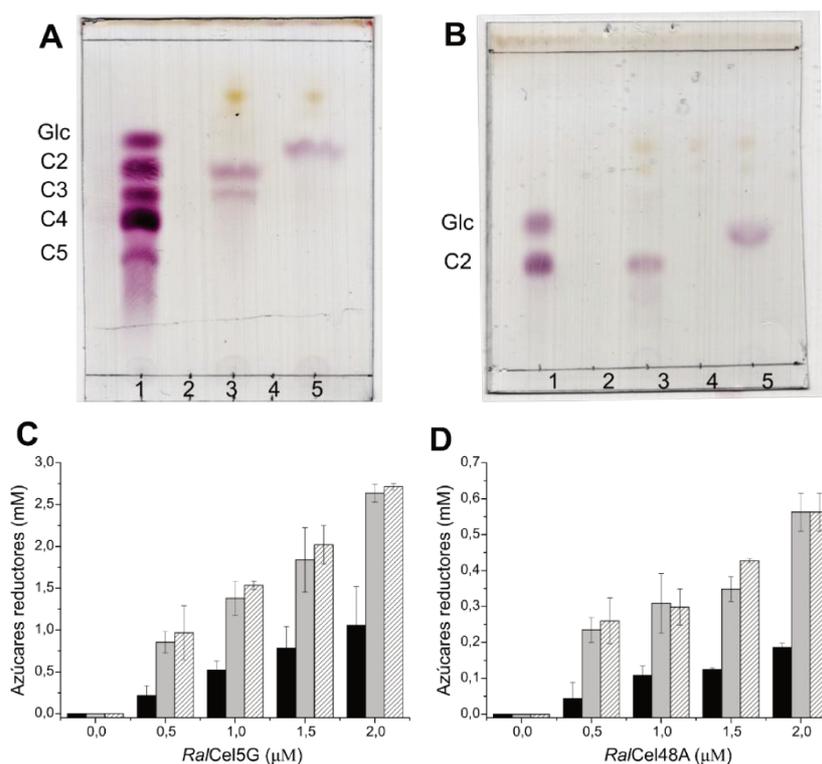


Figura 7. Análisis de los productos de reacción mediante TLC. **A:** Productos de reacción de *RalCel5G* **B:** Productos de reacción de *RalCel48A*. (1) Estándares: glucosa (Glc), celobiosa(C2), celotriosa (C3), celotetraosa (C4), celopentaosa (C5); (2) Control PASC, (3) Sobrenadante de reacción PASC + celulosa, (4) Control enzima, (5) Sobrenadante de reacción PASC + celulosa suplementada con *TbrCglT*. **C y D:** Cuantificación de producción de azúcares reductores por *RalCel5G* y *RalCel48A*: enzimas individuales (negro); suplementadas con *TbrCglT* en concentraciones equimolares (gris) y 10 veces mayores (líneas diagonales).

Dado que *RalCel48A* y *RalCel5G* generan el di- y trisacárido como productos de reacción (celobiosa y celotriosa), se decidió suplementar las reacciones de estas enzimas con una β -glucosidasa (CglT de *Thermoanaerobacter brockii*) para alcanzar su hidrólisis completa a glucosa. Para ello, se ensayaron dos proporciones de *TbrCglT*, en cantidades equimolares y 10 veces superiores a la concentración de las celulasas. El suplemento con ambas concentraciones de *TbrCglT* produjo el mismo incremento en el rendimiento total de azúcares reductores de ambas

celulasas. Como se observa en la Figura 7 A y B, concentraciones equimolares de *TbrCglT* fueron suficientes para lograr la hidrólisis total de los productos de reacción de las celulasas hasta glucosa. Para las condiciones de reacción ensayadas (30 min y 2 μ M de cada enzima), cuando las reacciones fueron suplementadas con BG, el rendimiento se incrementó de 1 a 2,5 mM y de 0,18 a 0,56 mM, para *RalCel5G* y *RalCel48A*, respectivamente (Figura 7 C y D).

El incremento en el rendimiento de los azúcares reductores producidos en las reacciones de *RalCel5G* suplementada con BG es consistente con el análisis realizado por TLC, donde se observó la generación de celotriosa y celobiosa como productos de reacción de *RalCel5G*. Estos azúcares, al ser hidrolizados hasta glucosa por la BG, generarían 2,5 veces más extremos reductores. En cambio, se observó que cuando *RalCel48A* fue suplementada con BG, el rendimiento se triplicó, lo cual podría ser un indicador de que, en ausencia de BG, *RalCel48A* podría ser inhibida por el producto de la reacción (celobiosa). Sin embargo, los ensayos de inhibición realizados, en donde se midió la actividad de *RalCel48A* frente a diferentes concentraciones de celobiosa, mostraron un valor de IC_{50} de $3,6 \pm 0,1$ mM (Figura 8). Teniendo en cuenta este valor de IC_{50} , las concentraciones de celobiosa alcanzadas durante las reacciones serían insuficientes para producir tal efecto inhibitorio. Por lo tanto, el aumento en la velocidad de catálisis de *RalCel48A*, provocado por el agregado suplementario de BG, podría adjudicarse, más adecuadamente, a un efecto sinérgico por la acción simultánea de estas dos enzimas.

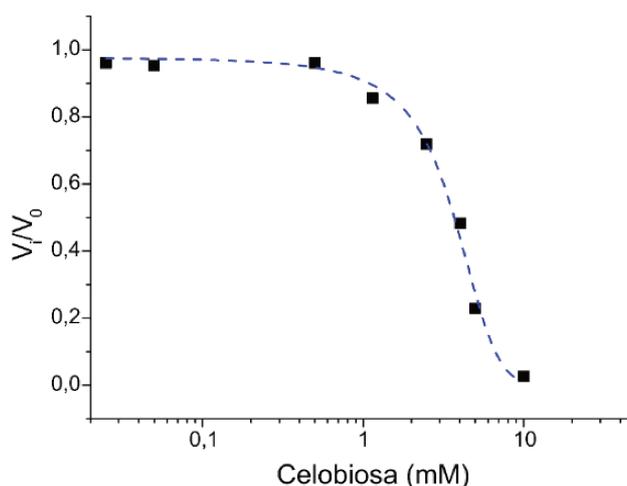


Figura 8. Curva de velocidad de catálisis relativa (V_i/V_0) de *RalCel48A* en presencia de diferentes concentraciones de inhibidor (celobiosa). Ajustado al modelo dosis-respuesta en OriginPro 8.1 ($R^2=0,999$).

10.1.6. Capacidad de adsorción a sustratos celulósicos

La unión eficaz entre las enzimas y el sustrato es esencial en este tipo de reacciones entre sustratos insolubles (p. ej. la celulosa) y las celulasas. Con el objetivo de evaluar la capacidad de estas enzimas de interactuar con sustratos celulósicos insolubles, *RalCel48A* y *RalCel5G* fueron incubadas durante 1 h en agitación continua (800 rpm) a 25 °C con diferentes sustratos

celulósicos como celulosa, papel de filtro o aserrín de madera de pino (1% p/v). A continuación, las fracciones de enzima remanente en solución y adherida al sustrato se separaron y se sembraron en un SDS-PAGE en condiciones reductoras como se muestra en la Figura 9 A y B. Se pudo identificar que *RalCel5G* posee una alta capacidad de adhesión en todos los sustratos analizados (Figura 9A), mientras que *RalCel48A* se distribuye entre la fracción soluble y adherida al sustrato dependiendo del sustrato ensayado. Se observa que cuando se utilizó papel de filtro, *RalCel48A* se mantuvo principalmente unida al sustrato; mientras que cuando se utiliza celulosa o un sustrato complejo como aserrín de madera de pino, la enzima se distribuye entre la fracción soluble y el precipitado (Figura 9B). La determinación de los parámetros de adsorción se realizó a partir del ajuste de las isotermas de unión de cada una de las enzimas a la celulosa (Figura 9 C y D). A partir de estas curvas se determinó que estas enzimas presentan un E_{Max} de $3,4 \pm 0,3$ y $1,2 \pm 0,4$ $\mu\text{moles/g}$ de sustrato y un K_d de $0,11 \pm 0,01$ y $0,84 \pm 0,02$ μM para *RalCel5G* y *RalCel48A*, respectivamente. Estos parámetros indican que, *RalCel5G* presenta una mayor afinidad aparente que *RalCel48A* y una mayor capacidad de adsorción al sustrato (E_{Max}), lo que implica una mayor fuerza en la unión de esta enzima en general ($A= 30,54$ vs. $1,32$ L/g sustrato). Estas diferencias observadas en los parámetros de unión y en los patrones de reconocimiento de estas dos enzimas frente a los sustratos, son consistentes con el mayor número de dominios CBM37 que presenta *RalCel5G* respecto a *RalCel48A* (2 vs.1). Sumado a esto, las diferencias en la estructura primaria entre los dos CBM37 presentes en *RalCel5G* podrían contribuir a la mayor capacidad de unión observada con los diferentes sustratos (Figura 9 A y B).

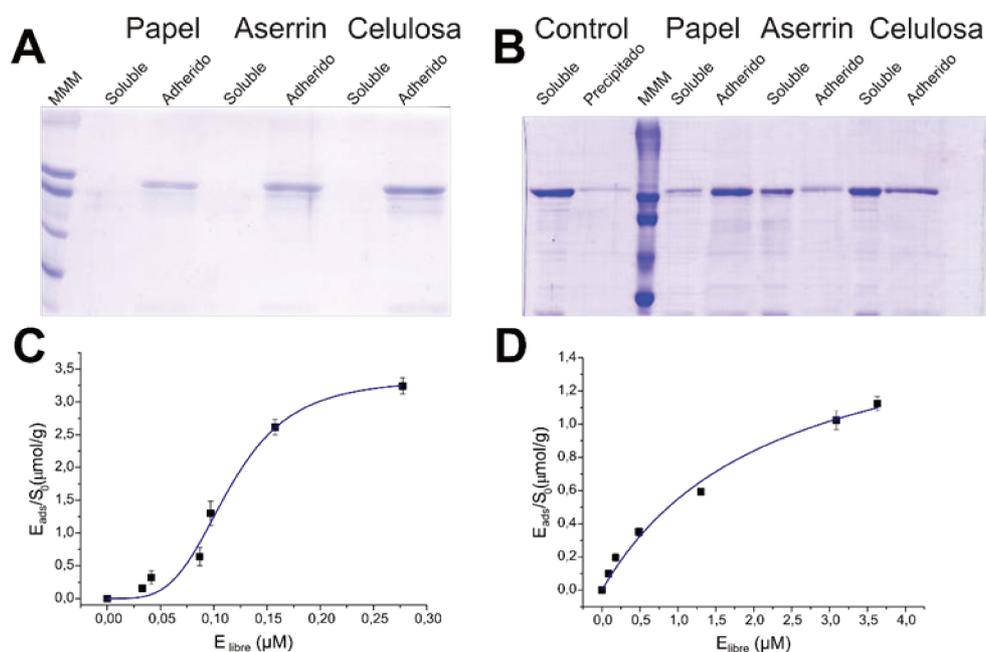


Figura 9. Análisis de la capacidad de unión. SDS-PAGE de las fracciones correspondientes a la proteína remanente en solución y la adherida a los diferentes sustratos para: **A:** *RalCel5G*; **B:** *RalCel48A*. Isotermas de unión a la celulosa a 25 °C de las enzimas: **C:** *RalCel5G*; **D:** *RalCel48A*.

10.1.7. Actividad sinérgica entre celulasas

Anteriormente, durante la caracterización de las celulasas se determinó que *RalCel5G* es una endoglucanasa procesiva; mientras que *RalCel48A* es una celobiohidrolasa. Esta diferencia en su modo de acción hace que su actividad se complementaría en la despolimerización de la celulosa, por lo cual analizar su posible interacción en la degradación de los polisacáridos es relevante para mejorar la hidrólisis de los diferentes sustratos. Para ello se determinó la velocidad de producción de azúcares solubles con diferentes proporciones de *RalCel5G*:*RalCel48A*, manteniendo la concentración final de enzima constante (2 μM) en dos condiciones: I) utilizando en la mezcla de reacción ambas enzimas simultaneo o; II) utilizándolas de manera secuencial (primero la EG, seguida de la CBH y viceversa) y esto se comparó con la actividad individual de cada una de las enzimas (Figura 10A). Adicionalmente, se calculó el grado de sinergia (GS) alcanzado, como la relación entre la velocidad de catálisis obtenida como resultado de la combinación de ambas enzimas utilizadas en simultaneo, sobre la suma de velocidades de cada una de las enzimas en forma individual (en concentraciones equivalentes a la de la mezcla de enzimas); es decir, la velocidad que se observaría si las dos enzimas actuaran de forma independiente, sin interacción (Ec. 3).

$$GS = \frac{Act_{(RalCel5G+RalCel48A)}}{Act_{RalCel5G} + Act_{RalCel48A}} \quad (\text{Ec. 3})$$

A partir del análisis de las curvas, se evidenció un aumento en la velocidad de catálisis cuando se utilizaron ambas enzimas en simultáneo respecto al uso secuencial de las mismas (en todas las proporciones de ensayadas), lo que indica un efecto sinérgico en la actividad de estas dos enzimas. Es importante destacar que, cuando se utilizaron las enzimas en forma secuencial, se alcanzó el mismo rendimiento que el calculado teóricamente para la suma de las actividades individuales, sin importar el orden de adición de cada una de las proteínas. El grado de sinergia alcanzado se modificó dependiendo de las proporciones de cada una de las enzimas, siendo máximo (GS=2) cuando se utilizaron relaciones molares de 1:4 de *RalCel5G*:*RalCel48A* (Figura 10B). Sin embargo, la máxima velocidad de hidrólisis del sustrato no coincide con las proporciones de celulasas que otorgan mayor nivel de sinergia. Como era de esperar, la velocidad de hidrólisis aumentó linealmente conforme se aumenta la concentración de las enzimas. Para las condiciones de reacción establecidas, la máxima hidrólisis se alcanzó para concentraciones de 1,5 μM y 0,5 μM de *RalCel5G* y *RalCel48A*, respectivamente.

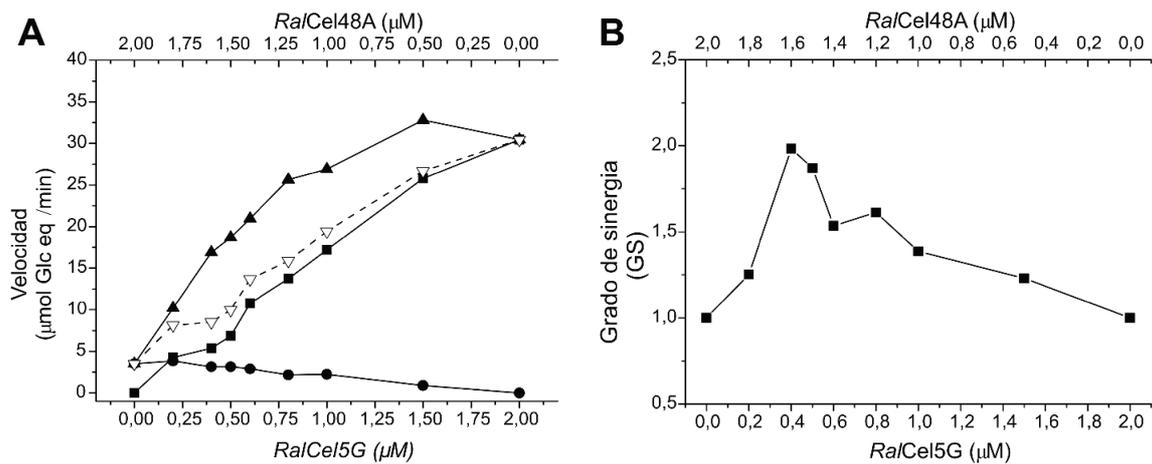


Figura 10. A: Curvas de velocidad de reacción en función de las concentraciones de *RalCel5G* y *RalCel48A*. **B:** Grado de sinergia alcanzado para las distintas concentraciones de enzimas. La concentración total de enzima se fijó en 2 μM. La actividad sinérgica se determinó para la mezcla de enzimas en fracciones molares variadas (triángulos negros). Las líneas de puntos (triángulos blancos) indican la suma de las actividades de las enzimas individuales *RalCel5G* (cuadrados) y *RalCel48A* (círculos). Los experimentos se realizaron a 55 °C durante 1 h, en *buffer* acetato de sodio 100 mM a pH 6. La actividad se calculó a partir de la determinación de extremos reductores en equivalentes de unidades de glucosa.

10.2. Caracterización de hemicelulasas de *R. albus* 8

10.2.1. Análisis de secuencia aminoacídica

A partir del proteoma de *R. albus* 8 ID [UP000004259](#), se identificaron cinco secuencias de posibles xilanasas (E9SFJ8, E9SF11, E9SDY0, E9SA77, E9S8N5), de las cuales tres pertenecen a la familia GH10 (E9SFJ8, E9SF11, E9SDY0) y dos a la familia GH11 (E9SA77, E9S8N5). Estas enzimas presentan arquitecturas multimodulares, incluyendo módulos de unión a carbohidratos de las familias CBM22, CBM37 y CBM4_9 e incluso un dominio catalítico adicional correspondiente a la familia acetilsterasa 3 (Figura 11). De todas ellas, la proteína E9SFJ8 (Xyn10A) fue la que presentó la arquitectura más simple, donde sólo pudo identificarse la presencia de un dominio catalítico de la familia GH10 comprendido entre los aminoácidos 59 a 382, además de un péptido señal desde los aminoácidos 1 a 23 y una región comprendida entre los aminoácidos 24 a 58 sin función asignada. Sin embargo fue la enzima que presentó mayor actividad (131), hecho que motivó nuestro estudio y caracterización.

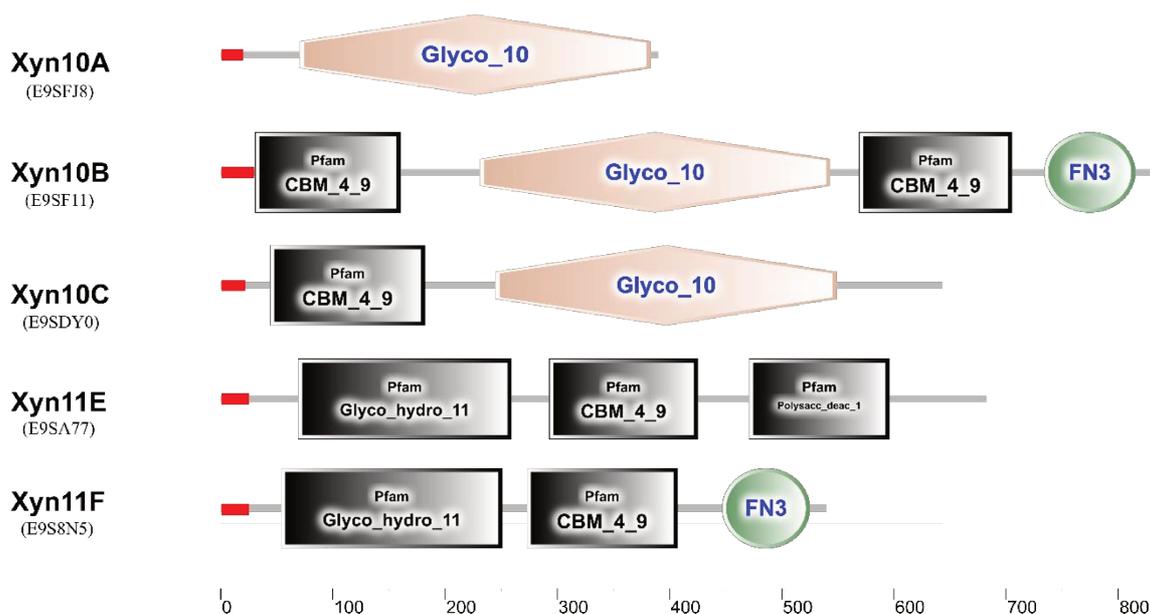


Figura 11. Dominios estructurales presentes en las diferentes xilanasas identificadas en el proteoma de *R. albus* 8.

10.2.2. Clonado, construcción de variantes y expresión recombinante

El gen codificante para la xilanasas Xyn10A de *R. albus* 8 (*ralxyn10A*) fue diseñado para la síntesis *de novo* (BIO BASIC INC) basado en la información de la secuenciación parcial del genoma de *R. albus* 8 depositado bajo el código (*GenBank accession n°*: [AEE64767.1](#)). En el diseño del gen se consideró el uso de codones de *E. coli* para optimizar la producción heteróloga

de la proteína recombinante y se insertaron los sitios de restricción *Bam*HI y *Hind*III flanqueando el mismo para su posterior clonado y expresión. Para analizar la función de la región N-terminal de 34 aminoácidos se construyó una variante de *RalXyn10A* a la que se le removió dicha región (Δ N34Xyn10A). Para ello, el fragmento de DNA codificante para la región identificada previamente como el dominio catalítico GH10 fue amplificado por PCR desde el vector [pUC57/*ralxyn10A*] con los *primers* FwN34Xyn10A y RvXyn10A (Tabla 1), conteniendo los sitios de restricción *Bam*HI y *Hind*III para su posterior clonado en el vector de expresión pETDuet, obteniéndose el plásmido [pETDuet/ *An34xyn10A*].

Un enfoque similar resultó útil para construir la proteína quimérica N34-*TbrCglT*, la cual está compuesta por el dominio N34 de *RalXyn10A* (N34-) fusionado al extremo N-terminal de la β -glucosidasa de *T. brockii* (*TbrCglT*), la cual se conoce que sólo está compuesta por un dominio de la familia GH10 (179). Para ello, el ADN que codifica para la región N-terminal de *RalXyn10A* se amplificó mediante PCR a partir de [pUC57/*ralxyn10A*] con los *primers* FwXyn10A y RvN34Xyn10A (Tabla 1) que contienen sitios de restricción *Bam*HI y *Not*I para su posterior inserción en el vector pETDuet resultando en la construcción [pETDuet/N34]. Esta construcción [pETDuet/N34], con los 102 nucleótidos correspondientes a la región comprendida entre los aminoácidos 24 a 58 de *ralxyn10A*, se digirió con las enzimas de restricción *Sac*I y *Sal*I y luego se subclonó el gen *tbrcglT* para obtener la construcción [pETDuet/ *N34tbcglT*].

Para la producción de estas enzimas, se crecieron células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con las correspondientes construcciones ([pETDuet/*ralxyn10A*], [pETDuet/ Δ N34*ralxyn10A*] y [pETDuet/*N34tbcglT*]) a 37 °C en medio LB suplementado con ampicilina 50 μ g. ml^{-1} hasta alcanzar un OD₆₀₀ ~0,6. La expresión de las proteínas se indujo con IPTG (0,2 mM) a 22 °C por 16 h. Las proteínas *RalXyn10A*, *Ral* Δ N34Xyn10A y N34*TbrCglT* fueron purificadas por cromatografía IMAC, seguida de cromatografía de filtración por gel Superdex G-200. Con cada una de las eluciones obtenidas de las cromatografías, se ensayaron respecto a la actividad enzimática correspondiente y se tomaron muestras de cada una de las diferentes fracciones para hacer un gel SDS-PAGE, en donde se pudo observar que las proteínas fueron obtenidas con un alto grado de pureza (Figura 12A). Las fracciones que mostraron mayor grado de pureza y actividad enzimática fueron recolectadas y almacenadas a -80 °C con el agregado de 20 % de glicerol. Con las enzimas purificadas se realizó una cromatografía de exclusión molecular en una columna Tricorn 10/300, de donde cada una de las proteínas eluyó como un único pico con un volumen de retención compatible con una estructura monomérica (Figura 12B).

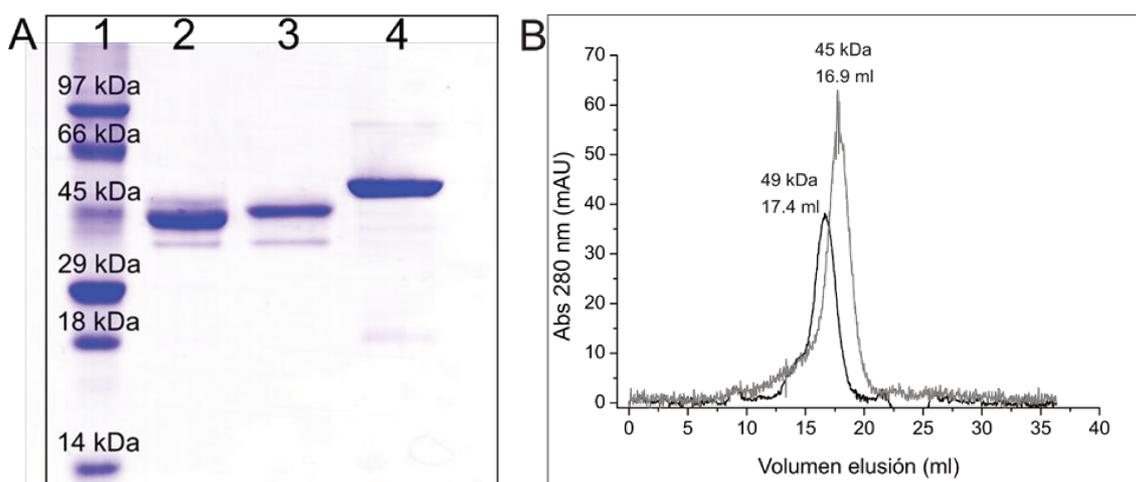


Figura 12. A: Análisis de las purificaciones de *RalXyn10A*, *RalΔN34Xyn10A* y *N34TbrCglt* por SDS-PAGE. Calle 1, marcadores de masa molecular. Calle 2, *RalΔN34Xyn10A*. Calle 3, *RalXyn10A*. Calle 4, *N34TbrCglt*. B: Cromatografía de exclusión molecular de *RalXyn10A* (negro) y *RalΔN34Xyn10A* (gris).

10.2.3. Determinación de condiciones óptimas de pH y temperatura

RalXyn10A y *RalΔN34Xyn10A* presentaron una actividad específica de 90 U/mg y 50 U/mg, respectivamente, cuando se utilizó el sustrato 4MGlcX. La actividad de ambas enzimas presentó similar dependencia a la temperatura y el pH, con valores óptimos de 40 °C y pH de 6,0 (Figura 13 A y B). Ambas enzimas presentaron buena estabilidad frente al pH en el rango de 4 a 8, manteniendo una actividad residual superior al 90 % de la inicial. (Figura 13C). La estabilidad térmica de las enzimas presentó un patrón de desnaturalización similar, manteniendo ambas más del 80 % de su actividad inicial cuando fueron incubadas por 1 h hasta una temperatura de 40 °C. Esta actividad disminuyó al 60 % en la enzima completa (*RalXyn10A*) cuando la temperatura de incubación se aumentó a 50 °C, pero se mantuvo por encima del 75 % para la versión *RalΔN34Xyn10A* (Figura 13D).

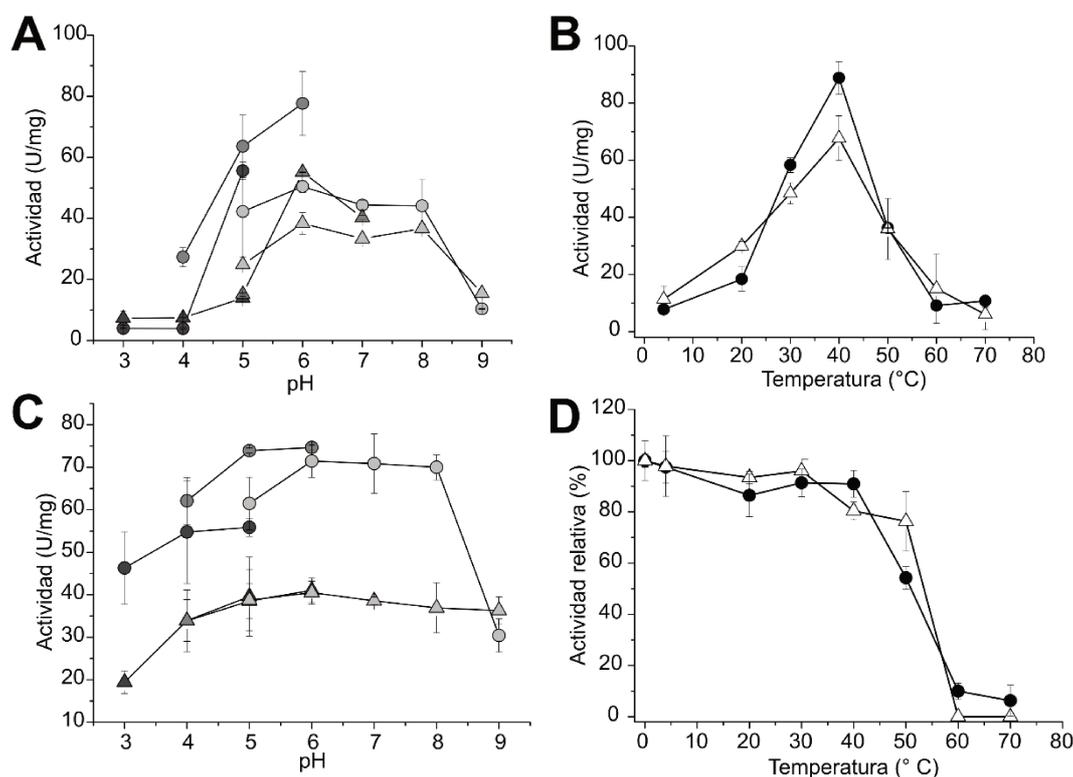


Figura 13. A: Determinación de condiciones óptimas de pH. B: Determinación de temperatura óptima. C: Actividad enzimática luego de incubaciones por 1 h a diferentes valores pH. D: Actividad enzimática residual (%) luego de incubaciones de 1 h a diferentes temperaturas. *RalXyn10A* (círculos); *RalΔN34Xyn10A* (triángulos).

10.2.4. Determinación de actividad enzimática y parámetros cinéticos

La determinación de la actividad xilanas de las variantes *RalXyn10A* y *RalΔN34Xyn10A* recombinantes se basó en la cuantificación de los equivalentes de azúcares reductores liberados a partir de los diferentes sustratos, 4-O-metil-D-glucurono xilano, xilano de *Beechwood*, y arabinoxilano, para los cuales se determinaron los parámetros cinéticos.

Como puede observarse en la Tabla 6, las dos versiones de la enzima presentaron parámetros cinéticos similares con los diferentes sustratos evaluados. Ambas enzimas presentaron mayor velocidad de catálisis con los sustratos 4MGlcX y BX, mientras que con el sustrato AX la velocidad fue unas 25 veces menor. El mayor número de recambio observado con los sustratos 4MGlcX y BX estaría relacionado a que ambos presentan una proporción de ramificaciones menor a la de AX (10 % vs. 33 %), esto facilitaría el acceso de la enzima al sustrato, ya que un 90 % de los residuos de xilosa no presentarían ramificaciones. Además, se observó una afinidad 3 a 4 veces menor por el arabinoxilano, lo cual también podría estar asociado al porcentaje de ramificaciones o a la diferente composición de estas ramificaciones (arabinosa vs. ácido glucurónico).

Tabla 6. Parámetros cinéticos de *RalXyn10A* y *RalΔN34Xyn10A* recombinantes

Sustrato	Enzima	$S_{0,5}$ (mg/ml)	k_{cat} (s ⁻¹)	$k_{cat}/S_{0,5}$ (ml.mg ⁻¹ .s ⁻¹)
4-O-metil-D-glucurono-xilano (4MGlcX)	<i>RalXyn10A</i>	3,7 ± 0,3	42,3	11,4
	<i>RalΔN34Xyn10A</i>	7,2 ± 0,9	51,3	7,1
xilano de <i>Beechwood</i> (BX)	<i>RalXyn10A</i>	2,9 ± 0,3	46,2	15,9
	<i>RalΔN34Xyn10A</i>	2,5 ± 0,2	45,7	18,3
Arabinoxilano (AX)	<i>RalXyn10A</i>	8,1 ± 0,5	2,9	0,36
	<i>RalΔN34Xyn10A</i>	6,5 ± 0,1	1,7	0,26

10.2.5. Ensayos de unión a sustratos celulósicos

A fin de evaluar si la extensión N-terminal de 34 amino ácidos que antecede al dominio catalítico GH10 en *RalXyn10A* posee función como dominio CBM, se determinó la capacidad de unión a polisacáridos insolubles de las variantes *RalXyn10A* y *RalΔN34Xyn10A*. Como controles se utilizaron la quimera N34-*TbrCglT* y *TbrCglT*, esta última compuesta únicamente por un dominio catalítico de la familia GH10. Cada una de estas proteínas fue incubada frente a diferentes polisacáridos y se determinó su capacidad de unión a partir de la cuantificación de la proteína remanente en el sobrenadante luego de la incubación con el sustrato. El porcentaje de enzima adherida al sustrato se calculó por diferencia con la cantidad de proteína incubada inicialmente. A continuación, el sustrato fue lavado repetidas veces, y la proteína adherida al mismo fue liberada con SDS 10 % y exposición a 100 °C por 10 min. Las fracciones de proteína soluble en sobrenadante y la recuperada desde el sustrato, se visualizaron en un SDS-PAGE (Figura 14A).

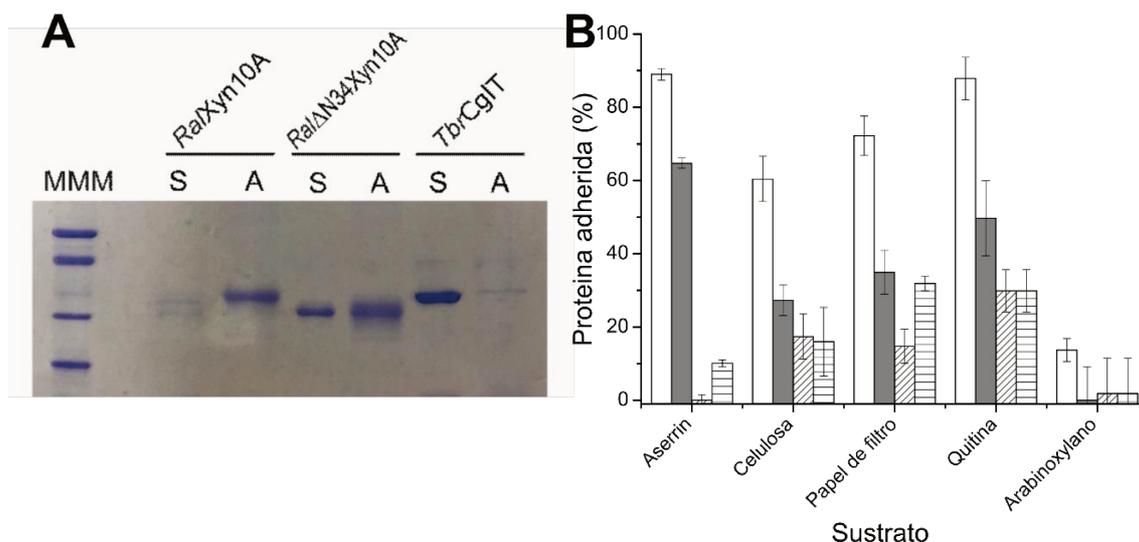


Figura 14. A: SDS-PAGE de las fracciones de proteína remanente en solución (S) y adherida al sustrato (A) luego de la incubación con aserrín de madera de pino. **B:** Capacidad de unión de las variantes de la enzima *RalXyn10A* a los diferentes sustratos insolubles.

A partir de la cuantificación, se evidenció que *RalXyn10A* posee capacidad de unirse a los diferentes sustratos ensayados con excepción del *paramylon* (polímero de glucosas unidas por enlaces β -1,3 glucosídicos); mientras que la variante *RalΔN34Xyn10A* presentó una menor capacidad de unión a estos sustratos, con una disminución del 40 % en la cantidad de enzima unida a celulosa, papel de filtro o quitina y un 30 % menos a la madera de pino, sustrato lignocelulósico complejo compuesto tanto por celulosa como por xilano. En cuanto al arabinoxilano, *RalXyn10A* mostró menor capacidad de unión en comparación con los sustratos celulósicos (10 %), mientras que *RalΔN34Xyn10A* fue incapaz de unirse al mismo (Figura 14B).

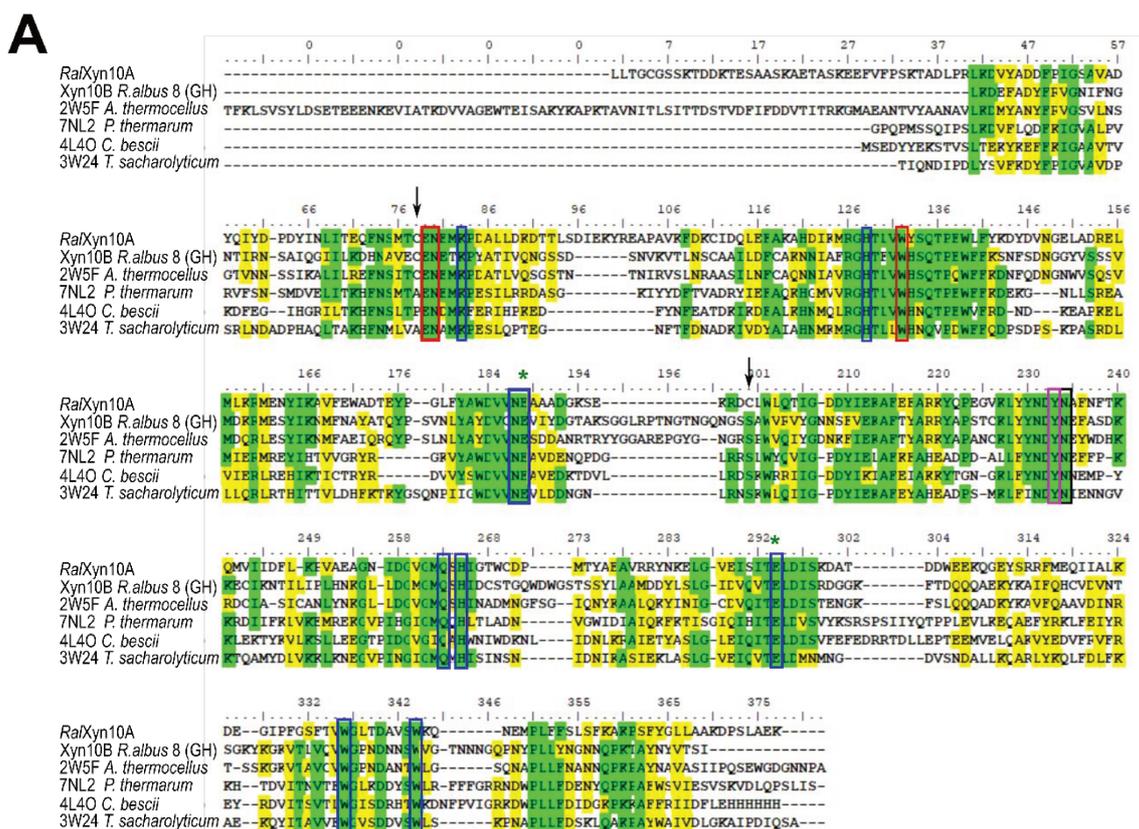
10.2.6. Modelo tridimensional

Se realizó una búsqueda de secuencias homologas a *RalXyn10A* mediante la herramienta DELTA-BLAST contra la base de datos del PDB y, a partir de este resultado, se hizo un alineamiento múltiple de las secuencias pertenecientes a xilanasas de la familia GH10 con mayor porcentaje de identidad. En simultáneo, el modelo tridimensional obtenido mediante AlphaFold 2 para la enzima *RalXyn10A* fue comparado con las estructuras tridimensionales de las secuencias encontradas. A partir de la superposición de las estructuras y el análisis del alineamiento múltiple se identificaron aminoácidos que serían importantes para la función catalítica de la enzima.

En las enzimas de la familia GH10, la hidrólisis generalmente ocurre entre los subsitios -1 y +1, de los cuales el primero comprende el sitio activo. De acuerdo a los alineamientos de secuencias con las xilanasas Xyn10b de *R. albus* 8, Xyn10b de *Clostridium thermocellum* (PDB 2W5F), β -Xyl de *Pseudothermotoga thermarum* (PDB 7NL2), Xyn10B de *Caldicellulosiruptor bescii* (PDB 4L4O) y XylA de *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* (PDB 3W24), el

subsitio -1 de *RalXyn10A* está compuesto por siete aminoácidos: Lys 83, His 128, Asn 187, Gln 263, His 265, Trp 344 y Trp 336, además de los dos catalíticos: Glu 188, Glu 294. El subsitio -2 está compuesto por tres aminoácidos (Glu 79, Asn 80 y Trp 132), el subsitio +1 por Tyr 233 y el +2 por Asn 234. Todos estos residuos se encuentran completamente conservados en las proteínas analizadas.

Basándonos en el modelo 3D de la enzima y en su comparación con estructuras cristalizadas de otras xilanasas de la familia GH10, identificamos una cisteína conservada (Cys 78) y otra no conservada (Cys 111) que se encuentran ubicadas en la proximidad del sitio de unión al sustrato (subsitio -1) de *RalXyn10A*. Tentativamente, Cys 78 y Cys 111 podrían desempeñar una función crítica en el mantenimiento de la estructura de la enzima o podrían también estar involucrados en la modulación redox de actividad enzimática. La proteína además contiene otras tres cisteínas, dos en el dominio GH10 (posiciones 200 y 270) y una en la región N-terminal (Cys 5) que potencialmente también podrían estar involucradas en la modificación redox. Sin embargo, en el modelo tridimensional se observó que los residuos Cys 200 y Cys 270 se encuentran distantes entre sí, y con respecto a otras cisteínas o residuos de relevancia para la funcionalidad de la enzima.



B

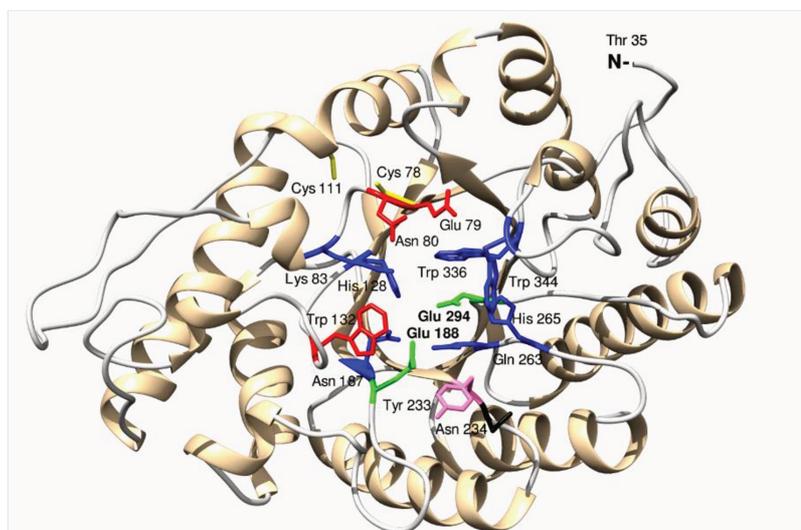


Figura 15. A: Alineamiento múltiple de secuencias entre *RalXyn10A* y las xilanasas de la familia GH10
B: Modelo 3D de *RalXyn10A*. Los aminoácidos conservados que conforman los subsitios de unión al sustrato se encuentran resaltados con un recuadro (alineamiento) o coloreados (modelo): subsitio -1 en azul; subsitio -2 en rojo; subsitio +1 en rosa; subsitio +2 en negro; aminoácidos catalíticos además están destacados con un asterisco (alineamiento) o en verde (modelo); las cisteínas se marcan con una flecha (alineamiento) o en amarillo (modelo).

10.2.7. Modificación redox de *RalXyn10A*

Para evaluar la funcionalidad de los residuos de cisteína identificados en el modelo tridimensional de *RalXyn10A*, como probables moduladores de la actividad o en la preservación de la estructura de la enzima, evaluamos la actividad de *RalXyn10A* recombinante luego de ser tratada con agentes reductores u oxidantes. Encontramos que la enzima fue sensible a la incubación con los agentes reductores 2-mercaptoetanol (2ME) y ditioneitol (DTT), pero no modificó su actividad cuando fue incubada inicialmente con agentes oxidantes (H_2O_2 y diamida). Como puede observarse en la Figura 16A, la disminución en la actividad enzimática estuvo directamente relacionada con el aumento en la concentración del agente reductor, alcanzándose aproximadamente un 80 % de inhibición a niveles de 3-5 mM de DTT o 2ME. Este efecto inhibitorio pudo ser revertido mediante el tratamiento con compuestos oxidantes (H_2O_2 y diamida), mostrando también una dependencia directa con la concentración del oxidante, recuperándose cerca del 100 % de la actividad enzimática con 6 mM de estos agentes (Figura 16B). Además, la reducción de la enzima (con 3 mM de DTT) afectó su capacidad para unirse a sustratos insolubles, ya que en estas condiciones se produjo una disminución del 50 % en la unión respecto a la proteína oxidada (Figura 17B); mientras que la versión carente del extremo N-terminal (*Ral* Δ N34*Xyn10A*), fue insensible al tratamiento redox, ya que no se observaron cambios en su actividad (Figura 16A), ni en su capacidad de unión al polisacárido (Figura 17B).

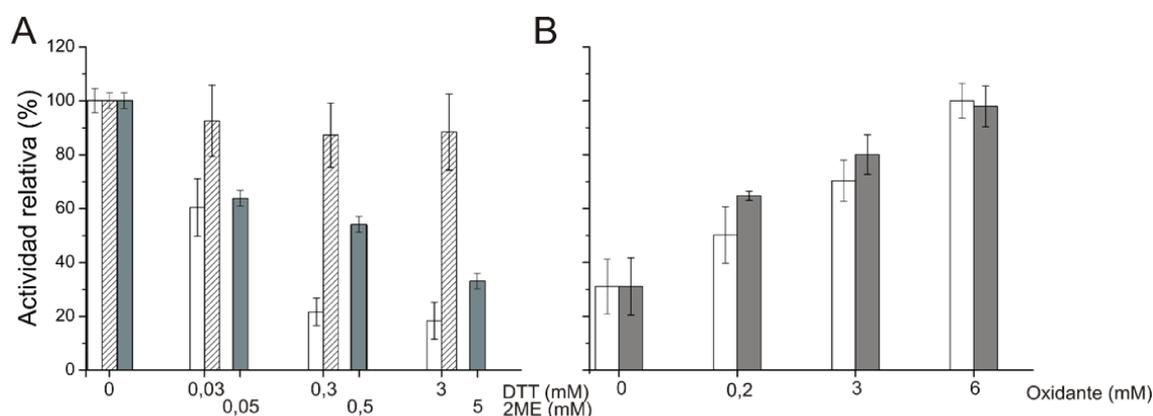


Figura 16. A: Actividad relativa de *RalXyn10A* (blanco y gris) y de *Ral* Δ N34*Xyn10A* (diagonales) luego del tratamiento con agentes reductores. **B:** Actividad relativa de *RalXyn10A* reducida con DTT y posteriormente oxidada con diferentes concentraciones de H_2O_2 (gris) y diamida (blanco).

10.2.8. Construcción de mutantes

Para comprender la modificación redox de *RalXyn10A* a nivel molecular, se construyeron tres mutantes puntuales de la proteína a partir de la información obtenida en el modelo tridimensional (C5S, C78S y C111S) y se determinaron sus parámetros cinéticos y su capacidad de unión al sustrato, antes y después del tratamiento con el agente reductor DTT, al igual que para

las versiones *RalXyn10A* y *RalΔN34Xyn10A*. Las mutantes C5S y C78S exhibieron insensibilidad a la incubación con DTT respecto a los cambios de actividad (Figura 17A) y en la unión al sustrato (Figura 17B), asemejándose al comportamiento de la versión *RalΔN34Xyn10A*; sin embargo, presentaron marcadas diferencias entre sus parámetros cinéticos (Tabla 8).

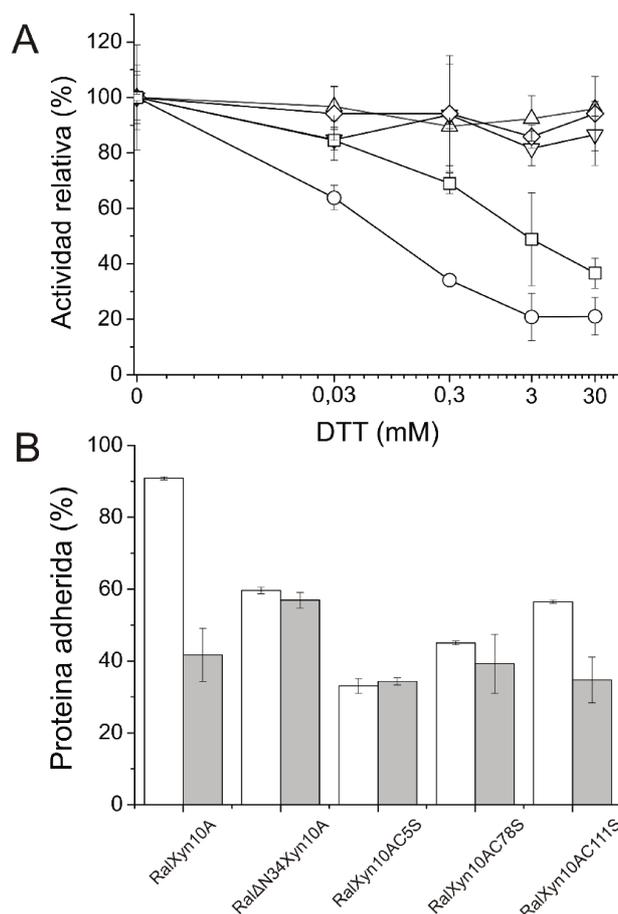


Figura 17. A: Actividad relativa de las diferentes versiones de la enzima luego del tratamiento con el agente reductor DTT. *RalXyn10A* (círculos), *RalΔN34Xyn10A* (triángulos), *RalXyn10A* C5S (triángulos invertidos), *RalXyn10A* C78S (rombos), *RalXyn10A* C111S (cuadrados). **B:** Efecto del tratamiento reductor sobre la capacidad de unión de las diferentes versiones de la enzima.

En la Tabla 8 se detallan los parámetros cinéticos para la hidrólisis de 4MGlcX de las variantes de la enzima *RalXyn10A*, la versión truncada en N34 y las mutantes en las diferentes cisteínas en sus respectivos estados oxidado y reducido. Como se muestra, todas las formas de la proteína exhibieron valores de K_M similares con este sustrato, aunque mostraron diferentes capacidades catalíticas (k_{cat}) dependiendo del estado redox. La mutante C5S exhibió parámetros cinéticos similares a la versión *RalΔN34Xyn10A* y a los de *RalXyn10A* en su estado reducido, mientras que C78S, además de ser insensible al agente reductor, presentó la misma capacidad catalítica y afinidad que *RalXyn10A* en su estado oxidado. Estos resultados indican que el dominio N34 y específicamente el residuo Cys 5 son críticos para que *RalXyn10A* alcance la máxima capacidad catalítica en su estado reducido. De hecho, *RalXyn10A* en el estado oxidado

exhibió una mejora de k_{cat} ~2 veces con respecto a (i) su forma reducida, (ii) *Ral* Δ N34Xyn10A y (iii) la enzima mutante C5S. La proteína C111S exhibió un comportamiento similar a la enzima de tipo salvaje, apoyando el papel de Cys 78 en el proceso redox (además de la participación de Cys 5 sugerida anteriormente). Más intrigantes son las características de la enzima C78S, ya que mostró una k_{cat} incluso más alta (un 20% más) que la proteína de tipo salvaje, además de que la actividad de C78S no se vio modificada por el tratamiento con DTT, lo que sugiere que esta forma de la proteína es intrínsecamente más activa o que el proceso de oxidación en la misma ocurre de manera diferente.

Tabla 8. Efecto del tratamiento con agente reductor (DTT) sobre los parámetros cinéticos de las diferentes versiones y mutantes de *RalXyn10*

Enzima	DTT (mM)	K_M (mg/ml)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (ml.mg ⁻¹ .s ⁻¹)
<i>RalXyn10A</i>	0	5,3 ± 0,3	75 ± 3	14,2
	0,3	5,4 ± 0,2	47 ± 2	8,7
<i>Ral</i> Δ N34Xyn10A	0	6,0 ± 0,5	39 ± 4	6,5
	0,3	6,0 ± 0,5	39 ± 5	6,5
<i>RalXyn10A</i> C5S	0	6,0 ± 0,5	48 ± 5	8,0
	0,3	6,4 ± 0,4	52 ± 2	8,1
<i>RalXyn10A</i> C78S	0	4,7 ± 0,5	83 ± 6	17,7
	0,3	4,2 ± 0,2	72 ± 3	17,1
<i>RalXyn10A</i> C111S	0	4,3 ± 0,3	71 ± 3	16,5
	0,3	4,5 ± 0,2	53 ± 2	11,8

Dada la modificación en la actividad de *RalXyn10A* ejercida por los agentes oxidantes y reductores, realizamos una titulación redox asociada a la capacidad catalítica de la enzima. La actividad de cada una de las variantes de la enzima se determinó a diferentes potenciales redox (Eh), alcanzados por proporciones específicas de 2ME y su forma oxidada (disulfuro de

hidroxietilo, HEDS) presentes en el medio de reacción. La actividad de *RalXyn10A* y la mutante C111S aumentó a medida que el Eh se volvió menos negativo (más oxidante) desde 40 U/mg, para alcanzar su valor máximo a -150 mV (Figura 18). La E_m (potencial en el que la actividad alcanzó el 50 % del aumento total) para *RalXyn10A* y C111S, se determinó en -290 mV y -230 mV, respectivamente. De acuerdo con los resultados anteriores, la actividad de *Ral* Δ N34*Xyn10A*, así como de las mutantes C5S y C78S, permaneció sin cambios dentro del rango de potencial redox analizado.

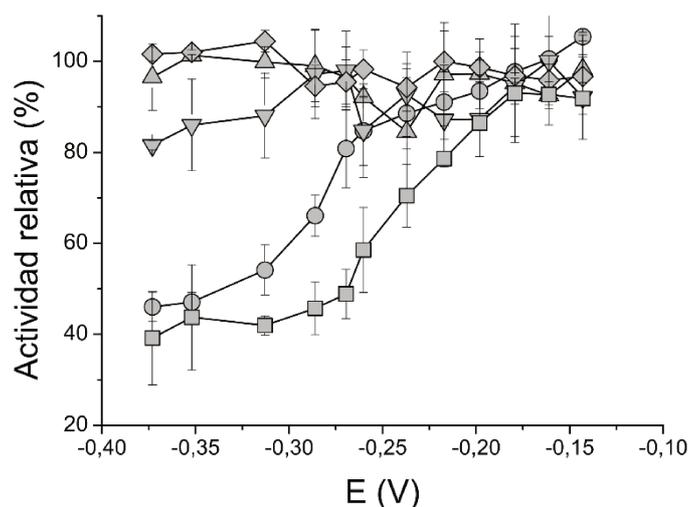


Figura 18. Determinación del potencial medio de reducción de cada una de las variantes de la enzima. *RalXyn10A* (círculos), *Ral* Δ N34*Xyn10A* (triángulos), *RalXyn10A* C5S (triángulos invertidos), *RalXyn10A* C78S (rombos), *RalXyn10A* C111S (cuadrados).

10.2.9. Análisis de estructura-función del dominio N34

Como se analizó anteriormente, el motivo N34 de *RalXyn10A* contiene un residuo de cisteína que participaría de manera crítica en la formación de un puente disulfuro con un residuo similar ubicado en el dominio GH10 de la proteína. El proceso redox genera una enzima más activa, con una mejora en la unión a sustratos insolubles. Teniendo en cuenta esta última característica, se hicieron alineamientos de secuencias entre el dominio N34 de *RalXyn10A* con dominios de otras proteínas cuya función se haya relacionado con la interacción con diferentes sustratos. A partir de los alineamientos con diferentes familias de CBMs, el mayor grado de similitud se encontró con el CBM37_1 de *RalCel5G* (23 %), aunque los aminoácidos conservados en estos módulos no están presentes en el N34. Además, se realizaron alineamientos con múltiples secuencias de proteínas *dockerin* y tipo *pili*, que son componentes moleculares extracelulares involucrados en el ensamblaje de celulosomas o en la interacción con polisacáridos de fibrillas, que se describieron previamente en *R. albus* (119,123). Los resultados de estos alineamientos mostraron similitudes de secuencia aún más bajas (~5-10 %), lo que sugiere que el motivo N34 no pertenecería a esta familia de proteínas. Invertimos la estrategia para encontrar una posible

similitud con proteínas de función conocida, ahora utilizando la secuencia de aminoácidos N34 como blanco contra el universo de dominios polipeptídicos en la base de datos BLAST. Mediante este procedimiento, identificamos una similitud significativa (~50 %) con los transportadores SBP (*Substrate Binding Protein*) del *Cassette ABC* (de las siglas en inglés *ATP binding cassette*) presentes en las membranas de muchas bacterias (180–182). Este resultado sugiere el papel de N34 en la conexión de *RalXyn10A* con la membrana de la bacteria, probablemente acoplado la degradación enzimática de los polisacáridos con el transporte de estos productos (monosacáridos) a la célula. Además, comparamos la secuencia N34 con la base de datos de proteínas de *R. albus*, revelando su presencia en un grupo de diecisiete proteínas que incluyen: cinco transglutaminasas, dos ColH quinasas, dos GH; y ocho catalogadas como proteínas putativas, sin función asignada.

10.3. Caracterización de glicosil fosforilasas de *R. albus* 8

La degradación de los celo-oligosacáridos metabolizados intracelularmente por *R. albus* 8 es catalizada por las enzimas celobiosa fosforilasa (CBP; EC 2.4.1.2) y celodextrina fosforilasa (CDP; EC 2.4.1.49), a diferencia de la hidrólisis catalizada por BG, típica de otros organismos (132). Estas enzimas pertenecen a la familia de las GH94 y desempeñan un papel clave en el metabolismo de las celodextrinas, ya que catalizan la fosforólisis reversible de un glucósido para producir el correspondiente azúcar-1P (Ec. 1) (38,94,100,133–135). Particularmente, las CDPs han sido ampliamente utilizadas en la síntesis enzimática de diferentes polisacáridos ya que poseen una amplia variedad de sustratos donantes y aceptores, lo que las convierte en una excelente herramienta para la biosíntesis de diversos polisacáridos (90,94,99,100,136,137). El grado de polimerización promedio de los sustratos de las CDPs, oscila entre 8 y 10 unidades de glucosa, lo que sugiere que estas enzimas no pueden interactuar con las cadenas de celo-oligosacáridos de un mayor grado de polimerización (90). Para superar este problema, numerosas GH poseen, además del dominio catalítico, uno o más CBMs (60), sin embargo, no se ha notificado ninguna enzima de la familia GH94, que contenga en su estructura un CBM.

10.3.1. Análisis de secuencias y construcción de variantes

En el proteoma de *R. albus* 8 (ID [UP000004259](#)) se identificaron las secuencias correspondientes a dos GP de la familia GH94 (E9SB92 y E9SAK5). Dentro de esta familia se agrupan celobiosas fosforilasas, celodextrinas fosforilasas, laminaribiosas fosforilasas, quitobiosas fosforilasas, entre otras. La búsqueda de proteínas homólogas mediante la herramienta BLAST mostró que la secuencia proteica E9SB92 es idéntica a la de la CBP de *R. albus* NE1 [53] y presentó una elevada identidad de secuencia con otras CBPs ya cristalizadas, como la CBP de *C. thermocellum* (PDB: 3qde) [47] y *C. gilvus* (PDB: 2cqs) [48] (67 % y 56 %, respectivamente), por lo cual identificamos a la secuencia E9SB92 como *RalCBP*. Por otro lado, la búsqueda de homólogos para la secuencia E9SAK5 identificó que la misma correspondería a una N,N'-diacetyl quitobiosa fosforilasa (ChBP). Sin embargo, E9SAK5, presentó una muy baja identidad con otras ChBPs ya caracterizadas, como ChBP de *Vibrio proteolyticus* (PDB: 1v7w) (183). El alineamiento de E9SAK5 con la CDP de *R. albus* 7 mostró un 95 % de identidad, pero cuando el gen codificante para esta última proteína (Rumal_2403) fue utilizado como template para clonar la CDP de *R. albus* NE1, la enzima recombinante producida exhibió una muy baja afinidad por la Glc-1P y el Pi (171). Es por ello que se decidió clonar y expresar de manera recombinante a la secuencia codificante para E9SAK5 (desde ahora *RalCDP*) para realizar su caracterización bioquímica.

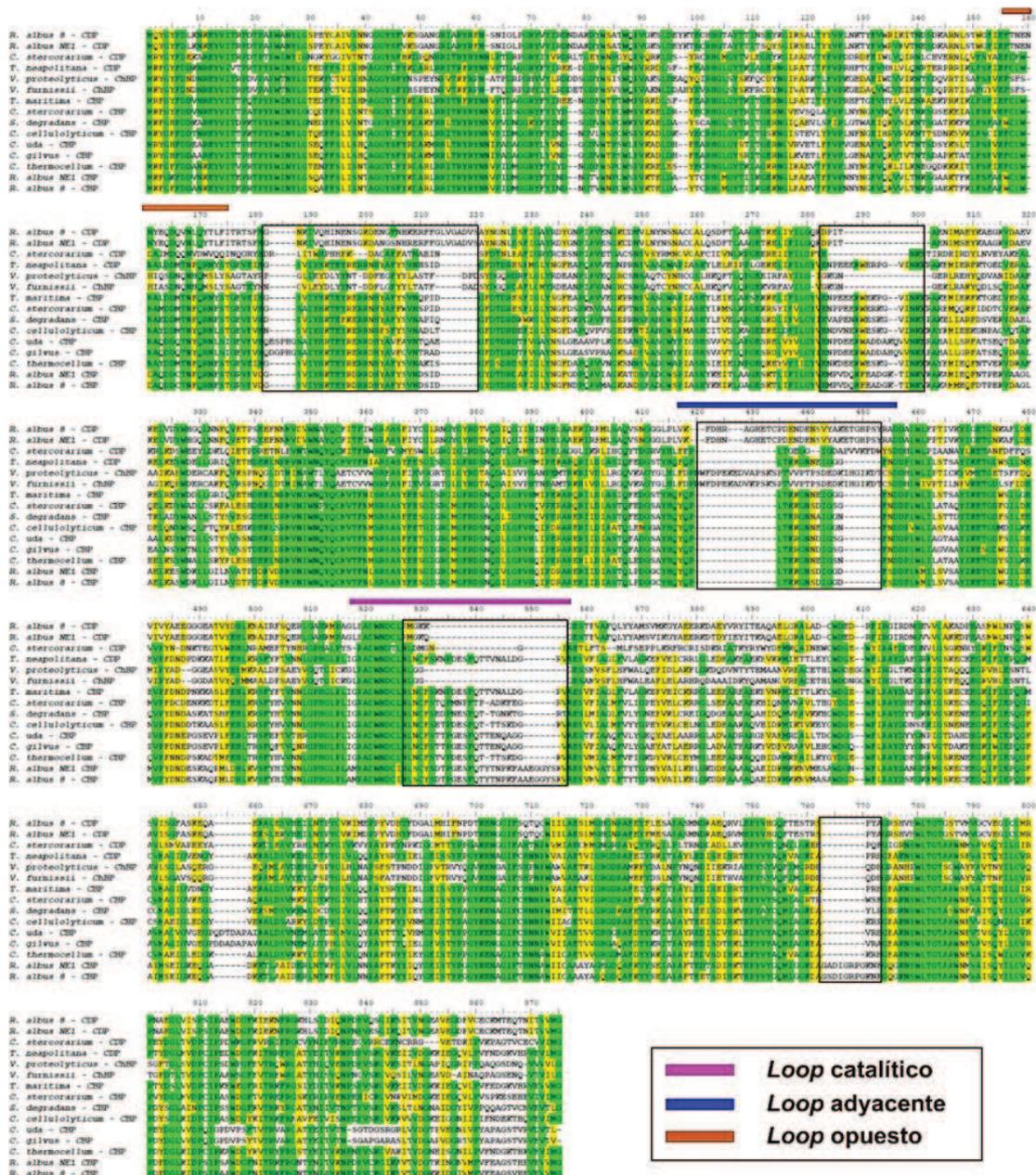


Figura 19. Alineamientos de secuencias de enzimas de la familia GH94. Las diferencias más importantes entre las secuencias se marcan en recuadros negros. Los aminoácidos que conforman los ya caracterizados loops catalíticos, adyacentes, y opuestos se marcan con una barra de color por encima de las secuencias.

La comparación mediante alineamientos múltiples de secuencias de *RalCBP* y *RalCDP* con numerosas enzimas de la familia GH94, reveló que todas las proteínas de esta familia presentan una región N-terminal altamente conservada (aminoácidos 1 a 63) (Figura 19). El análisis de identificación de dominios de proteínas identificó que esta región participaría en la interacción entre las subunidades en el homodímero y/o ser un putativo CBM (Figura 20A). Para analizar esta posible función como CBM, la cual sería novedosa en este tipo de enzimas, se construyó una variante de *RalCDP* a la cual se le removieron los 63 aminoácidos que componen

esta región (*Ral* Δ N63CDP). Paralelamente, se pensó en una estrategia para mejorar la actividad de *Ral*CDP sobre los polisacáridos de cadena larga, para lo cual se construyeron proteínas quiméricas a partir de la fusión del CBM de la familia 37, tanto a *Ral*CDP (*Ral*CDP-CBM37) como a la versión sin el extremo N-terminal (*Ral* Δ N63CDP-CBM37), tal como se muestra en el esquema de la Figura 20B. Para ello, se seleccionó el CBM37_2 de la endoglucanasa *Ral*Cel5G de *R. albus* 8 (aminoácidos 591 a 682), el cual hemos caracterizado previamente durante este trabajo de Tesis, analizando su capacidad de adhesión a diferentes sustratos celulósicos.

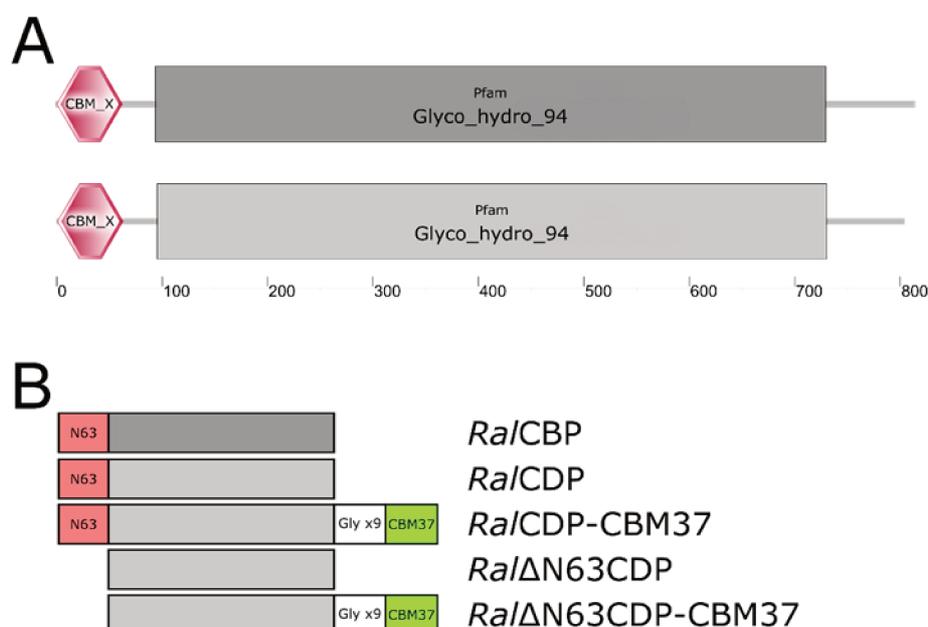


Figura 20. A: Análisis de dominios estructurales mediante la herramienta SMART de *Ral*CBP y *Ral*CDP. **B:** Esquema de las diferentes variantes construidas a partir de *Ral*CBP y *Ral*CDP.

10.3.2. Producción recombinante de *Ral*CBP, *Ral*CDP y construcción de variantes

La expresión recombinante de *Ral*CBP y *Ral*CDP se realizó en células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas con los correspondientes vectores de expresión, a 20 °C y 0,1 mM IPTG en agitación continua por 16 horas y su purificación se llevó a cabo por IMAC, seguida de cromatografía de filtración por gel Superdex G-200. La enzima *Ral*CBP posee 829 aminoácidos y una masa teórica de 92,3 kDa, mientras que *Ral*CDP tiene 809 aminoácidos y 90,2 kDa. El análisis por SDS-PAGE de las proteínas purificadas mostró una única banda de aproximadamente 90 kDa (Figura 21A). La estructura cuaternaria de las proteínas fue analizada mediante cromatografía de exclusión molecular en una columna Tricorn 10/300, y ambas eluyeron en un volumen correspondiente con una masa molecular de 180 kDa, lo que se correspondería con que las mismas adquieren una conformación homodimérica (Figura 21B). La actividad enzimática de cada uno de los picos de elusión se determinó utilizando el correspondiente aceptor (glucosa o

celobiosa) y Glc-1P, obteniéndose actividades específicas de 57 y 98 U/mg, para *RalCBP* y *RalCDP*, respectivamente.

Con el objetivo de caracterizar la función de la región N-terminal (N63) identificado como un putativo CBM, se diseñaron oligonucleótidos específicos para remover mediante PCR las primeras 189 bases de la secuencia del gen *ralcdp*. La secuencia resultante se clonó en el vector de expresión pRSFDuet entre los sitios *SacI* y *SalI*, con el cual se transformó la cepa de *E. coli* BL21(DE3) para la expresión de la proteína recombinante. La versión modificada en su extremo N-terminal de la enzima *RalCDP* (*Ral* Δ N63CDP) posee 746 aminoácidos y una masa teórica de 83,6 kDa (Figura 21A). A diferencia de la versión completa de la enzima, cuando la estructura cuaternaria de la mutante trunca fue analizada mediante cromatografía de exclusión molecular, eluyó en un volumen correspondiente con el de un monómero, presentando una actividad específica de 31 U/mg (Figura 21B).

Para la fusión del CBM37 a *RalCDP*, la secuencia codificante para el CBM37_2 de *RalCel5G* fue obtenida mediante PCR a partir del gen de *ralcel5g* utilizando los *primers* FwCBM37_2 y RvCBM37_2, agregando los sitios de restricción específicos que permiten introducir el fragmento de PCR en un *cassette* previamente diseñado para clonar el gen entre dos *linkers* de glicinas (GlyX9). Esta estrategia permitió fusionar el CBM tanto al extremo 3' como 5' del gen codificante *ralcdp*, previamente clonado en un vector pETDuet entre los sitios *SacI* y *SalI*. La selección de este *linker* flexible confiere un mayor grado de movilidad entre los dominios, permitiendo mayor libertad para la interacción con el sustrato.

Notablemente, la fusión del CBM37 a las diferentes versiones de la enzima *RalCDP* tuvo efectos completamente diferentes, ya que cuando se fusionó a la región N-terminal de *RalCDP* o *Ral* Δ N63CDP las enzimas fueron completamente inactivas. Sin embargo, cuando fue incorporado como dominio C-terminal de *RalCDP* (*RalCDP*-CBM37) la enzima exhibió una actividad específica de 45 U/mg. La determinación de la estructura cuaternaria de todas estas construcciones reveló que la fusión del CBM37 al C-terminal de *RalCDP* no afectó su conformación como homodímero, mientras que la proteína quimérica *Ral* Δ N63CDP-CBM37 se presentó como un multímero de cinco subunidades y resultó inactiva (Figura 21B). Los resultados obtenidos a partir de la construcción y evaluación de la estructura cuaternaria de *Ral* Δ N63CDP y *RalCDP*-CBM37 muestran la importancia del dominio N-terminal en esta enzima, ya que la ausencia de tal región impide la correcta conformación proteica como homodímero con un consecuente cambio en la actividad enzimática. Además, la fusión del CBM en el N-terminal de la enzima puso de manifiesto relevancia funcional de esta región, ya que en estas construcciones la actividad enzimática fue abolida.

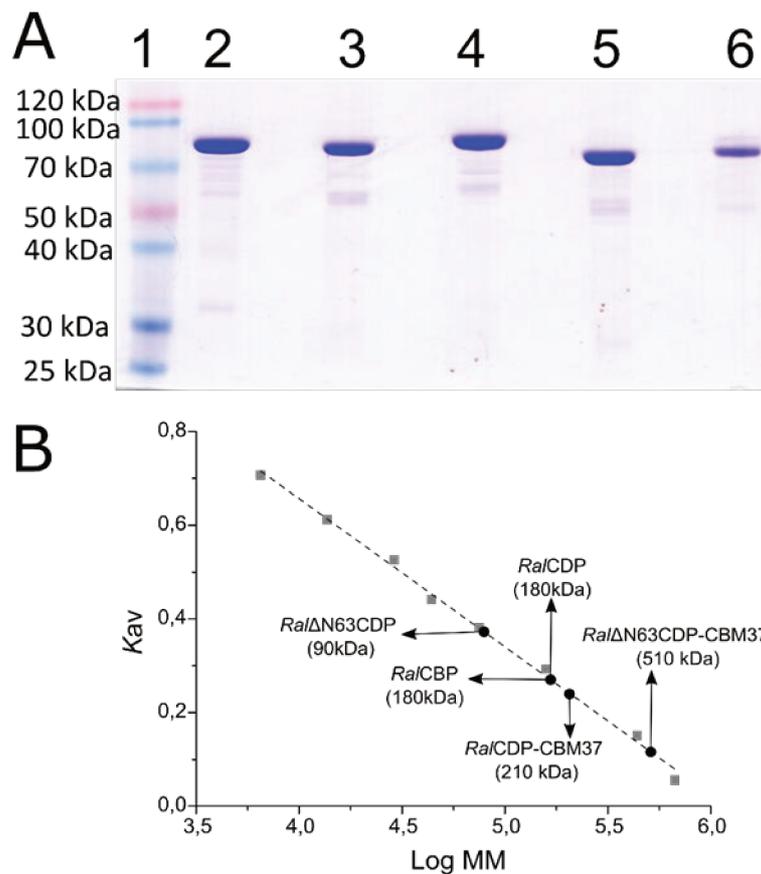


Figura 21. A: SDS-Page de las enzimas recombinantes purificadas: Marcadores de masa molecular (1), *Ral*CBP (2), *Ral*CDP (3), *Ral*CDP-CBM37 (4), *Ral*ΔN63CDP (5) y *Ral*ΔN63CDP-CBM37 (6). **B:** Determinación de la estructura cuaternaria de las diferentes construcciones mediante cromatografía de exclusión molecular.

10.3.3. Modelado molecular y comparación de estructuras

Los modelos tridimensionales obtenidos mediante AlphaFold 2 para *Ral*CBP y *Ral*CDP se compararon con las estructuras cristalográficas correspondientes a la CBP de *C. thermocellum* (PDB: 3QDE) (184) y a la única CDP informada hasta el momento perteneciente a *C. thermocellum* (PDB: 5NZ8), que ha sido cristalizada con los sustratos celotetraosa y Pi (185). En la estructura cristalina se observa que ambas enzimas son homodiméricas, y que sus sitios activos están conformados por la interacción entre las dos subunidades. El sitio activo de la CDP se encuentra en un extremo del barril-(α/α)₆ del dominio catalítico y el sitio de unión al sustrato está delimitado en gran medida por el *loop* opuesto de la segunda subunidad como se muestra en la Figura 22, mientras que en CBP, el sitio activo está delimitado principalmente por el *loop* catalítico de la misma subunidad (185).

A partir del alineamiento múltiple de secuencias se evidenció que el *loop* catalítico de *Ral*CBP está altamente conservado entre estas proteínas, tanto en longitud como en el tipo de aminoácidos que lo componen. En cambio, en *Ral*CDP, se observó que el *loop* opuesto es más

extenso que en el resto de las fosforilasas analizadas, además de que esta región presentó un muy bajo porcentaje de conservación en los aminoácidos que la componen. Para analizar en detalle estas características particulares del *loop* opuesto de *RalCDP*, se hizo un refinamiento sobre esta región a partir del modelo obtenido previamente, generando cinco nuevos modelos, todos con valores de calidad muy similares (α -DOPE aprox. $\sim -2,0$). Con estos modelos, sumado al modelo inicial, se hizo una superposición con la subunidad B de 5NZ8 y observamos la disposición espacial del *loop* opuesto (de cada uno de los modelos obtenidos) respecto al sitio de unión al sustrato de la subunidad A, pudiendo evidenciarse cómo la mayor extensión del *loop* opuesto de *RalCDP* le daría mayor plasticidad al sitio de unión del sustrato (Figura 22). Estas diferencias nos llevaron a especular que estas características particulares de *RalCDP* podrían estar modificando la especificidad por los sustratos respecto al resto de las GP de la familia GH94 caracterizadas hasta el momento.

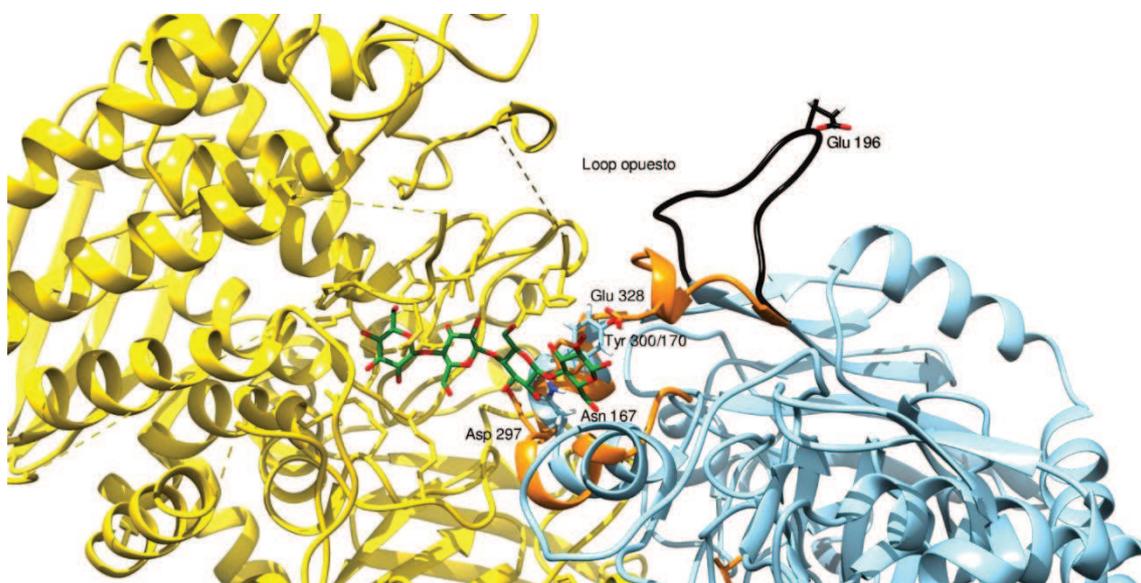


Figura 22. Conformación del sitio activo de la CDP de *C. thermocellum* (PDB 5NZ8) por la interacción entre ambas subunidades del homodímero. Diferencias en el *loop* opuesto de *RalCDP* (negro) y la CDP de *C. thermocellum* (naranja) mostradas por la superposición del modelo de *RalCDP* con la subunidad B de 5NZ8 y su influencia en el sitio de unión de la subunidad A (amarillo).

10.3.4. Propiedades fisicoquímicas de las enzimas

Dado que el cambio de estructura cuaternaria o la fusión del CBM37 podría alterar la sensibilidad de la proteína al pH o la temperatura, examinamos la actividad en función estas variables para las diferentes formas de las enzimas. Las actividades fosforolítica y sintética de cada una de las enzimas se analizaron en función del pH y de la temperatura, no habiéndose observado diferencias en el pH ni en la temperatura óptimos entre los distintos sentidos de reacción para ninguna de las variantes analizadas. En general, todas las enzimas exhibieron una dependencia similar de la actividad catalítica con la temperatura y el pH, aunque se evidenciaron diferencias en los pH más bajos ensayados (3 a 5) (Figura 23A). La actividad enzimática fue máxima en el rango de 5 a 7 para las enzimas *RalCBP* y *RalCDP*, mientras que para las versiones *RalΔN63CDP* y *RalCDP-CBM37*, el rango óptimo se mantuvo entre 6 y 7. A pH inferior a 5, se observó una mayor actividad de las versiones *RalCDP* y *RalCDP-CBM37* respecto de *RalΔN63CDP* y *RalCBP*, alcanzando una diferencia del 60% en la actividad residual a pH 5 en *buffer* citrato de sodio. Del mismo modo, se observó una diferencia menor (~20 %) también entre estas mismas variantes a pH 8 en *buffer* Tris-HCl.

En cuanto a la estabilidad de las enzimas a diferentes condiciones de pH, *RalCDP* y *RalCDP-CBM37* conservaron un 80 % de su actividad enzimática cuando fueron incubadas por 1 h a diferentes pH en el rango de 4 a 9. *RalCBP* conservó un nivel similar de actividad sólo cuando se incubó entre pH 4 y 6, ya que para el resto de las condiciones presentó entre un 50 y 60 % de su actividad inicial. Por su parte, *RalΔN63CDP* fue la variante con menor estabilidad, exhibiendo un 40 % de actividad residual luego de su incubación a pH mayores a 6. Sin embargo, presentó un 70 % de la actividad inicial cuando se incubó en *buffer* acetato de sodio en el rango de 4 a 6. Es importante mencionar que todas las enzimas presentaron una muy baja estabilidad cuando fueron incubadas en *buffer* citrato de sodio a pH 3 (Figura 23B).

La determinación de la temperatura óptima de cada una de las enzimas mostró que todas las variantes, con excepción de *RalCDP-CBM37*, presentaron un máximo de actividad a 45 °C, conservando más del 50 % de actividad en el rango entre 30 °C a 50 °C y con una notable disminución para temperaturas inferiores a 30 °C o superiores a 60 °C (Figura 23C). Por su parte, *RalCDP-CBM37*, presentó una temperatura óptima de 50 °C y en general se observó que la fusión del dominio CBM37 a *RalCDP* afectó de manera positiva la respuesta de la enzima frente al cambio de temperatura. Particularmente, la actividad de *RalCDP* disminuyó considerablemente a temperaturas apenas inferiores o superiores a su temperatura óptima (60 % y 40 % de su actividad óptima a 40 °C y 55 °C, respectivamente), mientras que *RalCDP-CBM37* conservó el 80 % y más del 60% de su actividad a 40 °C y 55 °C, respectivamente (Figura 23C). Para analizar en detalle este aumento en la estabilidad térmica, se incubaron ambas enzimas por 1 h a diferentes

temperaturas para luego determinar su actividad enzimática residual. Se observó que, conforme a los resultados anteriores, *Ral*CDP-CBM37 conservó más del 60 % de su actividad enzimática a 60 °C, mientras que, a esta misma temperatura la actividad de *Ral*CDP se redujo en un 90 % (Figura 23D).

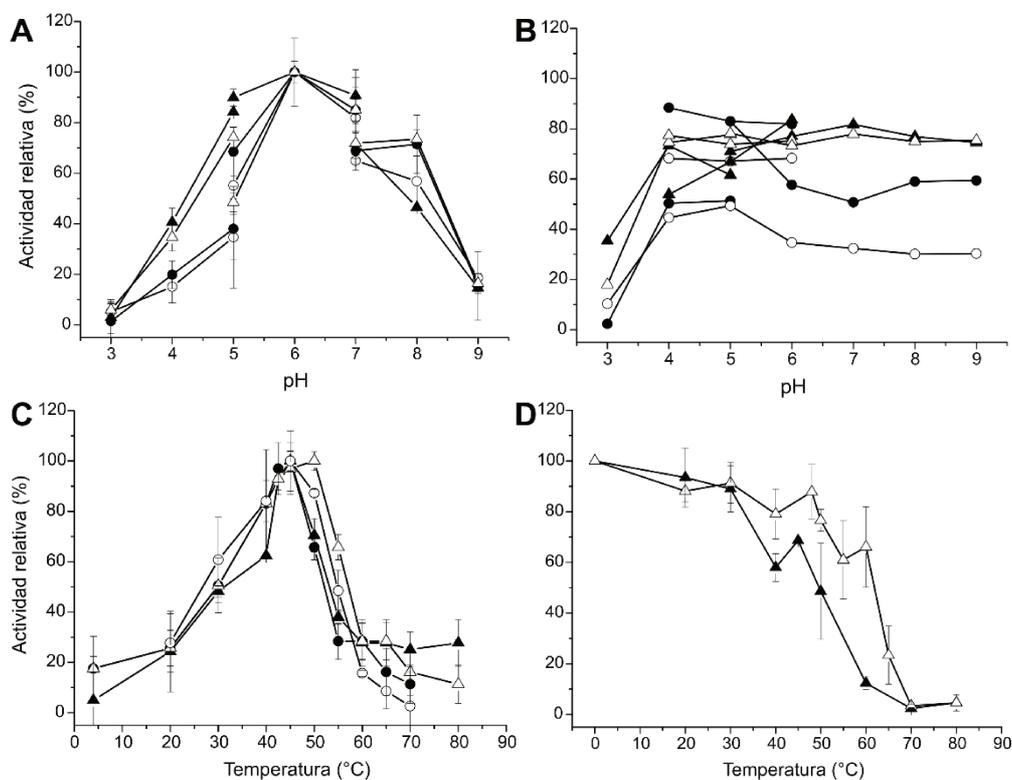


Figura 23 A: Actividad enzimática de *Ral*CBP (círculos negros), *Ral*CDP (triángulos negros), *Ral*CDP-CBM37 (triángulos blancos) y *Ral*ΔN63CDP (círculos blancos) a diferentes pH. B: Actividad enzimática residual de *Ral*CBP (círculos negros), *Ral*CDP (triángulos negros), *Ral*CDP-CBM37 (triángulos blancos), and *Ral*ΔN63CDP (círculos blancos) luego de ser incubadas por 1 h en soluciones *buffer* de distintos pH. C: Actividad enzimática de *Ral*CBP (círculos negros), *Ral*CDP (triángulos negros), *Ral*CDP-CBM37 (triángulos blancos) y *Ral*ΔN63CDP (círculos blancos) a diferentes temperaturas. D: Actividad enzimática residual de *Ral*CDP (triángulos negros) y *Ral*CDP-CBM37 (triángulos blancos), luego de ser incubadas por 1 h a diferentes temperaturas.

10.3.5. Caracterización de propiedades bioquímicas

La actividad enzimática de cada una de las versiones de las fosforilasas producidas se determinó para ambos sentidos de reacción (síntesis y fosforólisis) utilizando sustratos de diferente grado de polimerización, para los cuales se determinaron los parámetros cinéticos correspondientes. La actividad fosforolítica de *Ral*CBP y *Ral*CDP y sus variantes *Ral*ΔN63CDP y *Ral*CDP-CBM37 se ensayó con los sustratos celulósicos celobiosa, celotriosa, celotetraosa, celopentaosa y los oligosacáridos CMC y PASC, además de los disacáridos laminaribiosa, lactosa, maltosa, sacarosa. En la determinación de la actividad sintética de estas enzimas, además

de los sustratos anteriormente mencionados, se incluyeron los monosacáridos glucosa, xilosa y glucosamina como aceptores. Los parámetros cinéticos determinados en estos estudios son detallados en la Tabla 9.

RalCBP presentó actividad fosforolítica únicamente con los disacáridos celobiosa y lactosa, y en menor medida con el trisacárido celotriosa. Los parámetros cinéticos mostraron la máxima velocidad de catálisis con el disacárido celobiosa con un valor de K_M en el orden de la unidad milimolar. La velocidad con celotriosa y lactosa fue 250 y 5.000 veces menor, respectivamente, pero los valores que estiman la afinidad para estos sustratos fueron similares. Se analizó también, la capacidad de síntesis utilizando como dador glucosídico α -Glc-1P y los diferentes aceptores mencionados anteriormente. En este sentido, *RalCBP* presentó la máxima actividad con glucosa, seguida por el uso de los monosacáridos xilosa y glucosamina como aceptores, la cual fue 2,5 y 8,5 veces menor, respectivamente. La disminución de la actividad se exacerbó a medida que se aumentó el grado de polimerización del sustrato aceptor, siendo 450 veces menor cuando se utilizó el disacárido celobiosa y 1.100 veces menor con celotriosa. Los valores de K_M para los diferentes monosacáridos aceptor mostraron considerables variaciones dependiendo de la estructura química de los mismos, siendo mínimo para la glucosa, y aumentando 7,5 y 20 veces para la glucosamina y la xilosa, respectivamente. Paralelamente, la afinidad relativa de *RalCBP* no fue afectada significativamente cuando el sustrato aceptor fue el disacárido celobiosa o el trisacárido celotriosa, como lo muestran los valores de K_M para celobiosa y celotriosa en la Tabla 9. Notablemente, la enzima también presentó actividad sintética cuando se utilizó Gln-1P como dador y glucosa como aceptor, pero la misma fue 600 veces menor respecto a la determinada con Glc-1P.

Por otro lado, *RalCDP* mostró actividad sintética con diferentes aceptores como glucosa, glucosamina, xilosa, celobiosa, celotriosa, celotetraosa, celopentaosa y los polisacáridos PASC y CMC, aunque la eficiencia de utilización de los monosacáridos fue considerablemente menor que la de *RalCBP*, principalmente con glucosa, para la cual la eficiencia fue 14 veces menor (Tabla 9). *RalCDP* exhibió máxima eficiencia catalítica con los sustratos celotetraosa y celopentaosa, y valores 3, 4 y 25 veces menores para los aceptores celotriosa, celobiosa y glucosa, respectivamente; mientras que la eficiencia catalítica con los polisacáridos CMC y PASC fue unas 3.000 veces inferior. Estos resultados indican la preferencia de *RalCDP* por oligosacáridos sobre la utilización de di- o monosacáridos como aceptores, aunque la actividad se ve reducida cuando el grado de polimerización aumenta considerablemente, como en el caso de los polisacáridos CMC y PASC. Estas propiedades son similares a las descritas para polisacáridos de cadena larga en otras CDPs [54]. Del mismo modo, la eficiencia catalítica de *RalCDP* en la fosforólisis de los diferentes sustratos fue máxima con celopentaosa y muy similar con celotetraosa, seguida de celotriosa y celobiosa (10 y 35 veces menores, respectivamente). Esta disminución en la eficiencia

catalítica se debió principalmente a un aumento en el valor de K_M conforme disminuye el grado de polimerización del sustrato, ya que el número de recambio de la enzima fue similar con todos los celo-oligosacáridos (Tabla 9). Al igual que para el sentido de síntesis, la actividad fosforolítica sobre los polisacáridos CMC y PASC fue 1.000 veces inferior a la que la enzima presentó con los celo-oligosacáridos.

Cuando se eliminó la región N-terminal de *Ral*CDP, además del cambio en su estructura cuaternaria, la enzima *Ral* Δ N63CDP presentó parámetros cinéticos notablemente diferentes a los de la enzima completa. Como se muestra en la Tabla 9, la variante truncada exhibió una reducción de ~1.000 veces en su capacidad de fosforólisis de celobiosa y se mostró inactiva con otros disacáridos u oligosacáridos. Sin embargo, cuando se analizó la reacción sintética se observó una k_{cat} sólo 10 veces menor a la de la enzima completa al utilizar celobiosa o glucosa como aceptores y Glc-1P como dador de residuo glucosilo. El análisis de los parámetros cinéticos de *Ral* Δ N63CDP y *Ral*CDP para los sustratos Glc-1P y Pi, mostraron marcadas diferencias en la afinidad. Respecto a los parámetros cinéticos exhibidos por *Ral*CDP, la variante *Ral* Δ N63CDP mostró una reducción de ~30 veces en la afinidad por el Pi, pero también una reducción de un orden de magnitud en los valores de K_M para Glc-1P. Estos cambios llevaron a una disminución significativa en la eficiencia catalítica de la mutante trunca en la fosforólisis de la celobiosa, pero la eficiencia en síntesis de celotriosa a partir de celobiosa se mantuvo en el mismo nivel que para *Ral*CDP (Tabla 10). Esto conferiría a *Ral* Δ N63CDP una ventaja a la hora de utilizarla como herramienta en la síntesis de celo-oligosacáridos.

Finalmente, la fusión del CBM37 a *Ral* Δ N63CDP y *Ral*CDP tuvo efectos completamente diferentes sobre las propiedades catalíticas. *Ral* Δ N63CDP-CBM37 fue completamente inactiva, mientras que *Ral*CDP-CBM37 no mostró mayores diferencias, en relación a *Ral*CDP, en los parámetros cinéticos cuando se utilizaron celo-oligosacáridos (Tabla 9). Sin embargo, se observó una mejora notable en la capacidad de la enzima quimérica respecto a la utilización de los polisacáridos CMC y PASC, principalmente en la reacción de fosforólisis. La proteína fusionada al CBM exhibió un número de recambio un orden de magnitud mayor y una reducción en los valores de K_M para CMC y PASC de aproximadamente 2 veces. Consecuentemente, *Ral*CDP-CBM37 mostró una eficiencia catalítica ~20 veces mayor en la fosforólisis de los polisacáridos respecto a la determinada para *Ral*CDP (Tabla 9).

Tabla 9. Parámetros cinéticos de las enzimas con diferentes sustratos en cada uno de los sentidos de reacción

Enzima	Reacción	Sustrato	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (mM) (mg/ml)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ ·mM ⁻¹) (ml·s ⁻¹ ·mg ⁻¹)
<i>Ral/CBP</i>	Síntesis	Glucosa	178 ± 2	2,0 ± 0,2	89
		Xilosa	71 ± 4	39 ± 6	1,82
		Glucosamina	21 ± 3	11 ± 5	1,91
		Celobiosa	0,41 ± 0,01	9 ± 6	0,045
		Celotriosa	0,14 ± 0,01	9,4 ± 0,6	0,015
		Celotetraosa	ND	ND	-
		CMC	ND	ND	-
		PASC	ND	ND	-
	Fosforólisis	Celobiosa	152 ± 4	2,3 ± 0,4	66,1
		Celotriosa	0,62 ± 0,01	5,2 ± 0,9	0,12
		Celotetraosa	ND	ND	-
		Lactosa	0,03 ± 0,01	7 ± 2	0,004
		Sacarosa	ND	ND	-
		Maltosa	ND	ND	-
CMC*		ND	ND	-	
PASC*		ND	ND	-	
<i>Ral/CDP</i>	Síntesis	Glucosa	4,98 ± 0,08	0,8 ± 0,1	6,2
		Celobiosa	310 ± 30	8,0 ± 1	38,8
		Celotriosa	720 ± 30	13 ± 3	55,4
		Celotetraosa	1416 ± 38	9 ± 3	157,4
		Celopentaosa	235 ± 9	1,5 ± 0,4	156,7
		CMC	0,33 ± 0,03	6,5 ± 0,5	0,05
		PASC	0,38 ± 0,03	8,4 ± 0,1	0,045
		Fosforólisis	Celobiosa	19,7 ± 0,4	4,3 ± 0,4
	Celotriosa		29,6 ± 0,5	1,9 ± 0,4	15,6
	Celotetraosa		28,2 ± 0,5	0,28 ± 0,08	100,7
	Celopentaosa		20,4 ± 0,3	0,13 ± 0,03	156,7
	CMC*		0,024 ± 0,001	5,5 ± 0,4	0,004
	PASC*		0,028 ± 0,001	5,1 ± 0,8	0,005

<i>Rat</i> /CDP-CBM37	Síntesis	Glucosa	ND	ND	-
		Celobiosa	149 ± 9	5,8 ± 0,8	25,7
		Celotriosa	757 ± 15	11 ± 2	68,8
		Celotetraosa	1474 ± 28	8 ± 1	184,3
		Celopentaosa	218 ± 6	1,3 ± 0,3	167,5
		CMC	0,27 ± 0,03	3,0 ± 0,5	0,09
		PASC	0,27 ± 0,03	2,1 ± 0,4	0,13
	Fosforólisis	Celobiosa	1,2 ± 0,1	11 ± 2	0,1
		Celotriosa	30,2 ± 0,4	2,2 ± 0,3	13,7
		Celotetraosa	27,5 ± 0,4	0,24 ± 0,06	114,6
		Celopentaosa	16,4 ± 0,2	0,14 ± 0,03	117,1
		CMC*	0,28 ± 0,04	2,8 ± 0,3	0,1
		PASC*	0,27 ± 0,03	3,6 ± 0,7	0,08
<i>Rat</i> /ΔN63CDP	Síntesis	Glucosa	0,47 ± 0,4	11 ± 2	0,043
		Celobiosa	42 ± 5	22 ± 2	1,9
		Celotriosa	0,02 ± 0,01	7 ± 2	0,003
		Celotetraosa	ND	ND	-
		CMC	ND	ND	-
		PASC	ND	ND	-
	Fosforólisis	Celobiosa	0,02 ± 0,01	20 ± 3	0,001
		Celotriosa	ND	ND	-
		Celotetraosa	ND	ND	-
		CMC*	ND	ND	-
		PASC*	ND	ND	-

Tabla 10. Comparación de parámetros cinéticos entre ambos sentidos de reacción

Enzima	Aceptor	Síntesis			Fosforólisis		
		k_{cat} (s ⁻¹)	K_M Glc-1P (mM)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ .mM ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M Pi (mM)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ .mM ⁻¹)
<i>RalCBP</i>	Glucosa	178 ± 2	2,0 ± 0,2	39	-	-	-
	Celobiosa	0,37 ± 0,01	15 ± 3	0,025	284 ± 1	0,58 ± 0,02	489,6
<i>RalCDP</i>	Glucosa	5,0 ± 0,1	1,4 ± 0,9	3,6	-	-	-
	Celobiosa	310 ± 30	2,1 ± 0,1	147,6	19,7 ± 0,7	0,5 ± 0,1	39,4
<i>RalΔN63CDP</i>	Glucosa	0,47 ± 0,04	0,14 ± 0,08	3,4	-	-	-
	Celobiosa	42 ± 1	0,32 ± 0,08	131,3	0,024 ± 0,001	16 ± 5	0,002

10.3.6. Ensayos de corrimiento de estabilidad térmica

Se determinaron las temperaturas de fusión (T_m) de las diferentes variantes construidas a partir de *RalCDP* y se realizaron ensayos de corrimiento de estabilidad térmica para analizar las diferencias observadas previamente entre ellas. La enzima *RalCDP* presentó un T_m de 54,5 °C, mientras que la variante *RalCDP*-CBM37 mostró un aumento de 2 °C en su T_m y en la versión de la enzima que carece de la región N-terminal este valor disminuyó en 12,5 °C (Figura 24A). El aumento en la estabilidad de la enzima producido por la fusión del dominio CBM37 es coincidente con los ensayos de estabilidad térmica. Por otra parte, la disminución de T_m observada en *RalΔN63CDP* podría atribuirse a su diferente estructura cuaternaria respecto de *RalCDP* y *RalCDP*-CBM37, siendo los homodímeros más estables que el monómero.

Adicionalmente se determinó la influencia de diferentes ligandos sobre la estabilidad de cada una de las variantes en base al desplazamiento de su T_m . En general, todas las enzimas mostraron un aumento en su T_m en presencia de Glc-1P, con la particularidad de que, a una concentración de 1 mM, la T_m de *RalΔN63CDP* aumentó 1,5 °C desde 42 °C, mientras que para *RalCDP* y *RalCDP*-CBM37 permaneció inalterada. Sin embargo, a una concentración de 10 mM de Glc-1P, el efecto fue el contrario; *RalCDP* y *RalCDP*-CBM37 mostraron un aumento en su T_m de 6,1 °C y 4,8 °C, respectivamente, mientras que la T_m de *RalΔN63CDP* no fue modificada (Figura 24A). Estos resultados concuerdan con los valores de K_M para Glc-1P determinados en la Tabla 10, donde *RalΔN63CDP* presentó mayor afinidad por Glc-1P respecto al resto de las proteínas estudiadas. Los demás ligandos ensayados produjeron un aumento en la T_m de *RalΔN63CDP* de entre 1,5 y 2 °C, incluso ante el agregado de Pi, por el cual la enzima había

mostrado baja afinidad (Figura 24B). La máxima estabilización de esta enzima se dio en presencia simultánea de glucosa y Pi en el medio de reacción. Con respecto a *RalCDP* y *RalCDP-CBM37*, sólo se evidenció un incremento en la T_m en presencia de celotriosa (incrementos de 1 y 2 °C en la T_m , respectivamente), mientras que los demás ligandos produjeron cambios mínimos en la T_m (Figura 24C).

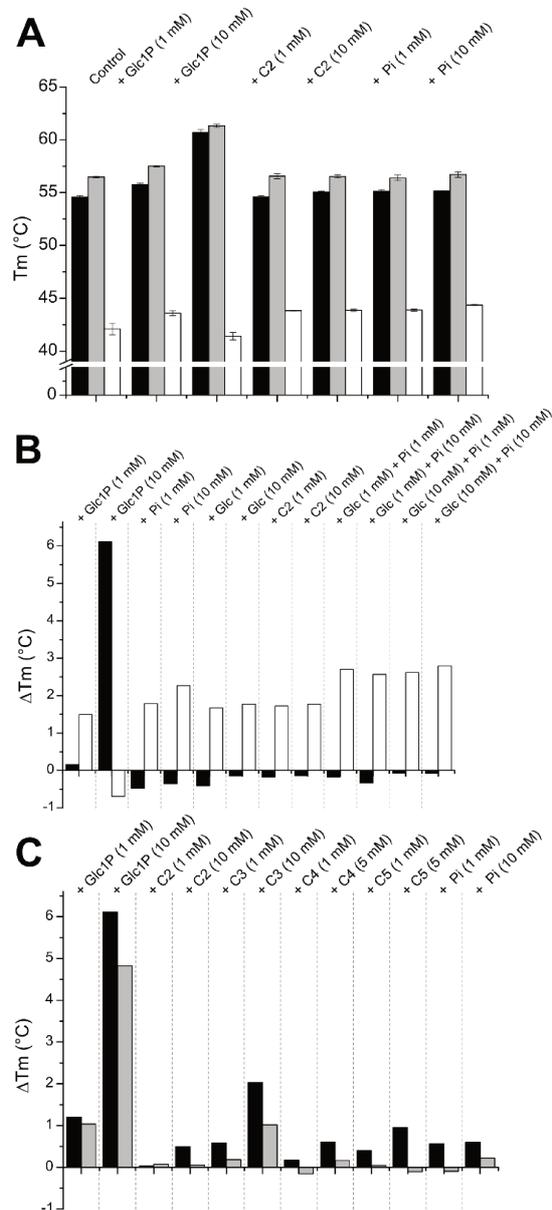


Figura 23. A: Determinación de temperaturas de fusión (T_m) para cada una de las enzimas *RalCDP* (negro), *RalCDP-CBM37* (gris) y *RalΔN63CDP* (blanco). **B y C:** Desplazamiento térmico (ΔT_m) provocado por el agregado de diferentes efectores para las distintas versiones *RalCDP* (negro), *RalCDP-CBM37* (gris) y *RalΔN63CDP* (blanco).

10.3.7. Capacidad de unión a polisacáridos

Se evaluó la capacidad de unión de las variantes *Ral*CDP, *Ral* Δ N63CDP, y *Ral*CDP-CBM37 al polisacárido celulósico PASC. Las enzimas fueron incubadas con el polisacárido y luego se analizaron la fracción soluble y la adherida al sustrato en un gel SDS-PAGE. Como se observa en la Figura 25A, la enzima nativa *Ral*CDP y la versión modificada *Ral* Δ N63CDP fueron incapaces de unirse a este sustrato, permaneciendo principalmente en la fracción soluble luego de la incubación. Esto indicaría que la región N-terminal, predicha como un putativo CBM, carece de esta funcionalidad, al menos con sustratos celulósicos. Sin embargo, la adición del CBM37 a la enzima (*Ral*CDP-CBM37), mejoró notablemente la capacidad de unión al polisacárido. Los parámetros de interacción entre la enzima y el polisacárido se calcularon a partir de las isotermas de unión para *Ral*CDP-CBM37 con el sustrato PASC como se muestran en la Figura 25B. La proteína de fusión *Ral*CDP-CBM37 presentó una constante de disociación (K_d) de $1,73 \pm 0,06 \mu\text{M}$ y una capacidad máxima de adsorción (E_{Max}) de $2,36 \pm 0,05 \mu\text{mol/g}$, las cuales son 5 veces superiores a los de la enzima salvaje. Estos resultados indican que CBM37 reconoce efectivamente el sustrato insoluble PASC, y este reconocimiento no estaría mediado por el dominio N-terminal, como lo respaldan los resultados obtenidos con la versión de *Ral*CDP completa (Figura 25A). Esta capacidad de unión al sustrato insoluble mediada por el CBM había sido reflejada anteriormente en los parámetros cinéticos de *Ral*CDP-CBM37, donde se observó un aumento en la actividad y una disminución en el valor de K_M para los polisacáridos CMC y PASC (Tabla 9).

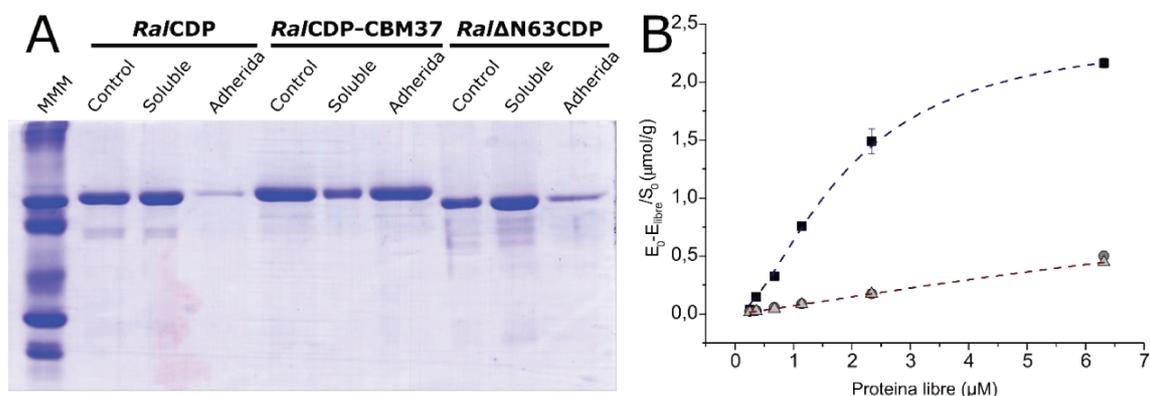


Figura 24. Análisis de la capacidad de unión de las enzimas al sustrato PASC. **A:** SDS-PAGE de las diferentes fracciones tras incubación con el sustrato (Control: enzima incubada sin sustrato). **B:** Isotermas de unión para *Ral*CDP (círculos), *Ral*CDP-CBM37 (cuadrados) y *Ral* Δ N63CDP (triángulos).

10.4. Uso de enzimas como herramientas para la degradación de material lignocelulósico y la síntesis de celo-oligosacáridos

10.4.1. Actividad sinérgica celulasas-hemicelulasas sobre un sustrato lignocelulósico

La degradación del material lignocelulósico hasta los azúcares simples que lo constituyen requiere la acción conjunta de diferentes enzimas ya que, en general, una única enzima es incapaz de alcanzar este objetivo de manera eficiente. Así también, para lograr un cóctel de enzimas adecuado es necesario optimizar diferentes factores como, por ejemplo, que las condiciones óptimas de trabajo de cada uno de los componentes sean similares, que su actividad sea complementaria y establecer proporciones adecuadas de cada uno de ellos. Todos estos factores deben abordarse para desarrollar un complejo de enzimas que puedan superar este cuello de botella, clave en los procesos de biorrefinería. Por lo tanto, para lograr mejoras en la formulación de enzimas se requiere, no sólo la caracterización exhaustiva de cada una de las que están involucradas en el proceso, sino también analizar el efecto de su interacción en la actividad enzimática sobre los diferentes sustratos lignocelulósicos. Además de celulosa, el material lignocelulósico está compuesto por un 20-25 % de hemicelulosa, por lo cual su degradación no sólo implicaría un incremento en el rendimiento de azúcares fermentables, sino que también se ha demostrado que facilita la hidrólisis de las cadenas de celulosa por las celulasas. Incluso, la determinación de los mecanismos subyacentes de la sinergia entre celulasas y entre éstas y hemicelulasas, podría optimizar la aplicación de las mismas en entornos industriales (76,186,187). Es por ello que, determinadas las proporciones más eficientes de endo-exo celulasas (punto 10.1.7), se analizó también el efecto de la suplementación de estas enzimas con la hemicelulasa previamente caracterizada (*RalXyn10A*). Tal estrategia, en principio, permitiría mejorar el rendimiento de las celulasas sobre un sustrato lignocelulósico complejo, incrementando los rendimientos de azúcares fermentables obtenidos. Para ello, se optimizaron las proporciones de hemicelulasas/celulasas a partir de un diseño experimental estadístico sistemático y se determinó su contribución en la degradación del material lignocelulósico (aserrín de madera de pino). Los componentes de la mezcla optimizados corresponden a las concentraciones de cada una de las enzimas: *RalCel5G* (A), *RalCel48A* (B) y *RalXyn10A* (C), cuyas concentraciones finales se establecieron en el rango de 0 a 10 μM y suplementadas con *TbrClgT* (10 μM) para un volumen final de 0,25 ml en tubos *Eppendorf* de 1,5 ml que se incubaron a 800 rpm a 50 ± 1 °C durante 4 h, con una carga inicial de sustrato de 1 mg/ml. Transcurrido el tiempo de reacción, las muestras fueron centrifugadas a 20.000 $\times g$ y se determinó la concentración de azúcares reductores

en el sobrenadante. Los resultados obtenidos de las dieciséis corridas experimentales del diseño se muestran en la Figura 25 A y se detallan en la Tabla 11.

Tabla 11. Componentes evaluados en el modelo de superficie de respuesta

Nº	Orden Corrida	Componente A: <i>RalCel5G</i> (μM)	Componente B: <i>RalCel48A</i> (μM)	Componente C: <i>RalXyn10A</i> (μM)	Respuesta: Azúcares reductores totales (mM)
1	5	0,0	0,0	10,0	0,43
2	10	0,0	10,0	0,0	0,23
3	6	5,0	0,0	5,0	0,93
4	13	5,0	5,0	0,0	0,40
5	12	10,0	0,0	0,0	0,41
6	4	0,0	5,0	5,0	0,22
7	8	6,7	1,6	1,7	1,26
8	7	1,6	6,7	1,7	0,98
9	9	1,7	1,7	6,6	1,26
10	15	0,0	1,7	8,3	0,12
11	14	3,4	3,3	3,3	1,06
12	1	3,3	3,4	3,3	0,82
13	2	3,3	3,3	3,4	0,61
14	3	3,3	3,3	3,3	0,85
15	16	10,0	0,0	0,0	0,67
16	11	0,0	10,0	0,0	0,28

La ecuación del modelo ajustado que presenta los efectos de cada factor sobre la actividad enzimática, luego de excluir los factores no significativos, fue la siguiente:

$$\text{Azúcares reductores totales} = 0,56 * \text{RalCel5G} + 0,31 * \text{RalCel48A} + 0,32 * \text{RalXyn10A} + 5,31 * \text{RalCel5G} * \text{RalXyn10A}$$

En este caso, el modelo indicó no sólo la contribución de cada uno de los componentes, sino que también de la interacción entre *RalCel5G* y *RalXyn10A* fue un factor significativo. La decodificación de los valores óptimos sugeridos por el modelo, minimizando la concentración total de enzima utilizada y maximizando el rendimiento de azúcares solubles, fue de 4,1 μM de *RalCel5G*, 2 μM de *RalCel48A* y 3,9 μM de *RalXyn10A*, para lo cual se estimó una concentración de azúcares totales de 1,5 mM.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con el modelo de predicción, se utilizaron las concentraciones óptimas predichas para realizar el ensayo de degradación del material lignocelulósico. Los rendimientos de azúcares obtenidos fueron de $1,4 \pm 0,1$ mM, los cuales son comparables con los predichos anteriormente por el modelo. Teniendo en cuenta la carga inicial de sustrato, el rendimiento de azúcares reductores obtenido corresponde con un 25 % de hidrólisis.

Es importante destacar que en los ensayos de degradación utilizando sólo las celulasas *RalCel5G* y *RalCel48A* (suplementadas con *TbrCglT*), en las proporciones óptimas establecidas en el punto 10.1.7, los niveles de hidrólisis alcanzados fueron del 10 % ($0,6 \pm 0,2$ mM), lo que implica que la suplementación con *RalXyn10A* aumentó 2,5 veces la capacidad de degradación de este sustrato Figura 26B.

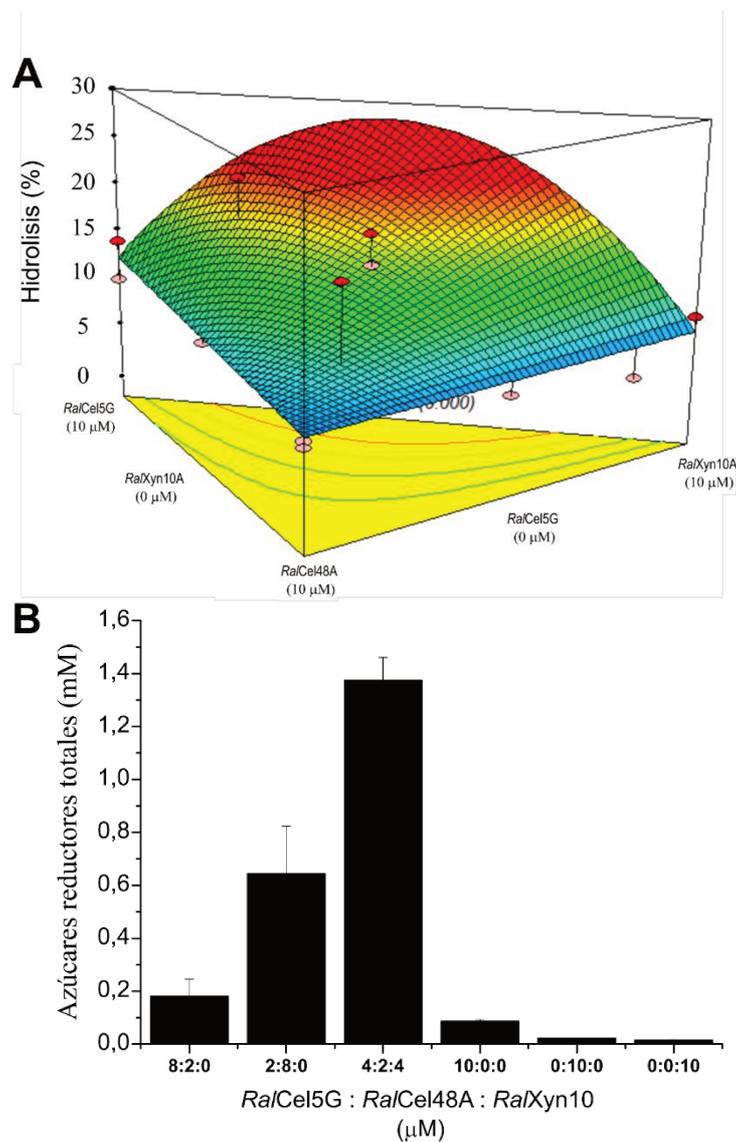


Figura 25. **A:** Superficie de respuesta del porcentaje de hidrólisis del sustrato para diferentes las concentraciones de *RalCel5G*, *RalCel48A* y *RalXyn10A* en el rango ensayado (0 a 10 μ M). **B:** Rendimiento de azúcares reductores totales para la degradación de aserrín de madera de pino (1 mg/ml) por 4 h a 40 °C utilizando las proporciones de enzimas determinadas a partir de los ensayos de optimización.

10.4.2. Uso de las variantes de CDP como herramientas en la síntesis de celo-oligosacáridos y la generación de azúcares-1P

Las CDPs han sido ampliamente empleadas en la síntesis de polisacáridos de interés, ya que poseen la más amplia variabilidad de sustratos aceptores y dadores de todas las enzimas de la familia GH94 (94,99,100,136,137). Adicionalmente, se han utilizado también para generar azúcares-1P a partir de la fosforólisis de diferentes polisacáridos aunque se ha comprobado que estas enzimas poseen baja actividad sobre polisacáridos de alto grado de polimerización (90). Las diferentes versiones de *RalCDP* que hemos construido, mostraron características prometedoras para ser usadas en la síntesis de polisacáridos y en la generación de Glc-1P a partir de polisacáridos complejos.

Particularmente, la versión a la cual se le eliminó el N-terminal, presentó marcadas diferencias entre su actividad sintética y fosforolítica, siendo esta última ~2.000 veces menor. Es por ello, que se analizó la capacidad de esta enzima (*RalΔN63CDP*) para la síntesis de oligosacáridos a partir de celobiosa y Glc-1P utilizando diferentes relaciones de las mismas (dador:aceptor), en comparación con la enzima nativa (*RalCDP*). Se evidenció que ambas versiones de CDP pudieron sintetizar celo-oligosacáridos a partir de estos sustratos. Sin embargo, los productos de reacción de cada una de las variantes presentaron marcadas diferencias, principalmente a bajas concentraciones de Glc-1P. En las reacciones catalizadas por *RalCDP* se observó la presencia de glucosa (producto de la fosforólisis de la celobiosa), mientras que en las reacciones catalizadas por *RalΔN63CDP* la misma no fue detectada (Figuras 27 A y B). Esta diferencia sería consecuencia de la mayor actividad fosforolítica de *RalCDP* respecto a *RalΔN63CDP*, principalmente por la baja afinidad de la mutante trunca por el Pi, como se demostró anteriormente en su caracterización cinética. Además, se evidenciaron oligosacáridos de bajo grado de polimerización (3 a 4 residuos de glucosa) en las reacciones de ambas enzimas cuando se utilizaron relaciones de sustratos de 3:1 y 5:1 (Figura 27 A y B).

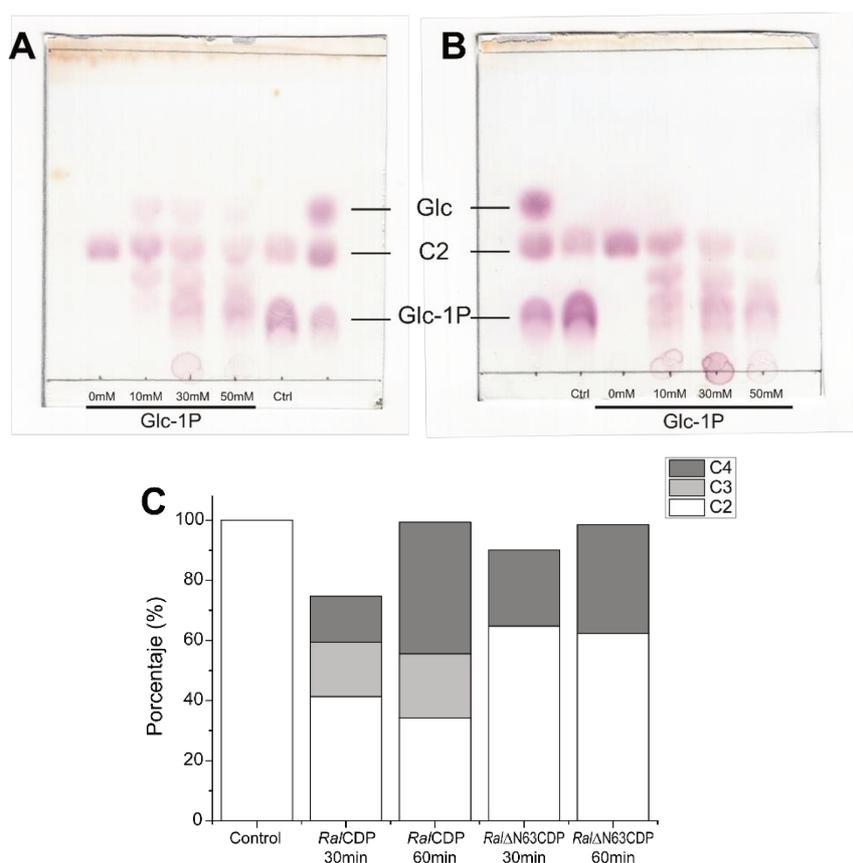


Figura 27. Análisis mediante TLC de los productos de reacción a diferentes relaciones de Glc-1P:celobiosa. **A:** *RalCDP* **B:** *RalΔN63CDP*. **C:** Análisis mediante HPLC de los oligosacáridos solubles sintetizados por *RalCDP* y *RalΔN63CDP* a diferentes tiempos de reacción.

Los productos de reacción de ambas enzimas fueron adicionalmente analizados mediante HPLC para lo cual se llevaron a cabo las reacciones durante 30 y 60 min utilizando una relación de Glc-1P:celobiosa de 3:1 (moles) (Figura 27C). Se determinó la presencia tanto de celotriosa como de celotetraosa en las reacciones catalizadas por *RalCDP* en ambos tiempos de reacción. Las proporciones de celotriosa producidas a los 30 y 60 min de reacción fueron similares (21 y 22 %, respectivamente) mientras que las proporciones de celotetraosa incrementaron considerablemente de 15 % a 43 % para 30 y 60 min, respectivamente. Mientras tanto, en las reacciones catalizadas por *RalΔN63CDP*, solo se determinó la presencia de celotetraosa en cantidades crecientes a lo largo del tiempo (Figura 27C). Las diferencias observadas entre las dos reacciones podrían atribuirse a que la enzima *RalΔN63CDP* es incapaz de extender la cadena del oligosacárido más allá de celotetraosa, tal como se observó en la caracterización cinética (Tabla 9) dando lugar a la acumulación de este oligosacárido; mientras que *RalCDP* posee una elevada actividad enzimática con celotetraosa, e incluso con celopentaosa, por lo cual la reacción es canalizada hacia la síntesis de oligosacáridos de mayor grado de polimerización.

La mayor eficiencia catalítica de *Ral*CDP-CBM37 con los polisacáridos celulósicos podría constituir una ventaja para su aplicación en diferentes procesos. Su mayor capacidad de elongación de los polisacáridos podría ser útil para la síntesis de celo-oligosacáridos con un elevado grado de polimerización, o a partir de su mayor capacidad fosforolítica, para la generación de Glc-1P a partir de polisacáridos celulósicos económicos.

Para evaluar estas características, comparamos la capacidad de *Ral*CDP-CBM37 y de *Ral*CDP de sintetizar polisacáridos de un elevado grado de polimerización a partir de diferentes proporciones de Glc-1P y celobiosa y un tiempo de reacción de 4 h. Como se muestra en la Figura 28A, para las reacciones catalizadas por *Ral*CDP-CBM37 se detectó la presencia de polisacáridos insolubles (precipitado) en todas las proporciones de Glc-1P:celobiosa ensayadas. En cambio, para las reacciones donde se utilizó *Ral*CDP solo se detectaron cuando se empleó la mayor relación dador:aceptor (5:1). La cuantificación de estos polisacáridos, a partir de su hidrólisis exhaustiva y cuantificación de la Glc contenida, reveló una acumulación 5 veces mayor cuando se utilizó *Ral*CDP-CBM37 como catalizador en todas las proporciones dador:aceptor, con excepción de la relación 1:1 donde no se detectaron polisacáridos insolubles (Figura 28B).

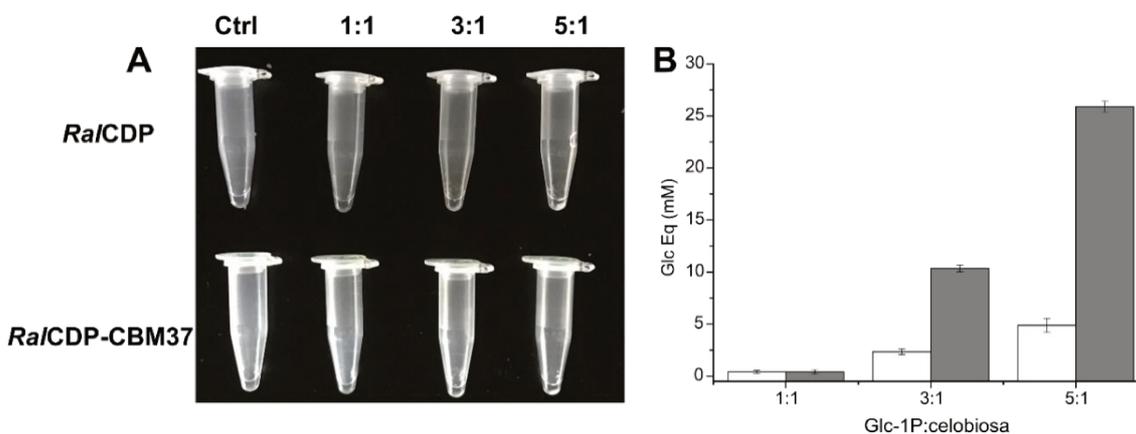


Figura 28. A: Síntesis de polisacáridos insolubles por *Ral*CDP y *Ral*CDP-CBM37. **B:** Cuantificación de los polisacáridos insolubles producidos por *Ral*CDP (blanco) y *Ral*CDP-CBM37 (gris).

Por otro lado, para el análisis de la capacidad fosforolítica sobre los polisacáridos, determinamos la generación de glucosa a partir la arsenólisis del sustrato PASC a diferentes tiempos de reacción, catalizada por *Ral*CDP y *Ral*CDP-CBM37 (Figura 29). Esta estrategia de reemplazar el Pi con arseniato es útil para medir la capacidad de generación de azúcar-1P de las enzimas a partir de un sustrato insoluble mediante la cuantificación del azúcar liberado (152). Como se muestra en la Figura 28, *Ral*CDP-CBM37 presentó una actividad ~4 veces mayor que *Ral*CDP. De estas reacciones se obtuvo un rendimiento máximo de glucosa de 0,26 mM con *Ral*CDP-CBM37 en 1 h de reacción, mientras que con *Ral*CDP el rendimiento fue de 0,1 mM después de 2 h. Este aumento en la velocidad parecería ser consecuencia del aumento en la concentración local efectiva de enzima sobre el sustrato insoluble por el agregado del CBM37.

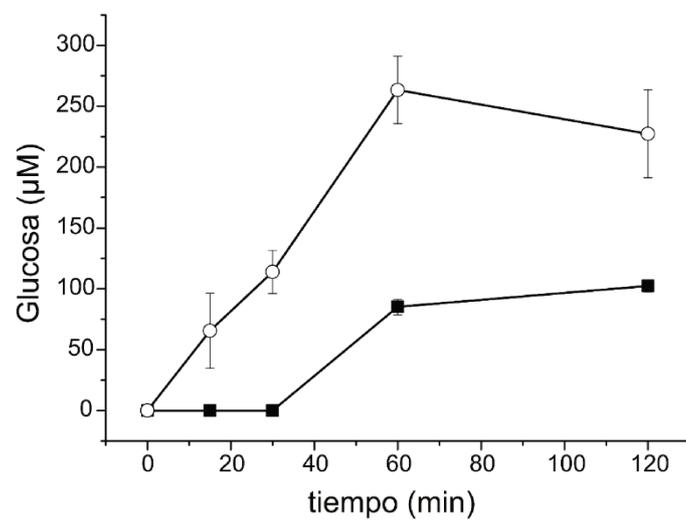


Figura 29. Glucosa generada a partir de la arsenólisis de PASC por *RalCDP* (cuadrados negros) y *RalCDP-CBM37*(círculos blancos).

11. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La conversión de los sectores de la economía basados en el petróleo a una nueva materia prima sostenible es un desafío fundamental para las próximas décadas. La utilización de los combustibles fósiles genera una emisión de carbono a un ritmo que sobrepasa las capacidades de su ciclo natural, con un consecuente aumento en la concentración de CO₂ atmosférico que contribuye al calentamiento global. Sumado a esto, la mayoría de los monómeros utilizados en la fabricación de plásticos derivan de hidrocarburos fósiles, por lo que estos polímeros no son biodegradables y como resultado, se acumulan en lugar de descomponerse en el medio ambiente (2). Por lo tanto, es necesario sustituir estas fuentes energéticas y derivados industriales por productos de base biológica como bioenergías y bioplásticos obtenidos a partir de materias primas y herramientas productivas sustentables. Una fuente atractiva para este propósito es la biomasa lignocelulósica, ya que representa el recurso orgánico más abundante de la Tierra, que puede ser provisto de los desechos de la industria agrícola y forestal en grandes cantidades y con bajos costos, sin competir con la producción de alimentos, y el requerimiento de tierras cultivables. Sin embargo, las características estructurales de la lignocelulosa la tornan recalcitrante a la degradación, por lo que descomponerla hasta sus monosacáridos constituyentes es dificultoso (188–190). Se han empleado diferentes estrategias para la degradación de la biomasa lignocelulósica, aunque estas tecnologías tienen asociados inconvenientes como la generación de subproductos tóxicos y a que en gran medida el componente “bio” solo está limitado al material de partida, ya que estos procedimientos utilizan métodos físicos y químicos con escaso uso de herramientas biológicas (191,192).

El concepto de biorrefinerías surge con el objetivo de maximizar la utilización de la biomasa y minimizar los desechos y las emisiones asociadas con la generación de productos bioenergéticos (7,8). Esta última implica no sólo la utilización de materias primas renovables, sino también procesos y productos ecológicamente sustentables. Claramente, el desarrollo de procedimientos adecuados de biorrefinerías requiere de la obtención de diferentes organismos vivos y biomoléculas que puedan ser aplicadas eficientemente en diversos procesos industriales. Dentro de esto último, las enzimas son moléculas de una importancia directa por su funcionalidad como catalizadores de alta eficiencia y especificidad de distintas reacciones necesarias en diferentes procesos industriales (87).

Diversos organismos poseen la capacidad de hidrolizar y metabolizar la biomasa lignocelulósica mediante la producción de un repertorio de CAZy con diferentes mecanismos y arquitecturas (193). Los rumiantes son capaces de utilizar la biomasa como fuente de energía debido a la relación simbiótica con los microorganismos (hongos, bacterias y protozoos) que habitan en el rumen, los cuales producen una amplia gama de enzimas con elevada actividad sobre

este sustrato (114). Dentro de los microorganismos ruminales, *R. albus* es uno de los que muestra alta capacidad para degradar y fermentar eficazmente los polisacáridos de la pared celular de las plantas. Sin embargo, el mecanismo mediante el cual lleva a cabo la degradación y adherencia al material lignocelulósico está poco definido (194). La comprensión de los procesos de degradación enzimática de la lignocelulosa por este microorganismo puede proporcionar información valiosa para el desarrollo de diversas aplicaciones biotecnológicas tales como la producción de enzimas relevantes para la generación de biocombustibles, biopolímeros y/u otros materiales.

En el marco de lo anteriormente detallado, en este trabajo de Tesis se realizó la caracterización exhaustiva de representantes de las principales enzimas celulíticas de *R. albus* 8 como son *RalCel5G* y *RalCel48A* y de la hemicelulasa *RalXyn10A*, como así también la interacción entre estas enzimas en la degradación de sustratos lignocelulósicos complejos. Además, se caracterizaron dos enzimas encargadas del procesamiento posterior de los oligosacáridos generados a partir de la degradación de la celulosa, como son *RalCBP* y *RalCDP*. Todas estas enzimas tienen el potencial de ser utilizadas como herramientas en procesos de biorrefinerías, tanto en la degradación de polisacáridos, como también para la síntesis de polisacáridos con estructura definida.

El análisis de las secuencias aminoacídicas de *RalCel5G* y *RalCel48A* reveló que ambas son proteínas multimodulares, cada una compuesta por un dominio catalítico de la familia GH5 y GH48, respectivamente, los cuales presentaron un alto grado de identidad con dominios de otras enzimas de las mismas familias (52 y 42 %, respectivamente). Adicionalmente, *RalCel5G* presenta dos dominios de unión a carbohidratos de la familia 37, mientras que *RalCel48A*, sólo uno de ellos. Mediante el análisis de los modelos tridimensionales y la comparación de las estructuras primarias de los tres dominios CBM37 presentes en *RalCel5G* y *RalCel48A*, se identificaron cuatro aminoácidos hidrofóbicos conservados (W20, Y29, W40 e Y54), que estarían formando una superficie de unión plana e hidrofóbica. Este tipo de superficies de unión son características de los CBMs de clase A, cuya interacción con los diferentes polisacáridos se da por la complementariedad entre esta superficie y las áreas planas que poseen sustratos como la celulosa o la quitina, por lo que este tipo de CBMs presentan una muy baja o nula afinidad por sustratos solubles (60,62). Es importante destacar que, si bien se ha descrito que los CBM37 poseen afinidad por una amplia gama de sustratos (127,129), hasta el momento no se ha definido cuales son los aminoácidos involucrados en la interacción con los mismos en esta familia de CBMs. Nuestro análisis también reveló que el CBM37_1 de *RalCel5G* presenta una baja similitud de secuencia con los otros dos CBMs (CBM37 de *RalCel48A* y CBM37_2 de *RalCel5G*). A pesar de ello, conserva una elevada similitud estructural, particularmente en la posible superficie de unión encontrada. Las diferencias identificadas entre las secuencias aminoacídicas del CBM37_1 y CBM37_2 de *RalCel5G* podrían contribuir a la disparidad observada en la capacidad de unión

de *RalCel5G* y *RalCel48A* frente a los diferentes polisacáridos ensayados. La determinación de los parámetros de adsorción de cada una de las enzimas reveló que la presencia de los dos dominios CBM37 en *RalCel5G* está claramente reflejada en una mayor capacidad de adsorción (3 veces) y una mayor afinidad (9 veces) de esta enzima sobre *RalCel48A*. Si bien la información existente respecto a los parámetros de adsorción de los distintos CBMs es muy variable, ya que depende de diversos factores como la familia de CBM, la naturaleza del sustrato, la temperatura, entre otros; los parámetros de afinidad determinados en este trabajo para *RalCel5G* y *RalCel48A* fueron similares a los informados para diferentes endo- y exo-glucanasas de *T. reesei* sobre sustratos lignocelulósicos (62), a los de la proteína CHB1 de *Streptomyces* con respecto a la afinidad hacia la quitina (195) o a los parámetros de adsorción de construcciones artificiales donde se fusionó un CBM a proteínas como GFP (156) o a la CDP de *C. thermocellum* (196). También se han reportado parámetros entre 10 y 100 veces menores a estos para otras enzimas como la xilanasa A (CBDXylA) de *Pseudomonas fluorescens* con un β -1,4 glucano (197) o los informados para la unión de xylC de *Nonomuraea flexuosa* sobre sustratos lignocelulósicos complejos (155).

A partir de los modelos tridimensionales generados para *RalCel5G* y *RalCel48A*, se identificó que *RalCel5G* posee un sitio activo en forma de canal característico de enzimas con actividad EG, presentando un elevado grado de conservación en los aminoácidos involucrados en la interacción con el sustrato en comparación con la estructura cristalina de la endoglucanasa E1 de *A. cellulolyticus* (PDB: 1ECE) (177). Notablemente, la caracterización cinética de *RalCel5G* con sustratos de diferente grado de compactación reveló que esta enzima posee un modo de acción de tipo EG procesiva, presentando actividad incluso sobre sustratos celulósicos de elevado grado de compactación. Generalmente, la procesividad de las EG está determinada por la relación en la generación de extremos reductores solubles a extremos reductores insolubles, donde las celulasas procesivas típicas producen alrededor del 90 % de azúcares reductores solubles (equivalentes de glucosa), mientras que las EG no procesivas generan del 30 a 50 % de azúcares reductores insolubles (198,199). Particularmente, para *RalCel5G*, la generación de azúcares solubles superó el 85% del total de los azúcares producidos a partir de sustratos como celulosa o papel de filtro, mostrando claramente un modo de acción procesivo. Si bien la mayoría de las EG procesivas pertenecen a la familia GH9, existen algunas excepciones pertenecientes a la familia GH5 (153,178,200,201). Estas enzimas, al igual que *RalCel5G*, presentaron actividad no solo sobre sustratos solubles como CMC, sino también sobre sustratos de mayor compactación como AVICEL, PASC y papel de filtro, generando como principales productos de reacción celobiosa y celotriosa, lo cual parece ser una característica distintiva de enzimas con este modo de acción (199,200,202,203).

En cuanto al modelo estructural obtenido para *RalCel48A*, presentó un túnel catalítico característico a la familia GH48 y consecuente del modo de acción previamente informado, el cual es exclusivamente procesivo a partir de los extremos reductores de la cadena (204). Sin embargo, en el alineamiento de secuencias se evidenció que *RalCel48A* presenta extensiones adicionales (*loops*) ubicados próximos al ingreso del túnel catalítico, similar a lo informado para Cel48 de *B. pumilus* (204). Conforme a estas características estructurales, *RalCel48A* presentó actividad exclusivamente con los sustratos celulósicos lineales (en este caso PASC y celulosa), y fue incapaz de procesar CMC, sustrato que presenta ramificaciones que dificultarían la translocación de la cadena a través del túnel catalítico de la proteína. Determinamos que *RalCel48A* presenta inhibición por su único producto de reacción (celobiosa) con un IC₅₀ similar al observado para la *CtCelS* (2,9 mM) (205). La inhibición pudo ser revertida por el agregado de cantidades equimolares de BG (*TbrCglT*), lo cual fue suficiente para alcanzar un incremento de ~3 veces en la velocidad de catálisis de la enzima y la hidrólisis completa del producto de reacción. Anteriormente se han informado actividades extremadamente bajas para enzimas de la familia GH48, y se especula que se deba a una ineficiente incorporación de la cadena del polisacárido al sitio catalítico, a la baja procesividad a través del túnel catalítico y/o debido a la inhibición por producto (204–206). Es de destacar que la actividad determinada para *RalCel48A* fue de un orden de magnitud superior dentro de las informadas para enzimas de este tipo. A partir de las diferencias estructurales identificadas en *RalCel48A* respecto a otras CBHs de la familia GH48, asumimos que la mayor actividad de *RalCel48A* podría ser consecuencia de la mayor extensión de los *loops* ubicados en la proximidad del ingreso al túnel catalítico, los cuales podrían otorgarle mayor plasticidad para la incorporación del sustrato al sitio activo y/o mejorarían la procesividad de la enzima, ya que los parámetros de inhibición fueron similares a los correspondientes a otras CBHs de esta familia (205).

El análisis de los productos de reacción de *RalCel5G* y *RalCel48A* sobre el sustrato celulósico PASC reveló que, a pesar de poseer diferentes modos de acción, ambas enzimas producen azúcares de un bajo grado de polimerización (celobiosa y celotriosa). Como ha sido descrito anteriormente, la degradación eficiente y completa de los polisacáridos como la celulosa es facilitada por la actividad de enzimas con diferentes mecanismos de acción (EG, CBH, BG). Probablemente el mecanismo de acción sinérgica mayormente reconocido es el llamado modelo endo/exo-sinérgico, el cual implica que la actividad de las EG, las cuales hidrolizan los enlaces internos de la cadena de celulosa, generan nuevos sitios de acción para las CBHs. Además, recientemente se ha demostrado que la acción de las EG facilita también la liberación de CBH unidas de forma improductiva, lo cual parece ser tan importante como su capacidad para generar nuevos sitios de ataque (82).

Las formas de las curvas de velocidad obtenidas en nuestros resultados para las diferentes combinaciones de *RalCel5G* y *RalCel48A* son particularmente informativas, ya que son indicativas que estas enzimas presentan un modo de sinergia endo/exo-sinérgico (207). El máximo grado de sinergia alcanzado (GS=2) se observó a bajas proporciones de *RalCel5G:RalCel48A* (1:4), acorde con la comprensión convencional de la sinergia endo-exo, en donde pequeñas cantidades de enzima de acción EG aumentan la disponibilidad de extremos de la cadena de polisacárido para la acción de las CBHs. El grado de sinergia que hemos alcanzado fue similar al informado también para otros pares de EG y CBH de distintas fuentes (208,209). Es importante remarcar también, que el efecto sinérgico se observó únicamente cuando ambas enzimas se utilizaron de manera simultánea en el medio de reacción, a diferencia de cuando se utilizaron en forma secuencial, independientemente del orden de adición. Esto es indicativo de que las enzimas poseen diferentes sitios de acción sobre el sustrato a pesar que ambas poseen la misma clase de CBM y un modo de acción procesivo. De ser de otro modo, se observaría una disminución en la actividad por competencia entre las enzimas, como ha sido demostrado anteriormente para otros casos (208,210). Se ha propuesto también que, a bajas proporciones enzima/sustrato, la sinergia entre las EG y CBH puede provenir de la capacidad de las EG para aliviar el estancamiento de las CBH, a partir de la eliminación de obstáculos que impiden el movimiento procesivo de estas últimas (80–82). Se ha demostrado que la acción sinérgica es recíproca, lo que significa que no sólo CBH se beneficia de la acción de EG, sino que también la hidrólisis mediada por CBH hace que el sustrato sea más accesible para EG, lo que mejora los rendimientos en la degradación de la celulosa (80,81,211).

Cuando se trata de un sustrato lignocelulósico, la acción de las celulasas es insuficiente para lograr una adecuada degradación de los polisacáridos que lo constituyen, para ello se requiere la acción adicional de otra clase de enzimas (hemicelulasas). La acción simultánea de estas enzimas, además de aumentar el rendimiento de azúcares solubles por la despolimerización de la hemicelulosa a monosacáridos, también mejora el rendimiento de las celulasas al eliminar los obstáculos que dificultan a su actividad (76,77).

Hasta el momento, el estudio de enzimas involucradas en la degradación de la hemicelulosa por *R. albus* incluye la caracterización de cinco xilanasas identificadas en su proteoma, dos pertenecientes a la familia GH10 y tres a la familia GH11 (131). Se identificó que estas proteínas operan sinérgicamente con una β -xilosidasa, una α -L-arabinofuranosidasa y una α -glucuronidasa que constituirían componentes accesorios para eliminar ramificaciones e hidrolizar aún más los productos de degradación de la hemicelulosa por las primeras (130,131,212). Dentro de las cinco xilanasas investigadas hasta el momento, *RalXyn10A* es la que presenta la arquitectura más simple, compuesta únicamente por un dominio catalítico GH10, sin embargo fue la que presentó la mayor actividad dentro de este grupo de enzimas (131). De

hecho, la enzima es marcadamente diferente a Xyn10B, cuyo módulo catalítico GH10 está flanqueado por un CBM4_9 y un CBM22 en el extremo N terminal más un CBM37 en su C-terminal.

En nuestro análisis estructural de *RalXyn10A* se identificó que posee una región de 34 aminoácidos (N34) hacia el N-terminal del módulo catalítico GH10 (no comprendida dentro del mismo), que carecería de función asignada, lo cual motivó el estudio de su funcionalidad a partir de la producción recombinante de la enzima completa *RalXyn10A* y la construcción de una versión mutante trunca en tal extremo N-terminal (*RalΔN34Xyn10A*). La caracterización de las propiedades de cada una de estas proteínas reveló la contribución de esta región N-terminal (N34) en la capacidad catalítica de la enzima y en su interacción con el sustrato. La forma completa de la enzima exhibió buena capacidad de adhesión a diferentes sustratos insolubles, pero cuando a la enzima se le removió el extremo N34 su capacidad de adhesión disminuyó considerablemente. Además, la construcción de la proteína quimérica (N34-*TbrCglT*) exhibió mejoras en la capacidad de adhesión a sustratos insolubles, la cual estaría mediada por el motivo N34 fusionado, ya que *TbrCglT* fue incapaz de interactuar con estos sustratos. Estos comportamientos concuerdan con la acción que ejercen los CBMs en otras construcciones multimodulares (156,196). Sin embargo, los alineamientos de secuencia con diferentes familias de CBMs mostró que la mayor similitud de secuencia encontrada para N34 fue con el CBM37_1 de Cel5G de *R. albus* 8 (23 %) y mucho menor respecto a otros CBMs ya caracterizados (60,62,193). Si bien hemos identificado previamente que los CBM37 presentan baja similitud de secuencia entre ellos (25-26 %), el dominio N34 no presenta los aminoácidos conservados en los CBM37 que estarían involucrados en la conformación de su sitio de unión a los polisacáridos, por lo que descartamos que pertenezca a esta familia.

Se identificó también que este dominio N34 es importante para la modulación de la actividad de *RalXyn10A* mediante la formación de un puente disulfuro entre la Cys 5 (ubicada en este motivo) con un residuo homólogo ubicado en el dominio GH10. Se evidenció que, en su forma oxidada, la enzima presenta mayor capacidad catalítica y de unión a polisacáridos insolubles. Estos cambios en la actividad de *RalXyn10A* resultaron de tratamientos con agentes reductores (DTT y 2ME) que inactivaron, u oxidantes (H_2O_2 y diamida) que revirtieron la oxidación, recuperando la actividad enzimática. Apoyando la participación de Cys 5, la construcción *RalΔN34Xyn10A*, al igual que la mutante puntual C5S, exhibieron la misma actividad que *RalXyn10A* en su estado reducido (la mitad de la actividad de que presenta la enzima completa en su estado oxidado), además de que ambas fueron insensibles al entorno redox. Realizando el tratamiento redox de la enzima en proporciones variables de 2ME/HEDS, calculamos un E_h de -290 mV para la transición entre las formas de alta y baja actividad de *RalXyn10A*. Teniendo en cuenta de que esta proteína es secretada al medio extracelular por *R.*

albus, estas condiciones redox son compatibles con las ocurrientes *in vivo*, en las que la enzima es operativa (el entorno ruminal presenta un E_h en el rango de 220 mV a 110 mV) (213–215). Por su parte, los resultados obtenidos a partir de la construcción de mutantes puntuales de *RalXyn10A*, mostraron que la variante C78S no sería afectada por agentes reductores ni oxidantes, incluso con una capacidad catalítica superior a la de la enzima nativa, lo que le confiere una característica ventajosa si se la eligiera para utilizarla como herramienta en la degradación de material lignocelulósico.

Como se mencionó previamente, la hemicelulosa comúnmente representa un 20-25 % de los azúcares que componen a los sustratos lignocelulósicos, por lo cual su degradación no sólo incrementaría el rendimiento de azúcares fermentables, sino que también se ha demostrado que su degradación también facilita la despolimerización de la celulosa (39). Numerosos estudios se han informado respecto a la acción sinérgica entre celulasas (216) o entre hemicelulasas (51), sin embargo, no se ha profundizado sobre la interacción entre esta dos clases de enzimas en *R. albus*. Es por ello que, determinadas las proporciones más eficientes de EG y CBH (punto 10.1.7), se analizó la suplementación de estas enzimas con la xilanasas (*RalXyn10A*), ya que la determinación de los mecanismos subyacentes de la sinergia operativa entre estas proteínas puede optimizar la aplicación de las mismas en procesos industriales (76,186). En este sentido, los resultados obtenidos mostraron una influencia significativa en el rendimiento de azúcares de las concentraciones de la EG procesiva *RalCel5G* y la xilanasas *RalXyn10A* en la degradación del sustrato lignocelulósico ensayado (aserrín de madera de pino). Cabe destacar también, que los rendimientos a partir de este sustrato lignocelulósico complejo con el agregado de esta enzima accesoria (*RalXyn10A*) se duplicaron respecto al uso aislado de las celulasas, e incluso fueron similares a los alcanzados en la degradación de celulosa pura, también para bajas dosis de proteína.

Estos resultados proporcionan información valiosa para diseñar combinaciones con número mínimo de enzimas necesarias para el procesamiento optimizado de la biomasa de diferentes residuos agrícolas los cuales varían en sus propiedades físicas y químicas, y para diferentes métodos de pretratamiento (217). Al presente, se ha informado de una serie de mezclas de enzimas sinérgicas basadas en componentes enzimáticos aislados, ya sea usando proteínas endógenas purificadas o recombinantes, para la hidrólisis de varios sustratos celulósicos. Esta estrategia se considera ventajosa con respecto a las mezclas crudas de enzimas, ya que la dosis de cada proteína es potencialmente menor (218). Además, los conjuntos de enzimas integrados se pueden expresar en huéspedes heterólogos ya establecidos para un bioprocesamiento consolidado (219).

Los azúcares generados como resultado de la degradación del material lignocelulósico por acción de las celulasas y hemicelulasas pueden utilizarse como bloques para la síntesis de una amplia gama de químicos de valor agregado y biopolímeros. El sentido de reacción sintético de las GP es potencialmente útil para la síntesis de diferentes polisacáridos o glicomoléculas, mientras que la reacción de fosforólisis se puede aprovechar para la degradación de carbohidratos con la consecuente producción de azúcares-1P. Sin embargo, se ha descrito que los sustratos de las GP poseen un grado de polimerización máximo que oscila entre 8 y 10 unidades de glucosa, lo que sugiere que estas proteínas no pueden interactuar con las cadenas de polisacáridos de mayor longitud (90). Esta característica podría ser consecuencia de la disminución en solubilidad de los polisacáridos a medida que aumenta su grado de polimerización, lo que conduce a que la enzima no pueda acceder al sustrato insoluble. Para superar este problema, numerosas GH poseen, además del dominio catalítico, uno o más módulos de unión a carbohidratos no catalíticos, los cuales median la adsorción de las proteínas a los sustratos insolubles, mejorando la eficiencia catalítica, pero hasta el momento, ningún CBM ha sido identificado en GP (60,62). Las GP son comúnmente homodímeros y cada subunidad está compuesta por tres dominios particulares: un dominio N-terminal β -sándwich que conforma la mayor parte de la interface entre las subunidades de dímero, un *linker* α -hélice y un dominio tipo barril $(\alpha/\alpha)_6$ donde se ubica el sitio catalítico, pero existen diferencias estructurales que hacen que cada una de estas enzimas se activa sobre sustratos particulares, diferenciando entre CBPs, CDPs, LBP, ChBPs, etc. (183,184,220–222).

En este trabajo, hemos identificado la presencia de dos GP de la familia GH94 en *R. albus* 8 y, a partir de alineamientos múltiples de secuencias, construimos modelos tridimensionales y los comparamos con estructuras cristalográficas de otras enzimas de esta misma familia. Con estos análisis, pudimos identificar diferencias en la secuencia aminoacídica y en la estructura de estas proteínas, que podrían otorgarle características distintivas respecto al resto de las enzimas de esta familia. Principalmente, se observaron diferencias en la longitud y en la composición aminoacídica de los tres *loops* claves en la delimitación del sitio activo, lo que define las diferentes especificidades de sustrato observadas entre CBPs, CDPs, y ChBPs (183,184,220,223). Se identificó también que los primeros 63 aminoácidos de estas enzimas se encuentran altamente conservados a lo largo de todas las proteínas pertenecientes a esta familia y otras enzimas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos.

La expresión recombinante, seguida de la caracterización estructural y bioquímica de *RalCBP*, *RalCDP* y de las diferentes construcciones (*Ral* Δ N63CDP y *RalCDP*-CBM37) reveló que tanto *RalCBP*, *RalCDP*, como *RalCDP*-CBM37 poseen una estructura homodimérica, al igual que gran parte de las enzimas pertenecientes a la familia GH94 (133,224–226). A partir de la caracterización estructural de *Ral* Δ N63CDP (monomérica) se pudo comprobar la importancia de la región N-terminal, altamente conservada entre estas enzimas, como crucial para la

conformación del homodímero. Pese a que se determinó que el monómero *Ral* Δ N63CDP es funcionalmente activo e independiente como fue informado para GP de la familia GH112 (227), el mismo exhibió una consecuente modificación en la actividad enzimática. La caracterización cinética de las diferentes formas de la CDP producidas reveló marcadas diferencias en la actividad y en la afinidad por los diferentes sustratos analizados, dependiendo del grado de polimerización de los mismos. *Ral*CBP presentó mayor eficiencia catalítica con los monosacáridos (principalmente glucosa, pero también xilosa y glucosamina), la cual disminuyó considerablemente con el aumento en el grado de polimerización del sustrato. En cambio, *Ral*CDP exhibió mayor eficiencia catalítica con los sustratos celotetraosa y celopentaosa, siendo similar para ambos sentidos de reacción (síntesis y fosforólisis). La determinación de los valores de K_M para Glc-1P y el Pi revelaron una elevada afinidad por estos sustratos (2 mM y 0,5 mM para las reacciones de síntesis y de fosforólisis, respectivamente), a diferencia de lo informado para la putativa CDP de *R. albus* NE1 (171). Es de remarcar que los autores de este trabajo referenciado informan valores de K_M 80 y 360 veces superiores para la Glc-1P y el Pi, respectivamente, a pesar de que la secuencia aminoacídica reportada para esta proteína mostró una similitud del 95 % con nuestra proteína.

A partir de la caracterización cinética de *Ral* Δ N63CDP con los diferentes sustratos observamos una disminución en un orden de magnitud en el número de recambio para ambos sentidos de reacción, y de 32 veces en la afinidad por el Pi respecto a *Ral*CDP, mientras que la afinidad por la Glc-1P fue similar. Estas características conllevan a que esta versión de la enzima presente una disminución de cinco órdenes de magnitud en la eficiencia catalítica para la reacción de fosforólisis de la celobiosa, pero conservado este parámetro cinético respecto a la síntesis del trisacárido, lo que resulta una característica ventajosa en la búsqueda de optimizar la síntesis oligosacáridos.

Por su parte, la proteína de fusión *Ral*CDP-CBM37 presentó características novedosas en su capacidad catalítica, principalmente en lo que respecta a la actividad fosforolítica sobre los polisacáridos. Si bien la enzima no experimentó mayores diferencias en la eficiencia catalítica en ninguno de los sentidos de reacción con los diferentes celo-oligosacáridos ensayados (C2, C3, C4 y C5), lo cual coincide con resultados previos de caracterización enzimas fusionadas a CBMs (203,228–230), si detectamos una mayor capacidad para degradar a los polisacáridos CMC y PASC (incremento de un orden de magnitud en la k_{cat} y una reducción del 50 % en los valores de K_M para estos sustratos). Estas modificaciones en los parámetros cinéticos condujeron a un incremento de 20 veces en la eficiencia catalítica de la enzima en la reacción de fosforólisis respecto a *Ral*CDP. Además, se determinó que la fusión del CBM37 produjo un incremento de cinco veces en la capacidad de adsorción de la enzima sobre el polisacárido PASC respecto a la enzima de origen salvaje. La correlación observada entre el aumento en la capacidad catalítica de

*Ral*CDP-CBM37 y de la adsorción al polisacárido por la fusión del CBM37 indica que este módulo está aumentando la cantidad de enzima sobre el sustrato insoluble, pero también que participaría en dirigir a la proteína a sitios específicos aptos para la catálisis. Teniendo en cuenta el modo de acción de esta enzima, probablemente el direccionamiento sería hacia los extremos de la cadena del polisacárido.

Los parámetros de adsorción determinados para nuestra construcción fueron similares a la mayor capacidad de adsorción lograda en la CDP de *C. thermocellum* por la fusión de CBMs de diferentes familias (CBM3, CBM4-2, CBM6, CBM9-2) (196). Al igual que en nuestro trabajo, la incorporación de los diferentes CBMs a *Ct*CDP no influyó en los parámetros cinéticos con los sustratos de menor grado de polimerización, pero afectaron de manera diferente las propiedades de unión y capacidad catalítica sobre los sustratos celohexaosa y PASC. Del mismo modo, se informa que los mayores incrementos en la capacidad catalítica y de adsorción de la enzima hacia polisacáridos celulósicos se dio por la fusión del CBM9, el cual, al igual que el CBM37, posee afinidad por una amplia gama de sustratos. Mejoras similares en la eficiencia catalítica y en la afinidad de las enzimas por los polisacáridos han sido encontradas cuando se incorporaron CBMs a endo- y exoglucanasas, como la fusión de los CBM3 y CBM9 al dominio GH5 de *Bacillus* sp. (231) o módulos de las familias 1,2,3,4,10, y 72 a la glucanasa Umcel9A, los cuales modificaron significativamente la k_{cat} de la enzima y en menor medida su K_M únicamente con el sustrato PASC, mientras que los parámetros cinéticos con sustratos solubles no fueron afectados (198).

La determinación de los parámetros óptimos de pH y temperatura para las diferentes versiones de *Ral*CDP, mostró un incremento en la temperatura óptima de reacción en la proteína fusionada al CBM37 (5 °C), lo cual también se vio reflejado en la estabilidad térmica de la proteína y en su temperatura de fusión, la que resultó incrementada en 2 °C respecto a *Ral*CDP. Este incremento en la temperatura óptima también había sido informado cuando diferentes CBMs se fusionaron a glucanasas de la familia GH5 (231) y por la unión del CBM72 a Umcel9A (198). Estos resultados también son consistentes con la disminución en la estabilidad térmica observada al eliminar el CBM72 de la endoglucanasa C5614-1 (232) y en la eliminación del CBM en la endoglucanasa termoestable de *Phialophora* sp. G5 (233). Si bien las funciones principales de los CBM son reconocer y unir polisacáridos y aumentar la actividad hidrolítica de las enzimas hacia sustratos insolubles mediante la aproximación del dominio catalítico al sustrato o de alterar la estructura del polisacárido (66), a partir de estos resultados inferimos que la presencia de CBM podría también afectar la integridad estructural de la enzima a altas temperaturas y, por lo tanto, su presencia podría hacer que la proteína sea más estable.

Durante la caracterización de las diferentes versiones de *Ral*CDP se identificaron características particulares en alguna de ellas que podrían ser beneficiosas para su utilización

como herramientas en diferentes procesos. Por un lado, la capacidad de *Ral*ΔN63CDP de sintetizar celotetraosa como producto final de reacción representa una característica beneficiosa, ya que la síntesis de celo-oligosacáridos cortos con un grado de polimerización definido es clave en la producción de prebióticos destinados a la nutrición humana y animal (72,234–236). Habitualmente, los métodos enzimáticos de síntesis utilizados para este fin, producen mezclas de oligosacáridos con diferentes grados de polimerización, lo que conlleva a posteriores pasos de purificación (99,105). Por otro lado, la mayor capacidad de síntesis de polisacáridos de un elevado grado de polimerización a bajas relaciones de dador:aceptor observada en *Ral*CDP-CBM37, implica una gran ventaja en tanto se pretenda llevar a cabo la síntesis de polisacáridos ya que, por lo general, se requieren altas relaciones de Glc-1P:celobiosa para su producción, siendo el azúcar-1P el reactivo más costoso para el proceso (95,99,100). Sumando a esto, la mayor actividad fosforolítica y capacidad de interacción con los polisacáridos que detectamos para la construcción *Ral*CDP-CBM37, permitió emplearla en la generación de Glc-1P a partir de un sustrato celulósico como PASC. La aplicación de este tipo de enzimas en la descomposición de los enlaces glucosídicos de sustratos celulósicos económicos tienen el potencial para proporcionar un suministro constante de azúcares-1P que pueden, por ejemplo, usarse como fuente de carbono en sistemas multienzimáticos para biobaterías (237) o en la síntesis de polímeros de estructuras definidas (96).

Como se ha descrito hasta aquí, la biomasa lignocelulósica es un recurso abundante con un potencial sin explotar para la producción de biocombustibles y productos químicos. Para ello es indispensable descomponer su compleja estructura que obstruye su bioconversión. En este contexto, las enzimas cobran una gran importancia, ya que son capaces de llevar a cabo el proceso de despolimerización de los principales componentes de la biomasa celulósica en condiciones suaves sin la producción de compuestos nocivos para el ambiente. En sistemas naturales como el rumen, diversas comunidades microbianas llevan a cabo la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica a través de la acción sinérgica de múltiples enzimas que mejoran la eficiencia del proceso de degradación. Es por ello que, la caracterización enzimática, el análisis de las relaciones estructura-función y las modificaciones estructurales de enzimas pertenecientes a uno de los microorganismos más activos en el rumen como lo es *R. albus* llevadas a cabo en este trabajo de Tesis, proporcionan información valiosa para formar la base para el desarrollo de diversas aplicaciones biotecnológicas tales como la formulación de mezclas enzimáticas relevantes para la producción de biocombustibles y/o la síntesis de biopolímeros.

12. CONCLUSIONES

En este trabajo de Tesis se ha logrado la producción recombinante de enzimas lignocelulolíticas provenientes de *R. albus* 8 en su forma nativa, mutantes y de proteínas quiméricas de manera soluble, activas y con buenos rendimientos en *E. coli*, organismo con reconocidas ventajas en su cultivo y manejo.

Durante la caracterización de estas enzimas se han identificado propiedades novedosas, las cuales contribuyen a la expansión en el conocimiento sobre esta familia de proteínas y en el mecanismo de degradación de lignocelulosa de *R. albus*, uno de los microorganismos predominantes en el rumen bovino. La caracterización cinética y estructural de estas enzimas nos ha permitido generar variantes con características prometedoras para su utilización como herramientas moleculares en procesos de biorrefinerías, tanto en la síntesis de biopolímeros como en la degradación de la biomasa lignocelulósica.

Particularmente, en la caracterización cinética y el análisis de los productos de reacción de *RalCel5G* y *RalCel48A* con sustratos celulósicos de diferente grado de compactación confirmo que estas enzimas poseen actividad endoglucanasa procesiva y exoglucanasa, respectivamente. Además, el empleo en simultáneo de estas enzimas mostró un efecto sinérgico en la degradación de la celulosa, acorde a un modelo sinérgico endo-exo.

Las diferencias observadas en el número de dominios CBM37 presentes en estas enzimas y las variaciones en la secuencia aminoacídica de los mismos, se vieron reflejadas en los parámetros de adsorción de estas enzimas a los sustratos insolubles.

Por su parte, la hemicelulasa *RalXyn10A* presentó un dominio asociado a la interacción con el sustrato y a la regulación redox de la actividad enzimática de la misma. Además, se identificó un efecto sinérgico en la acción de esta enzima y la endoglucanasa *RalCel5G* en la degradación de un sustrato lignocelulósico complejo como el aserrín de madera de pino, lo que sugiere un mecanismo de acción sinérgica entre celulasas y xilanasas en la degradación de la biomasa lignocelulósica por *R. albus*, poco descrito hasta el momento.

A partir de estos resultados es posible diseñar combinaciones con número mínimo de enzimas necesarias para el procesamiento optimizado de diferentes sustratos. Además, estos conjuntos de enzimas integrados podrían expresarse en huéspedes heterólogos ya establecidos para un bioprocésamiento consolidado.

Por otro lado, la caracterización de las GP de *R. albus*, se identificó una elevada eficiencia en la actividad con el disacárido celobiosa por parte de *RalCBP*; mientras que *RalCDP* presentó

mayor actividad con los sustratos con mayor grado de polimerización. La fusión del CBM37 a *Ral*/CDP incrementó la afinidad relativa de esta enzima sobre los polisacáridos celulolíticos insolubles, lo que también se reflejó en un incremento de la capacidad catalítica sobre estos sustratos. Además, se confirmó el rol de la región N-terminal de estas proteínas en la conformación de la estructura cuaternaria característica esta familia y se mostró su influencia en la actividad fosforolítica de la enzima.

Los avances logrados en el conocimiento de estas enzimas a nivel molecular sobre los mecanismos de acción e interacciones con los diferentes sustratos, facilitan futuros enfoques para el diseño de mejoras en la funcionalidad y la versatilidad de estas enzimas como biocatalizadores para la degradación de la biomasa lignocelulósica y/o la biosíntesis de biopolisacáridos.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Yeh BJ, Lim WA. Synthetic biology: lessons from the history of synthetic organic chemistry. *Nat Chem Biol* [Internet]. 2007 Sep [cited 2022 Aug 24];3(9):521–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17710092/>
2. Geyer R, Jambeck JR, Law KL. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci Adv* [Internet]. 2017 Jul 7 [cited 2022 Sep 23];3(7). Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.1700782>
3. Li P, Wang X, Su M, Zou X, Duan L, Zhang H. Characteristics of plastic pollution in the environment: A review. *Bull Environ Contam Toxicol* [Internet]. 2021 Oct 12 [cited 2022 Nov 16];107(4):577–84. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00128-020-02820-1>
4. Iglesias AA. Re-paving the road built by chemistry: A challenge to biochemistry and biotechnology. *Am J Biochem Biotechnol* [Internet]. 2015 Jan 1;11(1):3–4. Available from: <http://thescipub.com/abstract/10.3844/ajbbbsp.2015.3.4>
5. Li Q, Song J, Peng S, Wang JP, Qu G-Z, Sederoff RR, et al. Plant biotechnology for lignocellulosic biofuel production. *Plant Biotechnol J* [Internet]. 2014 Dec;12(9):1174–92. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pbi.12273>
6. Joyce BL, Stewart CN. Designing the perfect plant feedstock for biofuel production: Using the whole buffalo to diversify fuels and products. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2012 Sep;30(5):1011–22. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975011001388>
7. Cherubini F. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Convers Manag* [Internet]. 2010 Jul 1 [cited 2021 Jan 15];51(7):1412–21. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196890410000373>
8. Cherubini F, Mandl M, Philips C, Wellisch M. IEA Bioenergy Task 42 on Biorefineries: Co-production of fuels, chemicals, power and materials from biomass: IEA Bioenergy Task 42–Countries Report. 2010 [cited 2022 Jul 19]; Available from: <https://orbit.dtu.dk/en/publications/iea-bioenergy-task-42-on-biorefineries-co-production-of-fuels-che>
9. Nigam PS, Singh A. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Prog Energy*

- Combust Sci [Internet]. 2011 Feb 1 [cited 2021 Jan 19];37(1):52–68. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360128510000353>
10. Azad AK, Rasul MG, Khan MMK, Sharma SC, Hazrat MA. Prospect of biofuels as an alternative transport fuel in Australia. *Renew Sustain Energy Rev* [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2021 Jan 19];43:331–51. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032114009782>
 11. Dutta K, Daverey A, Lin J-G. Evolution retrospective for alternative fuels: First to fourth generation. *Renew Energy* [Internet]. 2014 Sep 1 [cited 2021 Jan 19];69:114–22. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960148114001359>
 12. Geddes CC, Nieves IU, Ingram LO. Advances in ethanol production. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 2011 Jun 1 [cited 2021 Jan 19];22(3):312–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166911000759>
 13. Zanuso E, Lara-Flores AA, Aguilar DL, Velazquez-Lucio J, Aguilar CN, Rodríguez-Jasso RM, et al. Kinetic modeling, operational conditions, and biorefinery products from hemicellulose: depolymerization and solubilization during hydrothermal processing. In: *Hydrothermal Processing in Biorefineries* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017 [cited 2021 Jan 19]. p. 141–60. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-56457-9_5
 14. Field JL, Richard TL, Smithwick EAH, Cai H, Laser MS, LeBauer DS, et al. Robust paths to net greenhouse gas mitigation and negative emissions via advanced biofuels. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2020 Sep 8;117(36):21968–77. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1920877117>
 15. Collotta M, Champagne P, Tomasoni G, Alberti M, Busi L, Mabee W. Critical indicators of sustainability for biofuels: An analysis through a life cycle sustainability assessment perspective. *Renew Sustain Energy Rev* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2021 Jan 19];115(September 2019):109358. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109358>
 16. Sun Y, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresour Technol* [Internet]. 2002 May [cited 2022 Jul 28];83(1):1–11. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852401002127>
 17. Gomez LD, Steele-King CG, McQueen-Mason SJ. Sustainable liquid biofuels from biomass: The writing's on the walls. *New Phytol* [Internet]. 2008 May 29 [cited 2021 Apr 19];178(3):473–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18373653/>

18. Bilal M, Asgher M, Iqbal HMN, Hu H, Zhang X. Biotransformation of lignocellulosic materials into value-added products—A review. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2022 Jul 20];98:447–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.133>
19. Foyle T, Jennings L, Mulcahy P. Compositional analysis of lignocellulosic materials: Evaluation of methods used for sugar analysis of waste paper and straw. *Bioresour Technol* [Internet]. 2007 Nov [cited 2021 Apr 19];98(16):3026–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17142038/>
20. Kumar R, Wyman CE. Effect of xylanase supplementation of cellulase on digestion of corn stover solids prepared by leading pretreatment technologies. *Bioresour Technol* [Internet]. 2009 Sep [cited 2019 Sep 24];100(18):4203–13. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096085240900354X>
21. Saini JK, Saini R, Tewari L. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech* [Internet]. 2015 Aug 21 [cited 2021 Feb 25];5(4):337–53. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13205-014-0246-5>
22. Zhou C-HH, Xia X, Lin C-XX, Tong D-SS, Beltramini J. Catalytic conversion of lignocellulosic biomass to fine chemicals and fuels. *Chem Soc Rev* [Internet]. 2011 Oct 17 [cited 2021 Aug 9];40(11):5588. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2011/cs/c1cs15124j>
23. Somerville C, Youngs H, Taylor C, Davis SC, Long SP. Feedstocks for lignocellulosic biofuels. *Science (80-)* [Internet]. 2010 Aug 13 [cited 2022 Jul 28];329(5993):790–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20705851/>
24. Beg QK, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal GS. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2001 Aug 1 [cited 2021 Apr 19];56(3–4):326–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11548999/>
25. Koukiekolo R, Cho H-Y, Kosugi A, Inui M, Yukawa H, Doi RH. Degradation of corn fiber by *Clostridium cellulovorans* cellulases and hemicellulases and contribution of scaffolding protein CbpA. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2005 Jul [cited 2021 Apr 19];71(7):3504–11. Available from: [/pmc/articles/PMC1168997/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16168997/)
26. Liab K, Azadi P, Collins R, Tolan J, Kim JS, Eriksson KL. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. *Enzyme Microb Technol* [Internet]. 2000 Jul 1 [cited 2021 Apr 19];27(1–2):89–94. Available from:

- <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022900001903>
27. Eriksson K-EL, Bermek H. Lignin, Lignocellulose, Ligninase. In: Encyclopedia of Microbiology [Internet]. Elsevier; 2009 [cited 2021 Apr 19]. p. 373–84. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123739445001528>
 28. Saha BC. Hemicellulose bioconversion. J Ind Microbiol Biotechnol [Internet]. 2003 May 1 [cited 2021 Apr 19];30(5):279–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12698321/>
 29. Hendriks A., Zeeman G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. Bioresour Technol [Internet]. 2009 Jan 1 [cited 2021 Apr 19];100(1):10–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18599291/>
 30. Himmel ME, Ding S-Y, Johnson DK, Adney WS, Nimlos MR, Brady JW, et al. Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. Science (80-) [Internet]. 2007 Feb 9 [cited 2022 Jul 26];315(5813):804–7. Available from: <https://www.science.org>
 31. Mooney CA, Mansfield SD, Touhy MG, Saddler JN. The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods. Bioresour Technol [Internet]. 1998 [cited 2021 Feb 25];64(2):113–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852497001818>
 32. Várnai A, Siika-aho M, Viikari L. Restriction of the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce by lignin and hemicellulose. Enzyme Microb Technol [Internet]. 2010 Mar 5 [cited 2021 Apr 21];46(3–4):185–93. Available from: <https://cris.vtt.fi/en/publications/restriction-of-the-enzymatic-hydrolysis-of-steam-pretreated-spruc>
 33. Mussatto SI, Fernandes M, Milagres AMF, Roberto IC. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. Enzyme Microb Technol [Internet]. 2008 Aug 5 [cited 2021 Apr 21];43(2):124–9. Available from: <https://orbit.dtu.dk/en/publications/effect-of-hemicellulose-and-lignin-on-enzymatic-hydrolysis-of-cel>
 34. Isikgor FH, Becer CR. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. Polym Chem [Internet]. 2015 Jun 16 [cited 2022 Jul 1];6(25):4497–559. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2015/py/c5py00263j>
 35. Qi B, Chen X, Su Y, Wan Y. Enzyme adsorption and recycling during hydrolysis of wheat

- straw lignocellulose. *Bioresour Technol* [Internet]. 2011 Feb [cited 2021 Apr 21];102(3):2881–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21109424/>
36. Berlin A, Balakshin M, Gilkes N, Kadla J, Maximenko V, Kubo S, et al. Inhibition of cellulase, xylanase and β -glucosidase activities by softwood lignin preparations. *J Biotechnol* [Internet]. 2006 Sep [cited 2021 Apr 21];125(2):198–209. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16621087/>
37. Nakagame S, Chandra RP, Saddler JN. The effect of isolated lignins, obtained from a range of pretreated lignocellulosic substrates, on enzymatic hydrolysis. *Biotechnol Bioeng* [Internet]. 2010 Apr 1 [cited 2021 Apr 21];105(5):871–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19998278/>
38. Zhang Y-HP, Lynd LR. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol Bioeng* [Internet]. 2004 Dec 30 [cited 2020 Apr 6];88(7):797–824. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.20282>
39. Merino ST, Cherry J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* [Internet]. Springer, Berlin, Heidelberg; 2007 [cited 2021 Apr 21]. p. 95–120. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/10_2007_066
40. Mansfield SD, Mooney C, Saddler JN. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnol Prog* [Internet]. 1999 Oct 1 [cited 2020 Apr 6];15(5):804–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10514250/>
41. Chundawat SPS, Venkatesh B, Dale BE. Effect of particle size based separation of milled corn stover on AFEX pretreatment and enzymatic digestibility. *Biotechnol Bioeng* [Internet]. 2007 Feb 1 [cited 2021 Apr 21];96(2):219–31. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.21132>
42. Chandra RP, Bura R, Mabee WE, Berlin A, Pan X, Saddler JN. Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? In: *Biofuels* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2007 [cited 2021 Apr 21]. p. 67–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17530205/>
43. Sun S, Sun S, Cao X, Sun R. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresour Technol* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2022 Jul 26];199:49–58. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852415011670>

44. Zhao L, Sun Z-F, Zhang C-C, Nan J, Ren N-Q, Lee D-J, et al. Advances in pretreatment of lignocellulosic biomass for bioenergy production: Challenges and perspectives. *Bioresour Technol* [Internet]. 2022 Jan;343(August 2021):126123. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126123>
45. Banerjee G, Scott-Craig JS, Walton JD. Improving enzymes for biomass conversion: A basic research perspective. *Bioenergy Res* [Internet]. 2010 [cited 2021 Apr 21];3(1):82–92. Available from: <http://www.energy.gov/print/6015.htm>
46. Drula E, Garron M-L, Dogan S, Lombard V, Henrissat B, Terrapon N. The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2021;50. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1045>
47. Sukharnikov LO, Cantwell BJ, Podar M, Zhulin IB. Cellulases: ambiguous nonhomologous enzymes in a genomic perspective. *Trends Biotechnol* [Internet]. 2011 Oct [cited 2021 Aug 20];29(10):473–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21683463/>
48. Dashtban M, Schraft H, Qin W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities and perspectives. *Int J Biol Sci* [Internet]. 2009 [cited 2021 Aug 20];5(6):578–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19774110/>
49. Kracher D, Andlar M, Furtmüller PG, Ludwig R. Active-site copper reduction promotes substrate binding of fungal lytic polysaccharide monooxygenase and reduces stability. *J Biol Chem* [Internet]. 2018 Feb 2 [cited 2021 Apr 23];293(5):1676–87. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820389468>
50. Couturier M, Berrin J-G. The saccharification step: the main enzymatic components. In: *Lignocellulose Conversion* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013 [cited 2021 Aug 20]. p. 93–110. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-37861-4_5
51. Biely P, Singh S, Puchart V. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2016 Nov 15 [cited 2022 Jul 18];34(7):1260–74. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975016301070>
52. Lafond M, Guais O, Maestracci M, Bonnin E, Giardina T. Four GH11 xylanases from the xylanolytic fungus *Talaromyces versatilis* act differently on (arabino)xylans. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014;98(14):6339–52.
53. Pollet A, Delcour JA, Courtin CM. Structural determinants of the substrate specificities of

- xylanases from different glycoside hydrolase families. *Crit Rev Biotechnol* [Internet]. 2010 Sep 12 [cited 2021 Aug 9];30(3):176–91. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/07388551003645599>
54. Teplitsky A, Shulami S, Moryles S, Shoham Y, Shoham G. Crystallization and preliminary X-ray analysis of an intracellular xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* [Internet]. 2000 Feb 1 [cited 2021 Aug 9];56(2):181–4. Available from: <https://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S0907444999013517>
55. Cragg SM, Beckham GT, Bruce NC, Bugg TDH, Distel DL, Dupree P, et al. Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life. *Curr Opin Chem Biol* [Internet]. 2015 Dec;29:108–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.10.018>
56. Levasseur A, Drula E, Lombard V, Coutinho PM, Henrissat B. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnol Biofuels* [Internet]. 2013 Mar 21 [cited 2021 Jul 27];6(1):41. Available from: <https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/1754-6834-6-41>
57. Bey M, Zhou S, Poidevin L, Henrissat B, Coutinho PM, Berrin J-G, et al. Cello-Oligosaccharide oxidation reveals differences between two Lytic Polysaccharide Monooxygenases (Family GH61) from *Podospira anserina*. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2013 Jan [cited 2021 Jul 27];79(2):488. Available from: </pmc/articles/PMC3553762/>
58. Horn SJ, Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Eijsink V. Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnol Biofuels* [Internet]. 2012 Dec 2 [cited 2021 Jul 27];5(1):45. Available from: <https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/1754-6834-5-45>
59. Dimarogona M, Topakas E, Christakopoulos P. Cellulose degradation by oxidative enzymes. *Comput Struct Biotechnol J* [Internet]. 2012 Sep [cited 2021 Jul 27];2(3). Available from: </pmc/articles/PMC3962083/>
60. Boraston AB, Bolam DN, GILBERT HJ, Davies GJ. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem J* [Internet]. 2004 Sep 15 [cited 2019 Sep 25];382(3):769–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1133952/>
61. Oliveira C, Carvalho V, Domingues L, Gama FM. Recombinant CBM-fusion technology

- Applications overview. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2015 May;33(3–4):358–69. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.006>
62. Shoseyov O, Shani Z, Levy I. Carbohydrate Binding Modules: Biochemical properties and novel applications. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 2006 Jun 1 [cited 2019 Sep 25];70(2):283–95. Available from: <http://mmbr.asm.org/content/70/2/283.abstract>
63. Filonova L, Gunnarsson LC, Daniel G, Ohlin M. Synthetic xylan-binding modules for mapping of pulp fibres and wood sections. *BMC Plant Biol* [Internet]. 2007 Dec 12 [cited 2021 Jul 27];7(1):54. Available from: <https://bmcplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2229-7-54>
64. Abbott DW, Eirin-Lopez JM, Boraston AB. Insight into ligand diversity and novel biological roles for family 32 Carbohydrate-Binding Modules. *Mol Biol Evol* [Internet]. 2007 Nov 13 [cited 2021 Jul 27];25(1):155–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18032406/>
65. Gregg KJ, Finn R, Abbott DW, Boraston AB. Divergent modes of glycan recognition by a new family of carbohydrate-binding modules. *J Biol Chem* [Internet]. 2008 May 2 [cited 2021 Jul 27];283(18):12604–13. Available from: </pmc/articles/PMC2335362/>
66. Guillén D, Sánchez S, Rodríguez-Sanoja R. Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2010 Feb 12 [cited 2021 Jul 27];85(5):1241–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19908036/>
67. McCartney L, Gilbert HJ, Bolam DN, Boraston AB, Knox JP. Glycoside hydrolase carbohydrate-binding modules as molecular probes for the analysis of plant cell wall polymers. *Anal Biochem* [Internet]. 2004 Mar [cited 2021 Aug 9];326(1):49–54. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269703008078>
68. Wang L, Zhang Y, Gao P. A novel function for the cellulose binding module of cellobiohydrolase I. *Sci China Ser C Life Sci* [Internet]. 2008 Jul 13 [cited 2021 Aug 9];51(7):620–9. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11427-008-0088-3>
69. Vaaje-Kolstad G, Horn SJ, Van Aalten DMF, Synstad B, Eijsink VGH. The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation. *J Biol Chem* [Internet]. 2005 Aug [cited 2021 Aug 9];280(31):28492–7. Available from: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)56549-6/abstract](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)56549-6/abstract)
70. Bischof RH, Ramoni J, Seiboth B. Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. *Microb Cell Fact* [Internet]. 2016 Dec 10 [cited 2022 Jul

- 25];15(1):106. Available from:
<http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-016-0507-6>
71. Rincon MT, Čepeljnik T, Martin JC, Lamed R, Barak Y, Bayer EA, et al. Unconventional mode of attachment of the *Ruminococcus flavefaciens* cellulosome to the cell surface. *J Bacteriol.* 2005 Nov;187(22):7569–78.
72. Flint HJ, Bayer EA, Rincon MT, Lamed R, White BA. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2008 Feb [cited 2021 Jun 25];6(2):121–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18180751/>
73. Fontes CMGA, Gilbert HJ. Cellulosomes: Highly efficient nanomachines designed to deconstruct plant cell wall complex carbohydrates. Vol. 79, *Annual Review of Biochemistry.* Annual Reviews; 2010. p. 655–81.
74. Zhu Y, McBride MJ. The unusual cellulose utilization system of the aerobic soil bacterium *Cytophaga hutchinsonii*. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2017 Oct 29;101(19):7113–27. Available from: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>
75. Brunecky R, Alahuhta M, Xu Q, Donohoe BS, Crowley MF, Kataeva IA, et al. Revealing nature's cellulase diversity: The digestion mechanism of *Caldicellulosiruptor bescii* CelA. *Science* (80-) [Internet]. 2013 Dec 20 [cited 2022 Jul 25];342(6165):1513–6. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1244273>
76. Malgas S, Chandra R, Van Dyk JS, Saddler JN, Pletschke BI. Formulation of an optimized synergistic enzyme cocktail, HoloMix, for effective degradation of various pre-treated hardwoods. *Bioresour Technol.* 2017 Dec 1;245:52–65.
77. Malgas S, Thoresen M, van Dyk JS, Pletschke BI. Time dependence of enzyme synergism during the degradation of model and natural lignocellulosic substrates. *Enzyme Microb Technol* [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2021 Aug 20];103:1–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28554379>
78. Dotsenko A, Gusakov A, Rozhkova A, Sinitsyna O, Shashkov I, Sinitsyn A. Enzymatic hydrolysis of cellulosic materials using synthetic mixtures of purified cellulases bioengineered at N-glycosylation sites. *3 Biotech* [Internet]. 2018 Sep 5 [cited 2021 Aug 20];8(9):1–8. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13205-018-1419-4>
79. Rahikainen J, Ceccherini S, Molinier M, Holopainen-Mantila U, Reza M, Väisänen S, et al. Effect of cellulase family and structure on modification of wood fibres at high

- consistency. Cellulose [Internet]. 2019 Apr 13 [cited 2021 Aug 20];26(8):5085–103. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10570-019-02424-x>
80. Eriksson T, Karlsson J, Tjerneld F. A model explaining declining rate in hydrolysis of lignocellulose substrates with cellobiohydrolase I (Cel7A) and endoglucanase I (Cel7B) of *Trichoderma reesei*. Appl Biochem Biotechnol - Part A Enzym Eng Biotechnol [Internet]. 2002 [cited 2021 Apr 16];101(1):41–60. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1385/ABAB:101:1:41>
81. Våljamäe P, Sild V, Nutt A, Pettersson G, Johansson G. Acid hydrolysis of bacterial cellulose reveals different modes of synergistic action between cellobiohydrolase I and endoglucanase I. Eur J Biochem [Internet]. 1999 Dec 1 [cited 2021 Apr 16];266(2):327–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10561572/>
82. Jalak J, Kurašin M, Teugas H, Våljamä P. Endo-exo synergism in cellulose hydrolysis revisited. J Biol Chem [Internet]. 2012 Aug 17 [cited 2021 Apr 16];287(34):28802–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22411111/>
83. Gonçalves GAL, Takasugi Y, Jia L, Mori Y, Noda S, Tanaka T, et al. Synergistic effect and application of xylanases as accessory enzymes to enhance the hydrolysis of pretreated bagasse. Enzyme Microb Technol [Internet]. 2015 [cited 2022 Jul 26];72:16–24. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022915000083>
84. Sun FF, Hong J, Hu J, Saddler JN, Fang X, Zhang Z, et al. Accessory enzymes influence cellulase hydrolysis of the model substrate and the realistic lignocellulosic biomass. Enzyme Microb Technol [Internet]. 2015 [cited 2022 Jul 26];79–80:42–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022915300223>
85. Bajaj P, Mahajan R. Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology. Appl Microbiol Biotechnol [Internet]. 2019 Nov 18;103(21–22):8711–24. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10146-0>
86. Jeoh T, Wilson DB, Walker LP. Effect of cellulase mole fraction and cellulose recalcitrance on synergism in cellulose hydrolysis and binding. Biotechnol Prog [Internet]. 2006 Feb 3 [cited 2021 Aug 20];22(1):270–7. Available from: <https://aiche.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1021/bp050266f>
87. Patel AK, Singhanian RR, Sim SJ, Pandey A. Thermostable cellulases: Current status and perspectives. Bioresour Technol [Internet]. 2019 May 1 [cited 2021 May 28];279:385–92. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852419300628>
88. Kawaguchi H, Takada K, Elkasaby T, Pangestu R, Toyoshima M, Kahar P, et al. Recent

- advances in lignocellulosic biomass white biotechnology for bioplastics. *Bioresour Technol* [Internet]. 2022;344:126165. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126165>
89. Manali Shah, Sanjukta Rajhans, Himanshu A. Pandya, Archana U. Mankad. Bioplastic for future: A review then and now. *World J Adv Res Rev.* 2021;9(2):056–67.
 90. Ubiparip Z, De Doncker M, Beerens K, Franceus J, Desmet T. β -Glucan phosphorylases in carbohydrate synthesis. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2021 May 10;105(10):4073–87. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s00253-021-11320-z>
 91. Nakajima H, Dijkstra P, Loos K. The recent developments in biobased polymers toward general and engineering applications: polymers that are upgraded from biodegradable polymers, analogous to petroleum-derived polymers, and newly developed. *Polymers (Basel)* [Internet]. 2017 Oct 18 [cited 2021 Mar 19];9(12):523. Available from: www.mdpi.com/journal/polymers
 92. Jae Kweon Park, Keyhani NO, Roseman S. Chitin catabolism in the marine bacterium *Vibrio furnissii*. Identification, molecular cloning, and characterization of an N,N'-diacetylchitobiose phosphorylase. *J Biol Chem* [Internet]. 2000 Oct 20 [cited 2021 Aug 9];275(42):33077–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10913116/>
 93. Kazuhiro C, Takanori N, Erika S, Mamoru N, Motomitsu K, Ken'Ichi O, et al. Discovery of two β -1,2-mannoside phosphorylases showing different chain-length specificities from *Thermoanaerobacter* sp. X-514. *PLoS One* [Internet]. 2014 Dec 12 [cited 2021 Aug 9];9(12):e114882. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0114882>
 94. O'Neill EC, Field RA. Enzymatic synthesis using glycoside phosphorylases. *Carbohydr Res* [Internet]. 2015 Feb 11 [cited 2021 Mar 19];403:23–37. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621514002481>
 95. Zhou W, You C, Ma H, Ma Y, Zhang YHP. One-pot biosynthesis of high-concentration α -glucose 1-phosphate from starch by sequential addition of three hyperthermophilic enzymes. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2016 Mar 2 [cited 2022 Jul 26];64(8):1777–83. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.jafc.5b05648>
 96. Awad FN. Glycoside phosphorylases for carbohydrate synthesis: An insight into the diversity and potentiality. *Biocatal Agric Biotechnol* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2022 Jul 26];31:101886. Available from:

- <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878818120319174>
97. Singh RP, Pergolizzi G, Nepogodiev SA, de Andrade P, Kuhaudomlarp S, Field RA. Preparative and kinetic analysis of β -1,4- and β -1,3-glucan phosphorylases informs access to human milk oligosaccharide fragments and analogues thereof. *ChemBioChem*. 2020 Apr 1;21(7):1043–9.
 98. Pergolizzi G, Kuhaudomlarp S, Kalita E, Field RA. Glycan phosphorylases in multi-enzyme synthetic processes. *Protein Pept Lett* [Internet]. 2017;24(8):696–709. Available from: <http://www.cazy.org/>
 99. Nidetzky B, Zhong C. Phosphorylase-catalyzed bottom-up synthesis of short-chain soluble cello-oligosaccharides and property-tunable cellulosic materials. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2022 Nov 22];51:107633. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S073497502030135X>
 100. Zhong C, Luley-Goedl C, Nidetzky B. Product solubility control in cellooligosaccharide production by coupled cellobiose and cellodextrin phosphorylase. *Biotechnol Bioeng* [Internet]. 2019 Sep 21 [cited 2021 Mar 19];116(9):2146–55. Available from: </pmc/articles/PMC6767486/>
 101. Adharis A, Petrović DM, Özdamar I, Woortman AJJ, Loos K. Environmentally friendly pathways towards the synthesis of vinyl-based oligocelluloses. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2021 Mar 19];193:196–204. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014486171830362X>
 102. Ávila PF, Silva MF, Martins M, Goldbeck R. Cello-oligosaccharides production from lignocellulosic biomass and their emerging prebiotic applications. *World J Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2021;37(5):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03041-2>
 103. Desmet T, Soetaert W. Broadening the synthetic potential of disaccharide phosphorylases through enzyme engineering. *Process Biochem* [Internet]. 2012 Jan 1 [cited 2021 Aug 9];47(1):11–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511311003965>
 104. Karnaouri A, Matsakas L, Krikigianni E, Rova U, Christakopoulos P. Valorization of waste forest biomass toward the production of cello-oligosaccharides with potential prebiotic activity by utilizing customized enzyme cocktails. *Biotechnol Biofuels* [Internet]. 2019 Dec 10 [cited 2022 Aug 2];12(1):1–19. Available from: <https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-019-1628-z>

105. Mano MCR, Neri-Numa IA, da Silva JB, Paulino BN, Pessoa MG, Pastore GM. Oligosaccharide biotechnology: an approach of prebiotic revolution on the industry. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2018 Jan 14 [cited 2022 Aug 2];102(1):17–37. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-017-8564-2>
106. Fujii S, Takahashi N, Inoue H, Katsumata SI, Kikkawa Y, Machida M, et al. A combination of soy isoflavones and cello-oligosaccharides changes equol/O-desmethylangolensin production ratio and attenuates bone fragility in ovariectomized mice. *Biosci Biotechnol Biochem* [Internet]. 2016 Aug 2 [cited 2022 Aug 2];80(8):1632–5. Available from: <https://academic.oup.com/bbb/article/80/8/1632/5938180>
107. Kameshwar AKS, Qin W. Recent developments in using advanced sequencing technologies for the genomic studies of lignin and cellulose degrading microorganisms. *Int J Biol Sci* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2021 Apr 22];12(2):156–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26884714/>
108. Juturu V, Wu JC. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renew Sustain Energy Rev* [Internet]. 2014 May 1 [cited 2021 Jun 24];33:188–203. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032114000999>
109. Medie FM, Davies GJ, Drancourt M, Henrissat B. Genome analyses highlight the different biological roles of cellulases. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2012 Mar 23 [cited 2021 Jun 24];10(3):227–34. Available from: <https://sci-hub.do/https://www.nature.com/articles/nrmicro2729>
110. Koeck DE, Pechtl A, Zverlov V V., Schwarz WH. Genomics of cellulolytic bacteria. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 2014 Oct 1 [cited 2021 Jun 24];29(1):171–83. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095816691400130X>
111. Schwarz WH, Zverlov V V., Bahl H. Extracellular glycosyl hydrolases from Clostridia. *Adv Appl Microbiol*. 2004 Jan 1;56:215–61.
112. Bhujbal SK, Ghosh P, Vijay VK, Rathour R, Kumar M, Singh L, et al. Biotechnological potential of rumen microbiota for sustainable bioconversion of lignocellulosic waste to biofuels and value-added products. *Sci Total Environ* [Internet]. 2022 Mar 25 [cited 2022 Jul 27];814:152773. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969721078529>
113. Weimer PJ, Waghorn GC, Odt CL, Mertens DR. Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*. 1999 Jan 1;82(1):122–34.

114. Koike S, Kobayashi Y. Fibrolytic rumen bacteria: their ecology and functions. *Asian-Australasian J Anim Sci* [Internet]. 2009 Jan 6 [cited 2022 Jul 27];22(1):131–8. Available from: <http://ajas.info/journal/view.php?doi=10.5713/ajas.2009.r.01>
115. Hess M, Sczyrba A, Egan R, Kim T-W, Chokhawala H, Schroth G, et al. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen. *Science* (80-) [Internet]. 2011 Jan 28 [cited 2021 May 13];331(6016):463–7. Available from: <https://science.sciencemag.org/content/331/6016/463>
116. Berg Miller ME, Antonopoulos DA, Rincon MT, Band M, Bari A, Akraiko T, et al. Diversity and strain specificity of plant cell wall degrading enzymes revealed by the draft genome of *Ruminococcus flavefaciens* FD-1. Ahmed N, editor. *PLoS One* [Internet]. 2009 Aug 14 [cited 2021 Jun 25];4(8):e6650. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0006650>
117. Shinkai T, Kobayashi Y. Localization of ruminal cellulolytic bacteria on plant fibrous materials as determined by fluorescence in situ hybridization and real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2007 Mar [cited 2022 Jul 27];73(5):1646–52. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.01896-06>
118. Christopherson MR, Dawson JA, Stevenson DM, Cunningham AC, Bramhacharya S, Weimer PJ, et al. Unique aspects of fiber degradation by the ruminal ethanologen *Ruminococcus albus* 7 revealed by physiological and transcriptomic analysis. *BMC Genomics* [Internet]. 2014 Dec 4 [cited 2020 May 9];15(1):1066. Available from: <http://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-15-1066>
119. Ohara H, Karita S, Kimura T, Sakka K, Ohmiya K. Characterization of the Cellulolytic Complex (Cellulosome) from *Ruminococcus albus*. *Biosci Biotechnol Biochem* [Internet]. 2000 Jan 22 [cited 2020 May 7];64(2):254–60. Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=tbbb20>
120. Ohara H, Noguchi J, Karita S, Kimura T, Sakka K, Ohmiya K. Sequence of egV and properties of EgV, a *Ruminococcus albus* endoglucanase containing a dockerin domain. *Biosci Biotechnol Biochem* [Internet]. 2000 [cited 2021 Jun 25];64(1):80–8. Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=tbbb20>
121. Suen G, Stevenson DM, Bruce DC, Chertkov O, Copeland A, Cheng J-F, et al. Complete genome of the cellulolytic ruminal bacterium *Ruminococcus albus* 7. *J Bacteriol* [Internet]. 2011 Oct [cited 2021 Jun 25];193(19):5574–5. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JB.05621-11>

122. Pegden RS, Larson MA, Grant RJ, Morrison M. Adherence of the gram-positive bacterium *Ruminococcus albus* to cellulose and identification of a novel form of cellulose-binding protein which belongs to the Pil family of proteins. *J Bacteriol.* 1998;180(22):5921–7.
123. Morrison M, Miron J. Adhesion to cellulose by *Ruminococcus albus*: a combination of cellulosomes and Pil-proteins? *FEMS Microbiol Lett.* 2000 Apr;185(2):109–15.
124. Pavlostathis SG, Miller TL, Wolin MJ. Fermentation of insoluble cellulose by continuous cultures of *Ruminococcus albus*. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1988 Nov [cited 2021 May 13];54(11):2655–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16347769>
125. Matulova M, Nouaille R, Capek P, Péan M, Delort AM, Forano E. NMR study of cellulose and wheat straw degradation by *Ruminococcus albus* 20. *FEBS J* [Internet]. 2008 Jul [cited 2021 Jun 25];275(13):3503–11. Available from: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1742-4658.2008.06497.x>
126. Devillard E, Goodheart DB, Karnati SKR, Bayer EA, Lamed R, Miron J, et al. *Ruminococcus albus* 8 mutants defective in cellulose degradation are deficient in two processive endocellulases, Cel48A and Cel19B, both of which possess a novel modular architecture. *J Bacteriol.* 2004 Jan;186(1):136–45.
127. Xu Q, Morrison M, Nelson KE, Bayer EA, Atamna N, Lamed R. A novel family of carbohydrate-binding modules identified with *Ruminococcus albus* proteins. *FEBS Lett.* 2004 May 21;566(1–3):11–6.
128. Yeoman CJ, Fields CJ, Lepercq P, Ruiz P, Forano E, White BA, et al. In vivo competitions between *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, and *Ruminococcus albus* in a gnotobiotic sheep model revealed by multi-omic analyses. *MBio.* 2021;12(2):1–16.
129. Ezer A, Matalon E, Jindou S, Borovok I, Atamna N, Yu Z, et al. Cell surface enzyme attachment is mediated by family 37 carbohydrate-binding modules, unique to *Ruminococcus albus*. *J Bacteriol.* 2008 Dec;190(24):8220–2.
130. Greve LC, Labavitch JM, Hungate RE. α -L-Arabinofuranosidase from *Ruminococcus albus* 8: Purification and possible role in hydrolysis of alfalfa cell wall. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1984 May [cited 2019 Sep 25];47(5):1135–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6742828>
131. Moon YH, Iakiviak M, Bauer S, Mackie RI, Cann IKO. Biochemical analyses of multiple endoxylanases from the rumen bacterium *Ruminococcus albus* 8 and their synergistic activities with accessory hemicellulose-degrading enzymes. *Appl Environ Microbiol*

- [Internet]. 2011 Aug 16;77(15):5157–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3147433/>
132. Lou J, Dawson KA, Strobel HJ. Cellobiose and cellodextrin metabolism by the ruminal bacterium *Ruminococcus albus*. *Curr Microbiol* [Internet]. 1997 Oct [cited 2021 Mar 19];35(4):221–7. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s002849900242>
133. Nakai H, Hachem MA, Petersen BO, Westphal Y, Mannerstedt K, Baumann MJ, et al. Efficient chemoenzymatic oligosaccharide synthesis by reverse phosphorolysis using cellobiose phosphorylase and cellodextrin phosphorylase from *Clostridium thermocellum*. *Biochimie* [Internet]. 2010 Dec;92(12):1818–26. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908410002798>
134. Puchart V. Glycoside phosphorylases: Structure, catalytic properties and biotechnological potential. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2021 Mar 19];33(2):261–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25687274>
135. Luley-Goedl C, Nidetzky B. Carbohydrate synthesis by disaccharide phosphorylases: Reactions, catalytic mechanisms and application in the glycosciences. *Biotechnol J* [Internet]. 2010 Dec 1 [cited 2021 May 27];5(12):1324–38. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/biot.201000217>
136. Nakai H, Kitaoka M, Svensson B, Ohtsubo K. Recent development of phosphorylases possessing large potential for oligosaccharide synthesis. *Curr Opin Chem Biol* [Internet]. 2013 Apr 1 [cited 2021 Mar 19];17(2):301–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1367593113000070>
137. Zhong C, Nidetzky B. Three-enzyme phosphorylase cascade for integrated production of short-chain cellodextrins. *Biotechnol J* [Internet]. 2020 Mar 14 [cited 2021 May 7];15(3):1900349. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31677345/>
138. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* [Internet]. 1976 May 7 [cited 2019 Sep 25];72(1–2):248–54. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269776905273>
139. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* [Internet]. 1970 Aug [cited 2021 Apr 22];227(5259):680–5. Available from: <https://www.nature.com/articles/227680a0>
140. Arndt C, Koristka S, Feldmann A, Bachmann M. Native Polyacrylamide Gels. In: Kurien

- B, Scofield R, editors. Protein Electrophoresis Methods and Protocols [Internet]. Humana Press, Totowa, NJ; 2019. p. 87–91. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-8793-1_8
141. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2001 Jun 1 [cited 2019 Sep 25];30(11):1191–212. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584901004804>
142. Lees WJ, Whitesides GM. Equilibrium constants for thiol-disulfide interchange reactions: a coherent, corrected set. *J Org Chem* [Internet]. 1993 Jan 1 [cited 2019 Sep 25];58(3):642–7. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jo00055a016>
143. Wood TM. Preparation of crystalline, amorphous, and dyed cellulase substrates. In: *Methods in Enzymology* [Internet]. Academic Press; 1988 [cited 2021 Sep 17]. p. 19–25. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0076687988601030>
144. DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* [Internet]. 1956 Mar 1;28(3):350–6. Available from: <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
145. Green F, Clausen CA, Highley TL. Adaptation of the Nelson-Somogyi reducing-sugar assay to a microassay using microtiter plates. *Anal Biochem* [Internet]. 1989 Nov;182(2):197–9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269789905782>
146. Zhang Y-HP, Lynd LR. Determination of the number-average degree of polymerization of cellodextrins and cellulose with application to enzymatic hydrolysis. *Biomacromolecules* [Internet]. 2005 May 1 [cited 2021 Jul 1];6(3):1510–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15877372/>
147. Kim JS, Lee YY, Kim TH. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* [Internet]. 2016 Jan;199:42–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.085>
148. Lanzetta PA, Alvarez LJ, Reinach PS, Candia OA. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal Biochem* [Internet]. 1979 Nov 15 [cited 2021 May 7];100(1):95–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/161695/>
149. Hess HH, Derr JE. Assay of inorganic and organic phosphorus in the 0.1–5 nanomole range. *Anal Biochem* [Internet]. 1975 Feb 1 [cited 2021 May 7];63(2):607–13. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269775903887>

150. Fusari C, Demonte AM, Figueroa CM, Aleanzi M, Iglesias AA. A colorimetric method for the assay of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Anal Biochem* [Internet]. 2006 May 1 [cited 2022 May 6];352(1):145–7. Available from: www.elsevier.com/locate/yabio
151. Raabo BE, Terkildsen TC. On the enzymatic determination of blood glucose. *Scand J Clin Lab Invest* [Internet]. 1960 Jan 13 [cited 2021 Mar 12];12(4):402–7. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/00365516009065404>
152. Eis C, Nidetzky B. Characterization of trehalose phosphorylase from *Schizophyllum commune*. *Biochem J* [Internet]. 1999 Jul 15;341(2):385. Available from: <http://www.biochemj.org/bj/341/bj3410385.htm>
153. Zhang C, Wang Y, Li Z, Zhou X, Zhang W, Zhao Y, et al. Characterization of a multi-function processive endoglucanase CHU_2103 from *Cytophaga hutchinsonii*. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2014 Aug 21 [cited 2022 Feb 8];98(15):6679–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24652064/>
154. Karnaouri A, Muraleedharan MN, Dimarogona M, Topakas E, Rova U, Sandgren M, et al. Recombinant expression of thermostable processive MtEG5 endoglucanase and its synergism with MtLPMO from *Myceliophthora thermophila* during the hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Biotechnol Biofuels* [Internet]. 2017 Dec 15 [cited 2022 Feb 23];10(1):126. Available from: <https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-017-0813-1>
155. Zhang J, Moilanen U, Tang M, Viikari L. The carbohydrate-binding module of xylanase from *Nonomuraea flexuosa* decreases its non-productive adsorption on lignin. *Biotechnol Biofuels* [Internet]. 2013 Jan 30 [cited 2019 Sep 25];6(1):18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3577619/>
156. Hong J, Ye X, Zhang Y-HP. Quantitative determination of cellulose accessibility to cellulase based on adsorption of a nonhydrolytic fusion protein containing CBM and GFP with its applications. *Langmuir* [Internet]. 2007 Dec 1 [cited 2021 Dec 9];23(25):12535–40. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la7025686>
157. Sugawara E, Nikaido H. Thin Layer Chromatography in Phytochemistry [Internet]. Waksmundzka-Hajnos M, Sherma J, Kowalska T, editors. Vol. 58, Antimicrobial agents and chemotherapy. CRC Press; 2008. 7250–7 p. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4249520>
158. Boratyn GM, Schäffer AA, Agarwala R, Altschul SF, Lipman DJ, Madden TL. Domain enhanced lookup time accelerated BLAST. *Biol Direct* [Internet]. 2012 Apr 17 [cited 2022

- May 4];7(1):12. Available from: <https://link.springer.com/articles/10.1186/1745-6150-7-12>
159. Mirdita M, Schütze K, Moriwaki Y, Heo L, Ovchinnikov S, Steinegger M. ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat Methods* [Internet]. 2022 Oct 29 [cited 2022 Apr 7];19(6):679–82. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.08.15.456425v2>
160. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* [Internet]. 2021 Jul 15 [cited 2021 Sep 23];596(7873):583–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-021-03819-2>
161. Baek M, DiMaio F, Anishchenko I, Dauparas J, Ovchinnikov S, Lee GR, et al. Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. *Science* (80-) [Internet]. 2021 Aug 20 [cited 2022 Feb 2];373(6557):871–6. Available from: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.abj8754>
162. Takei Y, Ishida T. How to select the best model from AlphaFold2 structures? *bioRxiv* [Internet]. 2022 Apr 5 [cited 2022 Apr 7];2022.04.05.487218. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.04.05.487218v1>
163. Rédei GP. Blast (basic local alignment search tool). In: *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics* [Internet]. 2008 [cited 2022 Apr 13]. p. 221–221. Available from: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome
164. Berman HM. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2000 Jan 1 [cited 2022 Apr 13];28(1):235–42. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/28/1/235/2384399>
165. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Couch GS, Croll TI, et al. UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Sci* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2021 Sep 17];30(1):70–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32881101/>
166. Lo MC, Aulabaugh A, Jin G, Cowling R, Bard J, Malamas M, et al. Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery. *Anal Biochem* [Internet]. 2004 Sep 1 [cited 2021 May 7];332(1):153–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15301960/>
167. Matulis D, Kranz JK, Salemme FR, Todd MJ. Thermodynamic stability of carbonic

- anhydrase: Measurements of binding affinity and stoichiometry using thermofluor. *Biochemistry* [Internet]. 2005 Apr 5 [cited 2021 May 7];44(13):5258–66. Available from: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
168. Devendran S, Abdel-Hamid AM, Evans AF, Iakiviak M, Kwon IH, MacKie RI, et al. Multiple cellobiohydrolases and cellobiose phosphorylases cooperate in the ruminal bacterium *Ruminococcus albus* 8 to degrade cellooligosaccharides. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Dec 17 [cited 2021 May 13];6(1):35342. Available from: www.nature.com/scientificreports
169. Iakiviak M, Devendran S, Skorupski A, Moon YH, Mackie RI, Cann I. Functional and modular analyses of diverse endoglucanases from *Ruminococcus albus* 8, a specialist plant cell wall degrading bacterium. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(June):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep29979>
170. Hamura K, Saburi W, Abe S, Morimoto N, Taguchi H, Mori H, et al. Enzymatic characteristics of cellobiose phosphorylase from *Ruminococcus albus* NE1 and kinetic mechanism of unusual substrate inhibition in reverse phosphorolysis. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2012;8451(June 2017):812–8.
171. Sawano T, Saburi W, Hamura K, Matsui H, Mori H. Characterization of *Ruminococcus albus* cellodextrin phosphorylase and identification of a key phenylalanine residue for acceptor specificity and affinity to the phosphate group. *FEBS J* [Internet]. 2013 Sep 1 [cited 2021 Mar 19];280(18):4463–73. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/febs.12408>
172. Letunic I, Khedkar S, Bork P. SMART: Recent updates, new developments and status in 2020. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2021 Jan 8 [cited 2021 Mar 15];49(D1):D458–60. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/49/D1/D458/5940513>
173. Guimarães BG, Souchon H, Lytle BL, David Wu JH, Alzari PM. The crystal structure and catalytic mechanism of cellobiohydrolase celS, the major enzymatic component of the *Clostridium thermocellum* cellulosome. *J Mol Biol*. 2002 Jul 12;320(3):587–96.
174. Parsiegla G, Juy M, Reverbel-Leroy C, Tardif C, Belaïch JP, Driguez H, et al. The crystal structure of the processive endocellulase CelF of *Clostridium cellulolyticum* in complex with a thiooligosaccharide inhibitor at 2.0 Å resolution. *EMBO J* [Internet]. 1998 Oct 1 [cited 2022 May 27];17(19):5551–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9755156/>
175. Kostylev M, Alahuhta M, Chen M, Brunecky R, Himmel ME, Lunin V V., et al. Cel48A

- from *Thermobifida fusca*: Structure and site directed mutagenesis of key residues. *Biotechnol Bioeng* [Internet]. 2014 [cited 2022 May 27];111(4):664–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24264519/>
176. Brunecky R, Alahuhta M, Sammond DW, Xu Q, Chen M, Wilson DB, et al. Natural diversity of glycoside hydrolase family 48 exoglucanases: insights from structure. *Biotechnol Biofuels* [Internet]. 2017 Dec 30;10(1):274. Available from: <https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-017-0951-5>
177. Sakon J, Adney WS, Himmel ME, Thomas SR, Karplus PA. Crystal structure of thermostable family 5 endocellulase E1 from *Acidothermus cellulolyticus* in complex with cellotetraose. *Biochemistry* [Internet]. 1996 Jan 1;35(33):10648–60. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi9604439>
178. Cohen R, Suzuki MR, Hammel KE. Processive endoglucanase active in crystalline cellulose hydrolysis by the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2005 May [cited 2022 Feb 8];71(5):2412–7. Available from: </pmc/articles/PMC1087581/>
179. Breves R, Bronnenmeier K, Wild N, Lottspeich F, Staudenbauer WL, Hofemeister J. Genes encoding two different β -glucosidases of *Thermoanaerobacter brockii* are clustered in a common operon. *Appl Environ Microbiol*. 1997 Oct 1;63(10):3902–10.
180. Kappes RM, Kempf B, Kneip S, Boch J, Gade J, Meier-Wagner J, et al. Two evolutionarily closely related ABC transporters mediate the uptake of choline for synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*. 1999;32(1):203–16.
181. Maqbool A, Horler RSP, Muller A, Wilkinson AJ, Wilson KS, Thomas GH. The substrate-binding protein in bacterial ABC transporters: Dissecting roles in the evolution of substrate specificity. *Biochem Soc Trans*. 2015 Oct 1;43(5):1011–7.
182. Du Y, Shi WW, He YX, Yang YH, Zhou CZ, Chen Y. Structures of the substrate-binding protein provide insights into the multiple compatible solute binding specificities of the *Bacillus subtilis* ABC transporter OpuC. *Biochem J*. 2011 Jun 1;436(2):283–9.
183. Hidaka M, Honda Y, Kitaoka M, Nirasawa S, Hayashi K, Wakagi T, et al. Chitobiose phosphorylase from *Vibrio proteolyticus*, a member of glycosyl transferase family 36, has a clan GH-L-like (α/α)₆ barrel fold. *Structure* [Internet]. 2004 Jun;12(6):937–47. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096921260400156X>
184. Bianchetti CM, Elsen NL, Fox BG, Phillips GN. Structure of cellobiose phosphorylase from *Clostridium thermocellum* in complex with phosphate. *Acta Crystallogr Sect F*

- Struct Biol Cryst Commun [Internet]. 2011 Nov 1;67(11):1345–9. Available from: <https://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S1744309111032660>
185. O'Neill EC, Pergolizzi G, Stevenson CEM, Lawson DM, Nepogodiev SA, Field RA. Cellodextrin phosphorylase from *Ruminiclostridium thermocellum*: X-ray crystal structure and substrate specificity analysis. Carbohydr Res [Internet]. 2017;451:118–32. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2017.07.005>
186. Gao D, Uppugundla N, Chundawat SPS, Yu X, Hermanson S, Gowda K, et al. Hemicellulases and auxiliary enzymes for improved conversion of lignocellulosic biomass to monosaccharides. Biotechnol Biofuels [Internet]. 2011 Feb 22 [cited 2021 Apr 16];4(1):5. Available from: <http://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/1754-6834-4-5>
187. Schmitz E, Leontakianakou S, Norlander S, Nordberg Karlsson E, Adlercreutz P. Lignocellulose degradation for the bioeconomy: The potential of enzyme synergies between xylanases, ferulic acid esterase and laccase for the production of arabinoxylo-oligosaccharides. Bioresour Technol [Internet]. 2022;343(October 2021):126114. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126114>
188. Ubando AT, Felix CB, Chen WH. Biorefineries in circular bioeconomy: A comprehensive review. Vol. 299, Bioresource Technology. Elsevier; 2020. p. 122585.
189. Kumar B, Verma P. Biomass-based biorefineries: An important archetype towards a circular economy. Fuel [Internet]. 2021 Mar;288:119622. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016236120326181>
190. Lara-Flores AA, Araújo RG, Rodríguez-Jasso RM, Aguedo M, Aguilar CN, Trajano HL, et al. Bioeconomy and Biorefinery: Valorization of hemicellulose from lignocellulosic biomass and potential use of avocado residues as a promising resource of bioproducts. In: Energy, Environment, and Sustainability. 2018. p. 141–70.
191. Binder JB, Raines RT. Fermentable sugars by chemical hydrolysis of biomass. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2010 Mar 9 [cited 2022 Nov 17];107(10):4516–21. Available from: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.0912073107>
192. Dharmaraja J, Shobana S, Arvindnarayan S, Francis RR, Jeyakumar RB, Saratale RG, et al. Lignocellulosic biomass conversion via greener pretreatment methods towards biorefinery applications. Bioresour Technol [Internet]. 2023 Feb 17 [cited 2022 Nov 18];369:128328. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852422016613>

193. Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2014 Jan 1 [cited 2021 Apr 20];42(D1):D490–5. Available from: <http://www.cazy.org>
194. Koike S, Kobayashi Y. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 2006 Jan 9 [cited 2021 Jun 24];204(2):361–6. Available from: <https://academic.oup.com/femsle/article/204/2/361/473247>
195. Zeltins A, Schrempf H. Specific interaction of the *Streptomyces* chitin-binding protein CHB1 with α -chitin The role of individual tryptophan residues. *Eur J Biochem*. 1997;246(2):557–64.
196. Ye X, Zhu Z, Zhang C, Zhang Y-HHP. Fusion of a family 9 cellulose-binding module improves catalytic potential of *Clostridium thermocellum* cellodextrin phosphorylase on insoluble cellulose. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2011;92(3):551–60. Available from: <http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/>;
197. Nagy T, Simpson P, Williamson MP, Hazlewood GP, Gilbert HJ, Orosz L. All three surface tryptophans in Type IIa cellulose binding domains play a pivotal role in binding both soluble and insoluble ligands. *FEBS Lett*. 1998;429(3):312–6.
198. Duan CJ, Huang MY, Pang H, Zhao J, Wu CX, Feng JX. Characterization of a novel theme C glycoside hydrolase family 9 cellulase and its CBM-chimeric enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2017 Jul 27 [cited 2022 Jul 8];101(14):5723–37. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-017-8320-7>
199. Wang W, Archbold T, Lam JS, Kimber MS, Fan MZ. A processive endoglucanase with multi-substrate specificity is characterized from porcine gut microbiota. *Sci Rep* [Internet]. 2019 Sep 20 [cited 2022 Jan 31];9(1):1–13. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-50050-1>
200. Watson BJ, Zhang H, Longmire AG, Young HM, Hutcheson SW. Processive endoglucanases mediate degradation of cellulose by *Saccharophagus degradans*. *J Bacteriol*. 2009 Sep;191(18):5697–705.
201. Zheng F, Ding S. Processivity and enzymatic mode of a glycoside hydrolase family 5 endoglucanase from *Volvariella volvacea*. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2013 Feb [cited 2022 Feb 8];79(3):989–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23204424/>
202. Wu B, Zheng S, Pedroso MM, Guddat LW, Chang S, He B, et al. Processivity and

- enzymatic mechanism of a multifunctional family 5 endoglucanase from *Bacillus subtilis* BS-5 with potential applications in the saccharification of cellulosic substrates. *Biotechnol Biofuels* [Internet]. 2018 Jan 29 [cited 2022 Jan 31];11(1). Available from: [/pmc/articles/PMC5787917/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31111111/)
203. Ghatge SS, Telke AA, Kang SH, Arulalapperumal V, Lee KW, Govindwar SP, et al. Characterization of modular bifunctional processive endoglucanase Cel5 from *Hahella chejuensis* KCTC 2396. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2014 [cited 2022 Jan 31];98(10):4421–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24343767/>
204. Chen M, Bu L, Alahuhta M, Brunecky R, Xu Q, Lunin V V, et al. Strategies to reduce end-product inhibition in family 48 glycoside hydrolases. *Proteins Struct Funct Bioinforma*. 2016;84(3):295–304.
205. Kruus K, Andreacchi A, Wang WK, Wu JHD. Product inhibition of the recombinant CelS, an exoglucanase component of the *Clostridium thermocellum* cellulosome. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1995 Dec;44(3–4):399–404.
206. Irwin DC, Zhang S, Wilson DB. Cloning, expression and characterization of a family 48 exocellulase, Cel48A, from *Thermobifida fusca*. *Eur J Biochem* [Internet]. 2000 [cited 2022 May 30];267(16):4988–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10931180/>
207. Tokin R, Ipsen JØ, Westh P, Johansen KS. The synergy between LPMOs and cellulases in enzymatic saccharification of cellulose is both enzyme- and substrate-dependent. *Biotechnol Lett* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2021 Apr 16];42(10):1975–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32458293/>
208. Andersen N, Johansen KS, Michelsen M, Stenby EH, Krogh KBRM, Olsson L. Hydrolysis of cellulose using mono-component enzymes shows synergy during hydrolysis of phosphoric acid swollen cellulose (PASC), but competition on Avicel. *Enzyme Microb Technol*. 2008;42(4):362–70.
209. Watson DL, Wilson DB, Walker LP. Synergism in binary mixtures of *Thermobifida fusca* cellulases Cel6b, Cel9a, and Cel5a on BMCC and Avicel. *Appl Biochem Biotechnol - Part A Enzym Eng Biotechnol* [Internet]. 2002 [cited 2022 Jul 18];101(2):97–111. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1385/ABAB:101:2:097>
210. Kyriacou A, Neufeld RJ, MacKenzie CR. Reversibility and competition in the adsorption of *Trichoderma reesei* cellulase components. *Biotechnol Bioeng*. 1989;33(5):631–7.
211. Irwin DC, Spezio M, Walker LP, Wilson DB. Activity studies of eight purified cellulases:

- Specificity, synergism, and binding domain effects. *Biotechnol Bioeng* [Internet]. 1993 Oct [cited 2021 Apr 16];42(8):1002–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18613149/>
212. Nakamura M, Nagamine T, Takenaka A, Aminov RI, Ogata K, Tajima K, et al. Molecular cloning, nucleotide sequence and characteristics of a xylanase gene (*xynA*) from *Ruminococcus albus* 7. *Anim Sci J*. 2002 Oct;73(5):347–52.
213. Julien C, Marden JP, Bonnefont C, Moncoulon R, Auclair E, Monteils V, et al. Effects of varying proportions of concentrates on ruminal-reducing power and bacterial community structure in dry dairy cows fed hay-based diets. *Animal*. 2010 May;4(10):1641–6.
214. Julien C, Marden J-P, Moncoulon, Bayourthe C. Redox potential measurement : A new way to explore ruminal metabolism. (93)2010; ADSA/ASAS Jt Annu Meet Denver, Color USA, 2010-07-11-2010-07-15., 2010;
215. Aurilia V, Martin JC, Scott KP, Mercer DK, Johnston MEA, Flint HJ. Organisation and variable incidence of genes concerned with the utilization of xylans in the rumen cellulolytic bacterium *Ruminococcus flavefaciens*. *Anaerobe*. 2000;6(6):333–40.
216. Kostylev M, Wilson D. Synergistic interactions in cellulose hydrolysis. *Biofuels* [Internet]. 2012 Jan 9 [cited 2022 Jul 18];3(1):61–70. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4155/bfs.11.150>
217. Meyer AS, Rosgaard L, Sørensen HR. The minimal enzyme cocktail concept for biomass processing. *J Cereal Sci* [Internet]. 2009 Nov [cited 2021 Apr 16];50(3):337–44. Available from: <https://orbit.dtu.dk/en/publications/the-minimal-enzyme-cocktail-concept-for-biomass-processing>
218. Inoue H, Decker SR, Taylor LE, Yano S, Sawayama S. Identification and characterization of core cellulolytic enzymes from *Talaromyces cellulolyticus* (formerly *Acremonium cellulolyticus*) critical for hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Biotechnol Biofuels* [Internet]. 2014 Oct 9 [cited 2021 Apr 12];7(1):151. Available from: <http://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-014-0151-5>
219. Liu Z, Inokuma K, Ho SH, Haan R Den, Hasunuma T, Van Zyl WH, et al. Combined cell-surface display- and secretion-based strategies for production of cellulosic ethanol with *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels* [Internet]. 2015 Sep 26 [cited 2021 Apr 12];8(1):162. Available from: <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/8/1/162>
220. Hidaka M, Kitaoka M, Hayashi K, Wakagi T, Shoun H, Fushinobu S. Structural dissection of the reaction mechanism of cellobiose phosphorylase. *Biochem J* [Internet]. 2006 Aug

- 15;398(1):37–43. Available from: <https://portlandpress.com/biochemj/article/398/1/37/41547/Structural-dissection-of-the-reaction-mechanism-of>
221. Kuhadomlarp S, Stevenson CEM, Lawson DM, Field RA. The structure of a GH149 β -(1 \rightarrow 3) glucan phosphorylase reveals a new surface oligosaccharide binding site and additional domains that are absent in the disaccharide-specific GH94 glucose- β -(1 \rightarrow 3)-glucose (laminaribiose) phosphorylase. *Proteins Struct Funct Bioinforma* [Internet]. 2019;87(10):885–92. Available from: <http://skuld.bmsc>.
222. Nakajima M, Tanaka N, Furukawa N, Nihira T, Kodutsumi Y, Takahashi Y, et al. Mechanistic insight into the substrate specificity of β -1,2-oligoglucan phosphorylase from *Lachnoclostridium phytofermentans*. *Sci Rep* [Internet]. 2017 May 15;7(1):42671. Available from: www.nature.com/scientificreports
223. De Groeve MRM, Remmery L, Van Hoorebeke A, Stout J, Desmet T, Savvides SN, et al. Construction of cellobiose phosphorylase variants with broadened acceptor specificity towards anomericly substituted glucosides. *Biotechnol Bioeng* [Internet]. 2010 Oct 15 [cited 2021 Mar 19];107(3):413–20. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.22818>
224. Kim Y-K, Kitaoka M, Krishnareddy M, Mori Y, Hayashi K. Kinetic studies of a recombinant Cellobiose Phosphorylase (CBP) of the *Clostridium thermocellum* YM4 strain expressed in *Escherichia coli*. *J Biochem* [Internet]. 2002 Aug 1;132(2):197–203. Available from: <https://academic.oup.com/jb/article-lookup/doi/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003210>
225. Krishnareddy M, Kim Y-K, Kitaoka M, Mori Y, Hayashi K. Cellodextrin Phosphorylase from *Clostridium thermocellum* YM4 strain expressed in *Escherichia coli*. *J Appl Glycosci* [Internet]. 2002;49(1):1–8. Available from: http://www.jstage.jst.go.jp/article/jag1999/49/1/49_1_1/_article
226. Reichenbecher M, Lottspeich F, Bronnenmeier K. Purification and properties of a Cellobiose Phosphorylase (CepA) and a Cellodextrin Phosphorylase (CepB) from the cellulolytic thermophile *Clostridium Stercorarium*. *Eur J Biochem* [Internet]. 1997 Jul;247(1):262–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1432-1033.1997.00262.x>
227. Hidaka M, Nishimoto M, Kitaoka M, Wakagi T, Shoun H, Fushinobu S. The crystal structure of Galacto-N-biose/Lacto-N-biose I Phosphorylase. *J Biol Chem* [Internet]. 2009 Mar 13 [cited 2022 Jul 7];284(11):7273–83. Available from:

- <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820326107>
228. Reyes-Ortiz V, Heins RA, Cheng G, Kim EY, Vernon BC, Elandt RB, et al. Addition of a carbohydrate-binding module enhances cellulase penetration into cellulose substrates. *Biotechnol Biofuels* [Internet]. 2013 Jul 3 [cited 2022 Jul 8];6(1):1–13. Available from: <https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/1754-6834-6-93>
 229. Thongekkaew J, Ikeda H, Masaki K, Iefuji H. Fusion of cellulose binding domain from *Trichoderma reesei* CBHI to *Cryptococcus* sp. S-2 cellulase enhances its binding affinity and its cellulolytic activity to insoluble cellulosic substrates. *Enzyme Microb Technol*. 2013 Apr 10;52(4–5):241–6.
 230. Wang Y, Tang R, Tao J, Wang X, Zheng B, Feng Y. Chimeric cellulase matrix for investigating intramolecular synergism between non-hydrolytic disruptive functions of carbohydrate-binding modules and catalytic hydrolysis. *J Biol Chem*. 2012 Aug 24;287(35):29568–78.
 231. Maharjan A, Alkotaini B, Kim BS. Fusion of carbohydrate binding modules to bifunctional cellulase to enhance binding affinity and cellulolytic activity. *Biotechnol Bioprocess Eng* [Internet]. 2018 Feb 16;23(1):79–85. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12257-018-0011-4>
 232. Duan CJ, Liu JL, Wu X, Tang JL, Feng JX. Novel carbohydrate-binding module identified in a ruminal metagenomic endoglucanase. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2010 Jul [cited 2022 Jul 8];76(14):4867–70. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.00011-10>
 233. Zhao J, Shi P, Huang H, Li Z, Yuan T, Yang P, et al. A novel thermoacidophilic and thermostable endo- β -1,4-glucanase from *Phialophora* sp. G5: Its thermostability influenced by a distinct β -sheet and the carbohydrate-binding module. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2012;95(4):947–55. Available from: <http://www.cazy.org>
 234. Sybesma W, Kort R, Lee Y-K. Locally sourced probiotics, the next opportunity for developing countries? *Trends Biotechnol* [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2021 Mar 19];33(4):197–200. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25812840/>
 235. Pokusaeva K, O’Connell-Motherway M, Zomer A, MacSharry J, Fitzgerald GF, van Sinderen D. Cellodextrin utilization by *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2011 Mar [cited 2022 Sep 21];77(5):1681–90. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.01786-10>
 236. Zhong C, Ukowitz C, Domig KJ, Nidetzky B. Short-Chain Cello-oligosaccharides:

- Intensification and scale-up of their enzymatic production and selective growth promotion among probiotic bacteria. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2020 Aug 12;68(32):8557–67. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.0c02660>
237. Zhu Z, Kin Tam T, Sun F, You C, Percival Zhang YH. A high-energy-density sugar biobattery based on a synthetic enzymatic pathway. *Nat Commun* [Internet]. 2014 Jan 21 [cited 2022 Sep 23];5(1):1–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/ncomms4026>