

Tesis Doctoral

# Prospección y caracterización de bacterias celulolíticas y hemicelulolíticas

Ghio, Silvina

2018-03-08

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Ghio, Silvina. (2018-03-08). Prospección y caracterización de bacterias celulolíticas y hemicelulolíticas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Ghio, Silvina. "Prospección y caracterización de bacterias celulolíticas y hemicelulolíticas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2018-03-08.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica

# **Prospección y caracterización de bacterias celulolíticas y hemicelulolíticas**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la  
Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

**Silvina Ghio**

Directores de tesis: Dra. Eleonora Campos.

Dr. Daniel H. Grasso.

Consejera de estudios: Dra. Sandra M. Ruzal.

Lugar de trabajo: Instituto de Suelos e Instituto de Biotecnología.  
CNIA-INTA.

Buenos Aires, 8 de Marzo de 2018.



## **Agradecimientos**

A mi familia, los que están lejos y los que están más cerca, por su infinito amor y apoyo incondicional.

A Eleo, por ser una excelente directora de este trabajo y fundamentalmente un ser humano excepcional, siempre dispuesta a discutir ideas y propiciar un ambiente de trabajo agradable y ayudarme en mis primeros pasos en el ámbito científico.

A Daniel, por confiar desde un principio en mí y apoyarme siempre en las decisiones para mejorar mi formación.

A mis compañeros y amigos del Instituto de Suelos y del Instituto de Biotecnología de INTA, así como también a los investigadores y autoridades de ambos, por su afecto y por estar siempre dispuestos a compartir ideas nuevas y sugerencias que mejoran el trabajo diario. En especial a Flor, Emi, Facu, Ana, Marce y Pao. Y a Orne por haber leído y corregido exhaustivamente el manuscrito final.

A la Dra. Sandra Ruzal, por su apoyo como Consejera de estudios en mi formación doctoral y por su gran amabilidad y calidez.

A la Dra. Nancy Lopez, Dr. Marcelo Berreta y Dr. Marcelo Soria, excelentes docentes e investigadores, por haber aceptado formar parte del cuerpo de jurados de esta tesis.

A Rubén Marrero por contribuir con su experiencia en el modelado molecular de proteínas, a la Dra. María Cerón por su asistencia en los ensayos en anaerobiosis y a la Dra. Laura Klepp por su apoyo con la metodología de geles bidimensionales.

Al INTA por otorgarme la beca de formación para desarrollar mi trabajo de tesis y financiar los cursos y congresos a los que asistí.

A la Fac. de Cs. Exactas de la UBA, por su excelente oferta académica que posibilitó una excepcional formación de posgrado.

<b>Índice General</b>	<b>I</b>
<b>Índice de Tablas y Figuras</b>	<b>V</b>
<b>Abreviaturas y unidades de medida</b>	<b>VIII</b>
<b>Resumen</b>	<b>IX</b>
<b><i>Abstract</i></b>	<b>XI</b>
<b>Publicaciones derivadas de este trabajo de Tesis</b>	<b>XIII</b>
<b>Financiamiento</b>	<b>XIV</b>

# Índice General

## Introducción

<b>I. Biomasa lignocelulósica.....</b>	<b>1</b>
I.1 Fuentes de biomasa lignocelulósica .....	1
I.2 Estructura molecular de la pared celular vegetal .....	3
I.2.1 Celulosa .....	4
I.2.2 Hemicelulosa.....	6
I.2.3 Lignina.....	7
I.2.4 Pectina .....	8
<b>II. Enzimas activas sobre biomasa .....</b>	<b>9</b>
II.1 Clasificación y características generales .....	9
II.1.1 Celulasas .....	10
II.1.2 Hemicelulasas .....	11
II.1.3 Lacasas y peroxidasas.....	13
<b>III. Microorganismos celulolíticos .....</b>	<b>13</b>
III.1 Diversidad filogenética.....	13
III.2 Mecanismos microbianos de bioconversión de biomasa .....	16
III.3 Hábitats naturales .....	17
<b>IV. Aplicaciones industriales de enzimas celulolíticas .....</b>	<b>19</b>
<b>Hipótesis y Objetivos .....</b>	<b>23</b>
<b>Materiales y métodos</b>	
<b>I.Muestras de suelo .....</b>	<b>25</b>
<b>II.Soluciones y medios de cultivo .....</b>	<b>25</b>
<b>III. Métodos microbiológicos .....</b>	<b>27</b>
III.1 Obtención de consorcios celulolíticos de suelo .....	27
III.2 Medición del crecimiento bacteriano.....	27
III.3 Tinción de Rojo Congo .....	27
III.4 Cálculo de la capacidad hidrolítica.....	27

III.5 Obtención de aislamientos bacterianos puros .....	28
III.6 Microscopía óptica y electrónica.....	28
III.7 Pruebas bioquímicas .....	28
<b>IV. Métodos moleculares .....</b>	<b>29</b>
IV.1 Extracción de ADN genómico.....	29
IV.2 Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	29
IV.3 Preparación de células de <i>E. coli</i> competentes químicas.....	30
IV.4 Clonado de genes y secuenciación.....	31
IV.5 Minipreparación de ADN plasmídico .....	31
IV.6 Expresión y purificación de proteínas recombinantes .....	31
IV.7 Electroforesis en geles de agarosa, poliacrilamida y <i>Western blot</i> .....	32
IV.8 Electroforesis bidimensional.....	32
IV.9 Espectrometría de masas.....	32
IV.10 Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) .....	33
IV.11 Polimorfismo de longitud de los fragmentos terminales de restricción (T-RFLP) .....	34
<b>V. Métodos enzimáticos.....</b>	<b>34</b>
V.1 Obtención de extractos enzimáticos.....	34
V.2 Cuantificación de proteínas totales.....	35
V.3 Actividad endoglucanasa, xilanasas, y exoglucanasa.....	35
V.4 Actividad FPasa .....	35
V.5 Cuantificación de azúcares reductores.....	36
V.6 Actividad $\beta$ -glucosidasa, $\beta$ -xilosidasa, arabinofuranosidasa y celobiosidasa .....	36
V.7 Zimografía .....	36
V.8 Curvas de pH, temperatura y termoestabilidad .....	37
V.9 Cinética enzimática .....	37
V.10 Hidrólisis de biomasa lignocelulósica .....	37

V.11 Cromatografía en capa delgada (TLC) .....	38
V.12 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) .....	38
<b>VI.Métodos bioinformáticos .....</b>	<b>38</b>
VI.1 Análisis filogenético .....	38
VI.2 Anotación funcional del genoma de <i>Paenibacillus</i> sp. A59 .....	39
VI.3 Modelado molecular de endoxilanasas .....	40
VI.4 Análisis estadístico .....	40
<b>Resultados</b>	
<b>Parte I. Bioprospección de bacterias celulolíticas de suelos forestales como fuente de nuevas enzimas</b>	
I. 1 Aislamiento e identificación de bacterias celulolíticas .....	43
I. 2 Rol de los integrantes del consorcio CB1-2 en la actividad enzimática ....	50
<b>Parte II. Caracterización fisiológica, bioquímica, genómica y proteómica de <i>Paenibacillus</i> sp. A59 y el posible rol de las enzimas (hemi)celulolíticas secretadas</b>	
II.1 Clasificación filogenética de <i>Paenibacillus</i> sp. A59 .....	58
II.2 Optimización de la producción de enzimas (hemi)celulolíticas del extracto bacteriano .....	64
II.3 Secuenciación completa del genoma de <i>Paenibacillus</i> sp. A59, anotación funcional e identificación de enzimas activas sobre carbohidratos .....	69
II.4 Identificación de proteínas del secretoma bacteriano involucradas en la hidrólisis de sustratos hemicelulósicos .....	80
<b>Parte III. Endoxilanasas GH10XynA y GH11XynB de <i>Paenibacillus</i> sp. A59: estudios bioquímicos y aplicaciones sobre biomasa lignocelulósica</b>	
III.1 Análisis bioinformático de GH10XynA y GH11XynB, filogenia y modelado molecular .....	87
III.2 Expresión recombinante y caracterización bioquímica de las endoxilanasas GH10XynA y GH11XynB .....	92
III.3 Mecanismo de hidrólisis de xilano de las endoxilanasas rGH10XynA y rGH11XynB .....	96

**Parte IV. Aplicación de rGH10XynA y rGH11XynB en la bioconversión de biomasa**

IV.1 Hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica pre-tratada .....	102
IV.2 Utilización de extractos recombinantes sin purificar en la hidrólisis de biomasa lignocelulósica pre-tratada .....	105
<b>Discusión .....</b>	<b>109</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>121</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>123</b>
<b>Anexo .....</b>	<b>140</b>

## Índice de Tablas y Figuras

<b>Figura I1.</b> Fuentes principales de biomasa lignocelulósica.....	1
<b>Tabla I1.</b> Composición porcentual de diferentes tipos de biomasa lignocelulósica.....	3
<b>Figura I2.</b> Estructura de la pared celular vegetal .....	4
<b>Figura I3.</b> Composición de las fibras de celulosa .....	5
<b>Figura I4.</b> Tipos principales de hemicelulosas .....	7
<b>Figura I5.</b> Estructura molecular de la lignina.....	8
<b>Figura I6.</b> Degradación enzimática de la celulosa .....	11
<b>Figura I7.</b> Sitios de ataque de enzimas xilanolíticas .....	12
<b>Figura I8.</b> Distribución de degradadores de lignocelulosa en el Árbol de la Vida .....	15
<b>Figura I9.</b> Representación esquemática de los mecanismos de hidrólisis de celulosa .....	17
<b>Figura I10.</b> Etapas de la producción de bioetanol de segunda generación .....	21
<b>Tabla M1.</b> Soluciones, buffers y medios de cultivo .....	25
<b>Tabla M2.</b> Cebadores utilizados en reacciones de PCR.....	30
<b>Figura R1.</b> Área de toma de muestra .....	43
<b>Tabla R1.</b> Caracterización fisicoquímica de las muestras de suelo .....	43
<b>Figura R2.</b> Cultivo de bacterias celulolíticas.....	45
<b>Tabla R2.</b> Crecimiento y capacidad hidrolítica de los aislamientos bacterianos en diferentes sustratos (hemi) celulósicos .....	45
<b>Figura R3.</b> Actividad celulolítica de CB1-2 y VG-4 .....	46
<b>Tabla R3.</b> Identificación, morfología y tinción de Gram de bacterias celulolíticas de suelos forestales de Cerro Bayo y Valle Grande.....	48
<b>Figura R4.</b> Análisis filogenético de secuencias 16S rRNA de bacterias celulolíticas	49
<b>Figura R5.</b> Actividad del consorcio CB1-2 en diferentes condiciones de cultivo.....	50
<b>Figura R6.</b> Abundancia relativa de los integrantes del consorcio CB1-2 .....	51
<b>Tabla R4.</b> Crecimiento e identificación de los integrantes del consorcio CB1-2 .....	52
<b>Figura R7.</b> 16S-DGGE del consorcio CB1-2 e integrantes del mismo.....	53
<b>Figura R8.</b> Actividad de <i>Paenibacillus</i> sp. A59 en base al gen 16S rRNA.....	55
<b>Figura R9.</b> Actividad comparada entre CB1-2 y <i>Paenibacillus</i> sp. A59 .....	56
<b>Figura R10.</b> Análisis filogenético de <i>Paenibacillus</i> sp. A59 .....	58
<b>Figura R11.</b> Microscopía de células de <i>Paenibacillus</i> sp. A59 .....	59
<b>Tabla R5.</b> Pruebas bioquímicas y fisiológicas de <i>Paenibacillus</i> sp. A59.....	61
<b>Figura R12.</b> Actividad hidrolítica de <i>Paenibacillus</i> sp. A59 sobre diferentes sustratos .....	62

<b>Figura R13.</b> Microscopía electrónica de barrido de <i>Paenibacillus</i> sp. A59 sobre diferentes sustratos celulósicos.....	<b>63</b>
<b>Figura R14.</b> Optimización de la actividad enzimática de <i>Paenibacillus</i> sp. A59 .....	<b>64</b>
<b>Figura R15.</b> Actividad xilanasa del extracto enzimático de <i>Paenibacillus</i> sp. A59....	<b>66</b>
<b>Figura R16.</b> Productos de hidrólisis de xilano.....	<b>67</b>
<b>Figura R17.</b> Productos de hidrólisis de biomasa lignocelulósica .....	<b>68</b>
<b>Figura R18.</b> Análisis de calidad de lecturas <i>forward</i> del genoma secuenciado de <i>Paenibacillus</i> sp. A59 .....	<b>69</b>
<b>Tabla R6.</b> Características principales del genoma de <i>Paenibacillus</i> sp. A59 por anotación en RAST y en NCBI .....	<b>70</b>
<b>Figura R19.</b> Agrupación en sub-sistemas de las proteínas de <i>Paenibacillus</i> sp. A59 anotadas mediante la plataforma RAST.....	<b>71</b>
<b>Figura R20.</b> Vía de utilización de xilósidos de <i>Paenibacillus</i> sp. A59.....	<b>72</b>
<b>Figura R21.</b> Análisis filogenético de <i>Paenibacillus</i> sp. A59 en base al gen <i>gyrB</i> .....	<b>73</b>
<b>Figura R22.</b> Distribución de dominios CAZy identificados en las proteínas predichas de <i>Paenibacillus</i> sp. A59 .....	<b>74</b>
<b>Tabla R7.</b> Predicción de CAZymas de <i>Paenibacillus</i> sp. A59, pertenecientes a la familia de glicosil hidrolasas (GHs) involucradas en la bioconversión de celulosa, xilano, mananos, almidón y quitina .....	<b>76</b>
<b>Figura R23.</b> Actividad endoglucanasa y xilanasa del secretoma de <i>Paenibacillus</i> sp. A59 .....	<b>80</b>
<b>Figura R24.</b> Análisis de las proteínas del secretoma de <i>Paenibacillus</i> sp. A59 .....	<b>82</b>
<b>Tabla R8.</b> Identificación de las proteínas secretadas por <i>Paenibacillus</i> sp. A59 por cultivo en xilano, carboximetilcelulosa, residuo de cosecha de caña de azúcar mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF. ....	<b>83</b>
<b>Tabla R9.</b> Identificación de proteínas secretadas por <i>Paenibacillus</i> sp. A59 mediante cultivo residuo de cosecha de caña de azúcar, mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF. ....	<b>85</b>
<b>Figura R25</b> Organización génica de las secuencias codificantes para endoxilanasas de <i>Paenibacillus</i> sp. A59 .....	<b>88</b>
<b>Figura R26.</b> Análisis filogenético de las endoxilanasas de <i>Paenibacillus</i> sp. A59 ....	<b>89</b>
<b>Figura R27.</b> Modelado molecular de GH10XynA y GH11XynB .....	<b>91</b>
<b>Figura R28.</b> Análisis de las proteínas recombinantes purificadas rGH10XynA y rGH11XynB .....	<b>93</b>
<b>Tabla R10.</b> Especificidad de sustrato de rGH10XynA y rGH11XynB .....	<b>94</b>

<b>Figura R29.</b> Perfil de actividad xilanasa de rGH10XynA y rGH11XynB .....	<b>95</b>
<b>Figura R30.</b> Cinética enzimática de rGH10XynA y rGH11XynB .....	<b>96</b>
<b>Tabla R11.</b> Productos de hidrólisis de xilotetraosa, xilotriosa y xilobiosa por rGH10XynA y rGH11XynB .....	<b>97</b>
<b>Figura R31.</b> Patrón de hidrólisis de xilooligosacáridos de rGH10XynA y rGH11XynB .....	<b>98</b>
<b>Figura R32.</b> Patrón de hidrólisis de xilano de rGH10XynA y rGH11XynB .....	<b>99</b>
<b>Tabla R12.</b> Azúcares liberados de la hidrólisis de xilano por endoxilanasas rGH10XynA y rGH11XynB .....	<b>100</b>
<b>Figura R33.</b> Patrón de hidrólisis de paja de trigo extrusada de rGH10XynA y rGH11XynB .....	<b>102</b>
<b>Tabla R13.</b> Azúcares liberados de la hidrólisis de paja de trigo extrusada por endoxilanasas rGH10XynA y rGH11XynB .....	<b>103</b>
<b>Tabla R14.</b> Azúcares liberados de la hidrólisis de paja de cebada (PC) y mazorca de maíz dulce (MM) (extrusadas E) por rGH10XynA y rGH11XynB .....	<b>103</b>
<b>Figura R34.</b> Patrón de hidrólisis de rGH10XynA y rGH11XynB sobre diferentes biomosas pre-tratadas .....	<b>104</b>
<b>Figura R35.</b> Actividad de los lisados de bacterias recombinantes .....	<b>106</b>
<b>Tabla R15.</b> Azúcares liberados de la hidrólisis de paja de cebada extrusada por rGH10XynA y rGH11XynB (purificadas P y lisados L) .....	<b>107</b>
<b>Figura D.</b> Representación esquemática simplificada de las potenciales CAZymas de <i>Paenibacillus</i> sp. A59. ....	<b>119</b>
<b>Figura A1.</b> Vectores de expresión .....	<b>140</b>
<b>Tabla A1.</b> Condiciones de pre-tratamiento y composición de biomosas .....	<b>140</b>
<b>Tabla A2.</b> Resultados de la prueba API CH50 de <i>Paenibacillus</i> sp. A59 y comparación con cepas de referencia cercanas filogenéticamente .....	<b>141</b>
<b>Figura A2.</b> Alineamiento múltiple de GH10XynA de <i>Paenibacillus</i> sp. A59 .....	<b>143</b>
<b>Figura A3.</b> Alineamiento múltiple de GH11XynB de <i>Paenibacillus</i> sp. A59 .....	<b>144</b>
<b>Figura A4.</b> Controles de HPLC .....	<b>145</b>

## Abreviaturas y unidades de medida

**<:** menor

**>:** mayor

**% p/p:** porcentaje de peso en peso

**% p/v:** porcentaje de peso en volumen

**% v/v:** porcentaje de volumen en volumen

**°C:** grados centígrados

**µg:** microgramos

**µl:** microlitros

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ARN:** ácido ribonucleico

**ARNr:** ARN ribosomal

**ARNt:** ARN de transferencia

**BLAST:** Basic local alignment search tool

**CDS:** secuencia codificante

**CHAPS:**Cholamido propil dimetil amonio propanosulfonato

**dNTPs:** mezcla de los 4 desoxinucleótidos trifosfato (adenina, guanina, citosina y timina)

**DO:** densidad óptica

**DTT:** ditioneitol

**EDTA:** ácido etilendiamino tetra acético

**g:** gramos

**hs:** horas

**IPTG:**isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido

**kDa:** kilo Dalton

**l:** litro

**m/h:** relación carga masa

**M:** concentración molar

**Mb:** mega bases

**mg:** miligramos

**min:** minutos

**ml:** mililitros

**mM:** concentración milimolar

**MOPS:** Ácido morfolino propanosulfónico

**NCBI:** national centre for biotechnology information

**ng:** nanogramos

**nl:** nanolitros

**pb:** pares de bases

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**rpm:** revoluciones por minuto

**SDS:** dodecil sulfato de sodio

**SDS-PAGE:** electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS

**UFC:** unidades formadoras de colonia

**UI:** unidades internacionales de actividad enzimática

**X-gal:** 5-bromo-4-cloro3-indolil-β-D-galactósido

## Resumen

### Prospección y caracterización de bacterias celulolíticas y hemicelulolíticas

La prospección de bacterias con capacidad de degradar lignocelulosa permite la identificación de nuevas enzimas con potencial aplicación en numerosos procesos industriales. En este trabajo el objetivo fue la obtención de enzimas con aplicación potencial en la bioconversión de lignocelulosa, mediante la prospección de bacterias celulolíticas de suelos forestales nativos y estudiar sus mecanismos de deconstrucción de biomasa. Se obtuvieron consorcios bacterianos celulolíticos de dos localidades de Argentina (Cerro Bayo, Neuquén y Valle Grande, Mendoza). Los consorcios fueron caracterizados en cuanto a su actividad enzimática, siendo el consorcio CB1-2 el que presentó mayor actividad celulolítica relativa. A partir del mismo se logró el aislamiento de todos sus integrantes y uno de ellos, al que se denominó *Paenibacillus* sp. A59, resultó el principal responsable de la actividad estudiada, mientras que los aislamientos pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* sp., *Stenotrophomonas* sp. y *Bacillus* sp. no presentaron actividad celulolítica detectable. Por técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS) se secuenció el genoma completo de *Paenibacillus* sp. A59 con una profundidad de 110 veces y se ensambló en 83 *contigs*. A partir del análisis del genoma con múltiples herramientas bioinformáticas, como las plataformas del NCBI, RAST y dbCAN, seguido de depuración manual, se identificaron 82 secuencias codificantes para potenciales proteínas activas sobre carbohidratos, incluyendo celulasas, xilanasas, mananasas, quitinasas y amilasas, entre otras. Además, se determinaron las condiciones óptimas para maximizar la actividad enzimática en el sobrenadante de cultivo, utilizando como fuente de carbono carboximetilcelulosa, xilano o residuo de cosecha de caña de azúcar, resultando predominante la actividad xilanasas en crecimiento con xilano. El estudio del secretoma en las diferentes condiciones de cultivo ensayadas, permitió identificar las proteínas responsables de dicha actividad y establecer un posible modelo para el sistema xilanolítico de esta bacteria. Entre las enzimas identificadas, dos endoxilanasas de las familias GH10 y GH11 involucradas en la deconstrucción de la hemicelulosa, fueron seleccionadas para ser expresadas de manera recombinante y caracterizar su actividad. Ambas enzimas se expresaron en el sistema de *E. coli*, de manera soluble y fueron purificadas a homogeneidad. Presentaron actividad óptima a temperaturas moderadas (entre 40 y 55°C) y a pHs

cercanos al neutro, si bien rGH11XynB presentó también alta actividad a pH alcalino. Tanto rGH10XynA como rGH11XynB mostraron actividad xilanolítica sobre xilanos comerciales y sobre la fracción hemicelulolítica de biomásas pre-tratadas (trigo, cebada y maíz). Sin embargo, la cinética enzimática y el perfil de los productos de hidrólisis generados mostraron diferencias, lo que podría determinar su utilización en una variedad de procesos. Este estudio comprende un análisis detallado del aislamiento *Paenibacillus* sp. A59 y de sus enzimas activas sobre carbohidratos, contribuyendo así en la comprensión de los mecanismos microbianos involucrados en la bioconversión de polisacáridos y estableciendo las bases para su aplicación industrial.

**Palabras clave:** *Paenibacillus* sp. A59, endoxilanasas, GH10, GH11, biomasa lignocelulósica, suelos forestales.

## **Abstract**

### **Prospection and characterization of cellulolytic and hemicellulolytic bacteria**

Prospection of hemicellulose degrading bacteria allows the identification of novel enzymes with potential application in numerous industrial processes. The objective of this work was the obtention of enzymes with potential application in bioconversion of lignocellulose, by prospection of cellulolytic bacteria from native forest soils, and the study of their mechanisms of biomass deconstruction. We obtained cellulolytic bacterial consortia from forest soils, from two areas of Argentina (Cerro Bayo, Neuquén and Valle Grande, Mendoza). Enzymatic activity of the consortia was characterized, resulting CB1-2 the one with the highest relative cellulolytic activity. We isolated all the consortium components and one of them, *Paenibacillus* sp. A59, was the main one responsible for the assayed activity, while the isolates belonging to *Pseudomonas* sp., *Stenotrophomonas* sp. and *Bacillus* sp. did not present cellulolytic activity. By next generation sequencing (NGS) techniques, *Paenibacillus* sp. A59 genome was fully sequenced, with a 110-fold coverage, and assembled in 83 contigs. By genome analysis using multiple bioinformatic tools, such as NCBI, RAST and dbCAN pipelines followed by manual editing, 82 coding sequences for potential carbohydrate active enzymes were identified, including cellulases, xylanases, mannanases, chitinases and amylases, among others. Also, optimal conditions for achieving the highest enzymatic activity in culture supernatants were determined, using carboxymethylcellulose, xylan or sugarcane straw as carbon sources, resulting xylanase the main activity, by growth in xylan. Secretome study under the different culture conditions assayed, allowed to identify the main proteins responsible for the activity and to establish a possible model of the xylanolytic system of this bacterium. Among the enzymes identified, two endoxylanases from GH10 and GH11 families, involved in hemicellulose deconstruction, were selected for recombinant expression and activity characterization. Both enzymes were expressed in *E. coli* system in the soluble fraction and purified to homogeneity. They presented optimal activity at moderate temperatures (between 40°C and 55°C) and at neutral pH, and rGH11XynB showed also high activity at alkaline pH. rGH10XynA and rGH11XynB had xylanolytic activity on commercial xylans and on the hemicellulolytic fraction of pre-treated biomasses (wheat, barley and maize). However, the enzyme kinetics and the hydrolysis products profiles showed differences, which could determine their

utilization in a variety of processes. This study comprises a detailed analysis of *Paenibacillus* sp. A59 isolate and their carbohydrate active enzymes, contributing to the understanding of microbial mechanisms involved in polysaccharides bioconversion and setting the basis for industrial application.

**Key words:** *Paenibacillus* sp. A59, endoxylanases, GH10, GH11, lignocellulosic biomass, forest soils.

## Publicaciones derivadas de este trabajo de Tesis

- Ghio S., Ontañón O., Piccinni F.E., Marrero Diaz de Villegas R., Talia P.M., Grasso D.H., Campos E. *Paenibacillus* sp. A59 GH10 and GH11 extracellular endoxylanases: application in biomass bioconversion. *Bioenergy Research* 2017 (DOI: 10.1007/s12155-017-9887-7).
- Ghio S., Insani M.E., Piccinni F.E., Talia P.M., Grasso D.H., Campos E. GH10 XynA is the main xylanase identified in the crude enzymatic extract of *Paenibacillus* sp. A59 when grown on xylan or lignocellulosic biomass. *Microb Research* 2016; 186:16-26.
- Ghio S., Martinez Cáceres A., Talia P., Grasso D., Campos E. Draft genome sequence of cellulolytic and xylanolytic *Paenibacillus* sp. A59, isolated from a decaying forest soil from Patagonia, Argentina. *Genome Announc.* Sep-Oct 2015; 3(5): e01233-15.
- Ghio S., Sabarís Di Lorenzo G., Lia V., Talia P., Cataldi A., Grasso D., Campos E. Isolation of *Paenibacillus* sp. and *Variovorax* sp. strains from decaying woods and characterization of their potential for cellulose deconstruction. *Int J Biochem Mol Biol* 2012; 3(4):352-364.

## **Financiamiento**

- Beca de Práctica Profesional INTA (2012-2014) a Mic. Silvina Ghio.
- Beca de Formación INTA (2014-2018) a Mic. Silvina Ghio.
- INTA 1130034 (2013-2019). Coordinador: Dr. Daniel Grasso.
- BABET-REAL5 (2016-2019). Coordinador: Dr. Daniel Grasso.
- PICT CABBIO 2016-4695 (2016-2018) IR: Dra. Eleonora Campos.
- PICT 2014-0791 (2015-2018) IR: Dra. Eleonora Campos.
- PIP 11220150100121CO (2016-2019): IR: Dra. Eleonora Campos.
- PICT 2011-2735 (2012-2016) IR: Dra. Eleonora Campos.

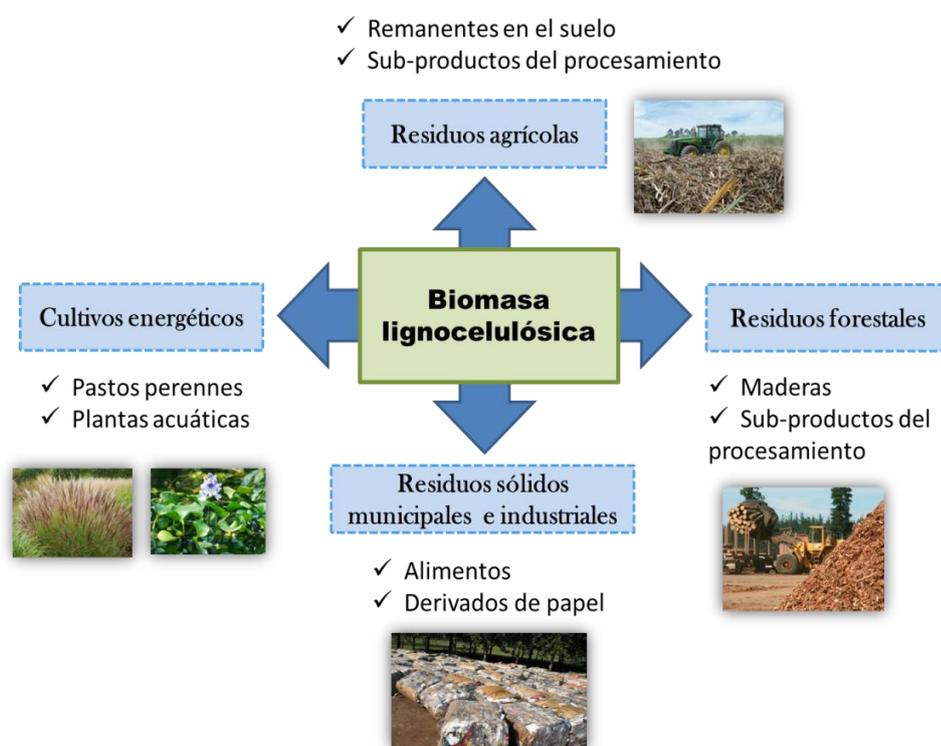
# Introducción

---

## I. Biomasa lignocelulósica

### I.1 Fuentes de biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica o biomasa vegetal cuenta con los beneficios de ser altamente renovable, económica y con amplia distribución geográfica. De hecho, al ser la fuente principal de materia orgánica renovable del mundo, en los últimos años emergió el concepto de biorefinería, que es la utilización de biomasa como materia prima en múltiples procesos de transformación (energía, biomateriales, etc.), en particular bioetanol de segunda generación. Las fuentes principales de biomasa lignocelulósica se clasifican en: cultivos energéticos, residuos forestales, residuos agroindustriales y la fracción orgánica de los residuos sólidos municipales e industriales (**Figura I1**).



**Figura I1. Fuentes principales de biomasa lignocelulósica** (Adaptado de Zabed y col., 2016)

Los cultivos energéticos son aquellos producidos expresamente para ser utilizados como biomasa con fines energéticos. Los pastos perennes más estudiados para este fin incluyen plantas con vías fotosintéticas del tipo C3, como hierba cinta (*Phalaris arundinacea*) y caña común (*Arundo donax*), y C4 como miscantus (*Miscanthus* spp.) y switchgrass o pasto varilla (*Panicum virgatum*). En comparación con los cultivos anuales, los pastos perennes presentan un alto contenido de celulosa y lignina, tienen menor requerimiento de nutrientes y generan menor perturbación del suelo. Además, los de tipo C4 poseen vías fotosintéticas más

eficientes que resultan en mayores niveles de producción de biomasa, principalmente en regiones sometidas a altas temperaturas (Lewandowsky y col., 2003). Dentro de las plantas acuáticas, se destaca el jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*), dado que es de crecimiento rápido, posee bajo contenido de lignina y es tolerante a fluctuaciones en las condiciones ambientales (Das y col., 2016). Por otro lado, los residuos agrícolas utilizados con fines energéticos se obtienen principalmente de cultivos como el maíz, trigo, arroz y caña de azúcar. Estos residuos incluyen el rastrojo de maíz (restos de tallos, chalas y mazorcas que quedan luego de la cosecha de los granos) y los tallos y hojas que permanecen en los suelos luego de la cosecha de caña de azúcar, trigo y arroz. Además, a partir del procesamiento de la caña de azúcar se obtiene el bagazo como sub-producto de la industria azucarera. Los residuos forestales incluyen principalmente materiales leñosos de la tala o la poda de maderas duras (*hardwoods*) como álamo, abedul, arce, sauce y roble y maderas blandas (*softwoods*) como pino, cedro, abeto, secuoya o ciprés. Otros residuos obtenidos del procesamiento de la madera son el aserrín, restos de cortezas, virutas de maderas y ramas de árboles en descomposición (Zabed y col. 2016). Los residuos sólidos municipales e industriales de utilidad son principalmente aquellos reciclables, con alto contenido de celulosa como diarios y cartón, y restos de cáscaras de frutas y verduras (Achinas y col., 2016).

La biomasa lignocelulósica se compone de tres polímeros mayoritarios: celulosa (30-35%), hemicelulosa (25-30%) y lignina (10-20%) y otros componentes en menor proporción como pectina, proteínas, pigmentos y cenizas. Las fibras de celulosa forman un esqueleto principal que se encuentra rodeado por polímeros de hemicelulosa y lignina, conformando una heteromatriz entrecruzada. La composición de la biomasa lignocelulósica es muy variable, dependiendo de la especie vegetal, de la parte de la planta y de la edad y estadio de crecimiento de la misma; por ejemplo las plantas de madera blanda tienen un mayor contenido de lignina que las maderas duras mientras que las gramíneas poseen mayor contenido de hemicelulosa (Bajpai 2014). La composición reportada de diversas biomásas y de los residuos lignocelulósicos más utilizados se detallan en la **Tabla 11**.

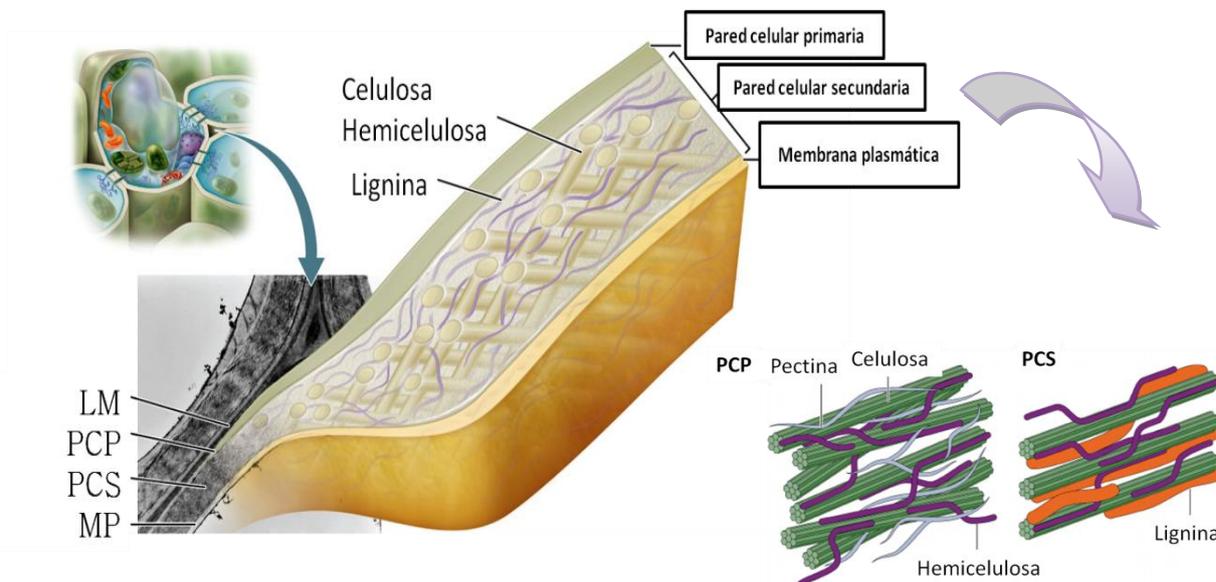
<b>Tabla I1: Composición porcentual de diferentes tipos de biomasa lignocelulósica</b>			
	<b>Celulosa (%)</b>	<b>Hemicelulosa (%)</b>	<b>Lignina (%)</b>
<b>Maderas duras (<i>hardwoods</i>)</b>	40-55	24-40	18-25
<b>Maderas blandas (<i>softwoods</i>)</b>	45-50	25-35	25-35
<b>Rastrojo de maíz</b>	38-40	28-30	7-21
<b>Bagazo de caña de azúcar</b>	32-48	19-24	23-32
<b>Paja de trigo</b>	30-39	39-50	15-17
<b>Paja de arroz</b>	39-42	20-32	13-14
<b>Paja de cebada</b>	37-38	26-37	16-19
<b><i>Switchgrass</i></b>	33-45	25-35	6-18
<b>Miscantus</b>	38-42	21-23	18-21
<b>Diarios</b>	40-55	25-40	18-30
<b>Residuos sólidos municipales</b>	33-49	9-16	10-14

Fuente: Sun y Cheng 2002; Saini y col., 2015; Tan y col., 2016.

## **I.2 Estructura molecular de la pared celular vegetal**

La pared celular vegetal, constituida por material fibroso inmerso en una matriz de polisacáridos complejos, tiene funciones esenciales en la planta dado que le otorga forma a los diferentes tipos de células vegetales, integrando los tejidos y órganos, y además tiene un rol relevante en la comunicación intercelular y en la respuesta planta-microorganismos, incluyendo la defensa frente a patógenos y la resistencia a la deshidratación (Keegstra y col., 2010). Dependiendo del tiempo de formación y de la composición química, la pared celular puede clasificarse en primaria (PCP), que rodea las células en activo crecimiento, o secundaria (PCS) que se forma como parte del proceso de maduración, luego del cese del crecimiento, entre la PCP y la membrana plasmática (Harris y Debolt, 2010). La PCP es una estructura delgada, flexible y altamente hidratada, cuyos componentes principales son, además de fibras de celulosa, los polisacáridos de hemicelulosa (principalmente xiloglucanos) y pectina, así como también proteínas (expansinas, endotransglicosilasas), glicoproteínas y iones. Las pectinas son importantes para garantizar la hidratación de la pared primaria, lo cual es indispensable para el crecimiento expansivo. En algunos grupos de células diferenciadas, como las encargadas del transporte de agua y nutrientes, cuando éstas detienen su crecimiento comienza la formación de la PCS cerca de la membrana plasmática. En ella, las pectinas y glicoproteínas son reemplazadas por lignina y diferentes tipos de hemicelulosa (xilanos y glucomanos) que a través de la formación de una red entrelazada con las fibras de celulosa, aportan rigidez a los tejidos para el crecimiento de la planta, aunque no es extensible y está poco hidratada. Las paredes de las células adyacentes se encuentran unidas a través de la laminilla

media, la cual es rica en sustancias pécticas (**Figura I2**) (Varner y Lin 1989; Cosgrove y Jarvis 2012).

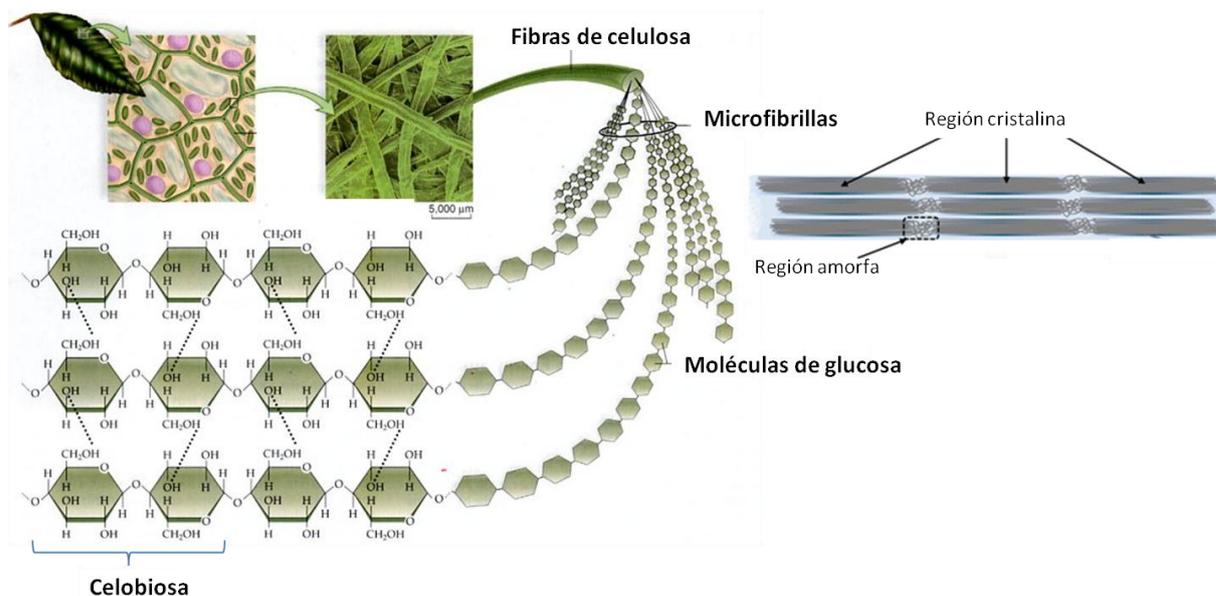


**Figura I2. Estructura de la pared celular vegetal.** Esquema general simplificado de los principales componentes de la pared celular vegetal, incluyendo los polímeros de celulosa, hemicelulosa y lignina. LM: laminilla media; PCP: pared celular primaria; PCS: pared celular secundaria; MP: membrana plasmática (Adaptado de Rytioja y col., 2014).

### I.2.1 Celulosa

La celulosa es el polímero más abundante del planeta. La estructura molecular primaria es un homopolisacárido formado por unidades repetitivas de D-anhidroglucopiranosas, unidas por enlaces de tipo  $\beta$ -1,4 glicosídicos, en forma de cadenas lineales. Los sucesivos residuos de D-anhidroglucopiranosas se encuentran rotados  $180^\circ$ , formando la mínima unidad repetitiva que es el dímero celobiosa. El grado de polimerización puede variar entre 500 a 15.000 unidades y las cadenas son polarizadas, es decir uno de los extremos es reductor y otro no reductor (Koyama y col., 1997). Las microfibrillas de celulosa se forman al ubicarse varias moléculas lineales de forma paralela entre sí, unidas inter e intramolecularmente por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waal's (Sorek y col., 2014). Varias microfibrillas se unen formando las fibras de celulosa, las cuales contienen algunas zonas organizadas de modo más regular o cristalino, mientras que otras zonas son más laxas o amorfas (**Figura I3**). El ángulo y la dirección de estas fibras es variable entre la PCP y la PCS, e incluso dentro de las diferentes regiones de la PCP, siguiendo un

orden más irregular en las capas externas y con una orientación perpendicular en las internas (Rytioja y col., 2014).

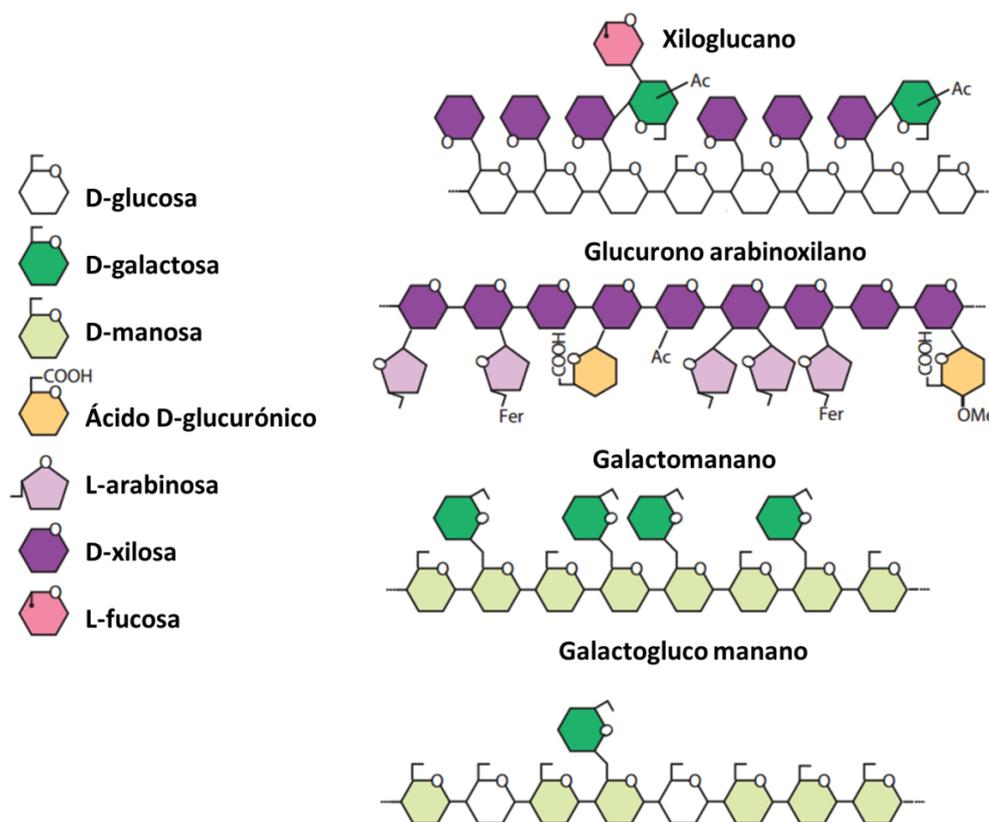


**Figura 13. Composición de las fibras de celulosa.** Estructura molecular de las fibras de celulosa que forman parte de la pared celular vegetal. Las cadenas lineales de glucosa se agrupan en microfibrillas, que originan las fibras de celulosa, con regiones amorfas y cristalinas.

En la naturaleza, la mayor parte de las fibras de celulosa existen en forma altamente cristalina. Sin embargo, existen sustratos comerciales que se preparan a partir de celulosa nativa, de acuerdo a fines específicos para estudios particulares. Por ejemplo, la carboximetilcelulosa (CMC) es un derivado soluble de la celulosa, generado por sustitución iónica con grupos carboximetilo. Por otro lado, el Solka Floc se prepara a partir de blanqueamiento de la pulpa de madera de abeto con dióxido de azufre, en un molino de bolas. El Avicel, comunmente llamado celulosa microcristalina o hidrocélulosa, se prepara a partir de la hidrólisis ácida parcial de fibras de pulpa de madera para eliminar gran parte de la fase soluble y posterior secado por *spray*. La celulosa bacteriana microcristalina (BCMC) se prepara a partir de celulosa bacteriana (producida por *Acetobacter xylium*) sometida a hidrólisis ácida parcial para remover la fracción amorfa de la celulosa. La celulosa de algodón se obtiene del algodón natural, luego de remover impurezas como ceras, pigmentos y pectinas. Además, el papel de filtro Whatman N°1 se produce a partir de fibras largas de la pulpa de algodón. Por otro lado, mediante tratamiento con ácido concentrado se puede lograr la conversión de celulosa cristalina a celulosa amorfa *Phosphoric Acid Swollen Cellulose* o PASC, por distensión de las fibras (Zhang y Lynd, 2004).

### I.2.2 Hemicelulosa

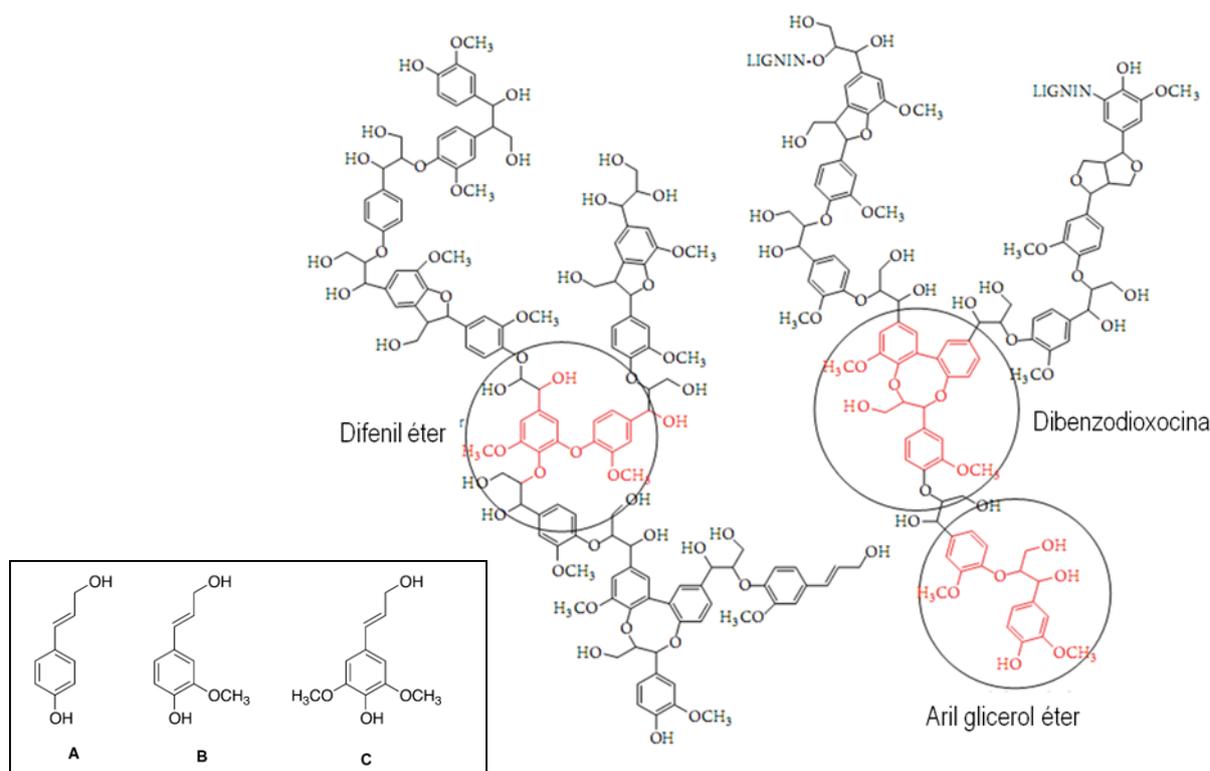
Es un polímero heterogéneo más corto que la celulosa (entre 50 y 200 unidades), formado por cadenas lineales de pentosas o hexosas, tales como glucosa, xilosa o manosa con ramificaciones de diversos tipos de azúcares. El esqueleto básico puede ser un homo o heteropolímero, con cadenas laterales cortas (Chen 2014). La hemicelulosa más abundante es el xilano, formado por una cadena lineal de unidades de D-xilopiranosas, unidas por enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,4. En algunas especies vegetales puede estar ramificado mediante uniones  $\alpha$ -1,2 con residuos glucuronosil o 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucuronosil, generando glucuronoxilanos (GX), más común en maderas duras. Por otro lado, en maderas blandas y cereales son más comunes las ramificaciones con unidades de arabinosa formando arabinoxilanos (AX) o bien glucurono arabinoxilanos (GAX) (Scheller y Ulvskov 2010). Además, muchos de los xilanos están acetilados en los residuos de xilosa (en general el 70% de los mismos están acetilados en maderas duras) o bien con ésteres de ácido ferúlico o ácido *p*-cumárico, unido a los residuos de arabinosa. El patrón de distribución de las cadenas laterales en los heteroxilanos influye en la solubilidad, la interacción con otros polímeros de pared celular y en la hidrólisis enzimática (Ebringerová y Heinze, 2000). Por otro lado, los xiloglucanos están constituidos por un esqueleto de unidades de D-glucopiranosas unidas por enlaces  $\beta$ -1,4. Casi el 75% de estos residuos tienen unido un  $\alpha$ -D-xilopiranosido en el C6 por enlaces  $\alpha$ -1,6. Los residuos de xilosa a su vez pueden unir otro residuo en el C2 como galactosa o galactosa unida a una fucosa (Pauly y col., 1999). Los mananos están formados por residuos de manosa unidos por enlaces  $\beta$ -1,4 y cuando una galactosa se une por enlace  $\alpha$ -1,6 se forman los galactomananos. Por otro lado, el esqueleto principal de los glucomananos son glucosas y manosas unidas por enlaces  $\beta$ -1,4, en una relación 1:3 y si tienen ramificaciones de galactosa se denominan galactoglucomananos (**Figura I4**).



**Figura 14. Tipos principales de hemicelulosas.** Esquema de los diferentes tipos de hemicelulosas presentes en la pared celular vegetal. Fer: esterificación con ácido ferúlico, Ac: acetilación, OMe: metilación (Scheller y Ulvskov, 2010).

### I.2.3 Lignina

La lignina es un co-polímero heterogéneo constituido por tres monómeros de fenilpropanoides (llamados monolignoles): *p*-cumaril alcohol, coniferil alcohol y sinapil alcohol, que varían en el grado de sustitución de los grupos metoxil en el anillo aromático. Durante el crecimiento de la planta, éstos monómeros son secretados hacia la nueva pared celular en formación y se intercalan dentro de la red de polisacáridos de celulosa-hemicelulosa (Pandey y Kim 2011). Las lacasas y peroxidasas de la planta generan radicales libres que intervienen en el proceso de polimerización de dichas unidades, originando una estructura no uniforme con diversos tipos de enlaces, tanto carbono-carbono como éter. Los enlaces  $\beta$ -O-4-aril glicerol éter son los más comunes e involucran el carbono  $\beta$  de una unidad con el hidroxilo fenólico de otra; además se forman otros enlaces como difenil éter y estructuras complejas que involucran tres unidades, llamadas dibenzodioxocinas (**Figura 15**) (Duval y Lawoko, 2014).



**Figura 15. Estructura molecular de la lignina.** Los monómeros estructurales de *p*-cumaril alcohol (A), coniferil alcohol (B) y sinapil alcohol (C) se encuentran recuadrados. Los principales enlaces se muestran en color rojo y rodeados por círculos (Wang y col., 2013).

Tanto el tipo de subunidades poliméricas como el contenido de lignina varían de una especie vegetal a otra: las gimnospermas como el pino tienen un contenido mayor de lignina que las maderas de álamo o de cereales (Sorek y col., 2014). Además, los cereales contienen los tres monómeros estructurales, mientras que las maderas blandas contienen principalmente coniferil alcohol y las duras tanto coniferil como sinapil alcohol (Upton y col., 2016).

### 1.2.4 Pectina

La pectina es un polímero heterogéneo soluble en agua, que se intercala en la matriz de celulosa-hemicelulosa de las células vegetales, principalmente en la pared celular primaria y en la laminilla media, favoreciendo la adhesión celular. Estos polímeros pueden a su vez quelar calcio y formar geles viscosos y elásticos (Sorek y col., 2014). Tiene un alto contenido de azúcares ácidos y acetilados, formados por un esqueleto de ácido galacturónico unido por enlaces  $\alpha$ -1,4 (homogalacturonanos) que puede tener ramificaciones de ramnosa (ramnogalacturonanos tipo II), xilosa (xilogalacturonanos) o apiofuranosa (apiogalacturonanos) (Caffall y Mohnen, 2009). En el caso de los ramnogalacturonanos tipo II, el esqueleto principal contiene un

disacárido formado por ácido galacturónico y ramnosa. Dado que la fracción péctica en la pared secundaria es casi inexistente, no es un polisacárido de relevancia en procesos de producción de biocombustibles, ya que no constituye una fuente principal de azúcares.

## II. Enzimas activas sobre biomasa

### II.1 Clasificación y características generales

La hidrólisis eficiente de la biomasa lignocelulósica está determinada principalmente por su composición química y por su estructura física. Tal como se mencionó anteriormente, la estructura compacta de la pared celular vegetal es fundamental para cumplir su rol de protección y garantizar la rigidez de los tejidos vegetales. Es por ello que, en aquellos procesos en los cuales la bioconversión de biomasa constituye un paso fundamental, la recalcitrancia de la misma es un factor limitante. Dicha recalcitrancia frente a la hidrólisis química o enzimática depende de varios factores naturales tales como: características de los tejidos epidérmicos de la planta (cutículas y ceras), la densidad de los haces vasculares, el grado de lignificación, la cantidad relativa de tejido esclerenquimático, la complejidad de la red de microfibrillas de celulosa y polímeros de matriz de la pared celular, el grado de polimerización, la presencia de inhibidores y la exclusión de las moléculas de agua, que afecta la actividad de las enzimas (Zhao y col., 2011; Alvarez y col., 2016).

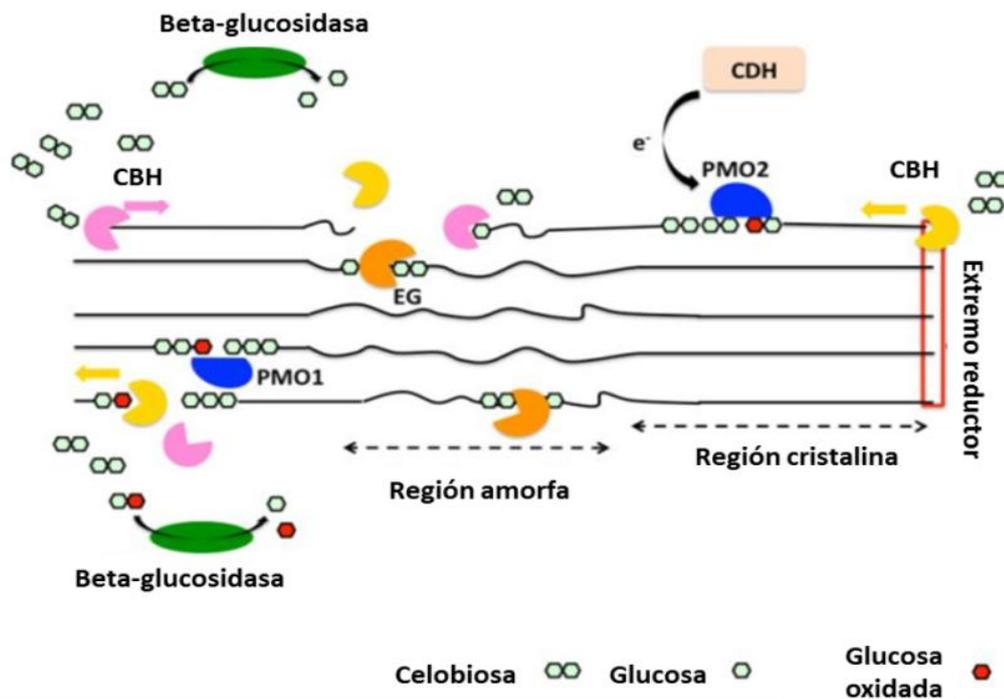
Debido a la complejidad estructural de la biomasa, existen numerosas enzimas que actúan en conjunto para lograr una bioconversión eficiente. Las enzimas activas sobre carbohidratos o CAZymas, se clasifican en diversas familias según su secuencia aminoacídica, basándose en la premisa de que la similitud en la secuencia refleja la conservación tanto de su estructura de plegamiento como de su mecanismo catalítico (Henrissat y Davies, 1997). Es así como aquellas enzimas que actúan degradando, modificando o generando enlaces glicosídicos se clasifican en: glicosil hidrolasas (GH), glicosil transferasas (GT), polisacárido liasas (PL), carbohidrato esterasas (CE) y enzimas con actividades auxiliares (AA) (Lombard y col., 2014). Por otro lado, muchas de las enzimas presentan una estructura modular, con módulos de reconocimiento de carbohidratos (CBMs, por las siglas en inglés, *carbohydrate binding modules*) que cumplen el rol fundamental de dirigir la acción de las enzimas (Boraston y col., 2004). La nomenclatura aceptada internacionalmente para identificar las funciones de las enzimas es el número EC (*Enzyme Commission*), basado en las reacciones químicas que catalizan. Es decir que dos

enzimas diferentes que catalizan la misma reacción, pueden tener asignado el mismo número EC, así como también una enzima puede tener asociado más de un número EC, si tiene más de una actividad bioquímica comprobada.

### II.1.1 Celulasas

Diferentes características de la molécula de celulosa influyen en la hidrólisis enzimática, tales como: el grado de polimerización, la cristalinidad, el área superficial y el tamaño de partícula. La hidrólisis de la celulosa requiere la acción combinada de al menos tres tipos de enzimas (GHs), capaces de hidrolizar los enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,4 entre las unidades de glucosa (**Figura I6**). Las endoglucanasas (endo-1,4- $\beta$ -D-glucanasas, EC 3.2.1.4) clivan al azar dichos enlaces en la cadena de celulosa, generando nuevos extremos reductores y no reductores. Se han descrito endoglucanasas, tanto bacterianas como fúngicas, pertenecientes a las familias de GHs 5, 6, 7, 9, 12, 45 y 74, siendo aquellas de la familia GH5 las más estudiadas. Las exoglucanasas (celulosa 1,4- $\beta$ -celobiosidasas EC 3.2.1.91), también llamadas celobiohidrolasas, actúan de un modo procesivo y liberan celobiosa desde los extremos reductores de las cadenas de celulosa, como es el caso de GH7 y GH48 o no reductores, como las GH6, (Wilson y Kostylev, 2012). Las  $\beta$ -glucosidasas (1,4- $\beta$ -glucosidasas EC 3.2.1.21) clivan celobiosa y celooligosacáridos liberados por la acción de las dos enzimas antes mencionadas, generando residuos de glucosa. Se agrupan principalmente en las familias GH1 y GH3 (Couturier y Berrin, 2013).

Además del mecanismo clásico de hidrólisis de celulosa, existen otras enzimas descritas recientemente involucradas en el clivaje oxidativo de éste polímero, las llamadas PMOs (*Polysaccharide monooxygenases*), previamente clasificadas como GH61 en hongos o CBM33 en bacterias (Beeson y col., 2015).



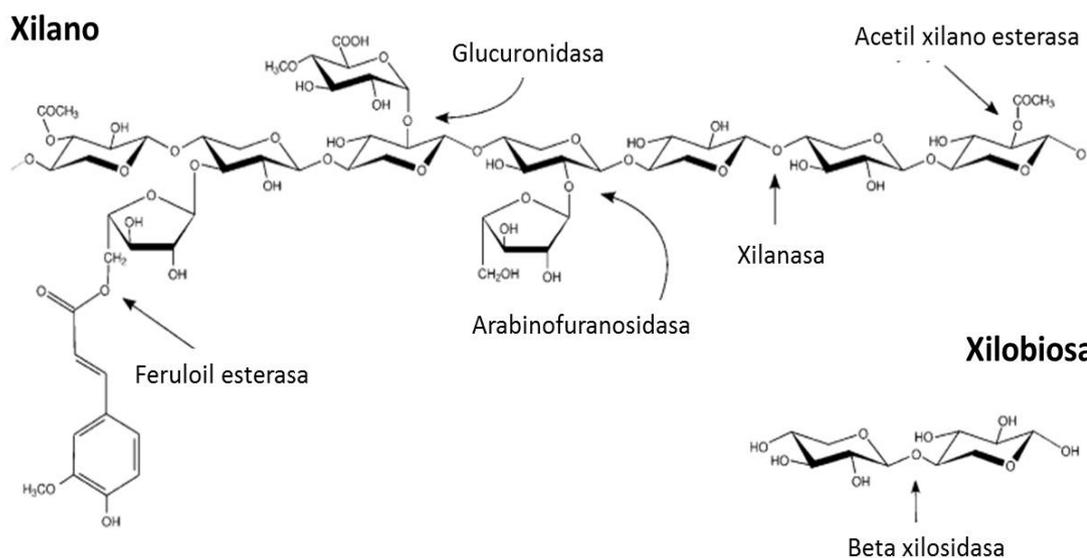
**Figura 16. Degradación enzimática de la celulosa.** Las endoglucanasas (EG) y PMOs (polisacárido monooxigenasas) clivan internamente las cadenas de celulosa, generando extremos libres, en los cuáles actúan las celobiohidrolasas (CBHs). Las beta-glucosidasas hidrolizan la celobiosa y celobiosa oxidada generadas por las CBHs, liberando glucosa. Las celobiosa deshidrogenasas (CDH) son potenciales dadores de electrones para las PMOs (Dimarogona y col., 2012).

Estas enzimas son dependientes de cobre y actúan depolimerizando la celulosa mediante hidroxilación de C1 y C4, que conduce al clivaje de los enlaces glicosídicos. Como esta reacción requiere de oxígeno molecular y una fuente de electrones externa, actúan en sinergismo con las celobiosa deshidrogenasas (CDH), por lo cual se generan extremos oxidados y no oxidados (Dimarogona y col., 2012).

### II.1.2 Hemicelulasas

Las hemicelulasas pueden agruparse en aquellas que actúan sobre la cadena principal de las hemicelulosas y las enzimas desramificantes que actúan removiendo los residuos sustituyentes de la cadena principal (**Figura 17**).

El xilano es el tipo de hemicelulosa más abundante en la naturaleza (presente principalmente en paredes celulares de cereales) y entre las enzimas que lo clivan se incluyen las  $\beta$ -1,4-endoxilanasas (EC 3.2.1.8), generalmente pertenecientes a las familias GH10 y GH11, generando xilooligosacáridos como producto de hidrólisis.



**Figura 17. Sitios de ataque de enzimas xilanolíticas.** La hidrólisis de los enlaces internos del xilano es llevada a cabo por xilanasas que actúan sobre el esqueleto principal de la molécula. Las  $\beta$ -xilosidasas actúan sobre xilobiosa y xilooligosacáridos cortos liberando xilosa, mientras que las enzimas desramificantes incluyen esterasas (feruloil y acetil), arabinofuranosidasas y glucuronidasas (Pastor y col., 2007).

Se han descrito recientemente algunas enzimas con actividad xilanasa clasificadas dentro de las familias GH 5, 7, 8, 26 y 43. Por otro lado, las  $\beta$ -1,4-xilosidasas (EC 3.2.1.37), actúan sobre xilooligómeros de cadena corta y xilobiosa, liberando xilosa, y pertenecen principalmente a las familias GH3, 39, 43, 52 y 54 (Couturier y Berrin, 2013). Un grupo de enzimas muy importantes son las desramificantes, que incluyen  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55),  $\alpha$ -D-glucuronidasas (EC 3.2.1.139), acetil-xilano esterasas (EC 3.1.1.72) y feruloil esterasas (EC 3.1.1.73) ya que permiten un mayor acceso de las endoxilanasas a la cadena principal de xilano (Bajpai, 2014).

Las endoxilanasas actúan al azar sobre los enlaces internos del xilano y difieren en su especificidad hacia el polímero, ya que algunas clivan la cadena en regiones sin sustituciones mientras que otras requieren la presencia de cadenas laterales próximas a los sitios de clivaje (Pastor y col., 2007). Las mismas se clasifican de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas en dos tipos: un grupo de xilanasas de bajo peso molecular (< 30 kDa) y punto isoeléctrico (pI) básico, pertenecientes a la familia GH11, y otro grupo con alto peso molecular (> 30 kDa) y pI ácido, de la familia GH10. La familia GH10 incluye enzimas que, además de la actividad endo- $\beta$ -1,4, pueden presentar actividad sobre aril-celobiósidos y xilanos con enlaces endo- $\beta$ -1,3. La familia GH11, en cambio, es un grupo monoespecífico, consideradas

“xilanasas verdaderas”, ya que sólo actúan sobre xilanos (Wong y col., 1988; Collin y col., 2005).

Otras enzimas que actúan sobre el principal tipo de hemicelulosa de maderas blandas, los mananos o glucomananos, son las mananasas (endo- $\beta$ -1,4-mananasas EC 3.2.1.78), pertenecientes a las familias GH5, GH26 y GH113. Las manosidasas ( $\beta$ -manosidasas EC 3.2.1.25) por su parte liberan manosa y manooligosacáridos de los extremos no reductores originados por las mananasas y se incluyen en las familias GH1, GH2 y GH5. Las  $\beta$ -glucosidasas (EC 3.2.1.21) y  $\alpha$ -galactosidasas (EC 3.2.1.22) son enzimas de relevancia en la hidrólisis de gluco y galactomananos, respectivamente (Malgas y col., 2015).

### **II.1.3 Lacasas y peroxidasas**

Dada la estructura química de la lignina, conformada por unidades de fenilpropanoides, sólo un grupo reducido de peroxidasas altamente especializadas son capaces de degradar este tipo de compuestos. Además, el hecho de ser un polímero complejo en forma de red tridimensional, la accesibilidad de las enzimas está fuertemente reducida. Para enfrentar estas dificultades es necesaria, por un lado la presencia de sitios catalíticos expuestos en la superficie de las peroxidasas de lignina y por el otro la utilización de mediadores redox que participen en el ataque enzimático. Es así como el peróxido de hidrógeno generado enzimáticamente oxida el polímero de lignina en una reacción catalizada por peroxidasas altamente especializadas (Martínez, 2009). Las enzimas ligninolíticas se clasifican en dos grupos: fenol oxidasas y hemo peroxidasas. Las fenol oxidasas son las lacasas o *p*-difenol dioxigen oxidoreductasas (EC 1.10.3.2) y las hemo peroxidasas incluyen lignina peroxidasas (EC 1.11.1.14), manganeso peroxidasas (EC 1.11.1.13), peroxidasas versátiles (EC 1.11.1.16) y peroxidasas del tipo dyP (EC 1.11.1.19). Las enzimas accesorias que participan en la degradación de la lignina son aril alcohol oxidasas, glioxal oxidasas y glucosa 1-oxidasa, que generan el peróxido de hidrógeno requerido por las peroxidasas (Falade y col., 2017).

## **III. Microorganismos celulolíticos**

### **III.1 Diversidad filogenética**

El dióxido de carbono presente en la atmósfera es fijado por las plantas a través de la fotosíntesis y almacenado como materia orgánica en la misma, retornando nuevamente a la atmósfera mediante las diversas vías respiratorias de

autótrofos y heterótrofos (Falkowsky 2000). Por lo tanto, dado que la pared celular vegetal es la fuente principal de carbono en la Tierra, un punto clave en el ciclo global del carbono es la hidrólisis de la misma. Por ejemplo, la vida media de la celulosa a pH neutro en ausencia de enzimas está estimada en varios millones de años, por lo cual la actividad microbiana se estima que es la principal responsable de la bioconversión del carbono presente de este polímero (Wilson 2011).

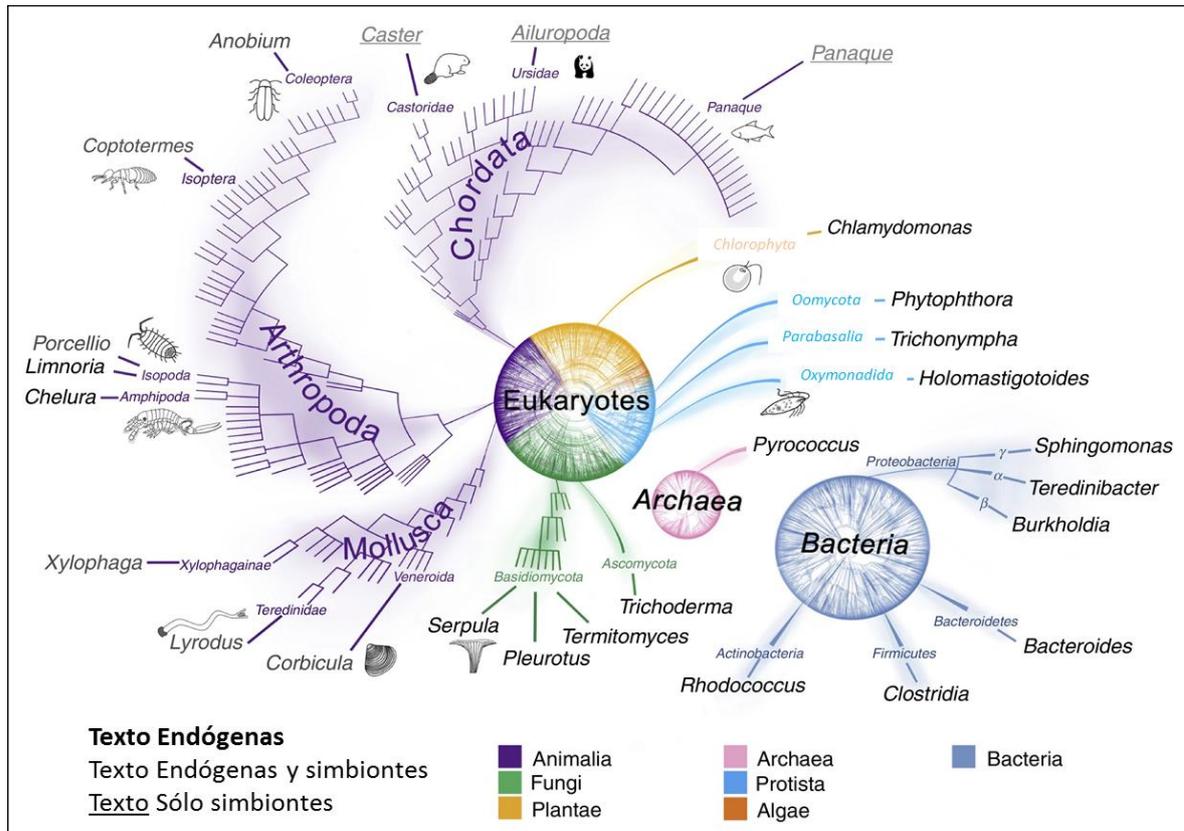
La gran diversidad de organismos que llevan a cabo la bioconversión de biomasa se ve reflejado a lo largo de las principales ramas del Árbol de la Vida (**Figura 18**), incluyendo Procariotas, Eucariotas unicelulares, Protistas, Hongos y Animales, en una amplia variedad de hábitats con condiciones ambientales diversas.

Dentro del Dominio *Bacteria*, los principales géneros celulolíticos se distribuyen en los *phyla Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Proteobacteria*. En términos fisiológicos, los sistemas bacterianos celulolíticos más estudiados son los pertenecientes a las bacterias aeróbicas Gram positivas *Cellulomonas* y *Thermobifida* pertenecientes al *phylum Actinobacteria* y las anaerobias fermentativas del *phylum Firmicutes*, típicamente Gram positivas, como *Clostridium*, *Ruminococcus* y *Caldicellulosiruptor* y algunas Gram negativas como *Butyrivibrio* y *Acetivibrio* (Ravinovich y col., 2002; Lynd y col., 2002). Además, varias especies de los géneros *Bacillus* y *Streptomyces*, fueron reportadas como celulolíticas (Morana y col., 2011).

En el dominio *Eukarya*, los hongos constituyen un grupo importante de microorganismos celulolíticos. Los mecanismos de hidrólisis de celulosa más estudiados son los que llevan a cabo los ascomicetes *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Aspergillus* y los basidiomicetes *Phanerochaete* y *Pycnoporus*. De hecho, una de las especies celulolíticas más estudiadas es *Trichoderma reesei*, desde el aislamiento de la cepa QM6A responsable del rápido deterioro de ropas de algodón y equipamiento de soldados en regiones tropicales, durante la Segunda Guerra Mundial (Reese 1976).

Por otra parte, los hongos ligninolíticos más eficientes estudiados hasta el momento son los filamentosos de la pudrición blanca y marrón (*phylum Basidiomycota*), o de la pudrición blanda (*phylum Ascomycota* o *Deuteromycota*). Si bien la capacidad lignolítica está asociada a los hongos mencionados anteriormente, recientemente se reportó la producción de enzimas ligninolíticas en las bacterias de suelo *Rhodococcus jostii* RHA1, *Amycolatopsis* sp. 75iv2, *Pseudomonas fluorescens* Pf-5, *Streptomyces* A3 y *Sphingobium* SYK-6 (Salvachua y col., 2015), lo cual amplía

la potencialidad de las bacterias de suelo en relación a la deconstrucción eficiente de biomasa.



**Figura 18. Distribución de degradadores de lignocelulosa en el Árbol de la Vida.** Los máximos rangos taxonómicos se encuentran representados en código de colores y los nombres de los géneros que utilizan enzimas endógenas, endógenas y de simbiotes y sólo de simbiotes se representan en distinta tipografía (Cragg y col., 2015).

La mayoría de los estudios relacionados a la búsqueda de capacidades celulolíticas en miembros del dominio *Archaea* se basan en enfoques metagenómicos, dadas las dificultades para el aislamiento en condiciones de laboratorio de muchas de las especies identificadas. Algunos microorganismos termófilos fueron hallados en pilas de compostaje e intestino de termitas, así como también genes codificantes para enzimas celulolíticas pertenecientes a *Pyrococcus* y *Sulfolobus*, pero el mecanismo de degradación de biomasa continúa poco estudiado en este grupo de bacterias (Kataoka y Ishikawa 2014). Del mismo modo, un enfoque principalmente metagenómico se aplica en el estudio de celulolíticos en Protistas y Animales. En cuanto a los primeros, se identificaron genes codificantes para endoglucanasas y exoglucanasas en *Dictyostelium* y también en el oomicete patógeno *Phytophthora*, que genera enzimas activas de pared celular (Kunii y col., 2014; Blackman y col., 2014). Entre los animales, algunos invertebrados como

nemátodos y termitas expresan celulasas endógenas. Estas últimas se producen en las glándulas salivales y en el intestino medio y se complementan con las enzimas de flagelados y bacterias del intestino posterior, pertenecientes a *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Proteobacteria* y *Elusibacteria*, resultando los principales responsables de la conversión de biomasa en metano, hidrógeno y acetato. Recientemente algunos genes codificantes para GH5, GH9 y GH45 fueron identificados en insectos, crustáceos y gasterópodos (Cragg y col., 2015).

### III.2 Mecanismos microbianos de bioconversión de biomasa

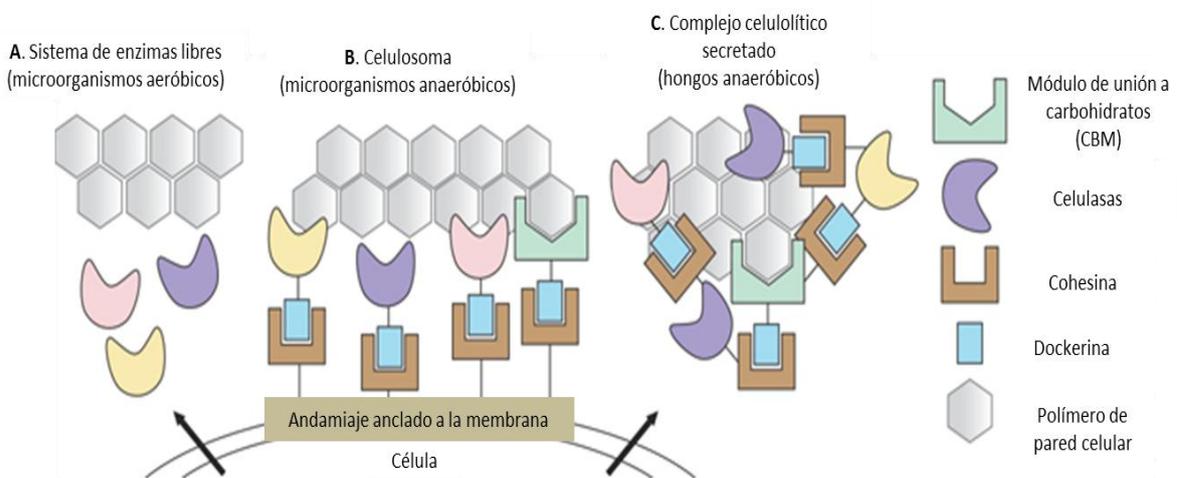
Los microorganismos celulolíticos han desarrollado diversas estrategias de utilización de biomasa, que está reflejada en las enzimas que producen y que actúan en conjunto de manera complementaria y sinérgica. Las GH son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces glicosídicos y, para lograr una hidrólisis eficiente de la celulosa y hemicelulosa, se complementan con otras enzimas, como las xilanasas, las estererasas que remueven esteres fenólicos, metilo y acetilo o bien polisacárido liasas y monooxigenasas líticas de polisacáridos (Payne y col., 2005).

En relación a la depolimerización de la lignina, ésta es llevada a cabo por acción de enzimas oxidativas, como lacasas y peroxidasas, generando un conjunto de compuestos aromáticos heterogéneos o bien mediante la utilización de pequeñas moléculas reactivas (reacción de Fenton) que modifican este polímero para lograr un mayor acceso a los compuestos celulósicos; sin embargo la lignina no es completamente metabolizada y de hecho persiste en el suelo (Cragg y col., 2015).

Existe una marcada diferencia en las estrategias celulolíticas entre microorganismos aerobios y anaerobios (**Figura I9**). Tanto los hongos como las bacterias aeróbicas utilizan la celulosa a través de la producción de celulasas extracelulares. En general, las hifas de hongos filamentosos penetran el sustrato celulósico y es allí donde secretan las enzimas, en proximidad al sustrato. Por otro lado, las bacterias anaeróbicas no poseen la habilidad de penetrar en los sustratos celulósicos, por lo que desarrollaron un mecanismo de degradación de la celulosa mediante la formación de celulosomas. Esto les permite posicionar las células en el sitio de hidrólisis, favorecer el sinergismo enzimático y asegurar una mínima difusión de los productos de hidrólisis para una incorporación eficiente de los mismos (Lynd y col., 2002). El modelo de celulosoma está ampliamente estudiado en bacterias anaeróbicas de *Clostridium thermocellum* y describe a las celulasas organizadas en un complejo celulolítico de alto peso molecular. Además de los dominios enzimáticos

catalíticos, las enzimas asociadas al celulosoma contienen dominios cohesina-dockerina que les permiten asociarse en un esqueleto o *scaffold* que se ancla a la membrana celular y facilita la aproximación del sustrato a la célula para una hidrólisis más eficiente. Otros dominios presentes en este sistema son los CBMs y los dominios de unión a capa S (SLH) (Bayer y col., 1998).

Recientemente se describió un posible modelo de utilización de celulosa en hongos anaeróbicos, frecuentemente aislados del tracto digestivos de herbívoros (*Neocallimastix* y *Orpinomyces*) mediante la formación de complejos similares a los celulosomas, pero que no se anclan a la pared celular fúngica, sino que son secretados (Haitjema y col., 2014).



**Figura I9. Representación esquemática de los mecanismos de hidrólisis de celulosa.** Los microorganismos aeróbicos secretan las enzimas al medio extracelular (a), mientras que los anaeróbicos forman complejos multienzimáticos llamados celulosomas (b). En los hongos anaeróbicos (c) se postula la formación de complejos enzimáticos que son secretados el medio extracelular (Haitjema y col., 2014).

### III.3 Hábitats naturales

Al finalizar el ciclo de vida de una planta, la compleja matriz de lignocelulosa es procesada por saprófitos y detritívoros que habitan el suelo y el intestino de animales, en las cadenas tróficas de descomposición de materia orgánica. Los denominados sistemas naturales de utilización de biomasa incluyen tanto microorganismos únicos -como bacterias y hongos de pudrición- como consorcios especializados formados por múltiples organismos, siendo el caso del rumen y el intestino de insectos (Xie y col., 2014).

El rumen constituye un ecosistema microbiano anaeróbico único, integrado por bacterias, protozoos ciliados, hongos, arqueas y bacteriófagos. Por otro lado, el

intestino de insectos -en particular el de termitas- representa un sistema en el cual la interacción sinérgica que se establece entre el huésped y los microorganismos simbioses permite una degradación del 99% de la biomasa en 24 hs, en un proceso continuo e integrado, a lo largo de todas las partes del intestino (Xie y col., 2014).

El suelo constituye una fuente muy rica de microorganismos, tanto hongos como bacterias, que juegan un rol muy importante en la degradación de la materia orgánica. Los hongos, dada su habilidad de descomponer los polímeros recalcitrantes de las plantas terrestres con alto contenido de lignina, representan una parte importante de la biota. Contrariamente, el bajo contenido de lignina de las plantas acuáticas determina que la biomasa en estos ambientes sea degradada principalmente por bacterias, que además se adaptan mejor que los hongos a los ambientes acuáticos. En los sedimentos anóxicos se ve favorecido el desarrollo de bacterias celulolíticas anaeróbicas, así como también en el tracto intestinal de animales herbívoros (Lynd y col., 2002).

Las bacterias celulolíticas aeróbicas de suelo están asociadas a aquellas regiones de la biomasa donde la celulosa, pectina y hemicelulosa están más accesibles, dada su habilidad restringida para penetrar sustratos complejos; lo mismo ocurre con las bacterias que descomponen madera. Es por ello que se estima que la fase inicial de descomposición de celulosa, por ejemplo en un suelo agrícola, es predominantemente bacteriana, seguida de una etapa fúngica. Posiblemente, las bacterias limiten el desarrollo de bacterias filamentosas y hongos en esta etapa inicial mediante la producción de compuestos inhibitorios (de Boer y col., 2005).

Los estudios de microorganismos celulolíticos que se enfocaron en las comunidades del suelo revelaron que los géneros frecuentemente aislados son principalmente los filamentosos *Streptomyces* y *Micromonospora* y no filamentosos *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Cytophaga*, desde ambientes tanto mesófilos como extremófilos. Uno de los géneros identificados con frecuencia es *Paenibacillus*. Éste género, perteneciente al *phylum Firmicutes* y orden *Bacillales*, fue recientemente reclasificado a partir del linaje monofilético de bacterias formadoras de endosporas, previamente llamado *Bacillus* Grupo III, siendo *P. polymyxa* la especie tipo (Ash y col., 1993). Incluye especies que pueden ser anaerobias facultativas o aerobias estrictas y con temperaturas óptimas de crecimiento en el rango mesófilo. Los suelos enriquecidos con humus y restos vegetales así como también la rizósfera de plantas de interés agrícola propician el desarrollo de aquellas especies capaces de realizar

la fijación biológica de nitrógeno, de producir compuestos antifúngicos y una amplia variedad de enzimas (Logan y De Vos, 2009).

#### **IV. Aplicaciones industriales de enzimas celulolíticas**

Las aplicaciones biotecnológicas de celulasas y hemicelulasas comenzaron a principios de 1980, primero en el ámbito de la alimentación animal y luego humana, mientras que el uso de pectinasas en la industria de alimentos data de 1930. Posteriormente, estas enzimas se comenzaron a utilizar en la industria textil, del lavado y en la del papel. Hoy en día, el uso de celulasas, hemicelulasas y pectinasas representa aproximadamente un 20% del mercado mundial de enzimas, principalmente obtenidas de los hongos *Trichoderma* y *Apergillus* (Bhat 2000).

En relación a la industria de alimentos, este tipo de enzimas se utilizan para la extracción y clarificación de jugos de frutas y vegetales, en especial pectato liasas y poligalacturonasas en combinación con celulasas, xilanasas y mananasas. Las mismas permiten una licuefacción del macerado de frutas y vegetales y reducen la viscosidad del producto final. Además, algunos tipos de xilanasas son utilizadas para el mejoramiento de la calidad de productos de panadería, al aumentar la concentración de arabino xilooligosacáridos. Una de las aplicaciones más recientes de xilanasas es en la producción de xilooligosacáridos para ser empleados como pre-bióticos en alimentos, al estimular el desarrollo de bacterias pro-bióticas benéficas en el intestino (Aachary y col., 2011). En la industria del vino y cerveza, el uso de glucanasas y pectinasas mejora la maceración de uvas, reduce la viscosidad de la cerveza y modifica algunos residuos aromáticos, mejorando el aroma de vinos. En relación a la alimentación animal, el uso de hidrolasas (glucanasas y xilanasas) en animales monogástricos mejora el valor nutricional, ya que favorece la digestibilidad del material lignocelulósico de los cereales en el caso de rumiantes que se alimentan de forraje.

Con respecto a la industria textil y del lavado, las celulasas son de amplia utilidad ya que mejoran la calidad de las telas al modificar las fibras de celulosa de una manera controlada. Es el caso de los procedimientos denominados *bio-stoning* de telas denim que reducen el colorante en ciertas zonas de la misma y *bio-polishing* que remueve el exceso de microfibrillas, en especial en telas de algodón. En la industria de los detergentes y polvos para el lavado de ropa, el uso de celulasas mejora el brillo de la misma, la suavidad y remueve la suciedad (Bhat 2000).

La industria del papel utiliza combinaciones de celulasas y xilanasas en distintas etapas del proceso como por ejemplo para la generación de la pulpa del

papel y modificación de las propiedades de las fibras, así como también en el blanqueo mediante xilanasas y mananasas, reduciendo el uso de cloro generalmente empleado en esta etapa (Kuhad 2011).

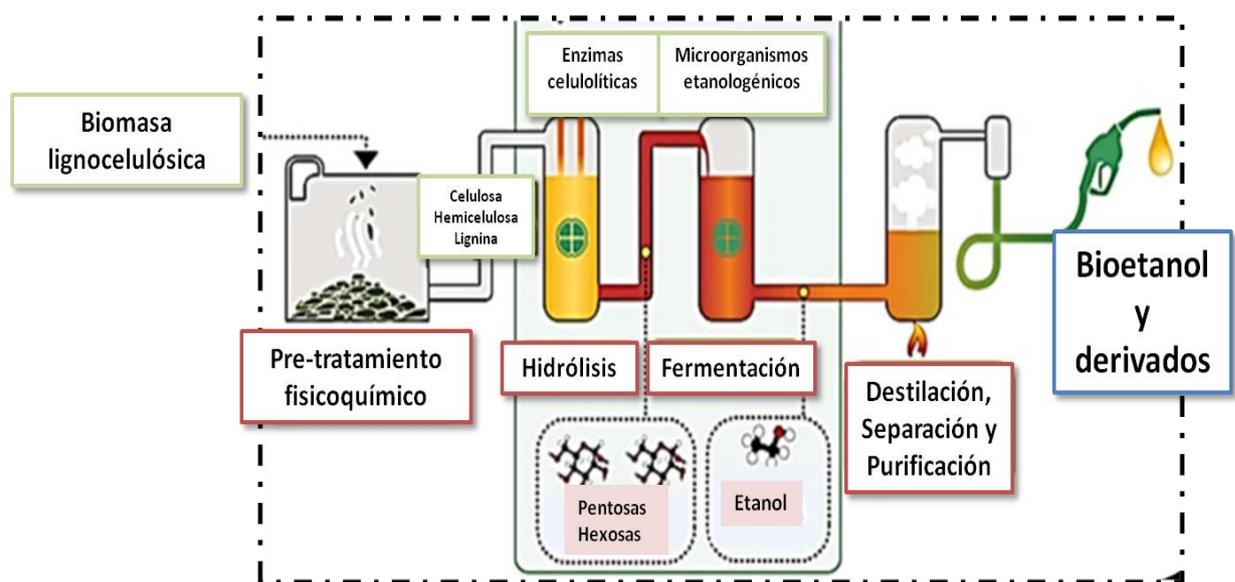
Una de las principales aplicaciones de las enzimas capaces de hidrolizar biomasa lignocelulósica es la producción de combustibles líquidos, en particular bioetanol de segunda generación ya que este tipo de biomasa es la única materia prima sustentable si se desea enfrentar la gran demanda energética actual. Además, la bioconversión a combustibles líquidos y otros químicos tiene varias ventajas en términos de mitigar el efecto invernadero y reducir la dependencia a los combustibles fósiles. El etanol de segunda generación se denomina de este modo ya que proviene de una fuente no utilizada para la alimentación humana, y se diferencia así de los de primera generación, basados en el uso de maíz y caña de azúcar principalmente. Sin embargo, los costos del procesamiento de biocombustibles de 2-G en la actualidad superan los de 1-G, teniendo en cuenta la recalcitrancia de la biomasa y la falta de enzimas eficientes para sobreponer esta dificultad (Kumar y col., 2016).

Las etapas generales de la producción de bioetanol de 2-G incluyen: pre-tratamiento, hidrólisis, fermentación y destilación (**Figura 110**). El pre-tratamiento incluye una serie de pasos iniciales mediante los cuales la biomasa es convertida en una forma más digerible y aumenta su superficie expuesta. Se incluyen métodos mecánicos, físicos (molienda), químicos (ácidos o alcalinos, a altas temperaturas) o biológicos (hongos celulolíticos y ligninolíticos) que reducen el tamaño de las partículas y el contenido de humedad. Sin embargo en algunos casos se generan compuestos tóxicos que resultan inhibitorios para el proceso, como ácidos débiles, compuestos fenólicos y derivados de furano (Tan y col., 2016).

La hidrólisis de la biomasa pre-tratada, mediante la cual se generan mono y oligosacáridos a partir de polisacáridos complejos, puede ser llevada a cabo usando ácidos o enzimas. La hidrólisis ácida requiere relativamente alta temperatura y produce no solo glucosa sino también hidroximetilfurfural y otros productos, lo cual reduce el rendimiento total. La aplicación de enzimas, por otro lado, es ventajosa dada una mayor eficiencia de conversión, baja generación de inhibidores y uso de condiciones operativas moderadas y no corrosivas. De todos modos, la degradación de la biomasa es un proceso multi-enzimático altamente complejo por lo cual aún no existen sistemas completamente efectivos y de bajo costo. Los factores de la biomasa que afectan la hidrólisis enzimática, además de la concentración de sustrato, son el grado de polimerización, la cristalinidad, el área accesible al ataque

enzimático y el contenido de hemicelulosa y lignina (Ballesteros 2010). La etapa de fermentación es llevada a cabo por microorganismos capaces de fermentar a etanol los azúcares generados durante la etapa de hidrólisis. La fermentación alcohólica involucra reacciones bioquímicas y enzimáticas complejas, que tienen lugar en un ambiente con cantidad de oxígeno reducida.

La cepa de levaduras más utilizada es *Saccharomyces cerevisiae*, que puede fermentar azúcares monoméricos de seis carbonos, y además bacterias que fermentan tanto azúcares de cinco como de seis carbonos. Sin embargo estas últimas en ocasiones deben ser ingenierizadas genéticamente para tolerar los altos niveles de etanol generados (Tan y col., 2016).



**Figura I10. Etapas de la producción de bioetanol de segunda generación.** La materia prima lignocelulósica es sometida a un pre-tratamiento mediante el cual los componentes de la misma (celulosa, hemicelulosa, lignina) se encuentran más accesibles para ser hidrólizados por enzimas celulolíticas agregadas al proceso. Luego las levaduras llevan a cabo la fermentación de los azúcares generados a etanol, que posteriormente es separado por métodos químicos.

Finalmente, se aplican métodos de separación para recuperación y deshidratación del etanol y remoción de los inhibidores generados durante la fermentación, para aumentar el rendimiento. Dado que el etanol se encuentra diluído en una solución acuosa luego de la fermentación (5-12%), la separación del mismo es un proceso que requiere de energía. En general se aplican dos etapas: en la primera se concentra por destilación convencional (92.4%) y luego es deshidratado a etanol puro mediante destilación azeotrópica, extractiva, líquido-líquido, adsorción o evaporación de membrana (Huang y col., 2010).

# Hipótesis y Objetivos

---

## **Hipótesis**

La bioprospección de suelos forestales posibilita el aislamiento de bacterias productoras de enzimas activas sobre carbohidratos, capaces de degradar biomasa lignocelulósica, con potencial aplicación industrial.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

El objetivo general de este trabajo es estudiar los mecanismos bacterianos de degradación de biomasa, con el fin de obtener extractos enzimáticos de celulasas y hemicelulasas de bacterias del suelo y evaluar su utilización en el aprovechamiento de residuos agroforestoindustriales, en procesos como la obtención de bioetanol.

### **Objetivos particulares**

OP1. Bioprospección de bacterias celulolíticas de suelos forestales como fuente de nuevas enzimas.

OP2. Caracterización fisiológica, bioquímica y genómica de un aislamiento bacteriano (hemi)celulolítico.

OP3. Optimización de la actividad (hemi)celulolítica del aislamiento obtenido e identificación de las enzimas responsables de la actividad observada.

OP4. Caracterización de la actividad enzimática de celulasas y/o hemicelulasas seleccionadas y potencial aplicación industrial.

# **Materiales y métodos**



## I. Muestras de suelo

Las muestras de suelo se tomaron de la capa superficial (0-20 cm) de bosques nativos de dos regiones diferentes de Argentina: Valle Grande (VG) (Mendoza) (-34° 48' 56.03", -68° 27' 6.19") y Cerro Bayo (CB) (Neuquén) (-40° 56' 22.55", -71° 23' 44.76") y se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento. El análisis fisicoquímico de suelos se realizó en el Servicio del Laboratorio del Instituto de Suelos (CIRN, INTA) el cual incluyó la determinación de pH (usando un electrodo de vidrio en una suspensión 1:2.5 de suelo:agua) contenido de materia orgánica y de carbono orgánico (método Walkley y Black semi-micro).

## I. Soluciones y Medios de cultivo

Tabla M1: Soluciones, <i>buffers</i> y medios de cultivo		
	Componentes	Volumen, masa o concentración
<b>Soluciones y <i>buffers</i></b>		
Solución fisiológica	NaCl	9 g/l
Reactivo Ácido dinitrosalicílico (DNS)	Agua destilada	141,6 ml
	3,5- Ácido dinitrosalicílico	1,06 g
	NaOH	1,98 g
	Tartrato de sodio y potasio	30,6 g
	Fenol (50°C)	0,76 ml
	Metabisulfito de sodio	0,83 g
Buffer de muestra (zimografía, 2X)	Tris-HCl pH 6.0	50 mM
	EDTA	8,2 mM
	SDS	1 % (p/v)
	Azul de bromofenol	0,025% (p/v)
Buffer de equilibrio (2D)	Tris-HCl pH 8.8	50 mM
	Urea	6 M
	Glicerol	30 % (v/v)
	SDS	2 % (p/v)
	DTT	1% (p/v)
Buffer de rehidratación (2D)	Urea	8 M
	CHAPS	2 % (p/v)
	Azul de bromofenol	0,025% (p/v)
Buffer de lisis A (pH8)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	10 mM
	Inhibidor de proteasas	0,1% (v/v)
Buffer de lisis B	Tris-HCl pH 7	20 mM
	KCl	20 mM
	EDTA	1 mM
	Igepal	0,2 % (v/v)
	DTT	1 mM
	Imidazol	10 mM
	Inhibidor de proteasas	0,1% (v/v)
Buffer de lavado A (pH8)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	20 mM
Buffer de lavado B	Tris-HCl pH 7	20 mM
	KCl	20 mM

	EDTA	1 mM
	Igepal	0,1% (v/v)
	Imidazol	20 mM
Buffer de elución A (pH8)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	250 mM
Buffer de elución B	Tris-HCl pH 7	20 mM
	KCl	20 mM
	EDTA	1 mM
	Igepal	0,1% (v/v)
	Imidazol	250 mM
Solución TFBI pH (5.8)	KAc	30 mM
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	10 mM
	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	50 mM
Solución TFBII pH (6.5)	Mops	10 mM
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	75 mM
	KCl	10 mM
	Glicerol	15% (v/v)
<b>Medios de cultivo</b>		
Medio mínimo (MM)* (pH7)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,67 g/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,87 g/l
	NaCl	0,05 g/l
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1 g/l
	NH <sub>4</sub> Cl	1 g/l
	CaCl <sub>2</sub>	0,04 g/l
	FeCl <sub>3</sub>	0,004 g/l
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,005 g/l
	Biotina	0,01 g/l
	Ácido nicotínico	0,02 g/l
	Ácido pantoténico	0,01 g/l
Medio salino (MS)** (pH7)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g/l
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g/l
	NaCl	0,5 g/l
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01 g/l
	MnSO <sub>4</sub>	0,01 g/l
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,3 g/l
Luria Bertani (LB) (pH7)	Triptona	10 g/l
	Extracto de levadura	5 g/l
	NaCl	10 g/l

\*Hankin y Anagostakis, 1977 (con modificaciones) \*\* Samira y col., 2011.

En los medios que así lo requirieron, se agregó (p/v): extracto de levadura 0,1% (EL, Bacto), Carboximetilcelulosa 1% (CMC, Sigma), Xilano (de abedul) 0,5% (XI, Sigma), Avicel 0,5% (AV, Fluka), Celobiosa 0,5% (CB, SIGMA), Solka Floc 0,5% (SF, Int. Fiber Corp.), Agar bacteriológico 1,5% (Bacto) y colorante Azul Tripán (AT, SIGMA) 0,01% (p/v).

## **II. Métodos microbiológicos**

### **III.1 Obtención de consorcios celulolíticos de suelo**

Para el aislamiento de bacterias celulolíticas, se agregaron 5 gr de suelo a 45 ml de solución fisiológica y se mantuvo en agitación por 40 min. Luego la suspensión se centrifugó a 5.000 rpm por 10 min y se agregaron 5 ml del sobrenadante a 45 ml de MM con CMC (como fuente de carbono) y EL (como fuente de nitrógeno), con cicloheximida 0,5 % (SIGMA) para prevenir el desarrollo de hongos. Los cultivos se incubaron a 30°C en agitador orbital durante 48 hs a 200 rpm y se tomaron muestras con ansa para la siembra por agotamiento por estrías en MM-CMC o MS-CMC con y sin EL. Además, se realizaron diluciones seriadas del cultivo de enriquecimiento, en solución fisiológica de las cuales se sembraron 50 µl con rastrillo de Drigalsky en placas con los mismos medios. Las mismas se incubaron a 30°C durante 5 días y luego los cultivos seleccionados se conservaron a -80°C, con glicerol 20% (v/v).

### **III.2 Medición del crecimiento bacteriano**

El crecimiento microbiano se midió en algunos casos por densidad óptica (DO) usando espectrometría a 600nm y en otros casos (como en cultivos crecidos en sustratos insolubles), se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) en placas de medio LB, por ml de cultivo.

### **III.3 Tinción de Rojo Congo**

Las placas con desarrollo de colonias bacterianas se tiñieron con una solución de Rojo Congo 0,1% (p/v) durante 15 min, se retiró el colorante y luego se destiñó con una solución de CNa 1M durante 15 min (Teather y Wood, 1982). Este procedimiento se repitió dos veces y los halos de hidrólisis se observaron a través de luz blanca. La actividad celulolítica se evidenció por la visualización de la hidrólisis del polímero celulósico con formación de halos claros alrededor de las colonias.

### **III.4 Cálculo de la capacidad hidrolítica**

Se realizó la siembra de gotas de 5 µl (por triplicado) de un cultivo bacteriano saturado en placas con MM-CMC o MM-XI (crecidos en MM-CMC-EL y MM-CMC-XY, respectivamente). Luego de la incubación durante 5 días a 30°C, se midió el diámetro de cada una de las tres colonias. Posteriormente, se lavaron las placas con solución fisiológica para eliminar las colonias y se realizó la Tinción de Rojo Congo. Se midió el diámetro del halo de hidrólisis. El cálculo de la capacidad hidrolítica (CH)

resultó del cociente entre el promedio del diámetro de la colonia y del diámetro del halo de hidrólisis (Gupta y col., 2012).

### **III.5 Obtención de aislamientos bacterianos puros**

A partir de consorcios celulolíticos seleccionados, se realizaron repiques sucesivos en placas con MM-CMC-EL-Azul Tripán lo cual permitió el seguimiento de colonias con actividad celulolítica (por halo claro de degradación) y la separación de aquellas colonias sin actividad dentro del consorcio. Por otro lado, también se utilizaron placas con MM-CB, MM-AV y MM-SF, usando el criterio de selección de colonias en base a diferencias morfológicas. La pureza de todos los aislamientos se testeó por morfología homogénea en LB.

### **III.6 Microscopía óptica y electrónica**

La observación del resultado de la Tinción de Gram (kit comercial Britania) y morfología bacteriana se llevó a cabo en un microscopio óptico (Olympus). La formación de endosporas, la medición del tamaño de las células bacterianas y el crecimiento en xilano y biomasa se visualizó en un Microscopio electrónico de barrido (SEM) modelo FEI Quanta-250 (FEI Co., Netherlands), en el Laboratorio de Microscopía del CICVyA, INTA. Para ello, se centrifugó el cultivo de interés a bajas revoluciones (1.000 rpm), se fijó con glutaraldehído (2,5% v/v) por 24 hs a 4°C, se lavó tres veces con buffer fosfato de sodio (0,1 M, pH 7) y se tiñó con tetróxido de osmio por 1 h. Luego se realizaron varios lavados con agua y posterior deshidratación de las muestras con un gradiente de etanol (30-80% v/v). Las muestras se metalizaron con una película de oro para favorecer la visualización.

### **III.7 Pruebas bioquímicas**

El requerimiento de oxígeno de un cultivo de *Paenibacillus* sp. A59 se determinó por crecimiento en tubos cerrados gaseados con dióxido de carbono (Grubb y Dehority, 1976). El crecimiento a diferentes temperaturas (4°C, 30°C, 37°C y 45°C), pHs (4, 5, 7, 9 y 10) y a diferentes concentraciones de NaCl (2, 5, 7 y 9%) se determinó en MM-EL-glucosa 0,2% (p/v) (SIGMA). Se evaluó el crecimiento bacteriano (mediante visualización de turbidez en el medio como registro positivo) en MM-CINH<sub>4</sub> 0,1% (p/v) suplementado con diferentes fuentes de carbono (0,5% p/v) y por otro lado se utilizó MM-0,2% glucosa suplementado con diferentes fuentes de nitrógeno (0,1% p/v). Las pruebas de movilidad, oxidasa, gelatinasa, utilización de

citrato y catalasa se llevaron a cabo según métodos clásicos (Mc Faddin, 2003). Para determinar actividad amilasa y caseinasa se utilizaron placas de agar almidón (almidón soluble, SIGMA, 0,2% p/v) y agar leche (leche descremada 2% p/v), respectivamente (Logan y De Vos, 2009). Placas de agar con MM y pectina de cítricos 1% (p/v) (SIGMA), quitina coloidal 2% (p/v) (SIGMA) (preparada según Hsu y Lockwood, 1975), 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucopiranosido 0,001% (p/v) (4-MUG) (SIGMA) y ABTS 2 mM (SIGMA) con 0.2 mM de sulfato de cobre, se utilizaron para determinar actividad pectinasa, quitinasa, celobiosidasa y lacasa, respectivamente. La prueba de API 50 CH (Biomérieux) fue realizada por el Laboratorio de Insumos Bacterianos, del Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (INTA) según protocolos estándar.

### **III. Métodos moleculares**

#### **IV.1 Extracción de ADN genómico**

Se utilizaron dos metodologías según la calidad y pureza del ADN requerido. Para reacciones de PCR, se centrifugaron los cultivos bacterianos a 7.000 rpm, 5 min, y se resuspendieron las células en 50  $\mu$ l de agua libre de nucleasas (Promega). Luego se calentaron a 100°C, 10 min y se congelaron a -80°C (este procedimiento repetido dos veces), seguido de un paso final a 100°C, 10 min. El sobrenadante obtenido a partir de la centrifugación a máxima velocidad por 5 min, se utilizó como ADN genómico templado para PCR, a la dilución apropiada. En los casos donde se requirió ADN genómico de buena calidad, como en el caso de 16S- DGGE, 16S- TRFLP o secuenciación genómica, se realizó la extracción siguiendo las instrucciones del kit Wizard Genomic DNA Extraction (Promega).

#### **IV.2 Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La secuencia nucleotídica correspondiente al gen codificante para la subunidad 16S del rRNA se amplificó utilizando los siguientes pares de cebadores, según los objetivos finales: para la tipificación molecular de consorcios se realizó la amplificación completa del gen (fD1/rD1; 27f/1492r) y para *Paenibacillus* sp. A59 se realizó la amplificación utilizando dos cebadores internos (519r y r533f) combinados con los cebadores en los extremos de la secuencia (27f y 1492r), lo que permitió cubrir el gen completo (27f/519r; 533f/1492r). Los cebadores 27f/1492r también se usaron para amplificar los aislamientos puros de CB1-2. Los genes codificantes para

GH11XynB y GH10XynA se amplificaron usando GH11F1Pae/GH11R2Pae y GH10-2DF/GH10-2DR, respectivamente (**Tabla M2**).

Tabla M2: Cebadores utilizados en reacciones de PCR		
Nombre	Secuencia (5'-3')*	Referencia
fD1	CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCA	Weisburg y col., 1991
rD1	GGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC	
27f	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Lane, 1991
1492r	GGTTACCTTGTTACGACTT	
519r	GWATTACCGCGGCKGCTG	Winsley y col., 2012
533f	GTGCCAGCAGCCGCGGTAA	
GH11F1Pae	AAACATATGCATCATCATCCATCACCACGCAACAGATTA TTGGCAAAT	Este trabajo
GH11R2Pae	ATCTAGATTACCACACCGTTACGTTGGA	
GH10-2DF	AAAGGATCCAAAGGAAGCAAGTTTCTGGGTAAT	Este trabajo
GH10-2DrR	AAACTCGAGTTAGGGATTGTTGGCAAGATAATT	

\*los sitios de corte con enzimas de restricción se encuentran subrayados

Las mezclas de reacción se realizaron en un volumen final de 25 µl, conteniendo: 1X del buffer de la polimerasa, 0,4 µM de cada cebador, 10 mM de cada dNTP (Promega) y 1,25 U de polimerasa Go-Taq (Promega), utilizando un termociclador Mastercycler Gradient (Eppendor), con los ciclos generales: 95°C 4 min, 30 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 53°C (fD1/rD1) o 56°C (27f/1492r; 27f/519r; 533f/1492r; GH11F1Pae/GH11R2Pae y GH10-2DF/GH10-2DR) y 2 min a 72°C, con una extensión final de 10 min a 72°C. Los productos de amplificación se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa (0,8% p/v) y se tiñieron con una solución de bromuro de etidio (10 mg/ml).

### IV.3 Preparación de células de *Escherichia coli* competentes químicas

A partir de un cultivo saturado de *E. coli*: DH5α (Thermo Fisher), Rossetta DE3 (Novagen) o XL1-blue (Stratagene) en medio LB a 37°C, se realizó una dilución 1/50 en el mismo medio, y se cultivó a 37°C hasta una DO (600nm) entre 0,4 y 0,6. Luego se enfrió el cultivo en hielo, se centrifugó 10 min a 4.000 rpm, 4°C y las células se resuspendieron en 20 ml de solución TFB I. Luego de enfriar nuevamente 5 min, se centrifugó a 4.000 rpm, 4°C y se resuspendió con 2 ml de solución TFB II. Las células competentes se conservaron a -80°C.

#### IV.4 Clonado de genes y secuenciación

Los productos de amplificación por PCR correspondientes al gen 16S rRNA, GH10XynA o bandas escindidas de un gel de DGGE, se purificaron siguiendo las instrucciones de un kit comercial (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega), se clonaron en el vector pGEM-T Easy (Promega) por ligación con la enzima T4 ligasa (Promega) y se transformaron células de *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes químicas. Los clones seleccionados (por crecimiento en placas con IPTG/X-gal) se secuenciaron a partir de cebadores del vector (SP6 y T7) en un Secuenciador Capilar ABI 3130xl (Applied Biosystems, USA) en la Unidad de Genómica de CICVyA-INTA.

#### IV.5 Minipreparación de ADN plasmídico

Se utilizó un kit de extracción de ADN plasmídico: Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega).

#### IV.6 Expresión y purificación de proteínas recombinantes

La secuencia génica amplificada de GH10XynA y clonada en pGemT Easy (**Figura A1a Anexo**), se cortó utilizando las enzimas de restricción *Bam*HI/*Xho*I (Promega) y se clonó en el vector de expresión pET28a (Novagen) mediante ligación con la enzima T4 ligasa (Promega). Luego, con los plásmidos recombinantes se transformaron células químicamente competentes de *E. coli* Rossetta DE3 para la expresión proteica, las cuales se cultivaron en medio LB suplementado con 50  $\mu$ g/ml de kanamicina. La expresión se indujo con 1mM de IPTG por 4 hs a 37°C.

En el caso de GH11XynB, se realizó la purificación del producto de PCR y posterior clonado en el vector de expresión pJExpress (DNA 2.0) (**Figura A1b Anexo**), utilizando las enzimas *Nde*I/*Xba*I (Promega) y la enzima T4 Ligasa. Luego, se transformaron células de *E. coli* XL1 Blue competentes químicas y se crecieron en placas con medio LB suplementado con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina. La expresión se indujo con 0,5 mM de IPTG por 16 hs a 28°C.

Para ambas proteínas, luego de la lisis celular (Buffer de lisis A y B para GH10XynA y GH11XynB, respectivamente) y sonicado (6 pulsos de 10 seg, 28% amplitud), se purificaron en la fracción soluble mediante cromatografía de afinidad por iones (IMAC) con resina de agarosa Ni-NTA (Qiagen). Para ello se usaron los buffers de lavado y elución adecuados (lavado y elución A para GH10XynA y B para GH11XynB).

#### **IV.7 Electroforesis en geles de agarosa, poliacrilamida y *Western blot***

Se siguieron los protocolos generales descritos en la bibliografía para las tres metodologías (Laemmli 1970; Sambrook y col., 1989). Se utilizaron equipos de electroforesis de BioRad y marcadores de peso molecular de 1 Kb (Promega) para ADN y marcador pre-teñido para proteínas (Thermo). Para la técnica de *Western blot* se utilizó como anticuerpo primario anti-histidinas (1:300) (GE) y como secundario anti-ratón (1:10.000) (GE).

#### **IV.8 Electroforesis bidimensional**

Se precipitaron las proteínas de un sobrenadante de cultivo libre de células (Ver Obtención de sobrenadante de cultivo libre de células) con ácido tricloroacético al 10%, durante 2 días a 4°C. Luego de extraer todo el ácido, se realizaron lavados con acetona fría y etanol, se resuspendieron las proteínas en agua de calidad ultra pura y se agregó el detergente DOC al 2% (v/v) (deoxicolato de sodio). Un segundo paso de precipitación y remoción de sustancias interferentes se realizó utilizando el kit 2D clean-up (GE Healthcare). Luego, la muestra se preparó para la separación por isoelectroenfoque (IEF), mediante el agregado de buffer de rehidratación y los anfólitos (IPG buffer 0,5% v/v, GE Healthcare y DTT ditiotretol 20 mM). Posteriormente se sembró en una tira con gradiente inmobilizado de pH (IPG) (7 cm, pH 4-7, Immobiline dry strip, GE Health care), y se llevó a cabo el IEF en un Ettan IPGphor 3 System (GE Healthcare). Para la electroforesis en segunda dimensión, a la tira se le agregó buffer de equilibrio y se corrió en un gel SDS-PAGE 10% durante 5 h a 80 V. Los *spots* observados luego de la tinción con Coomassie Coloidal G-250 (Neuhoff y col., 1988) se cortaron y analizaron por espectrometría de masas.

#### **IV.9 Espectrometría de masas**

La digestión de los fragmentos escindidos de los geles y el análisis de espectrometría de masas se realizaron en el CEQUIBIEM (Facultad de Ciencias Exactas, UBA) para el análisis de fracciones de geles monodimensionales, y en la Unidad Analítica de Bioquímica y Proteómica del Instituto Pasteur (Uruguay), a partir de los *spots* de un gel bidimensional. Las muestras a analizar fueron procesadas en los respectivos lugares de análisis de espectrometría de masas. Brevemente, los fragmentos se trataron con DTT (10 mM) por 45 min a 56°C, se agregó iodoacetamida (55 mM) por 45 min en oscuridad y se digirió con tripsina (200 ng) durante toda la noche a 37°C. Los péptidos se eluyeron con 50% acetonitrilo (ACN)-

05% ácido trifluoroacético y luego se concentraron por vacío y se desalaron utilizando la columna Zip-Tip X18 (Merck Millipore). Posteriormente se eluyeron en 10 µl de agua:ACN:Ácido fórmico 40:60:0,1% y se analizaron por LC-MS/MS en un Espectrómetro de masas Thermo Scientific Q-Exactive acoplado a un nano HPLC EASY-nLC 1000 (Thermo Scientific). Los péptidos se cargaron en una columna C18 Easy-Spray Accucore y se eluyeron por 120 min en un flujo de 33 nl/min, usando un gradiente de agua:ACN. Los espectros se obtuvieron con un analizador Orbitrap. El rango escaneado fue entre 400-1800 m/z. La información se procesó utilizando el software Proteome Discoverer software (version 1.4 Thermo Scientific), aplicando la búsqueda contra la base de datos de proteínas de *Paenibacillus* spp., incluyendo *Paenibacillus* sp. A59. La carbamido metilación de residuos cisteínas se indicó como una modificación fija y la oxidación de metioninas como modificación variable. Sólo las proteínas identificadas con péptidos determinados por el programa como de alta confianza se utilizaron para el análisis.

#### **IV.10 Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)**

La técnica de DGGE se aplicó para la amplificación de la región V3 hipervariable del gen 16S rRNA (200 pb). En primer lugar se realizó una PCR con los cebadores 27f/1492r para obtener la amplificación completa del gen y luego una segunda PCR con los cebadores 341f/534r (341f: 5'ACGGGAGGCAGCAG 3' con un GC *clamp* de 40 nucleótidos en el extremo 5' y 534r: 5'ATTACCGCGGGTGCTGG 3') (Muyzer, 1993). Para la segunda PCR, se utilizaron 25 ng de ADN molde (producto de la primera PCR) en una mezcla de reacción en un volumen final de 25 µl, conteniendo: 1X buffer de la polimerasa, 0,4 µM de cada cebador, 10 mM de cada dNTP y 1,25 U de polimerasa Go-Taq (Promega), utilizando un termociclador Mastercycler Gradient (Eppendor), con los ciclos generales: 93°C 4 min, 29 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 53°C, 2 min a 72°C, con una extensión final de 10 min a 72°C. Los productos de amplificación se corroboraron por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (p/v). Luego, se llevó a cabo la electroforesis en gel en gradiente desnaturalizante usando el sistema de Bio-Rad DGGE kit. Se agregó buffer de carga a cada producto de amplificación y se sembró un gel desnaturalizante (Urea 40% p/v, formamida 40% v/v) en gradiente de poliacrilamida (40 a 60%), generado utilizando una bomba persáltica. La corrida electroforética se realizó durante 16 h a 60°C, 70 V. El gel se tiñó con una solución

de SYBR Safe (1:10.000) (Thermo) durante 1 hora y se visualizó en GelDoc XR (BioRad) (Solaiman y Marschner, 2007).

#### **IV.11 Polimorfismo de longitud de los fragmentos terminales de restricción (T-RFLP)**

A partir de ADN extraído de cultivos de CB1-2 enriquecidos en MM-EL suplementado con: 1%CMC, 0,5%AV, 0,5%Xl o tiras de papel de filtro (PF) (3 repiques de 72 hs a 30°C), se realizó la amplificación del gen 16S rRNA usando los cebadores 27f/1492r. El cebador *forward* se diseñó con marcación de fluorescencia 6-FAM (6 carboxi-fluoresceína) (Liu y col., 1997). Los amplicones se cortaron con enzimas de restricción (*CfoI* y *HaeIII*, Promega) y dichos productos de restricción se separaron por electroforesis capilar en un secuenciador ABI3130xl (Applied Biosystems) (Unidad de Genómica del CICVyA, INTA). Los picos de fluorescencia obtenidos se compararon con los esperados según un análisis *in silico*, para cada uno de los integrantes del consorcio, en base al patrón de restricción de cada enzima. Dado que los géneros *Bacillus-Paenibacillus* y *Pseudomonas-Stenotrophomonas* generaron el mismo patrón de restricción, se analizaron en conjunto. Luego, a partir de la intensidad de la señal fluorescente, evaluada en base a un estándar de peso molecular (ROX 500) con el programa Peak Scanner v 1.0 (Thermo Fisher) se estimó la abundancia relativa de cada género como: el cociente entre la intensidad del pico fluorescente y la sumatoria de la intensidad de fluorescencia de todos los fragmentos generados. Se asumió para ello una proporcionalidad entre el número de copias del gen 16S y la abundancia de las bacterias presentes en la muestra (Grant y col., 2006).

### **V. Métodos enzimáticos**

#### **V.1 Obtención de extractos enzimáticos**

Los sobrenadantes de cultivo libre de células (extractos enzimáticos extracelulares) se obtuvieron a partir de la doble centrifugación a 4.000 rpm, durante 20 min a 4°C, de los cultivos bacterianos. En el caso de cultivos con sustratos insolubles, los mismos se pasaron a través de filtros de fibra de vidrio (1,2 µm, Blummer Shuette), previamente a la centrifugación. Para obtener los extractos enzimáticos intracelulares, se resuspendieron las células centrifugadas en buffer fosfato pH 6,5 y se sonicaron (6 pulsos de 10 seg, 75 W) y centrifugaron a 10.000 rpm, durante 20 min a 4°C. Luego, a ambos extractos se les adicionó inhibidor de

proteasas (Thermo) y azida de sodio al 0,4%, para evitar la proteólisis e inhibir el crecimiento bacteriano, respectivamente.

## **V.2 Cuantificación de proteínas totales**

Las proteínas totales se cuantificaron mediante el método de Bradford (1976) con el reactivo Protein Assay Dye Reagent Concentrated (BioRad) o utilizando el kit comercial basado en el uso del ácido bicinconínico como agente de detección (Micro BCA, Thermo), utilizando una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) en ambos casos.

## **V.3 Actividad endoglucanasa, xilanasa y exoglucanasa**

Las medidas de actividad se realizaron en un volumen final de 200  $\mu$ l, con 100  $\mu$ l de cada sustrato, para una concentración final (Cf) de: CMC 1% (endoglucanasa), XI 0,5% (xilanasa) y AV 0,5% (exoglucanasa), preparado en el buffer a pH adecuado y 100  $\mu$ l de una dilución apropiada de la enzima o del extracto enzimático, en el mismo buffer (reacciones adaptadas a volúmenes menores según King y col., 2009). En los ensayos enzimáticos de especificidad de sustrato, adicionalmente se utilizó celulosa bacteriana microcristalina (BMCC) o celulosa amorfa regenerada (PASC) (Zhang y col., 2006) para medir la actividad celulolítica (Cf: 1mg/ml) y Arabinoxilano de trigo 0,5% (viscosidad media, Megazymes) para determinar actividad xilanasa. Además, en todos los casos se realizaron controles de sustrato y buffer (sin enzima) y de enzima (sin sustrato). Las reacciones se llevaron a cabo en agitador termostatzado (Eppendorf) a 400 rpm, a la temperatura y tiempo requerido, y se detuvieron a 100°C durante 10 minutos. Luego se centrifugaron durante 2 min a máxima velocidad y se midieron los azúcares reductores. Al descontar los controles, se determinó la actividad enzimática en UI/ml de extracto o cultivo o bien UI/mg de proteína (actividad específica). Una unidad internacional (UI) de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu$ mol de producto por minuto, bajo determinadas condiciones de reacción.

## **V.4 Actividad FPasa**

Se llevó a cabo según el método establecido por NREL (Adney y Baker, 2008), adaptado a volúmenes menores. Las reacciones se realizaron utilizando 100  $\mu$ l de buffer al pH adecuado con un disco de papel de filtro de 6 mm de diámetro. Se mantuvieron durante 3 horas en agitador termostatzado (Eppendorf) a 400 rpm. Se

utilizó como control positivo un cóctel celulolítico comercial de *Aspergillus niger* (SIGMA), con actividad conocida ( $\geq 1.000$  UI/gr).

### **V.5 Cuantificación de azúcares reductores**

A 50  $\mu$ l del producto de reacción de hidrólisis (azúcares reductores), se agregaron 100  $\mu$ l del reactivo ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959), lo cual se incubó a 98°C por 5 minutos y luego a 4°C durante 1 minuto. El mismo procedimiento se aplicó en paralelo a una curva patrón de xilosa o glucosa (0-1 mg/ml). El producto coloreado generado se midió a 540nm por espectrometría.

### **V.6 Actividad $\beta$ -glucosidasa, $\beta$ -xilosidasa, arabinofuranosidasa y celobiosidasa**

Se realizaron las reacciones enzimáticas  $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -xilosidasa, arabinofuranosidasa y celobiosidasa (volumen final 200  $\mu$ l), utilizando 100  $\mu$ l de cada sustrato preparado en buffer (para obtener una concentración final de 2,5 mM): 4-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido, 4-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosido, 4-nitrofenil- $\beta$ -D-arabinofuranosido y 4-nitrofenil- $\beta$ -D-celobiosido (SIGMA) y 100  $\mu$ l del extracto enzimático o enzima, durante 20 min a la temperatura y pH apropiados. Luego, se detuvieron las reacciones con 500  $\mu$ l de carbonato de sodio (2% p/v) y se midió la absorbancia a 410 nm. Se utilizó como estándar una curva patrón de *p*-nitrofenol (*p*NP) (SIGMA).

### **V.7 Zimografía**

Se prepararon geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) co-polimerizados con CMC (0,2% p/v) o Xilano (0,1% p/v) (los sustratos sólo se incluyeron en el gel separador). Se agregó a cada muestra el mismo volumen de buffer de muestra para zimografía (2X), sin calentar y se sembraron 15  $\mu$ l por calle. Se realizó la corrida completa a 100 V. Posteriormente, se colocó el gel en un recipiente y se realizaron 3 lavados con buffer 0.04 M TrisHCl pH 6.8, de media hora cada uno, en agitación a temperatura ambiente. Luego del último lavado, se dejó toda la noche en el mismo buffer y al día siguiente se mantuvo 1 h a 30°C. Posteriormente se lavó con agua destilada estéril y se realizó la Tinción de Rojo Congo.

## V.8 Curvas de pH, temperatura y termoestabilidad

El efecto del pH sobre la actividad enzimática se evaluó realizando las reacciones en buffer citrato (pH 3-6), fosfato de sodio (7) y glicina-NaOH (pH 8-12) a una temperatura pre-determinada. El efecto de la temperatura se evaluó a un pH pre-definido, en un rango de temperaturas de 30°C a 80°C, en termomixer.

La estabilidad térmica se evaluó por pre-incubación del extracto enzimático o enzimas purificadas en buffer a pH óptimo y a diferentes temperaturas, con la toma periódica de muestras para la medición de la reacción enzimática correspondiente. Los resultados se expresaron en base a la actividad enzimática residual, es decir al % de actividad respecto de la actividad máxima (100%).

## V.9 Cinética enzimática

En primer lugar se determinó el tiempo en el cual la reacción enzimática transcurrió de forma lineal ( $V_o$ ), para lo cual se ensayó la actividad a diferentes tiempos: 0, 5, 10, 15 y 20 min. Al tiempo correspondiente a la  $V_o$  de la reacción, se determinó la actividad enzimática usando diferentes concentraciones de sustrato (2, 5 y 10 mg/ml) y se evaluaron los parámetros cinéticos de:  $K_M$  o  $K_{half}$ ,  $V_{max}$ , número de recambio ( $k_{cat}$ :  $V_{max}/[Et]$ ), eficiencia catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ) o coeficiente de Hill ( $\eta_H$ ), según correspondiera por el tipo de cinética, utilizando el programa GraphPad Prism version 6.04 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

## V.10 Hidrólisis de biomasa lignocelulósica

Las biomásas lignocelulósicas (trigo, cebada, maíz o residuo de cosecha de caña de azúcar) pre-tratadas (condiciones de pre-tratamiento y composición **Anexo Tabla A1**) se secaron a 70°C en estufa hasta peso constante y se utilizó una suspensión 2% de sólido en la reacción. Para volúmenes de reacción de 1 ml, se utilizaron tubos de plástico de 2 ml, para facilitar la agitación. La enzima purificada o extracto enzimático se agregó a los tubos con biomasa y buffer citrato 0,5 M (al pH indicado para cada reacción) y se llevaron a cabo las reacciones en agitador orbital a 250 rpm, a la temperatura y tiempo requerido. Luego, se detuvo la reacción enzimática a 100°C, 10 min y se centrifugaron las muestras a máxima velocidad durante 20 min. Posteriormente, los sobrenadantes se filtraron con filtro de nylon de 0.2  $\mu$ m para analizar los azúcares solubles por cromatografía.

### V.11 Cromatografía en capa delgada (TLC)

El perfil de azúcares generado luego de las reacciones de hidrólisis se analizó cualitativamente por cromatografía en placas de sílica gel (SIGMA), usando una solución de butanol:ácido acético:agua (2:1:1) como solvente. Luego de la separación completa de las muestras (aproximadamente 3 hs), se reveló la placa con una solución de agua:etanol:ácido sulfúrico (20:70:3) 1% orcinol (SIGMA), sobre el calor directo de una llama.

### V.12 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Los azúcares solubles generados en la reacciones de hidrólisis se detectaron en un equipo de HPLC Agilent serie 1100 equipado con un detector RI (a 35°C) y se utilizaron dos columnas, especificadas en cada ensayo: Aminex HPX-87P (BioRad) y Rezex RPM-Monosaccharide (Phenomenex) (80° C, flujo 0.6 ml/min). La fase móvil consistió en agua a una tasa de flujo de 1 ml/min. La concentración de azúcares (mg/ml) se calculó usando curvas estándar de compuestos puros: Glucosa, Celobiosa, Manosa, Arabinosa, Xilobiosa, Xilosa (SIGMA), Xilotriosa y Xilotetraosa (Megazyme).

## VI. Métodos bioinformáticos

### VI.1 Análisis filogenético

Las bases de datos de secuencias nucleotídicas como BLASTN (del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), RDP Ribosomal Database Project (Cole y col. 2014) (<http://rdp.cme.msu.edu/>) y EzBIOCloud (Yoon y col., 2017) (<http://www.ezbiocloud.net/>) se utilizaron para la identificación de género y especie bacterianas, en base a secuencias curadas del gen 16S rRNA. En el caso de los consorcios, se secuenciaron entre 3 y 5 clones y dado que las secuencias estaban clonadas en vectores, se eliminó de las mismas la región correspondiente al vector, mediante VecScreen del NCBI, con el consiguiente armado de los *contigs* completos utilizando el *software* Bioedit v7 (Hall 1999). Por otro lado, BLASTN y BLASTP (secuencias proteicas) se utilizaron para obtener secuencias homólogas tanto del gen 16S rRNA como del gen codificante para la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa (*gyrB*) y secuencias similares a las proteínas en estudio, para la construcción de los árboles filogenéticos. Aquellas secuencias con alta identidad y cobertura (mayor al 90%) fueron descargadas para la construcción de árboles filogenéticos con las

herramientas disponibles en MEGA software v6.0 (Tamura y col, 2013). Los alineamientos múltiples de todas las secuencias se realizaron con Clustal W (dentro de MEGA), seguido de una mínima edición manual del alineamiento final. Luego, el análisis filogenético se realizó en base a diferentes métodos, según cada tipo de secuencia: Máxima Parsimonia con análisis de Subtree-Pruning-Regrafting SPR (filogenia de aislamientos de CB y VG), Neighbor-Joining y Máxima Verosimilitud (Maximun Likelihood) con análisis Kimura-2 parameter (filogenia de *Paenibacillus* sp. A59) y Neighbor-Joining con método de *p*-distance (secuencias proteicas). El árbol final en cada caso resultó como consenso a partir de 1000 réplicas (*bootstrap*). Secuencias alejadas filogenéticamente se utilizaron como *outgroup*, según se detalla en cada caso.

## VI.2 Anotación funcional del genoma de *Paenibacillus* sp. A59.

El genoma de *Paenibacillus* sp. A59 se secuenció en la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología del CICVyA, INTA. El servicio de secuenciación realizó un análisis de calidad mediante FAST QC v 0.11.2, el cual incluyó varios módulos de control de las secuencias crudas (longitud y calidad de secuencias, contenido de Ns o adaptadores, etc.). A las lecturas o *reads* generadas se les eliminaron los adaptadores de secuenciación y las posiciones de baja calidad utilizando Trimmomatic v0.33 (Bolger y col., 2014) y se realizó el ensamblado *de novo* con Velvet v 1.2.10 (Zerbino y col., 2008). El genoma en formato *draft* se depositó en la base de datos del NCBI, con el N° de acceso: LITU0000000.1, N° de bioproyecto: PRJNA293555 y N° de biomuestra: SAMN04005808.

Los *contigs* generados se anotaron utilizando dos plataformas de anotación automática: Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST) ([www.nmpdr.org](http://www.nmpdr.org)) (Aziz y col., 2008) y Prokaryotic Genome Annotation Pipeline del NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation\\_prok](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok)). Además para evaluar específicamente las CAZymas se utilizó la anotación disponible en la plataforma dbCAN ([www.csbl.bmb.uga.edu/dbCAN](http://www.csbl.bmb.uga.edu/dbCAN)) (Yin y col., 2012). El programa Artemis se utilizó como plataforma para la visualización y el análisis de los genes anotados (Carver y col., 2012). Los programas disponibles en la plataforma Softberry (<http://www.softberry.com/>) BRPOM y FindTerm, se utilizaron para la predicción de promotores y terminadores de la transcripción, respectivamente. El análisis de hibridación ADN-ADN *in silico* se realizó utilizando el genoma ensamblado como

*input*, en la plataforma GGDC (*Genome to Genome Distance Calculator*) del Instituto Leibniz DSMZ ([www.ggdc.dsmz.de/](http://www.ggdc.dsmz.de/)) (Meier-Kolthoff y col., 2013).

### **VI.3 Modelado molecular de endoxilanasas**

Las estructuras moleculares de las proteínas de interés se generaron usando el programa de modelado *online* I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) (Yang y col., 2015). Para construir el modelo, el programa utilizó estructuras de proteínas similares de la biblioteca PDB (Protein Data Bank) (<http://www.rcsb.org>) mediante LOMETS (combinación de 10 programas: MUSTER, FFAS3D, SPARKSX, HHSEARCH2 5, HHSEARCH I, NeffPPAS, HHSEARCH, pGenTHREADER, cdPPAS, PROSPECT2). Los fragmentos de templados con el máximo nivel de significancia (medido mediante el *Z score*) se re-ensamblaron en un modelo de longitud completa. El modelo final de I-TASSER fue el resultado de una segunda simulación donde se refinó su topología global. El nivel de confianza de cada modelo se determinó cuantitativamente por el *C-score*, *TM-score* y RMSD. El *C-score* tiene un valor típico entre [-5, 2], donde un valor alto representa un alto nivel de confianza y viceversa. El *TM-score* tiene valores en un rango de [0, 1], donde 1 indica una similitud perfecta entre dos estructuras. El RMSD representa la distancia promedio entre los átomos de dos proteínas superpuestas. El análisis funcional se realizó también por I-TASSER, utilizando COACH (combinando los programas COFACTOR, TMSITE y SSITE) e incluyendo la predicción de los sitios de unión a ligandos. La manipulación para obtener la figura final de los modelos se realizó usando Chimera software v1.11 (Pettersen y col., 2004).

### **VI.4 Análisis estadístico**

Las diferencias estadísticamente significativas se calcularon en base al análisis de varianza unifactorial (ANOVA), seguido del Test de Tukey ( $p < 0.01$ ) usando GraphPad v 6.0 (Swift, 1997). Todos los datos correspondientes a los ensayos descritos en cada sección se obtuvieron a partir de dos réplicas biológicas independientes, con tres determinaciones o réplicas técnicas cada una.

# Resultados



## **Parte I**

# **Bioprospección de bacterias celulolíticas de suelos forestales como fuente de nuevas enzimas**

## I.1 Aislamiento e identificación de bacterias celulolíticas

En este trabajo se seleccionaron suelos de bosques nativos prístinos, con signos evidentes de degradación de biomasa lignocelulósica (**Figura R1**), con la finalidad de obtener una colección de aislamientos celulolíticos. Las muestras de suelo, denominadas CB y VG según su lugar de procedencia (Cerro Bayo y Valle Grande), presentaron diferencias en cuanto al pH, carbono y materia orgánica (**Tabla R1**). Los cultivos de enriquecimiento de CB y VG alcanzaron una densidad óptica (DO) máxima a las 48 hs de 0,47 y 0,56 correspondientes a  $0,98 \times 10^{13}$  UFC/ml y  $1,28 \times 10^{13}$  UFC/ml, respectivamente.



**Figura R1.** Área de toma de muestra. Muestras obtenidas de suelo forestal superficial.

<b>Tabla R1: Características fisicoquímicas de las muestras de suelo</b>			
<b>Suelo</b>	<b>pH</b>	<b>% materia orgánica</b>	<b>% carbono orgánico</b>
<b>Cerro Bayo</b>	4,5	13,7	7,9
<b>Valle Grande</b>	7,7	4,3	2,5

Las bacterias celulolíticas provenientes de esas muestras de suelo se enriquecieron usando un derivado soluble de la celulosa, carboximetilcelulosa (CMC), como única fuente de carbono. Para su aislamiento se evaluaron dos medios salinos (MM y MS) con y sin suplemento de extracto de levadura (EL), también con CMC, con posterior visualización del halo de hidrólisis, luego de la tinción de Rojo Congo (RC) (**Figura R2a**).

Los medios suplementados con EL permitieron el desarrollo de colonias de mayor tamaño y a tiempos más cortos (24 hs). Por otro lado, el MM como base de sales minerales para el cultivo permitió un mayor desarrollo de bacterias celulolíticas (colonias con halo) que el MS. Posiblemente la presencia en el MM de biotina, ácido nicotínico y ácido pantoténico favoreció el crecimiento de bacterias con mayores requerimientos nutricionales. Es por ello que en adelante se continuó empleando

MM suplementado con EL como medio basal para ser suplementado con un sustrato de interés.

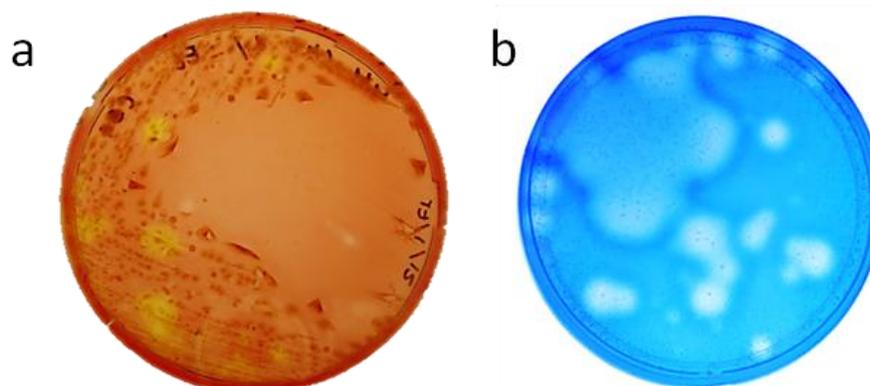
Con este procedimiento se obtuvo en primera instancia una colección de 22 aislamientos celulolíticos (15 provenientes de muestras de suelos de CB y 7 de VG), a partir de placas sembradas por estrías en MM-CMC (13 aislamientos), MM-CMC-EL (6 aislamientos) y MS-CMC (3 aislamientos). De esta colección se seleccionaron 7 que mantuvieron la capacidad de degradación de CMC luego de repiques sucesivos: CB1-2, CB1-7, CB1-8, CB2-1, CB2-5, VG-4 y VG-5.

Para el monitoreo de repiques sucesivos, ensayamos la tinción con Azul Tripán (AT) como método alternativo a la tinción con RC. Si bien ambos métodos se basan en el mismo principio, que es la tinción del polímero celulósico (y por lo tanto formación del halo de hidrólisis en el caso de actividad enzimática), la diferencia radica en que mientras el RC se aplica sobre la placa, una vez formadas las colonias, el AT se incorpora al medio en la preparación de la placa, lo cual evita tinción posterior (que en algunos casos llevaba a que se levanten las colonias). Esto permitió una mejor individualización de las colonias con actividad.

En los 7 aislamientos se observaron colonias de mayor tamaño con actividad celulolítica y colonias pequeñas sin actividad (**Figura R2b**), que resultaron difíciles de separar, lo cual sugirió que dichos aislamientos podían corresponder a consorcios integrados por bacterias con capacidad de degradar celulosa y por otras bacterias con un rol complementario.

La capacidad de los aislamientos de utilizar sustratos celulósicos o hemicelulósicos como única fuente de carbono se determinó en base a su capacidad de crecimiento (en medio líquido o medio sólido, dependiendo del sustrato) y en base al diámetro del halo de hidrólisis respecto del halo de la colonia (definida como capacidad hidrolítica) (**Tabla R2**).

Todos los aislamientos fueron capaces de crecer utilizando los sustratos como fuente de carbono. VG-4 mostró además signos de degradación del papel de filtro (**Figura R3a**) sugiriendo capacidad celulolítica total, es decir capacidad de hidrólisis de la fase amorfa y cristalina de la celulosa del papel.



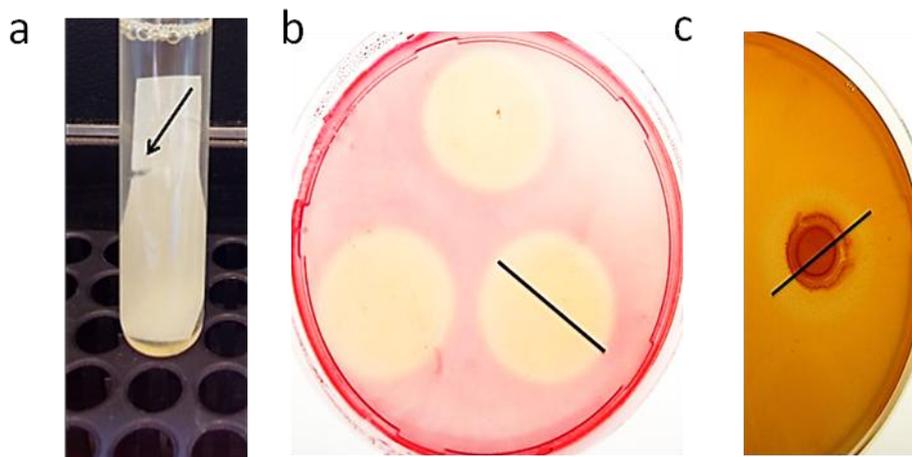
**Figura R2. Cultivo de bacterias celulolíticas.** (a) Estría por agotamiento a partir del cultivo de enriquecimiento de CB, en MM-1%CMC-0,1%EL, seguido de tinción con Rojo Congo. (b) Estría de CB1-2 en MM-1%CMC-0,1%EL-0.01% AT. Los halos alrededor de las colonias son indicativos de actividad celulolítica.

**Tabla R2: Crecimiento y capacidad hidrolítica de los aislamientos bacterianos en diferentes sustratos (hemi)celulósicos.**

Nombre	Crecimiento en CMC o AV	Capacidad hidrolítica (CH) en CMC ( $\pm$ de)	Crecimiento en XI / Capacidad hidrolítica (CH) en XI ( $\pm$ de)	Crecimiento (C) y/o degradación (D) de PF
CB1-2	+	3.61 $\pm$ 0.64	+ / 1.58 $\pm$ 0.11	C
CB1-7	+	1.23 $\pm$ 0.10	+	C
CB1-8	+	1.21 $\pm$ 0.11	+	C
CB2-1	+	1.11 $\pm$ 0.10	+	C
CB2-5	+	2.97 $\pm$ 0.90	+	C
VG-4	+	3.33 $\pm$ 0.45	+ / 1.27 $\pm$ 0.25	C+D
VG-5	+	3.76 $\pm$ 0.41	+	C

La capacidad hidrolítica (CH) es una estimación cuantitativa de la habilidad de un aislamiento de secretar enzimas capaces de hidrolizar un sustrato y es un ensayo preliminar muy utilizado para seleccionar aislamientos en estudios de bioprospección. En este trabajo, CB1-2 (**Figura R3b**), CB2-5, VG-4 y VG-5 presentaron los niveles más altos de CH para CMC, indicando que son los que tendrían mayor actividad endoglucanasa.

CB1-2 y VG-4 también fueron capaces de hidrolizar el xilano, lo cual se evidenció por la formación de un halo de hidrólisis (**Figura R3c**), indicando que las bacterias que lo integran son secretoras de enzimas xilanolíticas. El resto de los aislamientos, si bien crecieron en xilano, no mostraron hidrólisis del mismo, probablemente debido a una secreción baja o basal de las enzimas xilanolíticas.



**Figura R3. Actividad celulolítica de CB1-2 y VG-4:** Determinación del crecimiento de VG4 sobre papel de filtro (a) y de la capacidad hidrolítica de CB1-2 sobre CMC (b) y de VG-4 sobre xilano (c). La línea representa el diámetro del halo de hidrólisis. La tinción se realizó con Rojo Congo.

Los géneros bacterianos correspondientes a los 7 aislamientos seleccionados, se identificaron por amplificación y posterior secuenciación del gen codificante para la subunidad 16S del rRNA, que es utilizado como marcador molecular debido a la presencia de regiones conservadas y otras altamente variables. La tipificación molecular bacteriana se complementó con el análisis microbiológico básico (morfología y tinción de Gram), los cual se detalla en la **Tabla R3**. Todos los análisis de homología resultaron en un porcentaje de identidad mayor al 85%, con una cobertura de secuencia mayor al 94%. En el caso de CB1-2 y VG-4 se observaron bacilos Gram positivos y Gram negativos al microscopio óptico, indicando que efectivamente no correspondían a aislamientos puros sino a consorcios bacterianos, lo cual se confirmó mediante la identificación de géneros diferentes (CB1-2: *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Bacillus* y *Stenotrophomonas* y VG4: *Stenotrophomonas*, *Achromobacter* y *Lysinibacillus*). Por otro lado, en el caso de CB2-1 y CB1-8 se identificó más de un género bacteriano (*Bacillus*, *Stenotrophomonas* y *Pseudomonas*; *Viridivacillus* y *Brevundimonas*, respectivamente) aun cuando la observación microscópica indicó una morfología y tinción homogéneas. CB1-7 también resultó integrado por bacterias de diferentes géneros (*Psycrobacillus* y *Bacillus*), lo cual coincide con lo observado por microscopía, dado que se trata de bacilos Gram positivos. La identificación de bacterias pertenecientes únicamente al género *Lysinibacillus* en CB2-5 y VG-5 indicó que podría tratarse de cultivos puros. Sin embargo no se pudo descartar que estos aislamientos fueran también consorcios y que los otros miembros no hayan

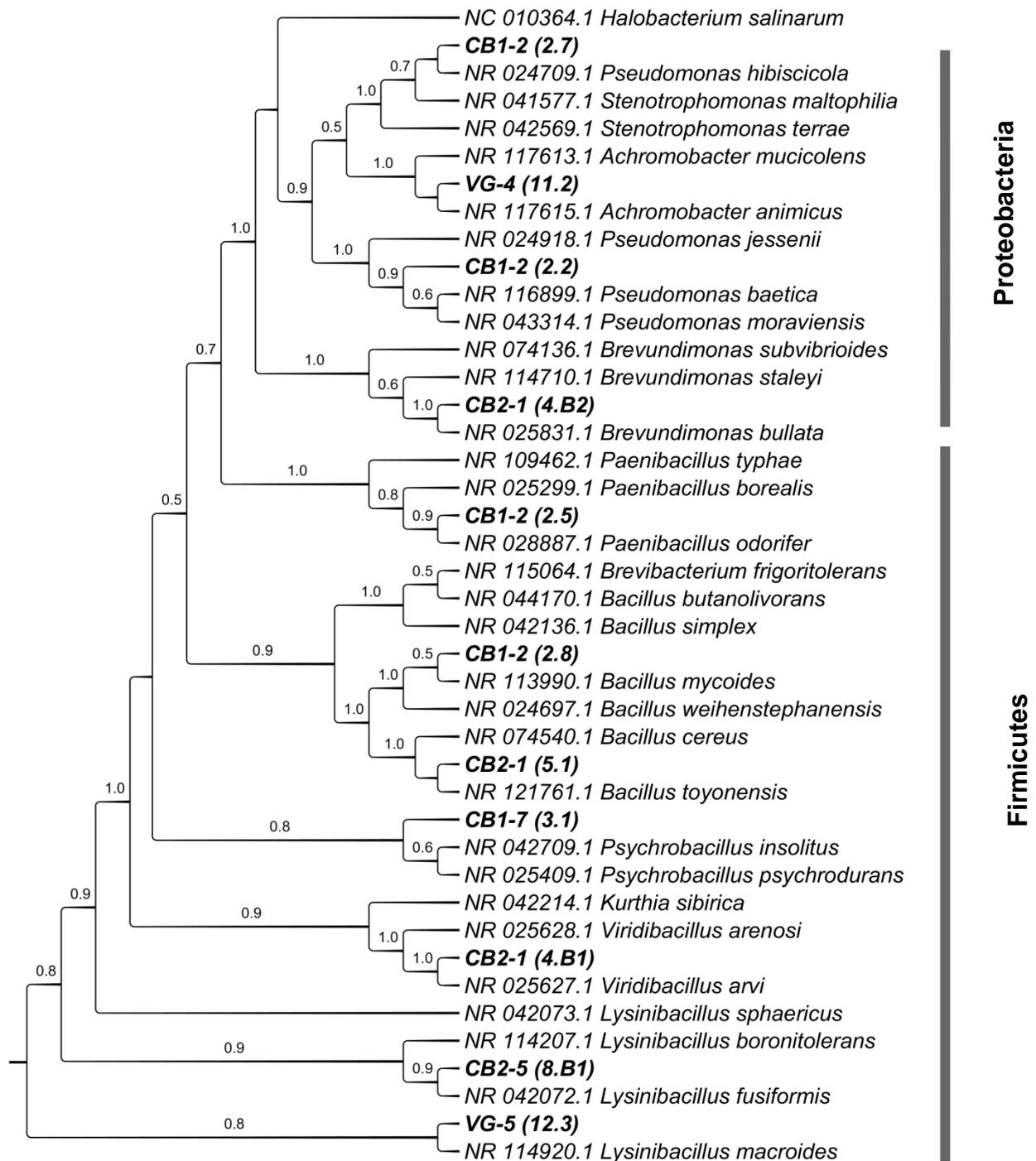
sido puestos en evidencia mediante nuestro análisis, dado que en placas con CMC se observaron colonias con y sin capacidad celulolítica.

Para confirmar la identidad de los integrantes de los consorcios celulolíticos, se estudiaron sus relaciones filogenéticas en base a la secuencia del gen 16S rRNA, con secuencias homólogas. El árbol filogenético (**Figura R4**) se construyó utilizando clones diferentes (2.2, 2.5, 2.7, 2.8, 3.1, 5.1, 4b1, 4b2, 8b1, 11.2, 12.3) seleccionados de la **Tabla R1**. En primer lugar se observó que todos los aislamientos se agruparon dentro de dos *phylum* diferentes: *Proteobacteria* y *Firmicutes*. Los distintos clados originados mostraron un sustento alto, con valores de *bootstrap* mayores al 60%, siendo en la mayoría de los casos superiores a 90%. Las diferentes secuencias se distribuyeron en 8 clados, formados por especies de *Stenotrophomonas/Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Brevundimonas*, y la mayoría pertenecientes al orden *Bacillales*: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Psychrobacillus*, *Viridibacillus* y *Lysinibacillus*.

En base a los resultados obtenidos en relación a la actividad enzimática, los consorcios CB1-2 y VG-4 resultaron los más promisorios. Sin embargo, los resultados de VG4 presentaron baja reproducibilidad, posiblemente por inestabilidad del consorcio, por lo que se profundizó el estudio de CB1-2.

Tabla R3: Identificación, morfología y tinción de Gram de bacterias celulolíticas de suelos forestales de Cerro Bayo y Valle Grande							
	Morf./ Gram	Clon	N° pb	Identificación de género (EzBio Cloud y RDP)	Identificación de Especie		
					Top BLASTn (16S rRNA)	% ID	% C
<b>CB1-2</b>	Bacilos G + y G -	2.2	1560	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.moraviensis</i>	99	97
		2.3	1080	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>S. maltophilia</i>	85	96
		2.5	1495	<i>Paenibacillus</i>	<i>P. odorifer</i>	98	95
		2.6	965	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.baetica</i>	99	95
		2.7	1223	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>S. maltophilia</i>	92	99
		2.8	1522	<i>Bacillus</i>	<i>B. weihenstephanensis</i>	99	98
<b>CB1-7</b>	Bacilos espor. G +	3.1	1296	<i>Psychrobacillus</i>	<i>P. insolitus</i>	97	95
		3.2	967	<i>Bacillus</i>	<i>B. weihenstephanensis</i>	97	97
		3.3	974	<i>Bacillus</i>	<i>B. frigoritolerans</i>	98	97
<b>CB1-8</b>	Bacilos G +	4b1	1497	<i>Viridibacillus</i>	<i>V. arvi</i>	99	99
		4b2	1411	<i>Brevundimonas</i>	<i>B. bullata</i>	98	98
		4b3	884	<i>Viridibacillus</i>	<i>V. arvi</i>	96	95
<b>CB2-1</b>	Bacilos G+	5.1	1532	<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i>	99	99
		5.2	771	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>S. maltophilia</i>	99	95
		5.3	914	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. baetica</i>	95	97
		5.4	950	<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i>	99	98
<b>CB2-5</b>	Bacilos G +	8b1	1604	<i>Lysinibacillus</i>	<i>L. fusiformis</i>	99	94
		8b2	1495	<i>Lysinibacillus</i>	<i>L. fusiformis</i>	99	99
		8b4	884	<i>Lysinibacillus</i>	<i>L. fusiformis</i>	99	97
		8b5	912	<i>Lysinibacillus</i>	<i>L. fusiformis</i>	99	98
		8b6	923	<i>Lysinibacillus</i>	<i>L. fusiformis</i>	99	96
<b>VG-4</b>	Bacilos G + y G -	11.1	899	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>S. maltophilia</i>	97	97
		11.2	1541	<i>Achromobacter</i>	<i>A. mucicolens</i>	99	97
		11.3	872	<i>Lysinibacillus</i>	<i>L. macroides</i>	100	96
<b>VG-5</b>	Bacilos G +	12.1	945	<i>Lysinibacillus</i>	<i>L. macroides</i>	99	97
		12.2	948	<i>Lysinibacillus</i>	<i>L. macroides</i>	94	99
		12.3	1224	<i>Lysinibacillus</i>	<i>L. macroides</i>	99	99

G:Gram, Espor.: esporulados; Morf.: Morfología; pb: Pares de bases; ID: Identidad; C: Cobertura. Las secuencias correspondientes al gen 16S rRNA fueron depositadas en GenBank (NCBI), con números de acceso asignados entre JX992628 y JX992655.

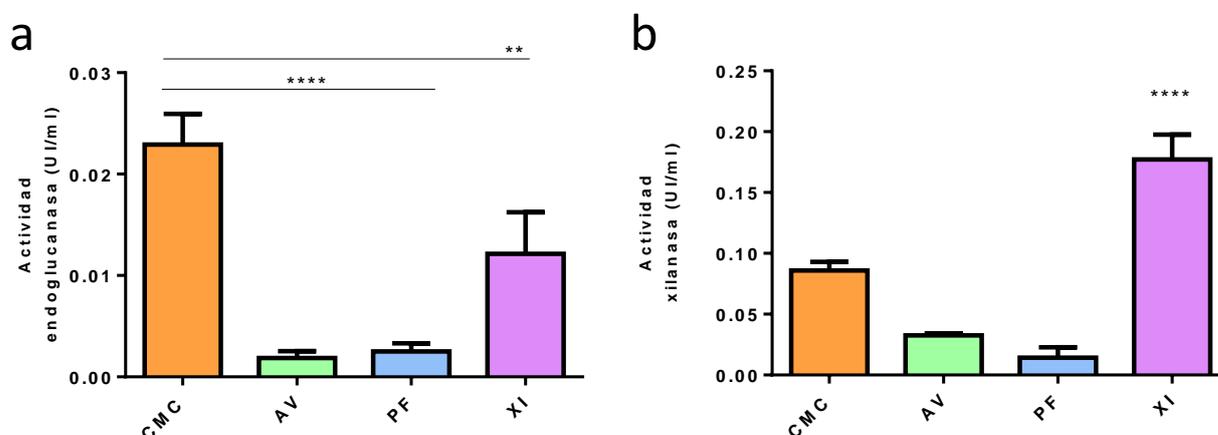


**Figura R4. Análisis filogenético de secuencias 16S rRNA de bacterias celulolíticas:** Dendrograma de Máxima Parsimonia (Subtree-Pruning-Regrafting SPR) originado a partir de 41 secuencias de 16S rRNA, correspondientes a clones obtenidos de bacterias celulolíticas aisladas de muestras de suelos forestales y otras secuencias con alta identidad. El árbol originado es un consenso a partir de 1000 *bootstrap* (solo se muestran valores mayores al 50%). *Halobacterium salinarum* fue usado como *outgroup* (MEGA v6.0).

## I.2 Rol de los integrantes del consorcio CB1-2 en la actividad enzimática

La composición relativa de las comunidades microbianas puede sufrir variaciones según los sustratos disponibles. Por lo tanto se evaluó si la actividad enzimática y la abundancia relativa de los distintos géneros integrantes de CB1-2, que habían sido identificados previamente como *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*, varía en relación al polisacárido utilizado como fuente de carbono. Se realizó entonces el enriquecimiento sucesivo de CB1-2 en MM-EL suplementado con CMC, AV, XI o PF y se midió la actividad enzimática endoglucanasa y xilanasa en los sobrenadantes libres de células.

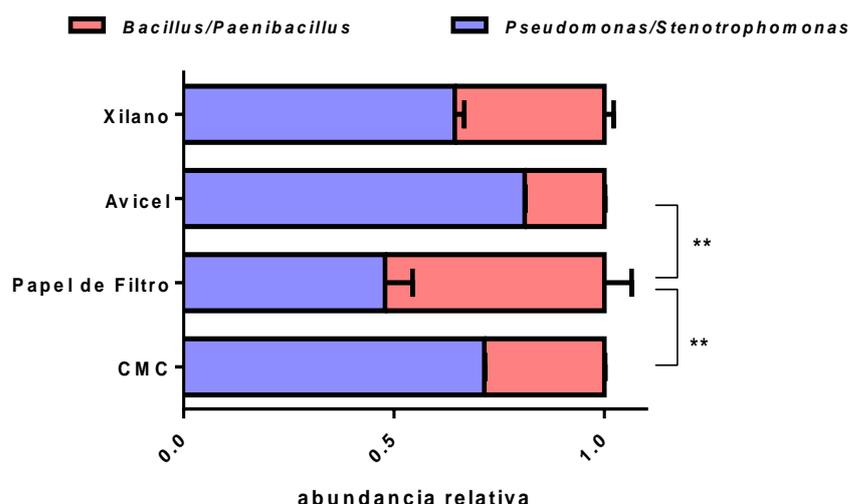
El cultivo de CB1-2 en CMC ( $7,2 \times 10^9$  UFC/ml) resultó en una mayor actividad endoglucanasa y del mismo modo, la mayor actividad xilanasa fue alcanzada luego del cultivo en xilano ( $9,5 \times 10^9$  UFC/ml) (**Figura R5**). Esto confirmó la inducción de enzimas celulolíticas o xilanolíticas mediante el enriquecimiento previo con fuentes de carbono celulósicas o hemicelulósicas, respectivamente. El hecho de haber detectado actividad endoglucanasa por cultivo en xilano y CMCasa por cultivo en xilano, podría indicar una inducción cruzada.



**Figura R5. Actividad del consorcio CB1-2 en diferentes condiciones de cultivo:** Actividad endoglucanasa (a) y xilanasa (b) del sobrenadante de cultivo libre de células de CB1-2 cultivado en CMC, AV, PF y XI. Los gráficos de barras muestran el promedio  $\pm$  desvío estándar de cada actividad, a partir de tres réplicas técnicas. Las diferencias estadísticamente significativas (\*) fueron determinadas por ANOVA unifactorial, seguido de Test de Tukey ( $p < 0.01$ ) (GraphPad Prism 6).

Los cultivos en Avicel y en papel de filtro resultaron en menor crecimiento ( $7,6 \times 10^8$  UFC/ml y  $2,2 \times 10^8$  UFC/ml, respectivamente) y en muy baja actividad en el sobrenadante de cultivo, por lo que resultaron sustratos poco eficientes para los fines de este trabajo.

La variación de la actividad enzimática en los sobrenadantes de cultivo estudiados podría deberse o bien a cambios en la composición del consorcio o a cambios en la expresión de las enzimas necesarias para la utilización de dichos sustratos. Se realizaron entonces estudios dirigidos a analizar el comportamiento de la composición relativa del consorcio en presencia de las diferentes fuentes de carbono, mediante 16S-TRFLP. Este análisis reveló una mayor abundancia relativa de bacterias de los géneros *Pseudomonas/Stenotrophomonas* sobre *Bacillus/Paenibacillus*, en los cultivos con CMC, Avicel y Xilano, y una distribución más pareja por enriquecimiento en papel de filtro (**Figura R6**), lo cual no resultó concluyente para explicar la actividad enzimática observada. Dada la alta homología en las secuencias de 16S rRNA entre *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas* o *Bacillus* y *Paenibacillus*, el análisis de 16S-TRFLP se realizó en conjunto, por lo que para comprender el rol de cada uno de los integrantes del consorcio por separado, fue necesario el aislamiento de todos ellos.



**Figura R6. Abundancia relativa de los integrantes del consorcio CB1-2:** 16S-TRFLP del consorcio CB1-2 enriquecido en CMC, Avicel, Papel de Filtro y Xilano. Las barras indican el promedio  $\pm$  desvío estándar de la abundancia relativa de cada grupo bacteriano. Las diferencias estadísticamente significativas (\*) fueron determinadas por ANOVA unifactorial, seguido de Test de Tukey ( $p < 0.01$ ) (GraphPadPrism 6).

CB1-2 podría tratarse de un consorcio obligado cuya actividad hidrolítica sería consecuencia de la acción conjunta de todos los miembros del mismo, o bien uno de sus integrantes podría ser la especie clave responsable de la actividad. En este último caso no sería necesaria la presencia de todos para la hidrólisis de sustratos. Para responder este interrogante se procedió al intento de aislamiento de los integrantes de CB1-2, por cultivo en medio MM líquido con celobiosa (dímero de glucosa), Avicel y Solka flocc (celulosa microcristalina) o CMC, con posterior

aislamiento en placas con el mismo medio. La utilización diferencial de sustratos por parte de cada miembro del consorcio, permitió su separación en base a características morfológicas y actividad enzimática.

Luego de 4 repiques en MM-CMC, con Azul Tripán para realizar el seguimiento de colonias con y sin actividad, se obtuvo un aislamiento con halo de hidrólisis (A59) y uno sin actividad (CMC-B). Por otro lado, a partir de placas con celobiosa, solo se obtuvo un aislamiento con características uniformes (CB-A) y mediante el cultivo en celulosa cristalina, tanto en Avicel como en Solka floc, se obtuvieron dos aislamientos con diferente morfología: colonias grandes con bordes irregulares (AV-A y SF-A) y colonias redondas y pequeñas (AV-B y SF-B).

Los aislamientos obtenidos fueron identificados mediante amplificación y secuenciación directa del gen codificante para el 16S rRNA (**Tabla R4**), y resultaron clasificados taxonómicamente dentro de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas* con niveles de identidad mayor a 99%, con 100% de cobertura de secuencia. Fueron denominados *Paenibacillus* sp. A59, *Bacillus* sp. AV-A, *Pseudomonas* sp. CB-A y *Stenotrophomonas* sp. AV-B.

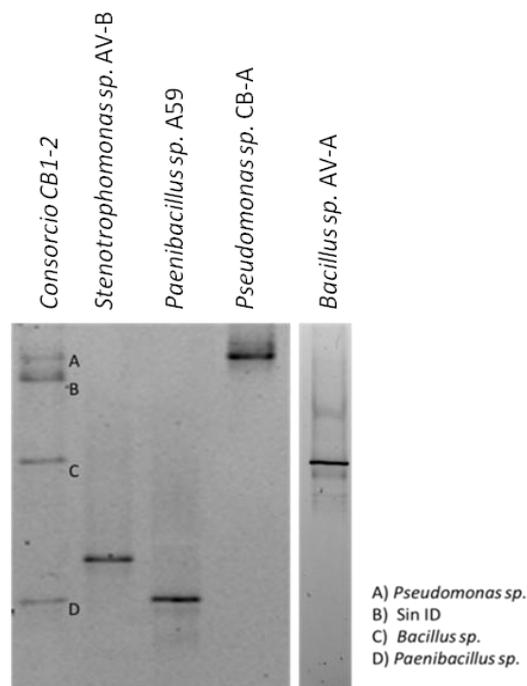
Para confirmar si se había logrado el aislamiento de todos los miembros del consorcio, se analizó CB1-2 en comparación con los aislamientos obtenidos, mediante 16S-DGGE. Este procedimiento permitió el análisis de fragmentos de ADN de un mismo tamaño (en este caso la región V3 hipervariable del gen codificante para la subunidad 16S del rRNA) con diferencias en sitios puntuales de su secuencia y posterior corrida electroforética en un gel con gradiente desnaturante.

**Tabla R4: Crecimiento e identificación de los integrantes del consorcio CB1-2**

Sustrato	Aislamiento	Morfología de colonia	Identificación de especie		
			Top BLASTn	ID (%)	Cob. (%)
CMC	A59	Medianas	<i>Paenibacillus taichungensis</i>	99	98
	CMC-B	Pequeñas punteadas	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99	100
Celobiosa	CB-A	Medianas	<i>Pseudomonas brenneri</i>	99	100
Avicel	AV-A	Grandes, irregulares	<i>Bacillus mycoides</i>	99	100
	AV-B	Pequeñas punteadas	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	98	100
Solka floc	SF-A	Grandes, irregulares	<i>Bacillus mycoides</i>	99	100
	SF-B	Pequeñas punteadas	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99	100

Por escisión de las bandas correspondientes al consorcio CB1-2 se identificaron los géneros correspondientes a cada una (**Figura R7**). Los resultados obtenidos correspondieron a tres de los aislamientos previamente obtenidos: *Pseudomonas* sp. CB-A, *Bacillus* sp. AV-A y *Paenibacillus* sp. A59, aunque no se observó ninguna banda correspondiente a *Stenotrophomonas* sp. AV-B. Esto podría deberse a una menor representación de este género en el consorcio. En el análisis de CB1-2, debajo de la banda identificada como *Pseudomonas* sp. CB-A, se observó otra que no pudo ser identificada por mostrar cromatogramas de secuenciación superpuestos. Esta podría tratarse de una banda doble correspondiente únicamente a *Pseudomonas* sp. CB-A, dado que las dobles bandas son un artefacto observado frecuentemente en geles de DGGE (Janse 2004).

Se confirmó así que los aislamientos obtenidos correspondían a todos los integrantes del consorcio CB1-2 y que efectivamente se trató de aislamientos puros ya que no se observaron otras bandas en las corridas de cada uno de ellos.

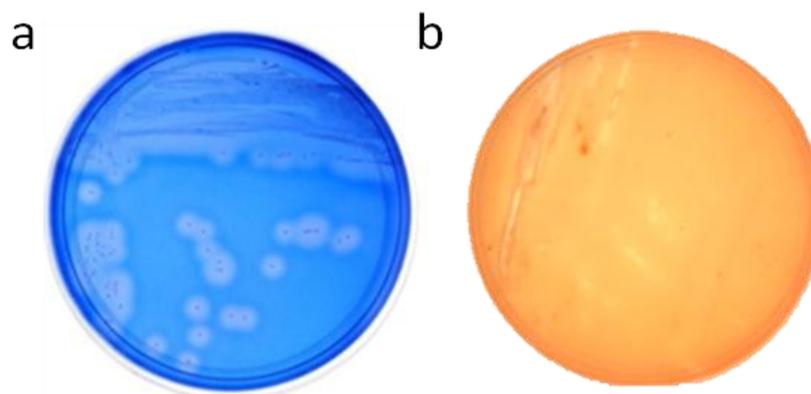


**Figura R7. 16S-DGGE del consorcio CB1-2 e integrantes del mismo:** Corrida electroforética en gel de poliacrilamida 6%, con gradiente desnaturante (40-60% de Urea y formamida) y posterior tinción con *SyberSafe*. Las bandas indicadas con letras (A-D) fueron escindidas del gel e identificadas por secuenciación.

Para analizar el rol de *Bacillus* sp. AV-A, *Paenibacillus* sp. A59, *Pseudomonas* CB-A y *Stenotrophomonas* sp. AV-B en la actividad del consorcio CB1-2, se hizo una evaluación preliminar cualitativa de la actividad CMCasa y xilanasa de los mismos en

placas con CMC y XI, resultando *Paenibacillus* sp. A59 el único con actividad hidrolítica detectable (**Figura R8 a y b**). Luego, para indagar en la posibilidad de que los demás integrantes tuvieran otras capacidades celulolíticas se cuantificó la actividad de los extractos enzimáticos bacterianos, ya que las enzimas que hidrolizan polímeros hemicelulósicos en general son secretadas al exterior celular mientras que aquellas que convierten oligosacáridos a monómeros son enzimas intracelulares. Entonces, por un lado se midió la actividad endoglucanasa, xilanasa, FPasa y exoglucanasa del sobrenadante de cultivo libre de células (extracto enzimático extracelular) de cada aislamiento y por otro lado la actividad  $\beta$ -xilosidasa y  $\beta$ -glucosidasa del extracto obtenido a partir de lisis celular por sonicado (extracto intracelular), de cultivos en CMC y en xilano, según la actividad a ensayar (endoglucanasa/FPasa/exoglucanasa/ $\beta$ -glucosidasa o xilanasa/ $\beta$ -xilosidasa respectivamente).

*Paenibacillus* sp. A59 fue el único aislamiento con actividad detectable, tanto en el sobrenadante de cultivo como en el extracto intracelular. Las actividades detectadas bajo estas condiciones fueron actividad xilanasa ( $0.26 \pm 0.01$  UI/ml) y endoglucanasa ( $0.025 \pm 0.1$  UI/ml) en extracto extracelular y actividades  $\beta$ -xilosidasa ( $12.3 \pm 0.6$  mUI/ml) y  $\beta$ -glucosidasa ( $10.8 \pm 0.8$  mUI/ml) en el extracto intracelular (a partir de cultivos en xilano y CMC, respectivamente). No se detectó actividad exoglucanasa o FPasa en las condiciones ensayadas. Aún cuando alcanzaron crecimientos similares (CMC  $7 \times 10^{11}$  UFC/ml y XI  $3 \times 10^{11}$  UFC/ml), el contenido de proteínas totales fue significativamente mayor en los extractos enzimáticos extracelulares obtenidos a partir del cultivo en XI (0.1 mg/ml extracelular; 0.2 mg/ml intracelular) que en CMC (0.01 mg/ml extracelular; 0.12 mg/ml intracelular), lo cual se correlaciona con los niveles de actividad observados. Esto implicaría que este aislamiento secreta mayor cantidad de proteínas en presencia de una fuente de hemicelulosa, como es el xilano. Ninguno de los otros aislamientos obtenidos presentó actividad.



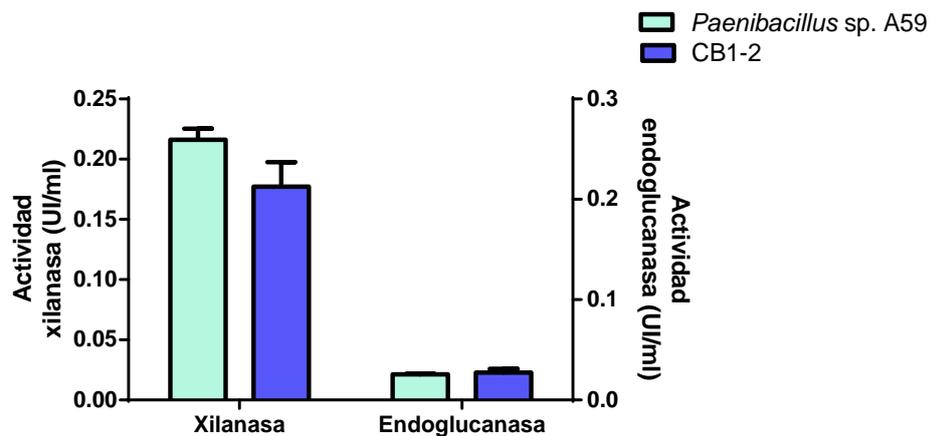
**Figura R8. Actividad de *Paenibacillus* sp. A59:** Actividad celulolítica en placas de MM-1%CMC-0,1%EL-0,01% Azul Tripán, luego de incubación por 48 hs a 30°C **(a)** y actividad xilanolítica en MM-0.5%Xl-0.1%EL, con posterior tinción de Rojo Congo **(b)**. En ambas placas se evidencian los halos de hidrólisis.

Las bacterias del género *Stenotrophomonas* sp. se obtuvieron por aislamiento en placas junto con *Bacillus* o *Paenibacillus*. Esto sugiere que *Stenotrophomonas* sp. podría tener la capacidad de asimilar y utilizar los oligosacáridos producto de la hidrólisis de los sustratos complejos generados por otras bacterias, sin requerir de la producción propia de celulasas, posiblemente mediante transportadores de oligosacáridos pequeños. El aislamiento de *Pseudomonas* sp., por otro lado, solo fue posible mediante el crecimiento en placas con una fuente de fácil asimilación, como el dímero celobiosa, lo cual implicaría que también es capaz de utilizar azúcares solubles pero no de degradar los polímeros.

En el caso de *Bacillus* sp., el mismo fue aislado en medio con celulosa microcristalina, si bien no se detectó actividad celulolítica o xilanolítica en los sobrenadantes de cultivo en las condiciones ensayadas. Las bacterias del género *Bacillus* han sido descritas como productoras de numerosas enzimas y otras proteínas, como proteasas (Shafi y col., 2017). Por lo tanto, no podemos descartar que este aislamiento esté produciendo enzimas cuyo nivel de actividad podría estar por debajo del límite de detección de los métodos utilizados, pero que sin embargo le permite a la bacteria crecer en el medio con Avicel o Solka Floc como fuente de carbono.

Todos los resultados descriptos anteriormente indicaron a *Paenibacillus* sp. A59 como el único integrante con actividad celulolítica del consorcio CB1-2 y que a su vez el uso de CMC y XI garantizaron su máxima actividad endoglucanasa y xilanasa, respectivamente. El diseño de estrategias para el desarrollo de extractos enzimáticos se basa en decidir el uso del consorcio completo o bien de su único integrante celulolítico, lo cual dependía en primera instancia de comparar la

actividad entre ambos. Es importante recalcar que la obtención de extractos enzimáticos a partir de consorcios bacterianos es compleja dado que el escalado del mismo requiere de condiciones que permitan una composición estable y en la cual sea optima la producción enzimática. Afortunadamente, la actividad endoglucanasa y xilanasa de los extractos enzimáticos del consorcio CB1-2 y del aislamiento *Paenibacillus* sp. A59 fueron similares, con un contenido de proteínas totales en el mismo orden entre ambos (desde cultivo en CMC aproximadamente 0.06 mg/ml y en XI 0.25 mg/ml) (**Figura R9**).



**Figura R9. Actividad comparada entre CB1-2 y *Paenibacillus* sp. A59:** Las barras indican el promedio  $\pm$  desvío estándar ( $n=3$ ), de la actividad xilanasa y endoglucanasa de los sobrenadante de cultivo de *Paenibacillus* sp. A59 y CB1-2, obtenidos a partir de cultivos de 72 hs. en MM-XI-EL (xilanasa) y MM-CMC-EL (endoglucanasa), a 30°C.

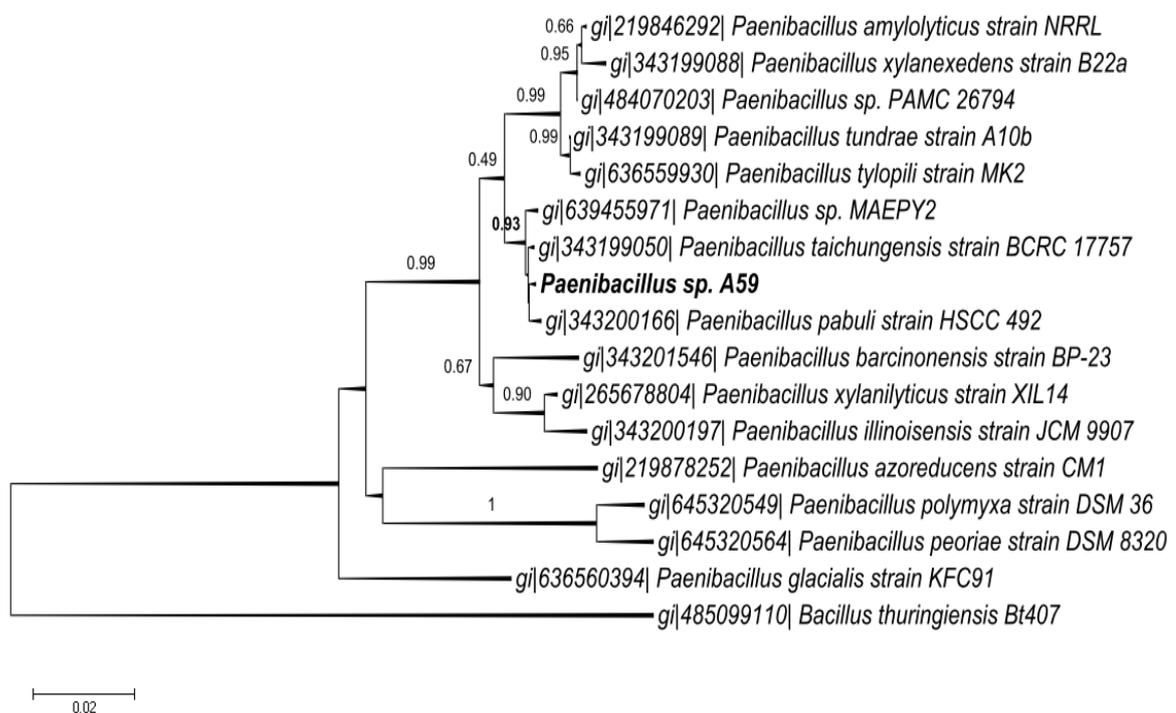
En base a esto, se decidió profundizar en el estudio de *Paenibacillus* sp. A59 como fuente de nuevas enzimas, mediante la caracterización fisiológica, genómica y proteómica del mismo para comprender los mecanismos involucrados en su actividad (hemi) celulolítica.

## **Parte II**

**Caracterización fisiológica, bioquímica,  
genómica y proteómica de *Paenibacillus* sp. A59 y el  
posible rol de las enzimas (hemi)celulolíticas  
secretadas**

## II.1 Clasificación filogenética de *Paenibacillus* sp. A59

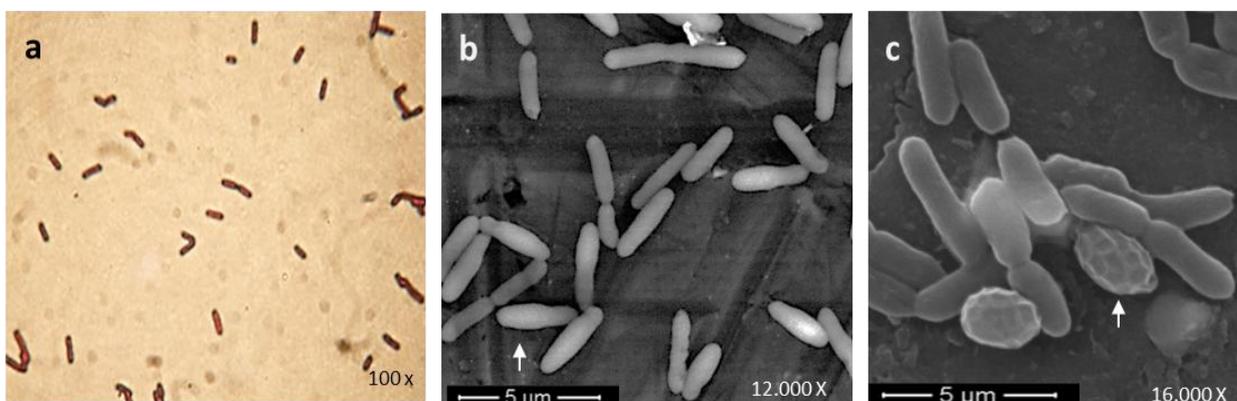
El estudio de las relaciones filogenéticas así como también la evaluación de las características fenotípicas principales de un nuevo aislamiento constituyen un punto de partida fundamental para clasificarlo y estudiar comparativamente su potencialidad genética o enzimática. La secuencia del gen completo codificante para la subunidad 16S del rRNA de *Paenibacillus* sp. A59 fue obtenida por amplificación y secuenciación. Mediante comparación con la base de datos de 16S (bacterias y arqueas) depurada (BLASTN, EZtaxon y RDP), el aislamiento fue clasificado como miembro del género *Paenibacillus* con una identidad mayor al 99% y alta cobertura de secuencia (98%), con homología contra *Paenibacillus taichungensis* BCRC 17757, *Paenibacillus tundrae* A10b, *Paenibacillus pabuli* (cepas HSCC 492 y JCM 9074) y *Paenibacillus xylanilyticus* XYL14. El análisis filogenético (**Figura R10**) basado en dicho gen, mediante el método Neighbor-joining, permitió agrupar al aislamiento A59, en un *cluster* con *P. taichungensis* (gi343199050), *P. pabuli* HSCC 492 (gi343200166) y *Paenibacillus* sp. MAEPY2 (gi639455971), apoyado por un alto valor de *bootstrap* (0.93).



**Figura R10. Análisis filogenético de *Paenibacillus* sp. A59 en base al gen 16S rRNA.** Árbol filogenético realizado utilizando el método de *Neighbor-Joining*, con secuencias de alta identidad. El porcentaje de árboles en los cuales los diferentes taxones agrupan juntos se determinó a partir de un test de *bootstrap* de 1000 réplicas y se muestran en cada rama (mayores al 50%). La escala representa el número de nucleótidos sustituidos por sitio (MEGA v6.0).

*P. taichungensis* BCRC 17757 fue aislado a partir de muestras de suelo (Lee y col., 2008) y *Paenibacillus* sp. MAEPY2 a partir de lixiviados de vertederos (Chua y col., 2014); sin embargo no existen reportes sobre el aislamiento de *P. pabuli* HSCC 492. Además, *P. taichungensis* BCRC 17757 y una cepa de *P. pabuli* (BM17) presentan actividad quitinilítica (Juarez-Jimenez y col., 2008; Chen y col., 2010) pero no hay reportes de actividad celulasa o xilanasas.

Debido al alto nivel de conservación a nivel de secuencia de 16S, el grado de discriminación de este análisis no permitió establecer si se trataba de una nueva especie o de una nueva cepa perteneciente a alguno de los dos taxones. Para complementar la caracterización del aislamiento, se realizaron pruebas bioquímicas clásicas y se analizaron aspectos morfológicos y fisiológicos del mismo. *Paenibacillus* sp. A59 desarrolló colonias circulares, convexas, blancas y medianas en medio sólido. Presentó tinción de Gram positiva, morfología bacilar al microscopio óptico y movilidad positiva, aunque no se observó la presencia de flagelo. Mediante microscopía electrónica se determinó el tamaño promedio en 2,2  $\mu\text{m}$  de longitud por 0,65  $\mu\text{m}$  de ancho, y se observó la formación de esporas terminales y subterminales, con estructura polihédrica en la superficie (**Figura R11**). Esta morfología fue previamente descrita para *Paenibacillus polymyxa* (Comas-Riu y Vives Rego, 2002).



**Figura R11. Microscopía de células de *Paenibacillus* sp. A59:** Micrografía óptica (100 x) de células con tinción de Gram (**a**) y micrografía electrónica donde se indican las endosporas terminales (**b**) y las esporas con superficie polihédrica (**c**) a partir de un cultivo de 48 hs a 30°C en LB.

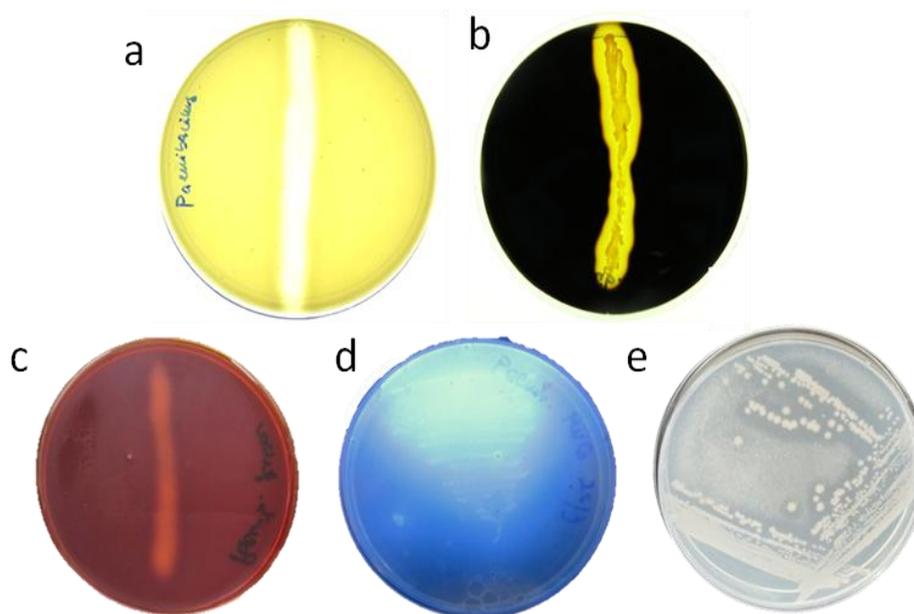
Las condiciones óptimas de cultivo fueron temperaturas moderadas, entre 30°C y 37°C, en aerobiosis, aunque también se observó crecimiento en anaerobiosis, indicando que este aislamiento es anaerobio facultativo. Además, mostró alta tolerancia a un amplio rango de pH y alta salinidad, siendo capaz de desarrollarse en cultivos con pH entre 5 y 10 y hasta 7% de cloruro de sodio (**Tabla R5**).

Muchas de las pruebas bioquímicas y fisiológicas testeadas en *Paenibacillus* sp. A59 fueron similares a las descritas para las cepas de referencia *P. taichungensis* BCRC 17757 y *P. pabuli* BCRC 15857 (Nakamura y col., 1984; Lee y col., 2008). Sin embargo nuestro aislamiento hidroliza caseína, a diferencia de los otros dos antes mencionados y *P. pabuli* es negativo para la prueba de oxidasa. A su vez, el resultado de la prueba de API 50 CH fue concluyente para poder afirmar que nuestro aislamiento sería una nueva especie dada la diferencia con las especies de referencia más cercanas en varias de las pruebas clave en uso de carbohidratos, con producción de ácido a partir ramnosa, N-acetil glucosamina, inulina o D-melezitosa (**Tabla A2 Anexo**).

La capacidad de hidrolizar sustratos complejos, en especial carbohidratos, es una de las características deseadas para microorganismos novedosos con potencial uso industrial. Por ello, se evaluó el desarrollo de *Paenibacillus* sp. A59 en medios de cultivo conteniendo una amplia variedad de polisacáridos como almidón, pectina, glucurónidos, quitina, y proteínas de la leche (**Tabla R5 y Figura 12**), mostrando una buena actividad hidrolítica de todos ellos.

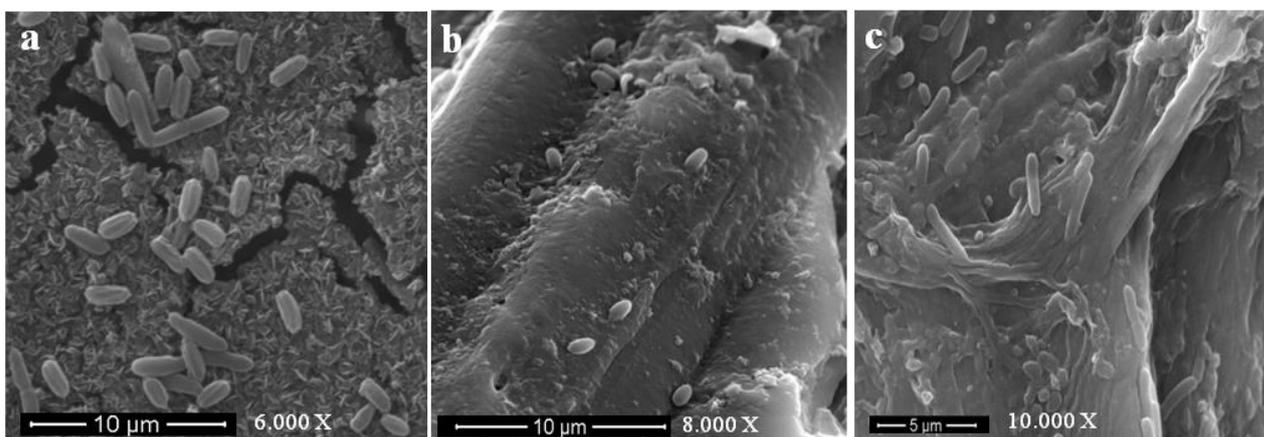
Se ensayaron entonces diferentes fuentes de carbono celulolíticas (comerciales y naturales) para establecer las condiciones de cultivo más apropiadas para la secreción de enzimas hidrolíticas. Los mejores niveles de crecimiento se alcanzaron a las 72 hs con CMC y XI, con valores de  $7 \times 10^{11}$  y  $3 \times 10^{11}$  UFC/ml respectivamente, mientras que en AV o PF, el crecimiento fue menor:  $7 \times 10^8$  y  $2 \times 10^8$  UFC/ml, respectivamente. El aislamiento también presentó crecimiento en XI y PF en condiciones anaeróbicas, indicando que bajo estas condiciones también expresa las enzimas hidrolíticas necesarias para su utilización.

<b>Tabla R5: Pruebas bioquímicas y fisiológicas de <i>Paenibacillus</i> sp. A59</b>		
<b>Morfología</b>		Bacilos
<b>Tinción de Gram</b>		Positivo
<b>Tamaño celular promedio</b>		2.2 $\mu\text{m}$ (l) x 0.6 $\mu\text{m}$ (a)
<b>Endosporas</b>		Terminales o sub-terminales
<b>Esporangio</b>		Distendido
<b>Movilidad</b>		+
<b>Requerimiento de oxígeno</b>		Anaerobio facultativo
<b>Catalasa</b>		+
<b>Utilización de citrato</b>		-
<b>Gelatinasa</b>		-
<b>Crecimiento</b>	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	30 y 37
	NaCl (%)	2 y 7
	pH	5,7, 9 y 10
<b>Hidrólisis</b>	CMC	+
	Xilano	+
	Leche descremada	+
	Almidón soluble	+
	Pectina de cítricos	+
	Urea	-
	4-MUG	+
	ABTS	-
	Quitina coloidal	+
<b>Utilización de fuentes de nitrógeno</b>	Extracto de levadura	+
	Peptona	+
	Triptona	+
	Cloruro de amonio	+
	Nitrato de potasio	+
	Sulfato de amonio	+
<b>Utilización de fuentes de carbono</b>	Arabinosa	-
	Celobiosa	+
	Lactosa	+
	Glucosa	+
	Trealosa	+
	Maltosa	+
	Dextrosa	+
	Rafinosa	+
	Sacarosa	+
	Glicerol	+



**Figura R12. Actividad hidrolítica de *Paenibacillus* sp. A59 sobre diferentes sustratos:** Crecimiento e hidrólisis de caseína de leche descremada (**a**), almidón soluble revelado con iodo (**b**), pectina de cítricos revelado con tinción de rojo congo (**c**), 4-MUG (metilumbiferil glucopiranosido) revelado con luz ultravioleta (**d**) y quitina coloidal (**e**).

El uso de biomasa lignocelulósica como fuente de carbono implica la hidrólisis eficiente de los polímeros que la constituyen. El residuo de cosecha de caña de azúcar (RAC) y la paja de trigo poseen una composición heterogénea (**Tabla A1, Anexo**) y por lo tanto son modelos adecuados para estudios de deconstrucción de biomasa lignocelulósica. *Paenibacillus* sp. A59 fue capaz de crecer en RAC y paja de trigo y las células permanecieron adheridas al sustrato aún luego de varios lavados, lo cual indicaría que, si bien es una bacteria aeróbica y secreta las enzimas hidrolíticas al medio, estructuras presentes en la superficie celular le permiten una fuerte adherencia al sustrato, lo cual podría facilitar luego la internalización de los oligosacáridos solubles generados (**Figura R13**).

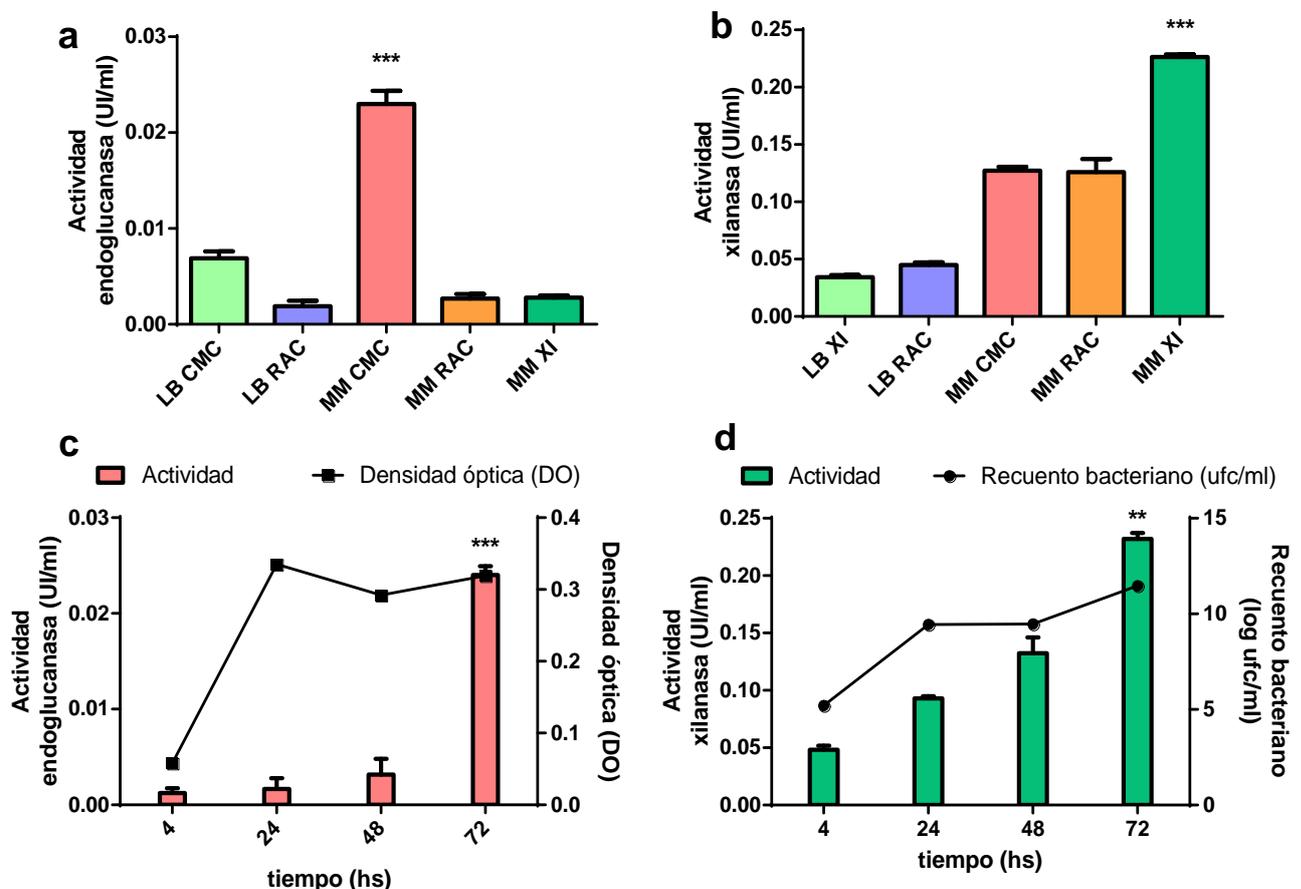


**Figura R13. Microscopía electrónica de barrido de *Paenibacillus* sp. A59 sobre diferentes sustratos celulósicos:** Micrografías obtenidas a partir de la observación de cultivos bacterianos en MM-XI (a), MM con residuo de cosecha de caña de azúcar (RAC) extrusada (b) y MM con paja de trigo extrusada (c), durante 72 hs a 30°C.

Los resultados anteriores demostraron la capacidad de *Paenibacillus* sp. A59 de crecer en una amplia variedad de sustratos, incluyendo biomasa lignocelulósica, lo cual destaca la diversidad hidrolítica de sus enzimas.

## II.2 Optimización de la producción de enzimas (hemi)celulolíticas del extracto bacteriano.

Las condiciones de cultivo de un microorganismo, en particular la fuente de carbono utilizada, pueden influir en las enzimas que son inducidas para el aprovechamiento eficiente de la misma. Con el fin de determinar las condiciones óptimas de crecimiento de *Paenibacillus* sp. A59 que inducirían una mayor actividad enzimática en su secretoma, se ensayaron dos medios de cultivo (MM y LB), suplementados con sustratos celulósicos y/o hemicelulósicos (CMC, XI y RAC), a diferentes tiempos de cultivo (4, 24, 48 y 72 hs) (**Figura R14 a y b**).



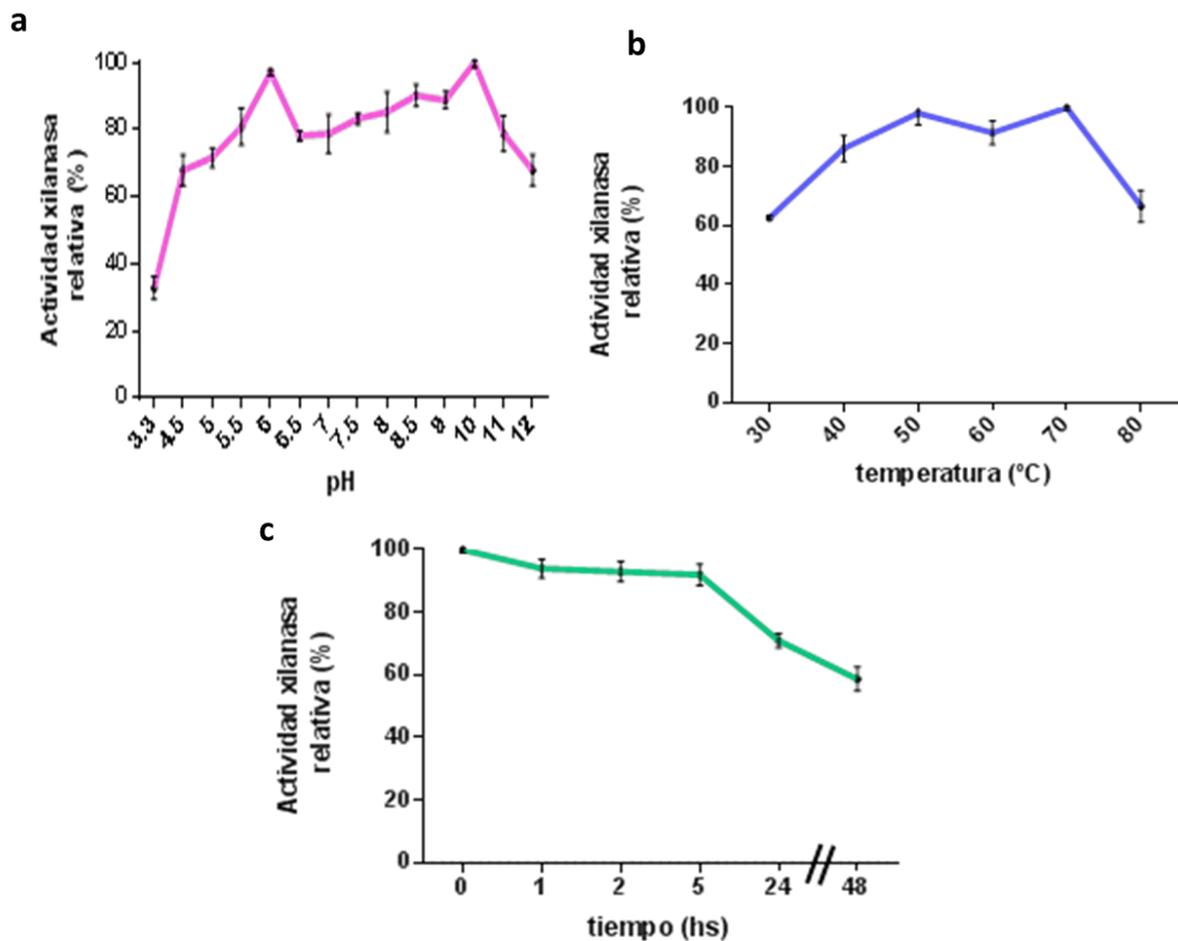
**Figura R14. Optimización de la actividad enzimática de *Paenibacillus* sp. A59:** Actividad endoglucanasa (a) y xilanasa (b) del extracto enzimático bacteriano extracelular desde cultivo en diferentes medios. En (c) y (d), los extractos se obtuvieron por cultivo en MM-CMC y MM-XI, a las 4, 24, 48 y 72 hs. Cada barra en los gráficos representa el promedio  $\pm$  desvío estándar ( $n=3$ ) de UI de actividad enzimática/ml de extracto. Además se muestran las curvas de crecimiento bacteriano en log UFC/ml (XI) y DO (CMC). (\*) representa diferencias estadísticamente significativas por ANOVA unifactorial, seguido de Test de Tukey ( $\alpha$  0.01) (GraphPadPrism 6).

A partir de los sobrenadantes de cultivo libre de células (extractos enzimáticos extracelulares, EE) se determinó tanto actividad xilanasa como endoglucanasa. Ambas actividades resultaron máximas en extractos enzimáticos provenientes de cultivo en MM-CMC ( $0.023 \pm 0.001$  UI/ml) y MM-xilano ( $0.226 \pm 0.002$  UI/ml)

respectivamente. En MM-RAC se obtuvo buena actividad xilanasa ( $0.126 \pm 0.011$  UI/ml) aunque la actividad CMCasa fue muy baja ( $0.002 \pm 0.001$  UI/ml). La evaluación de cada una de estas actividades a diferentes tiempos de cultivo (**Figura R14 c y d**), indicó una actividad máxima a las 72 hs, correspondiente a una fase exponencial tardía de crecimiento. Estos resultados demostraron que *Paenibacillus* sp. A59 presenta principalmente actividad xilanolítica, por sobre la actividad celulolítica, por lo cual esta actividad fue caracterizada con mayor profundidad. Para la obtención de un extracto xilanolítico se podría utilizar tanto xilano comercial, como RAC en el cultivo, mientras que para la actividad endoglucanasa se requiere el cultivo en CMC.

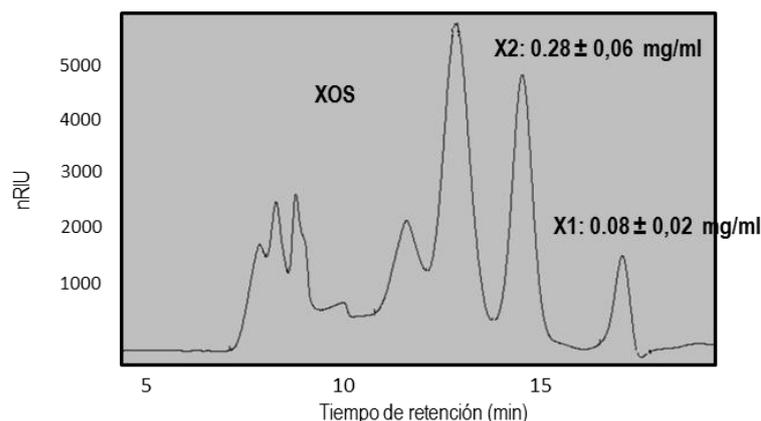
El conocimiento de las condiciones óptimas de actividad del extracto enzimático, en cuanto a pH, temperatura y termoestabilidad es de relevancia para evaluar su potencialidad para ser utilizado en procesos de bioconversión de biomasa. Determinamos entonces dichos parámetros en sobrenadantes de cultivo de 72 hs, obtenidos en XI (**Figura R15**). El perfil de actividad en función del pH se mantuvo superior al 70% entre pH 4.5 y pH 12, con dos picos de actividad en pH 6 y pH 10, lo cual garantizaría la actividad enzimática incluso en procesos en donde ocurran variaciones amplias de pH.

Además el extracto enzimático presentó alta actividad ( $\geq$  al 80%) entre 40 y 70°C, manteniendo hasta un 60% de actividad a 50°C durante 48 hs, lo cual resulta muy interesante para una bacteria mesófila. Estos resultados demostraron que el extracto enzimático extracelular de *Paenibacillus* sp. A59, al presentar tolerancia a pHs alcalinos y actividad a temperaturas medias a altas, permitiría su aplicación en diversos procesos.



**Figura R15. Actividad xilanasa del extracto enzimático de *Paenibacillus* sp. A59:** Perfil de actividad del secretoma de *Paenibacillus* sp. A59 cultivado en MM-XI en función del pH (a) y la temperatura (b). Estabilidad térmica de la actividad xilanasa a 50°C (c). Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  desvío estándar (n=3). Las actividades relativas se calcularon en relación a la máxima actividad (100%). Este ensayo corresponde a una de tres réplicas biológicas con resultados equivalentes.

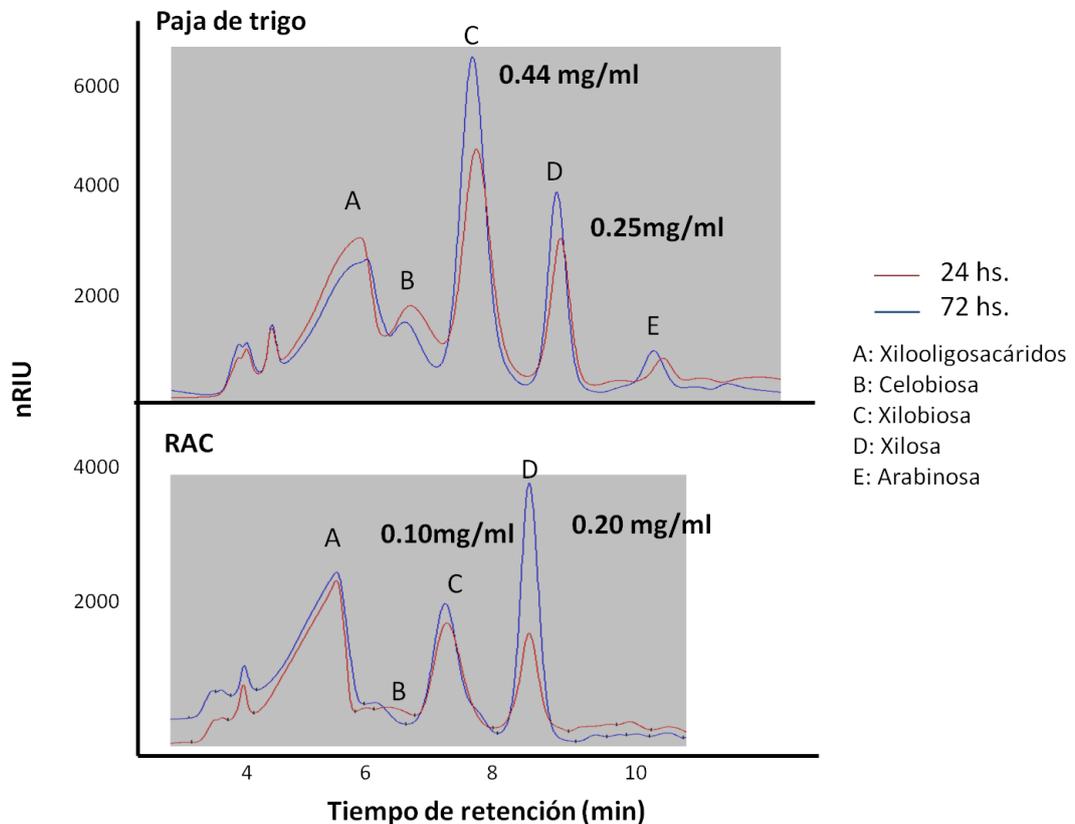
Los productos de la reacción xilanasa, utilizando el extracto enzimático extracelular, fueron identificados por HPLC (Figura R16). El principal producto fue xilobiosa (X2), aunque también xilosa (X1) en menor proporción y xilooligosacáridos solubles de mayor grado de polimerización, no discriminados en esta técnica. Esto indica que el extracto extracelular presenta enzimas con actividad principalmente endo-xilanasa y/o  $\beta$ -xilosidasa, en menor proporción.



**Figura R16. Productos de hidrólisis de xilano:** Azúcares solubles liberados a partir de la hidrólisis de xilano por el extracto enzimático de *Paenibacillus* sp. A59, a pH 6 50°C, cuantificados por HPLC. X1: xilosa, X2: xilobiosa, XOS: xilooligosacáridos, nRIU: unidades de índice de refracción. Columna Aminex 87P (BioRad). Se indican los promedios de la concentración de los azúcares a partir de tres réplicas biológicas y su correspondiente desvío. Los controles de sustrato y de enzima no presentaron picos en los tiempos de retención estudiados.

La hidrólisis eficiente de un sustrato comercial como el xilano de abedul, cuya composición principal es un esqueleto de xilosas con ramificaciones de ácido glucurónico, no garantiza necesariamente la bioconversión de la hemicelulosa presente en biomásas más complejas, teniendo en cuenta la recalcitrancia de los polímeros lignocelulósicos. Por lo tanto, ensayamos la actividad del extracto enzimático de *Paenibacillus* sp. A59 sobre dos biomásas de interés en nuestro país, paja de trigo y residuo de cosecha de caña de azúcar, pre-tratadas en condiciones industriales por extrusión o por explosión de vapor, respectivamente. El pre-tratamiento aplicado a dichas biomásas tiene como objetivo mejorar la accesibilidad de las enzimas, aumentando la eficiencia de la hidrólisis, al exponer los polisacáridos mediante la apertura de las fibras. Teniendo en cuenta que las biomásas naturales están compuestas de hemicelulosa y celulosa, se utilizó un nuevo extracto enzimático, combinando en una proporción 1:1 extractos obtenidos en CMC y XY, de manera de tener las máximas actividades xilanasa y endoglucanasa posibles. Las reacciones se realizaron hasta por 72 hs y se analizaron los azúcares solubles liberados (**Figura R17**). Los productos principales obtenidos a partir de ambas biomásas fueron xilobiosa y xilosa, siendo máximos a las 72 hs de reacción, lo cual demuestra que la actividad xilanolítica fue predominante. Se liberaron también trazas de arabinosa sólo a partir de paja de trigo, dado que el xilano de este cereal posee sustituciones de arabinosa (3,5%). Con respecto a la hidrólisis de celulosa, solo se

obtuvo una muy baja cantidad de celobiosa a partir de paja de trigo y no se detectó glucosa a ningún tiempo, confirmando la baja actividad endoglucanasa (y ausencia de actividad  $\beta$ -glucosidasa) del extracto y que la actividad xilanolítica fue predominante.



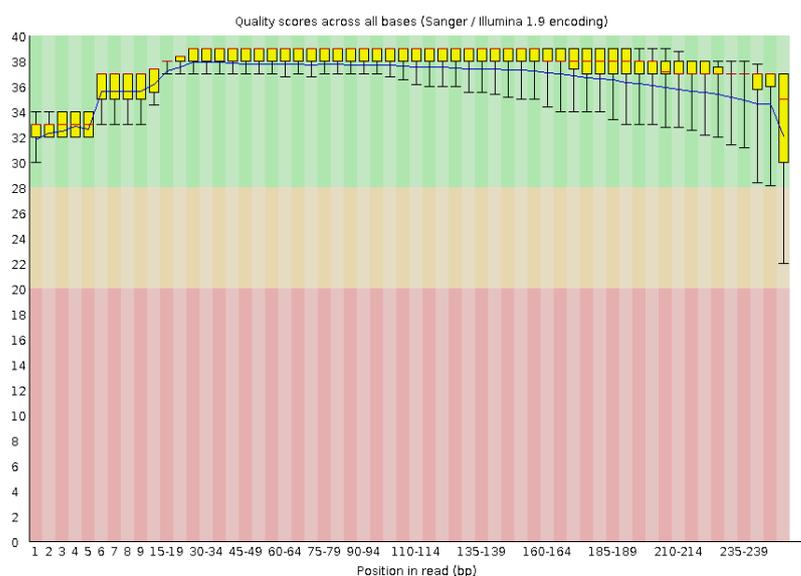
**Figura R17. Productos de hidrólisis de biomasa lignocelulósica:** Azúcares solubles liberados a partir de la hidrólisis de paja de trigo extrusada y residuo de cosecha de caña de azúcar (RAC) pretratada por explosión de vapor, mediante la aplicación del extracto enzimático de *Paenibacillus* sp. A59. En el gráfico se muestran los resultados correspondientes a 24 hs (línea roja) y 72 hs (línea azul) de reacción, a pH 6 50°C, cuantificados por HPLC, Columna Aminex HP87 (BioRad). Sobre los picos correspondientes a xilosa y xilobiosa se muestran los mg/ml correspondientes a las 72 hs de reacción.

Por lo tanto, los extractos enzimáticos de *Paenibacillus* sp. A59 podrían ser optimizados para su aplicación en procesos donde se requiera la bioconversión de polímeros de xilano principalmente.

### II.3 Secuenciación completa del genoma de *Paenibacillus* sp. A59, anotación funcional e identificación de enzimas activas sobre carbohidratos.

El conocimiento del genoma de una aislamiento novedoso y con potencial aplicación industrial, como es el caso de *Paenibacillus* sp. A59, es fundamental para profundizar en el estudio de los genes que codifican para secuencias proteicas de interés, su organización y regulación génica y las posibles redes metabólicas que conforman.

La secuenciación del genoma de *Paenibacillus* sp. A59 se llevó a cabo mediante la plataforma Illumina MiSeq 1.9. Se obtuvieron 4.201.470 lecturas *paired-end* (2.100.735 lecturas *forward* y *reverse*), con una longitud promedio de 250 pares de bases, alcanzando una cobertura del genoma de 110x, con una buena calidad de dichas lecturas, tanto *forward* como *reverse* (**Figura R18**) (solo se muestra el resultado de calidad de las lecturas *forward*).



**Figura R18. Análisis de calidad de lecturas *forward* del genoma secuenciado de *Paenibacillus* sp. A59:** El gráfico de cajas muestra el análisis de calidad por base, para cada rango de lecturas, indicando la posición en el fragmento en el eje X y el score obtenido en el eje Y. El fondo del gráfico divide dicho eje en secuencias de muy buena calidad (verde), de calidad razonable (naranja) y de baja calidad (rojo). Los rectángulos amarillos indican el rango inter-cuartil (25-75%) y la línea roja interna el valor promedio, mientras que la línea azul representa la calidad promedio (plataforma FAST QC).

Para el ensamblado, se eliminaron las secuencias correspondientes a los adaptadores de secuenciación y las secuencias de baja calidad, lo que resultó en 2.063.761 lecturas (tanto *forward* como *reverse*). Fue necesario realizar dicho ensamblado *de novo*, ya que muy pocas lecturas (menos del 5%) mapearon contra los genomas secuenciados más cercanos filogenéticamente. El ADN se organizó en

un solo cromosoma, sin plásmidos, y se obtuvieron 83 *contigs* con una longitud acumulada de 7.087.589 pares de bases. El valor de N<sub>50</sub> fue de 317.824 pares de bases, que indica la mediana estadística ponderada de tal manera que el 50% de las secuencias fue contenida en *contigs* iguales o mayores que este valor. El contenido de G+C promedio fue de 46%, congruente con bacterias del género.

Por lo tanto, la secuencia genómica obtenida fue de muy buena calidad, con buena cobertura del genoma y pudo ser ensamblada en un número de *contigs* adecuado para continuar con el estudio de las secuencias codificantes.

La anotación funcional de los genes codificados en el genoma de *Paenibacillus* sp. A59, se realizó mediante dos plataformas: RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) y NCBI (Prokaryotic Genome Annotation Pipeline), y se obtuvo información similar entre ambas anotaciones como la longitud total del genoma y el % de GC, y ligeras variaciones en el número de secuencias codificantes, mientras que la información del NCBI resultó más completa ya que se detalló el número y tipo de RNAs (**Tabla R6**).

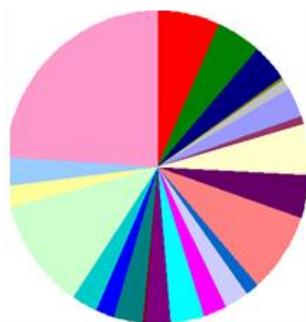
Tabla R6: Características principales del genoma de <i>Paenibacillus</i> sp. A59 por anotación en RAST y en NCBI		
Plataforma	NCBI	RAST
Longitud total (MB)	7.087.290	7.087.296
Genes	6.339	-
Secuencias codificantes (CDS)	5.974*	6424
Pseudogenes	346	-
RNAs	53	48
rRNAs	1 (5S), 1 (16S), 1 (23S)	-
tRNAs	46	-
otros	4	-
% de GC	46	46
*con función hipotética: 1729		

La anotación en RAST permitió además agrupar el 39% de las secuencias codificantes en 447 subsistemas, mayoritariamente relacionados con síntesis de pared celular y cápsula, síntesis de vitaminas y cofactores y metabolismo de proteínas, aminoácidos y carbohidratos. La mayoría fueron clasificadas en el metabolismo de carbohidratos (**Figura R19**). Sin embargo, el 61% de las secuencias no pudo ser asignado a ningún subsistema.

## Cobertura de subsistemas



Distribución en categorías



- Cofactors, Vitamins, Prosthetic Groups, Pigments (234)
- Cell Wall and Capsule (172)
- Virulence, Disease and Defense (133)
- Potassium metabolism (12)
- Photosynthesis (0)
- Miscellaneous (36)
- Phages, Prophages, Transposable elements, Plasmids (6)
- Membrane Transport (106)
- Iron acquisition and metabolism (30)
- RNA Metabolism (180)
- Nucleosides and Nucleotides (162)
- Protein Metabolism (291)
- Cell Division and Cell Cycle (40)
- Motility and Chemotaxis (93)
- Regulation and Cell signaling (82)
- Secondary Metabolism (4)
- DNA Metabolism (130)
- Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids (97)
- Nitrogen Metabolism (14)
- Dormancy and Sporulation (99)
- Respiration (71)
- Stress Response (99)
- Metabolism of Aromatic Compounds (9)
- Amino Acids and Derivatives (393)
- Sulfur Metabolism (79)
- Phosphorus Metabolism (110)
- Carbohydrates (808)

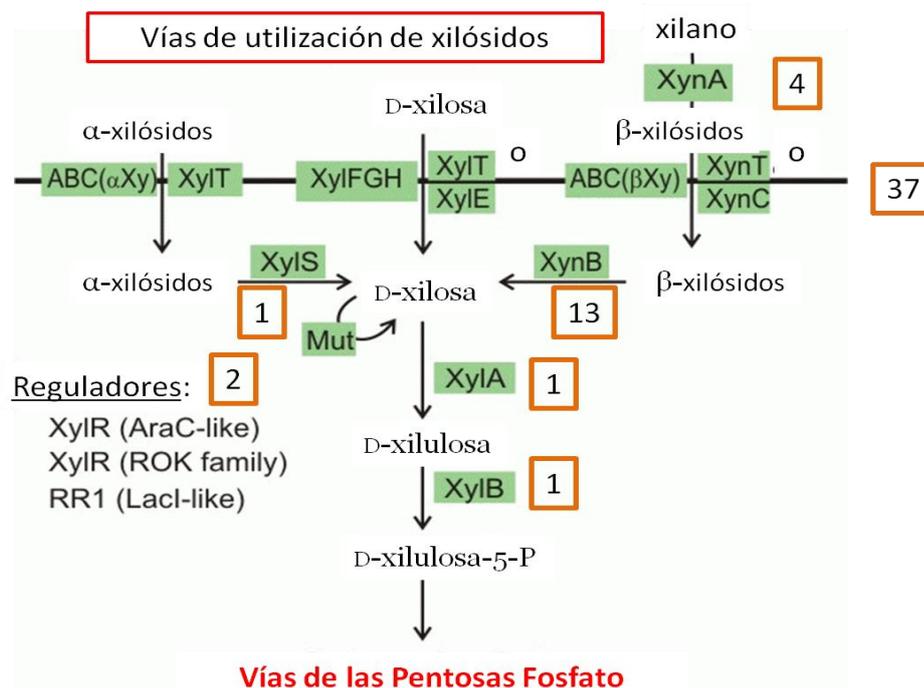
Verde: en subsistemas  
Azul: sin subsistemas

**Figura R19. Agrupación en subsistemas de las proteínas de *Paenibacillus* sp. A59 anotadas mediante la plataforma RAST:** El gráfico de torta muestra la distribución de las proteínas en cada categoría o subsistema, mientras que los números entre paréntesis indican el recuento de las mismas.

Dado que el aislamiento en estudio mostró una alta actividad xilanolítica, se analizó el posible mecanismo de incorporación y utilización de xilósidos, producidos por la hidrólisis de xilano, hasta el ingreso a la Vía de las Pentosas Fosfato (**Figura R20**). Este análisis permitió identificar el número de genes codificantes para cada proteína dentro del metabolismo propuesto y el nombre asignado, de manera de poder luego buscar los genes de interés en la secuencia del genoma. Identificamos así las posibles enzimas implicadas en el sistema xilanolítico de esta bacteria, desde la hidrólisis inicial del xilano por endoxilanasas (3 codifican para enzimas de la familia GH10 y 1 de la familia GH11), la incorporación de los  $\beta$ -xilósidos mediante transportadores, la hidrólisis a D-xilosa mediante  $\beta$ -xilosidasas y la generación de xilulosa-5-P, mediante una xilosa isomerasa y una xilulosa quinasa, para ser incorporada a la Vía de las Pentosas Fosfato. También se identificó un gen codificante para una  $\alpha$ -xilosidasa.

Analizamos entonces la distribución genética de estas enzimas. Las 4 endoxilanasas predichas se encuentran formando parte de *clusters* de genes, generalmente entre secuencias codificantes para transportadores de membrana y reguladores transcripcionales. Estos *locus* génicos relacionados con la conversión de polisacáridos fueron inicialmente descriptos para *Bacteroides* y se extendieron en

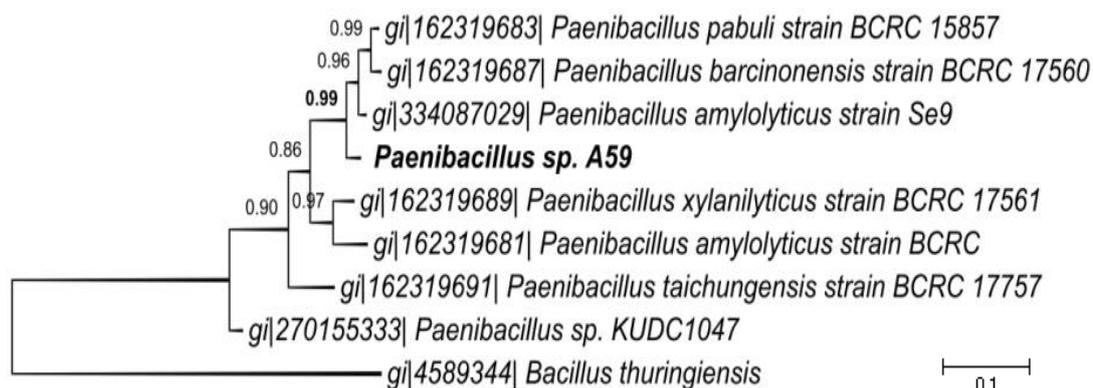
la actualidad a otros grupos de microorganismos, denominados PULs (*Polysaccharide utilization locus*) (Berlemont 2017).



**Figura R20. Vía de utilización de xilósidos de *Paenibacillus* sp. A59:** Mecanismo de utilización de  $\beta$  y  $\alpha$ -xilósidos en base a la anotación por RAST, de las 58 secuencias codificantes para las proteínas que intervienen en el mismo. En los recuadros naranjas se muestra el número de secuencias codificantes anotadas. XynA:  $\beta$ -1,4-endoxilanasas; XynT, XynC, XylT, XylE: transportadores de xilósidos; XynB:  $\beta$ -xilosidasa; XylS:  $\alpha$ -xilosidasa; Mut: xilosa epimerasa; XylA: xilosa isomerasa; XylB: xilulosa quinasa; XylR y RR1: reguladores transcripcionales.

La anotación mediante la plataforma del NCBI permitió realizar la comparación de la información entre el genoma de *Paenibacillus* sp. A59 con otros genomas anotados. Existen hasta la fecha 128 genomas de especies de *Paenibacillus* ensamblados, la mayoría en formato *draft*. El número promedio de proteínas entre todos estos genomas es 5.815, con un promedio de longitud del genoma de 6,8 Mb y un % de G+C de 47,8%. Para determinar si *Paenibacillus* sp. A59 efectivamente se trata de una especie nueva, tal como fue establecido anteriormente por filogenia basada en el marcador molecular 16S rRNA, se realizó una hibridación ADN-ADN *in silico*, utilizando la plataforma GGDC (*Genome to Genome Distance Calculator*) del Instituto Leibniz DSMZ, Alemania. La herramienta utilizada realizó la comparación de los genomas de a pares e infirió el parámetro DDH (*DNA-DNA Hybridization*) el cual determina si los genomas corresponden a una misma especie (mayor al 70%) o misma subespecie (mayor a 79%). La evaluación se realizó entre *Paenibacillus* sp. A59 contra los genomas más cercanos, resultando los valores de DDH todos menores a 70%: *Paenibacillus pabuli* NBRC 13638

(35.9%), *Paenibacillus* sp. AD87 (47.1%), *Paenibacillus* sp. 0199 (46.7%), *Paenibacillus* sp. MAEPY2 (50.6%). Estos resultados indicaron que *Paenibacillus* sp. A59 podría ser una nueva especie. Además se utilizó la secuencia del gen codificante para la subunidad  $\beta$  de la DNA girasa (*gyrB*) (extraída del genoma) (**Figura R21**), empleada generalmente como marcador filogenético alternativo en especies del género *Bacillus* (Wang y col., 2007).

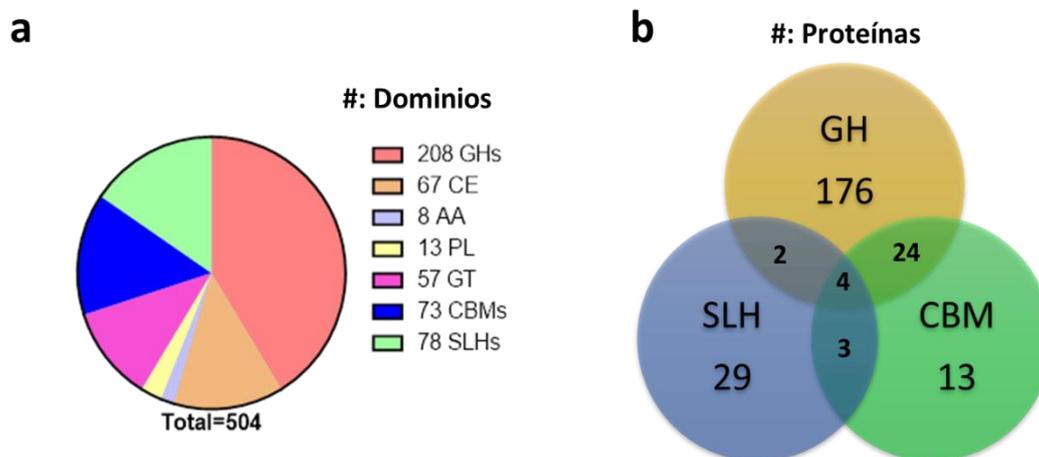


**Figura R21. Análisis filogenético de *Paenibacillus* sp. A59 en base al gen *gyrB*.** Árbol filogenético basado en el gen codificante para la subunidad beta de la ADN girasa (*gyrB*), utilizando el método de *Maximun Likelihood*, con secuencias de alta identidad. El porcentaje de árboles en los cuales los diferentes taxones agrupan juntos se determinó a partir de un test de bootstrap de 1000 réplicas y se muestran en cada rama (mayores al 50%). La escala representa el número de nucleótidos sustituidos por sitio (MEGA v6.0).

Mediante el análisis de identidad de secuencia con BLASTN, basado en el gen *gyrB*, se observó una similitud entre 83-93% con las especies más cercanas y el análisis filogenético con el método *Maximun Likelihood* ubicó a *Paenibacillus* sp. A59 en una rama separada con un alto valor de *bootstrap* (0.99) apoyando también la posibilidad de que se trata de una nueva especie.

Además de la anotación por estas dos plataformas, el genoma de *Paenibacillus* sp. A59 fue analizado mediante la plataforma dbCAN, recientemente disponible, con el objetivo de identificar específicamente en las secuencias proteicas, dominios correspondientes a enzimas activas sobre carbohidratos (CAZymas), tomando como referencia la base de datos CAZy (*Carbohydrate active enzymes*). En particular en este análisis nos enfocamos en las CAZymas potencialmente involucradas en la deconstrucción de polímeros lignocelulósicos (celulosa, hemicelulosa y lignina), por análisis de los dominios catalíticos: glicosil hidrolasas (GH), polisacárido liasas (PL), glicotransferasas (GT), carbohidrato esterasas (CE), actividades auxiliares (AA) y módulos de unión a carbohidratos (CBMs) así como los

dominios de unión a capa S (SLH), en las proteínas previamente anotadas por NCBI. Se identificaron un total de 504 dominios CAZy, incluyendo dominios GH, PL, GT, CE, AA y módulos de unión como SLHs y CBMs (**Figura R22a**).



**Figura R22. Distribución de dominios CAZy identificados en las proteínas predichas de *Paenibacillus* sp. A59.** Gráfico de torta de la distribución de los 504 dominios CAZy inferidos en dbCAN (**a**). Diagrama de Venn de las proteínas GH con dominios CBM o SLH, o ambos (**b**). GH: glicosil hidrolasas, CE: carbohidrato esterases, AA: actividades auxiliares, PL: polisacárido liasas, GT: glicosil transferasas, CBMs: módulos de unión a carbohidratos, SLHs: dominios de unión a proteínas de capa S.

Luego de un detallado análisis manual, se asignaron dichos dominios a 396 proteínas. En todos los casos a una única proteína se le asignó un único dominio catalítico, es decir no se encontraron proteínas con combinaciones de dominios catalíticos; sin embargo, a 30 de las proteínas con dominios GHs se les asignó también dominios CBM o SLH, o ambos (**Figura R22b**).

Dado que *Paenibacillus* sp. A59 mostró una buena capacidad de crecimiento e hidrólisis de varios carbohidratos en los ensayos previos, se definieron las potenciales GH involucradas en la hidrólisis de celulosa y hemicelulosa (xilanos, heteroxilanos, heteromananos y xiloglucanos) y otros polisacáridos (mananos, almidón y quitina). Para reconfirmar la identidad de las mismas, aquellas identificadas por dbCAN fueron analizadas mediante BLASTP. A su vez, para determinar el secretoma teórico, es decir aquellas CAZymas que podrían ser secretadas al exterior, se realizó la predicción de péptido señal mediante la plataforma Signal P. De este modo se identificaron 82 GHs pertenecientes a familias asociadas con la hidrólisis de celulosa (GH 1, 2, 3, 6, 8, 9, 12, 16, 30, 48), hemicelulosa (GH 10, 11, 30, 31, 43, 51, 52, 74), mananos (GH26), almidón (GH13) y quitina (GH18) (**Tabla R7**).

Entre ellas, se identificaron enzimas con potencial actividad endoglucanasa,  $\beta$ -glucosidasa, exoglucanasa, endoxilanasas,  $\beta$ -xilosidasa, xiloglucanasa, arabinofuranosidasa, glucuronoxilanasas, mananasa,  $\alpha$ -amilasa y quitinasa. Es de destacar que sólo se identificó una proteína para cada familia de GH 1, 6, 8, 9, 11, 12, 26, 48 y 52, especialmente asociadas con actividad endoglucanasa, exoglucanasa y endoxilanasas, mientras que se identificaron varias proteínas dentro de las familias relacionadas con actividad  $\beta$ -xilosidasa,  $\beta$ -glucosidasa y arabinofuranosidasa: GH 3, 5, 10, 16, 30, 43 y 51.

En todos los casos, la secuencia codificante para cada proteína se encontró en copia única en el genoma. Además, en 35 GHs se infirió la presencia de péptido señal, lo que indicó que podrían ser secretadas o estar expuestas al espacio extracelular. Las proteínas identificadas de las familias de GH1, 51 y 52, sólo son intracelulares. Estas enzimas estarían involucradas en la hidrólisis de oligosacáridos cortos y disacáridos, lo cual ocurre generalmente dentro de la célula en los pasos finales de hidrólisis. Sin embargo, se identificaron dos GH3  $\beta$ -glucosidasas (una de ellas con tres dominios SLH) y siete GH43  $\beta$ -xilosidasas/ $\alpha$ -arabinofuranosidasas (seis de las cuales poseen un CBM asociado) que, dado que presentan péptido señal, podrían ser extracelulares o estar expuestas en la superficie celular.

Tabla R7: Predicción de CAZymas de *Paenibacillus* sp. A59, pertenecientes a las familias de glicosil hidrolasas (GHs) involucradas en la bioconversión de celulosa, xilano, mananos, almidón y quitina.

Actividad <sup>1</sup> / Número EC <sup>2</sup>	Número de acceso <sup>3</sup>	Dominio CAZy <sup>4</sup>	Péptido señal <sup>5</sup>
<b>β-glucosidasa</b> 3.2.1.21	WP_053780132.1	GH1	A
	WP_053780488.1	GH3	A
	WP_053781619.1	GH3	A
	WP_053782189.1	GH3	P
	WP_053782759.1	GH3+CBM6	A
	WP_053782986.1	GH3	A
	WP_053782991.1	GH3	A
	WP_053783318.1	GH3	A
	WP_053783722.1	GH3	A
	WP_053784388.1	GH3	A
	WP_053779370.1	GH3+SLH <sub>3</sub>	P
	WP_053780053.1	GH3	A
<b>Endo-β-1,4-glucanasa</b> 3.2.1.4	WP_053783226.1	GH5	A
	WP_053782127.1	GH5	P
	WP_053782136.1	GH5+CBM46 <sub>2</sub>	P
	WP_053782765.1	GH5	P
	WP_053779698.1	GH8	P
	WP_053783505.1	GH9+CBM3 <sub>3</sub>	P
	WP_053779894.1	GH12	P
<b>Celobiohidrolasa (extremo no reductor)</b> 3.2.1.91	WP_053784024.1	GH6+CBM3	P
<b>Celobiohidrolasa (extremo reductor)</b> 3.2.1.176	WP_053783364.1	GH48+CBM3	P
<b>Endo-β-1,4-xilanasa</b> 3.2.1.8	WP_053779305.1	GH10+CBM9+CBM22 <sub>3</sub> +SLH <sub>3</sub>	P
	WP_053780820.1	GH10	A
	WP_053782506.1	GH10	P
	WP_053781844.1	GH11	P
<b>β-xilosidasa</b> 3.2.1.37	WP_053780819.1	GH43	A
	WP_053780821.1	GH43	A
<b>α-L-arabinofuranosidasa</b> 3.2.1.55	WP_053781471.1	GH43+CBM42	P
	WP_053781573.1	GH43	A
	WP_053782335.1	GH43+CBM35	P
	WP_053782339.1	GH43	A
	WP_053782398.1	GH43+CBM40	P
	WP_053782497.1	GH43+CBM32+CBM42	P

	WP_053782893.1	GH43+CBM13	P
	WP_053783386.1	GH43	A
	WP_053783510.1	GH43	A
	WP_053783509.1	GH43	P
	WP_053781832.1	GH43+CBM6 <sub>3</sub>	P
	WP_053780607.1	GH52	A
<b>Endo-<math>\beta</math>-1,3-glucanasa</b>	WP_053781078.1	GH16	P
3.2.1.39	WP_053781865.1	GH16	P
	WP_053782420.1	GH16+CBM13	P
<b><math>\beta</math>-mananasa 3.2.1.78</b>	WP_053780374.1	GH26	A
<b><math>\alpha</math>-L-arabinofuranosidasa</b>	WP_053782397.1	GH51	A
3.2.1.55	WP_053782407.1	GH51	A
	WP_053783366.1	GH51	A
	WP_053779045.1	GH51	A
<b>Xiloglucanasa</b>	WP_053779044.1	GH74	P
3.2.1.151	WP_053781908.1	GH74	P
<b>Glucuronoxilanasa</b>	WP_053781470.1	GH30+CBM13	P
3.2.1.136	WP_053781633.1	GH30	A
	WP_053779434.1	GH30	P
	WP_053782376.1	GH30	A
	WP_053782507.1	GH30	A
<b><math>\alpha</math>-xilosidasa</b>	WP_053783720.1	GH31	A
3.2.1.177	WP_053781003.1	GH31	A
<b><math>\beta</math>-glucuronidasa</b>	WP_053781895.1	GH2	A
3.2.1.31	WP_053782272.1	GH2	A
	WP_053782273.1	GH2	A
	WP_053784098.1	GH2+CBM6	A
	WP_053779343.1	GH2	A
<b>Amilasa</b>	WP_053780120.1	GH13	A
3.2.1.1	WP_053780921.1	GH13+CBM48	A
<b>Pululanasa</b>	WP_053780924.1	GH13+CBM34	A
3.2.1.41	WP_053781497.1	GH13	A
	WP_053782301.1	GH13	A
	WP_053782709.1	GH13	A
	WP_053784100.1	GH13+CBM34	A
	WP_053784175.1	GH13+CBM20	A
	WP_053779168.1	GH13+CBM48	A
	WP_053779169.1	GH13+CBM48+CBM41	A
	WP_053779396.1	GH13	A
	WP_053779794.1	GH13+CBM34	P
	WP_053779878.1	GH13	A

	WP_053779880.1	GH13	A
<b>Quitinasa</b>	WP_053780034.1	GH18+SLH <sub>3</sub>	P
3.2.1.14	WP_053782252.1	GH18	P
	WP_053782576.1	GH18+CBM12	P
	WP_053782577.1	GH18+CBM12	P
	WP_053783507.1	GH18	A
	WP_053778955.1	GH18	A
<b>Endo-β-1,6-glucanasa 3.2.1.75</b>	WP_053782296.1	GH30	P
<b>Unión a celulosa</b>	WP_053783378.1	CBM9	A
	WP_053784172.1	CBM9	A
	WP_053781829.1	CBM9+SLH <sub>3</sub>	P
<b>Unión a glucomanano</b>	WP_053783422.1	CBM16	A
<b>Unión a xilano</b>	WP_053781007.1	CBM35	P
	WP_053783673.1	CBM35+CBM35+SLH <sub>3</sub>	P
1: De acuerdo a la clasificación de base de datos CAZy y homología de secuencia usando BlastP (NCBI); 2: <i>Enzyme Commission number</i> ; 3: Anotación funcional <i>Paenibacillus</i> sp. A59 en NCBI; 4: Dominos CAZy de la anotación en dbCAN; 5: Presencia (P) o ausencia (A) de péptido señal (Signal P v4.1)			

Alrededor de la mitad de las CAZymas identificadas en *Paenibacillus* sp. A59 se asociaron a un módulo CBM, aunque los CBM9, CBM16 y CBM35 se identificaron en proteínas sin dominio catalítico conocido, lo cual sugiere un rol diferente en estas proteínas o bien actividades que aún no fueron descritas. Todos los CBMs identificados se describieron previamente como de unión a polímeros de celulosa, xilano, quitina o mananos (Boraston y col., 2003). Es de destacar además que algunas proteínas con función similar dentro de la misma familia de GH, mostraron asociación con distintos CBMs, como en el caso de la familia GH43, con varios tipos de CBMs: 6, 13, 35, 40, 42 y 66. En otros casos dentro de una misma familia, solo una de las proteínas se asoció a un CBM, como las familias GH5, GH10, GH16, GH30. También se observaron dominios de unión a capa S (SLH), generalmente en forma de tres unidades consecutivas en los extremos de las secuencias. Estos dominios se identificaron en estudios previos y se estudió su posible rol como parte de enzimas de superficie celular en otras bacterias Gram positivas (Desvaux y col., 2006; Blumer-Schuette y col., 2012); sin embargo, su función en la deconstrucción de la hemicelulosa aún permanece poco claro.

Además se identificaron varias proteínas con dominios carbohidrato esterasa (CE), incluyendo acetil xilano y feruloil esterases, así como también monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMO, AA10). Estas actividades se describieron como

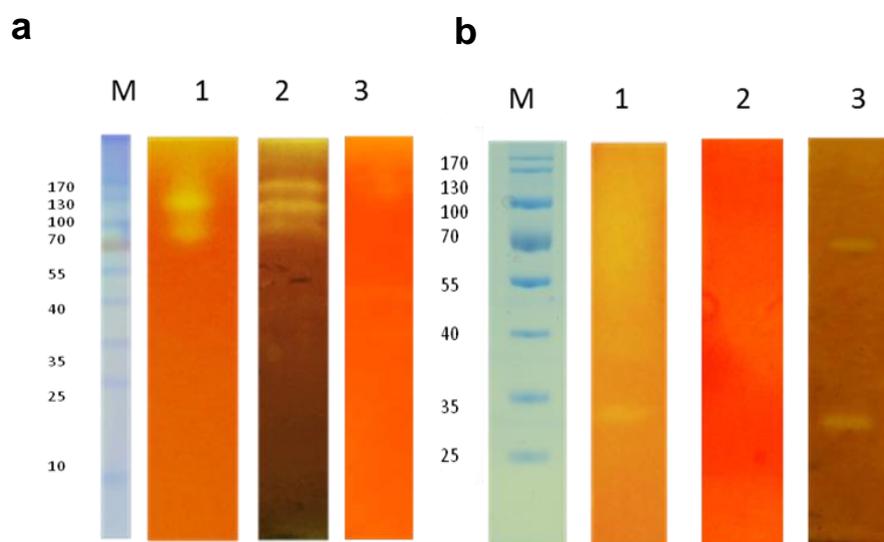
---

relevantes para la desramificación de hemicelulosa y quitina y la deconstrucción de la celulosa, respectivamente. La mayoría de las especies aeróbicas con capacidad de crecer sobre celulosa insoluble, poseen genes codificantes para una o dos proteínas AA10 que catalizan el clivaje oxidativo de los polisacáridos (*Paenibacillus* sp. A59 posee un sólo gen codificante para AA10) aunque la mayoría de estas proteínas no fueron caracterizadas completamente (Kruer-Zerhusen y Wilson 2015).

Finalmente, es notable como algunas proteínas cuya anotación funcional en NCBI o RAST determinó una función hipotética, a partir de dbCAN fue posible asignar un dominio CAZy, lo cual es un aporte en la actividad potencial de estas proteínas aún no caracterizadas. Por otro lado, resultó de gran importancia la utilización de más de una plataforma de anotación para la asignación de función a las secuencias e identificación de motivos conservados en proteínas involucradas en la utilización de carbohidratos.

## II.4 Identificación de proteínas del secretoma bacteriano involucradas en la hidrolisis de sustratos hemicelulósicos

En general, los microorganismos aeróbicos (hemi) celulolíticos secretan enzimas libres para degradar los polímeros. El hecho de haber obtenido la secuencia genómica de alta calidad de *Paenibacillus* sp. A59 y haber logrado una anotación exhaustiva de las CAZymas, así como la predicción de su secretoma teórico, permitió profundizar en el estudio del secretoma bacteriano en condiciones óptimas de crecimiento, utilizando diferentes sustratos como celulosa (CMC), xilano (XI) y residuo de cosecha de caña de azúcar (RAC), una biomasa rica en hemicelulosa. Los estudios previos habían demostrado que la utilización de CMC como fuente de carbono resultaba en la mayor actividad endoglucanasa y que la utilización de xilano y RAC resultaban en la mayor actividad xilanasa, por lo que mediante el análisis del secretoma de cultivos crecidos en estos sustratos nos propusimos identificar las proteínas efectivamente involucradas en la bioconversión de los mismos y correlacionarlas con la actividad. En primera instancia se analizaron por zimografía los tamaños moleculares de las posibles enzimas involucradas en dichas actividades (**Figura R23**).

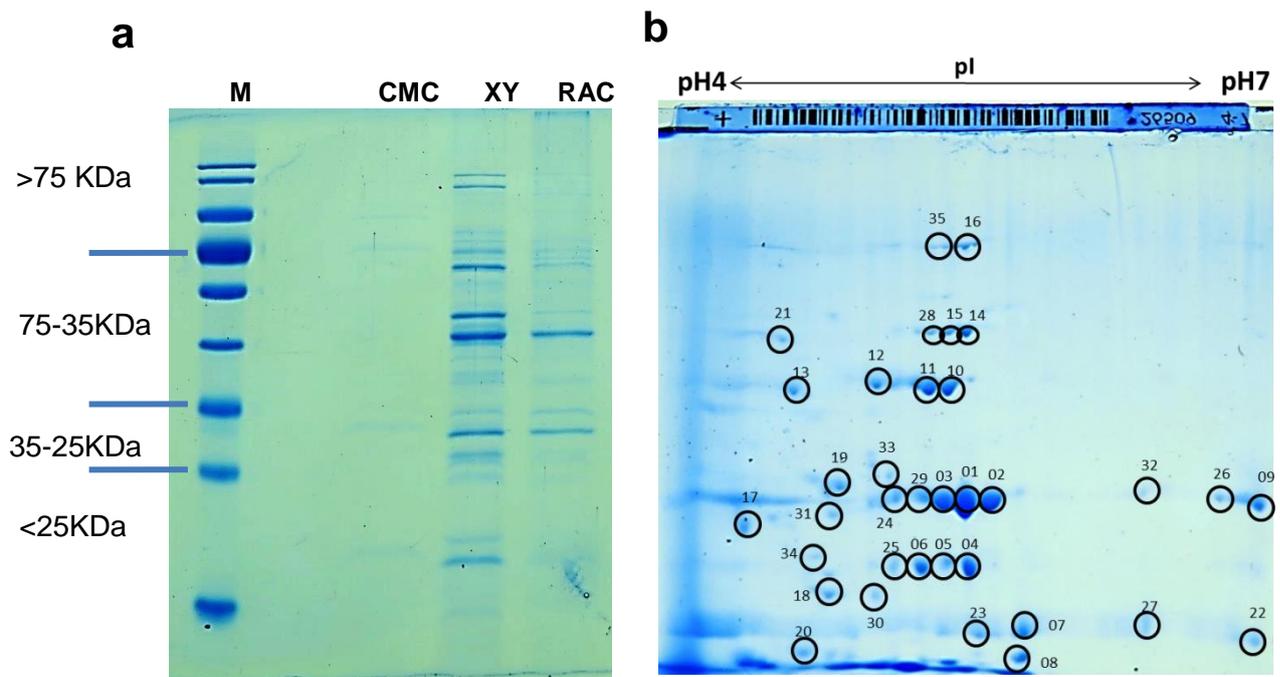


**Figura R23. Actividad endoglucanasa y xilanasa del secretoma de *Paenibacillus* sp. A59:** Zimogramas (SDS-PAGE 10%) en CMC (**a**) y xilano (**b**) a partir del secretoma de *Paenibacillus* sp. A59 cultivado en MM-RAC (1), MM-CMC (2) y MM-XI (3). M: marcador de peso molecular pre-teñido.

De este modo en los zimogramas en CMC se pudieron identificar bandas definidas de alto peso molecular (mayores a 70 kDa) con actividad endoglucanasa en extractos de cultivos en MM-CMC y MM-RAC, mientras que no se observaron bandas en extractos de cultivo en MM-XI. Por otro lado, en los zimogramas con xilano, se identificó una banda con actividad xilanasa de aproximadamente 30 kDa en común en los cultivos de MM-XI y MM-RAC. Además se observó otra banda de aproximadamente 70 kDa desde el extracto de cultivo en MM-XI. No se identificaron bandas con actividad xilanasa en extractos de cultivo en MM-CMC.

Paralelamente, se separaron las proteínas por electroforesis monodimensional y se cortaron fracciones de cada extracto, correspondientes a diferentes rangos de peso molecular, las cuales fueron sometidas a análisis proteómico por espectrometría de masas. Además se analizó el secretoma en RAC por electroforesis en gel en dos dimensiones, seguido de espectrometría de masas de los *spots* seleccionados (**Figura R24**). En el caso del gel monodimensional se analizaron todas las fracciones correspondientes al secretoma en XI y sólo las fracciones mayores a 75 kDa y entre 25-35 kDa de los extractos en CMC y RAC (ya que en estas zonas fue donde previamente se observaron bandas de actividad por zimografía). Las proteínas totales (mg/ml de extracto) fueron diferentes según el sustrato utilizado, siendo mayor en el caso de XI (0,93) y RAC (1,24) y mucho menor en el cultivo en CMC (0,5).

Se identificaron un total de 28 proteínas por el análisis de los tres secretomas en los geles monodimensionales (**Tabla R8**). Las identificadas en el secretoma en xilano se agruparon en: 10 glicosil hidrolasas, 9 transportadores de proteínas de tipo ABC, 1 amidasa, 1 peptidasa y 2 proteínas no caracterizadas. Varias proteínas sin péptido señal se detectaron luego del análisis, posiblemente como resultado de lisis celular durante la extracción del secretoma, por lo tanto no fueron tenidas en cuenta para análisis posteriores. Dentro de las GH, se identificaron proteínas pertenecientes a diversas familias: 3 endoxilanasas (2 de familias GH10 y 1 GH11), 2 quitinasas (GH18), 1 celobiohidrolasa (GH6), 3 endoglucanasas ( $\beta$ -1,3 GH16,  $\beta$ -1,4 GH8 y  $\beta$ -1,6 GH30) y 1 amilasa (GH13).



**Figura R24. Análisis de proteínas del secretoma de *Paenibacillus* sp. A59:** SDS-PAGE-12% del secretoma bacteriano crecido en MM-CMC, MM-XI y MM-RAC (a) y gel bi-dimENSIONAL del secretoma bacteriano cultivado en MM-RAC (b). Se indican las diferentes secciones (gel monodimensional) y en los spots (gel bi-dimENSIONAL) que fueron escindidos para el análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF). M: marcador de peso molecular.

Además, la mayoría de ellas mostró CBMs asociados a su dominio catalítico. En la endoxilanasas de 160 kDa GH10 se observaron tres dominios de unión a xilano (dos CBM22 y un CBM9) así como también tres dominios SLH en el extremo carboxilo terminal. Las dos quitinasas GH18 identificadas en el secretoma presentaron un CBM12, previamente caracterizado como responsable de la unión a quitina. Por otro lado se observó un CBM20 de unión a almidón, asociado a la amilasa GH13. Las endoglucanasas GH6 y GH16 se asociaron con dominios de unión a celulosa CBM3 y CBM13, respectivamente.

Es de destacar que hubo tres péptidos con alto score que no pudieron ser identificados en ninguna de las proteínas de *Paenibacillus* sp. A59, según la anotación funcional descrita en la sección anterior. Sin embargo, sí fueron identificados en otras especies de *Paenibacillus*, posiblemente debido a variaciones o gaps en las secuencias peptídicas de *Paenibacillus* sp. A59.

Tabla R8: Identificación de proteínas secretadas por *Paenibacillus* sp. A59 por cultivo en xilano, carboximetilcelulosa y residuo de cosecha de caña de azúcar, mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF.

Actividad	Número de acceso	Score	Cob.	# Péptidos	PM teórico (kDa)/PI	Dominio CAZy
<b>Xilano</b>						
Endo- $\beta$ -1,4-xilanasas	WP_053782506.1	103,9	25,0	5	32/8,92	GH10
	WP_053779305.1	2,8	0,5	1	160,1/4,93	GH10+CBM22 <sub>2</sub> +CBM9+SLH <sub>3</sub>
	WP_053781844.1	61,8	12,0	2	22/9,38	GH11
Quitinasas	WP_053782577.1	92,0	25,6	13	73,6/6,35	GH18+CBM12
	WP_053782576.1	6,2	3,5	3	55,5/6,35	GH18+CBM12
Celobiohidrolasa	WP_053784024.1	5,1	4,3	2	75,7/5,47	GH6+CBM3
Endo- $\beta$ -1,3-glucanasa	WP_053782420.1	4,5	2,2	1	44,3/5,39	GH16+CBM13
Endo- $\beta$ -1,4-glucanasa	WP_053779698.1	4,2	6,0	2	44,8/8,35	GH8
Endo- $\beta$ -1,6-glucanasa	WP_053782296.1	2,7	2,0	1	55,4/8,4	GH30
$\alpha$ -amilasa	WP_053784175.1	34,9	21,0	9	76,1/6,27	GH13+CBM20
Peptidasa M4	WP_053783199.1	67,5	18,6	6	55,9/5,02	-
Proteína del transportador ABC	WP_053780420.1	36,9	27,5	7	36,8/4,87	-
	WP_053781964.1	28,0	16,8	8	67,2/4,84	-
	WP_053780095.1	21,2	34,7	6	29,8/4,91	-
	WP_053781518.1	4,8	2,0	2	76,4/4,7	-
	WP_053783256.1	7,2	15,1	2	30,4/4,9	-
	WP_053783994.1	5,5	5,2	2	67,1/5,02	-
	WP_053779742.1	2,4	3,0	1	47,8/4,91	-
	WP_053780115.1	9,7	6,8	3	52,5/5,36	-
WP_053781233.1	24,1	15,9	9	62,8/5,06	-	
Amidasa	WP_053780743.1	4,7	2,0	1	49,9/7,61	-
Hipotética	WP_053782877.1	9,7	4,8	2	52,2/4,67	-
	WP_053781861.1	1,9	1,0	1	54,4/5,36	-
<b>RAC</b>						
Endo-1,4- $\beta$ -xilanasas	WP_053782506.1	63,1	17,8	4	35,1/8,92	GH10
	WP_053779305.1	2,0	0,54	2	160,1/4,93	GH10+CBM22 <sub>2</sub> +CBM9+SLH <sub>3</sub>
Peptidasa M4	WP_053783199.1	30,8	14,6	5	55,9/5,02	-
Hipotética	WP_053782877.1	3,95	3,75	2	52,2/4,67	-

$\beta$ -xilosidasa	WP_053781832.1	2,1	1,35	1	90,1/5,82	GH43+CBM6
<b>CMC</b>						
Celobiohidrolasa	WP_053783364.1	6,4	2,2	2	118,1/5,06	GH48+CBM3

Las proteínas identificadas mostraron alta homología con GHs de *Paenibacillus* sp. A59: 1 endoglucanasa GH9 de *Paenibacillus* sp. FSL H7-0357 (62% de homología con WP\_053783505.1) y dos endoglucanasas GH5 de *Paenibacillus* sp. FSL R7-0331 y *Paenibacillus* sp. A1 (63 y 95% de homología con WP\_053782136.1 y WP\_053782127.1, respectivamente). Por otro lado, la única GH identificada en el secretoma de la bacteria crecida en CMC fue una celobiohidrolasa GH48, de alto peso molecular (118 kDa) unida a un CBM3. En el caso del secretoma por crecimiento en RAC, se identificaron las dos xilanasas GH10 (identificadas también en xilano: GH10 160 kDa y GH10 32 kDa) y además una beta xilosidasa GH43 con un CBM6. Una misma proteína con función hipotética (WP\_053782877.1) fue detectada en el sobrenadante en RAC y XI, lo que indica un posible rol aún no estudiado.

A partir del análisis de los 35 spots obtenidos de un gel bidimensional del secretoma de *Paenibacillus* sp. A59 crecido en RAC, se identificaron 6 proteínas principales (**Tabla R9**): una proteína hipotética de 130 kDa con dos dominios SLH en el extremo N-terminal y con una gran parte de su secuencia C-terminal sin homología con otras proteínas, una endoxilanasas GH10 de 32 kDa (previamente identificada en geles monodimensionales de secretoma en xilano y RAC), una proteína de unión a sustrato perteneciente a transportadores tipo ABC, una endonucleasa, una peptidasa M4 y una enolasa. Todas estas proteínas presentaron péptido señal, lo cual se correlaciona con su localización extracelular en el sobrenadante de cultivo. Algunos spots analizados se identificaron como productos de proteólisis de dichas proteínas, lo que podría deberse a actividad hidrolítica de la peptidasa o de proteasas no identificadas en este análisis. En otros casos, spots con mayor peso molecular o diferente punto isoeléctrico, se identificaron como la misma proteína. Si bien no es claro a qué puede deberse, una posibilidad podría ser la presencia de modificaciones post-traduccionales, que si bien han sido menos caracterizadas en bacterias, fueron descritas para otros géneros (Finnie y Svensson 2002; Nouwens y col., 2003).



## **Parte III**

**Endoxilanasas GH10XynA y GH11XynB de  
*Paenibacillus* sp. A59: estudios bioquímicos y  
aplicaciones sobre biomasa lignocelulósica**

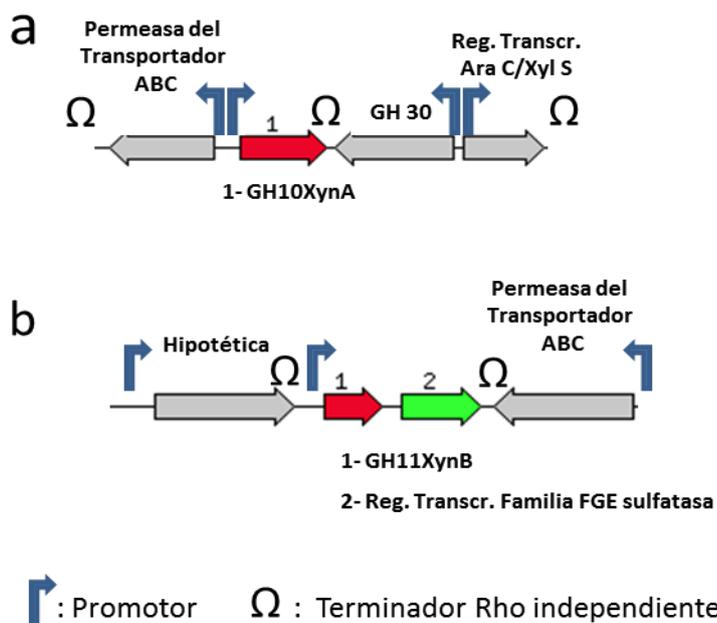
### III.1 Análisis bioinformático de GH10XynA y GH11XynB, filogenia y modelado molecular

La caracterización detallada de una enzima en particular implica estudios a nivel de su secuencia primaria y de su estructura molecular, además de una evaluación exhaustiva de aspectos bioquímicos y de actividad, como punto de partida para su utilización en procesos eficientes. Las enzimas GH10XynA y GH11XynB fueron seleccionadas para ser caracterizadas, debido a que se identificaron como cruciales para la actividad xilanolítica de *Paenibacillus* sp. A59. Para ello se realizó el análisis *in silico* de su secuencia y estructura y su expresión recombinante, lo que permitió la caracterización funcional.

En una primera etapa, estudiamos en profundidad la organización de los genes cercanos a los que codifican para GH10XynA y GH11XynB, mediante la herramienta *Seed Viewer* de RAST, ORFFinder de NCBI y por predicción de secuencias promotoras y terminadoras (mediante BPROM y FindTerm de la plataforma Softberry, respectivamente) (**Figura R25**). El gen *gh10XynA*, de 963 pb, se ubicó precedido por un gen codificante para una permeasa del sistema de transporte ABC (1185 pb) y seguido de un gen codificante para una glicosil hidrolasa de la familia GH30 (WP\_053782507.1) de 1338 pb. Río abajo le siguió un regulador transcripcional de la familia AraC (superfamilia MSF) de 915 pb.

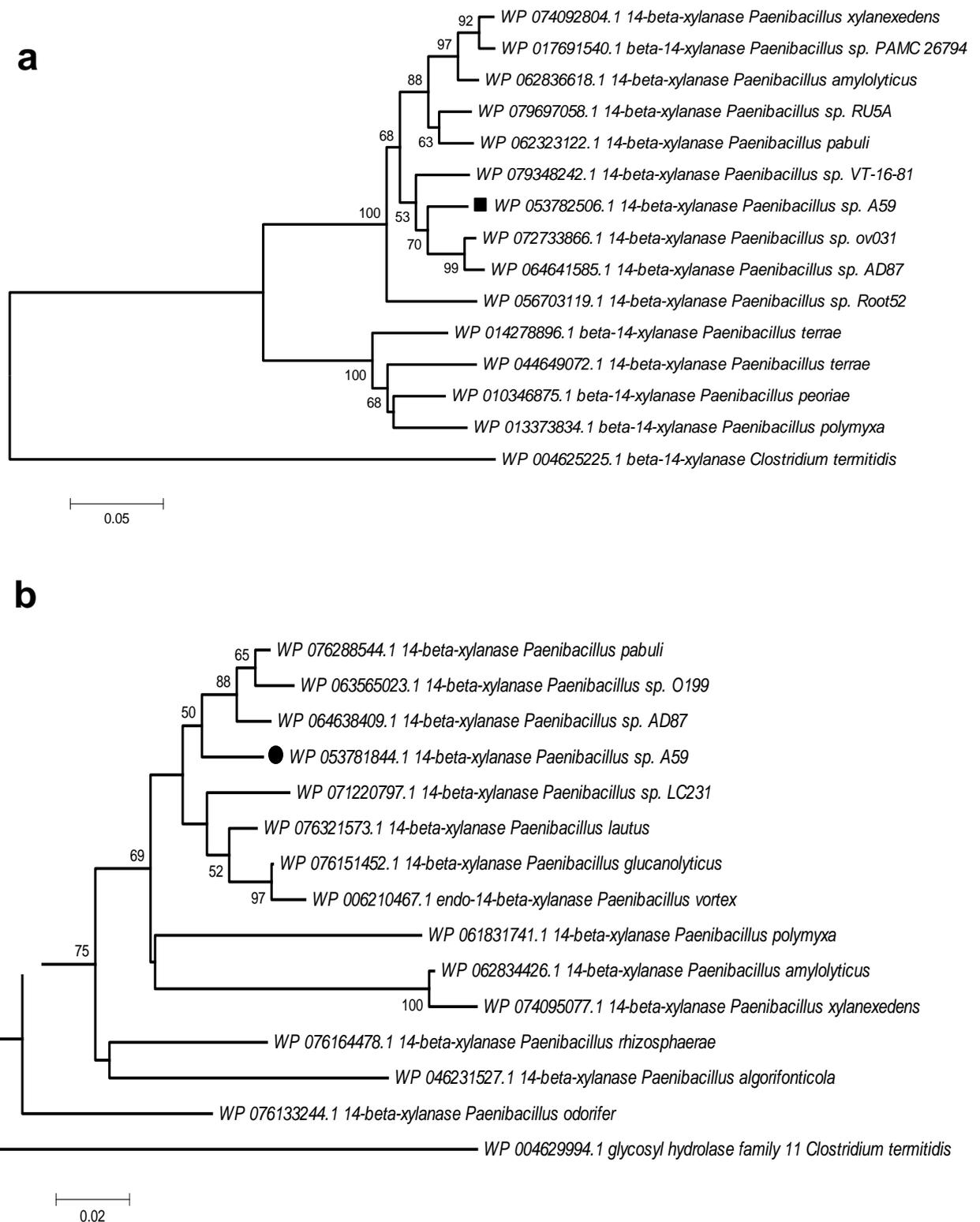
Por otro lado, el gen *gh11XynB*, de 636 pb se encontró formando parte de una misma unidad transcripcional con un gen de 840 pb que codifica para un regulador transcripcional de la familia FGE sulfatasa; río arriba de esta unidad se identificó una secuencia de 1473 pb codificante para una proteína hipotética con un dominio DUF4179 y río abajo una permeasa putativa del sistema ABC (superfamilia MSF).

Éstas proteínas del sistema ABC son diferentes a las encontradas en el secretoma de *Paenibacillus* sp. A59, descrito en la sección anterior.



**Figura R25. Organización génica de las secuencias codificantes para endoxilanasas de *Paenibacillus* sp. A59.** Las posibles funciones predichas (BLAST) de los CDS (secuencias codificantes) cercanas a gh10XynA (**a**) y gh11XynB (**b**) se describen sobre cada una de las flechas (que indican el sentido de transcripción). Los promotores y terminadores predichos también se esquetizan en el sitio indicado mediante BPROM y FindTerm, respectivamente.

Continuamos con el estudio de las proteínas GH10XynA y GH11XynB, las cuales se analizaron en esta instancia en base a su secuencia aminoacídica y se identificaron los dominios conservados en las bases de datos de NCBI y ExPASy-Prosite. GH10XynA mostró alta identidad (mayor al 96%, en más de un 90% de cobertura) con secuencias proteicas anotadas como endoxilanasas de otros aislamientos clasificados como *Paenibacillus* sp. (**Figura A2 anexo**). El análisis por Neighbor-Joining ubicó a GH10XynA cercana filogenéticamente a las endoxilanasas de *Paenibacillus* sp. AD87 (WP\_064641585.1) y *Paenibacillus* sp. Ov031 (WP\_072733866.1), dado que se agruparon en el mismo *cluster* apoyado por un valor de *bootstrap* del 70% (**Figura R26a**). GH11XynB presentó alta identidad (97% con 100% de cobertura) con una endoxilanasas de *Paenibacillus pabuli* (WP\_076288544.1) (**Figura A3 anexo**), y además el análisis filogenético la agrupó en el mismo *cluster* con secuencias de *Paenibacillus* sp. AD87 (WP\_064638409.1) y *Paenibacillus* sp. O199 (WP\_063565023.1) con un soporte de *bootstrap* de 50% (**Figura R26b**).



**Figura R26. Análisis filogenético de las endoxilanasas de *Paenibacillus* sp. A59:** La historia evolutiva de GH10XynA (a) y GH11XynB (b) fue inferida usando el método de Neighbor-Joining, con análisis de *p-distance* (MEGA v6). El árbol se construyó a escala, con la longitud de las ramas medidas en el número de diferencias en aminoácidos por sitio. Las secuencias de GH10 y GH11 de *Clostridium termitidis* fueron usadas como *outgroup* para cada árbol. El porcentaje de árboles en los cuales los diferentes taxones agrupan juntos se determinó a partir de un test de bootstrap de 1000 réplicas y se muestran en cada rama (mayores al 50%). La escala representa el número de aminoácidos sustituidos por sitio (MEGA v6.0).

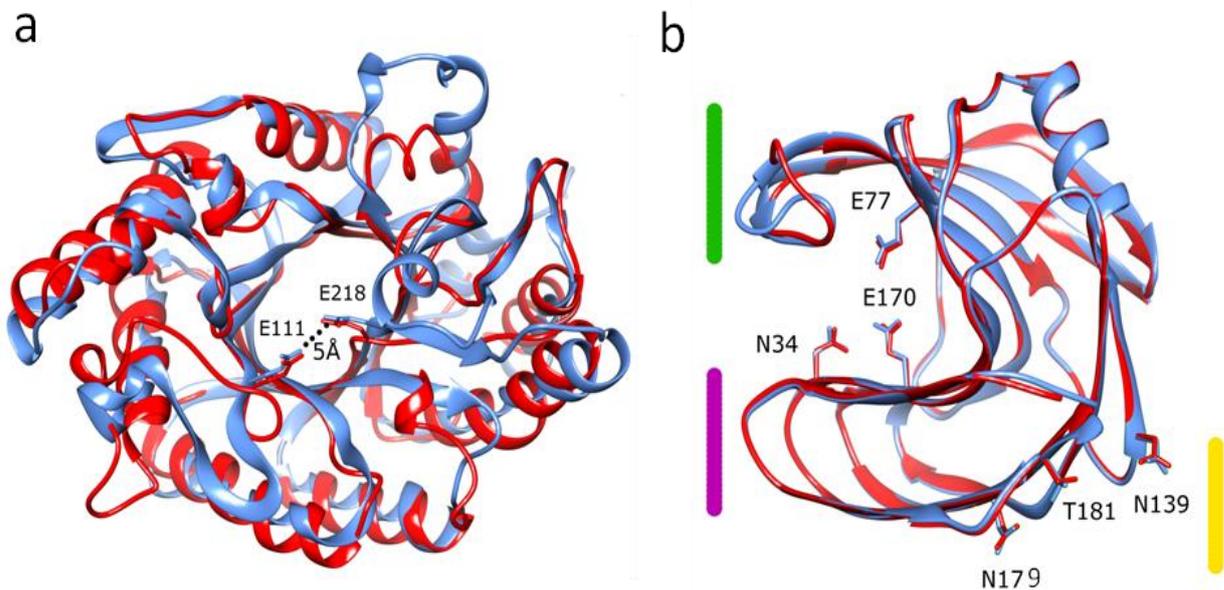
Todas las secuencias de endoxilanasas antes mencionadas fueron inferidas de estudios de *shotgun* de genomas, excepto por la endoxilanasas de la familia GH11 de *Paenibacillus* sp. O199 que también se identificó en estudios proteómicos (por cultivo en celulosa microcristalina o paja de trigo) (López-Mondéjar y col., 2016). Sin embargo, ninguna de las mencionadas anteriormente fue expresada de forma recombinante ni se caracterizó aún su actividad.

Para dilucidar la estructura terciaria de estas proteínas, se llevó a cabo el modelado molecular de las secuencias proteicas maduras de GH10XynA y GH11XynB, usando algoritmos de la plataforma I-TASSER (Roy y col. 2011). Esta herramienta, disponible de modo libre, selecciona aquellas estructuras proteicas de la base de datos PDB ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) con alta homología con la proteína en estudio, mediante una serie de alineamientos (utilizando diez programas diferentes incluidos en la plataforma LOMETS). Los templados seleccionados por I-TASSER para construir cada modelo fueron para GH10XynA: 3nyd-A, 1nq6-A, 4pmx-A, 1r85-A y para GH11XynB: 1axk-B, 1axk-A, 3lgr-A, 3wp3-A, 3mfa-A, 3wp3-A y 2z79-A. Luego los fragmentos de templados que obtuvieron el máximo nivel de significancia fueron re-ensamblados y en una segunda ronda de simulación se refinó la topología global para generar el modelo final.

De este modo se obtuvo un modelo con alto nivel de confianza para la proteína GH10XynA (parámetros C-score 1.2, TM-score  $0.88 \pm 0.07$ , RMSD  $3.7 \pm 2.5 \text{ \AA}$ ) el cual presentó máxima homología estructural (TM-score 0.969) con una endoxilanasas GH10 de la especie bacteriana termófila *Thermotoga petrophila* (PDB: 3niy). Sin embargo, aunque la estructura general resultó altamente conservada, se observaron algunas diferencias entre los dos modelos alineados, posiblemente debido a que la GH10 de *T. petrophila* es una enzima hipertermófila (Santos y col., 2010). GH10XynA se ajustó al clásico dominio catalítico de las enzimas de la familia GH10 del clan A: un barril  $(\beta/\alpha)_8$  (TIM-barrel), el cual se asemeja a un “*bowl* de ensalada” (**Figura R27a**).

Los sitios de unión a ligando de GH10XynA fueron identificados por análisis de algoritmos COACH (también en la plataforma I-TASSER), en base a 135 templados con elevado C-score, siendo la más representativa una GH10 cristalizada formando un complejo con xilobiosa (XynGR40, PDB: 5d4y). Por otro lado, los residuos E111 y E218 (de la proteína madura) fueron identificados como la díada catalítica, con una distancia atómica de  $5 \text{ \AA}$  entre ambos, lo cual fue descrito previamente como un requerimiento estructural para el mecanismo catalítico de retención de la

conformación anomérica (*retaining*) en otras endoxilanasas GH10 (Solomon y col., 2007). Estos resultados aportan evidencias que GH10XynA es una endoxilanasas, perteneciente a la familia GH10, con un mecanismo catalítico de retención.



**Figura R27. Modelado molecular de GH10XynA y GH11XynB:** Los modelos de GH10XynA (a) y GH11XynB (b) se generaron en I-TASSER. Se muestran los modelos superpuestos de GH10XynA y GH11XynB (celeste) con su homólogo estructural más cercano: PDB: 3niy (xilanasas GH10 de *Thermotoga petrophila*) y PDB: 1axk (el módulo catalítico ingenierizado de *Bacillus* sp.), respectivamente. Los residuos catalíticos de ácido glutámico se muestran para cada modelo. En GH11XynB, los dominios correspondientes al “pulgar” y los “dedos” se indican con líneas verde y violeta, respectivamente, así como también los potenciales residuos involucrados en el sitio de unión secundario (N139, N179, T181) con una línea amarilla. Se destaca además el residuo N34 sugerido como clave en enzimas alcalinas.

Se obtuvo también un modelo molecular de alta confianza para la proteína madura GH11XynB, con un C-score de 1.64, TM-score de  $0.94 \pm 0.05$  y RMSD de  $2.0 \pm 1.6 \text{ \AA}$ . Éste presentó alta analogía estructural (TM score de 0.993), con el dominio  $\beta$ -1,4-xilanasas de una proteína de *Bacillus* generada por ingeniería genética (PDB: 1axkA1), con excelente alineamiento entre ambas. El modelo de GH11XynB presentó un dominio catalítico con una estructura  $\beta$ -jelly roll, similar a una mano derecha parcialmente cerrada, con dos hojas  $\beta$  antiparalelas (los “dedos”) y una única hélice  $\alpha$  (Figura R27b) (Törrönen y col., 1994; Törrönen y Rouvinen 1995). A partir del análisis de COACH y del alineamiento de las estructuras más similares, se identificaron los aminoácidos E77 y E110 como los involucrados en el mecanismo catalítico, como fue reportado previamente para otras endoxilanasas GH11. La díada catalítica se encuentra ubicada en el medio de un hueco profundo y estrecho, lo cual

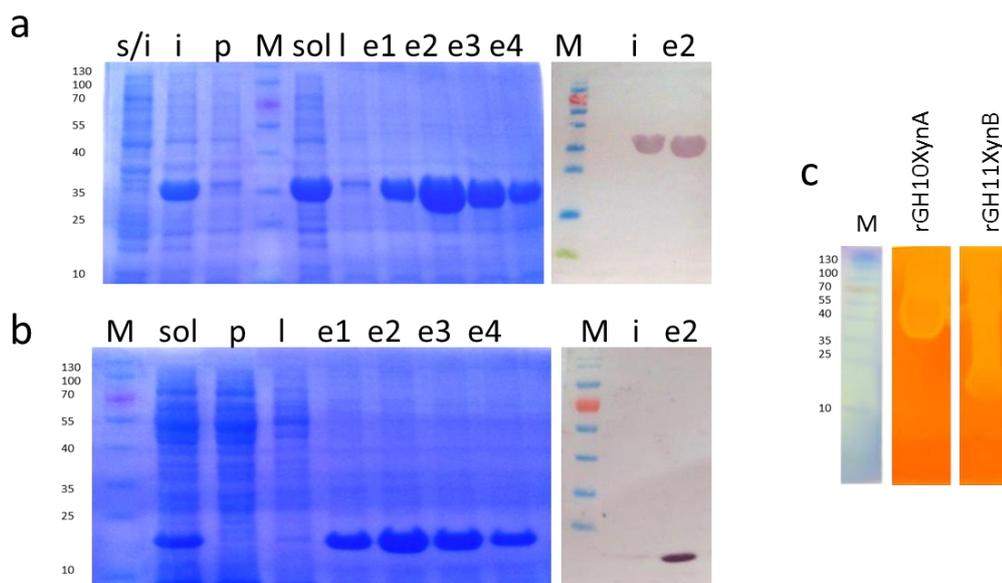
se asocia con el mecanismo de tipo “endo” de estas enzimas (Paës y col., 2012). El bucle generado entre las hojas  $\beta$  llamadas B7 y B8 formó el “pulgar”, con el motivo conservado PSIXG. El modelado además mostró otros aminoácidos relevantes, como P89 en el *cord* y N34, un residuo asociado con la funcionalidad de las enzimas de la familia GH11 a pHs superiores a 5, en las llamadas xilanasas alcalinas (Törrönen y Rouvinen 1997; Sapag y col., 2002). Además, se identificaron tres aminoácidos (N139, N179, T181) potencialmente involucrados en un posible sitio secundario de unión a sustratos largos, sobre una de las superficies planas de la proteína (Curyvers y col., 2011) (**Figura R27b**).

El análisis de secuencia y estructura molecular descrito anteriormente permitió inferir la potencial actividad endoxilanolítica de GH10XynA y GH11XynB, con motivos catalíticos propios de cada familia de glicosil hidrolasas. Sin embargo, para poder asignar un número EC a una enzima, es necesaria la confirmación bioquímica de su actividad.

### **III.2 Expresión recombinante y caracterización bioquímica de las endoxilanasas GH10XynA y GH11XynB**

La amplificación de la secuencia codificante correspondiente a la proteína madura de GH10XynA y GH11XynB se realizó a partir del ADN genómico de *Paenibacillus* sp. A59 y, una vez confirmada la integridad de las secuencias, las mismas fueron clonadas en vectores para expresión recombinante en *E. coli*. Se optimizaron las condiciones de inducción y purificación, para obtener las proteínas solubles. rGH10XynA fue obtenida en el sistema pET-*E.coli*, mientras que la mejor expresión de rGH11 se obtuvo en el sistema pJExpress-*E.coli*, ya que en el sistema pET la proteína formaba cuerpos de inclusión.

En SDS-PAGE las proteínas purificadas rGH10XynA y rGH11XynB mostraron un peso molecular de 32 kDa y 20 kDa (similar a los esperados), respectivamente, y no se observó la formación de dímeros u otras estructuras de mayor peso molecular en geles en condiciones no desnaturizantes. Ambas presentaron además actividad endoxilanasas en zimogramas, usando xilano como sustrato, lo cual representa un primer indicio de su capacidad xilanolítica que será confirmado en ensayos posteriores (**Figura R28**).



**Figura R28. Análisis de las proteínas recombinantes purificadas rGH10XynA y rGH11XynB:** Purificación IMAC soluble (10% SDS-PAGE) (a y b) y zimograma en xilano (12% SDS-PAGE-0.1% xilano) (c) de rGH10XynA (a) y rGH11XynB (b). M: marcador de peso molecular pre-teñido, s/i: sin inducir, i: inducido, p: percolado, l: lavado sol: fase soluble, e: eluciones.

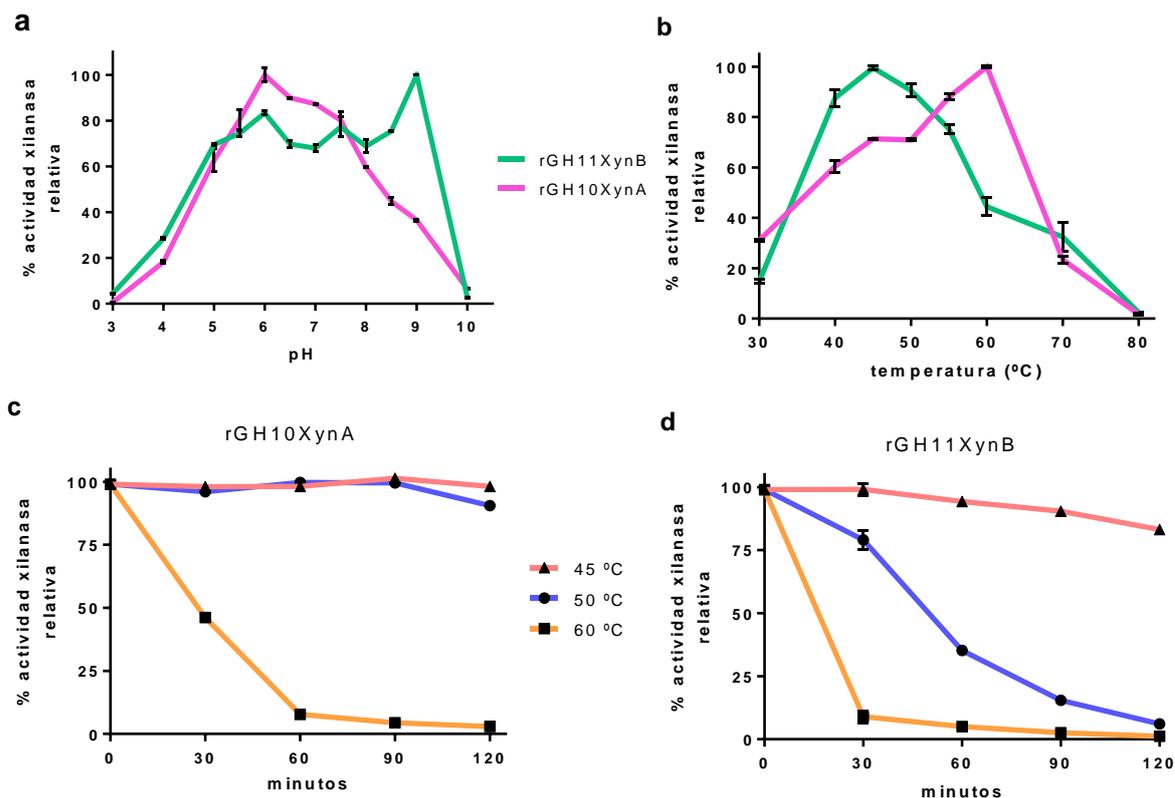
La clasificación de las glicosil hidrolasas en familias se establece en base a su estructura molecular; sin embargo dentro de una misma familia pueden existir enzimas con diferente actividad (sobre diferentes sustratos), es decir que una familia GH puede agrupar enzimas de distinto número EC. Es por ello que se ensayó la especificidad de sustrato de las dos enzimas usando tanto sustratos celulósicos como hemicelulósicos (**Tabla R10**). rGH11XynB fue activa únicamente sobre xilano ( $85.04 \pm 0.02$  UI/mg) y arabinoxilano de trigo ( $131.56 \pm 0.08$  UI/mg), confirmando así una actividad xilanasa “verdadera”, lo cual coincide con el hecho de que, hasta el momento, todas las enzimas de la familia GH11 presentan sólo actividad xilanasa (Pollet y col., 2010). Por otro lado, rGH10XynA mostró no solo actividad sobre xilano ( $105.96 \pm 0.05$  UI/mg) y arabinoxilano de trigo ( $99.58 \pm 0.14$ ), sino también trazas de actividad sobre pNP-xilopiranosido ( $0.06 \pm 0.02$  UI/mg) y pNP-celobiosido ( $1.25 \pm 0.01$  UI/mg). Esta enzima podría contribuir entonces a la hidrólisis de xilo y celooligosacáridos, aunque no mostró actividad sobre ningún tipo de celulosa, soluble o cristalina. El perfil de actividad en función de la temperatura y el pH de cada xilanasa fue determinado utilizando xilano como sustrato, para caracterizar la actividad en diferentes condiciones de reacción (**Figura R29**).

Tabla R10: Especificidad de sustrato de rGH10XynA y rGH11XynB		
	rGH10XynA (UI/mg)	rGH11XynB (UI/mg)
Xilano de abedul	105.96 ± 0.05	85.04 ± 0.02
Arabinoxilano de trigo	99.58 ± 0.14	131.56 ± 0.08
Avicel	ND	ND
Carboximetilcelulosa	ND	ND
BMCC	ND	ND
PASC	ND	ND
pNP-xilopiranosido	0.056 ± 0.02	ND
pNP-glucopiranosido	ND	ND
pNP-celobiosido	1.25 ± 0.01	ND
pNP-arabinosido	ND	ND

ND: no detectado, UI/mg: UI de actividad enzimática/mg de proteínas totales.

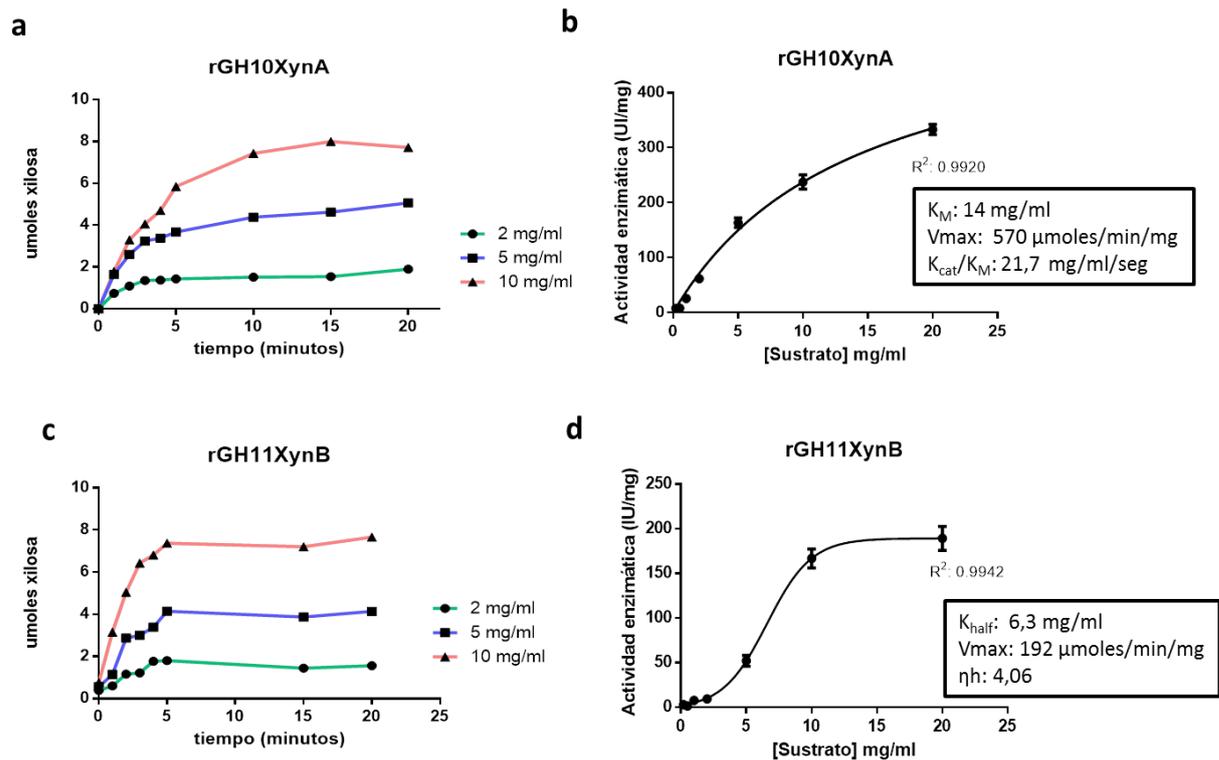
rGH10XynA mostró una actividad máxima a pH 6 y 60°C, con más del 70% de actividad en un rango de pH desde 5.5 a 7.5 y a temperaturas entre 45°C y 60°C. Sin embargo, la enzima perdió casi toda la actividad luego de 60 minutos a 60°C, mientras que se mantuvo completamente estable por 120 minutos a 45°C y 50°C. Es por ello que se seleccionaron como condiciones de reacción para ensayos posteriores pH 6 y 45° o 50°C. rGH11XynB mostró una actividad máxima a pH 9 y 45°C, con más del 60% de actividad en un amplio rango de pH, de 5 a 9, y de temperatura (entre 40°C y 55°C). A la temperatura óptima de 45°C, la enzima mantuvo más del 75% de actividad xilanasa luego de 120 minutos. Por lo tanto pH 6 y pH 9 y 45°C se seleccionaron como mejores condiciones de reacción.

Los parámetros cinéticos para cada enzima se evaluaron realizando las reacciones enzimáticas de actividad a diferentes concentraciones de xilano, en condiciones óptimas de reacción y durante 5 min (tiempo en el cual la reacción transcurrió en la zona de  $V_0$ ) (**Figura R30**). Mientras que la regresión no lineal aplicada a rGH10XynA mostró una cinética Michaeliana (hipérbola), la actividad de rGH11XynB generó una curva sigmoide, indicando una cinética no-Michaeliana, lo que indicaría un efecto cooperativo de unión al sustrato.



**Figura R29. Perfil de actividad xilanasica de rGH10XynA y rGH11XynB.** Condiciones óptimas de pH (a), temperatura (b) y estabilidad térmica (c) de las endoxilanasas rGH10XynA y rGH11XynB. Los resultados corresponden al promedio y desvío estándar de tres réplicas técnicas. Dos ensayos con muestras biológicas independientes se llevaron a cabo con resultados equivalentes.

Calculamos entonces los parámetros cinéticos, para tener una noción de la eficiencia catalítica de ambas enzimas. Para rGH10XynA se obtuvieron una  $K_M$  y  $V_{max}$  de 14 mg/ml y  $570 \mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ , respectivamente, y la eficiencia catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ) de  $21.7 \text{ mg ml}^{-1} \text{seg}^{-1}$  se calculó en base al número de recambio ( $k_{cat}$ )  $304 \text{ seg}^{-1}$ . En el caso de rGH11XynB, la  $K_{half}$  resultó 6.3 mg/ml, la  $V_{max}$   $192 \mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  y el coeficiente de Hill ( $\eta_H$ ) 4.06. Estos resultados indicaron un comportamiento alostérico de rGH11XynB, con efecto de unión cooperativa, lo cual sugirió la presencia de sitios de unión secundarios (de inglés *secondary binding sites* SBSs), tal como se observó recientemente en otras endoxilanasas de la familia GH11 (de *Bacillus circulans* y *Pseudozyma brasiliensis*) (Cuyvers y col., 2011; Borges y col., 2014). Una región relativamente plana, flanqueada por residuos de asparagina y treonina, podría actuar como SBS. Los aminoácidos claves del SBS (identificados en otras GH11 por estudios de mutagénesis) están altamente conservados en rGH11XynB, tal como se determinó en el modelo molecular (Figura R27b).



**Figura R30. Cinética enzimática de rGH10XynA y rGH11XynB.** Producto liberado en las reacciones de hidrólisis, evaluados en diferentes concentraciones de xilano, expresados en  $\mu\text{moles/min}$ , de rGH10XynA (a) y rGH11Xynb (b). Los parámetros cinéticos de fueron calculados en GraphPrism v 6.0 a partir de la regresión no lineal de las curvas de actividad enzimática (UI/mg) en función de diferentes concentraciones de xilano (mg/ml) (b, d).

### III.3 Mecanismo de hidrólisis de xilano de las endoxilanasas rGH10XynA y rGH11XynB

El mecanismo de acción de una enzima está determinado fundamentalmente por la conformación de su sitio catalítico lo cual influye en el tipo de sustrato que es capaz de internalizar para una hidrólisis eficiente. En el caso particular de las enzimas en estudio, es evidente la diferencia estructural entre las dos endoxilanasas, observada a partir del modelado molecular, lo cual supone variaciones en el grado de polimerización (GP) de los sustratos que reaccionan y los productos originados.

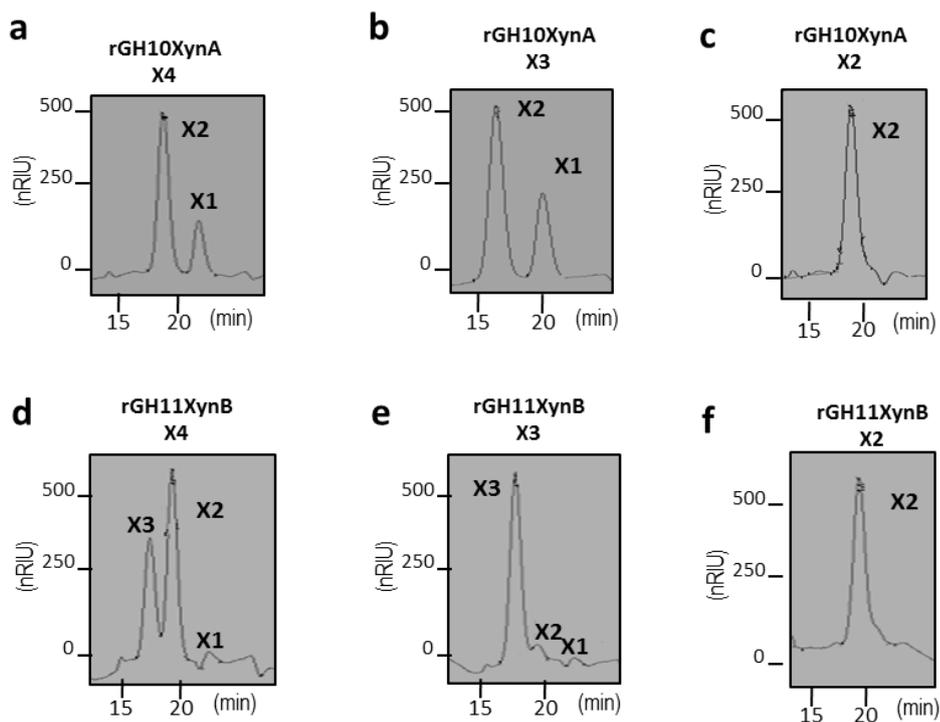
Para determinar el mecanismo de acción de rGH10XynA y rGH11XynB se utilizaron xilooligosacáridos no ramificados, tales como xilotetraosa (X4) y xilotriosa (X3) así como también sobre el disacárido xilobiosa (X2) y se cuantificaron los productos generados mediante HPLC. Los resultados observados en la **Tabla R11 y Figura R31** indicaron que la endoxilanasas rGH10XynA hidroliza X4 y X3 completamente a xilobiosa y xilosa, lo cual podría indicar la hidrólisis de los enlaces glicosídicos terminales de X3 y X4, de un modo procesivo, librando así xilosa, lo

cual coincidiría con la actividad observada sobre pNP-X. Por otro lado, rGH11XynB fue activa principalmente sobre X4, generando X2 y X3 como principales productos, mientras que X3 fue muy poco hidrolizado a X2.

Tabla R11: Productos de hidrólisis de xilotetraosa, xilotriosa y xilobiosa por rGH10XynA y rGH11XynB.					
Enzima	S	X4 (mg/ml)	X3 (mg/ml)	X2 (mg/ml)	X1 (mg/ml)
rGH10XynA	X4	ND	ND	1.66±0.90 (86%)	0.28±0.01 (14%)
	X3	ND	ND	1.72±0.06 (77%)	0.51±0.00 (23%)
	X2	ND	ND	1.48±0.11 (100%)	ND
rGH11XynB	X4	ND	0.37±0.04 (27%)	1.01±0.06 (73%)	NC
	X3	ND	1.41±0.17 (94%)	0.10±0.00 (6%)	NC
	X2	ND	ND	1.25±0.14 (100%)	ND

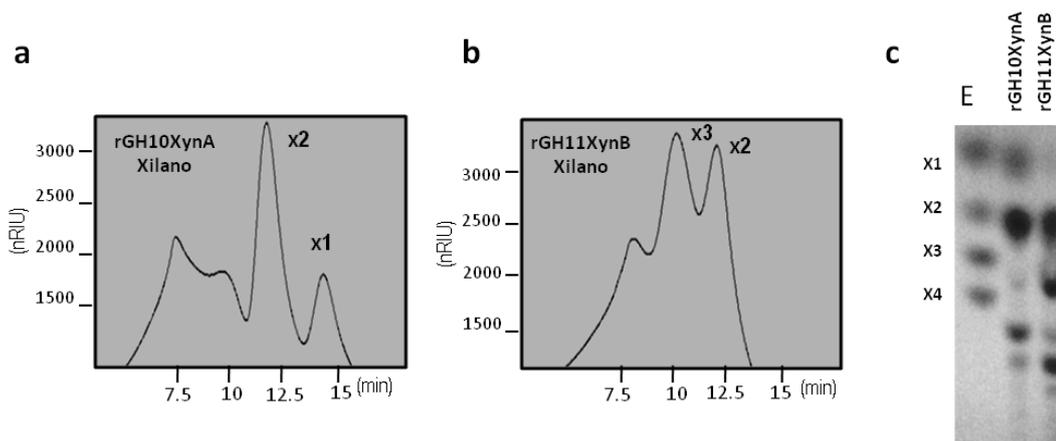
ND: no detectado, NC: no cuantificable (<0.1 mg/ml), S: sustrato. Entre paréntesis se muestra el porcentaje correspondiente a cada producto de la reacción. X4: xilotetraosa, X3: xilotriosa, X2: xilobiosa, X1: xilosa.

Estos resultados sugieren que el principal mecanismo de actividad de rGH11XynB podría ser la hidrólisis de enlaces glicosídicos internos de X4, y es compatible con la falta de actividad sobre pNP-X. Es decir que mientras que rGH10XynA fue capaz de hidrolizar sustratos con GP≥3, rGH11XynB mostró una actividad principal sobre GP≥4. El disacárido xilobiosa (X2) no fue hidrolizado por ninguna de las dos enzimas. Esto confirma la actividad endoxilanasas de ambas y que además no poseen actividad β-xilosidasa.



**Figura R31. Patrón de hidrólisis de xilooligosacáridos de rGH10XynA y rGH11XynB.** Azúcares solubles liberados a partir de la hidrólisis de X4 (a, d), X3 (b, e) y X2 (c, f) por rGH10XynA y rGH11XynB, respectivamente, determinados por HPLC, en reacciones enzimáticas a pH6 y 45°C. X1: xilosa, X2: xilobiosa, X3: xilotriosa, X4: xilotetraosa, nRIU: unidades de índice de refracción.

El análisis de los azúcares solubles liberados desde xilano indicó perfiles diferentes de hidrólisis de este sustrato para ambas enzimas. rGH10XynA liberó X2 como principal azúcar así como también X1 y X3, mientras que GH11XynB no liberó X1, sólo X2 y X3 (en proporciones similares) y xilooligosacáridos (XOS) de alto grado de polimerización. Estos resultados coinciden con los esperados en base a las conclusiones obtenidas en el ensayo sobre xilooligosacáridos. En ambos casos, X3, X4 y XOS de mayor grado de polimerización se observaron por TLC pero no pudieron ser resueltos por HPLC (**Figura R32**). Los controles de enzima y sustrato se muestran en la **Figura A4** del Anexo. Estos resultados podrían correlacionarse con un acceso diferencial al sustrato por parte de cada enzima, basado en las diferencias estructurales de la conformación del sitio activo antes descritas.



**Figura R32. Patrón de hidrólisis de xilano de rGH10XynA y rGH11XynB:** Azúcares solubles liberados a partir de la hidrólisis de xilano por rGH10XynA (a) y rGH11XynB (b) determinados por HPLC y por TLC (c), en reacciones enzimáticas a pH 6 y 45°C. E: estándares, X1: xilosa, X2: xilobiosa, X3: xilotriosa, X4: xilotetraosa.

Para analizar si ambas enzimas tenían efecto sinérgico o aditivo entre ellas, ensayamos la hidrólisis sobre xilano de las enzimas individuales o combinadas, mediante la cuantificación de los azúcares solubles liberados por HPLC, en diferentes condiciones de reacción (pH y temperatura) (**Tabla R12**), de manera de identificar los productos de reacción. Al ensayar rGH11XynB en sus dos pH óptimos, pH 6 y pH 9 (a 45°C), se obtuvo casi el doble de concentración de X2 a pH 6. Esto podría ser explicado por el hecho que el perfil de dependencia al pH en las glicosil hidrolasas es determinado por el estado de ionización de los dos residuos carboxílicos de su sitio activo (Ly y Withers 1999). Estos resultados resaltaron la importancia de analizar el patrón detallado de hidrólisis de los sustratos en estudio para seleccionar la condición de reacción más adecuada, según el grado de polimerización que se requiera para cada aplicación industrial.

La combinación de ambas enzimas en la misma proporción (5 UI/mg de xilano, cada una) no mostró efecto aditivo ni sinérgico sobre xilano, dado que se observaron resultados equivalentes a los observados por la acción única de rGH10XynA. El análisis de los productos de hidrólisis de arabinoxilano de trigo, un tipo de xilano altamente sustituido con arabinosa (38%), mostró muy pocas cantidades de X2 como producto principal ( $0,54 \pm 0,07$  mg/ml y  $0,22 \pm 0,00$  mg/ml para rGH10XynA y rGH11XynB, respectivamente) y valores no cuantificables de xilosa ( $< 0.1$  mg/ml) (datos no tabulados). Estos resultados indicaron una muy baja conversión de arabinoxilanos altamente ramificados por parte de ambas enzimas recombinantes.

Tabla R12: Azúcares liberados de la hidrólisis de xilano por endoxilanasas rGH10XynA y rGH11XynB					
Enzima	UI/mg de xilano	Condición de reacción	Xilotriosa (X3) (mg/ml)	Xilobiosa (X2) (mg/ml)	Xilosa (X1) (mg/ml)
rGH10XynA	5	45°C, pH 6	NR	2.54±0.50	0.90±0.20 (15.84%)
		50°C, pH 6	ND	1.80±0.20	0.77±0.60 (13.55%)
rGH11XynB	5	45°C, pH 6	0.76±0.60	1.30±0.20	ND
		45°C, pH 9	0.80±0.30	0.60±0.20	ND
rGH10XynA	10	45°C, pH 6	NR	3.40±0.30	0.68±0.10 (11.9%)
rGH11XynB	10	45°C, pH 6	1.40±0.80	1.42±0.25	ND
rGH10XynA +rGH11XynB	5 (c/u)	45°C, pH 6	ND	2.90±0.34	0.76±0.10 (13.4%)

NC: no cuantificable (<0.1 mg/ml) NR: no resuelto, ND: no detectado. Entre paréntesis se muestra el porcentaje de conversión a X2 y X1

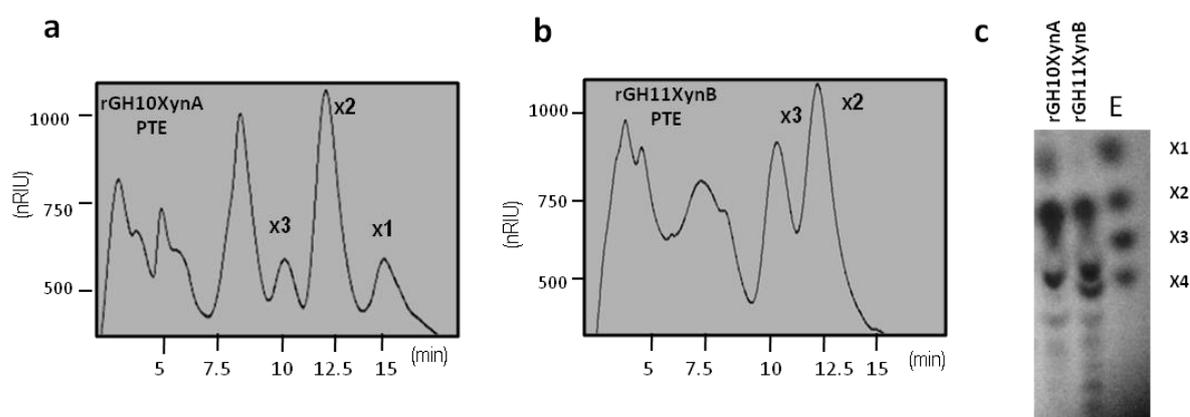
Los ensayos de hidrólisis de las endoxilanasas rGH10XynA y rGH11XynB evidenciaron la capacidad de bioconversión de xilano, generando xilooligosacáridos, xilobiosa y xilosa (solo con rGH10XynA) como principales productos, lo cual resultó promisorio para avanzar hacia la etapa de desarrollo de reacciones de hidrólisis en biomásas lignocelulósicas pre-tratadas.

## **Parte IV**

### **Aplicación de rGH10XynA y rGH11XynB en la bioconversión de biomasa lignocelulósica**

#### IV.1 Hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica pre-tratada

Con el objetivo de evaluar la bioconversión de los polímeros hemicelulósicos de biomásas obtenidas en las condiciones de procesamiento industrial, las endoxilanasas recombinantes se ensayaron sobre paja de trigo pre-tratada por extrusión. La paja de trigo extrusada es rica en arabinoxilanos; sin embargo el grado de sustitución es mucho menor (3,5%) que el del arabinoxilano de trigo comercial (38%). Se seleccionaron las condiciones de pH y temperatura definidas como favorables para ambas enzimas (pH 6, 45°C). Se observó un patrón de hidrólisis diferente entre rGH10XynA y rGH11XynB, tanto por TLC como por HPLC (**Figura R33**). Mientras que ambas enzimas liberaron XOS con GP>2 y no se liberó arabinosa, X1 solo se detectó como producto de rGH10XynA, y la concentración máxima de X3 fue generada por rGH11XynB. No se observó efecto aditivo ni sinérgico con la combinación de rGH11XynB y rGH10XynA a la misma proporción, similar a lo obtenido en el caso de xilano (**Tabla R13**). Al comparar la conversión a xilosa entre rGH10XynA con un cóctel enzimático hemicelulolítico NS22002 (Novozymes), se observó para este último un rendimiento mayor en la conversión a X1, probablemente debido a la actividad  $\beta$ -xilosidasa ( $2.32\pm 0.15$  UI/ml) presente en el cóctel.



**Figura R33. Patrón de hidrólisis de paja de trigo extrusada de rGH10XynA y rGH11XynB:** Azúcares solubles liberados a partir de la hidrólisis de paja de trigo extrusada (PTE) por rGH10XynA (a) y rGH11XynB (b) determinados por HPLC y por TLC (c), en reacciones enzimáticas a pH6 y 45°C. E: estándares, X1: xilosa, X2: xilobiosa, X3: xilotriosa, X4: xilotetraosa.

**Tabla R13: Azúcares liberados de la hidrólisis de paja de trigo extrusada por rGH10XynA y rGH11XynB**

Enzima	UI/mg de biomasa	Xilotriosa (X3) (mg/ml)	Xilobiosa (X2) (mg/ml)	Xilosa (X1) (mg/ml)	Conversión a xilosa (%)
rGH10XynA	2.5	0.12±0.10	0.82±0.10	0.45±0.10	7.30
rGH11XynB	2.5	0.46±0.10	0.69±0.10	NC	-
rGH10XynA + rGH11XynB	1.25 (c/u)	ND	1.11±0.10	0.61±0.10	8.94
NS22002	0.6	ND	2.70±0.13	1.65±0.11	24.20

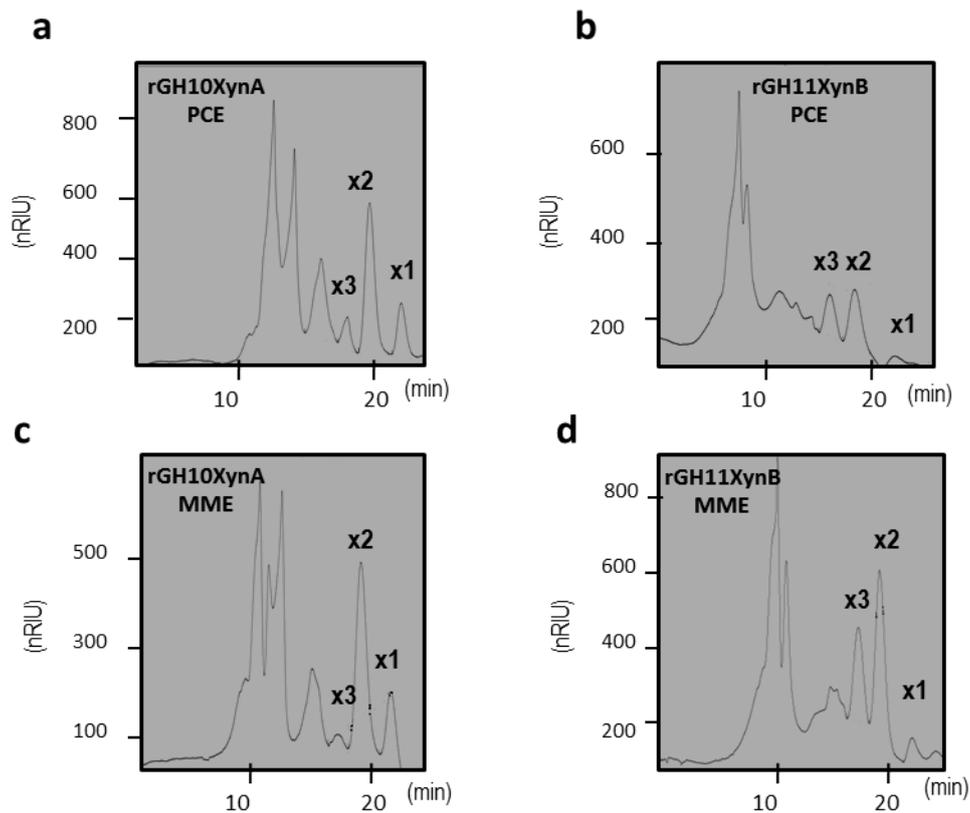
NC: no cuantificable <0.1 mg/ml, ND: no detectado

En base a estos resultados se definió por un lado no utilizar las enzimas combinadas en forma de cóctel ya que no se observó un aumento en la bioconversión a X1 y por el otro, utilizar 2.5 UI/mg biomasa para las siguientes reacciones de bioconversión de biomasa. Las pruebas posteriores se realizaron sobre otros residuos agrícolas pre-tratados por extrusión: paja de cebada (PCE) (20.9 % xilano, 5.1% arabinosa) y mazorca de maíz dulce (MME) (24.6 % xilano, 7,1% arabinosa). Se observó un patrón de hidrólisis similar al obtenido anteriormente para paja de trigo extrusada, resultando X2 y X1 como principales productos de hidrólisis de rGH10XynA, y X3 y X2 de la hidrólisis mediante rGH11XynB, para ambas biomasa. Sin embargo, cuando se utilizó rGH11XynB la conversión de maíz a X2 y X3 fue superior a la observada para cebada (**Tabla R14, Figura R34**). Los controles de enzima y sustrato se muestran en la **Figura A4** del Anexo.

**Tabla R14: Azúcares liberados de la hidrólisis de paja de cebada (PC) y mazorca de maíz dulce (MM) (extrusados E) por rGH10XynA y rGH11XynB**

Bioma sa	Enzima	UI/mg de biomasa	Xilotriosa (X3) (mg/ml)	Xilobiosa (X2) (mg/ml)	Xilosa (X1) (mg/ml)	Conversión a X1 (%)
PCE	rGH10XynA	2.5	NR	1.50±0.15	0.32±0.04	6.73
	rGH11XynB	2.5	0.25±0.04	0.58±0.11	NC	-
MME	rGH10XynA	2.5	NC	1.29±0.26	0.24±0.05	4.29
	rGH11XynB	2.5	0.47±0.08	1.09±0.27	NC	-

NR: no resuelto, NC: no cuantificable <0.1 mg/ml



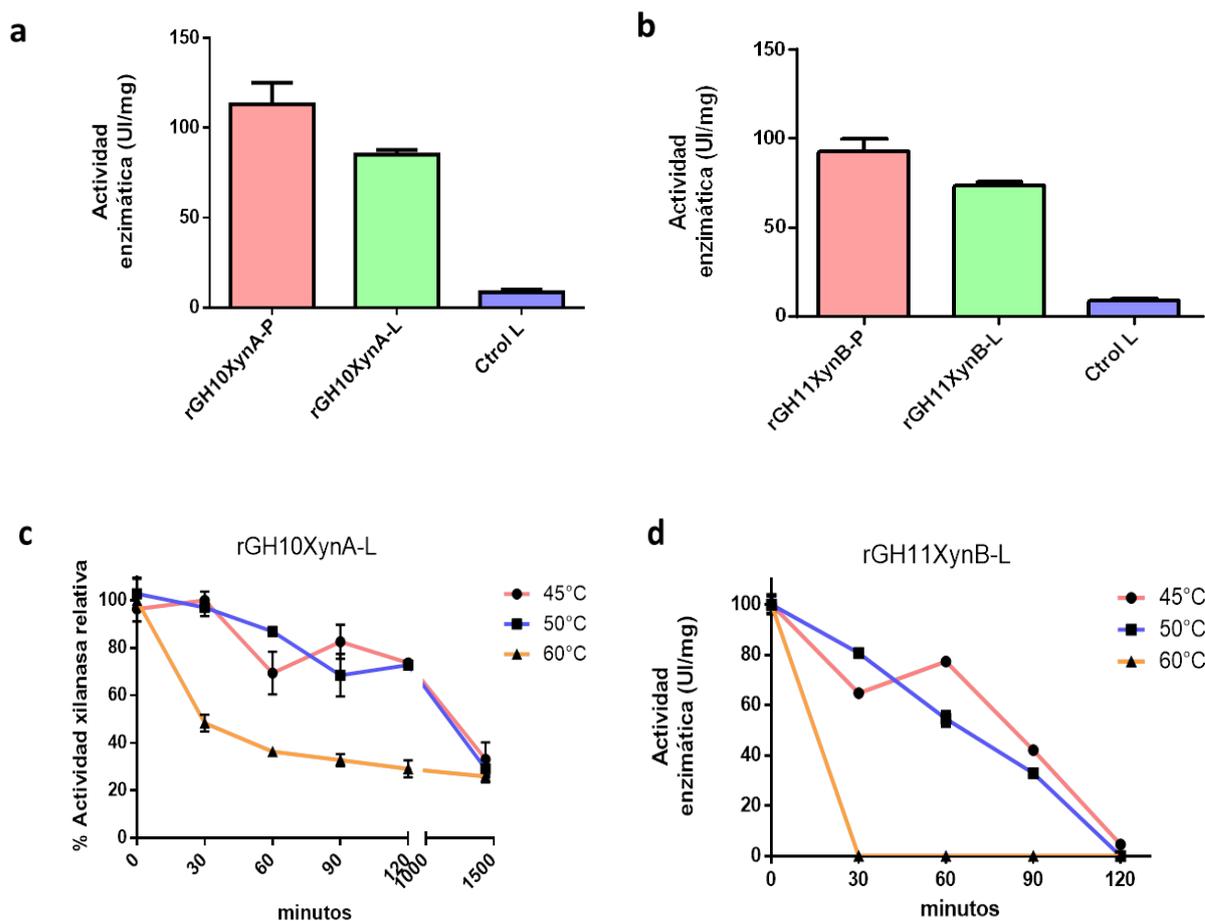
**Figura R34. Patrón de hidrólisis de rGH10XynA y rGH11XynB sobre diferentes biomazas pre-tratadas:** Azúcares solubles liberados a partir de la hidrólisis de paja de cebada extrusada (PCE) y mazorca de maíz extrusada (MME), mediante rGH10XynA (a, c) y rGH11XynB (b, d) determinados por HPLC, en reacciones enzimáticas a pH 6 y 45°C. X1: xilosa, X2: xilobiosa, X3: xilotriosa.

## IV.2 Utilización de extractos recombinantes sin purificar en la hidrólisis de biomasa lignocelulósica pre-tratada

Como estrategia para disminuir los costos en la utilización de enzimas recombinantes para bioconversión de biomasa se evaluó la factibilidad de utilizar los extractos proteicos provenientes del lisado de las bacterias recombinantes sin purificar por IMAC. En primer lugar se analizó la actividad enzimática xilanasa de los lisados (L) en comparación con las enzimas purificadas (P) respectivas, caracterizando además la termoestabilidad de dichos extractos (**Figura R35**). Los lisados presentaron una actividad xilanasa en niveles comparables con las enzimas purificadas: 82.5 UI/mg rGH10XynA-L respecto de 112 UI/mg de rGH10XynA-P y 75.4 UI/mg rGH11XynB-L respecto de 100 UI/mg rGH11XynB-P. Con respecto a la termoestabilidad, los lisados correspondientes a rGH10XynA-L mantuvieron un 70% de la actividad hasta 2 hs a 45°C y 50°C, mientras que a 60°C se redujo al 50% en los primeros 30 minutos. A las 24 hs a las tres temperaturas, el extracto perdió el 75% de su actividad. En el caso de rGH11XynB-L, luego de una hora de incubación aún presentó el 50% de actividad bien a 45°C y 50°C pero luego de 2 hs se registró una pérdida total de actividad a las tres temperaturas ensayadas.

Esto indica que los lisados presentaron una actividad similar a las enzimas purificadas pero una menor termoestabilidad lo cual determina que, dependiendo del proceso en el que se van a utilizar, se podrían utilizar los extractos, algo promisorio para la aplicación industrial.

Se ensayó entonces la utilización de los extractos en las reacciones de hidrólisis sobre paja de cebada extrusada. Los principales azúcares liberados fueron xilobiosa (X2), xilosa (X1) y xilooligosacáridos (**Tabla R15**). Se obtuvieron niveles de X1 similares, utilizando rGH10XynA y rGH11XynB a diferentes concentraciones (tanto enzimas purificadas como lisados). Los niveles de X2 liberados por rGH10XynA-L se duplicaron al aumentar la concentración de enzima incorporada (de forma similar a lo observado por rGH10XynA-P), obteniéndose un máximo de 2,4 mg/ml, al incorporar 5 UI de lisado. Sin embargo, la concentración de X1 registrada fue similar en todas las condiciones analizadas.



**Figura R35. Actividad de los lisados de bacterias recombinantes:** Actividad xilanasa comparada entre los lisados (L) y las enzimas purificadas (P) correspondientes a rGH10XynA (a) y rGH11XynB (b) y ensayos de termoestabilidad a 45, 50 y 60°C de los lisados de rGH10XynA (c) hasta 24 hs (1140 min) y rGH11XynB (d), hasta 120 min. El control de lisado corresponde al lisado de bacterias sin la proteína recombinante. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  desvío estándar de  $n=3$  (GraphPad Prism v 6.0)

En el caso de rGH11XynB-L, se observó algo de liberación de X1, a diferencia de rGH11XynB-P, la cual no hidrolizó la biomasa a X1 pero liberó concentraciones mayores de X2. Sin embargo, los niveles de ninguno de esos azúcares aumentaron al adicionar mayores cantidades de lisado ni de enzima purificada a la reacción.

Tabla R15: Azúcares liberados de la hidrólisis de paja de cebada extrusada por endoxilanasas rGH10XynA y rGH11XynB (purificadas P y lisados L)				
Enzima	UI/mg biomasa	Xilobiosa (X2) (mg/ml)	Xilosa (X1) (mg/ml)	Conversión a xilosa (%)
<b>Enzimas Purificadas</b>				
rGH10XynA-P	1.25	0.50±0.23	0.50±0.06	10.52
rGH10XynA-P	2.5	1.35±0.04	0.61±0.02	12.84
rGH11XynB-P	1.25	1.40±0.02	NC	-
rGH11XynB-P	2.5	1.40±0.02	NC	-
rGH10XynA-P + rGH11XynB-P	1.25 (c/u)	2.90±0.30	0.80±0.10	16.84
<b>Lisados</b>				
rGH10XynA-L	2.5	1.05±0.11	0.51±0.02	10.73
rGH10XynA-L	5	2.4±0.37	0.64±0.08	13.47
rGH11XynB-L	2.5	0.72±0.08	0.36±0.10	7.57
rGH11XynB-L	5	1±0.37	0.38±0.03	8.00
rGH10XynA-L + rGH11XynB-L	2.5 (c/u)	1.40±0.09	0.61±0.05	12.84
<b>Benchmark</b>				
Ns22002	0.62	2.34±0.23	2.34±0.16	49.26

ND: no detectado, NC: no cuantificable (<0.1 mg/ml)

El uso de las enzimas combinadas resultó en una máxima conversión a X2 mediante el uso de enzimas purificadas, mientras que la conversión a X1 no aumentó significativamente. Al utilizar NS22002, se observó una mayor conversión a xilosa (49.5%), similar a lo obtenido anteriormente con paja de trigo. Por lo tanto, una alternativa para mejorar el nivel de conversión a xilosa sería la utilización una enzima recombinante con actividad  $\beta$ -xilosidasa en combinación con las endoxilanasas caracterizadas en este trabajo. Estudios preliminares utilizando la enzima EcXyl43, una  $\beta$ -xilosidasa recombinante (Campos y col., 2014), mostraron un incremento en la conversión a xilosa, a partir de xilano y de paja de trigo extrusada utilizando rGH10XynA y rGH11XynB, combinadas con EcXyl43 (en preparación, Ontañon y col., 2017).

# Discusión



La bioconversión de biomasa lignocelulósica es considerada una manera de transformar residuos agroforesto industriales en productos de alto valor agregado como biocombustibles, químicos y papel, entre otros. En los últimos años, los estudios están enfocados en la bioprospección microbiana con el fin de explorar actividades enzimáticas útiles y novedosas y a su vez dilucidar los mecanismos que median en la bioconversión de la biomasa. Los desarrollos recientes de las técnicas meta-ómicas, como genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica, permitieron relevar la diversidad genética y la estructura de las comunidades microbianas de ambientes ricos en lignocelulosa y, además, tratar de establecer el posible rol de los miembros dentro de las mismas. De esta forma, mediante la combinación de técnicas biológicas tradicionales con técnicas de alta resolución es posible el estudio de rutas microbianas claves para la degradación de biomasa.

El presente trabajo se realizó en base a la hipótesis que los suelos forestales constituyen una fuente promisoría para el aislamiento de nuevas cepas bacterianas celulolíticas. A partir de ello, el principal objetivo fue estudiar los mecanismos de bioconversión de biomasa lignocelulósica de aislamientos celulolíticos de suelo, para el desarrollo de extractos enzimáticos útiles en el aprovechamiento de residuos agrícolas.

En este contexto, se realizó la bioprospección de bacterias celulolíticas cultivables de suelos forestales prístinos con materia vegetal en descomposición, de dos regiones diferentes de Argentina, y se obtuvieron siete consorcios bacterianos celulolíticos. Una característica común en el proceso de aislamiento fue la dificultad de obtener aislamientos puros, siendo que a pesar de numerosos repiques se obtenían colonias con actividad celulolítica y otras sin actividad aparente, difíciles de ser separadas. Resultados similares fueron observados en estudios previos de prospección de microorganismos celulolíticos (Romano y col., 2013; Sabarís Di Lorenzo 2013).

Los consorcios obtenidos mostraron buena capacidad de crecimiento en sustratos celulósicos y hemicelulósicos ya que fueron capaces de crecer en CMC y xilano como única fuente de carbono. Una manera semi-cuantitativa para seleccionar los consorcios o aislamientos más promisorios es evaluar la capacidad hidrolítica (CH) sobre los sustratos de interés, mediante la relación entre el diámetro del halo de hidrólisis y el diámetro de la colonia. Al comparar los valores de CH de los consorcios con los previamente reportados encontramos una gran variabilidad, siendo que resultaron mayores a los de aislamientos celulolíticos (no identificados)

obtenidos desde suelos forestales y agrícolas (Hatami y col., 2008) aunque menores a los obtenidos con bacterias mesófilas (*Bacillus pasteurii*, *Bacillus cereus*, *Halobacillus*, *Aeromicrobium* y *Brevibacterium*) aisladas de sistemas de compostaje (Lu y col., 2005).

A partir de un análisis detallado de los integrantes de los consorcios obtenidos, se determinó un predominio de bacterias Gram positivas, con una marcada prevalencia de los phyla *Proteobacteria* y *Firmicutes*, principalmente del orden *Bacillales*. En concordancia con nuestro trabajo, Pandey y col., en 2013 obtuvieron aislamientos con capacidad celulolítica a partir de suelos con condiciones extremas, principalmente pertenecientes a los phyla antes mencionadas (la mayoría de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Lysinibacillus*). Además, en estudios metagenómicos de suelos forestales se identificaron comunidades celulolíticas con predominancia de bacterias del phylum *Proteobacteria* (Talia y col., 2012) y también, a diferencia de nuestro trabajo, bacterias del phylum *Bacteroidetes* (Jimenez y col., 2016). Zhang y col., 2016 estudiaron comunidades bacterianas en suelos cultivados con algodón, observando predominancia de los phyla *Proteobacterias*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes*. La alta prevalencia de bacterias pertenecientes a estos grupos filogenéticos en comunidades de suelos, indicaría que poseen ventajas adaptativas para la utilización de recursos celulósicos.

Entre los consorcios obtenidos se destacaron dos -CB1-2 y VG-4- que fueron capaces de hidrolizar de manera eficiente celulosa (CMC) y hemicelulosa (xilano), los componentes mayoritarios de la biomasa. En VG-4 se identificaron bacterias de los géneros *Achromobacter*, *Lysinibacillus* y *Stenotrophomonas*. Si bien la habilidad de usar carbohidratos complejos no fue descrita para miembros de *Achromobacter* spp., diferentes aislamientos pertenecientes a este género fueron obtenidos por asociación con bacterias celulolíticas; por ejemplo *Achromobacter* sp. CX2 fue descrita como una cepa productora de glucosidasas extracelulares, actuando en sinergismo con bacterias celulolíticas (Chen y col., 2015). En concordancia con esto, la secuenciación del genoma de una cepa no celulolítica, *Achromobacter* sp. AR476-2 reveló la ausencia de genes codificantes para hidrolasas de polímeros de xilano o celulosa, pero sí para una amilasa GH13 y módulos catalíticos de glucosidasas y xilosidasas, enzimas involucradas en la degradación de oligosacáridos (Kurth y col., 2016). Además otras cepas fueron reportadas en estudios metagenómicos de comunidades celulolíticas de *switchgrass* y suelo (Yang y col. 2011; Talia y col., 2012). Todo esto podría indicar la asociación de bacterias no celulolíticas de este

género con cepas lignocelulolíticas, mediante el aprovechamiento de los azúcares cortos generados.

Por otro lado, bacterias del género *Lysinibacillus* no solo se identificaron como integrantes de VG-4 sino también en dos consorcios eficientes en la degradación de CMC, como VG-5 y CB2-5, lo que podría indicar que su actividad principal sería sobre celulosa. En ninguno de los consorcios previamente mencionados (VG-4, CB2-5 o VG-5) fue posible obtener los integrantes puros, aún luego de varios repiques sucesivos en placas con CMC, ya que o bien perdían la actividad celulolítica o bien no crecían por separado. Esto podría indicar que para la utilización de CMC, *Lysinibacillus* requiere de actividades enzimáticas provistas por otro grupo bacteriano. A diferencia de nuestro trabajo, especies de *Lysinibacillus* con capacidad de hidrolizar xilano fueron aisladas a partir de suelo y humus forestal (Alves-Prado y col., 2010; Lee y col., 2010). Por lo tanto, será necesario estudiar un mayor número de aislamientos y consorcios para determinar el rol de *Lysinibacillus* en la degradación de biomasa en las comunidades microbianas del suelo.

El consorcio CB1-2 resultó el más promisorio en términos de capacidad hidrolítica y reproducibilidad y el análisis de su composición reveló cuatro géneros: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*. A partir de enriquecimiento en diferentes sustratos (CMC, celulosa microcristalina y celobiosa) se obtuvieron todos sus integrantes en cultivo puro, lo cual se verificó mediante una técnica de *fingerprint* como es el DGGE (de Lima Brossi y col., 2015).

Al analizar la actividad de los aislamientos, sólo *Paenibacillus*, al que denominamos A59, presentó actividad celulolítica y xilanolítica. Es más, los niveles de actividad obtenidos resultaron similares al consorcio. Los demás aislamientos (*Bacillus*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*), no presentaron actividad celulosa o xilanasa. Diversas cepas de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, fueron ampliamente reportadas en la literatura como celulolíticas, principalmente obtenidas en estudios de bioprospección desde suelos forestales y zonas rizosféricas (Sudiana y col., 2011; Soares y col., 2012; Kim y col. 2012; Sindhu y Dadarwal 2001; Chen y col., 2011). Es posible entonces, que los aislamientos de dichos géneros obtenidos en este trabajo o bien no tengan actividad celulolítica detectable o que la misma no haya sido inducida en las condiciones utilizadas.

Por otro lado, el rol de *Stenotrophomonas* en la dinámica de los consorcios permanece no dilucidado aún, dado que no mostró actividad celulolítica o xilanolítica en este estudio. Este género, frecuentemente aislado de zonas rizosféricas, incluye

cepas promotoras del crecimiento vegetal y otras patógenas oportunistas de humanos, todas éstas muy ubicuas y con una buena adaptación a diferentes ambientes, mediante producción de compuestos antimicrobianos y biocontroladores (Ryan y col., 2009). La amplia versatilidad metabólica de este género podría explicar el aislamiento frecuente junto a otras bacterias, contribuyendo al mantenimiento de las comunidades en ambientes desfavorables. En un trabajo reciente, se reportó el aislamiento de cepas de *S. terrae* y *S. rizophila*, como parte de consorcios celulolíticos de suelos forestales junto con otros géneros, con actividad principalmente  $\alpha$ -D-glucosidasa,  $\beta$ -D-glucosidasa,  $\beta$ -D-galactosidasa y  $\beta$ -D-xylosidasa (Cortes-Tolalpa y col., 2016). Esto sugiere un posible rol de éste género en la hidrólisis de oligosacáridos solubles residuales, generados por *Paenibacillus* sp. A59 a compuestos monoméricos, dentro del consorcio CB1-2.

Concluimos entonces que el aislamiento *Paenibacillus* sp. A59 es el principal responsable de la actividad (hemi)celulolítica del consorcio CB1-2, por lo cual profundizamos su caracterización fisiológica, bioquímica y molecular.

En los últimos años, numerosas especies de *Paenibacillus* fueron aisladas de forma ubicua a partir de un amplio rango de fuentes ambientales (Sánchez y col., 2005; Pason y col., 2006; Khianggam y col., 2009 a, b; Eida y col., 2012). A su vez, aislamientos previamente caracterizados como *Bacillus* sp. fueron recategorizados al género *Paenibacillus* sp. (Ash y col., 1993). El análisis filogenético basado en la secuencia del gen codificante para la subunidad 16s del rARN y de *gyrA*, ubicó a *Paenibacillus* sp. A59 en un *cluster* junto a *P. pabuli* y *P. taichungensis*, con similitudes de 99%. A su vez, si bien compartieron muchas de las propiedades fisiológicas y bioquímicas ensayadas, tuvieron claras diferencias en cuanto a características clave (Lee y col., 2008; Priest 2009), por lo que *Paenibacillus* sp. A59 sería una nueva especie. Hasta el momento de esta tesis no se reportaron estudios sobre la actividad xilanolítica o celulolítica de *P. pabuli* y *P. taichungensis*, aunque fueron caracterizadas algunas enzimas con actividad quitinasa (Juarez-Jimenez y col., 2008; Chen y col., 2010).

*Paenibacillus* sp. A59 mostró un amplio espectro de actividad hidrolítica, dado que fue capaz de degradar celulosa, xilano, almidón, pectina, caseína y quitina, reflejando una potencial utilidad en múltiples aplicaciones en procesos donde se requiera la bioconversión de cualquiera de estos polímeros. Particularmente, como punto de partida para el desarrollo de extractos enzimáticos eficientes para la conversión de biomasa, se obtuvo una actividad xilanasa máxima mediante cultivo

en xilano y residuo de cosecha de caña de azúcar (RAC) y actividad endoglucanasa al crecer en CMC.

Los niveles de actividad endoglucanasa obtenidos en el sobrendante de cultivo fueron bajos respecto de enzimas comerciales, aunque similares a los reportados para otras especies de *Paenibacillus*, como *P. curdanolyticus* B-6 (Pason y col., 2006), *P. polymyxa* BE-b40 (Gastelum-Arellanez y col., 2014), *P. terrae* ME27-1 (Liang y col., 2014) y *P. polymyxa* EG2 y EG14 (Gorska y col., 2015). Sin embargo, el sobrendante de cultivo de *Paenibacillus* sp. A59 mostró alta actividad xilanasa, en niveles similares a otros dos aislamientos, *Paenibacillus* sp. 2S-6 (Ko y col., 2011) y *P. campinansensis* BL11 (Ko y col., 2010), obtenidos a partir del licor negro de la primera etapa de lavado del proceso de fabricación de pasta kraft (pasta de celulosa).

Una conversión eficiente del xilano utilizando el extracto de *Paenibacillus* sp. A59, lo cual generó xilobiosa y xilosa como productos principales, con una buena estabilidad térmica y en un amplio rango de temperaturas óptimas (entre 50 y 70°C), es destacable para una cepa mesófila (a diferencia de otras especies previamente descritas como celulolíticas, *Paenibacillus* sp. A59 no creció a temperaturas mayores a 45°C). Además, a pesar de haber sido aislado de un suelo con pH cercano a la neutralidad, su extracto xilanolítico mostró actividad en un amplio rango de pH, entre 6 y 10, lo cual constituye una de las características deseadas para extractos que podrían tener una aplicación en bioprocesos.

Un aspecto destacable del extracto enzimático de *Paenibacillus* sp. A59 fue que además permitió deconstruir biomásas agrícolas complejas pre-tratadas, como RAC o paja de trigo, liberando xilooligosacáridos, xilobiosa y xilosa, confirmando su actividad xilanolítica principal. Para la utilización industrial del extracto enzimático crudo, es necesaria la optimización del cultivo en bioreactores, determinando las condiciones óptimas para maximizar la actividad, por ejemplo empleando diferentes combinaciones de fuentes de carbono y nitrógeno, pH y temperatura (Irfan y col., 2017). El hecho de que mediante el cultivo en RAC se haya obtenido una buena actividad xilanasa, es un resultado inicial muy promisorio para la optimización de extractos bacterianos usando sustratos residuales de bajo costo. Además se podría investigar el desarrollo de variantes hipersecretoras por mutagénesis, lo cual ya ha sido realizado en otras bacterias (Rojas-Rejón y col., 2011).

Dado que el extracto secretado por *Paenibacillus* sp. A59 mostró una amplia capacidad de hidrolizar sustratos, nos preguntamos qué enzimas estarían

involucradas en dichas actividades y qué mecanismos utiliza esta bacteria para poder utilizar los polisacáridos disponibles. Para responder estas preguntas, en primer lugar se secuenció el genoma completo del aislamiento por técnicas de secuenciación de nueva generación, lo cual permitió tener una versión del genoma con alta profundidad y cobertura, ensamblada en un número muy bajo de contigs (83).

Mediante el análisis detallado del genoma de *Paenibacillus* sp. A59, pudimos identificar 85 glicosil hidrolasas potencialmente activas sobre polímeros abundantes en la naturaleza, como celulosa, xilano, quitina, mananos y almidón, resaltando el excelente potencial de este aislamiento novedoso para la prospección de enzimas biotecnológicamente relevantes. En particular, las proteínas identificadas como involucradas en el sistema xilanolítico y que podrían ser secretadas por esta bacteria fueron tres endoxilanasas, una de la familia GH11 (GH11XynB) y dos de la familia GH10; una de ellas unimodular (GH10XynA) y otra de alto peso molecular, con módulos de unión a carbohidratos y módulos SLH (GH10XynC). Además de identificaron dos glucuronoxilanasas (de la familia GH30) y 13 enzimas con actividad  $\beta$ -xilosidasa/arabinofuranosidasa (6 inferidas como intracelulares y 7 extracelulares). Si bien en las regiones genómicas próximas a las GHs antes mencionadas se identificaron reguladores transcripcionales y transportadores de azúcares, es necesario profundizar en la identificación de los grupos de genes transcritos en determinadas condiciones, así como también de los elementos regulatorios, para identificar los operones o regulones involucrados en la utilización de xilanos (Chow y col., 2007).

Aunque en otros trabajos se describió la potencialidad de *Paenibacillus* como género celulolítico y xilanolítico, y se identificaron los genes involucrados, existen pocos reportes sobre la asociación de dicha actividad con las proteínas responsables de la misma. Es por ello que se analizó el secretoma de *Paenibacillus* sp. A59 crecido en celulosa, xilano y RAC. De las 35 glicosil hidrolasas predichas en el análisis genómico como potencialmente secretadas, 10 fueron identificadas en el secretoma en xilano, lo cual representa alrededor de 1/3 del total. En el secretoma de la bacteria en CMC se detectó solo una GH48, lo cual concuerda con la baja actividad CMCasa detectada en el sobrenadante de cultivo. Sorprendentemente, no solo fueron inducidas xilanasas por crecimiento en xilano, sino también otras GHs potencialmente activas sobre glucanos, quitina y almidón, sugiriendo una posible inducción cruzada de las enzimas deconstructivas. Todo esto resalta el gran

potencial del secretoma en xilano de este aislamiento como una fuente muy rica en GHs activas sobre diversos carbohidratos.

Las principales xilanasas secretadas a partir del crecimiento en xilano y RAC fueron GH10XynA y GH10XynC, mientras que GH11XynB solo se detectó en el secretoma obtenido por cultivo en xilano. Esto puede deberse a que no se induzca la expresión de GH11XynB por cultivo en RAC o bien que los niveles de expresión/secreción no hayan sido suficientes para ser detectada en el ensayo realizado. Otras bacterias Gram positivas fueron reportadas como secretoras de diferentes endoxilanasas como parte de su sistema hemicelulolítico, como *Bacillus subtilis* (luego del crecimiento en glucuronoxilano) y cepas hipertermófilas como *Caldicellulosiruptor kronotskyensis* y *Thermotoga maritima* (Liebl y col., 2008; Rhee y col., 2014; Jia y col., 2016). Una GH10 con una estructura multimodular, perteneciente a *Paenibacillus* D22, llamada XynC, fue caracterizada recientemente (Lee and Lee, 2014) y otras endoxilanasas de la misma familia, de *Paenibacillus* sp. W61 y *Paenibacillus* sp. JDR-2 (con una similitud del 64% con la estructura molecular de GH10XynC de *Paenibacillus* sp. A59), fueron activas sobre metilglucuronoxilano, mediante anclaje a la superficie celular con dominios SLH (Ito y col., 2003; St John y col., 2006). GH10XynC de *Paenibacillus* sp. A59 también tiene tres dominios SLH y otra proteína de alto peso molecular con un dominio de función desconocida y dos dominios SLH se identificó en el secretoma en RAC. Las proteínas con dominios SLH fueron reportadas previamente en estudios de secretoma de bacterias anaeróbicas celulolíticas como *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (Desvaux y col., 2006) y en algunas GHs de *Paenibacillus* (Ito y col., 2003; Lee y Lee, 2014). Sin embargo, el rol de los dominios SLH en la degradación de polisacáridos de bacterias aeróbicas no está completamente estudiado hasta el momento, aunque se cree que podrían cumplir una función en el anclaje de las enzimas a la superficie de la membrana celular. Sin embargo, es necesario corroborar la actividad de GH10XynC para confirmar si tiene un rol en la deconstrucción de biomasa.

Es de destacar que en los estudios de secretoma sólo se detectó 1 de las 7 proteínas con actividad  $\beta$ -xylosidasa/ $\alpha$ -arabinofuranosidasa identificadas en el genoma como potencialmente secretadas, lo cual se correlaciona con la muy baja actividad  $\beta$ -xylosidasa de los sobrenadantes de cultivo. Por lo tanto, estudios de expresión de este grupo de enzimas muy representadas nos permitiría conocer su rol en la utilización del xilano.

Por otra parte, se identificaron en el secretoma de *Paenibacillus* sp. A59 varias proteínas que conforman los sistemas de transporte de azúcares de tipo ABC. En estudios proteómicos de consorcios adaptados al crecimiento en *switchgrass*, se indicó la presencia de transportadores ABC y dominios SLH del género *Paenibacillus* como principales proteínas sobre-representadas (D'haeseleer y col., 2013). Además, el estudio del patrón de utilización de carbohidratos en *C. saccharolyticus* también reveló genes codificantes para el sistema de transporte de azúcares tipo ABC como altamente transcriptos durante el crecimiento en carbohidratos complejos junto con glicosil hidrolasas, sugiriendo el rol de estas proteínas en la incorporación de productos de degradación a la célula (VanFossen y col., 2009; Blumer-Schuetz y col., 2015).

En base a nuestros resultados de secuenciación del genoma y análisis de secretoma, y a información ya existente, proponemos un posible mecanismo de utilización de polisacáridos en *Paenibacillus* sp. A59. La endoxilanasas GH10XynC podría permanecer unida a la pared celular bacteriana mediante los dominios SLH mientras que los CBMs de la misma podrían asistir en la unión al sustrato xilano. Esta proteína, en conjunto con las endoxilanasas GH10XynA y GH11XynB actuarían generando xiloligosacáridos cortos, xilobiosa y algo de xilosa, los cuales serían luego incorporados a la célula, mediante transportadores específicos. Las proteínas de unión a sustratos, pertenecientes a los transportadores de azúcares del sistema ABC, podrían asistir en la internalización de los azúcares monoméricos u oligosacáridos (**Figura D1**).

Finalmente, con el fin de caracterizar con mayor profundidad el sistema xilanolítico de *Paenibacillus* sp. A59, estudiamos la actividad de dos de las xilanasas identificadas en su extracto enzimático -GH10XynA y GH11XynB- mediante expresión heteróloga y caracterización de la actividad y mecanismo de acción de ambas.

Ambas enzimas son unimodulares, es decir, solo tienen módulo catalítico. El modelado molecular nos permitió confirmar su estructura terciaria e identificar los residuos clave que forman parte del sitio activo así como también otros sitios que podrían ser modificados mediante mutagénesis dirigida para mejorar las propiedades de las enzimas. El reemplazo o variaciones de residuos en otras xilanasas con el fin de mejorar la termoestabilidad térmica, los niveles de actividad a pH alcalino y la selectividad por sustratos, fue reportado previamente (Moers y col., 2007; Xie y col., 2011; Li y col., 2015).

La proteína rGH10XynA presentó valores de actividad xilanasas en el orden de las 100 UI/mg, tanto sobre xilano como sobre arabinoxilano, a pHs moderados y temperaturas moderadas a altas, liberando como principales productos xilobiosa y xilosa. Estos valores fueron superiores en comparación con los reportados para otras xilanasas bacterianas purificadas, disponibles comercialmente, tales como las GH10 endo- $\beta$ -1,4-xilanasas de *Aeromonas punctata* (8 UI/mg) o de *Cellvibrio japonicus* (25 UI/mg) (Megazyme). Por otro lado, la actividad xilanasas de rGH10XynA estuvo en el mismo rango que otras pertenecientes al género *Paenibacillus*, las cuales varían entre 10 y 450 UI/mg (*Paenibacillus* sp. HC1 y *Paenibacillus* DG22, respectivamente).

Por su parte, rGH11XynB presentó una actividad xilanasas de alrededor de 85 UI/mg sobre xilano y 130 UI/mg sobre arabinoxilano, lo cual coincide con el rango establecido para xilanasas comerciales de *Aspergillus niger* (80 UI/mg), aunque también existen otras con niveles muy altos de actividad, como la endoxilanasas GH11 de *Neocallimastix patriciarum* (1500 UI/mg). Si bien *Paenibacillus* sp. A59 rGH11XynB presentó niveles de actividad similares a rGH10XynA, la primera mostró un rango amplio de actividad a pH (entre 5 y 9) y liberó xilooligosacáridos solubles con mayor grado de polimerización. Del mismo modo, la endoxilanasas GH11 de *Paenibacillus* sp. HY8, la cual mostró una nivel de homología del 96% con rGH11XynB, presentó el mismo patrón de hidrólisis de xilano y actividad xilanasas (150 UI/mg), pero en un rango de pH muy reducido (Heo y col., 2006).

En relación a las pruebas sobre biomasa pre-tratada, ambas enzimas mostraron una muy buena conversión de los polímeros hemicelulósicos del maíz, trigo y cebada, principalmente arabinoxilanos, a xilooligosacáridos (X3 y X4) y xilobiosa principalmente. rGH10XynA también liberó xilosa, aunque la conversión fue menor a la obtenida con un cóctel hemicelulolítico comercial (NS22002). Sin embargo, este rendimiento puede ser mejorado con el agregado de enzimas  $\beta$ -xilosidasas que actúen sobre los XOS y xilobiosa generados por rGH10XynA. Por otro lado, la acción conjunta de ambas endoxilanasas recombinantes rGH10XynA y rGH11XynB, no fue superior a la actividad de cada una de ellas por separado, por lo que no estarían actuando de manera sinérgica sobre los sustratos. En general, la información concerniente a la actividad de proteínas purificadas sobre biomasa pre-tratada y la conversión a azúcares monoméricos no es abundante en la literatura (Lequart y col., 1999; Liavoga y col., 2007), por lo cual es importante contar con enzimas o cócteles enzimáticos comerciales para comparar los rendimientos y

realizar ensayos para incrementarlos. La utilización de los lisados de bacterias recombinantes, con actividad en niveles comparables a las enzimas purificadas, es un resultado promisorio ya que de este modo se reducirían parte de los costos de producción de las enzimas.

La estabilidad en condiciones alcalinas y la ausencia de actividad celulasa de GH11XynB indican que es un muy buen candidato para ser utilizado en la industria del papel, donde las hemicelulosas deben ser removidas de manera selectiva sin afectar la celulosa, en un pre-tratamiento alcalino. Por su parte, GH10XynA genera xilooligosacáridos con un amplio rango en el grado de polimerización, incluyendo xilosa, a partir de xilano y de arabinoxilanos de paja de trigo, cebada y maíz. Esto sugiere un posible uso de esta endoxilanasas en la producción de xilooligosacáridos, que pueden ser utilizados como pre-bióticos, o en la bioconversión de biomásas con alto contenido de hemicelulosa en la producción de biocombustibles, mediante complementación con cócteles enzimáticos celulolíticos.

Los resultados obtenidos en este trabajo indicaron la alta potencialidad del género *Paenibacillus* como fuente de enzimas xilanolíticas y otras enzimas que podrían contribuir a la comprensión del sistema de degradación de polisacáridos, en este género recientemente reclasificado. La secuenciación del genoma de *Paenibacillus* sp. A59, en combinación con la anotación en diversas plataformas y la predicción de los módulos de enzimas activas sobre carbohidratos, reveló muchas enzimas de interés biotecnológico. Por otra parte, la identificación de las enzimas claves secretadas por esta bacteria al crecer en celulosa, xilano y biomasa lignocelulósica permitieron plantear una hipótesis sobre el posible mecanismo hemicelulolítico de este aislamiento. A su vez, la prueba real de la actividad enzimática de las dos endoxilanasas seleccionadas, lograda mediante su expresión recombinante y caracterización en profundidad, permitió establecer su potencial aplicación industrial.

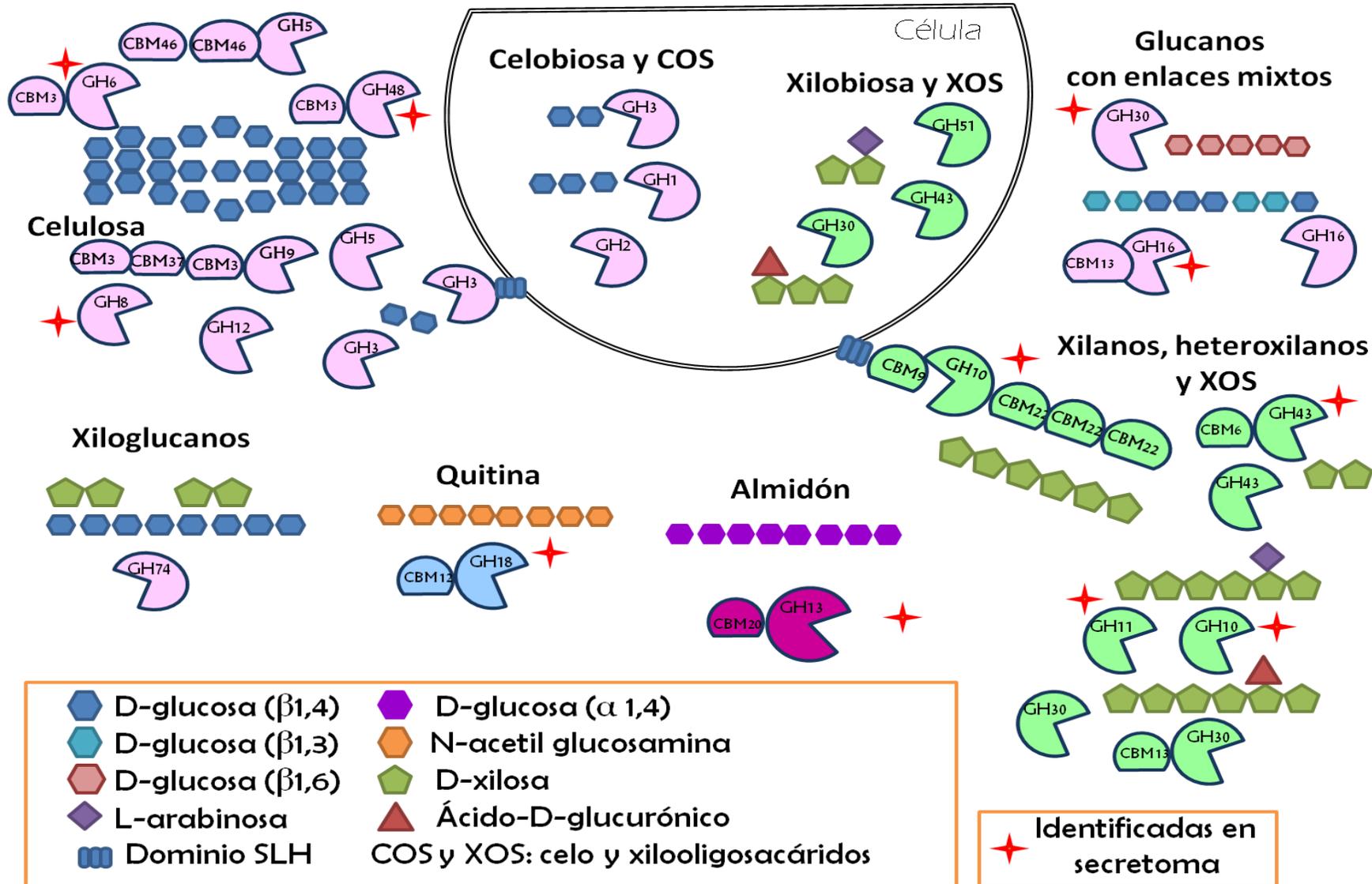


Figura D1. Representación esquemática simplificada de las potenciales CAZymas de *Paenibacillus* sp. A59. Los polisacáridos se encuentran representados en base a un código de colores, según el tipo de enlaces químicos de los monómeros que los conforman. Se incluyen todas las enzimas GHs identificadas en el genoma (intracelulares y extracelulares), destacando con una estrella aquellas efectivamente secretadas a partir del análisis del secretoma en xilano, RAC y CMC.

# Conclusiones



- ❖ La bioprospección de suelos forestales posibilitó el aislamiento de una nueva especie, *Paenibacillus* sp. A59, capaz de hidrolizar diferentes sustratos de interés industrial -en particular xilano- en un amplio rango de pH y temperatura.
- ❖ El gran número de genes codificantes para CAZymas en el genoma de *Paenibacillus* sp. A59, destacan su potencialidad para hidrolizar múltiples carbohidratos y constituye un reservorio de enzimas de interés biotecnológico.
- ❖ *Paenibacillus* sp. A59 secreta no sólo enzimas activas sobre carbohidratos, como endoxilanasas, endoglucanasas, y celobiohidrolasas, sino también proteínas del sistema de transporte de azúcares y otras de actividad desconocida, que podrían intervenir también en los sistemas de degradación de biomasa.
- ❖ La expresión recombinante de dos enzimas identificadas en el secretoma de *Paenibacillus* sp. A59 -GH10XynA y GH11XynB- permitió confirmar la actividad endoxilanolítica de ambas.
- ❖ GH10XynA, que genera xilosa a partir de la hidrólisis del xilano, podría ser aplicada en procesos de obtención de biocombustibles a temperaturas moderadas a altas.
- ❖ GH11XynB, al contar con una alta especificidad por xilano y ser inactiva sobre celobiosidos, podría tener aplicación en procesos a pH alcalino, como la eliminación selectiva de hemicelulosas en el tratamiento de pulpa de papel.
- ❖ Ambas enzimas mostraron buena actividad sobre xilanos de maderas duras (glucuronoxilanos) y de cereales (arabinoxilanos), generando xilobiosa y XOS como principales productos, lo cual es de relevancia para la producción de prebióticos y de biocombustibles de segunda generación.

# Bibliografía



**A**

Aachary AA y Prapulla SG (2011). Xylooligosaccharides (XOS) as an emerging prebiotic: microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 10: 2-16.

Achinas S y Euverink GJW (2016). Consolidated briefing of biochemical ethanol production from lignocellulosic biomass. *Electronic Journal of Biotechnology*. 23:44-53.

Adney B y Baker J (1996). Measurement of cellulase activities. LAP- 006 NREL Analytical Procedure. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO.

Álvarez C, Reyes-Sosa FM y Díez B (2016). Enzymatic hydrolysis of biomass from wood. *Microb. Biotechnol.* 9: 149–156.

Alves-Prado HF, Pavezzi FC, Leite RS, de Olivera VM, Sette LD, Dasilva R (2010). Screening and production study of microbial xylanase producers from Brazilian Cerrado. *Appl Biochem Biotechnol*, 161:333-346.

Ash C, Priest FG, Collins MD (1993). Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Antonie van Leeuwenhoek, *Int J Gen Mol Microbiol* 64: 253–60.

Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O (2008). The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* 9:75.

**B**

Ballesteros M (2010) Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass, pp 159-177, En: Bioalcohol Production: Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass, Ed. Waldron KW, Woodhead Publishing Series in Energy.

Bajpai P (2014). Xylan: occurrence and structure. En Xylanolytic enzymes, *Academic Press* 10-19.

Bayer EA, Belaich JP, Shoham Y, Lamed R (2004). The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. *Annu Rev Microbiol.* 58:521-54.

Beeson WT, Phillips CM, Cate JH, Marletta MA (2012). Oxidative cleavage of cellulose by fungal copper-dependent polysaccharide monooxygenases. *J Am Chem Soc.* 134(2):890-2.

Berlemont R (2017). Distribution and diversity of enzymes for polysaccharide degradation in fungi. *Nature Sci. Rep.* 7, 222.

Bhat MK (2000). Cellulases and related enzymes in microbiology. *Biotech Advances* 8:355-383.

Blackman LM, Cullerne DP, Hardham AR (2014). Bioinformatic characterisation of genes encoding cell wall degrading enzymes in the *Phytophthora parasitica* genome. *BMC Genomics.* 11:15:785.

Blumer-Schuetz SE, Lewis DL, Kelly RM (2012). Phylogenetic, microbiological, and glycoside hydrolase diversities within the extremely thermophilic, plant biomass-degrading genus *Caldicellulosiruptor*. *Appl Environ Microbiol* 76:8084–8092.

Blumer-Schuetz SE, Alahuhta M, Conway JM, Lee LL, Zurawski JV, Giannone RJ (2005). Discrete and structurally unique proteins (Tapirins) mediate attachment of extremely thermophilic *Caldicellulosiruptor* species to cellulose. *J Biol Chem* 290:10645–10656.

de Boer W, Folman LB, Summerbell RC y Boddy L (2005). Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development, *FEMS Microbiology Reviews*, 29(4):795–811.

Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* 30(15): 2114–2120.

Boraston AB, Kwan E, Chiu P, Warren RA, Kilburn DG (2003). Recognition and hydrolysis of noncrystalline cellulose. *J Biol Chem* 278:6120–6127.

Borges TA, Tieppo de Souza A, Squina FM, Riaño-Pachón DM, Corrêa dos Santos RA, Machado E, Velasco de Castro Oliveira J, Damásio ARL, Goldman GH (2014) Biochemical characterization of an endoxylanase from *Pseudozyma brasiliensis* sp. nov. strain GHG001 isolated from the intestinal tract of *Chrysomelidae* larvae associated to sugarcane roots. *Process Biochemistry* 49:77-83.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.

## C

Campos E, Negro Alvarez MJ, Sabaris Di Lorenzo GJ, Gonzalez S, Rorig M, Talia P, Grasso DH, Cataldi A (2014). Purification and characterization of a GH43  $\beta$ -

- xylosidase from *Enterobacter* sp. identified and cloned from forest soil bacteria. *Microbiol Res* 169: 213-20.
- Caffall KH y Mohnen D (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydr Res.* 28; 344(14):1879-900.
- Carver T, Harris SR, Berriman M, Parkhill J y McQuillan JA (2012). Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics* 28(4):464-469.
- Chen HB, Kao PM, Huang HC, Shieh CJ, Chen CI, Liu YC (2010). Effects of using various bioreactors on chitinolytic enzymes production by *Paenibacillus taichungensis*. *Biochem Eng J* 2010; 49:337–42.
- Chen H-J, Chang H-J, Fan C, Chen W-H, Lee M-S (2011). Screening, isolation and characterization of biotransformation bacteria from specific soils. *International Conference on Environment and Industrial Innovation IPCBEE* vol. 12.
- Chen H (2014). Chemical composition and structure of natural lignocellulose. En *Biotechnology of lignocellulose: theory and practice* ed. Chen H. China: *Chemical Industry Press* 25-71.
- Chen, Xiaoyi & Wang, Ying & Yang, Fan & Qu, Yinbo & li, Xianzhen. (2015). Isolation and characterization of *Achromobacter* sp. CX2 from symbiotic *Cytophagales*, a non-cellulolytic bacterium showing synergism with cellulolytic microbes by producing  $\beta$ -glucosidase. *Annals of Microbiology.* 65:1699.
- Chow V, Nong G y Preston JF (2007). Structure, function, and regulation of the aldouronate utilization gene cluster from *Paenibacillus* sp. strain JDR-2. *J Bacteriol.* 189(24):8863-70.
- Chua, P., Yoo, H.-S., Gan, H. M., & Lee, S.-M. (2014). Draft Genome Sequences of Two Cellulolytic *Paenibacillus* sp. Strains, MAEPY1 and MAEPY2, from Malaysian Landfill Leachate. *Genome Announcements*, 2(1), e00065–14.
- Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, Brown CT, Porrás-Alfaro A, Kuske CR, Tiedje TJ (2014). Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucl Acids Res.* 42:633-642
- Collins T, Gerday C, Feller G (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol Rev.* 29(1):3-23.
- Comas-Riu J y Vives-Rego J (2002). Cytometric monitoring of growth, sporogenesis and spore cell sorting in *Paenibacillus polymyxa* (formerly *Bacillus polymyxa*). *J Appl Microbiol* 92, 475–81.

Cortes-Tolalpa L, Jiménez DJ, de Lima Brossi, MJ (2016). Different inocula produce distinctive microbial consortia with similar lignocellulose degradation capacity *Appl Microbiol Biotechnol* 100(17): 7713-7725

Cosgrove DJ y Jarvis MC (2012). Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls. *Frontiers in Plant Science*. 3:204.

Couturier M y Berrin J-G (2013). The saccharification step: the main enzymatic components. En *Lignocellulose conversion: Enzymatic and Microbial tools for bioethanol production*. Springer. Ed. Faraco V. Cap. 5. pp:93-110.

Cuyvers S, Dornez E, Rezaei MN, Pollet A, Delcour JA, Courtin CM (2011) Secondary substrate binding strongly affects activity and binding affinity of *Bacillus subtilis* and *Aspergillus niger* GH11 xylanases. *FEBS J* 278(7):1098-111.

Cragg SM, Beckham GT, Bruce NC, Bugg TD, Distel DL, Dupree P, Etxabe AG, Goodell BS, Jellison J, McGeehan JE, McQueen-Mason SJ, Schnorr K, Walton PH, Watts JE, Zimmer M (2015). Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life. *Curr Opin Chem Biol* 29:108-19.

## D

D'haeseleer P, Gladden JM, Allgaier M, Chain PSG, Tringe SG, Malfatti SA (2013). Proteogenomic analysis of a thermophilic bacterial consortium adapted to deconstruct switchgrass. *PLoS One* 8 (7): e68465.

Das A, Ghosh P, Paul T, Ghosh U, Pati BR, Mondal KC (2016). Production of bioethanol as useful biofuel through the bioconversion of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *3 Biotech*. 6(1):70.

De Lima Brossi MJ, Jiménez DJ, Cortes-Tolalpa L y van Elsas JD (2016). Soil-Derived Microbial Consortia Enriched with Different Plant Biomass Reveal Distinct Players Acting in Lignocellulose Degradation. *Microbial Ecology* 71, 616–627.

Desvaux M, Dumas E, Chafsey I, Hébraud M (2006). Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure. *FEMS Microbiol Lett* 256:1–15.

Dimarogona M, Topakas E y Christakopoulos P (2012). Cellulose degradation by oxidative enzymes. *Comput Struct Biotechnol J*. e201209015.

Duval A y Lawoko M (2014). A review on lignin-based polymeric, micro- and nano-structured materials. *Reactive and Functional Polymers*. 85:78-96

**E**

Ebringerova A y Heinze T (2000). Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. En Xylan and xylan derivatives - Biopolymers with valuable properties. *Macromolecular Rapid Communications*. 21:542 - 556.

Eida MF, Nagaoka T, Wasaki J y Kouno K (2012). Isolation and Characterization of Cellulose-decomposing Bacteria Inhabiting Sawdust and Coffee Residue Composts. *Microbes and Environments*, 27(3), 226–233.

**F**

Falade AO, Nwodo UU, Iweriebor BC, Green E, Mabinya LV y Okoh AI (2017). Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. *Microbiology Open*. 6:e00394.

Falkowski P, Scholes RJ, Boyle E, Canadell J, Canfield D, Elser J, Gruber N, Hibbard K, Högberg P, Linder S, Mackenzie FT, Moore B 3rd, Pedersen T, Rosenthal Y, Seitzinger S, Smetacek V, Steffen W (2000). The global carbon cycle: a test of our knowledge of earth as a system. *Science*. 290(5490):291-6

Finnie C, Svensson B (2002). Proteolysis during the isoelectric focusing step of two-dimensional gel electrophoresis may be a common problem. *Anal Biochem* 311:182–86.

**G**

Gastelum-Arellanez A, Paredes-López O, Olalde-Portugal V (2014). Extracellular endoglucanase activity from *Paenibacillus polymyxa* BEb-40: production, optimization and enzymatic characterization. *World J Microbiol Biotechnol* 30:2953–65.

Gorska EB, Jankiewicz U, Dobrzynski J, Russel S, Pietkiewicz S, Kalaji H (2015). Degradation and colonization of cellulose by diazotrophic strains of *Paenibacillus polymyxa* isolated from soil. *J Bioremed Biodeg* 6:271.

Grant RJ, Muckian LM, Clipson NJW, Doyle EM (2007). Microbial community changes during the bioremediation of creosote-contaminated soil. *Letters in Applied Microbiology* 44: 293–300.

Gupta P, Samant K, Sahu A (2012). Isolation of Cellulose-Degrading Bacteria and Determination of Their Cellulolytic Potential. *International Journal of Microbiology* vol. 5.

Grubb JA y Dehority BA (1976). Variation in colony counts of total viable anaerobic rumen bacteria as influenced by media and cultural methods. *Appl Environ Microbiol* 31, 262-267.

**H**

Harris D y DeBolt S (2010). Synthesis, regulation and utilization of lignocellulosic biomass. *Plant Biotechnology Journal* 8: 244–262.

Haitjema, C. H., Solomon, K. V., Henske, J. K., Theodorou, M. K. and O'Malley, M. A. (2014). Anaerobic gut fungi: Advances in isolation, culture, and cellulolytic enzyme discovery for biofuel production. *Biotechnol. Bioeng.* 111: 1471–1482.

Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser.* 41: 95-98.

Hankin L, Anagnostakis SL (1977). Solid media containing carboxymethylcellulose to detect cellulase activity of microorganisms. *J Gen Microbiol* 98:109-115.

Hatami S, Alikhani HA, Besharati H, Salehrastin N, Afrousheh M, Yazdani Jahromi Z (2008). Investigation on aerobic cellulolytic bacteria in some of north forest and farming soils. *Am-Eu J Agri Environ Sci* 3: 713-716.

Henrissat B y Davies G (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr Opin Struct Biol.* 7(5):637-44.

Heo S, Kwak J, Oh HW, Park DS, Bae KS, Shin DH, Park HY (2006) Characterization of an extracellular xylanase in *Paenibacillus* sp. HY-8 isolated from an herbivorous longicorn beetle. *J Microbiol Biotechnol* 16:1753-1759.

Huang Y, Baker R y Vane L. (2010). Low-Energy Distillation-Membrane Separation Process. *Industrial & Engineering Chemistry Research.* 49 (8), pp 3760–3768.

Hsu SC y Lockwood JL (1975). Powder chitin agar as a selective medium for enumeration of *Actinomycetes* in water and soil. *Appl Microbiol* 29:422-426.

**I**

Irfan M, Mushtaq Q, Tabssum F, Shakir HA y Qazi JI (2017). Carboxymethyl cellulase production optimization from newly isolated thermophilic *Bacillus subtilis* K-18 for saccharification using response surface methodology. *AMB Express* 7:29.

Ito Y, Tomita T, Roy N, Nakano A, Sugawara-Tomita N, Watanabe S, Okai N, Abe N, Kamio Y (2003) Cloning, expression, and cell surface localization of *Paenibacillus* sp. strain W-61 xylanase 5, a multidomain xylanase. *Appl Environ Microbiol* 69:6969-6978.

**J**

Janse I, Bok J, Zwart G. A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. *J Microbiol Methods*. 57(2):279-81.

Jia X, Qiao W, Tian W, Peng X, Mi S, Su H, Han Y (2016) Biochemical characterization of extra- and intracellular endoxylanase from thermophilic bacterium *Caldicellulosiruptor kronotskyensis*. *Sci Rep*. 6:21672.

Jiménez DJ, de Lima Brossi MJ, Schückel J, Kračun SK, Willats WG, van Elsas JD (2016). Characterization of three plant biomass-degrading microbial consortia by metagenomics- and metasecretomics-based approaches. *Appl Microbiol Biotechnol*. 100(24):10463-10477.

Juarez-Jimenez B, Rodelas B, Martinez-Toledo MV, Gonzalez-Lopez J, Crognale S, Gallo AM (2008). Production of chitinolytic enzymes by a strain (BM17) of *Paenibacillus pabuli* isolated from crab shells samples collected in the east sector of central Tyrrhenian Sea. *Int J Biol Macromol* 43:27–31.

**K**

Kataoka M y Ishikawa K (2014). A new crystal form of a hyperthermophilic endocellulase. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology Communications*, 70:878–883.

Keegstra K (2010). Plant cell walls. *Plant Physiol*. 154(2):483-6.

Khianggam S, Akaracharanya A, Tanasupawat S, Lee KC, Lee JS (2009). *Paenibacillus thailandensis* sp. nov. and *Paenibacillus nanensis* sp. nov., xylanase-producing bacteria isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2009 Mar;59(Pt 3):564-568.

King BC, Donnelly MK, Bergstrom GC, Walker LP, Gibson DM (2009). An optimized microplate assay system for quantitative evaluation of plant cell wall-degrading enzymes activity of fungal culture extracts. *Biotechnol Bioeng*. 102:1033-1044

Kim JK, Lee SC, Cho YY, Oh HJ, Ko YH (2012). Isolation of cellulolytic *Bacillus subtilis* strains from agricultural environments. *ISRN Microbiol* 650563.

Ko CH, Lin ZP, Tu J, Tsai CH, Liu CC, Chen HT, Wang TP (2010). Xylanase production by *Paenibacillus campinasensis* BL11 and its pretreatment of hardwood kraft pulp bleaching. *Int Biodeterior Biodegrad* 64:13–19.

Ko CH, Tsai CH, Tu J, Yang BY, Hsieh DL, Jane WN, Shih TL (2011). Identification of *Paenibacillus* sp. 2S-6 and application of its xylanase on biobleaching. *Int Biodeterior Biodegrad* 65:334–339.

Koyama M, Helbert W, Imai T, Sugiyama J, Henrissat B (1997). Parallel-up structure evidences the molecular directionality during biosynthesis of bacterial cellulose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94(17):9091-9095.

Kuhad RC, Gupta R, Singh A (2011). Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Res*. 280696.

Kumar S, Singh SP, Mishra IM y Adhikari DK (2009). Recent Advances in Production of Bioethanol from Lignocellulosic Biomass. *Chem. Eng. Technol*. 32: 517–526.

Kunii M, Yasuno M, Shindo Y, Kawata T (2014). A *Dictyostelium* cellobiohydrolase orthologue that affects developmental timing. *Dev Genes Evol*. 2014 224(1):25-35.

Kurth D, Romero CM, Fernandez PM, Ferrero MA, Martinez MA (2016). Draft Genome Sequence of *Achromobacter* sp. Strain AR476-2, Isolated from a Cellulolytic Consortium. *Genome Announc*. 4(3). pii: e00587-16.

Kruer-Zerhusen N, Wilson DB (2015). Bacterial AA10 Lytic Polysaccharide Monooxygenases Enhance the Hydrolytic Degradation of Recalcitrant Substrates. In: Himmel ME (ed) *Direct Microbial Conversion of Biomass to Advanced Biofuels*. Elsevier, Amsterdam, pp 91-110.

## L

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-685.

Lane DJ (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*: eds. Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. pp 115–147. New York, USA: John Wiley and Sons.

Lee CS, Jung Y-T, Park S, Oh T-K, Yoon J-H (2010). *Lysinibacillus xylanilyticus* sp. nov., a xylan degrading bacterium isolated from forest humus. *Int Journ Syst Evol Microb* 60:281-286.

Lee F-L, Tien C-J, Tai C-J, Wang L-T, Liu Y-C, Chern, L-L (2008). *Paenibacillus taichungensis* sp. nov., from soil in Taiwan. *Int J Syst Evol Microbiol*; 58:2640–45.

Lee SH and Lee HE (2014) Cloning and Characterization of a Multidomain GH10 Xylanase from *Paenibacillus* sp. DG-22. *J Microbiol Biotechnol* 24:1525–1535.

Lewandowski I, Scurlockb JMO, Lindvallc E, Lewandowski MC (2003). The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe. *Biomass and Bioenergy*. 25:335-361.

Liang YL, Zhang Z, Wu M, Wu Y, Feng JX (2014). Isolation, screening, and identification of cellulolytic bacteria from natural reserves in the subtropical region of China and optimization of cellulase production by *Paenibacillus terrae* ME27-1. *Biomed Res Int*. 512497.

Liebl W, Winterhalter C, Baumeister W, Armbrecht M, Valdez M (2008) Xylanase attachment to the cell wall of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *J Bacteriol* 190:1350-1358.

Liu WT, Marsh TL, Cheng H y Forney LJ (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 63(11): 4516–4522.

Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B (2014) The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res* 42:490–495.

Logan NA y De Vos P (2009). Genus *Bacillus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 3. The Firmicutes, 2nd edition*. ed. Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H. and Whitman, W. pp. 21-71. New York, USA: Springer.

López-Mondéjar R, Zühlke D, Větrovský T, Becher D, Riedel K, Baldrian P (2016) Decoding the complete arsenal for cellulose and hemicellulose deconstruction in the highly efficient cellulose decomposer *Paenibacillus* O199. *Biotechnol Biofuels* 9:104:1-12.

Lu WJ, Tang HT, Yang SJ, Wang ZC, Nie YF (2005). Isolation and characterization of mesophilic cellulose-degrading bacteria from flower stalks-vegetable waste co-composting system. *J Gen Appl Microbiol* 51:353-360

Ly HD, Withers SG (1999). Mutagenesis of Glycosidases. *Annu Rev Biochem*. 68:487-522.

Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, Pretorius IS (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*. 66(3):506-77.

## M

Mac Faddin JF (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ra edición. Ed. Médica Panamericana. Montevideo, Uruguay.

Malgas S, van Dyk JS, Pletschke BI (2015). A review of the enzymatic hydrolysis of mannans and synergistic interactions between  $\beta$ -mannanase,  $\beta$ -mannosidase and  $\alpha$ -galactosidase. *World J Microbiol Biotechnol*. 31(8):1167-75.

Martínez AT, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Del Río JC, Gutiérrez A (2009). Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill. *Curr Opin Biotechnol*. 20(3):348-57.

Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk H-P, Göker M (2013). Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics* 14:60.

Miller GL (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31, 426–430.

Morana A, Maurelli L, Ionata E, La Cara F y Rossi M (2011). Cellulases from Fungi and Bacteria and their Biotechnological Applications. En: Cellulase: types and action, mechanism and uses, Ed. Golan EG, Nova Science Publishers Inc., New York. pp: 1-80.

Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59(3):695-700.

## N

Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9:255-62.

Nouwens AS, Walsh BJ, Cordwell SJ (2003). Application of proteomics to *Pseudomonas aeruginosa*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 83:117-40.

## P

Paës G, Berrin JG, Beaugrand J (2012). GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. *Biotechnol Adv* 30:564–592.

Pandey MP y Kim CS (2011). Lignin Depolymerization and Conversion: A Review of Thermochemical Methods. *Chem. Eng. Technol*. 34: 29–41

Pandey S, Singh S, Yadav AN, Nain L, Saxena AK (2013). Phylogenetic diversity and characterization of novel and efficient cellulase producing bacterial isolates from various extreme environments. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2013;77(7):1474-80. Epub Jul 7.

Pason P, Kyu KL, Ratanakhanokchai K (2006). *Paenibacillus curdolanolyticus* strain B-6 xylanolytic-cellulolytic enzyme system that degrades insoluble polysaccharides. *Appl Environ Microbiol*; 72:2483–90.

Pastor FIJ, Gallardo Ó, Sanz-Aparicio J, Díaz P (2007) Xylanases: molecular properties and applications. En: Polaina J, Mac Cabe AP (eds) *Ind. Enzym. Struct. Funct. Appl.* Springer, Netherlands, pp 65–82.

Pauly M, Albersheim P, Darvill A, York WS (1999). Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants. *Plant J.* 20(6):629-39.

Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004). UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 25(13):1605-12.

Pollet A, Delcour J a., Courtin CM (2010). Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. *Crit Rev Biotechnol* 30:176–191.

Priest FG (2009). Genus *Paenibacillus*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 3. The Firmicutes, 2nd edition. ed. Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H. and Whitman, W. New York: Springer; pp. 269-95.

## R

Rabinovich ML, Melnick MS, Bolobova AV (2002). The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. *Biochemistry (Mosc).* 67(8):850-71.

Reese ET (1976) History of the cellulase program at the U.S. army Natick Development Center. *Biotechnol Bioeng Symp* 6:9–20.

Rhee MS, Wei L, Sawhney N, Rice JD, St. John FJ, Hurlbert JC, Preston JF (2014) Engineering the xylan utilization system in *Bacillus subtilis* for production of acidic xylooligosaccharides. *Appl Environ Microbiol.* 80:917-927.

Rojas-Rejón OA, Poggi-Valardo HM, Ramos-Valdivia AC, Martínez-Jiménez A, Cristiani-Urbina E, de la Torre Martínez M, Ponce-Noyola T (2011). Production of cellulases and xylanases under catabolic repression conditions from mutant PR-22 of *Cellulomonas flavigena*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 38(1):257-64.

Romano N, Gioffré A, Sede SM, Campos E, Cataldi A, Talia P (2013). Characterization of cellulolytic activities of environmental bacterial consortia from an Argentinian native forest. *Curr Microbiol.* 67(2):138-47.

Roy A, Kucukural A, Zhang Y (2011) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* 5:725–738.

Ryan RP, Monchy S, Cardinale M, Taghavi S, Crossman L, Avison MB, Berg G, van der Lelie D, Dow JM (2009). The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nat Rev Microbiol*. 7(7):514-25.

Rytioja J, Hildén K, Yuzon J, Hatakka A, de Vries RP, Mäkelä MR (2014). Plant-polysaccharide-degrading enzymes from *Basidiomycetes*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 78(4):614-649.

## S

Sabarís Di Lorenzo GJ, Campos E (2013). Tesis de Licenciatura: Prospección, aislamiento y caracterización de bacterias celulolíticas de suelo de bosque nativo de Misiones, Argentina. Fac. de Cs. Exactas, UBA.

Saini JK, Saini R y Tewari L (2015) Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech* 5:337-353.

Salvachua D, Karp EM, Nimlos CT, Vardon DR, Beckham GT (2015). Towards lignin consolidated bioprocessing: simultaneous lignin depolymerisation and product generation by bacteria. *Green Chem* 17: 4951-4967.

Samira M, Mohammeda R, Gholamreza G (2011). Carboxymethyl-cellulase and filter-paperase activity of new strains isolated from Persian Gulf. *Microbiol J* 1:8-16.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2da edición, Cold Spring Harbor, New York.

Sánchez MM, Fritze D, Blanco A, Spröer C, Tindall BJ, Schumann P, Kroppenstedt RM, Diaz P, Pastor FI (2005). *Paenibacillus barcinonensis* sp. nov., a xylanase-producing bacterium isolated from a rice field in the Ebro River delta. *Int J Syst Evol Microbiol*. (Pt 2):935-9.

Santos CR, Meza AN, Hoffmann ZB, Silva JC, Alvarez TM, Ruller R, Giesel GM, Verli H, Squina FM, Prade RA, Murakami MT (2010) Thermal-induced conformational changes in the product release area drive the enzymatic activity of xylanases 10B: Crystal structure, conformational stability and functional characterization of the xylanase 10B from *Thermotoga petrophila* RKU-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 403(2):214-9.

Sapag A, Wouters J, Lambert C, de Loannes P, Eyzaguirre J, Depiereux E (2002). The endoxylanases from family 11: Computer analysis of protein sequences reveals important structural and phylogenetic relationships. *J Biotechnol* 95:109–131.

Scheller HV y Ulvskov P (2010). Hemicelluloses. *Annu Rev plan Biol* 61:263–289.

Shafi J, Tian h, Ji M (2017). *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31:3, 446-459.

Sindhu SS y Dadarwall (2011). Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas* sp. antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp. Cicer in chickpea. *Microbiol. Res.* 156:353-358.

Soares FL Jr., Melo IS, Dias AC, Andreote FD (2012). Cellulolytic bacteria from soils in harsh environments. *World J Microbiol Biotechnol* 28:2195-203.

Sudiana IM, Rahayu RD, Imanuddin H, Rahmansyah M. Cellulolytic bacteria of soil of Gunung Halimun National Park. Edisi Khusus (2011). *Berita Biologi* 25:703-709.

Solaiman Z y Marschner P (2007). DGGE and RISA protocols for microbial community analysis in soil. En: *Advanced techniques in soil microbiology* (Varma, A. and Oelmüller, R., eds.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 167–180.

Solomon V, Teplitsky A, Shulami S, Zolotnitsky G, Shoham Y, Shoham G (2007) Structure-specificity relationships of an intracellular xylanase from *Geobacillus stearothermophilus*. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr.*63:845-859.

Sorek N, Yeats TH, Szemenyei H, Youngs H, Somerville CR (2014). The Implications of Lignocellulosic Biomass Chemical Composition for the Production of Advanced Biofuels. *BioScience* 64(3):192–20.

St John FJ, Rice JD, Preston JF (2006) *Paenibacillus* sp. Strain JDR-2 and XynA1: a Novel System for Methyl glucuronoxylan Utilization. *App Environ Microbiol* 72:1496–1506.

Sun Y y Cheng J (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol* 83(1):1-11.

Swift ML (1997). GraphPad Prism, Data Analysis, and Scientific Graphing. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* 37 (2):411-412.

## T

Talia P, Sede SM, Campos E, Rorig M, Principi D, TostoD, Hopp HE, Grasso D, Cataldi A (2012). Biodiversity characterization of cellulolytic bacteria present on native Chaco soil by comparison of ribosomal RNA genes. *Res Microbiol* 163:221-232.

Tan HT, Corbin KR, Fincher GB (2016) Emerging Technologies for the production of renewable liquid transport fuels from biomass sources enriched in plant cell walls. *Frontiers in Plant Science.* 7:1854.

Tamn R, Saier MHJ (1993). Structural, functional and evolutionary relationship among extracellular solute-binding receptors of bacteria. *Microb Rev* 57:320-46.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30(12):2725–2729.

Teather RM, Wood PJ (1982). Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *App Environ Microbiol* 43:777-780.

Törrönen A, Harkki A, Rouvinen J (1994). Three-dimensional structure of endo-1,4-beta-xylanase II from *Trichoderma reesei*: two conformational states in the active site. *EMBO J* 13:2493–501.

Törrönen A, Rouvinen J (1995). Structural Comparison of Two Major endo-1,4-Xylanases from *Trichoderma reesei*. *Biochemistry* 34:847–856.

Törrönen a, Rouvinen J (1997). Structural and functional properties of low molecular weight endo-1,4-beta-xylanases. *J Biotechnol* 57:137–149.

## U

Upton BM y Kasko AM (2016). Strategies for the Conversion of Lignin to High-Value Polymeric Materials: Review and Perspective. *Chem Rev.* 116(4):2275-306.

## V

VanFossen AL, Verhaart MRA, Kengen SMW, Kelly RM (2009). Carbohydrate utilization patterns for the extremely thermophilic bacterium *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* reveal broad growth substrate preferences. *Appl Environ Microbiol* 75:7718-24.

Varner JE y Lin L-S. Plant cell wall architecture (1989). *Cell* 56(2) 231-239.

## W

Wang L-T, Lee F-L, Tai C-J, Kasai H (2007). Comparison of *gyrB* sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *Int. Journal of System and Evol Microb* 57:1846-50.

Wang H, Tucker M y Ji Y (2013). Recent Development in Chemical Depolymerization of Lignin: A Review. *Journal of Applied Chemistry*. ID 838645.

Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ (2009). Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*. 25 (9) 1189-1191.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991). 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173:697-703.

Wilson DB (2011). Microbial diversity of cellulose hydrolysis. *Curr Opin Microbiol.* 14(3):259-63.

Wilson DB y Kostylev M (2012). Cellulase Processivity. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) 908:93–99.

Winsley T, van Dorst JM, Brown MV, Ferrari BC (2012). Capturing Greater 16S rRNA Gene Sequence Diversity within the Domain Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), 5938–5941.

Wong KK, Tan LU, Saddler JN (1988). Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiol Rev.* 52(3):305-17.

## X

Xie S, Syrenne R, Sun S, Yuan JS (2014). Exploration of Natural Biomass Utilization Systems (NBUS) for advanced biofuel--from systems biology to synthetic design. *Curr Opin Biotechnol.* 27:195-203.

## Y

Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y (2015). The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods* 12: 7-8.

Yin Y, Mao X, Yang JC, Chen X, Mao F y Xu Y (2012). dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Res* 40:W445-51.

Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, Chun J (2017). Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol* 67(5):1613-1617.

## Z

Zabed H, Sahu JN, Boyce AN, Faruq G (2016) Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 66:751-774.

Zhao X, Zhang L y Liu D (2012). Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels Bioprod. Bioref.* 6: 465–482.

Zerbino DR, Birney E (2008). Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.* 18(5):821-9.

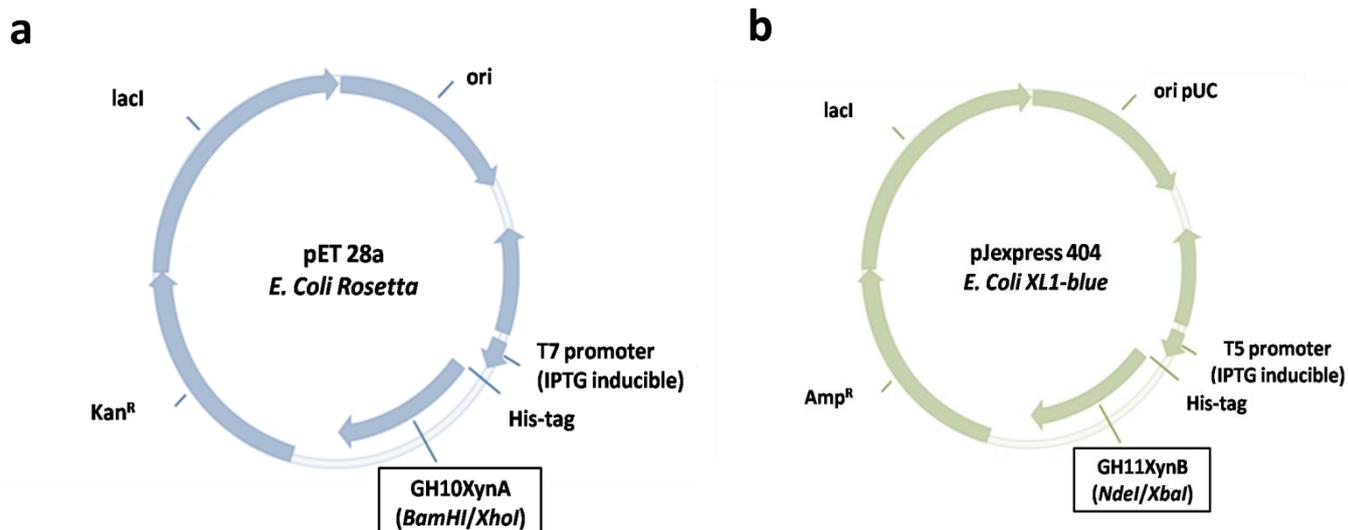
Zhang YH y Lynd LR (2004). Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol Bioeng.* 30;88(7):797-824.

Zhang YH, Cui J, Lynd LR, Kuang LR (2006). A transition from cellulose swelling to cellulose dissolution by o-phosphoric acid: evidence from enzymatic hydrolysis and supramolecular structure. *Biomacromolecules*. 7(2):644-8.

Zhang YH, Himmel ME, Mielenz JR (2006) Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnol Adv*. Sep-Oct;24(5):452-81.

**Anexo**





**Figura A1. Vectores de expresión.** Los diagramas muestran los componentes de cada vector de expresión utilizado para las endoxilasas GH10XynA (a) y GH11XynB (b) de *Paenibacillus* sp. A59.

Tabla A1. Condiciones de pre-tratamiento y composición de biomazas				
	RAC	Paja de trigo	Paja de cebada	Mazorca de maíz dulce
<b>Pre tratamiento</b>	Explosión de vapor (197,5°C; 4.02 min)	Extrusión (70°C, NaOH 6%, 2mm)	Extrusión (NaOH-Ac. Fosfórico)	Extrusión (NaOH-Ac. Fosfórico)
<b>Composición (%)</b>				
Celulosa	50,86	46,81 (51,5 G)	34,49 (37,9 G)	42,1 (39.6 G)
Hemicelulosa	15,04	29,97 (30,1 X, 3,5 A, 0,28 M)	24,93 (21,7 X, 4,2 A, 0,31 M, 1,88 Ga)	26,3 (24,6 X, 7,1 A)
Lignina ácida (soluble)	-	1,31	3,11	6,4
Lignina ácida (insoluble)	26,02	19,84	16,55	-
Cenizas	12,77	2,14	11,60	-

G: glucosa, X: xilosa, A: arabinosa, M: manosa, Ga: galactosa

**Tabla A2. Resultados de la prueba API CH50 de *Paenibacillus* sp. A59 y comparación con cepas de referencia cercanas filogenéticamente**

	<i>Paenibacillus</i> sp. A59	<i>P. taichungensis</i> V10537 <sup>1</sup>	<i>P. pabuli</i> BCRC 15857 <sup>2</sup>
Glicerol	+	+	+
Eritrol	-	-	nd
D-arabinosa	-	-	-
L-arabinosa	+	+	+
Ribosa	+	+	+
D-xilosa	+	+	+
L-xilosa	-	-	nd
D-adonitol	-	-	-
MetilB-D Xil	+	+	+
Galactosa	+	+	+
Glucosa	+	+	+
Fructosa	+	+	+
Manosa	+	+	+
Sorbosa	-	-	nd
<b>Ramnosa</b>	-	-	+
Dulcitol	-	-	nd
Inositol	-	-	nd
Manitol	+	+	+
Sorbitol	-	-	-
MetilA-D-Man	-	-	nd
Metil A-D-Glu	+	+	nd
<b>N-acetilglucosamina</b>	-	+	nd
Amigdalina	+	+	nd
Arbutina	+	+	nd
Esculina	+	+	nd
Salicina	+	+	+
D-celobiosa	+	+	+
D-maltosa	+	+	+
D-Lactosa	+	+	+
D-melibiosa	+	+	+
D-Sacarosa	+	+	+
D-trehalosa	+	+	+
<b>Inulina</b>	-	+	+
<b>D-melezitosa</b>	-	+	+
D-rafinosa	+	+	nd
Almidón	+	+	+
Glicógeno	+	+	+
Xilitol	-	-	nd
Gentiobiosa	+	+	+
D-turanosa	+	+	nd
D-lixosa	-	-	nd
D-tagatosa	-	-	nd
D-fucosa	-	-	nd
L-fucosa	-	-	nd
D-arabitol	-	-	nd
L-arabitol	-	-	nd

---

Gluconato de potasio	-	-	-
2-kero gluconato	-	-	-
5-kero gluconato	-	-	-

nd: no determinado; 1: Lee y col., 2008; 2: Nakamura y col., 1984

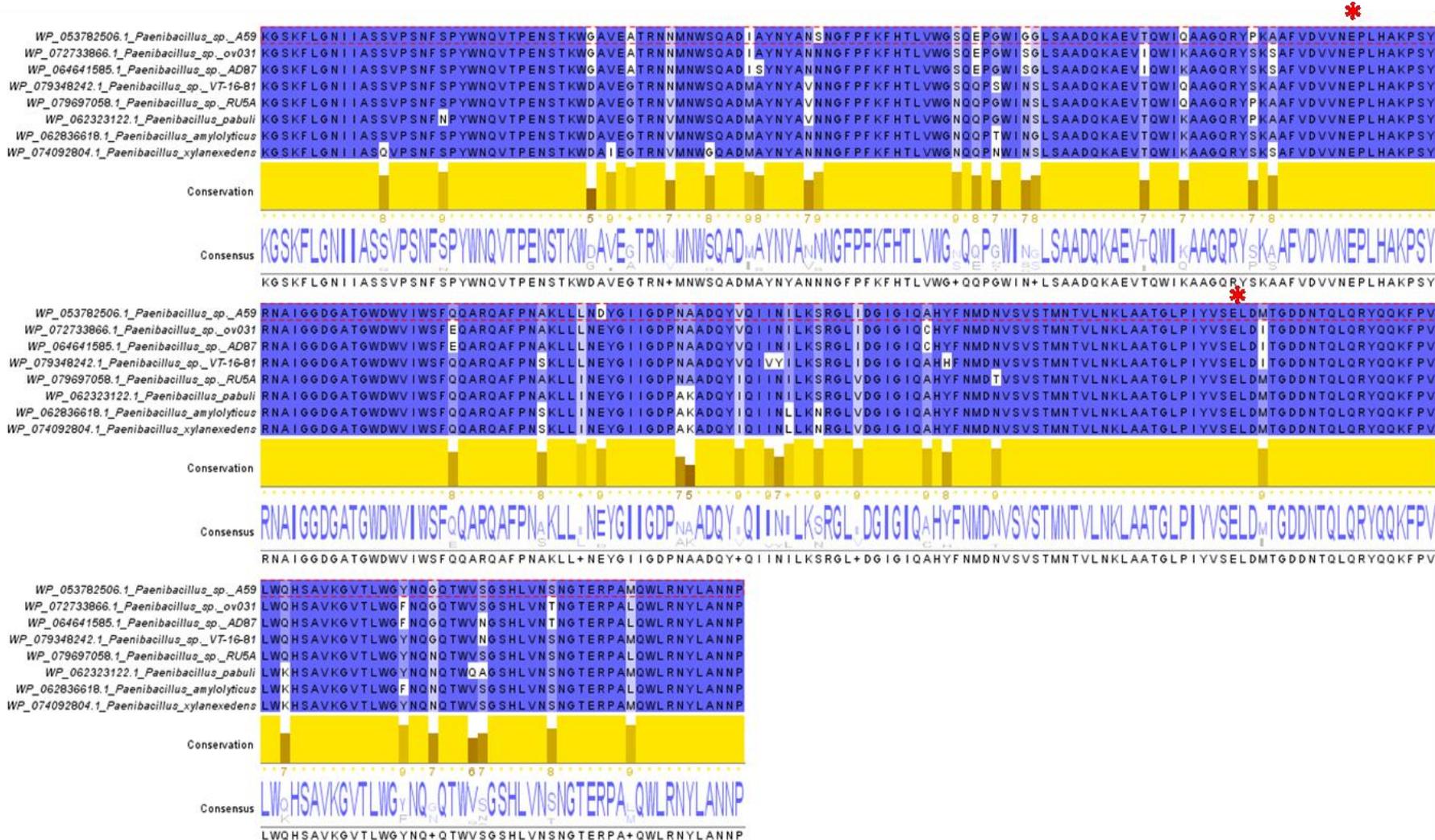
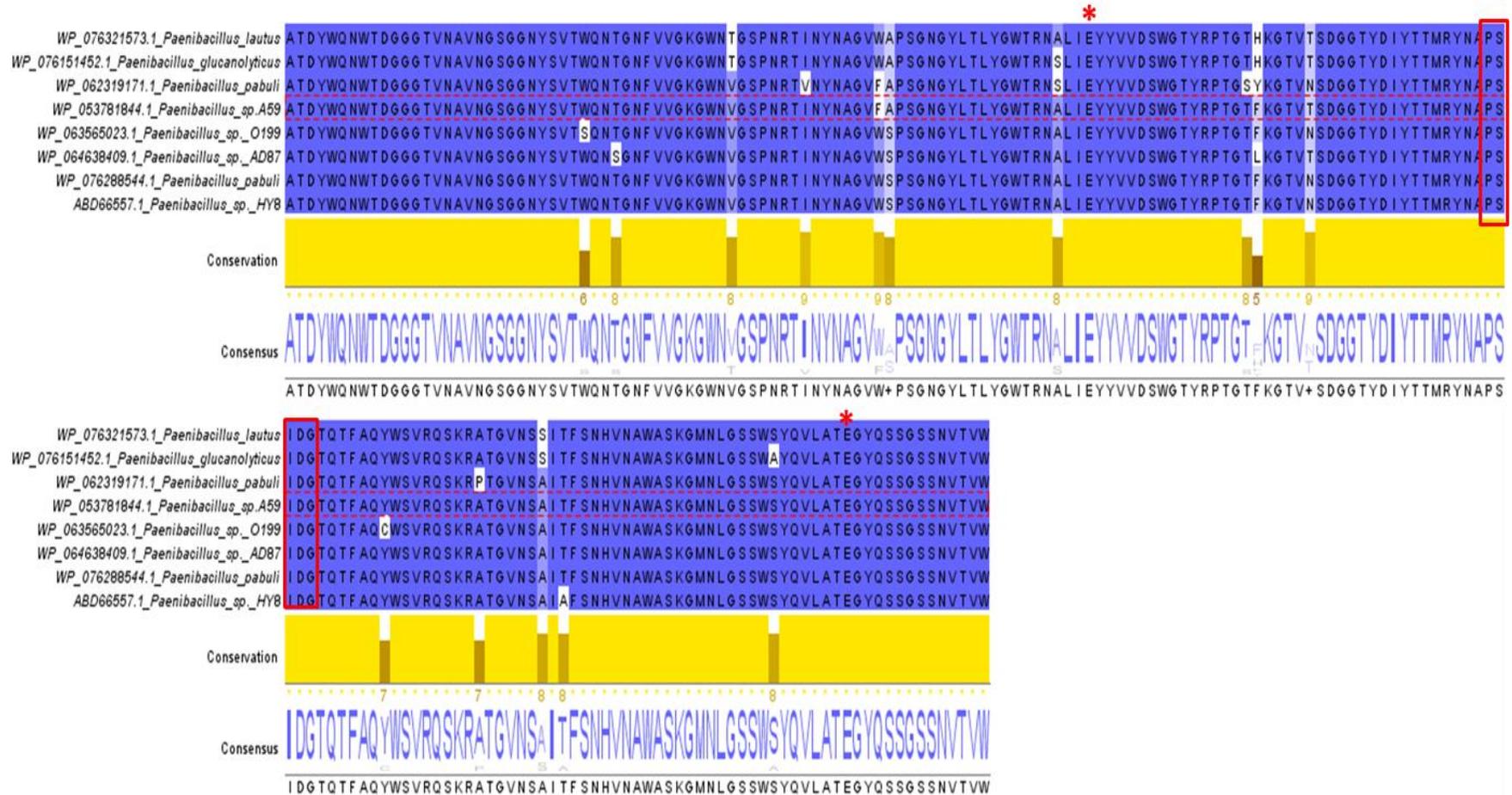
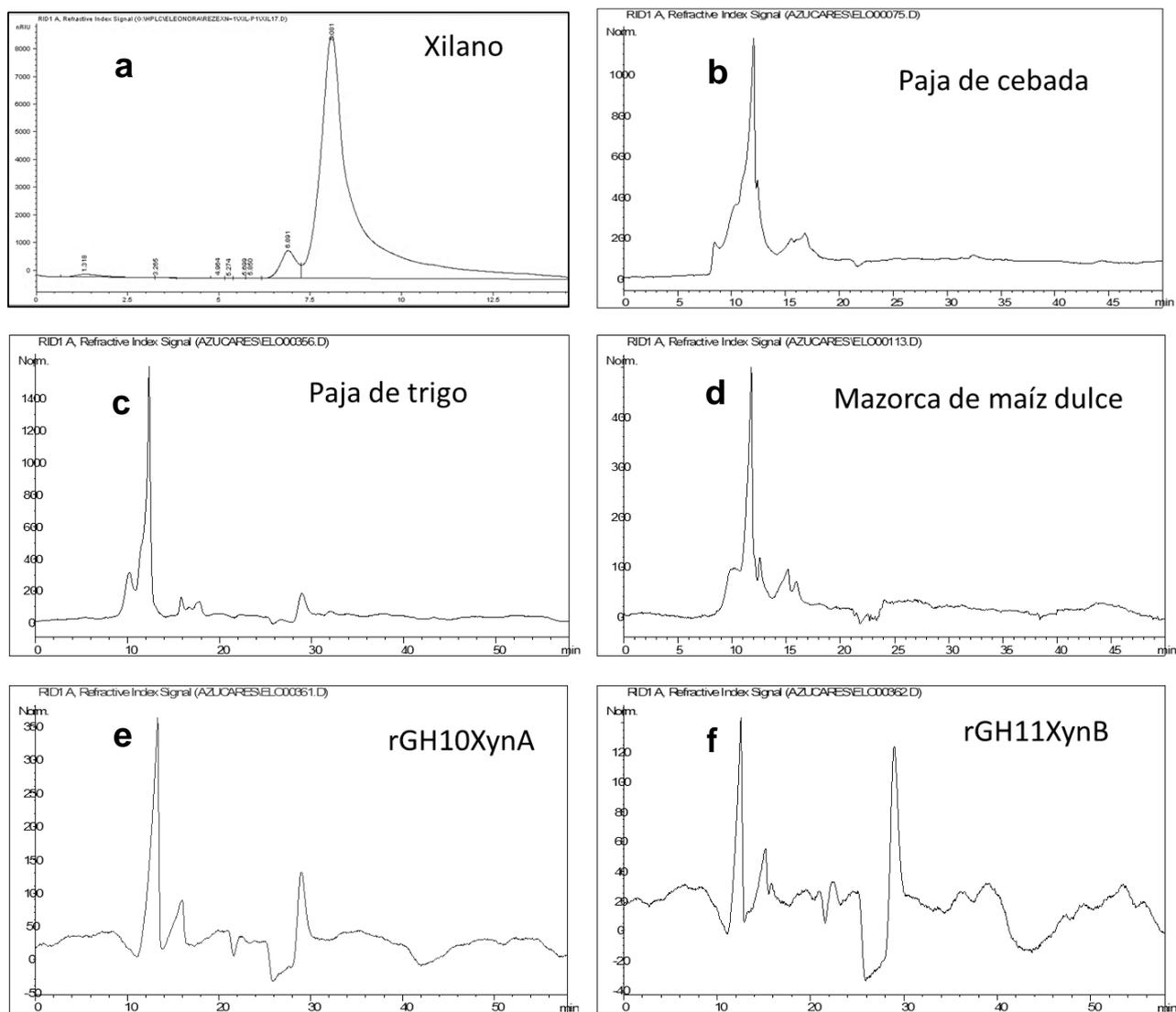


Figura A2. Alineamiento múltiple de GH10XynA de *Paenibacillus* sp. A59. La secuencia GH10XynA (rodeada por rectángulo de línea punteada) se alineó con otras secuencias de endoxilanasas con alta identidad. Las barras amarillas indican el grado de conservación y las letras muestran la secuencia consenso. Los asteriscos indican los residuos de glutámicos (E) del sitio activo (JalView v2, Watherhouse y col., 2009).



**Figura A3. Alineamiento múltiple de GH11XynB de *Paenibacillus* sp. A59.** La secuencia GH11XynB (rodeada por rectángulo de línea punteada) se alineó con otras secuencias de endoxilanasas con alta identidad. Las barras amarillas indican el grado de conservación y las letras muestran la secuencia consenso. Los asteriscos indican los residuos de glutámicos (E) del sitio activo y el motivo clásico PSIDG se encuentra recuadrado (JalView v2, Watherhouse y col., 2009).



**Figura A4. Controles de HPLC.** Los cromatogramas corresponden al control de sustrato xilano (a) biomazas como paja de cebada (b), paja de trigo (c) y mazorca de maíz dulce (d). Además, se indican los controles de enzimas rGH10XynA (f) y rGH11XynB (g).