

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ESTUDIO DEL POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ACTINOBACTERIAS DE
CUATRO CIÉNEGAS, COAHUILA CON ACTIVIDAD CELULOLÍTICA

POR

JANNETH ESCUDERO AGUDELO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

2022

ESTUDIO DEL POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ACTINOBACTERIAS
DE CUATRO CIÉNEGAS, COAHUILA CON ACTIVIDAD CELULOLÍTICA

Comité de tesis



Dra. Susana De la Torre Zavala

Presidente



Dr. Hamlet Avilés Arnaut

Secretario



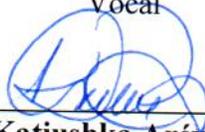
Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna

Vocal



Dra. Martha Guerrero Olazarán

Vocal



Dra. Katiushka Arévalo Niño

Vocal



Dra. Katiushka Arévalo Niño

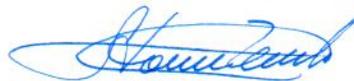
Subdirectora de posgrado



**SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO**

ESTUDIO DEL POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ACTINOBACTERIAS
DE CUATRO CIÉNEGAS, COAHUILA CON ACTIVIDAD CELULOLÍTICA

Dirección de tesis



Dra. Susana De la Torre Zavala

Directora

AVISO DERECHOS DE AUTOR

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de vídeos y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

Agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada a título de la estudiante de doctorado Janneth Escudero Agudelo con número de matrícula 1940824 y número CVU 898034.

AGRADECIMIENTOS

A mi esposo, mi vida, mi amor, mi complemento, *Sebastián Mejía Gómez*,

Gracias mi vida por elegirme cada día, por sufrir y por gozar juntos, por creer en mí y por creer en nuestro amor.

A *Diosito por sus bendiciones*, por ponerme en el lugar correcto, con las personas correctas, en el momento oportuno.

A mis padres, *Astrid Yaneth y Darío Alonso*,

No ha de alcanzarme la vida para devolver un poco de todo lo que recibo de ustedes,

Gracias por su apoyo incondicional sin importar la distancia, sin importar los recursos, sin importar los esfuerzos,

Gracias por sus enseñanzas, por su amor, por impulsarme a llegar a dónde ni en sueños me hubiese imaginado.

A mis hermanos, *Estefanía y Anderson*,

No me imagino la vida sin ustedes,

Gracias por las risas, los consejos, el amor, la paciencia,

Somos y seremos siempre equipo “*Diosito se pasó con nosotros*”.

A *toda mi familia*,

Son la extensión del amor, son mi refugio,

Gracias por incluirme en el paquete, aunque casi siempre este a kilómetros de distancia.

A mi directora de tesis, la Dra. *Susana De la Torre Zavala*,

Que quien a través de una pantalla pudo ver en mí su siguiente estudiante,

Gracias por aceptarme, por nunca dejarme sola, por compartir conmigo su ser maravilloso, por regalarme un modelo a seguir, por los regaños, por las exigencias, por los abrazos, por los logros alcanzados aún en momentos de crisis, por sus consejos para terminar este trabajo sin importar la pandemia por Covid-19.

Al Dr. *Hamlet Avilés Arnaút*, por sus consejos, por aceptarme y hacerme parte de su laboratorio, por preocuparse por mi esposo y por acompañarme para terminar este trabajo.

Al *comité de tesis* de este trabajo, por sus valiosos aportes.

A mis compañeros de mil batallas, *Yanelis Robainas, Daniel Sánchez, Myriam Ibarra, Nancy Pentón y Fabiola García*, porque sin ustedes esta meta se veía nublada y sin esperanza, pero juntos llegamos al final... ¡Son unos resilientes, felicidades por sus logros!

A mi segunda familia, *el laboratorio L9*,

Gracias a todos los integrantes por dejarme ser parte del grupo, por las charlas en la comida, por enseñarme de México, por el aprendizaje, por su apoyo...por siempre en mi corazón.

A “*The Power Girls*” *M. Mercedes Cortés (y su familia), Cynthia D. Correa y P. Karina López*, por ser mis compañeras, mis amigas, mis confidentes, mi punto de apoyo, por los momentos vividos...*Gracias infinitas, las quiero montones.*

A *Max Mizraim* por los consejos, las peleas académicas y los parches de cerveza.

A mis hermanastros, *Josué M. Corona* y *Carlos E. Álvarez*, por su cariño, por su amistad, por sus puntos de vista, por acompañarme en horario extendido, por los cafés... Les mando un abrazo que perdure por la eternidad.

A los hermanos mayores del L9, *Hector* y *Nahui* por acogermen, por ser mis guías en Monterrey y en el laboratorio, por ser un bonito ejemplo.

Al *team Celulasas*, estudiantes y servicios sociales que me acompañaron estos años, *Karina Esquivel*, *Rubén López*, "*Actino-Babys*" *Ilse* y *Alondra*, *Gema Félix*, *Ehecatl Ruiz*, *Barbara García*, *Rafael Rodríguez*, *Asael Robledo*, *Celina Guerrero*, *Lucia Aquino* por su tiempo, su esfuerzo y amistad.

A *mis amigos* por siempre estar presentes.

A "*Las Chicas Superpoderosas*" *Vanessa Díaz*, *Ligia Suescún* y *Cistry González* que desde un celular me hacían sentir esos abrazos cargados de amor.

Al encuentro católico de novios de Monterrey, en especial a mis nuevos grandes amigos *Belén* y *Manuel*, *Karen* y *Cesar* por hacer parte de nuestras vidas, por su apoyo en momentos difíciles, por los socialitos, por estar ahí siempre.

A mi perrita *Happy*, por acompañarme en tantas noches de desvelo.

A *México*, por regalarme estos años de gastronomía, por dejarme hacer de este país mi casa, mi lugar de formación y por su gente bonita. En especial, Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico.

A todos GRACIAS

"Nada es más honorable que un corazón agradecido". Séneca

DEDICATORIA

A mi mamá

Por ser para mí un ángel en la tierra, Te Amo.

A mis abuelos Reynaldo y Fidelina

Papito Rey te mando un beso hasta el cielo.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	II
INDICE DE ILUSTRACIONES	V
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	VI
RESUMEN	VIII
ABSTRACT.....	IX
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	3
2.1 Composición y estructura de la biomasa lignocelulósica	3
2.1.1 Celulosa	4
2.1.2 Hemicelulosa	6
2.1.3 Lignina	7
2.2 Degradación enzimática de la lignocelulosa.....	7
2.2.1 Celulasas	7
2.2.2 Hemicelulasas	10
2.2.3 Ligninasas	11
2.2.4 LPMOs (monooxigenasas de polisacárido lítico).....	12
2.1 Celulasas y sus aplicaciones Biotecnológicas.	12
2.1.1 Industria alimenticia humana y alimentación animal.....	16
2.1.2 Industria textil y detergentes para ropa	16
2.1.3 Bioetanol de segunda generación	17
2.1.4 Fabricación de papel	18
2.2 Microorganismos productores de celulasas	19
2.2.1 Actinobacterias	20
2.3 Cuatro Ciéneegas como fuente de enzimas novedosas	22
3 JUSTIFICACIÓN	25
4 OBJETIVOS	26
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	26
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
5 HIPÓTESIS	27
6 MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
6.1 Lugar de estudio	28
6.2 Colección biológica	28
6.3 ETAPA I: DEGRADACIÓN DE CELULOSA IN VITRO.....	30
6.3.1 Cribado de la colección biológica y selección de los microorganismos potenciales	30
6.3.2 Índice enzimático.....	31
6.4 ETAPA II: CINÉTICA DE LA PRODUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA: ENSAYO PRELIMINAR	33
6.4.1 Ensayo preliminar de la cinética de la producción de la actividad celulólitica	

6.4.2	Efecto de la temperatura en la actividad celulolítica de los aislados de Actinobacterias	34
6.4.3	Cinética de crecimiento en diferentes concentraciones de glucosa	35
6.5	ETAPA III: CINÉTICA DE LA PRODUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA	36
6.5.1	Extracto enzimático crudo	36
6.5.2	Actividad Endoglucanasa (EnG)	36
6.5.3	Proteína soluble.	37
6.5.4	Crecimiento microbiano mediante peso seco	37
6.5.5	Hidrólisis de diversos sustratos de celulosa.....	38
6.6	ETAPA IV: CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE ACTINOMICETOS CON ALTA CAPACIDAD CELULOLÍTICA	38
6.6.1	Caracterización morfológica microscópica	39
6.6.2	Caracterización morfológica macroscópica.....	39
6.6.3	Extracción del ADN genómico.....	39
6.7	ETAPA V: ANÁLISIS GENÓMICO.....	40
6.7.1	Ensamblaje de novo, predicción de genes y anotación del genoma	40
6.7.2	Número de acceso del genoma	41
6.7.3	Identificación de enzimas activas sobre celulosa	41
6.7.4	Análisis filogenético	42
7	RESULTADOS	43
7.1	ETAPA I: DEGRADACIÓN DE CELULOSA IN VITRO.....	43
7.1.1	Cribado de la colección biológica y selección de los microorganismos potenciales	43
7.1.2	Índice enzimático.....	45
7.2	ETAPA II: CINÉTICA DE LA PRODUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA: ENSAYO PRELIMINAR	48
7.2.1	Ensayo preliminar de la cinética de la producción de la actividad celulolítica	48
7.2.2	Efecto de la temperatura en la actividad celulolítica	50
7.2.3	Cinética de crecimiento de CH565 en diferentes concentraciones de glucosa.	52
7.3	ETAPA III: CINÉTICA DE PRODUCCION DE LA ACTIVIDAD CELULOLITICA.....	53
7.3.1	Crecimiento microbiano	53
7.3.2	Actividad Endoglucanasa (EnG)	53
7.3.3	Hidrólisis de diversos sustratos de celulosa.....	57
7.4	ETAPA IV: CARACTERIZACION DE CEPAS DE ACTINOMICETOS CON ALTA CAPACIDAD CELULOLÍTICA	59
7.4.1	Caracterización morfológica microscópica	59
7.4.2	Caracterización morfológica macroscópica.....	60
7.4.3	Identificación molecular	61

7.5	ETAPA V: ANÁLISIS GENÓMICO.....	67
7.5.1	Ensamble y anotación del genoma	67
7.5.2	Identificación de enzimas activas sobre celulosa	71
7.5.3	Análisis filogenético	76
8	DISCUSIÓN.....	78
8.1	Análisis de la degradación de celulosa	79
8.2	Análisis de la cinética de la producción de la actividad celulolítica de Streptomyces sp._CH565	81
8.3	Minería genómica	85
8.4	Análisis filogenético	90
9	CONCLUSIONES	91
10	PERSPECTIVAS.....	94
11	REFERENCIAS	95
12	ANEXO A	108
13	ANEXO B.....	118
14	ANEXO C.....	125

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1. Resumen de las aplicaciones biotecnológicas de las celulasas.....	14
Tabla 2-2. Panorama general de los microorganismos productores de enzimas celulolíticas (Kuhad et al., 2011).	19
Tabla 7-1. Porcentaje de microorganismos evaluados por poza de agua del sistema Churince en Cuatro Ciénegas, Coahuila.	43
Tabla 7-2. Resultados arrojados para el porcentaje ANI (Average Nucleotide Identity) del genoma de CH565.....	65
Tabla 7-3. Resultados arrojados para el porcentaje AAI (Average Amino Acid Identity) del genoma de CH565.....	66
Tabla 7-4. Información de secuenciación del genoma CH565.	67
Tabla 7-5. Comparativa del genoma de <i>Streptomyces</i> sp._CH565 con otros <i>Streptomyces</i> modelo para la ruta metabólica Almidón y Glucosa y otras rutas metabólicas identificadas.	71
Tabla 7-6. Glicosil-Hidrolasas y CBM predichas en el genoma de <i>Streptomyces</i> sp._CH565.....	72
Tabla 8-1. Comparación de la producción de enzimas celulolíticas por <i>Streptomyces</i> sp. utilizando CMC como sustrato. S/D: Sin Datos.....	83
Tabla 11-1. Características generales y descripción del tamizaje en medio de cultivo CCM1 del banco de Actinobacterias evaluado en este estudio.....	108
Tabla 12-1. Descripción de los genes y proteínas que contienen módulos catalíticos pertenecientes a enzimas activas sobre carbohidratos (CAZyme) y módulos de unión a carbohidratos (CBM) de la cepa <i>Streptomyces</i> sp._CH565. Entre paréntesis, posición de inicio y final del gen.....	118

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 6-1.** Mapa descriptivo del sitio de estudio. Pozas a lo largo del sistema hidrológico ubica la Cuenca de Cuatro Ciénegas (CCB) en el desierto de Chihuahua. a) Geolocalización de las pozas de agua en Cuatro Ciénegas, Coahuila. b) Churince durante el muestreo/Churince actual. c) De Izquierdo a derecho, de arriba abajo: Mojarral (MO), Pozas Rojas (PR), Archaean Domes (AD), Pozas Azules (PA), Anteojo (AN), Becerra (BE). _____ 29
- Figura 6-2.** Primer cribado: Esquema general del procedimiento para la evaluación semi-cuantitativa de la colección de Actinobacterias empleando el método rojo Congo. 32
- Figura 6-3.** Segundo cribado: Esquema general de la metodología desarrollada durante la estandarización de las condiciones de cultivo para la posterior evaluación de la actividad enzimática en cultivo líquido. _____ 33
- Figura 7-1.** Cribado de la colección biológica. Descripción de las categorías para la evaluación de la degradación de celulosa usando el método rojo Congo. _____ 44
- Figura 7-2.** Índice enzimático. Se determinó luego de siete días de cultivo en medio agar CCM1. Todos los valores representan la media \pm error estándar de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se determinaron por análisis de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey ($p < 0.05$). _____ 46
- Figura 7-3.** Halo de hidrólisis de celulosa. Todos los valores representan la media \pm error estándar de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se determinaron por análisis de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey ($p < 0.05$). _____ 47
- Figura 7-4.** Medición de la actividad enzimática utilizando el microorganismo en etapa de esporulación. Todos los valores representan la media \pm error estándar de tres experimentos independientes. Los gráficos superiores muestran las medidas de Actividad Volumétrica, los inferiores son de Actividad Específica. Los gráficos en la izquierda corresponden al microorganismo CH565 y los gráficos de la derecha a CH194. __ 49
- Figura 7-5.** Efecto de la temperatura sobre el diámetro de halo de hidrólisis. Resultados obtenidos y análisis estadístico para el microorganismo CH565 durante tres días de

evaluación y tres tratamientos. Todos los valores representan la media \pm error estándar de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se determinaron por análisis de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Los valores que no comparten una letra presentan diferencias significativas. _____ 50

Figura 7-6. Efecto de la temperatura sobre el diámetro de halo de hidrólisis. Seguimiento fotográfico del experimento _____ 51

Figura 7-7. Efecto de la adición de glucosa en el crecimiento del microorganismo CH565. Todos los valores representan la media \pm error estándar de tres experimentos independientes. _____ 52

Figura 7-8. Seguimiento del desarrollo microbiano mediante peso seco. CH565 durante 20 días de evaluación. Todos los valores representan la media \pm error estándar de tres experimentos independientes. _____ 54

Figura 7-9. Evaluación de la actividad enzimática del microorganismo CH565 durante 20 días de evaluación. Resultados obtenidos en términos de actividad enzimática volumétrica y su relación con los azúcares reductores liberados. Todos los valores representan la media \pm error estándar de tres experimentos independientes. _____ 55

Figura 7-10. Evaluación de la actividad enzimática del microorganismo CH565 durante 20 días de evaluación. Resultados obtenidos en términos de actividad enzimática específica calculada y su relación con la proteína extracelular determinada. Todos los valores representan la media \pm error estándar de tres experimentos independientes. _____ 56

Figura 7-11. Crecimiento de CH565 en diferentes fuentes de celulosa como única fuente de carbono. Se presenta el puntaje cualitativo definido para tipo de sustrato luego de 14 días de evaluación. _____ 57

Figura 7-12. Ensayo demostrativo: Hidrólisis de diversas fuentes de celulosa. Comparación de los resultados obtenidos después de 14 días de cultivo para la cepa *Streptomyces* sp._CH565. _____ 58

Figura 7-13. Fotografía microscópica del aislado CH565. La micrografía se realizó a través de la observación de un fresco y una tinción Gram de una muestra de la bacteria en medio de cultivo CCM2 usando microscopía de contraste de fases a 100X. _____ 59

Figura 7-14. Resultados de la caracterización fisiológica y uso de nutrientes del aislado CH565 empleando el *International Streptomyces Project* (ISP). _____ 60

Figura 7-15. Extracción AND genómico de la cepa CH565. a) Gel de electroforesis 1% agarosa. Carril MM Marcador de peso molecular. Carril 565-Final ADN genómico cepa CH565. b) Lectura en espectrofotómetro-Nanodrop. Información de la concentración de ácidos nucleicos y la calidad de la extracción. _____62

Figura 7-16. Diagrama MyTaxa correspondiente a CH565 – *Streptomyces* sp. Se encuentra la leyenda de colores de las especies más representadas en el diagrama.64

Figura 7-17. Representación circular del genoma de CH565 – *Streptomyces* sp. Azul marino: contigs; verde: CDS cadena forward; morado: CDS cadena reversa; rojo: genes de resistencia antimicrobiana; azul rey: transportadores; negro fondo morado: %GC. _____68

Figura 7-18. Distribución de categorías de subsistemas del genoma de CH565. _69

Figura 7-19. Metabolismo de almidón y glucosa según KEGG. En color verde se representa las enzimas encontradas dentro del genoma CH565 para esta ruta metabólica. _____70

Figura 7-20. Reconstrucción filogenética de *Streptomyces* sp._CH565. La historia evolutiva se dedujo utilizando el método Neighbor-Joining [1]. Se muestra el árbol óptimo. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en “bootstrap test” (1000 réplicas) se muestran junto a las ramas [2]. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método Tamura de 3 parámetros [3] y se encuentran en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. Se eliminaron todas las posiciones ambiguas para cada par de secuencia (opción de eliminación por pares). Hubo un total de 1414 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA11 [4]._____77

INDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 2-1. Esquema simplificado de la pared vegetal. Imagen libre de derechos de autor.....	4
Ilustración 2-2. Estructura química y enlaces de hidrógeno en la celulosa: (a) estructura química de la celulosa, (b) enlaces de hidrógeno en la celulosa y (c) esquema de microfibrillas de celulosa que muestra la estructura cristalina y amorfa. Fuente: (Dassanayake et al., 2018).	5
Ilustración 2-3. Representación general del modo de acción de las celulasas. Fuente: (Bhardwaj et al., 2021).....	9
Ilustración 2-4. Conservación estructural y diversidad de celulasas. Debajo de cada tipo de plegamiento se indican las familias de glicosil hidrolasas (GH) correspondientes. Imagen modificada de (Sukharnikov et al., 2011).	10

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AA: Actividad auxiliar

AAI: Average Aminoacid Identity

AD: Archaean Domes

AN: Poza Anteojo

ANI: Average Nucleotide Identity

BE: Poza la Becerra

CAZy: Base de datos de Enzimas Activas en Carbohidratos

CBM: Módulos de Unión a Carbohidratos

CCB: Cuenca de Cuatro Ciénegas

CCM: Medio de cultivo con Carboximetilcelulosa como única fuente de carbono

CH: Poza Churince

CMC: Carboximetilcelulosa

dbCAN: Base de datos para la anotación automatizada de enzimas activas de carbohidratos

DNS: Ácido 3,5-dinitrosalicílico

E.C: Enzyme Commission Number

EnG: Endoglucanasa

FastQC: Fast Quality Control. Programa diseñado para detectar problemas potenciales en conjuntos de datos de secuenciación de alto rendimiento.

GH: Glicosil Hidrolasas

IE: Índice enzimático

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

LPMOs: Monooxigenasas de Polisacárido Lítico

MiGA: The Microbial Genomes Atlas webserver

MO: Poza Mojarral

PA: Pozas Azules

PATRIC: Pathosystems Resource Integration Center. Es el Centro de Recursos de Bioinformática Bacteriana

Pfam: Base de datos de familias de proteínas

PR: Pozas Rojas

RAST: Rapid Annotations using Subsystems Technology webserver.

RESUMEN

Este trabajo describe la evaluación sistemática de cepas de Actinobacterias de la cuenca Cuatro Ciénegas CCB (por sus siglas en inglés) con potencial industrial para la degradación de la celulosa, los resultados de esta investigación abren la puerta para la aplicación biotecnológica del microorganismo seleccionado y las enzimas contenidas en su genoma.

Las pozas de agua de CCB se han utilizado inmensamente para el estudio de especies ecológicas y de biodiversidad, sin embargo, recientemente los investigadores han visto con potencial la obtención de biomoléculas de importancia industrial de origen microbiano. Principalmente, el sistema hidrológico de Churince (CH) es el sitio más inusual dentro del CCB, pero la recarga en el acuífero es ineficiente y se secó. De las Actinobacterias de CH estudiadas, se seleccionó el microorganismo *Streptomyces* sp._CH565 por su mayor potencial celulolítico.

“*Grosso modo*”, más del 70% de la colección biológica evaluada, producen enzimas hidrolíticas extracelulares utilizando carboximetilcelulosa como única fuente de carbono. De ellas, 12 cepas mostraron valores elevados de índice enzimático (IE) ($\geq 3,0$) y se consideraron como potenciales productores de la enzima celulasa. Posteriormente, mediante cinética de producción de la enzima, se encontró un microorganismo con características de crecimiento y producción extracelular de la enzima adecuadas para continuar estudios de su genoma; de esta manera, su análisis genómico nos llevó a la caracterización de su “CAZyoma” y se determinó que 56% de sus dominios CAZy (Enzimas Activas de Carbohidratos) están dedicados exclusivamente a la hidrólisis de carbohidratos lo que constituye un reservorio importante de enzimas de interés biotecnológico, además, se determinó el modelo para la hidrólisis enzimática de celulosa el cual incluye glucanasas procesivas y no procesivas, dominios accesorios, como módulos de unión a carbohidratos (CBM), y LPMOs (Monooxigenasas de Polisacárido Lítico), completando así un modelo considerado exitoso según investigaciones al respecto, para la hidrólisis total de la celulosa.

ABSTRACT

This work describes the systematic evaluation of Actinobacteria strains from the Cuatro Ciénegas CCB basin with industrial potential for cellulose degradation. The results of this research open the door for the biotechnological application of the selected microorganism and the enzymes contained in its genome.

The pozas of the CCB have been used immensely for the study of ecological species and biodiversity, however, recently researchers have seen the potential to obtain biomolecules of industrial importance of origin microbial. Mainly, the hydrological system of Churince (CH) is the most unusual site within the CCB, but the recharge in the aquifer is inefficient and has dried up. Of the CH-Actinobacteria studied, the microorganism *Streptomyces* sp._CH565 was selected due to its greater cellulolytic potential.

“*Grosso modo*”, more than 70% of the biological collection evaluated produce extracellular hydrolytic enzymes using carboxymethylcellulose as the only carbon source. Of these, 12 strains showed high values of EI (enzymatic index) (≥ 3.0) and were considered as potential producers of the enzyme cellulase. Subsequently, through enzyme production kinetics, a microorganism was found with optimal growth characteristics and extracellular production of the enzyme suitable for further studies in this regard. Its genomic analysis led us to the characterization of its "CAZyoma" and it was determined that 56% of its CAZy (Carbohydrate Active Enzyme) domains are dedicated exclusively to carbohydrate hydrolysis, which constitutes an important reservoir of enzymes of biotechnological interest, in addition, the model for the enzymatic hydrolysis of cellulose which includes processive and non-processive glucanases, accessory domains, such as carbohydrate binding modules (CBM), and LPMOs (Lytic Polysaccharide Monooxygenase), thus completing a model considered successful for the total hydrolysis of cellulose.

1 INTRODUCCIÓN

La celulosa es el biopolímero natural más abundante en la naturaleza (Behera et al., 2017), caracterizado por su muy baja solubilidad en agua (Lynd & Weimer, 2002), representa aproximadamente el 45% del peso seco de los materiales lignocelulósicos, compuestos por subunidades de D-glucosa que forman el dímero de celobiosa por enlaces glucosídicos β -1,4; el cual necesita ser hidrolizado para su uso, sin embargo, la celulosa resulta altamente resistente a la hidrólisis. debido a la forma cristalina en su estructura.

Las celulasas son una mezcla compleja de proteínas capaces de hidrolizar los enlaces glucosídicos β -1,4 de la celulosa y derivados de la celulosa (Lynd & Weimer, 2002), se pueden clasificar en Endo- β -1,4-glucanasas (EC 3.2.1.4), que atacan aleatoriamente a la celulosa amorfa para que pueda ser posteriormente atacado por las Exo- β -1,4-glucanasas (EC 3.2.1.74), que hidrolizan la celulosa cristalina y las β -glucosidasas (EC 3.2.1.21), que hidrolizan los dímeros de glucosa (Asha et al., 2012). Además, monooxigenasas de polisacárido lítico (LPMO's) que actúan en forma sinérgica con las glicosil hidrolasas clásicas y podrían ser responsables del ataque inicial de los polisacáridos (Hemsworth et al., 2013).

Además de la industria de los biocombustibles, las celulasas también se aplican en tratamiento de aguas residuales, procesamiento de almidón, producción de alimento para ganado, producción de ácido láctico y proteína extracelular, procesos de extracción de jugos de frutas y verduras, así como la industria textil y la industria del papel (Gastelum-Arellanez et al., 2014). Actualmente, los tratamientos enzimáticos para hidrolizar celulosa tienden a ser costosos, lentos y relativamente ineficientes (Kim, 2018; Manzanares, 2010). Hongos como *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. y *Trichoderma* spp. pueden secretar cantidades industriales de enzimas lignocelulolíticas extracelulares, sin embargo, las enzimas bacterianas tienen características que son más ventajosas que las de las enzimas fúngicas. Esto se debe a que las bacterias crecen más rápidamente, producen complejos multienzimáticos con mayor funcionalidad y especificidad, y pueden tolerar mayor *stress* ambiental (Lu et al., 2014). Por esta razón, es necesaria la búsqueda de nuevos

microorganismos que produzcan enzimas más adecuadas para este tipo de procesos, con mayores actividades específicas y mejores eficiencias (Bhardwaj et al., 2021; Quinlan et al., 2010).

Las Actinobacterias en hábitats extremos representan no solo una amplia diversidad taxonómica, sino también una alta diversidad genética de sus vías biosintéticas para sintetizar nuevos compuestos biológicos (Qin et al., 2016). En este sentido, los hábitats áridos y desérticos son ecosistemas especiales que pueden reclutarse para el aislamiento de Actinobacterias poco comunes con nueva capacidad metabólica (Mohammadipanah & Wink, 2016). En este aspecto, se han adelantado estudios con excelentes resultados sobre la diversidad morfológica y metabólica y la distribución de poblaciones de Actinobacterias cultivables en la cuenca Cuatro Ciénegas, Coahuila ubicada dentro del Desierto Chihuahuense Mexicano. La Cuenca de Cuatro Ciénegas (CCB) es un oasis extremadamente oligotrófico y biodiverso en peligro de extinción en el desierto de Chihuahua (Souza et al., 2012) y dentro de ella, el Sistema Churince es el sistema hidrológico más inusual, debido a su mayor altitud dentro de la valle (alrededor de 30 m sobre la mayor parte del CCB), su dependencia de aguas antiguas en su mayoría profundas con influencia magmática (Wolaver et al., 2013), una matriz de suelo de calcio y extrema oligotrofia en términos de limitación de fósforo (Elser et al., 2005a). Las características de este peculiar ambiente crean una extensa biodiversidad de microorganismos, los cuales se ven obligados a utilizar diferentes estrategias bioquímicas para sobrevivir en condiciones de escasez. Debido a que Cuatro Ciénegas contienen un registro notable de su historia evolutiva dentro de sus genomas (Souza et al., 2006a), no solo la búsqueda de nuevas enzimas o la ingeniería de las existentes, sino el estudio de sus genomas despierta gran interés entre los investigadores. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad celulolítica producida por Actinobacterias muestreados de CCB con potencial de ser utilizados con fines biotecnológicos.

2 ANTECEDENTES

2.1 Composición y estructura de la biomasa lignocelulósica

El término biomasa lignocelulósica se refiere a toda aquella biomasa vegetal que no es utilizada como fuente de alimento y comprende residuos de la agroindustria, cultivos energéticos, como pasturas y malezas y desechos sólidos urbanos (Den et al., 2018; Robak & Balcerek, 2018). Es un material abundante y renovable por lo que su aprovechamiento es materia de estudio a nivel global, especialmente en países con fuerte actividad agrícola y forestal (Arevalo-Gallegos et al., 2017). Una de las utilidades más investigadas en los últimos años es su aprovechamiento para la producción de etanol, dado su alto contenido de hidratos de carbono fermentables y la gran disponibilidad de biomasa. A diferencia de los biocombustibles de primera generación, derivados principalmente de almidón como el maíz y la papa y, de la sacarosa presente en caña de azúcar, sorgo azucarero o remolacha, los biocombustibles derivados de lignocelulosa, llamados de segunda generación, provienen de fuentes no alimenticias y de bajo valor (Lennartsson et al., 2014; Wyman, 1994).

La lignocelulosa es el componente estructural principal de la pared vegetal de plantas terrestres y el recurso renovable más abundante en la tierra. Su composición varía según la especie, pero, a grandes rasgos, la componen los polisacáridos celulosa y hemicelulosa y la lignina, que constituyen el 20–50%, 15–35% y 10–30% del peso seco de la planta, respectivamente (Payne et al., 2015). Estos componentes interactúan a través de enlaces covalentes y no covalentes formando una estructura altamente recalcitrante a la degradación (Saini et al., 2015).

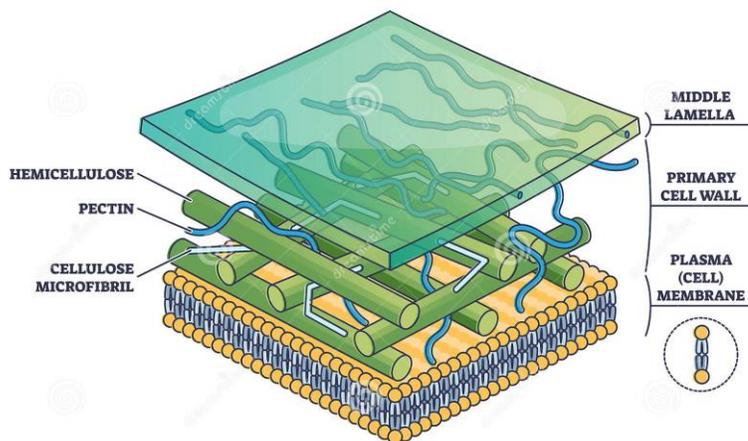


Ilustración 2-1. Esquema simplificado de la pared vegetal. Imagen libre de derechos de autor.

Se ha establecido que una de las vías más eficiente de deconstrucción de materiales lignocelulósicos es la utilización de enzimas (Glicosil hidrolasas y enzimas oxidativas) ya que permite maximizar la obtención tanto de hexosas (glucosa) como de pentosas (xilosa), para su posterior fermentación, lo cual es clave para el aprovechamiento completo de la biomasa y la sustentabilidad del proceso (Ballesteros, 2010).

2.1.1 Celulosa

Como el componente esquelético más importante de las plantas, el polisacárido de celulosa es una materia prima polimérica casi inagotable con una estructura y propiedades fascinantes (Klemm et al., 2005).

Es un polisacárido compuesto exclusivamente de moléculas de glucosa por lo que se conoce como un homopolisacárido; es rígido, insoluble en agua, y contiene desde varios cientos, hasta varios miles de unidades de β -glucosa, que se mantienen unidas mediante enlaces β -1,4 glucosídico. Su larga cadena polimérica es de pesos moleculares variables, y una fórmula empírica $(C_6H_{10}O_5)_n$ donde n presenta un valor mínimo de 200 (Guarnizo Franco et al., 2009) (Ilustración 2-2 a).

Las cadenas de celulosa están estabilizadas por puentes de hidrógeno intra e intercatenarios (Lynd & Weimer, 2002). Cada cadena tiene un extremo reductor, en que queda expuesto el aldehído del carbono anomérico por la apertura del enlace hemiacetal, y otro no-reductor (A. Kumar & Chandra, 2020). Las cadenas de celulosa se disponen en forma paralela, adoptando una estructura compacta, llamada celulosa cristalina. Alrededor de 30 moléculas de celulosa se organizan formando protofibrillas, que se ensamblan en microfibrillas de entre 10 y 25 nm de diámetro. A su vez, las microfibrillas se empaquetan en macrofibrillas de aproximadamente 0,5 μm de ancho y 4 μm de longitud (Ilustración 2-2). Como resultado, la celulosa cristalina es un material insoluble en agua y, por lo tanto, recalcitrante a la acción enzimática (D. Kumar & Murthy, 2016).

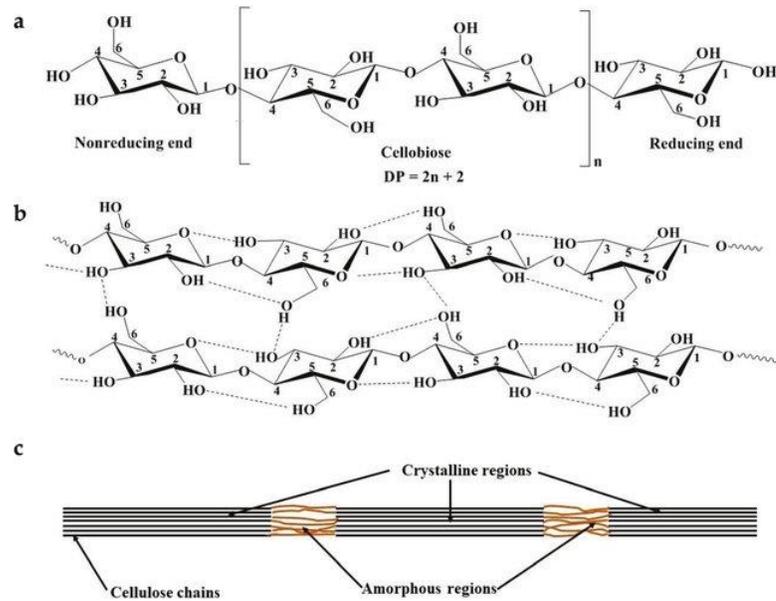


Ilustración 2-2. Estructura química y enlaces de hidrógeno en la celulosa: (a) estructura química de la celulosa, (b) enlaces de hidrógeno en la celulosa y (c) esquema de microfibrillas de celulosa que muestra la estructura cristalina y amorfa. Fuente: (Dassanayake et al., 2018).

Algunas fibras de celulosa se apartan de la cristalinidad y se disponen de manera desordenada, más permeable a la entrada de agua y susceptible a la degradación

enzimática (Lynd & Weimer, 2002). Este tipo de celulosa es conocida como celulosa amorfa o paracristalina. El porcentaje de celulosa amorfa en la pared vegetal varía entre fuentes de celulosa. Una misma cadena de celulosa presenta regiones amorfas y cristalinas en forma alternada (D. Kumar & Murthy, 2016). Los pliegues y torsiones de microfibrillas también contribuyen a la hidratación de la celulosa y al acceso de enzimas (Ilustración 2-2). La celulosa de la pared vegetal primaria tiene un menor grado de cristalinidad que la secundaria. Normalmente, la celulosa vegetal se encuentra embebida en una matriz de hemicelulosa y lignina en la gran mayoría de las plantas, salvo en las cápsulas de algodón y algunos otros casos, en los que se encuentra pura (Lynd & Weimer, 2002).

2.1.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa es el segundo componente principal de la pared celular vegetal. En contraste con la celulosa, la cuál es cristalina, fuerte y resistente a la hidrólisis, las hemicelulosas son estructuras aleatorias, amorfas con pequeña solidez, fácilmente hidrolizables en ácidos o bases diluidos (Bosetto et al., 2016).

Todos los tipos de hemicelulosas son heteropolímeros ramificados y complejos, compuestos por hexosas (D-galactosa, L-galactosa, D-manosa, L-fructosa, L-fucosa), pentosas (L-ramnosa, arabinosa, xilosa), ácido D-glucurónico y azúcares acetilados (Bosetto et al., 2016; Kucharska et al., 2018). Entre los carbohidratos poliméricos que constituyen la hemicelulosa, se incluyen xilano, xiloglucano, manano, glucomanano, galactoglucomanano y calosa (Collins et al., 2005).

El xilano constituye el principal componente de la hemicelulosa; un complejo de carbohidratos poliméricos que incluye xilano, xiloglucano (heteropolímero de D -xilosa y D -glucosa), glucomanano (heteropolímero de D -glucosa y D -manosa), galactoglucomanano (heteropolímero de D -galactosa, D -glucosa y D -manosa) y arabinogalactano (heteropolímero de D -galactosa y arabinosa) (Collins et al., 2005).

2.1.3 Lignina

La lignina es una de las mayores barreras para la degradación química y biológica de la biomasa lignocelulósica.

Las ligninas son heteropolímeros aromáticos derivados de tres monómeros, los alcoholes p-cumarílico (4-hidroxicinamílico), coniferílico (4-hidroxi-3-metoxicinamílico) y sinapílico (4-hidroxi-3,5- dimetoxicinamílico), que se enlazan por polimerización oxidativa, dando lugar a una red tridimensional con diferentes tipos de enlaces. Este polímero es depositado principalmente en la pared celular secundaria y mantiene unidas las fibras celulósicas. Confiere rigidez a la planta e impermeabilidad a los materiales lignificados, es muy resistente a la biodegradación, protegiendo a la pared del ataque microbiano (Vanholme et al., 2010).

2.2 Degradación enzimática de la lignocelulosa

2.2.1 Celulasas

La hidrólisis de la celulosa mediante el uso de enzimas es una de las principales etapas en la conversión de biomasa lignocelulósica.

Las enzimas del complejo celulolítico son hidrolasas que escinden uniones O-glicosídicas, siendo clasificadas por la Enzyme Commission number (EC) con la codificación 3.2.1.x donde el valor de x varía con una celulasa estimada.

La clasificación de las celulasas, de acuerdo con su sitio de acción en el sustrato celulósico se divide en tres grandes grupos: endo- β -1,4- glucanasas, exo-1,4- β -glucanasas (o celobiohidrolasas) y β -xilosidasas (Ilustración 2-3) (Escudero et al., 2013).

Las **Endoglucanasas** (Endo- β -glucanasas ó 1,4 β -D-glucan glucanohidrolasas) (EC 3.2.1.4), cortan de manera aleatoria al interior de la cadena de celulosa en las regiones

amorphas produciendo hidrólisis al azar de los enlaces β -1,4 glicosídicos, generando oligosacáridos de varias longitudes y consecuentemente nuevos sitios de ataque complementados por las exoglucanasas (extremos reductores y no reductores) (Lynd & Weimer, 2002). El mejor sustrato para la medición de la actividad de endoglucanasas es un derivado soluble de la celulosa, como por ejemplo la carboximetilcelulosa (CMC) (Ghose, 1987).

Exoglucanasas (ó Exo- β -glucanasas), producen principalmente rupturas secuenciales en la molécula de celulosa a partir de un extremo no reductor liberado y están representadas por 2 grupos de enzimas: exocelobiohidrolasas o celobiohidrolasas (CBH) (1,4- β -D-glucan celobiohidrolasas) (EC. 3.2.1.91) que liberan unidades de celobiosa a partir del extremo no reductor y exoglucohidrolasas (1,4- β -D-glucan glucohidrolasas) (EC. 3.2.1.74) que liberan pequeñas cantidades de glucosa a partir del extremo no reductor liberado. Las celobiohidrolasas son las halladas más frecuentemente (Espósito & de Azevedo, 2010; Hernández-Santoyo, Alejandra García-Hernández, Enrique Rodríguez-Romero, 1999).

β -Glucosidasas (celobiasas ó β -D-glucósido glucohidrolasas) (EC 3.2.1.21), hidrolizan celobiosa y celodextrinas de bajo peso molecular (celotriosas y celotetrosas) o también sobre pequeños oligómeros de glucosa (Steele & Heinzl, 2010). Siendo la glucosa el resultado final de la acción degradativa del complejo celulolítico sobre el polímero de celulosa. Los sistemas celulolíticos con niveles bajos de β -glucosidasa tienen baja actividad, debido a la inhibición de las endoglucanasas y las exoglucanasas por la celobiosa. Estas enzimas hidrolizan únicamente celooligosacáridos a una razón decreciente con el grado de polimerización y no son específicas para enlaces β -1,4 (Hernández-Santoyo, Alejandra García-Hernández, Enrique Rodríguez-Romero, 1999).

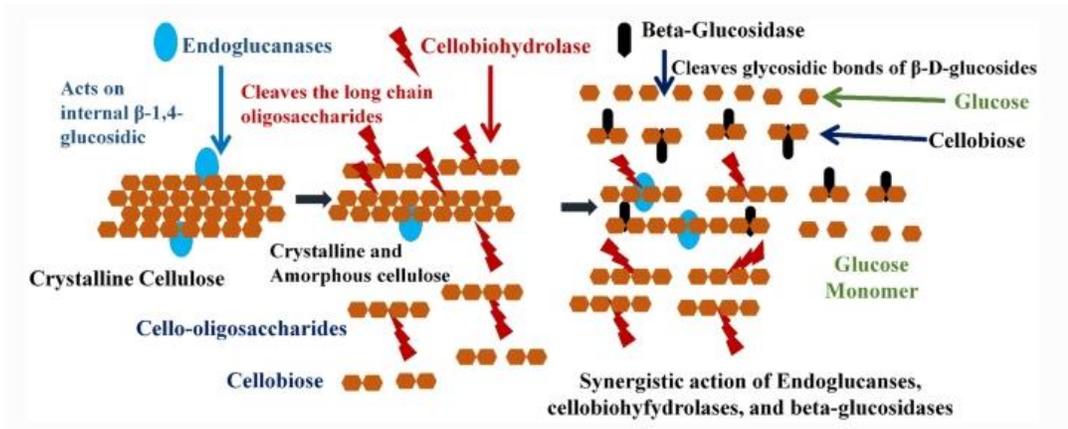


Ilustración 2-3. Representación general del modo de acción de las celulasas. Fuente: (Bhardwaj et al., 2021).

En la base de datos CAZy (<http://www.cazy.org/Home.html>) se detallan por lo menos doce familias de celulasas, que están clasificadas en base a la similitud de la secuencia de aminoácidos de su módulo catalítico (GH). Estudios estructurales de las diferentes familias muestran que las celulasas presentan ocho diferentes tipos de plegamientos proteicos y estructuras tridimensionales (Ilustración 2-4) (Sukharnikov et al., 2011).

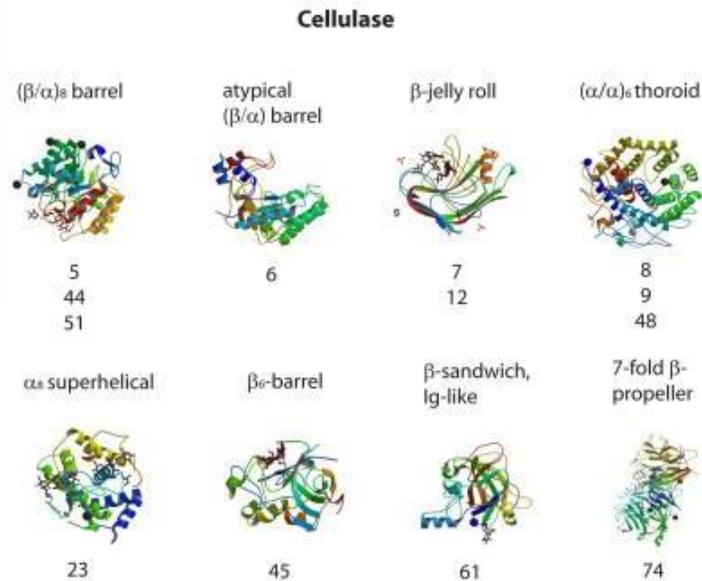


Ilustración 2-4. Conservación estructural y diversidad de celulasas. Debajo de cada tipo de plegamiento se indican las familias de glicosil hidrolasas (GH) correspondientes. Imagen modificada de (Sukharnikov et al., 2011).

Hay dos tipos comunes de sitios activos de celulasa. Los glucósidos que se hidrolizan con sitios activos abiertos (ranuras, hendiduras) generalmente exhiben actividad endocelulolítica, se unen en cualquier lugar a lo largo de la molécula de celulosa e hidrolizan el enlace glucosídico β -1,4, mientras que aquellos con sitios activos similares a túneles exhiben actividad exocelulolítica (celobiohidrolasas), que se unen en los extremos de la molécula de celulosa (Kurasin & Väljamäe, 2011) y producir productos de oligosacáridos de longitud unitaria. Por lo general, las exocelulasas son enzimas procesivas, es decir, se unen a la cadena de celulosa hasta que se hidroliza por completo (Beckham et al., 2011; Kurasin & Väljamäe, 2011), mientras que las endocelulasas pueden ser tanto procesivas como no procesivas (Kurasin & Väljamäe, 2011). La eficiencia de las celulasas procesivas puede contribuir en gran medida al paso limitante de la hidrólisis de la celulosa (Beckham et al., 2011). Celulasas con modo de acción- Endo parecen estar representados por un mayor número de pliegues de proteínas, esto indica que las Endocelulasas son más diversas evolutivamente o que aún no se han encontrado muchas Exocelulasas novedosas (Gilbert, 2010).

Muchas celulasas son proteínas multidominio y, además del dominio catalítico, tienen dominios accesorios, como módulos de unión a carbohidratos (CBM), conectados por un conector flexible. El papel principal de CBM es ayudar a las celulasas a unirse a la celulosa, aunque también puede participar en la ruptura inicial de las fibras de celulosa (Sukharnikov et al., 2011).

2.2.2 Hemicelulasas

Las xilanasas son enzimas hidrolíticas que despolimerizan el xilano. Existen diversas formas de estas enzimas, que presentan mecanismo de acción, especificidad de sustrato,

características físico-químicas y diferentes plegamientos (Collins et al., 2005; Pollet et al., 2010). La degradación completa del xilano depende de la cooperación de toda una batería enzimática.

Se ha descrito actividad endoxilanasas en enzimas con familias GH10 y GH11, principalmente, pero también GH5, GH7, GH8 y GH43. Las β -xilosidasas se distribuyen en las familias GH1, GH3, GH30, GH39, GH43, GH51, GH52, GH54, GH116 y GH120 (Bosetto et al., 2016; Collins et al., 2005). Debido a que las cadenas de xilano se encuentran muy ramificadas con sustituyentes de distinta naturaleza, se requiere de la acción auxiliar de enzimas desramificantes, como las α -L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55), las α -D-glucuronidasas (EC 3.2.1.131), las esterasas de ácido férulico (EC 3.1.1.73) y las esterasas de acetilxilano (EC 3.2.1.72). Estas enzimas favorecen el acceso de las endoxilanasas a la cadena principal de xilano. Otros tipos de hemicelulosa involucran la actividad de enzimas como mananasas (EC 3.2.1.78) y β -manosidasas (EC 3.2.1.25), de α -galactosidasas (EC 3.2.1.22) y/o de xiloglucanasas (EC 3.2.1.151).

2.2.3 Ligninasas

La lignina es altamente resistente a la degradación química y biológica debido a su complejidad estructural, alto peso molecular e insolubilidad. Los hongos de podredumbre blanca son los microorganismos más eficientes en la degradación de lignina.

La despolimerización de la lignina está catalizada por enzimas inespecíficas extracelulares con alto poder oxidativo que forman productos altamente oxidados e inestables que mediante diferentes reacciones catalizan la degradación de la lignina. Entre estas enzimas se encuentran las lacasas y las peroxidasas. Las lacasas necesitan oxígeno para su actividad mientras que las peroxidasas requieren agua oxigenada. Existen varios tipos de peroxidasas, lignina peroxidasa, manganeso peroxidasas y peroxidasas versátiles (Furukawa et al., 2014; Vanholme et al., 2010).

2.2.4 LPMOs (monooxigenasas de polisacárido lítico)

Las LPMOs resultan esenciales en la degradación de polisacáridos de estructura cristalina, como la celulosa y la quitina (Morgenstern et al., 2014). Actúan en forma sinérgica con las glicosil hidrolasas clásicas y podrían ser responsables del ataque inicial de los polisacáridos (Hemsworth et al., 2013). Como su mecanismo fue dilucidado recientemente, algunas LPMOs habían sido clasificadas dentro de las familias GH61 o CBM33, en el año 2013, se las reclasificó en AA9 y AA10, respectivamente (Levasseur et al., 2013). Las AA9 son características de hongos y se ha identificado que actúan sobre celulosa, principalmente. Las AA10 son bacterianas y se ha descrito su actividad sobre celulosa y quitina (Levasseur et al., 2013). Hoy en día, se considera que el modelo para la hidrólisis enzimática de celulosa debe incluir las glucanasas procesivas y no procesivas y las LPMOs (Morgenstern et al., 2014).

2.1 Celulasas y sus aplicaciones Biotecnológicas.

El mercado de las enzimas se valoró en USD 10.000 millones en 2019 y se prevé que alcance los USD 14.700 millones para 2025. Por tipo, el mercado de enzimas está segmentado en carbohidrasas, proteasas, lipasas, polimerasas y nucleasas, y otras enzimas. El segmento de las carbohidrasas se segmenta aún más en amilasas, celulasas y otros carbohidratos. Se estima que este segmento representa una participación significativa en el mercado de enzimas, ya que la carbohidrasa, como la amilasa y la celulasa, se usa de manera significativa para aplicaciones industriales como las industrias de alimentos y bebidas, textiles y pulpa y papel (Tabla 2-1).

Por fuente, el mercado de enzimas está segmentado en microorganismos, plantas y animales. Se proyecta que el segmento de microorganismos sea testigo del mayor crecimiento durante el período de pronóstico, ya que las enzimas obtenidas de fuentes microbianas conducen a bajos costos de producción. Además, como las enzimas obtenidas

de fuentes microbianas pueden cultivarse en grandes cantidades en un período corto, los microorganismos son la principal fuente de enzimas industriales (*Enzymes Market Size & Share, Growth Trends / Industry Report 2020-2025* |, n.d.)

Tabla 2-1. Resumen de las aplicaciones biotecnológicas de las celulasas

Industria	Aplicación	Referencia
Médica/Alimentaria	<p>Para la digestión colectiva de sustancias fibrosas ricas en celulosa, para tratar a las personas que padecen trastornos metabólicos.</p> <p>Para la degradación de las paredes celulares de los organismos patógenos.</p>	(Galié et al., 2018; Jayasekara & Ratnayake, 2019)
Alimentación animal	<p>Las celulasas juegan un papel crucial en el incremento de las tasas de digestión de la fibra, ya que mejoran el tratamiento de ensilaje para mejorar la digestibilidad de los rumiantes.</p>	(Sharma et al., 2016)
Alimentaria	<p>Se usan en la eliminación de la capa externa de la soja para la producción de alimentos fermentados como salsa de soja y miso.</p> <p>En el aislamiento de proteínas de soja y coco.</p> <p>Para la gelatinización de algas con el fin de aumentar su digestibilidad.</p> <p>La producción de celooligosacáridos, glucosa y otros azúcares solubles a partir de residuos celulósicos.</p>	(Bhat & Bhat, 1997)
Cervecera	<p>Para hidrolizar β-1,3-1,4-glucanos, que se encuentran en el endospermo de la cebada, mejorar la filtración de la cerveza y disminuir su turbidez.</p>	(Bhat, 2000)

Vinicola	Para poder aumentar el aroma de los vinos.	(Toushik et al., 2017)
Textil	Se utilizan en el proceso de biolavado de las prendas vaqueras para eliminar el exceso de tinte (azul de índigo) y dar a las prendas suavidad y aspecto gastado, permitiendo la eliminación parcial o total del uso de piedra pómez.	(Bhat & Bhat, 1997; Sharma et al., 2016)
Biocombustibles	Se utilizan en la bioconversión de residuos agroindustriales, y en general de la biomasa, en bioetanol.	(Dodd & Cann, 2009; Kim, 2018; Manzanares, 2010)
Papelera	Tienen aplicación en el reciclado del papel para el destintado de las fibras (deinking)	(Bajpai, 2010; Machado & Gil, 2012)

2.1.1 Industria alimenticia humana y alimentación animal

Las enzimas activas sobre lignocelulosa son empleadas para mejorar las características de productos de consumo humano que derivan de frutas y vegetales. En la industria vitivinícola se utilizan β -glucanasas, hemicelulasas y pectinasas, que mejoran ciertas características del vino, como su color y aroma (Toushik *et al.*, 2017, Bhat, 2000).

Recientemente, se ha estudiado el uso de celulasas y amilasas en cócteles multi-enzimáticos diseñados para la disgregación de la matriz extracelular en biofilms de bacterias patógenas que colonizan alimentos o elementos de cocina (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*) (Galié *et al.*, 2018).

Las enzimas fibrolíticas (celulasas, β -glucanasas y xilanasas, principalmente) son también de utilidad en el procesamiento de alimentos para animales monogástricos (como aves y porcinos) (Bhat, 2000; Mendoza *et al.*, 2014), ya que colaboran en la hidrólisis de las fibras presentes en granos y vegetales, es decir, de todos los componentes que no son almidón, como celulosa, pectina y xilanos. Las fibras son consideradas factores antinutricionales. La adición de estas enzimas al alimento puede convertir los polisacáridos estructurales en un material absorbible por los animales monogástricos, lo que mejora la salud animal (Kuhad *et al.*, 2011). Inclusive, se han observado mejoras en el crecimiento, la masa muscular y la calidad de la leche por agregado de enzimas fibrolíticas al forraje destinado a rumiantes (Mendoza *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2016).

2.1.2 Industria textil y detergentes para ropa

En la industria textil, la catálisis biológica es una alternativa a los tratamientos químicos, que tienen consecuencias medioambientales negativas. Las celulasas (Endo y exoglucanasas y β -glucosidasas) se aplican en procesos como el desgastado de telas (*biostoning*) y el acabado de fibras de lino y algodón o similares (*biopolishing*). A su vez,

se utilizan pectinasas para remover pectina y ceras de las telas de algodón y en lanas (*bioscouring*). Además, las celulasas se agregan en los detergentes para el lavado de ropa, ya que modifican las fibras de celulosa, contribuyendo a la remoción de manchas y mejorando el aspecto y la suavidad de las telas. Actualmente, se utilizan endo y exoglucanasas de hongos de los géneros *Humicola*, *Trichoderma* y *Aspergillus* y de bacterias del género *Bacillus*, entre otros. Muchas de estas enzimas son activas en condiciones levemente alcalinas y/o a baja o alta temperatura (Sharma *et al.*, 2016).

2.1.3 Bioetanol de segunda generación

Los biocombustibles celulósicos, o de segunda generación, se basan en la sacarificación de la celulosa para la obtención de glucosa y su posterior fermentación a etanol, llevada a cabo por levaduras. La sacarificación puede efectuarse por tratamiento con ácido a altas temperaturas o por hidrólisis enzimática, siendo ésta última la metodología que ha dado mejores rendimientos (Manzanares, 2010).

La sacarificación enzimática es el cuello de botella de la producción de etanol celulósico, dado el alto costo económico asociado a la producción de enzimas y la variedad de las actividades enzimáticas necesarias para la degradación completa de un sustrato complejo (Manzanares, 2010). Por lo tanto, es crucial el desarrollo de nuevos cócteles, con todas las enzimas necesarias en la proporción justa, apropiada para cada tipo de biomasa.

Además, la producción de glucosa disminuye en función del tiempo de hidrólisis, lo que se postula que puede resultar de la inactivación térmica de las enzimas, la unión irreversible al sustrato, la inhibición de las celulasas por producto y los cambios reológicos de la materia prima a lo largo del proceso (Manzanares, 2010). También se ha adjudicado la modificación del rendimiento de las enzimas a la formación de compuestos inhibitorios (como furanos, ácidos orgánicos, fenoles) durante el pretratamiento, que interfieren en las etapas siguientes de producción de etanol celulósico, es decir, en la sacarificación y fermentación (Kim, 2018).

Por todo esto, es necesaria la prospección de enzimas novedosas, adecuadas a las condiciones del proceso (termoestables, que no presenten regulación por inhibición por producto, que se produzcan en grandes cantidades), a fin de maximizar el rendimiento y reducir los costos económicos asociados a la producción de etanol celulósico (Quinlan et al., 2010). Otra estrategia consiste en modificar genéticamente las enzimas ya caracterizadas para mejorar su actividad (Kim, 2018).

La sustentabilidad económica del etanol celulósico podría estar ligada, además, al diseño de biorrefinerías para la explotación conjunta tanto del biocombustible como de los subproductos, que pueden ser convertidos a productos de alto valor agregado (Arévalo-Gallegos *et al.*, 2017).

2.1.4 Fabricación de papel

El papel se define como un material en forma de lámina constituido por fibras celulósicas que establecen enlaces entre ellas. En la formación del papel, las fibras deben desarrollar uniones que permitan la obtención de papeles con determinada calidad (García-Hortal 1993; Cadena 2009).

La madera actualmente es el recurso más utilizado en la industria papelera. Es un recurso renovable compuesto por celulosa (45%), hemicelulosa (30%) y lignina (25%). Tiene menos de 5 % de sustancias como terpenos, resinas y ácidos grasos. En los países industrializados las plantas herbáceas son destinadas frecuentemente para la producción de papeles especiales. Por otro lado, para cubrir la demanda mundial de papel, en las últimas décadas está incrementando el uso de papel reciclado como fuente de celulosa.

El destintado enzimático es el proceso que se efectúa utilizando enzimas, las cuales pueden atacar el papel o en algunos casos las partículas de tinta. Para el destintado enzimático, las más comunes son las celulasas, las cuales degradan la celulosa liberando las partículas de tinta que están aferradas al papel, y posteriormente puedan ser removidas, dando como resultado un papel con cantidades menores de tinta. Estas enzimas pueden

ser ayudadas en algunos casos por los surfactantes. Se ha demostrado que las celulasas mejoran el destintado de fibras secundarias. Ellas son utilizadas en conjunto con ayudantes de flotación para reducir considerablemente los conteos de puntos en pulpas destintadas del mercado, procesadas a partir de mezclas de papel blanco (MOW, mixed office waste) (Machado y Gil, 2012).

2.2 Microorganismos productores de celulasas

Tabla 2-2. Panorama general de los microorganismos productores de enzimas celulolíticas (Kuhad et al., 2011).

Fungi	Soft rot fungi <i>Aspergillus niger</i> ; <i>A. nidulans</i> ; <i>A. oryzae</i> ; <i>A. terreus</i> ; <i>Fusarium solani</i> ; <i>F. oxysporum</i> ; <i>Humicola insolens</i> ; <i>H. grisea</i> ; <i>Melanocarpus albomyces</i> ; <i>Penicillium brasilianum</i> ; <i>P. occitanis</i> ; <i>P. decumbans</i> ; <i>Trichoderma reesei</i> ; <i>T. longibrachiatum</i> ; <i>T. harzianum</i> ; <i>Chaetomium cellulyticum</i> ; <i>C. thermophilum</i> ; <i>Neurospora crassa</i> ; <i>P. fumigosum</i> ; <i>Thermoascus aurantiacus</i> ; <i>Mucor circinelloides</i> ; <i>P. janthinellum</i> ; <i>Paecilomyces inflatus</i> ; <i>P. echinulatum</i> ; <i>Trichoderma atroviride</i>
	Brown rot fungi <i>Coniophora puteana</i> ; <i>Lanzites trabeum</i> ; <i>Poria placenta</i> ; <i>Tyromyces palustris</i> ; <i>Fomitopsis sp.</i>
	White rot fungi <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ; <i>Sporotrichum thermophile</i> ; <i>Trametes versicolor</i> ; <i>Agaricus arvensis</i> ; <i>Pleurotus ostreatus</i> ; <i>Phlebia gigantea</i>
	Aerobic bacteria <i>Acinetobacter junii</i> ; <i>A. amitatus</i> ; <i>Acidothermus cellulolyticus</i> ; <i>Anoxybacillus sp.</i> ; <i>Bacillus subtilis</i> ; <i>B. pumilus</i> ; <i>B. amyloliquefaciens</i> ; <i>B. licheniformis</i> ; <i>B. circulans</i> ; <i>B. flexus</i> ; <i>Bacteriodes sp.</i> ; <i>Cellulomonas bioazotea</i> ; <i>Cellvibrio gilvus</i> ; <i>Eubacterium cellulosolvans</i> ; <i>Geobacillus sp.</i> ; <i>Microbispora bispora</i> ; <i>Paenibacillus curdolanolyticus</i> ; <i>Pseudomonas cellulosa</i> ; <i>Salinivibrio sp.</i> ; <i>Rhodothermus marinus</i>
Bacteria	Anaerobic bacteria <i>Acetivibrio cellulolyticus</i> ; <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> ; <i>Clostridium thermocellum</i> ; <i>C. cellulolyticum</i> ; <i>C. acetobutylium</i> ; <i>C. papyrosolvans</i> ; <i>Fibrobacter succinogenes</i> ; <i>Ruminococcus albus</i>
	Actinomycetes <i>Cellulomonas fimi</i> ; <i>C. bioazotea</i> ; <i>C. uda</i> ; <i>Streptomyces drozdowiczii</i> ; <i>S. lividans</i> ; <i>Thermomonospora fusca</i> ; <i>T. curvata</i>

En la naturaleza, la deconstrucción de lignocelulosa es llevada a cabo, en gran medida, por los hongos y bacterias saprófitos, capaces de producir enzimas activas sobre los componentes de la biomasa, en la Tabla 2.2 se presenta un resumen general de microorganismos que han sido relacionados con la degradación de la celulosa. Estos organismos, o sus enzimas, son aprovechados en la industria de los biocombustibles para la sacarificación de la celulosa y hemicelulosa. Asimismo, muchas de las enzimas activas sobre lignocelulosa son aplicables en otras industrias, como la alimenticia, la textil y del

papel, etc (Chakdar et al., 2016; Cragg et al., 2015; P. Kumar et al., 2017; Walia et al., 2017).

Los extractos enzimáticos de celulasas que se utilizan actualmente a nivel prototípico en la industria provienen de los hongos filamentosos *Aspergillus niger*, *Penicillium* spp., *Phanerochaete chrysosporium* y *Trichoderma reesei*, que secretan una variedad de enzimas celulolíticas (Lu et al., 2014). Sin embargo, las enzimas bacterianas tienen características que son más ventajosas que las de las enzimas fúngicas. Esto se debe a que las bacterias crecen más rápidamente, producen complejos multienzimáticos con mayor funcionalidad y especificidad y pueden tolerar mayor *stress* ambiental (Maki et al., 2009; Ulrich et al., 2008).

2.2.1 Actinobacterias

El *filum* Actinobacteria constituye uno de los más grandes grupos del dominio bacteria, son un grupo importante de bacterias Gram-positivas con alto contenido de Guanina+Citosina en su ADN (Arocha-Garza et al., 2017). De ellas, se conoce que tienen una capacidad inigualable para producir moléculas bioactivas y son fuentes prometedoras de una amplia gama de enzimas importantes, debido a su diversidad metabólica y a su mayor adaptabilidad a condiciones ambientales extremas (Yuan et al., 2014). Las Actinobacterias además, son una parte importante de la comunidad microbiana que degrada la biomasa de las plantas de manera natural y ya que en su mayoría tienen características importantes como tolerancia térmica, se espera que puedan producir enzimas con mejores propiedades catalíticas (Budihal et al., 2016)

Durante las últimas décadas, la investigación de recursos de Actinobacterias se ha centrado en hábitats especiales y entornos extremos; sin embargo, debido a las limitaciones de los métodos de aislamiento y cultivo, nuestro conocimiento de la diversidad y ecología de las Actinobacterias extremófilas es, en el mejor de los casos, fragmentario (Bull, 2011). Las Actinobacterias en hábitats extremos representan no solo

una amplia diversidad taxonómica, sino también una alta diversidad genética de sus vías biosintéticas para sintetizar nuevos compuestos biológicos (Qin et al., 2016). En este sentido, los hábitats áridos y desérticos son ecosistemas especiales que pueden reclutarse para el aislamiento de Actinobacterias poco comunes con nueva capacidad metabólica (Mohammadipanah & Wink, 2016).

El orden *Actinomycetales* pertenece a este grupo de organismos procarióticos. Los actinomicetos, producen filamentos y esporas. Son de naturaleza ubicua y representan alrededor del 10% del microbioma de los hábitats extremos, con una amplia diversidad taxonómica (Barka et al., 2016; Qin et al., 2016). Diversas investigaciones avalan el alto potencial de degradación de celulosa de los actinomicetos (Eida et al., 2012; Gong et al., 2020; Jang & Chang, 2005; Wu et al., 2018), siendo los pertenecientes al género *Streptomyces* sp. los productores más abundantes (Lu et al., 2014; Saini et al., 2015; Wilson, 1992).

Investigaciones al respecto se vienen adelantando estudios con excelentes resultados sobre la diversidad morfológica y metabólica, y la distribución de poblaciones de Actinobacterias cultivables a escala local, en la cuenca Cuatro Ciénegas, Coahuila. Producto de estos estudios, se encuentra conservada una colección de 305 cepas de Actinobacterias, de las cuales, (Arocha-Garza et al., 2017) logró secuenciar 105 cepas de esta colección, y determinó que el 50% de las secuencias evaluadas corresponden a *Streptomyces* sp. Existen estimaciones que predicen que la capacidad de producción microbiana de metabolitos se encuentra subestimada. Es decir, que sólo el 3% de esta ha sido develada y que aún faltan alrededor de 300,000 moléculas por ser identificadas (Watve et al., 2001). El uso de la minería de genomas reforzaría la idea de que, el verdadero potencial de producción de productos naturales es mayor de lo anteriormente reportado. De manera tal, que los enfoques genéticos pueden ser una estrategia para mejorar los procesos celulolíticos en la industria.

Investigaciones con enfoque genético han encontrado que, para obtener una hidrólisis sustancial de los sustratos celulósicos, se requiere producir al menos una combinación

insignificante o "núcleo" de celulasas. Algunas combinaciones de genes, por ejemplo, endoglucanasa de *Trichoderma reesei* (Tr-EGII), celobiohidrolasa de *Talaromyces emersonii* (Te-CBHI) y β -glucosidasa de *Saccharomycopsis fibuligera* (Sf-BGLI) se expresaron en levadura y resultó en una hidrólisis parcial de lignocelulosa (Bhardwaj et al., 2021; Olson et al., 2012). Además, algunas cepas diseñadas que pertenecían a orígenes genéticamente diferentes han demostrado la capacidad de una variedad de secreción de enzimas celulolíticas (Dadwal et al., 2020).

La utilización de enzimas multifuncionales es otro enfoque aclamado. Las enzimas multifuncionales son un producto de un solo gen que posee varias actividades de glucósido hidrolasa. Se considera que reduce los costos de producción de enzimas, purificación y carga de enzimas en comparación con la acción cooperativa de varias hidrolasas de glucósidos individuales (Teeravivattanakit et al., 2016). El desarrollo y la ingeniería de enzimas multifuncionales son cruciales para desarrollar enzimas de próxima generación para la deconstrucción de biomasa (Brunecky et al., 2020; Dadwal et al., 2020).

Bhardwaj et al., (2021) encontraron que la coproducción *in situ* de múltiples enzimas celulasas con énfasis en la utilización de cepas diseñadas y el control de los parámetros del proceso son métodos factibles para controlar el costo total de la industria. Por lo tanto, es crucial el desarrollo de nuevos cócteles, con todas las enzimas necesarias en la proporción justa, apropiada para cada tipo de biomasa; así como nuevos microorganismos, o la ingeniería de estos, que complementen las existentes actividades, resulta realmente de interés.

2.3 Cuatro Ciénegas como fuente de enzimas novedosas

La Cuenca de Cuatro Ciénegas (CCB), es considerado el humedal más importante en el desierto Chihuahuense y una de las tres ecorregiones desérticas más importantes del

mundo (Souza et al., 2006a). Este valle es un área de Protección de Flora y Fauna, de un poco más de 85 mil hectáreas decretadas el 7 de noviembre de 1994; localizado a 740 m sobre el nivel del mar y se encuentra rodeado por montañas que forman parte de la Sierra Madre Oriental, que por su ubicación tiene una escasa precipitación anual (≈ 150 mm).

CCB es un oasis extremadamente oligotrófico y biodiverso en peligro de extinción en el desierto de Chihuahua (Souza et al., 2012), aquí, las proporciones de nitrógeno y fósforo (N:P) son extremadamente altas, dada la gran limitación de fósforo (P) (157:1) o muy bajo N(1.8:1). El desbalance estequiométrico es lo que caracteriza a este oasis extraordinario, es por esto que sus aguas son transparentes ya que las algas que requieren un equilibrio estequiométrico normal de N:P 16:1 en CC (Cuatro Ciénegas) no pueden crecer y por lo tanto, permiten a comunidades biológicas ancestrales desarrollarse ya que sus aguas asemejan las condiciones de los mares del precámbrico (Breitbart et al., 2009; Souza et al., 2008), lo que ha generado una adaptación y dinámica poblacional de los organismos que le sobreviven muy diferente al resto del mundo, contribuyendo al endemismo biológico de la zona, la cual es la de mayor grado en todo América del norte (Souza et al., 2006a).

Uno de los sistemas de agua más importantes dentro de CCB, corresponde a Churince (CH). El Sistema Churince es el sistema hidrológico más inusual, debido a su mayor altitud dentro del valle, su dependencia de aguas antiguas en su mayoría profundas con influencia magmática (Wolaver et al., 2013), una matriz de suelo de calcio y extrema oligotrofia en términos de limitación de fósforo (Elser et al., 2005a). En el 2007 la Dirección del Área de Protección de Flora y Fauna Cuatro Ciénegas la reportaba como una de las lagunas más grandes en superficie de todo el Valle de Cuatro Ciénegas; abarcaba aproximadamente 50 ha, pero también era una de las menos profundas (60 cm en promedio). Se trata de una laguna que presenta variaciones en su espejo de agua durante el año y entre años. De acuerdo con los registros del monitoreo que la Dirección de la Reserva realiza mensualmente desde el 2004, se ha observado que Laguna Churince

comienza a contraer su espejo de agua a principios de mayo, cuando las altas temperaturas son mayores a 42° C, por lo que ocasionan altas tasas de evaporación; en los meses de junio, julio y agosto, en donde la laguna pierde entre el 70 y 80% de su espejo, mismo que comienza a recuperar de manera paulatina a partir de los meses de diciembre y enero. Lastimosamente, a fecha de 2022 esta laguna (CH) se encuentra seca, probablemente debido a malas administraciones del recurso hídrico y podría considerarse, un cementerio biológico. Los microorganismos que de aquí fueron aislados, son hoy un tesoro biológico a disposición de la ciencia, la sociedad y el desarrollo biotecnológico a escala local, regional y de país.

En CCB, se han logrado identificar múltiples comunidades de bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, hongos y virus, los cuales al ser analizados por técnicas moleculares en su gran mayoría han resultado ser endémicos de la zona (Escalante et al., 2008; Moreno-Letelier et al., 2012). En cuanto al aislamiento de Actinobacterias en las pozas de CC, en el año 2010 se reportó el cultivo exitoso de algunos termófilos de los géneros *Citroccocus*, *Kocuria*, *Arthrobacter*, *Cellulomonas*, *Nocardioides*, *Microbacterium* (Cerritos et al., 2011) y más recientemente, (Arocha-Garza et al., 2017) demostró una alta diversidad y endemismo de este grupo microbiano, comprobando de esta manera la basta diversidad de Actinobacterias cultivables en el valle. Las características de este peculiar ambiente crean una extensa biodiversidad de microorganismos, los cuales se ven obligados a utilizar diferentes estrategias bioquímicas para sobrevivir en condiciones de escasez.

Por lo anteriormente descrito, CCB es un lugar ideal para aprovechar las Actinobacterias con fines biotecnológicos. Además, debido a que Cuatro Ciénegas contiene un registro notable de su historia evolutiva dentro de sus genomas (Souza et al., 2006b), no solo la búsqueda de nuevas enzimas o la ingeniería de las existentes, sino el estudio de sus genomas despierta gran interés entre los investigadores.

3 JUSTIFICACIÓN

La bioconversión de celulosa se ha convertido en una tecnología clave para la biodegradación de biomasa lignocelulósica. Se estima que para 2026 el mercado mundial de enzimas de biocombustibles debería alcanzar los \$ 2 billones USD. Sin embargo, el uso de enzimas purificadas en diferentes procesos industriales (vinícola, papel, alimentos, bioetanol, etc.) genera altos costos de producción, que pueden reducirse mediante el uso de microorganismos que producen distintas variantes de celulasas capaces de biodegradar la celulosa en oligosacáridos solubles y glucosa sin producir subproductos peligrosos. Por lo tanto, se crea una demanda muy alta de microorganismos que pueden producir celulasas a un costo mejor que el disponible comercialmente, lo que estimula a las industrias y grupos de investigación académicos de todo el mundo a encontrar nuevos microorganismos como estos.

En este sentido, CCB, abre un camino trascendental para la bioprospección de Actinobacterias con capacidades enzimáticas posiblemente extraordinarias o con mejores características para la industria. Este ecosistema desértico es uno de los dos únicos en América del Norte caracterizados por altos niveles de endemismo, asimismo, sus sistemas acuáticos son extremadamente oligotróficos debido a los niveles de fósforo casi insignificantes. Debido a que Cuatro Ciénegas contienen un registro notable de su historia evolutiva dentro de sus genomas, no solo la búsqueda de nuevas enzimas o la ingeniería de las existentes, sino el estudio de sus genomas despierta gran interés. Es así como este proyecto, estudió el potencial biotecnológico de Actinobacterias y su riqueza genómica al contener actividad celulolítica; el banco de cepas de Actinobacterias se encuentra conservado en el laboratorio L9 del instituto de Biotecnología y fueron aisladas de Cuatro Ciénegas, Coahuila. Este trabajo es uno de los primeros reportes que describe sistemáticamente la evaluación enzimática y la caracterización genómica de cepas de Actinobacterias aisladas de CCB con potencial industrial para la hidrólisis de la celulosa.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el potencial biotecnológico de Actinobacterias de Cuatro Ciénegas, Coahuila con actividad celulolítica.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar cualitativamente la capacidad de producir enzimas celulolíticas de la colección de Actinobacterias de Cuatro Ciénegas, Coahuila.
- Determinar la actividad celulolítica sobre carboximetilcelulosa (Actividad Endoglucanasa) de las cepas de Actinobacterias seleccionadas del escrutinio cualitativo.
- Caracterizar con enfoque polifásico, las cepas de Actinobacterias con mayor índice enzimático a través de evaluación morfológica, bioquímica y molecular.
- Identificar y caracterizar las familias de enzimas y los genes que codifiquen para el complejo enzimático celulolítico de una cepa seleccionada mediante minería genómica.

5 HIPÓTESIS

Las Actinobacterias de Cuatro Ciénegas, Coahuila representan una fuente importante de biodiversidad para la búsqueda de enzimas celulolíticas de interés biotecnológico.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Lugar de estudio

Esta investigación se llevó a cabo con la colección biológica recolectada en los sistemas de agua “pozas” localizadas en Cuatro Ciénegas, dentro del desierto Chihuahuense, en el estado de Coahuila, México. El sitio de estudio correspondiente a siete pozas a lo largo del sistema hidrológico ubica la Cuenca de Cuatro Ciénegas (CCB) en el desierto de Chihuahua (Figura 6-1). Se indica geolocalización: Ubicación Pozas Rojas (PR) (26°33'00"N 102°27'32"W), ubicación sistema Churince (CH) (26°50'58"N 102°09'12' W), ubicación Pozas Azules (PA) (26°55'22"N 102°07'12"W), ubicación Archaean Domes (AD) (26°49'41.70"N 102°01'28.74' O), localidad Poza Anteojo (AN) (26°58'08.95"N 102°07'13.84"O), localidad Becerra (BE) (26°52'42"N 102°08'17" W) y ubicación Mojarral (MO) (26°55'22"N 102°07'06"W).

6.2 Colección biológica

Se evaluaron 196 aislamientos de Actinobacterias correspondientes a la colección del laboratorio 9 del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de Nuevo León (IB-UANL), a cargo de la Dra. Susana De la Torre. Información adicional de la colección en el [Anexo A](#).

El muestreo se realizó entre 2016-2017. Las muestras se obtuvieron de agua y sedimento de la capa superior con permiso de las autoridades federales para coleccionar en el Área Natural Protegida (permiso de muestreo científico SEMARNAT No. SGPA/DGVS/03121/15). Recolectando así, muestras aleatorias, independientes y heterogéneas debido a las diversas pozas de agua (ver apartado [Lugar de estudio](#)).



Figura 6-1. Mapa descriptivo del sitio de estudio. Pozas a lo largo del sistema hidrológico ubica la Cuenca de Cuatro Ciénegas (CCB) en el desierto de Chihuahua. a) Geolocalización de las pozas de agua en Cuatro Ciénegas, Coahuila. b) Churince durante el muestreo/ Churince actual. c) De Izquierdo a derecho, de arriba abajo: Mojarral (MO), Pozas Rojas (PR), Archaean Domes (AD), Pozas Azules (PA), Anteojo (AN), Becerra (BE).

6.3 ETAPA I: DEGRADACIÓN DE CELULOSA *IN VITRO*

6.3.1 Cribado de la colección biológica y selección de los microorganismos potenciales

Inicialmente la colección de Actinobacterias se reactivó, posteriormente se sembró en medio de cultivo CMC1 que se describirá en el siguiente apartado. Los aislamientos que presentaron crecimiento fueron sometidos al crecimiento nuevamente en medio CMC1, en esta oportunidad mediante la técnica estandarizada en el laboratorio (Ver protocolos de trabajo laboratorio-9, IB) por triplicado para la selección primaria de los potenciales degradadores de celulosa, como se describe a continuación:

El colorante rojo Congo tiene una fuerte interacción con los polisacáridos que contienen enlaces contiguos β -1,4, D-glucosídicos y β -1,3, D-glucosídicos y, por lo tanto, su uso como indicador de la degradación de β -D-glucanos provee las bases para un tamizaje rápido y sensible para las bacterias celulolíticas (P. Gupta et al., 2012). Los microorganismos se evaluaron en un medio de cultivo (CCM1) que contenía como única fuente de carbono CMC, para el tamizado preliminar de la actividad celulolítica y su composición se describe a continuación: Carboximetilcelulosa (CMC) 10 g/L, K_2HPO_4 2 g/L, $(NH_4)_2 SO_4$ 0.35 g/L, urea 0.0748 g/L, agar 15 g/L, sales marinas Kent® 25 g/L, a pH 7.0 ± 0.1 . Luego de diez días de cultivo, se reveló la zona clara (halo de hidrólisis) para seleccionar el productor de mayor actividad de celulasa utilizando la prueba del rojo Congo (Carder, 1986; Yoon et al., 2007), En la Figura 6-2 se presenta un esquema general del procedimiento. Además de la colección biológica descrita previamente, en este experimento se evaluó una cepa de referencia, *Streptomyces coelicolor*, descrita como degradadora de celulosa (Lim et al., 2016).

Para esta etapa, las placas Petri reveladas con rojo Congo se fotografiaron y se analizaron mediante el programa para análisis de imágenes *Fiji*. El experimento se realizó utilizando tres repeticiones para cada cepa. Se calculó el promedio de tres experimentos, junto con la desviación del error. Los valores obtenidos se puntuaron según la zona de hidrólisis:

alta degradación de celulosa >30 mm de diámetro y menor degradación de celulosa <30 mm de diámetro.

Al finalizar el primer tamizaje y una vez seleccionadas un mínimo de cepas (12) para continuar, se mantuvo un volumen de inóculo suficiente para llevar a cabo las actividades de investigación, para ello, se siguieron las recomendaciones de almacenamiento se almacenaron esporas de los microorganismos en glicerol 50% y se conservaron a -20 °C (Shepherd et al., 2010).

6.3.2 Índice enzimático

Los microorganismos aislados con la zona de hidrólisis significativamente más grande en diámetro se seleccionaron para avanzar en los análisis para el cribado secundario. Los microorganismos se incubaron durante tres, cinco y siete días a 28°C en un medio de agar CMC1 previamente descrito, se emplearon placas de Petri de 60mm x 15mm. El tamaño del halo de hidrólisis y de la colonia, se determinó empleando el programa para análisis de imágenes *Fiji* mediante calibración del programa con la escala de medición presente en cada imagen adquirida.

El índice enzimático (IE) de cada cepa se calculó como sigue:

$$IE = \frac{\text{Diámetro de la zona de hidrólisis}}{\text{Diámetro de la colonia}}$$

El IE es una medida de la actividad enzimática por difusión radial en medio sólido (de Paula et al., 2016) y sugiere una metodología sencilla y rápida para seleccionar cepas dentro del mismo género que tengan potencial para producir enzimas (Florencio et al., 2012).

Análisis estadístico. Todos los cultivos se realizaron por triplicado, se calculó el promedio de los datos, así como el error estándar de la media. Los resultados se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA, *analysis of variance*) y comparación de medias por prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$), en el entorno Minitab para análisis estadístico. Con este análisis se seleccionarán los aislamientos con mayor potencial de degradar CMC. La visualización de los resultados obtenidos se graficó utilizando el software GraphPad Prism (versión 9.2.0).

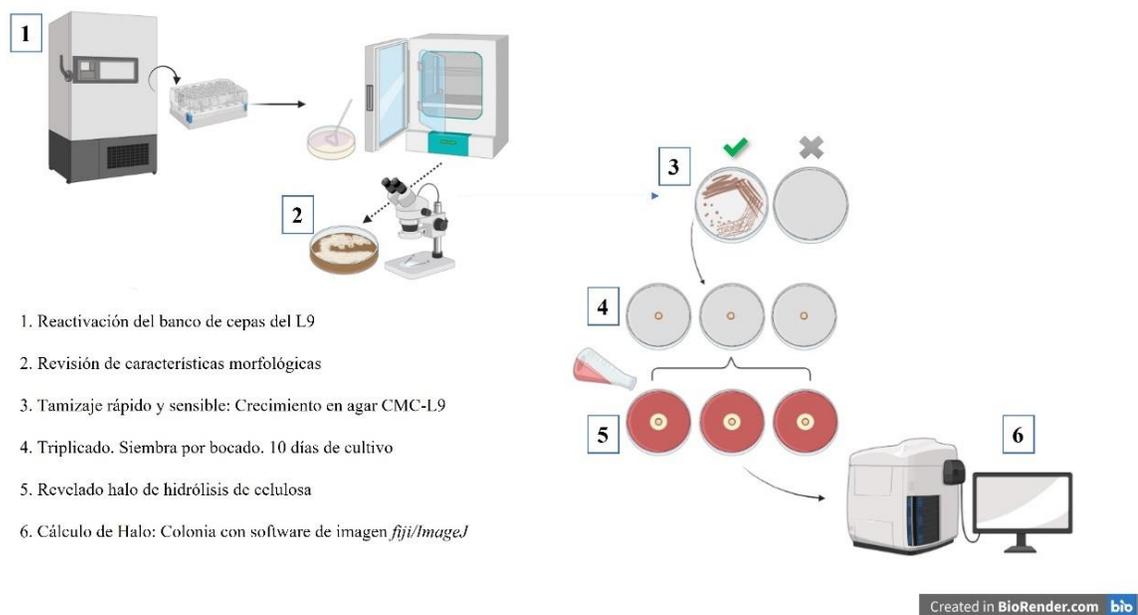


Figura 6-2. Primer cribado: Esquema general del procedimiento para la evaluación semi-cuantitativa de la colección de Actinobacterias empleando el método rojo Congo.

6.4 ETAPA II: CINÉTICA DE LA PRODUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA: ENSAYO PRELIMINAR

Se llevaron a cabo tres experimentos para determinar las variables de importancia para evaluar en fermentación sumergida al aislado promisorio, la figura 6-3 sintetiza claramente la metodología desarrollada. Para ello se tuvieron en cuenta los resultados previos en cuanto a él o los potenciales aislados de Actinobacterias degradadoras de celulosa y con ellas se realizó este procedimiento.

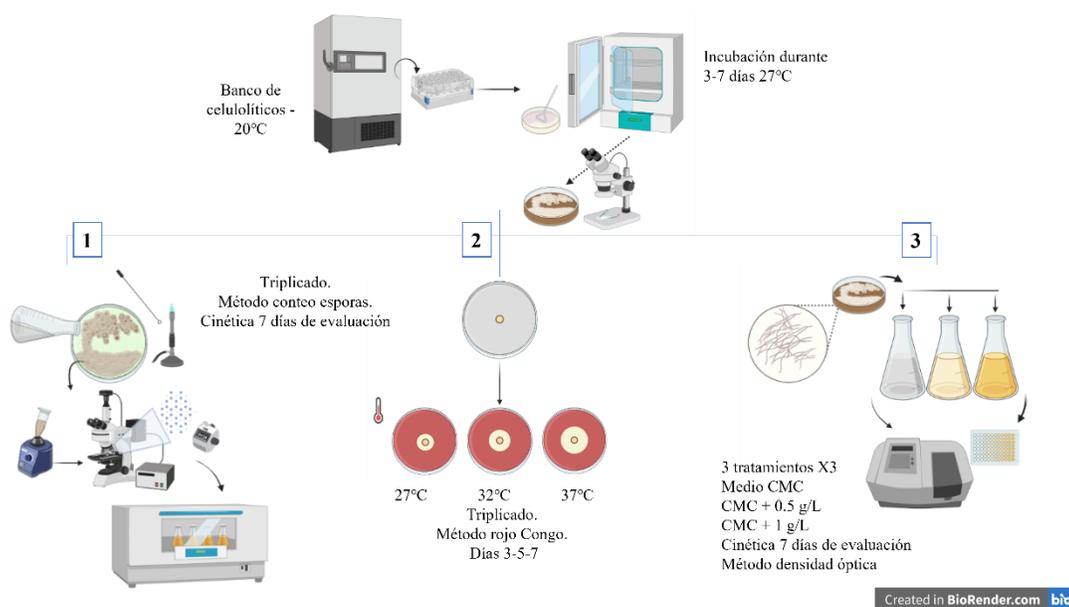


Figura 6-3. Segundo cribado: Esquema general de la metodología desarrollada durante la estandarización de las condiciones de cultivo para la posterior evaluación de la actividad enzimática en cultivo líquido.

6.4.1 Ensayo preliminar de la cinética de la producción de la actividad celulolítica

Se seleccionó una solución de esporas (1×10^9 esporas/mL) de cultivo de las cepas con la zona de hidrólisis más grande y se incubó en 150 ml de medio CMC 5 g, K_2HPO_4 2 g, $(NH_4)_2 SO_4$ 0.35 g, urea 0.0748 g, mezcla de sales marinas Kent® 5 g, a $pH 7.0 \pm 0.1$

(composición para un litro), en adelante denominado medio CCM2, en matraces Erlenmeyer de 250 ml por triplicado. Los matraces se incubaron a 28 °C durante 7 días en una incubadora con agitador a 150 rpm.

Se extrajo una muestra (1.5 ml) de cada uno de los matraces de fermentación cada 12 horas. Las muestras se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 min y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. El caldo sobrenadante se recogió asépticamente para determinar el rendimiento de la enzima. Se midieron las variables proteína extracelular, actividad enzimática Endoglucanasa y azúcares reductores, para detalles de los procedimientos ver apartados [Actividad Endoglucanasa \(EnG\)](#) y [Determinación de proteína soluble](#).

6.4.2 Efecto de la temperatura en la actividad celulolítica de los aislados de Actinobacterias

Para determinar si la temperatura tiene un efecto en la actividad celulolítica, se seleccionaron tres temperaturas de incubación (27 °C, 32 °C y 37 °C) a las que se sometieron cultivos sólidos del aislado CH565. Para ello, se sembraron los aislados en el medio de cultivo CCM2 en placas de Petri (60 mm x15 mm) y por triplicad. Como variable de respuesta se midió el diámetro del halo de hidrólisis, cuyo valor se determinó usando el programa para análisis de imágenes *Fiji* mediante calibración del programa con la escala de medición presente en cada imagen adquirida. Se realizó un seguimiento a la variable de respuesta durante los días tres, cinco y siete de crecimiento en las 3 temperaturas evaluadas.

Análisis estadístico. Se calculó el promedio de los datos, así como el error estándar de la media (todos los cultivos se realizaron por triplicado). Los resultados se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA, *analysis of variance*) y comparación de medias por prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$), en el entorno Minitab para análisis estadístico. Con este análisis se seleccionó la temperatura en la cual se desarrollará la cinética enzimática.

6.4.3 Cinética de crecimiento en diferentes concentraciones de glucosa

Para determinar si la glucosa presentaba efecto sobre la cinética de crecimiento, se realizó el experimento descrito a continuación. Estos tratamientos consistieron en medios de cultivo con CMC2 y la adición de glucosa, como se describe a continuación: un tratamiento solo con CMC como fuente de carbono, un segundo tratamiento con CMC y 0.5 g/L de glucosa y un tercer tratamiento con CMC y 1 g/L de glucosa. Se evaluaron tres tratamientos por triplicado.

El preinóculo de CH565 se preparó en cada medio de cultivo a evaluar hasta obtener un valor de 0.1 en la escala de McFarland y para el desarrollo del experimento se utilizó microplaca para cultivo celular de 96 pozos. La cinética de crecimiento se realizó empleando el espectrofotómetro (Agilent BioTek® Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader) a 600 nm y se realizó la lectura cada seis horas, hasta completar siete días de evaluación. Se calculó el promedio de los datos, así como el error estándar de la media y se realizó la gráfica correspondiente en el programa de hoja de cálculo Microsoft® Excel.

6.5 ETAPA III: CINÉTICA DE LA PRODUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA

6.5.1 Extracto enzimático crudo

Se preparó un preinóculo bacteriano de CH565 para realizar la fermentación sumergida a partir de la cepa con mayor degradación de celulosa en placa Petri seleccionada (CH565). El crecimiento vegetativo se retiró de la placa de Petri y se inoculó en suplemento de CCM2 con glucosa para obtener 0.1 en la escala de McFarland a 600 nm (A_{600nm}). El medio de cultivo para este experimento se describe a continuación [por litro]: CMC 5 g, glucosa 1 g, K_2HPO_4 2 g, $(NH_4)_2 SO_4$ 0.35 g, urea 0.0748 g, mezcla de sales marinas Kent® 5 g, a pH 7.0 ± 0.1 en matraces Erlenmeyer (500 mL) por triplicado. Los matraces se incubaron a 37 °C durante 20 días en una incubadora con agitador a 150 rpm. Se extrajo parte de las muestras (2.5 mL) de cada día del matraz de fermentación y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 min y se almacenó a -20 °C hasta este análisis. El caldo sobrenadante transparente se recogió asépticamente para determinar la actividad enzimática.

6.5.2 Actividad Endoglucanasa (EnG)

La presencia de enzimas celulolíticas (endo-1,4- β -glucanasa) en una muestra puede ser determinada mediante la cuantificación de la liberación de glucosa cuando dicha muestra es expuesta en una solución de carboximetilcelulosa, ya que estas enzimas actúan sobre esta molécula desprendiendo como producto unidades de glucosa.

La actividad Endoglucanasa se cuantificó utilizando como sustrato CMC al 2% en tampón de citrato 0.05 M pH 4.8, según Ghose (Ghose, 1987). Siguiendo la metodología propuesta por Ghose (Ghose, 1987), se añadió 500 μ L del extracto enzimático y se atemperarán a 50 °C, luego se agregó Carboximetilcelulosa (CMC) y se mezcló bien; se incubó durante 30 min. Posteriormente, se adicionó el reactivo DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) y se mezcló; se dejó hervir 5 min y luego de este tiempo, otros 5 min esta vez en baño de hielo; finalmente se agregó agua destilada y se mezcló bien. Se leyó absorbancia a 540 nm

transcurridos 20 min después de la reacción. Una unidad de actividad EnG se definió como la cantidad de enzima que liberaba 1 mol_{glucosa}/min en las condiciones indicadas.

6.5.3 Proteína soluble.

El contenido de proteína extracelular de los extractos enzimáticos de CH565 se determinó por cuantificación de proteína soluble con azul de coomassie, de acuerdo con el método Bradford (Bradford, 1976) (variante micro) y se utilizó albúmina de suero bovino (Sigma®) como estándar.

Siguiendo el método de Bradford (Bradford, 1976), en tubos pequeños protegidos de la luz se adicionó 100 µL del sobrenadante de cada una de las muestras a evaluar, a los cuales se les agregó 1 mL de reactivo Bradford (Thermo Scientific™), se mezcló y se dejó durante 5 min, a continuación, se midió la absorbancia a 595 nm, se calculó la concentración de proteína utilizando la ecuación de la curva previamente calibrada.

6.5.4 Crecimiento microbiano mediante peso seco

El peso seco (contenido de sólidos) de las células bacterianas que se encuentran en una suspensión se obtiene por el secado de un volumen en un horno a 105°C hasta peso constante. En este estudio, se obtuvieron 1000 uL de muestra cada 24 horas durante los 20 días de evaluación, la muestra se centrifugó y el pellet obtenido se secó a 105°C en un horno de secado convencional. Posteriormente y para eliminar la humedad que pudiese quedar restante en el microtubo, se secó hasta peso constante a 40 °C. Una vez seca la muestra, se procedió a pesar en balanza analítica los microtubos. Previo al experimento, los microtubos se pesaron vacíos, este dato con la finalidad de obtener el valor del ‘peso con muestra – peso del tubo vacío’ y calcular la biomasa del microorganismo durante el ensayo de fermentación. Los resultados se analizaron a partir del triplicado del experimento y se calcularon como pérdida o ganancia de peso en mg/L.

6.5.5 Hidrólisis de diversos sustratos de celulosa

La cepa se cultivó tres días u obtuvo una $DO_{600nm} = 0.1$ en medio CCM3 a pH 7.0. El medio CCM3 contiene por litro: glucosa 5 g, K_2HPO_4 2 g, $(NH_4)_2 SO_4$ 0.35 g, urea 0.0748 g, mezcla de sales marinas Kent® 5 g. Se realizaron ensayos cualitativos deconstructivos con papel de filtro, algodón y palillos de dientes con tubos de ensayo por triplicado que contenían 20 ml de medio CCM3 con glucosa al 0.5 % p/v o una tira de papel de filtro Whatman n.º 1 de 1 cm x 8 cm, 50 mg de algodón absorbente, 6 cm de palillo como sustrato y 10 % (p/v) de microorganismo. Todos los cultivos se incubaron a 37°C con agitación a 150 rpm.

Los tubos se observaron durante 2 semanas y se puntuaron: 0 = sin crecimiento en 2 semanas; sin degradación, 1 = crecimiento en 1-2 semanas, sin degradación; 2 = crecimiento en 1 semana, sin degradación; 3 = degradación en 2 semanas; 4 = baja degradación en 1 semana y fuerte degradación en 2 semanas; 5 = fuerte degradación en 1 semana.

6.6 ETAPA IV: CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE ACTINOMICETOS CON ALTA CAPACIDAD CELULOLÍTICA

Para confirmar las características morfológicas esperadas para una cepa de Actinobacteria, particularmente del género *Streptomyces*, están establecidos medios de cultivo del

International *Streptomyces* Project, así como el análisis de la tinción Gram para la observación de las estructuras filamentosas y esporuladas.

6.6.1 Caracterización morfológica microscópica

Se realizaron preparaciones en fresco y tinciones de Gram para el microorganismo CH565 para su diferenciación, este a su vez, fue criopreservado a temperaturas de -20 °C en glicerol estéril a una concentración del 50% (Shepherd et al., 2010) a partir de un crecimiento en medio de cultivo sólido con CMC como fuente de carbono.

6.6.2 Caracterización morfológica macroscópica

La cepa potencial se identificó mediante estudios morfológicos, de cultivo y de género basándose en la composición química de la pared celular y estudios micro-morfológicos a saber:

Se identificaron sus características de crecimiento macroscópicas tales como textura, forma, color del micelio aéreo y del sustrato, y la producción de pigmentos difusibles en el medio de cultivo. La caracterización de la cepa se realizó utilizando el medio estándar ISP (*International Streptomyces Project*). Asimismo, las características morfológicas de la colonia como el tipo de micelio y esporas, observados al microscopio y/o estereomicroscopio.

6.6.3 Extracción del ADN genómico

Para confirmar la identidad y el posterior análisis genómico y filogenético, se extrajo ADN genómico utilizando un método de fenol/cloroformo modificado por (Arocha-Garza et al., 2017).

Para ello, las colonias de la cepa CH565, se rasparon cuidadosamente de las placas de agar (justo previo a la esporulación) y se colocaron en tubos de centrifuga; los sedimentos celulares se lavaron al 10% (p / v) con sacarosa y se resuspendieron en 400 µl de solución de lisis QTP que contiene [Por litro] (40 ml Triton X-100, 100 ml SDS al 20%, 20 ml NaCl 5M, 10 ml Tris 2M pH=8,7 ml EDTA pH=8, aforado a 10 ml con agua miliQ). Después de la resuspensión, se añadieron 400 µl de fenol/cloroformo y perlas de vidrio de 0.1 mm a la mezcla de lisis y se llevaron a un disruptor rotacional de células durante 2 min. Los lisados se centrifugaron (12.000 rpm, 15 min) y el ADN en fase acuosa se precipitó con etanol y 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M a pH 5.2; después de la incubación durante la noche a -20 °C, el ADN se centrifugó (12.000 rpm, 10 min a 4 °C), se lavó con etanol al 70% y se eluyó en TE con RNasa.

La concentración del ADN obtenido fue medida en un espectrofotómetro (Nanodrop Thermo Scientific 2000) a una absorbancia de 260nm. Con la finalidad de confirmar la integridad del ADN 3µl de cada muestra se tiñeron Gel Red 1:10.000, para posteriormente ser cargados en un gel de agarosa a una concentración del 1% preparada con una solución de TBE 1x [X litro]:108g tris base 1M, 55g ácido bórico, 7.5g EDTA. Como estándar de referencia se utilizaron 2 µl de marcador de peso molecular 1Kb Boline, los cuales fueron corridos en una cámara de electroforesis durante 30 minutos a 120v. para posteriormente ser observados en un transiluminador de luz ultravioleta (Thermo Fisher Scientific UVP MultiDoc-it Imagen System modelo 0970192201). Los productos de la amplificación del ADN genómico se enviaron a servicios especializados para su secuenciación, como se describe en el siguiente apartado.

6.7 ETAPA V: ANÁLISIS GENÓMICO

6.7.1 Ensamblaje de novo, predicción de genes y anotación del genoma

Los productos de la amplificación del ADN genómico se enviaron a servicios especializados para su secuenciación al CINVESTAV-LANGEBIO en Irapuato, mediante la tecnología *Illumina* Mi-Seq 2x300.

Las lecturas de secuenciación producidas por Illumina fueron procesadas por TrimGalore (versión 0.6.4) y FastQC (versión 0.11.9) para recortar lecturas de baja calidad, incluidas las lecturas del adaptador *Illumina* y otros errores de secuenciación. Las secuencias una vez limpiadas, se ensamblaron en varios algoritmos, entre ellos SPADdes (versión 3.13.0), Velvet (versión 1.2.10) y Unicycler (versión 0.4.8), hasta obtener el menor número de contigs posibles y de buena calidad. Los contigs ensamblados se compararon con las secuencias del gen del ADNr 16S en la base de datos del NCBI utilizando la Herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST) para determinar las afiliaciones a nivel de género depositadas en GenBank.

La anotación funcional de los genes predichos se realizó se hizo en forma automática mediante dos algoritmos de anotación disponibles en la web, el Pathosystems Resource Integration Center (PATRIC) (<https://www.patricbrc.org/>) y el algoritmo de Rapid Annotation using Subsystems Technology (RAST) (<http://rast.nmpdr.org>).

6.7.2 Número de acceso del genoma

El borrador permanente del genoma del microorganismo analizado en este estudio está disponible en línea con el siguiente identificado 6666666.875706 anotado en la plataforma RAST.

6.7.3 Identificación de enzimas activas sobre celulosa

La familia de glicosilhidrolasas que codifican genes candidatos pertenecientes a familias que se sabe que incluyen enzimas que degradan la celulosa se identificaron utilizando Pfam y la base de datos de referencia y clasificación de la familia de enzimas activas de carbohidratos (CAZymes) (Lombard et al., 2014) y supuestamente los genes activos en carbohidratos se predijeron utilizando dbCAN2 (<https://bcb.unl.edu/dbCAN2/>) (Yin et al., 2012) y se identificaron en función de la información correspondiente entre el número

Pfam y los módulos CAZy. La asignación de función se basó en la similitud con enzimas de función conocida. De esta manera, se determinaron los dominios catalíticos y de unión a sustrato correspondientes a la clasificación de la base de datos CAZy (<http://www.cazy.org>). Teniendo en cuenta los resultados de dbCAN, de la anotación por NCBI y del alineamiento de secuencias, se le asignó una actividad potencial a cada CAZYme.

6.7.4 Análisis filogenético

Para representar la diversidad y otros análisis subsecuentes de la cepa seleccionada CH565, se realizó un análisis filogenético. Inicialmente, el gen 16S rDNA (contig 192) se extrajo del genoma completo (<http://microbial-genomes.org/>). Luego, se seleccionaron secuencias representativas del género, secuencias que comparten una afiliación filogenética con la cepa promisorio y secuencias del gen 16S rDNA de Actinobacterias obtenidas de la base de datos GenBank del centro nacional de información biotecnológica (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) que presentaron porcentajes de identidad cercanos a las aisladas del valle de Cuatro Ciénegas. El árbol filogenético se construyó utilizando MEGA 11 (versión 5.05) con el algoritmo de método Neighbor-joining (NJ) y 1000 iteraciones “*Bootstrap*”.

Las secuencias fueron alineadas por el método de Clustal W (Thompson et al., 1994), con un grupo de 23 secuencias relacionadas, incluidas tres de del valle de Cuatro Ciénegas (*Streptomyces* sp. Strain STCH_207.C, *Streptomyces* sp. Strain STCH_610.A, *Streptomyces* sp. Strain STCH_617.D) y 4 secuencias usadas como raíz (*Nocardia panacis*, *Mycobacterium seoulense*, *Micromonospora echinofusca* y *cellulosimicrobium funkei*). Después de su alineación y rasurado se calculó el modelo evolutivo.

7 RESULTADOS

7.1 ETAPA I: DEGRADACIÓN DE CELULOSA *IN VITRO*

7.1.1 Cribado de la colección biológica y selección de los microorganismos potenciales

El estudio exploró la biodiversidad de la Cuenca de Cuatro Ciénegas (CCB) para la caracterización de cepas productoras de β -1,4-glucanasas y con ellas su potencial de producir estas enzimas en fermentación sumergida con miras en su aplicación de diversas industrias o la investigación biotecnológica.

Se exploraron siete diferentes pozas de agua de CCB a nombrar: Pozas Rojas, Pozas Azules, Mojarral, Becerra, Domo, Anteojo y el sistema de laguna intermedia Churince. Se analizaron un total de 196 cepas de Actinobacterias (Tabla 7-1).

Tabla 7-1. Porcentaje de microorganismos evaluados por poza de agua del sistema Churince en Cuatro Ciénegas, Coahuila.

Sitio	Sistema de agua	Aislamientos evaluados (%)
A	Laguna Intermedia Churince	54
B	Poza el Mojarral	12
C	Pozas Azules	10
D	Pozas Rojas	9
E	Poza el Anteojo	8
F	Archaeal domes	4
G	Poza la Becerra	4

Localización: **A:** sistema Churince (CH) (26°50'58"N 102°09'12" W), **B:** Mojarral (MO) (26°55'22"N 102°07'06"W), **C:** Pozas Azules (PA) (26°55'22"N 102°07'12"W), **D:** Pozas

Rojas (PR) (26°33'00"N 102°27'32"W), E: Poza Anteojó (AN) (26°58'08.95"N 102°07'13.84"O), F: Archaeán Domes (AD) (26°49'41.70"N 102°01'28.74" O), G: Becerra (BE) (26°52'42"N 102°08'17" W).

Todas las cepas de Actinobacterias fueron evaluadas para la producción de celulasa, usando el método de ensayo en placa. La colección de actinobacterias se cribó con 1% de CMC para el ensayo de hidrólisis de celulasa como única fuente de carbono. La presencia de un halo alrededor del crecimiento de la colonia después de la prueba del rojo congo indicó la producción de la enzima Endo- β -1,4-glucanasa y, en consecuencia, la degradación de la celulosa. De las 196 cepas, 156 cepas (78% de las cepas de Actinobacterias totales) presentaron crecimiento sobre el medio de cultivo CCM1 a los 10 días de crecimiento, de ellas 10.5% no presentó actividad celulolítica detectable por este método (halo hidrólisis revelado con rojo Congo), mientras que, 67.5% presentó actividad celulolítica (halo de hidrólisis de celulosa revelado por el método rojo Congo). Información extendida de cada aislado evaluado y su crecimiento en medio CCM1, puede verse en el apartado [Anexo A](#).

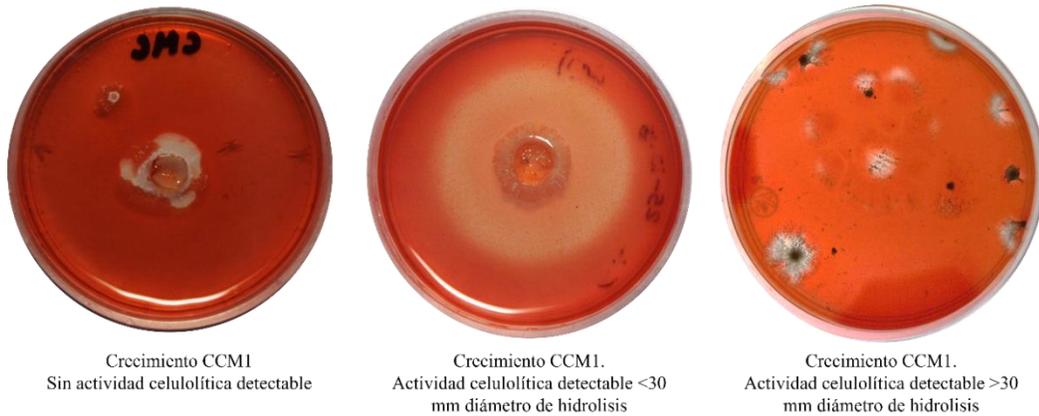


Figura 7-1. Cribado de la colección biológica. Descripción de las categorías para la evaluación de la degradación de celulosa usando el método rojo Congo.

De acuerdo con la metodología propuesta, en esta evaluación primaria nos encontramos con dos grandes grupos microorganismos celulolíticos, aquellos cuyo tamaño de halo de hidrólisis fue <30 mm de diámetro se consideró con menor degradación de la celulosa y un segundo grupo cuyo halo de hidrólisis fue >30 mm de diámetro, puntuado como con mayor potencial para degradar celulosa bajo las condiciones de este estudio. Este segundo grupo albergó 12 aislados de la colección y con ellos se continuó las siguientes etapas de investigación. Otro factor para considerar es que para este cribado también se consideró una cepa de referencia, *Streptomyces coelicolor* (Lim et al., 2016), según nuestro estudio, esta cepa obtuvo un tamaño de diámetro de halo de hidrólisis <30 mm, lo que nos indica que la metodología que proponemos es adecuada para evaluación de Actinobacterias con potencial para producir celulasas, sin embargo, dado su resultado no fue considerada para las siguientes etapas de este trabajo.

7.1.2 Índice enzimático

Se seleccionaron 12 cepas con alto diámetro de zona de hidrólisis (>30 mm) para la evaluación con el método de ensayo en placa *de novo*. Se aumentó la superficie de degradación al cambiar la configuración de la unidad experimental, en esta oportunidad se evaluó en cajas de Petri de 60 mm x 15 mm y se disminuyó el factor tiempo, limitando a siete días de crecimiento y observar los resultados con estos microorganismos promisorios.

Para la evaluación de la actividad enzimática, se tomaron dos parámetros: 1. Diámetro de la zona clara (zona de ausencia de hidrólisis) y 2. Diámetro de la colonia. El índice de la actividad enzimática resulta del cociente de la medida de la zona de hidrólisis entre la medida del diámetro de colonia. La evaluación del índice enzimático mostró dos grupos principales en nuestra colección, uno con un índice enzimático superior a dos y otro con valores inferiores a dos como se muestra en la Figura 7-2.

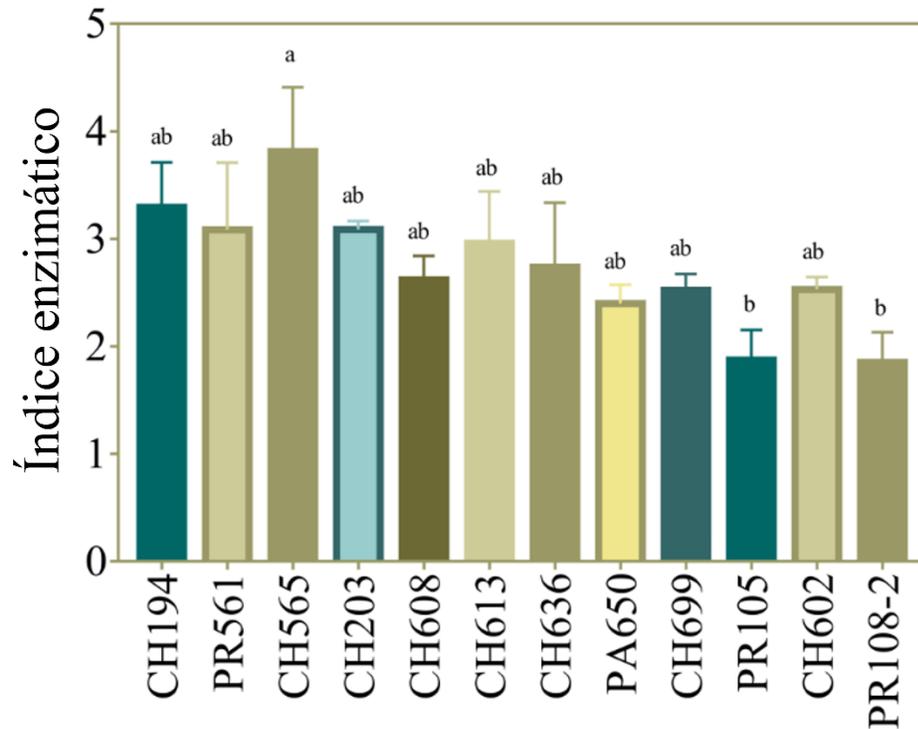


Figura 7-2. Índice enzimático. Se determinó luego de siete días de cultivo en medio agar CCM1. Todos los valores representan la media \pm error estándar de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se determinaron por análisis de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

La cepa CH565 mostró el índice enzimático más alto (EI= 3.8) seguida de CH194 (EI= 3.2), sin embargo, el estadístico de análisis solo mostró diferencia significativa con el grupo con valores de IE inferiores a dos (p -value= 0.043), es decir, con el grupo estadístico B (PR105, PR108-2).

Por su parte, el halo producido por la hidrólisis de la celulosa está directamente relacionado con la región de acción de las enzimas celulolíticas, ya que el colorante solo permanece adherido a regiones donde existen enlaces β -1,4-D-glucanohidrolasa (Florencio et al., 2012) Se evaluó la característica de máxima degradación de celulosa, se identificaron las cepas CH565 y CH194 como un grupo estadístico diferente al resto de

los aislados y con el más alto diámetro de halo de hidrólisis. (Figura 7-3) y fueron seleccionadas para los estudios posteriores de la evaluación de la actividad enzimática celulolítica en fermentación sumergida.

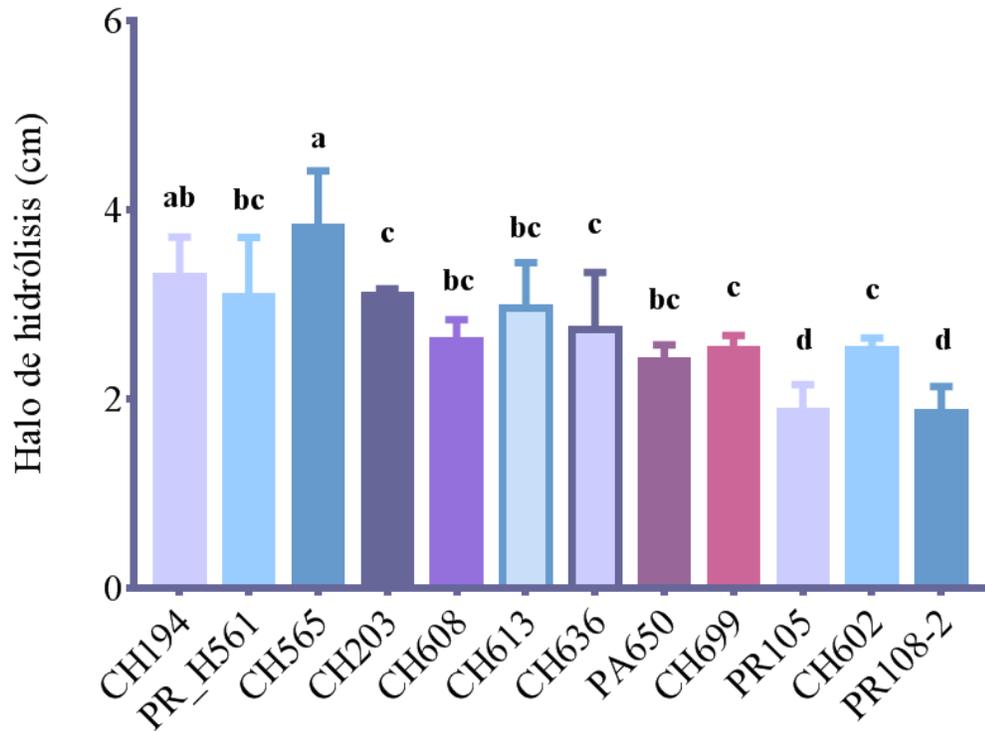


Figura 7-3. Halo de hidrólisis de celulosa. Todos los valores representan la media \pm error estándar de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se determinaron por análisis de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

7.2 ETAPA II: CINÉTICA DE LA PRODUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA: ENSAYO PRELIMINAR

7.2.1 Ensayo preliminar de la cinética de la producción de la actividad celulolítica

Los resultados indican que tanto la actividad enzimática como la liberación de azúcares reductores, no presentaron variaciones a lo largo del tiempo (Figura 7-4). Si se observa la actividad enzimática específica (del extracto enzimático crudo), CH565 muestra 76.2 U/mg EnG a las 36 h y 601.4 U/mg EnG a las 108h, siendo hasta diez veces superior al valor reportado por CH194 con 56.8 U/mg EnG a las 132h. Por lo tanto, se seleccionó CH565 para continuar en este estudio. La proteína extracelular presentó valores cercanos al límite de cuantificación del método, con valores máximos de 0.02 mg/mL en los microorganismos evaluados.

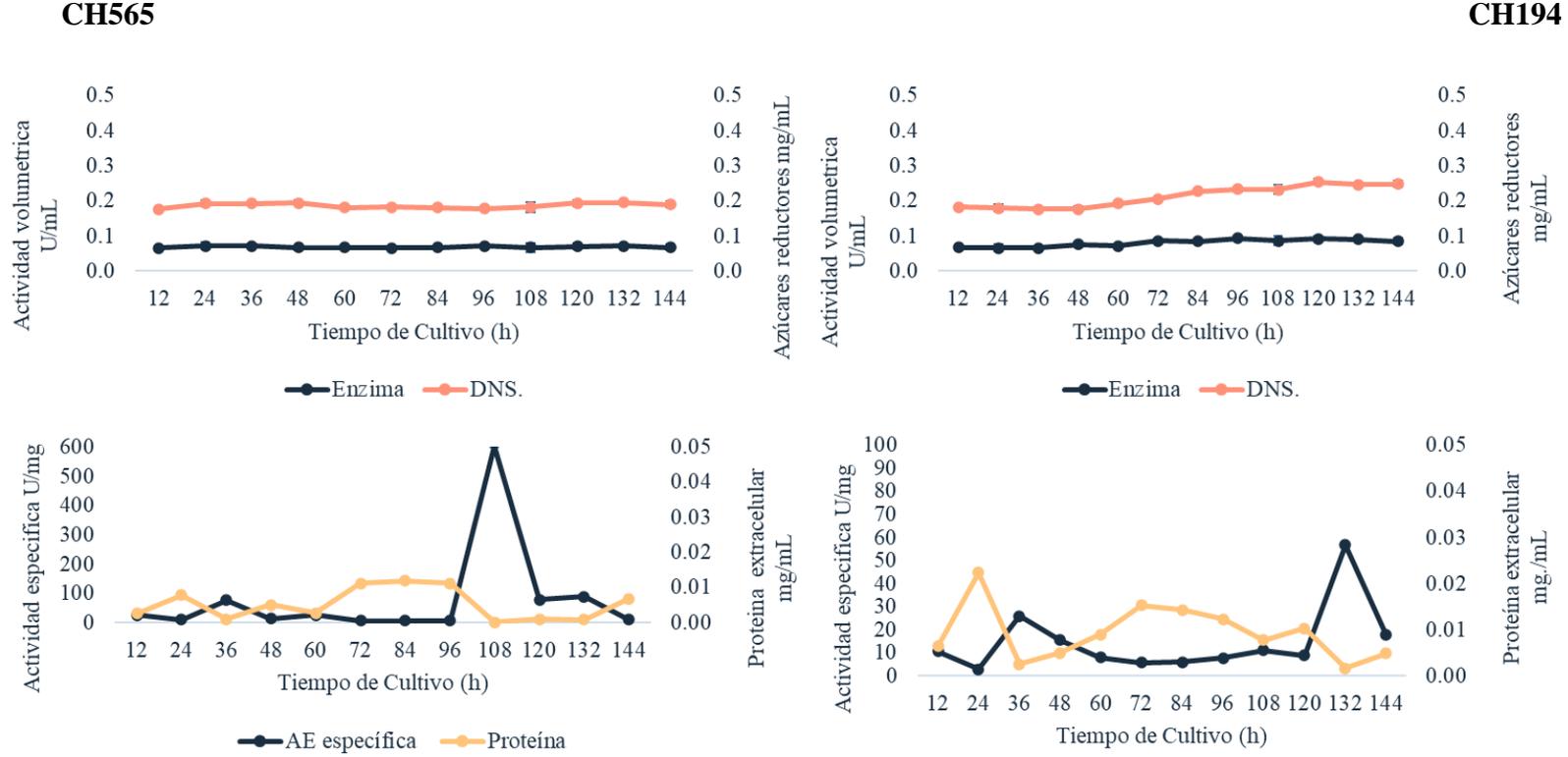


Figura 7-4. Medición de la actividad enzimática utilizando el microorganismo en etapa de esporulación. Todos los valores representan la media \pm error estándar de tres experimentos independientes. Los gráficos superiores muestran las medidas de Actividad Volumétrica, los inferiores son de Actividad Específica. Los gráficos en la izquierda corresponden al microorganismo CH565 y los gráficos de la derecha a CH194.

7.2.2 Efecto de la temperatura en la actividad celulolítica

Como puede observarse en las Figuras 7-5 y 7-6, el halo de hidrólisis presenta diferencias según la temperatura. En el caso de la temperatura de 27 °C o 32 °C no presenta diferencia estadísticamente significativa (p -value= 0.242) a la hora de evaluar la hidrólisis de celulosa en estas condiciones de evaluación, mientras que, la temperatura de 37 °C (p -value= 0.026) favorece la hidrólisis de la celulosa. Por lo tanto, esta temperatura se tuvo en cuenta para las evaluaciones posteriores. Se presenta un seguimiento del experimento y un gráfico con los resultados obtenidos.

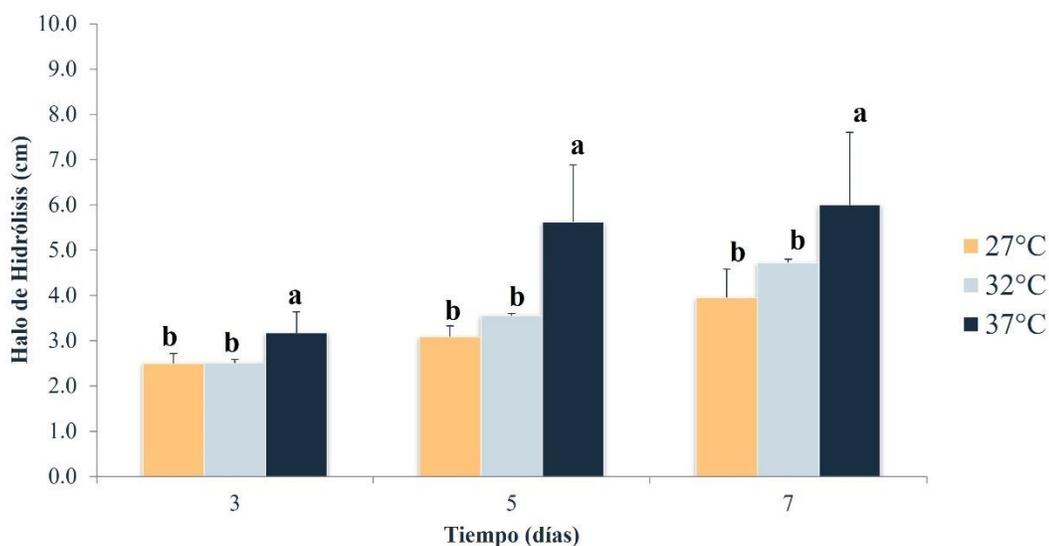


Figura 7-5. Efecto de la temperatura sobre el diámetro de halo de hidrólisis. Resultados obtenidos y análisis estadístico para el microorganismo CH565 durante tres días de evaluación y tres tratamientos. Todos los valores representan la media \pm error estándar de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se determinaron por análisis de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Los valores que no comparten una letra presentan diferencias significativas.

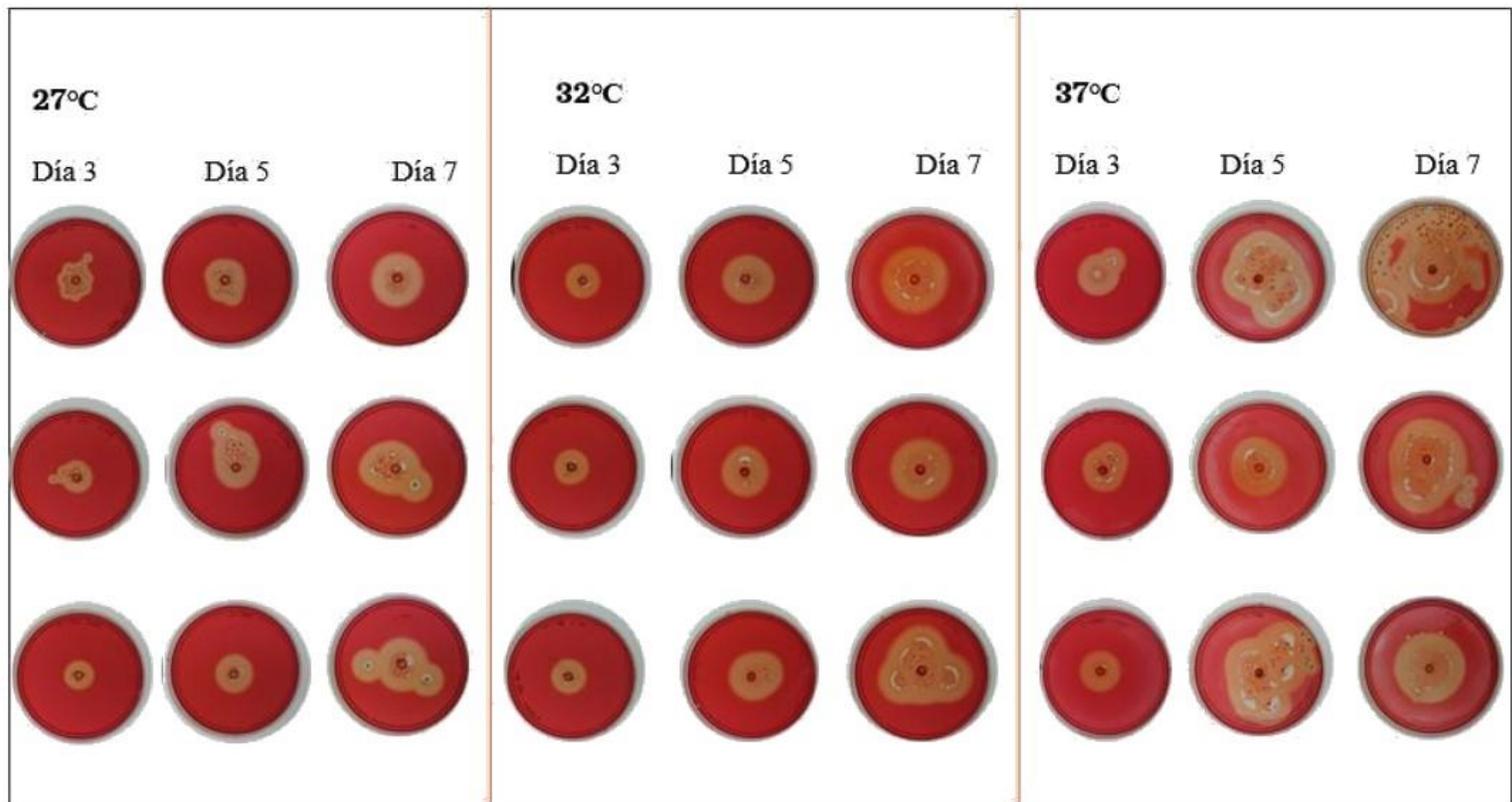


Figura 7-6. Efecto de la temperatura sobre el diámetro de halo de hidrólisis. Seguimiento fotográfico del experimento

7.2.3 Cinética de crecimiento de CH565 en diferentes concentraciones de glucosa.

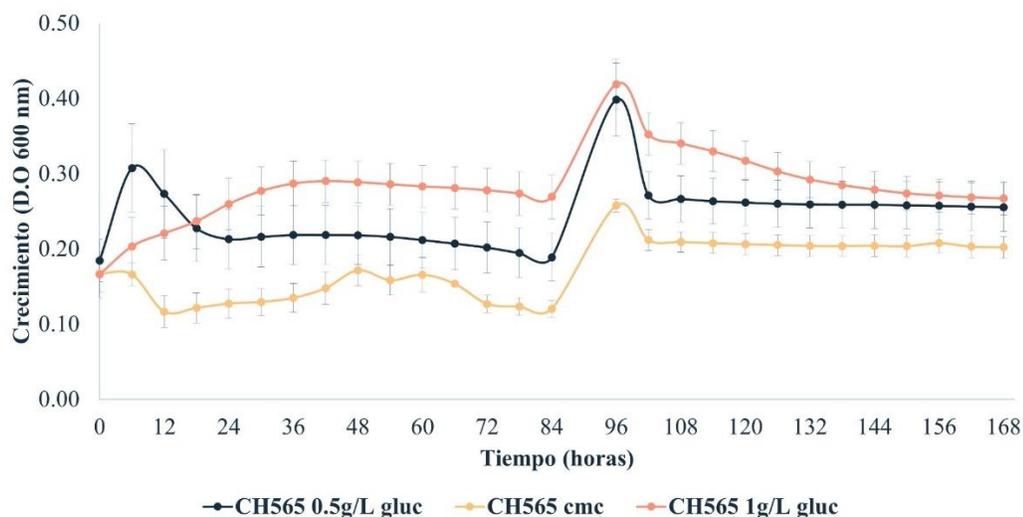


Figura 7-7. Efecto de la adición de glucosa en el crecimiento del microorganismo CH565. Todos los valores representan la media \pm error estándar de tres experimentos independientes.

La Figura 7-7 nos muestra como a lo largo de siete días de cultivo el microorganismo CH565 presenta diferentes comportamientos de acuerdo con el medio de cultivo en el cual se evalué. Con la línea más clara observamos el medio de cultivo CCM1 sin glucosa añadida, en el cual se puede claramente notar un menor desarrollo del microorganismo comparado con los dos medios de cultivo que contienen glucosa añadida, generando un efecto de represión por glucosa ya observado en otros *Streptomyces* sp. La elección de la cantidad de glucosa a ser agregada en el medio de cultivo se basó en los valores de D.O obtenidos, por lo que el medio de cultivo CCM1 con la adición de 1g/L glucosa fue seleccionado.

7.3 ETAPA III: CINÉTICA DE PRODUCCION DE LA ACTIVIDAD CELULOLITICA

7.3.1 Crecimiento microbiano

La fermentación sumergida se llevó a cabo en medio salino que contenía 0.5% de CMC (pH 6.9), además, de 0.1% de glucosa denominado en este estudio como medio CCM2 a 37°C, según resultados previos (ver [Cinética de crecimiento en diferentes concentraciones de glucosa](#)).

De la Figura 7-8 podemos tener una descripción visual de las características estructurales del microorganismo en cada etapa de la fermentación sumergida. En orden de Figura, podemos observar que la biomasa presentó varios eventos de desarrollo, al inicio se ve puede ver un alza del peso seco probablemente debida al consumo inmediato de la glucosa por ser una fuente de carbono menos compleja y que implica menos gasto energético para el microorganismo, por lo tanto, se asume una preferencia por la misma, dato que se puede confirmar en la Figura 7-9. Luego de una breve caída, se estabiliza, seguido de una segunda caída antes de aumentar y finalmente una caída antes de un último aumento, el cual coincide con la esporulación del microorganismo.

7.3.2 Actividad Endoglucanasa (EnG)

Los valores de actividad Endo- β -1,4-glucanasa se reportan a partir del día 4 de cultivo, coincidiendo con el consumo de la glucosa disponible en el medio, estos valores se alcanzaron entre 0.15 U/mL hasta 0.27 U/mL (Figura 7-9). En cuanto a la actividad enzimática específica, se reportaron tres importantes momentos a considerar, con valores que oscilan entre 56 U/mg hasta 149 U/mg (Figura 7-10).

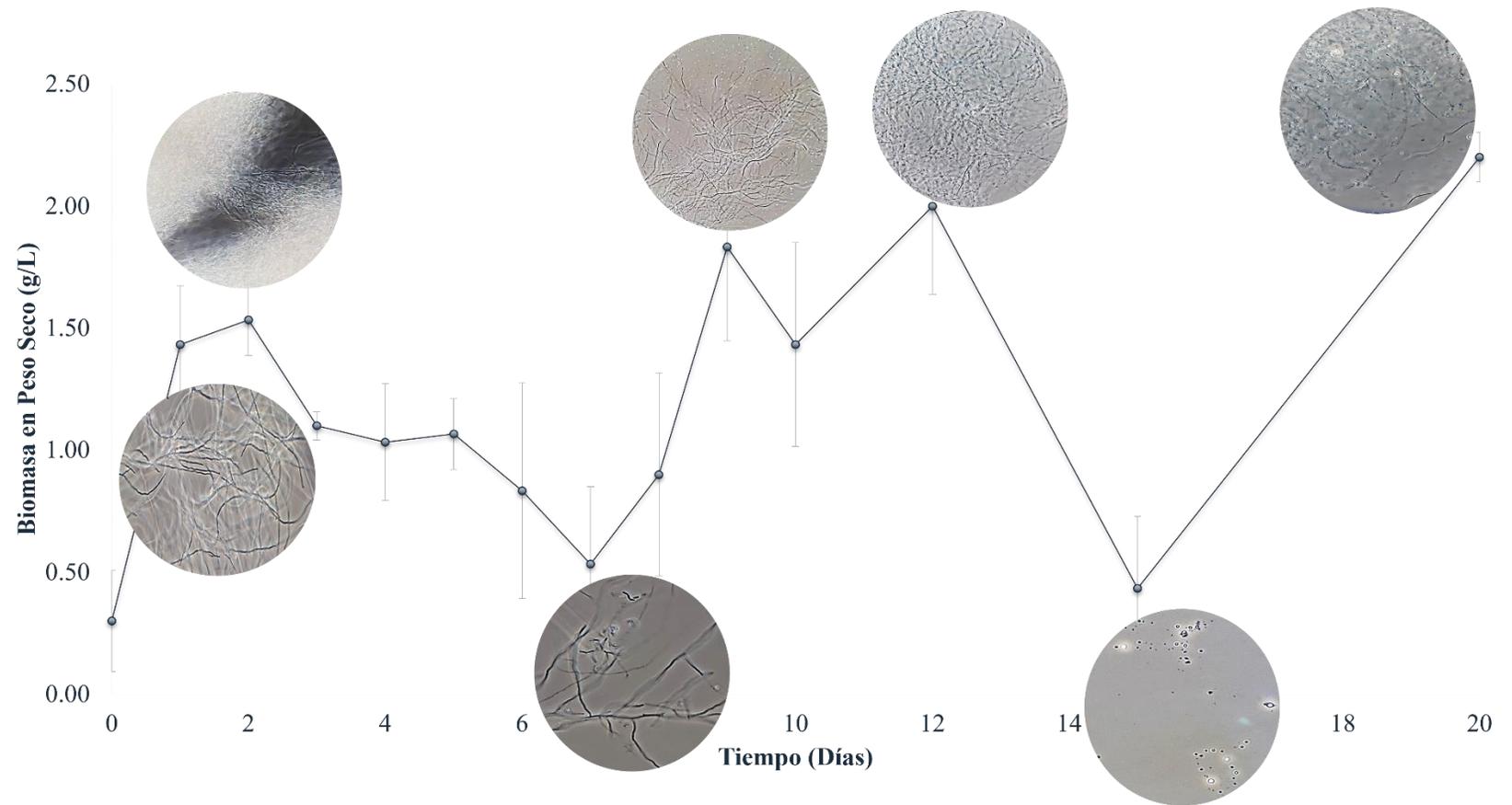


Figura 7-8. Seguimiento del desarrollo microbiano mediante peso seco. CH565 durante 20 días de evaluación. Todos los valores representan la media \pm error estándar de tres experimentos independientes.

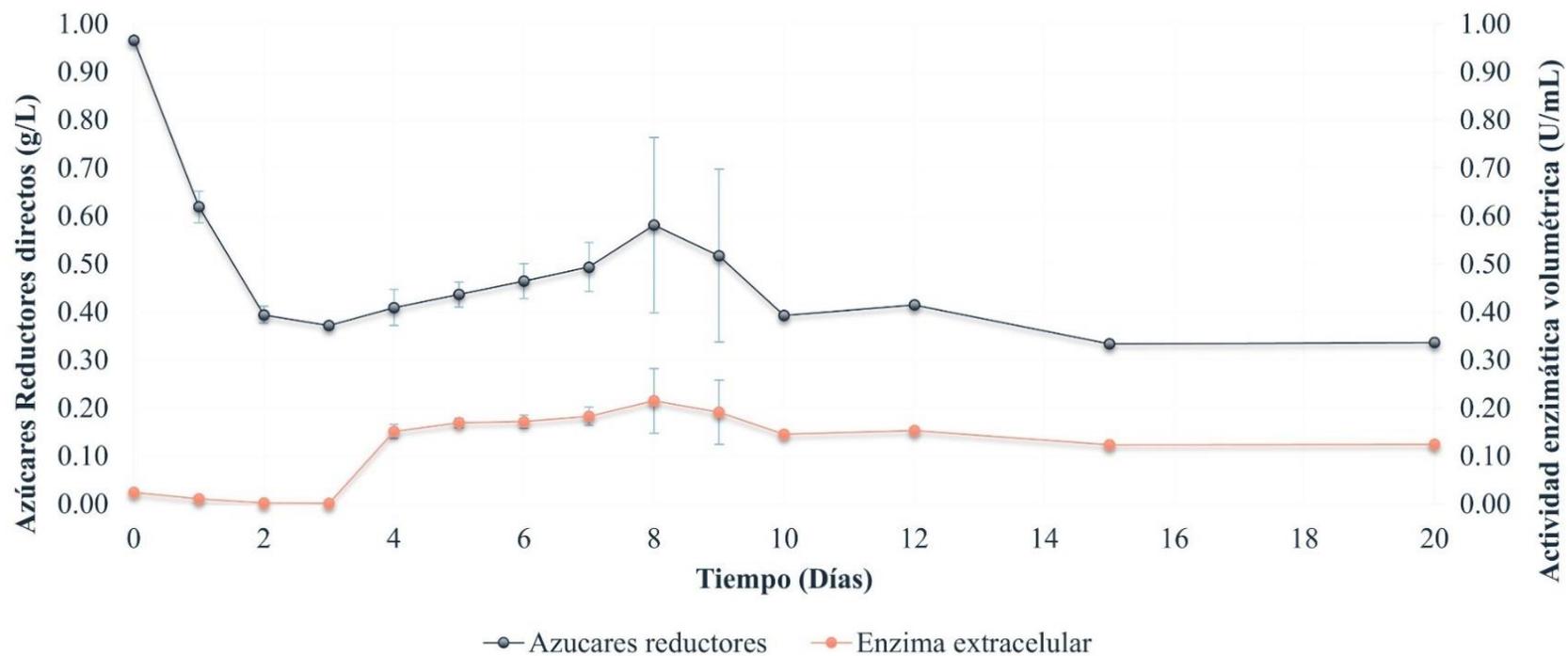


Figura 7-9. Evaluación de la actividad de la preparación enzimática del microorganismo CH565 durante 20 días de evaluación. Resultados obtenidos en términos de actividad enzimática volumétrica y su relación con los azúcares reductores liberados. Todos los valores representan la media \pm error estándar de tres experimentos independientes.

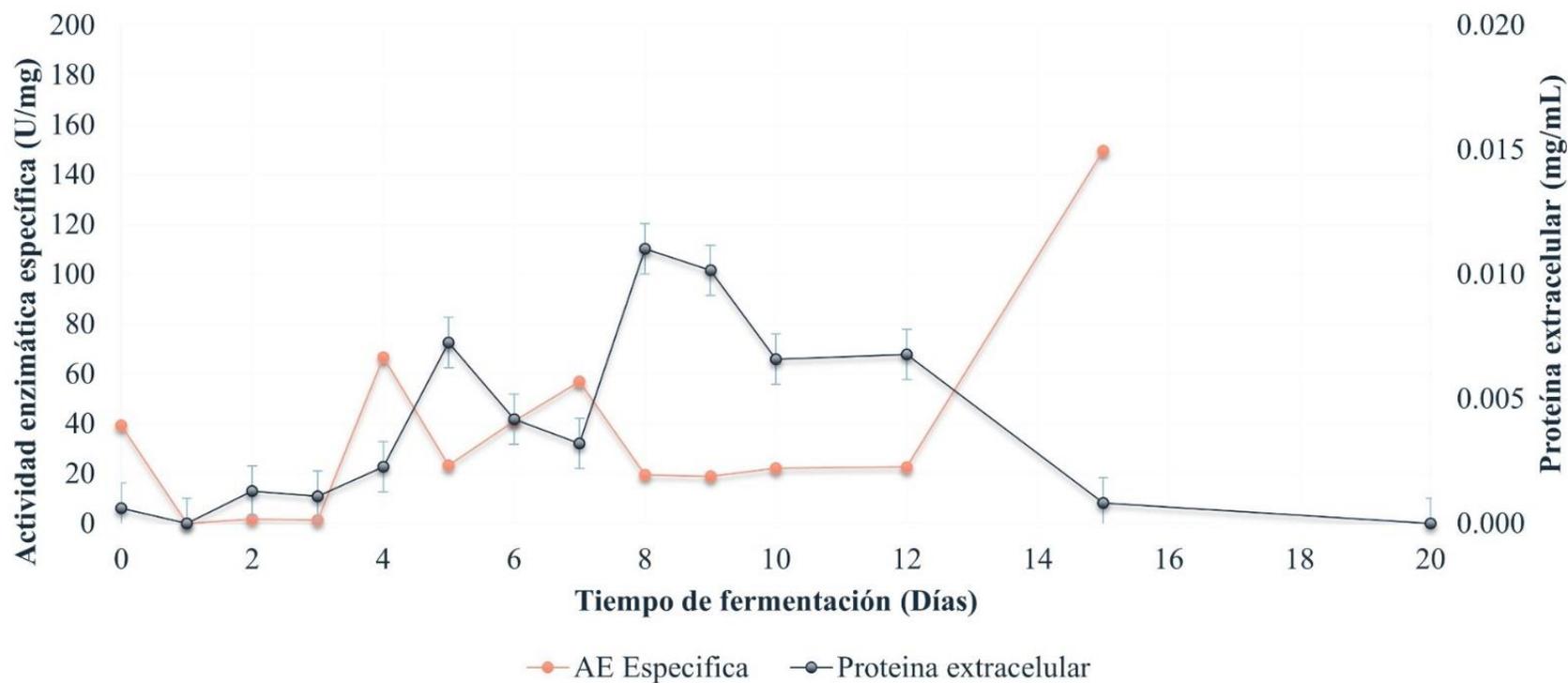


Figura 7-10. Evaluación de la actividad enzimática del microorganismo CH565 durante 20 días de evaluación. Resultados obtenidos en términos de actividad enzimática específica calculada y su relación con la proteína extracelular determinada. Todos los valores representan la media \pm error estándar de tres experimentos independientes.

7.3.3 Hidrólisis de diversos sustratos de celulosa

Este experimento cualitativo, nos permitió observar la hidrólisis de algunas fuentes de celulosa incluidas algodón (Avicel), papel filtro y madera (palillo), los resultados se contrastaron con CMC como control. Los tubos se observaron durante 2 semanas y se puntuaron: 0 = sin crecimiento en 2 semanas; sin degradación, 1 = crecimiento en 1-2 semanas, sin degradación; 2 = crecimiento en 1 semana, sin degradación; 3 = degradación en 2 semanas; 4 = baja degradación en 1 semana y fuerte degradación en 2 semanas; 5 = fuerte degradación en 1 semana. Con los resultados obtenidos se obtuvo los siguientes resultados (Figura 7-11 y Figura 7-12).

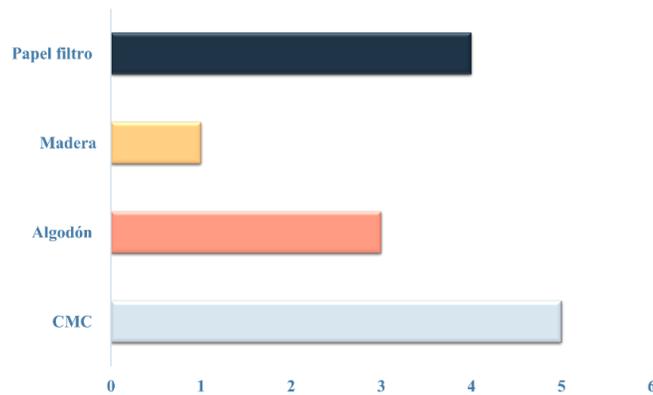


Figura 7-11. Crecimiento de CH565 en diferentes fuentes de celulosa como única fuente de carbono. Se presenta el puntaje cualitativo definido para tipo de sustrato luego de 14 días de evaluación.

Según la puntuación dada, podemos observar que con el sustrato de palillo (madera) con un valor de 1 presentó el crecimiento y degradación visible más lenta, tal como se muestra en la Figura 7-12. También según el seguimiento fotográfico (Figura 7-12) se obtuvo que, dependiendo de la fuente de celulosa, el aislado CH565 presenta mayor o menor degradación según la escala propuesta, en orden de degradación estaría: CMC, papel filtro, avicel (algodón) y finalmente madera (palillo).

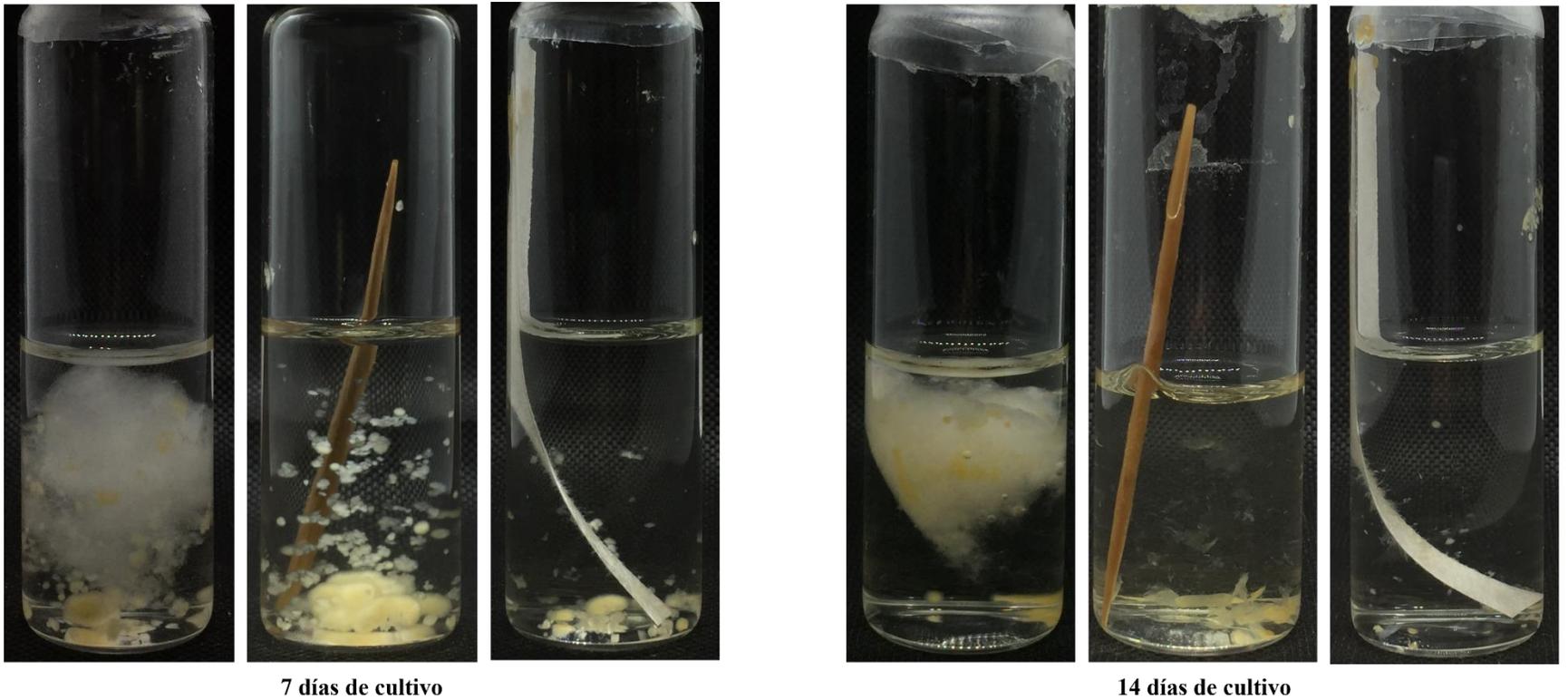


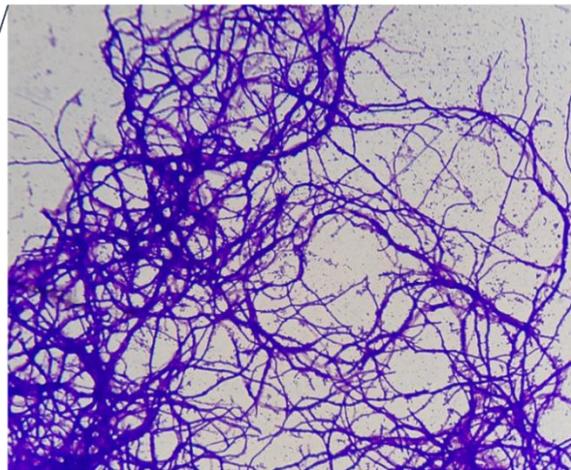
Figura 7-12. Ensayo demostrativo: Hidrólisis de diversas fuentes de celulosa. Comparación de los resultados obtenidos después de 14 días de cultivo para la cepa *Streptomyces* sp._CH565.

7.4 ETAPA IV: CARACTERIZACION DE CEPAS DE ACTINOMICETOS CON ALTA CAPACIDAD CELULOLÍTICA

7.4.1 Caracterización morfológica microscópica



Fresco
Contraste de fases
Micrografía 100X

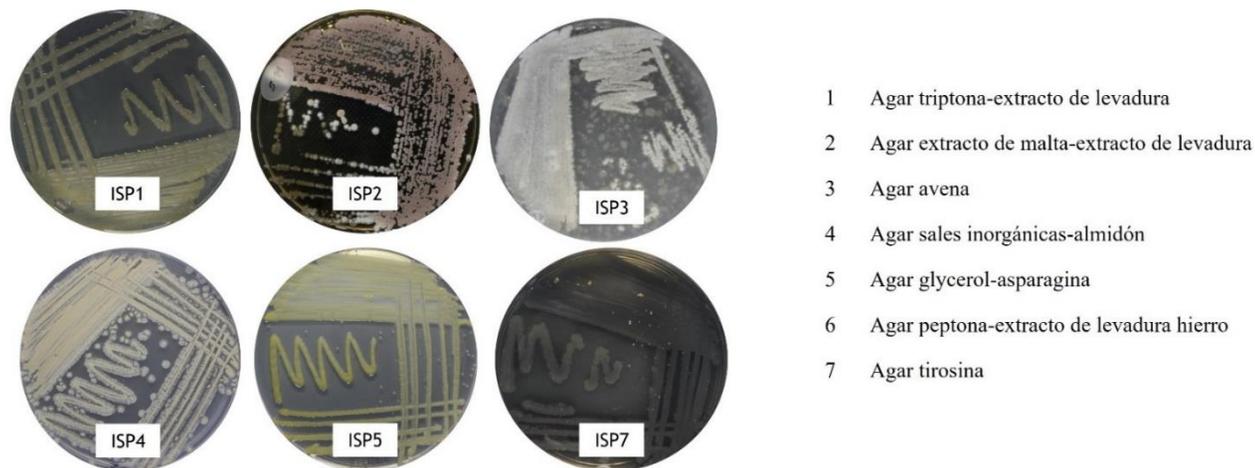


Tinción Gram
Campo claro
Micrografía 100X

Figura 7-13. Fotografía microscópica del aislado CH565. La micrografía se realizó a través de la observación de un fresco y una tinción Gram de una muestra de la bacteria en medio de cultivo CCM2 usando microscopía de contraste de fases a 100X.

En la micrografía (Figura 7-13) se observan hifas vegetativas bien desarrolladas y extensas, características del género *Streptomyces* sp., a su vez observamos una tinción Gram positiva.

7.4.2 Caracterización morfológica macroscópica



Características fisiológicas y uso de nutrientes del aislado seleccionado como potencial celulolítico

Aislado	Desarrollo	Medio de cultivo						
		ISP1	ISP2	IPS3	ISP4	ISP5	ISP6	ISP7
CH565*	crecimiento vegetativo	Amarillo	Amarillo claro	Ivory	Amarillo claro	Amarillo	Ivory	Amarillo
	Micelio aereo	Blanco	Blanco lila	Ivory	Amarillo-anaranjado	Blanco crema	morado	Amarillo

* Pigmento difusible en el medio ISP6 color morado oscuro y en ISP7 color café

Figura 7-14. Resultados de la caracterización fisiológica y uso de nutrientes del aislado CH565 empleando el *International Streptomyces Project* (ISP).

Las características morfológicas y culturales se estudiaron en medio de cultivo sólido. Se caracterizó por la capacidad para utilizar varios monosacáridos, disacáridos y polisacáridos como fuentes de carbono. La cepa de actinomiceto CH565 formaron un micelio aéreo bien desarrollado con buena esporulación en todos los medios probados. El crecimiento, el color del micelio del sustrato, el color del micelio aéreo y el pigmento se resumieron en la Figura 7-14. Dentro de las características morfológicas de CH565 se reveló el desarrollo de pigmento difusible en medio de agar ISP7, considerando un potencial microorganismo para otros usos biotecnológicos.

El medio ISP2, es un medio cuya composición es usualmente empleada para el mantenimiento de las cepas de *Streptomyces* sp. y otros Actinomicetos. A continuación, una descripción general de las observaciones de la cepa CH565 en dicho medio de cultivo. Se puede identificar en el microorganismo a nivel macroscópico tres etapas de desarrollo: la primera corresponde al crecimiento vegetativo sobre el sustrato con biomasa color amarillo, seguido de un inicio de esporulación el cuál se observa en tonalidad blanca y finalmente una etapa de crecimiento aéreo (esporulación) de color blanco lila, lila o violeta claro según la escala de color utilizada.

7.4.3 Identificación molecular

Para la identificación molecular, el ADN genómico fue extraído según la metodología descrita en el apartado [Extracción del ADN genómico](#). La calidad de dicha extracción se muestra en la Figura 7-15B.

Se presenta un ADN genómico íntegro (Figura 7-15A), de buena calidad con relación 260/280 de 1.97 y concentración de ácidos nucleicos de 362.4 ng/uL.

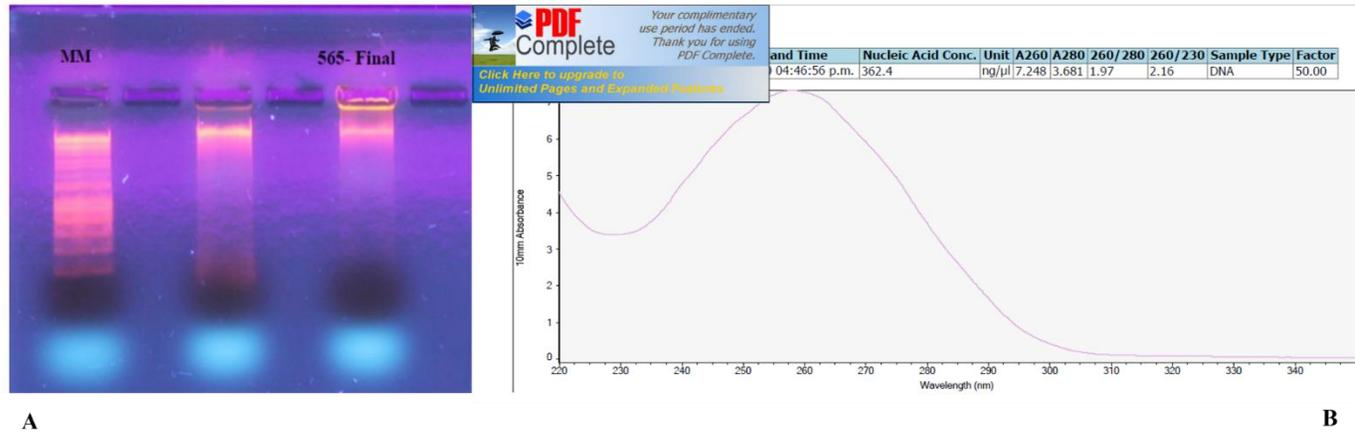


Figura 7-15. Extracción AND genómico de la cepa CH565. a) Gel de electroforesis 1% agarosa. Carril MM Marcador de peso molecular. Carril 565-Final ADN genómico cepa CH565. b) Lectura en espectrofotómetro-Nanodrop. Información de la concentración de ácidos nucleicos y la calidad de la extracción.

La secuenciación de *Illumina* Mi-Seq arrojó como resultado 4.896.807 lecturas crudas para el aislamiento CH565, dichas lecturas pasaron por un proceso de normalización para su posterior análisis bioinformático. Para información adicional de este proceso ver apartado [Ensamble y anotación del genoma](#).

La comparación taxonómica con *MyTaxa*, que se encuentra en la Figura 7-16, nos muestra tres resultados importantes. El primero, este análisis del genoma completo indica que alrededor de la mitad de los genes tiene como origen del género *Streptomyces* sp., sin embargo, no es muy claro cuál podría ser la especie correspondiente. Segundo, se puede observar que no hay contaminación. Tercero, existen regiones inusuales en el genoma indicadas en la parte superior con color rojo, estas regiones pueden ser características propias y/o únicas de la cepa CH565, para ello, sería necesario análisis detallado de las regiones indicadas.

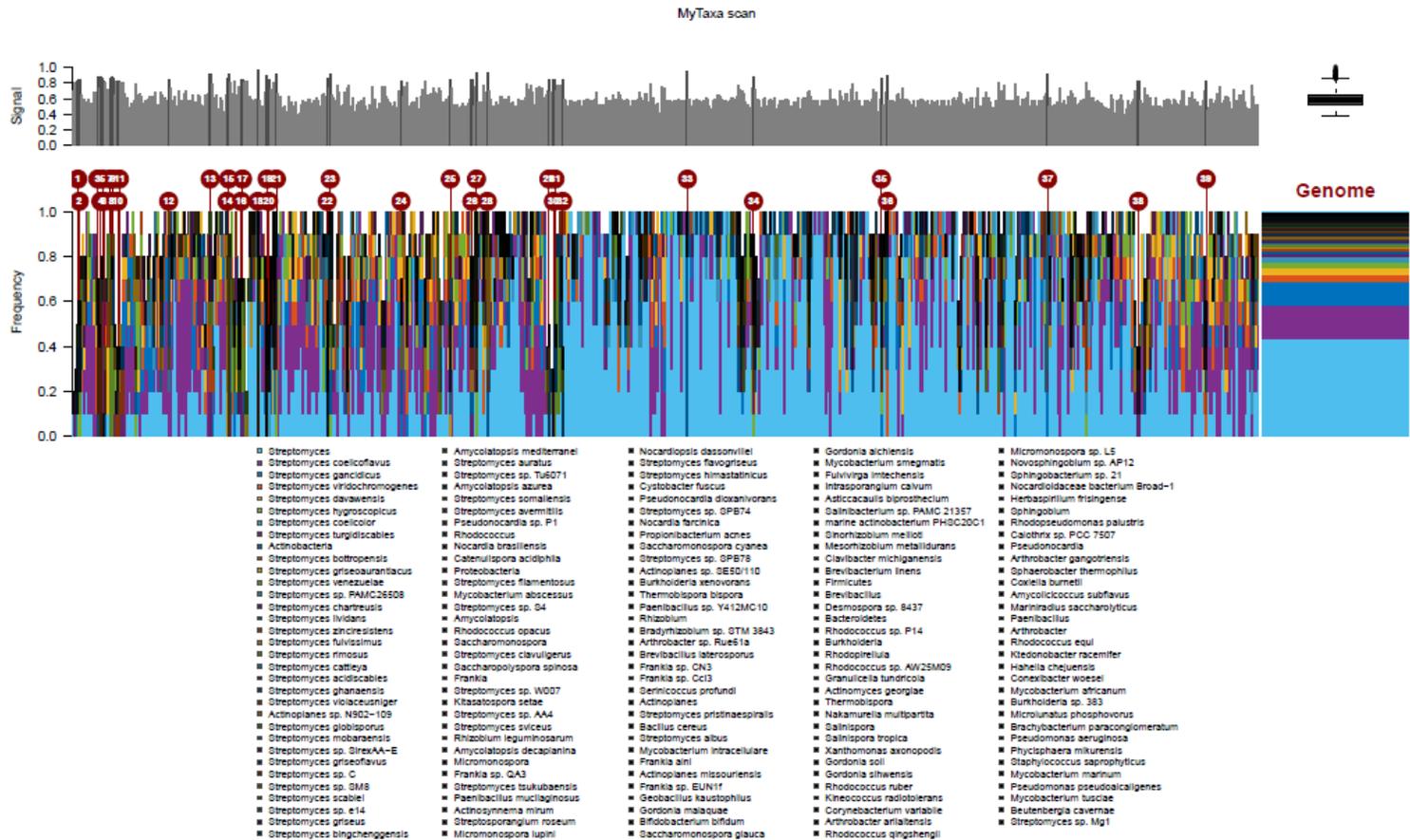


Figura 7-16. Diagrama MyTaxa correspondiente a CH565 – *Streptomyces* sp. Se encuentra la leyenda de colores de las especies más representadas en el diagrama.

Otro análisis posible para la identificación molecular a partir del genoma completo es a través del uso del porcentaje AAI (Average Amino Acid Identity) y ANI (Average Nucleotide Identity), estos valores son obtenidos mediante la comparación de otros genomas incluidos en la base de datos NBCI para procariotas. Mediante la plataforma MiGA (Microbial Genomes Atlas), fue posible determinar estos porcentajes para clasificar al genoma de CH565.

Tabla 7-2. Resultados arrojados para el porcentaje ANI (Average Nucleotide Identity) del genoma de CH565.

ANI table			
Dataset	ANI (%)	Standard deviation (ANI%)	Fraction of genome shared (%)
Streptomyces olivaceus NZ CP043317	99.04	0.0	89.4
Streptomyces olivaceus NZ CP016795	97.98	0.0	84.32
Streptomyces sp. VN1 NZ CP036534	97.9	0.0	85.82

En las Tablas 7-2 y 7-3 podemos observar los resultados arrojados para el análisis de genomas relacionados considerando los porcentajes ANI y AAI. En el caso de la tabla ANI el genoma de CH565 comparte 89.4% de genoma con *Streptomyces olivaceus* NZCP043317 y tiene una fracción de su genoma compartido (89.82%) en términos de porcentaje AAI con la misma cepa. Esto nos indica un acercamiento a la especie de nuestro genoma de interés con *Streptomyces olivaceus*, sin embargo, el porcentaje que se comparte es por debajo del 90% por lo que no es posible garantizar la especie con este análisis.

Tabla 7-3. Resultados arrojados para el porcentaje AAI (Average Amino Acid Identity) del genoma de CH565.

AAI table			
Dataset	AAI (%)	Standard deviation (AAI%)	Fraction of proteins shared (%)
Streptomyces olivaceus NZ CP043317	98.57	5.22	89.82
Streptomyces sp. VN1 NZ CP036534	97.33	6.53	87.05
Streptomyces olivaceus NZ CP016795	97.09	7.49	85.27
Streptomyces coelicolor A3 2 NZ CP042324	86.72	0.0	(estimated)
Streptomyces sp. 2114-2 NZ LT629768	86.07	0.0	(estimated)
Streptomyces sp. KPB2 NZ CP034353	85.91	0.0	(estimated)
Streptomyces parvulus NZ CP015866	85.04	0.0	(estimated)
Streptomyces pactum NZ CP019724	84.15	0.0	(estimated)
Streptomyces sp. SS52 NZ CP039123	83.94	0.0	(estimated)
Streptomyces ambofaciens ATCC 23877 NZ CP012382^T	83.4	0.0	(estimated)
Streptomyces sp. SGAir0924 NZ CP027297	83.29	0.0	(estimated)
Streptomyces sp. NA02536 NZ CP054939	77.95	0.0	(estimated)
Streptomyces tendae NZ CP043959	77.88	0.0	(estimated)

La identificación molecular confirma que corresponde al género *Streptomyces*, y se asocia cercanamente con la especie *S. olivaceus*.

7.5 ETAPA V: ANÁLISIS GENÓMICO

7.5.1 Ensamble y anotación del genoma

La secuenciación de *Illumina* Mi-Seq arrojó como resultado 4.896.807 lecturas crudas para el aislamiento CH565, dichas lecturas pasaron por un proceso de normalización. Las lecturas de secuenciación sin procesar fueron procesadas por TrimGalore (versión 0.6.4) para recortar lecturas de baja calidad, incluidas las lecturas del adaptador PCR de *Illumina* y FastQC (versión 0.11.9) para el control de calidad (Se obtuvieron 205 contigs). Usando la plataforma Unicycler (versión 0.4.8) se realizó el ensamblaje *de novo* de lecturas cortas con resultados de buena calidad. La anotación funcional de los genes predichos se realizó con PATRIC y RAST. Los resultados los veremos en este y los siguientes apartados (ver [Identificación de enzimas activas sobre celulosa](#), [Análisis filogenético](#)).

La información general de la secuenciación del genoma se resume en la Tabla 7-4.

Tabla 7-4. Información de secuenciación del genoma CH565.

Características	Genoma
Tamaño genómico	8.524.640 bp
Contenido de GC	72.28%
CDS	8.078
ARNr	2
ARNt	65
Plataforma de secuenciación	Illumina Mi-seq
Ensamblador	Unicycler
Fuente de anotación	RAST/PATRIC

Una vez anotado el genoma podemos observar mediante la representación circular sus características generales (Figura 7-17).

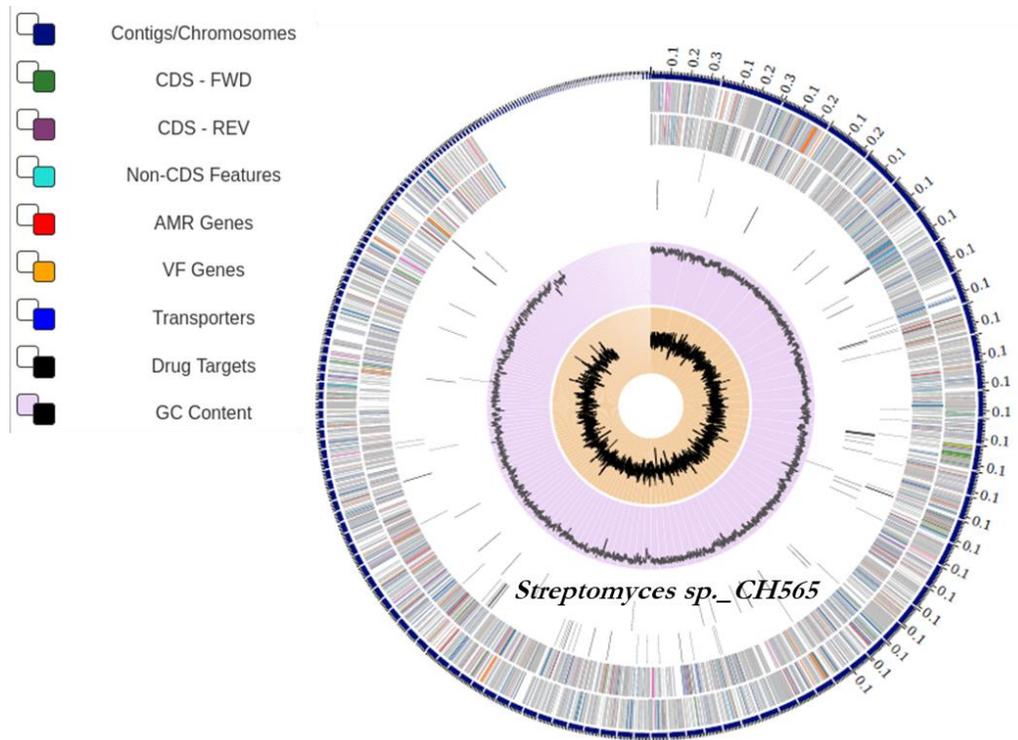


Figura 7-17. Representación circular del genoma de CH565 – *Streptomyces* sp. Azul marino: contigs; verde: CDS cadena forward; morado: CDS cadena reversa; rojo: genes de resistencia antimicrobiana; azul rey: transportadores; negro fondo morado: %GC.

La plataforma RAST permite la asignación de secuencias a subsistemas, constituidos por genes de función relacionada y así también se pueden predecir diversas vías metabólicas. En nuestro caso, solo el 17% de las secuencias fueron asignadas a un subsistema, sin embargo, esta información permitió identificar el subsistema carbohidratos, quien es de relevancia en esta investigación, donde 327 genes fueron relacionados con este subsistema. Este subsistema (Carbohidratos) fue estudiado con más detalle en este estudio (Figura 7-18).

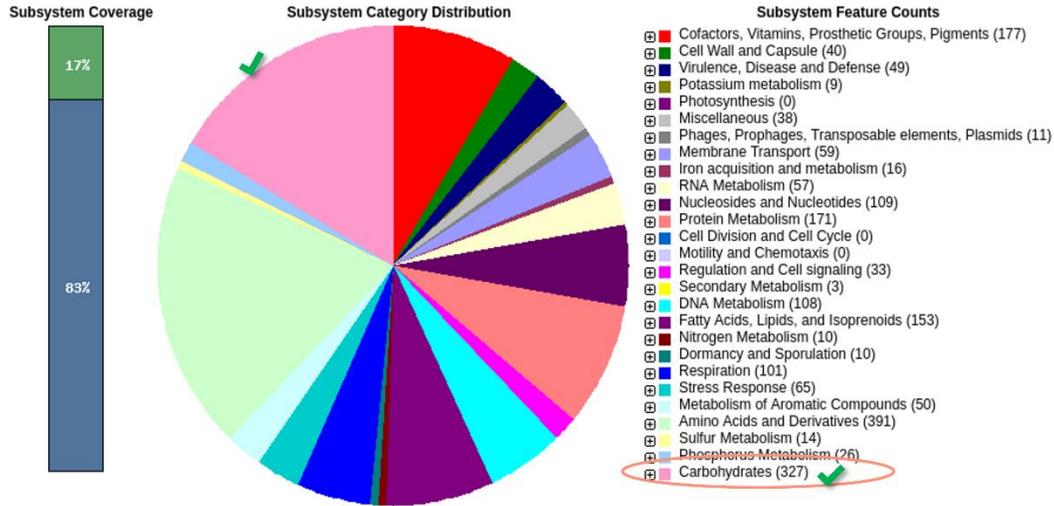


Figura 7-18. Distribución de categorías de subsistemas del genoma de CH565.

Una vez identificado el subsistema, se procedió a relacionarlo con la ruta metabólica correspondiente a la hidrólisis de la lignocelulosa. En la Figura 7-19 se puede observar que, en la ruta metabólica de almidón y glucosa, se encuentran las E.C (Enzyme Commission number) asignadas, se resaltan los resultados en color verde.

Según KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), en la ruta seleccionada se puede observar las interacciones y las vías enzimáticas correspondientes y asociadas a la degradación de celulosa, algunas de ellas con multicopias de E.C. Por su parte la E.C 3.2.1.4 (EnG), reporta una sola vía de celulosa a celobiosa, otras, por ejemplo, la E.C 3.2.1.21 (β -glucosidasa) se observa en varias vías, es decir, a partir de diferentes sustratos y la posterior acción de la enzima, se puede obtener como producto final β -D-glucano.

Se compararon los componentes de la ruta metabólica encontrada en CH565 con la reportada por otros *Streptomyces* modelo, incluidos *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor* y *Streptomyces griseus subsp., griseus*. Los resultados se muestran en la Tabla 7-5.

Tabla 7-5. Comparativa del genoma de *Streptomyces* sp._CH565 con otros *Streptomyces* modelo para la ruta metabólica Almidón y Glucosa y otras rutas metabólicas identificadas.

KEGG map	Distinct ECs	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	<i>Streptomyces griseus subsp. griseus</i> NBRC 13350
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	94	32 (34.0 %)	35 (37.2 %)	37 (39.4 %)	35 (37.2 %)
Ascorbate and aldarate metabolism	44	12 (27.3 %)	13 (29.5 %)	14 (31.8 %)	10 (22.7 %)
Glycolysis / Gluconeogenesis	41	20 (48.8 %)	19 (46.3 %)	22 (53.7 %)	19 (46.3 %)
Pentose and glucuronate interconversions	56	13 (23.2 %)	12 (21.4 %)	13 (23.2 %)	10 (17.9 %)
Retinol metabolism	18	1 (5.6 %)	3 (16.7 %)	2 (11.1 %)	2 (11.1 %)
Starch and sucrose metabolism	71	23 (32.4 %)	18 (25.4 %)	22 (31.0 %)	16 (22.5 %)

En la tabla se puede observar que, para ruta metabólica comparada, existe un número determinado de E.C distintas, de ellas, se le asigna la cantidad anotada de los genomas comparados. Nosotros encontramos que, *Streptomyces* sp._CH565 presenta 1.4% más de E.C para el metabolismo de almidón y glucosa, en comparación con *Streptomyces* modelo.

7.5.2 Identificación de enzimas activas sobre celulosa

Con el objetivo de analizar el potencial biotecnológico de la cepa CH565 seleccionada en esta investigación, y con ello, identificar las proteínas que podrían estar involucradas en la utilización de celulosa, se analizó el genoma completo usando la plataforma dbCAN2 (<https://bcb.unl.edu/dbCAN2/>) que nos permite realizar este tipo de análisis.

Se identificaron todas las proteínas que contienen módulos catalíticos (CD) pertenecientes a enzimas activas sobre carbohidratos (CAZYme) y módulos de unión a carbohidratos (CBM) (Lombard et al., 2014).

La base de datos de referencia CAZY (<http://www.cazy.org/>) describe las familias de módulos catalíticos y de unión a carbohidratos (o dominios funcionales) estructuralmente relacionados de las enzimas que degradan, modifican o crean uniones glicosídicas. Se

especializa en la visualización y el análisis de información genómica, estructural y bioquímica sobre las enzimas activas sobre carbohidratos. La importancia que tiene es que la información sobre posibles nuevas familias se crea con base en la evidencia publicada sobre la actividad de al menos un miembro de la familia y todas se actualizan regularmente, tanto en contenido como en descripción (Lombard et al., 2014).

Con esta información fue posible obtener un CAZyoma teórico, a partir de las CAZy identificadas en el genoma CH565. En la Tabla 7-6 se muestra la información obtenida, específicamente para las Glicosil-Hidrolasas y CBM. Información completa de CAZyoma se encuentra en el [Anexo B](#).

Tabla 7-6. Glicosil-Hidrolasas y CBM predichas en el genoma de *Streptomyces* sp._CH565

Gene ID	Dominio CAZy	Signal P
fig 6666666.875706.peg.1012	GH25(129-311)	No
fig 6666666.875706.peg.1102	GH31(223-661)	No
fig 6666666.875706.peg.1339	CBM13(116-264)	No
fig 6666666.875706.peg.1340	CBM13(327-481)	No
fig 6666666.875706.peg.138	GH3(62-289)	No
fig 6666666.875706.peg.1456	GH3(141-366)	Si
fig 6666666.875706.peg.1518	GH13_30(42-407)	No
fig 6666666.875706.peg.157	CBM32 + GH92	Si
fig 6666666.875706.peg.1668	GH23	Si
fig 6666666.875706.peg.1840	GH23	No
fig 6666666.875706.peg.1920	GH10	No
fig 6666666.875706.peg.1952	GH3	No
fig 6666666.875706.peg.2081	GH13_3	No
fig 6666666.875706.peg.2083	CBM13	No
fig 6666666.875706.peg.2091	GH13_16	No
fig 6666666.875706.peg.2220	GH13_16	No
fig 6666666.875706.peg.2221	GH13_16	No
fig 6666666.875706.peg.2346	GH18	Si
fig 6666666.875706.peg.237	GH18	Si
fig 6666666.875706.peg.251	GH76	Si
fig 6666666.875706.peg.258	GH125	No
fig 6666666.875706.peg.2704	CBM35	Si

fig 6666666.875706.peg.2725	GH19	Si
fig 6666666.875706.peg.2751	GH3	No
fig 6666666.875706.peg.2752	GH5_19	no
fig 6666666.875706.peg.2794	GH38	no
fig 6666666.875706.peg.2796	GH5_18	No
fig 6666666.875706.peg.2807	GH92	Si
fig 6666666.875706.peg.2843	GH87	Si
fig 6666666.875706.peg.2848	GH13_30	No
fig 6666666.875706.peg.3031	GH15	No
fig 6666666.875706.peg.3075	GH43_10	No
fig 6666666.875706.peg.3129	GH2 +GH2	Si
fig 6666666.875706.peg.3187	GH46	Si
fig 6666666.875706.peg.3200	GH154	No
fig 6666666.875706.peg.3249	GH65	No
fig 6666666.875706.peg.3297	CBM2 + GH18	Si
fig 6666666.875706.peg.3355	CBM48 +GH13_9	Si
fig 6666666.875706.peg.3412	GH13_13	Si
fig 6666666.875706.peg.3413	GH13_32	Si
fig 6666666.875706.peg.3414	GH13_30	No
fig 6666666.875706.peg.3567	GH18	Si
fig 6666666.875706.peg.3822	GH26	No
fig 6666666.875706.peg.4155	GH171	Si
fig 6666666.875706.peg.4179	GH2	No
fig 6666666.875706.peg.4193	GH1	No
fig 6666666.875706.peg.443	GH35	Si
fig 6666666.875706.peg.444	GH51	No
fig 6666666.875706.peg.4579	GH12	Si
fig 6666666.875706.peg.4610	GH2	Si
fig 6666666.875706.peg.4611	GH43_34+CBM66	Si
fig 6666666.875706.peg.4738	CBM67+GH78	Si
fig 6666666.875706.peg.4739	GH106	Si
fig 6666666.875706.peg.4740	GH146	Si
fig 6666666.875706.peg.4771	GH93+CBM13	Si
fig 6666666.875706.peg.4862	GH77	No
fig 6666666.875706.peg.4864	CBM35	Si
fig 6666666.875706.peg.4873	GH4	No
fig 6666666.875706.peg.4895	GH3	No
fig 6666666.875706.peg.5120	CBM2+GH18	Si
fig 6666666.875706.peg.5121	GH1	No

fig 6666666.875706.peg.5127	GH1	No
fig 6666666.875706.peg.5177	CBM48+GH13_11	No
fig 6666666.875706.peg.5238	GH64	Si
fig 6666666.875706.peg.5243	GH65	No
fig 6666666.875706.peg.5256	GH109	No
fig 6666666.875706.peg.5427	GH19	Si
fig 6666666.875706.peg.5459	CBM67+GH78	No
fig 6666666.875706.peg.5461	GH28	No
fig 6666666.875706.peg.5462	GH28	No
fig 6666666.875706.peg.5467	GH140	No
fig 6666666.875706.peg.5468	GH33	No
fig 6666666.875706.peg.5479	GH127	No
fig 6666666.875706.peg.5480	GH95	Si
fig 6666666.875706.peg.5481	GH141	Si
fig 6666666.875706.peg.5484	GH28	Si
fig 6666666.875706.peg.5522	GH38	No
fig 6666666.875706.peg.5523	GH2	No
fig 6666666.875706.peg.5545	GH75	Si
fig 6666666.875706.peg.5574	GH87	Si
fig 6666666.875706.peg.5713	GH20	No
fig 6666666.875706.peg.5755	GH20	Si
fig 6666666.875706.peg.5828	GH1	No
fig 6666666.875706.peg.5834	GH3	No
fig 6666666.875706.peg.5835	GH158+CBM32	Si
fig 6666666.875706.peg.5837	GH55	Si
fig 6666666.875706.peg.5860	CBM48+GH13_11	No
fig 6666666.875706.peg.5868	GH25	No
fig 6666666.875706.peg.589	GH1	No
fig 6666666.875706.peg.593	GH31	No
fig 6666666.875706.peg.5955	GH25	Si
fig 6666666.875706.peg.60	GH13_11	No
fig 6666666.875706.peg.6060	GH114	Si
fig 6666666.875706.peg.61	GH13_26	No
fig 6666666.875706.peg.6132	GH42	No
fig 6666666.875706.peg.6206	GH43_26	Si
fig 6666666.875706.peg.6212	GH2	No
fig 6666666.875706.peg.6248	GH43	Si
fig 6666666.875706.peg.6273	GH64	Si
fig 6666666.875706.peg.6276	GH16_3	Si

fig 6666666.875706.peg.6277	GH64	Si
fig 6666666.875706.peg.64	GH13_10	No
fig 6666666.875706.peg.6420	GH92+CBM6	Si
fig 6666666.875706.peg.645	GH3	No
fig 6666666.875706.peg.6475	CBM48+GH13_9	No
fig 6666666.875706.peg.6591	CBM13	No
fig 6666666.875706.peg.6651	CBM2+GH6	Si
fig 6666666.875706.peg.6657	GH33	Si
fig 6666666.875706.peg.6671	GH109	No
fig 6666666.875706.peg.6673	CBM6	Si
fig 6666666.875706.peg.6709	GH16_3+CBM13	Si
fig 6666666.875706.peg.675	GH13_30	No
fig 6666666.875706.peg.6914	GH6	Si
fig 6666666.875706.peg.6966	CBM2	No
fig 6666666.875706.peg.699	GH36	No
fig 6666666.875706.peg.7008	GH109	No
fig 6666666.875706.peg.701	GH109	No
fig 6666666.875706.peg.7016	GH11	Si
fig 6666666.875706.peg.7171	GH15	No
fig 6666666.875706.peg.7239	GH135	No
fig 6666666.875706.peg.7335	GH15	No
fig 6666666.875706.peg.7381	GH20	No
fig 6666666.875706.peg.7386	GH109	Si
fig 6666666.875706.peg.7410	GH10+CBM13	Si
fig 6666666.875706.peg.7420	GH114	Si
fig 6666666.875706.peg.7425	GH4	No
fig 6666666.875706.peg.7536	GH97	Si
fig 6666666.875706.peg.7613	GH114	Si
fig 6666666.875706.peg.7677	CBM35	No
fig 6666666.875706.peg.7767	GH109	No
fig 6666666.875706.peg.7940	CBM16+GH18	Si
fig 6666666.875706.peg.8028	GH4	No
fig 6666666.875706.peg.8029	GH16_3+CBM6	Si

El CAZyme de CH565 consistió en uno o más dominios de la familia CAZy e incluyen Glicosil- Hidrolasas (GH), Glicosil-Transferasas (GT), Carbohidrato-Esterasas (CE) y algunas enzimas redox que tienen actividades auxiliares (AA) que funcionan

simultáneamente con CAZymes, además de módulos de unión a carbohidratos (CBM). Mediante el algoritmo HMMER (*hidden Markov model*), 133 Glicosil Hidrolasas (GH), entre ellas algunas CBM fueron determinadas en el CAZyoma de CH565, tal como se observa en la Tabla 7-6. Si la información obtenida de las GH es analizada respecto a las celulasas, específicamente la EnG, correspondiente a la E.C 3.2.1.4, podemos resumir los resultados obtenidos en las siguientes GH: GH10, GH5, GH26, GH51, GH12, CBM2+GH6, CBM6 y GH6.

Además, se puede analizar la posible localización de las CAZymas, ya sea intracelular o extracelular a través de la información arrojada por el algoritmo SignalP, que determina la presencia de secuencia codificante para péptido señal y con ello, identificar aquellas proteínas que serían secretadas al medio extracelular por el mecanismo de péptido señal (mecanismo clásico). En este sentido, se reducen las GH del CAZyoma de CH565 a GH6, GH12 y CBM2+GH6.

En total 133 GH y CBM unidas a ellas, más 5 AA10 ([Anexo B](#)) fueron anotadas para *Streptomyces* sp._CH565, del total determinado (244 dominios Cazy), lo que representa un 56% de todo su Cazyoma dedicado exclusivamente a la hidrólisis de carbohidratos.

7.5.3 *Análisis filogenético*

Para el análisis filogenético, se extrajo la información correspondiente a la secuencia completa de la subunidad ribosomal 16s y se construyó un árbol filogenético (Figura 7-20) para *Streptomyces* CH565. Se realizó un dendograma por el método Neighbor-joining (NJ). Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA 11. El análisis sugiere que la cepa CH565 está asociada a otras cepas de su mismo lugar de origen, en este caso, las pozas de Cuatro Ciénegas que se trabajaron en este estudio. Además, en este árbol la especie relacionada para *Streptomyces* sp._CH565 que fue *S. olivaceus*, no compartió clado con nuestra cepa de estudio.

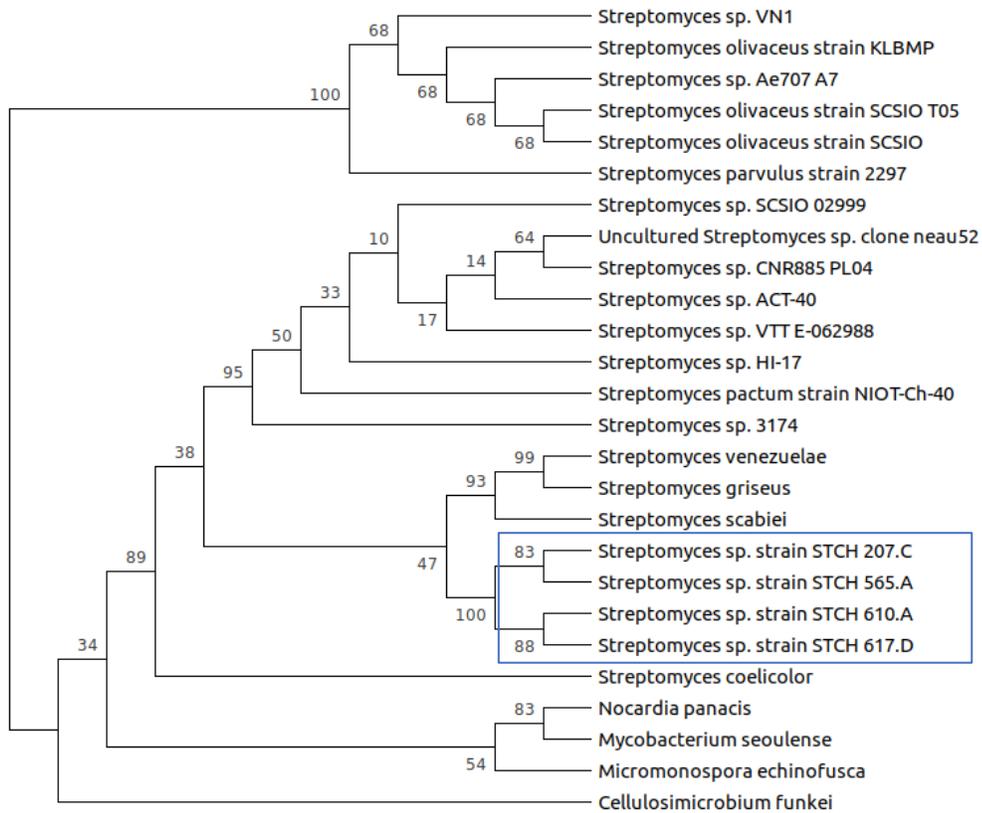


Figura 7-20. Reconstrucción filogenética de *Streptomyces* sp._CH565. La historia evolutiva se dedujo utilizando el método *Neighbor-Joining* [1]. Se muestra el árbol óptimo. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en “*bootstrap test*” (1000 réplicas) se muestran junto a las ramas [2]. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método *Tamura* de 3 parámetros [3] y se encuentran en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. Se eliminaron todas las posiciones ambiguas para cada par de secuencia (opción de eliminación por pares). Hubo un total de 1414 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA11 [4].

8 DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis, partimos de la hipótesis que las Actinobacterias de Cuatro Ciénegas, Coahuila representan una fuente importante de biodiversidad para la búsqueda de enzimas celulolíticas de interés biotecnológico. Al inicio de esta investigación no se contaban con publicaciones de este tipo para las Actinobacterias del Valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila. Estas enzimas podrían generar perspectivas con miras a reemplazar o completar a las enzimas fúngicas comercializadas a la fecha.

Para ello nos planteamos estudiar el sistema de enzimas responsable de la degradación del polisacárido tipo comercial Carboximetilcelulosa y enfocarnos en el ataque hidrolítico principal para la hidrólisis de este, es decir, la Endoglucanasa; mediante estrategias clásicas, como es el caso del tamizaje usando el método rojo Congo para la identificación del diámetro de hidrólisis, así como, métodos de análisis de la producción de la actividad enzimática volumétrica y específica (calculada) y estrategias vanguardistas, mediante minería genómica usando la secuencia del genoma completo de la cepa seleccionada. El conjunto de estas estrategias nos permitió la selección de una cepa con potencial biotecnológico para la producción de Endoglucanasa aplicable a procesos industriales, sin embargo, los resultados obtenidos requieren investigaciones posteriores para concretar el uso de dicha enzima a nivel comercial.

Al enfocarnos en el lugar de origen de los aislamientos evaluados, podemos decir que, Cuatro Ciénegas, Coahuila, abre un camino sin precedentes para la bioprospección de Actinobacterias con capacidades enzimáticas posiblemente extraordinarias (evidencias comparativas en cuanto a las propiedades enzimáticas y las aplicaciones específicas corroborarían esta aseveración) que (Arocha Garza, 2018) ya había explorado en términos de biodiversidad. La Cuenca de Cuatro Ciénegas (CCB) como ya hemos descrito en este documento, es un oasis extremadamente oligotrófico (particularmente limitado en fósforo) y considerado un “*hotspot*” de biodiversidad, además, en peligro de extinción en el desierto de Chihuahua (Souza et al., 2012). Dentro del Valle, el Sistema Churince es

uno de los sistemas hidrológico más inusuales, debido a su mayor altitud dentro de la valle (alrededor de 30 m sobre la mayor parte del CCB), su dependencia de aguas antiguas en su mayoría profundas con influencia magmática (Wolaver et al., 2013), una matriz de suelo de calcio y extrema oligotrofia en términos de limitación de fósforo (Elser et al., 2005a). Las características de este peculiar ambiente crean una extensa biodiversidad de microorganismos, los cuales se ven obligados a utilizar diferentes estrategias bioquímicas para sobrevivir en condiciones de escasez y ha impuesto a la evolución de los microorganismos que aquí alberga, un factor conductor y que ha “aislado” del resto del mundo. Mas recientemente, un estudio realizado a una cepa celulolítica de Cuatro Ciénegas, muestra que la cepa CC48 *Streptomyces* sp. es capaz de hidrolizar sustratos de maíz y trigo, lo que sugiere el potencial de esta bacteria para hidrolizar desechos agrícolas. Además, la cuenca de Cuatro Ciénegas puede representar una fuente de microorganismos celulolíticas eficientes (Celaya-Herrera et al., 2021).

8.1 Análisis de la degradación de celulosa

Las pozas de agua de CCB se han utilizado inmensamente para el estudio de especies ecológicas y de biodiversidad, sin embargo, recientemente se ha estudiado el aislamiento de nuevas enzimas de importancia industrial de origen microbiano. Principalmente, el sistema hidrológico de Churince es el sitio más inusual dentro del CCB (Minckley & Cole, 1968), pero la recarga en el acuífero es ineficiente y se secó. Las principales cepas de este estudio (CH194 y CH565) fueron aisladas de este sitio.

(Arocha-Garza et al., 2017) demostraron la alta abundancia y diversidad de cepas de actinomicetos especialmente *Streptomyces* sp. (54% del total aislado) de la CCB, un lugar extremadamente oligotrófico (Souza et al., 2012), categorizado como un oasis en peligro de extinción dentro del desierto de Chihuahua, México. Estas proporciones estequiométricas inusuales y extremas en CCB generan tensiones nutricionales que dictan dinámicas de población quizás más parecidas a las de épocas anteriores en la historia de la Tierra en lugar de ambientes existentes más convencionales. Además, la oligotrofia

extrema probablemente ha contribuido a un endemismo biológico en el CCB similar al de las Galápagos (Stein et al., 2000). Encontramos que la colección biológica conservada en el IB-UANL es, además, un importante reservorio de Actinobacterias con potenciales fines biotecnológicos para la bioconversión de celulosa, donde más del 70% de las cepas totales evaluadas, producen enzimas hidrolíticas extracelulares utilizando CMC como única fuente de carbono, según se ha mostrado en este trabajo.

En general, los actinomicetos han sido ampliamente reconocidos como una fuente de enzimas degradantes de β -glucanos. Entre el amplio género, los *Streptomyces* son el grupo más prevalente de productores de enzimas. Algunos de ellos incluyen *Streptomyces* sp. 9X166 (Sakdapetsiri et al., 2016), *Streptomyces* sp. S27 (Shi et al., 2010), *Streptomyces matensis* ATCC 23935 (Woo et al., 2014), *Streptomyces rochei* (WU et al., 2002) y más recientemente este estudio encontró *Streptomyces* sp._CH565 productora de Endo- β -1,4 glucanasa tanto en evaluación *in vitro* como su producción en fermentación sumergida.

La degradación de la celulosa en el medio agar CCM1 se calculó en términos de índice enzimático. Es una metodología modesta y rápida para seleccionar prospectos productores de enzimas dentro del mismo género (Teather & Wood, 1982). En este estudio, 12 cepas que mostraron valores elevados de IE (≥ 3.0) y se consideraron como potenciales productores de la enzima de interés, por lo que se seleccionaron para ensayos enzimáticos cuantitativos. Al respecto, (Bhatariwala et al., 2017), informaron el perfil de actividad enzimática de 20 cepas de actinomicetos como celulasa, lipasa, quitinasa, β -mananasa, amilasa, caseinasa, cafeinasa y xilanasas mediante la determinación del índice enzimático. Los valores de IE más altos se observaron en TBG-NR3 (7.27 ± 0.225) y TBG-CH22 (8.53 ± 0.058) respectivamente para los ensayos en placa de Exo- β -1,4-glucanasa y Endo- β -1,3-glucanasa. De manera similar, otros investigadores también han informado ampliamente sobre la producción de enzima celulasa por Actinobacterias marinas; (Stalin et al., 2012) informó que 30 aislamientos (obtenidos de la zona costera de Tiruchendhur de Tamil Nadu, India) fueron evaluados para la actividad de celulasa y *S. clavuligerus* solo produjo la cantidad máxima de celulasa. (Veiga et al., 1983) aislaron 36 cepas de *Streptomyces* de 10 m de profundidad en la bahía de La Coruña, España, entre ellos, el

50% de los aislamientos realizaron actividad celulolítica; recientemente, (Ibrahim et al., 2021) evaluaron 34 aislados de bacterias obtenidas del área de Wadi El Natrun, Gobernación de Beheira, Egipto y determinaron su índice celulolítico, de ellos solo un aislado fue seleccionado para continuar los análisis por presentar el IE superior a los demás.

La comparación de nuestros resultados (78% del banco evaluado con actividad celulolítica) que hemos discutido previamente, con otros estudios de bioprospección de Actinobacterias celulolíticas ([Anexo C](#)), nos lleva a pensar que la colección biológica evaluada en el presente trabajo presenta un alto potencial para la hidrólisis de celulosa y puede servir como una guía para investigaciones futuras al respecto.

8.2 Análisis de la cinética de la producción de la actividad celulolítica de *Streptomyces* sp._CH565

En este estudio, la medición de la actividad de celulasa se llevó a cabo partir de las muestras obtenidas de la fermentación sumergida. Dicha fermentación ocurrió en medio mínimo de sales que contenía CMC al 0.5% (pH 6.9) a 150 rpm en una incubadora con agitador durante 20 días. Se encontró que la actividad Endo- β -1,4-glucanasa del extracto crudo fue de máximo 0.27 U/mL, valor similar al que presentan algunos trabajos al respecto (P. Gupta et al., 2012; Khatiwada et al., 2016; Sujatha & Hemalatha, 2020).

En este trabajo no realizamos una optimización del proceso, por lo que no es aventurado especular que la actividad volumétrica y específica podrán incrementar encontrando las condiciones óptimas de producción de la enzima.

La Tabla 8-1 contiene una serie de resultados reportados en la literatura, que han sido enfocados en la evaluación de la actividad celulolítica del género *Streptomyces* sp. y cuyo sustrato de celulosa corresponde a CMC, de manera tal que podemos comparar nuestros resultados obtenidos para *Streptomyces* sp._CH565.

La actividad enzimática volumétrica reportada nos muestra que la cepa seleccionada *Streptomyces* sp._CH565 presenta valores superiores a la cepa *Streptomyces* CC48 (0.11 U/mL) aislada también de Cuatro Ciénegas cuando su optimización no se ha llevado a cabo, pero valores inferiores cuando la misma cepa se evalúa nuevamente bajo las condiciones de optimización (0.76 U/mL), esto solo en términos de la investigación de (Celaya-Herrera et al., 2021), lo que nos llevaría a pensar que un proceso optimizado de nuestra investigación podría arrojar actividades volumétricas superiores.

Comparando nuestros resultados con los obtenidos en otras investigaciones, la cepa CH565 presenta valores actividad volumétrica similares o inferiores a otros reportes de procesos no optimizados (Budihal et al., 2016; Grigorevski de Lima et al., 2005) respecto a investigaciones de procesos optimizados, podemos observar en general una actividad volumétrica inferior para *Streptomyces* sp._CH565 (Sureshkumar & Prathaban, 2015), excepto al compararnos con *S. albidoflavus* SAMRC-UFH5 cuyo valor de actividad volumétrica es 0.26 U/mL en un proceso optimizado.

Tabla 8-1. Comparación de la producción de enzimas celulolíticas por *Streptomyces* sp. utilizando CMC como sustrato. S/D: Sin Datos

Proceso optimizado	Cepa de estudio	Condiciones de evaluación	Actividad enzimática	Actividad específica	Concentración de CMC	Referencias
No	<i>Streptomyces</i> sp._CH565	pH 7.0 a 37 °C y 20 days	0.27 U/mL	149.6 U/mg	0.5% CMC	Este estudio
No	<i>Streptomyces</i> sp. BRCI	pH 7.0 a 26 °C y 4 days	12 U/mL	S/D	1% CMC	(Chellapandi & Jani, 2008)
Si	<i>Streptomyces</i> sp. J2	pH 7.0 a 60 °C y 3 days	0.432 U/mL	S/D	0.5% CMC	(Jaradat et al., 2008)
Si	<i>S. albidoflavus</i> SAMRC-UFH5	pH 6.0 a 40 °C y 3 days	0.26 U/mL	0.205 U/mg	1% CMC	(Fatokun et al., 2016)
Si	<i>Streptomyces</i> T3-1	pH 6.5 a 50 °C y 5 days	40.3 U/mL	S/D	1% CMC	(Jang & Chang, 2005)
No	<i>Streptomyces drozdowiczii</i>	pH 7.0 a 50 °C y 3 days	0.595 U/mL	S/D	1% CMC	(Grigorevski de Lima et al., 2005)
No	<i>Streptomyces corchorusii</i> MN244066	pH 7.2 a 37 °C y 2 days	S/D	4.38 U/mg	0.2% CMC	(Sujatha & Hemalatha, 2020)
No	<i>Streptomyces</i> DSK59	pH 6.5 a 45 °C y 4 days	27 U/mL	S/D	0.5% CMC	(Budihal et al., 2016)
Si	<i>Streptomyces lividians</i>	pH 7.0 a 28 °C y 3 days	22.37 U/mL	S/D	0.5% CMC	(Sureshkumar & Prathaban, 2015)
Si	<i>Streptomyces</i> CC48	pH 7.0 a 60 °C y 10 days	0.76 U/mL	S/D	1% CMC	(Celaya-Herrera et al., 2021)
No	<i>Streptomyces</i> CC48	28 °C y 5 days	0.11 U/mL	S/D	1% CMC	(Celaya-Herrera et al., 2021)

En este trabajo se reporta una actividad enzimática específica de 149 U/mg para el extracto crudo de un proceso no optimizado luego de 15 días de cultivo sumergido no alimentado, sin embargo, otros días son a su vez relevantes en términos de actividad enzimática específica, luego de cuatro días de cultivo se encontró una actividad enzimática específica de 66.7 U/mg y luego de siete días una actividad enzimática específica de 56.8 U/mg. Estudios detallados de la caracterización de la enzima, podrían dar una aproximación a una aparente afinidad por el sustrato.

En la revisión bibliográfica llevada a cabo, son pocos los estudios los que reportan la actividad enzimática específica por lo menos calculada a partir de los datos obtenidos en las determinaciones de la producción de la actividad enzimática, pero existen algunos disponibles. Por ejemplo: podemos decir que *Streptomyces* sp._CH565 presenta una alta actividad enzimática específica en comparación con otros estudios (Tabla 8-1), Fatokun et al., (2016) reportan 0.205 U/mg, por su parte Sujatha & Hemalatha, (2020) reportan 4.38 U/mg.

La actividad enzimática específica es relevante en términos biotecnológicos (Budihal et al., 2016), porque si bien, existen diferentes celulasas comerciales obtenidas a partir de cepas fúngicas, su actividad enzimática se limita a la actividad volumétrica, pero no a su especificidad sobre el sustrato, lo que implica un aumento en los costos de producción por ser requeridas grandes cantidades de estas celulasas para lograr una hidrólisis completa de las matrices poliméricas susceptibles al ataque enzimático (Kim, 2018; Manzanares, 2010; Quinlan et al., 2010; Teeravivattanakit et al., 2016).

Otro aspecto por analizar es que, si bien se alcanzó valores superiores a otros reportes de esta actividad enzimática bajo las características evaluadas, el tiempo de fermentación podría considerarse un obstáculo para procesos de escalamiento, debido a la baja velocidad de bioconversión que puede llevar a la coproducción de compuestos inhibidores, sumado al tamaño de la infraestructura (Manzanares, 2010). Una alternativa de solución para considerar como perspectiva de investigación sería aislamiento y expresión heteróloga de los genes que se identificaron responsables de la actividad

enzimática. Investigaciones al respecto presentan resultados promisorios (Daniels et al., 2018; Sahoo et al., 2020).

8.3 Minería genómica

En general, la degradación de los polisacáridos en monómeros de azúcar requiere la acción sinérgica de varias clases de enzimas activas sobre carbohidratos (CAZymes). Entre las CAZymes, las glucósido hidrolasas (GH) son la principal familia de enzimas implicadas en la degradación de polisacáridos como el almidón y la celulosa (Sidar et al., 2020). En la base de datos CAZy (<http://www.cazy.org/Home.html>) las Endoglucanasas se clasifican en 15 familias diferentes, GH5, GH6, GH7, GH8, GH9, GH10, GH12, GH26, GH44, GH45, GH48, GH51, GH74, GH124 y GH148. Las Exoglucanasas se dividen en 5 familias de GH, GH5, GH6, GH7, GH9 y GH48. En este sentido, el análisis genómico, en términos del CAZYoma, demostró que esta cepa *Streptomyces sp._CH565*, así como otras de su género, codifican los genes necesarios para la hidrólisis de la celulosa. Los genes encontrados en la base de datos CAZy coinciden con una importante familia de enzimas para degradar la celulosa (Endoglucanasa, GH12) y también otras importantes familias glicosil-hidrolasas fueron anotadas en el genoma de *Streptomyces sp._CH565*, GH5-GH6 (Celobiohidrolasas) y GH1-GH3 (β -glucosidasas), conformando un complejo celulolítico.

Uno de los dominios más abundantes encontrados fue la familia GH1 y GH3 que al sumo se encuentra en 10 copias de genes. Esta abundancia es superior a la reportada por (Malik et al., 2020), que recientemente realizó un análisis del Cazyoma de *Streptomyces yeochonensis* CN732. Estas enzimas las β -glucosidasas (BG) son de gran interés no solo por sus aportes a la degradación de la celobiosa, sino en otras aplicaciones industriales, incluidas incluida la producción de sabor y aroma, y la liberación de compuestos aromáticos del vino, jugos de frutas y productos sin sabor (Singhania et al., 2013).

Un punto importante para entender la especificidad sobre el sustrato es la topología del sitio activo de la enzima. En el caso de la Endoglucanasa su topología catalítica tiene forma de hendidura abierta, lo que permite que una cadena de celulosa amorfa lineal se degrade aleatoriamente en cualquier parte de la cadena (Davies & Henrissat, 1995), mientras que en caso de la Celobiohidrolasa su maquinaria catalítica se establece en una conformación similar a un túnel, lo que permite que la cadena de celulosa única se escinda en el extremo reductor o no reductor (Parkkinen et al., 2008) estas variaciones en la topología del sitio activo, da como resultado diferentes especificidades de sustrato. Investigaciones corroboran experimentalmente estas variaciones. Por ejemplo, Sidar et al., (2020) encontraron que “GH6 PaCel6B” mostró una mayor actividad sobre la carboximetilcelulosa (CMC), que es un sustrato altamente específico para la celulasa de acción Endo. La CMC es celulosa descristalizada y, por lo tanto, contiene más sitios amorfos que son ideales para el acceso a la cadena de celulosa por parte de las Endoglucanasas que se escinden internamente, mientras que la Exoglucanasa “GH6 PaCel6A” mostró mayor actividad sobre la celulosa microcristalina insoluble Avicel que sobre la CMC. Considerando esto, y al encontrar tanto la GH12 como la GH6 en el genoma que analizamos, podríamos pensar que el sustrato CMC pudo ser atacado catalíticamente hablando en toda su cadena, tanto en su estructura amorfa como en los extremos reductores y no reductores. Sin embargo y como veremos en los siguientes apartados, el ataque enzimático no se limitó a la maquinaria catalítica de estas dos glicosilhidrolasas.

Ahora bien, si comparamos las enzimas activas sobre sustrato entre hongos y bacterias podemos encontrar múltiples diferencias. Por ejemplo, los hongos filamentosos representan un reservorio más rico de CAZymes en comparación con las bacterias (Berlemont, 2017; Berlemont & Martiny, 2013). Sin embargo, la variabilidad de las enzimas asociadas con CBM u otros dominios accesorios es mucho menor en hongos que en bacterias (Berlemont, 2017; Talamantes et al., 2016).

Sidar et al., (2020) Encontraron que al comparar los géneros *Aspergillus* y *Streptomyces*, aproximadamente el 90% de las GHs celulasa y amilasa con CBM fueron identificadas de

Streptomyces. Por el contrario, las celulasas de GH sin CBM están más extendidas en hongos que representan alrededor del 80% de estos casos. Otra importante diferencia que los autores encontraron es que en *Streptomyces*, se identificaron cuatro CBM diferentes asociados con el dominio catalítico de celulasa de GH, incluidos CBM2, CBM3, CBM4 y CBM46; cada CBM no solo está presente como un solo módulo, sino que también aparece en combinación con otros dominios accesorios, incluido otro CBM (CBM2 y CBM4 y CBM2 y CBM3). Según los autores, CBM2 es el CBM que se encuentra con más frecuencia (67%) entre los cuatro CBM diferentes en las celulasas de *Streptomyces*. En contraste con esta diversidad, en *Aspergillus*, CBM1 es el único módulo asociado con las celulasas GH y siempre presente en un arreglo simple de un dominio catalítico más un CBM. De manera que, las celulasas de *Aspergillus* y *Streptomyces* no comparten un CBM común y la diversidad de CBM está asociada con el género *Streptomyces*, según este estudio.

En este trabajo, hallamos que, aunado a las GH determinadas en el genoma de *Streptomyces* sp._CH565, se encuentra anotado el módulo de unión de carbohidratos (CBM2), específicamente formando complejo CBM2-GH6. Cabe rescatar que, los CBM no tienen actividad catalítica propiamente dicha, pero funcionan como módulos de unión al sustrato (Boraston et al., 2004; Lombard et al., 2014). Estudios sugieren que la característica de unión de un CBM mejora la función catalítica de las CAZymes dirigiendo la enzima al sustrato y aumentando la proximidad sustrato-enzima, así como interrumpiendo la cristalinidad de la fracción de sustrato insoluble (Bernardes et al., 2019; Reyes-Ortiz et al., 2013; Sidar et al., 2020); por lo que, encontrar este CBM2-GH6 en el genoma analizado despierta gran interés para este estudio. Podríamos sugerir que este módulo es una de las características clave para entender la afinidad de la cepa *Streptomyces* sp._CH565 por el sustrato evaluado – CMC; lo que podría confirmarse con estudios que demuestran que la eliminación del CBM de la enzima da como resultado una actividad enzimática disminuida y una estabilidad enzimática reducida (Bissaro et al., 2017; Cockburn et al., 2018).

En un análisis más enfocado en las actividades auxiliares que se unen al complejo celulolítico para conformar un modelo completo para la hidrólisis enzimática de celulosa, se encontraron cinco copias de AA10 en el Cazyoma de *Streptomyces* sp._CH565. Estas multicopias de AA10, sugieren un papel importante en los resultados ([Anexo B](#)). AA10 es el dominio asignado por la base de datos CAZy para las monooxigenasas de polisacáridos líticos (LPMO's), las cuales son enzimas dependientes de cobre que escinden los polisacáridos a través de un mecanismo oxidativo, el mecanismo de acción propuesto consiste en la escisión de la celulosa por la inserción de oxígeno en C1 y/o C4, con la subsiguiente formación de una lactona, que se hidroliza espontáneamente a ácido aldónico o cetoaldosa, respectivamente. Estas enzimas se han utilizado inicialmente en sinergia con glucósidos hidrolasas para potenciar la sacarificación de la biomasa vegetal y se han incorporado en cócteles de enzimas comerciales de última generación para la producción de biocombustibles (Johansen, 2016; Moreau et al., 2019). En el genoma de CH565, esta LPM's se encuentran presente y supone naturalmente la participación en la degradación de la celulosa, sin ser añadida de manera exógena como ocurre en otros estudios (Moreau et al., 2019).

Con estas LPMO's se completa para el genoma de *Streptomyces* sp._CH565 el modelo para la hidrólisis enzimática de la celulosa, que en resumen estaría compuesto de los dominios CAZy GH6, GH12, CBM2+GH6 y AA10, además del inusual CBM6 y identificadas como proteínas que serían secretadas al medio extracelular por el mecanismo de péptido señal (mecanismo clásico), si como otros dominios no asociados al mecanismo de péptido señal como GH10 (Xilanasas), GH26, GH51 y AA10+CBM2.

Este complejo celulolítico en particular (con mecanismo de péptido señal), fue igualmente determinado y analizado por Book et al., (2016), ellos encontraron, después de analizar 1100 cepas de *Streptomyces*, que 29 de estas exhibieron altas tasas de actividad de degradación de celulosa sobre papel filtro y en general presentan un contenido de genes CAZy similar, comprendido por familias de enzimas importantes para deconstruir celulosa (GH5, GH6, GH9, GH12, GH48 y AA10) y xilano (GH10, GH11, GH30) y en las familias del módulo de unión a carbohidratos (CBM2 y CBM3), mientras que la cepas

categorizadas con menor actividad celulolítica carecen de una celobiohidrolasa terminal reductora y una Endoglucanasa (GH9, GH12, GH74) y la mayoría de las cepas no tienen genes de Xilanasa (GH10, GH11); lo que sugiere que la ausencia de estas actividades no redundantes probablemente reduce su capacidad para deconstruir la celulosa y la biomasa vegetal. Finalmente, demostraron que la actividad celulolítica rápida es el producto de un conjunto completo de enzimas (Endoglucanasa, Celobiohidrolasa terminal reductora y no reductora y LPMO), y la ausencia de cualquiera de estas enzimas da como resultado una actividad limitada (Book et al., 2016).

Este estudio (Book et al., 2016), también enfocó sus esfuerzos en determinar si el origen del cual fueron aislados los *Streptomyces* presentaba diferencias en la capacidad celulolítica y demostraron que los clados I y III categorizados como altamente celulolíticos comprendían cepas de *Streptomyces* asociadas al huésped (“host-associated”), mientras que el clado II categorizado con baja actividad celulolítica comprendía *Streptomyces* de vida libre (del suelo específicamente), gracias al análisis de procesos evolutivos del CBM2, concluyendo que *“Es probable que la presión selectiva del entorno simbiótico seleccione estas cepas por un mayor contenido de genes CAZy, retención de genes transferidos horizontalmente y expansión de elementos reguladores. Por el contrario, las cepas de suelo de vida libre, que han evolucionado dentro de diversas comunidades, probablemente han experimentado una selección limitada para la actividad de degradación rápida de la celulosa en forma aislada”*.

Todo lo anterior nos ha dirigido al análisis del genoma de *Streptomyces* sp._CH565 para buscar posibles evidencias en su genoma que pudieran explicar la actividad enzimática determinada y, es considerando que Cuatro Ciénegas *“es un mundo perdido microbiano: un nicho multidimensional desequilibrado de nutrientes aislado del entorno humano”* (Souza et al., 2018), es probable que esta presión de selección y alto endemismo, particularmente en la poza Churince donde fue aislada la cepa, *“debido a su mayor altitud dentro de la valle, su dependencia de aguas antiguas en su mayoría profundas con influencia magmática (Wolaver et al., 2013), una matriz de suelo de calcio y extrema oligotrofia en términos de limitación de fósforo (Elser et al., 2005b; Souza et al., 2018)”*;

se pueda concluir que las Endoglucanasas y tal vez el complejo enzimático celulolítico en sí de la cepa *Streptomyces* sp._CH565 y la alta actividad enzimática específica que presenta, este relacionada a su origen evolutivo.

8.4 Análisis filogenético

La clasificación taxonómica de la cepa CH565 (ver [Identificación taxonómica](#)) se estableció previamente dentro del género *Streptomyces*, lo cual fue luego analizado por las puntuaciones promedio de identidad de nucleótidos (ANI), donde el genoma de CH565 comparte 89.4% de genoma con *Streptomyces olivaceus* NZCP043317 y tiene una fracción de su genoma compartido (89.82%) en términos de porcentaje AAI con la misma cepa (ver [Identificación molecular: ADN genómico](#)); estas puntuaciones sugieren un acercamiento a la especie del genoma de interés (CH565) con *Streptomyces olivaceus*, sin embargo, el porcentaje que se comparte es por debajo del 90% por lo que no es posible garantizar la especie con este análisis. Se verificó entonces, mediante una filogenia basada en el análisis de una región altamente conservada 16s. La cepa se agrupó con otras cepas del mismo lugar de aislamiento, Cuatro Ciénegas, estas cepas fueron todas previamente identificadas por la misma unidad ribosomal 16s por (Arocha-Garza et al., 2017), dentro del género *Streptomyces* y corresponden a *Streptomyces* sp. strain STCH_207.C, *Streptomyces* sp. strain STCH_610.A, *Streptomyces* sp. strain STCH_617. D. Se confirma el género microbiano de la cepa de estudio. Sin embargo, estudios filogenéticos más extensos con la evaluación del ‘core’ o la evaluación del genoma completo confrontado con una base de datos más robusta podría predecir la especie de *Streptomyces* sp._CH565. Como era de esperarse, según estudios previos (Alcaraz et al., 2008; Arocha-Garza et al., 2017; Rebollar et al., 2012), se presenta en este trabajo, nuevos resultados que soportan la hipótesis del endemismo de la cepa de estudio, particularmente del sistema de laguna intermedia Churince, dado que los *Streptomyces* con quien comparte clado fueron aislados de esta poza.

9 CONCLUSIONES

Este trabajo describe la evaluación sistemática de cepas de Actinobacterias de la cuenca Cuatro Ciénegas CCB (por sus siglas en inglés) con potencial industrial para la degradación de la celulosa y la caracterización genómica de la cepa seleccionada con más alto potencial celulolítico según este estudio, los resultados de esta investigación abren la puerta para la aplicación biotecnológica del microorganismo seleccionado y las enzimas contenidas en su genoma.

La evaluación cualitativa del banco de Actinobacterias mediante el tamizaje en cultivo sobre medio de cultivo CCM1 mostró que más del 70% de la colección biológica evaluada, producen enzimas hidrolíticas extracelulares utilizando carboximetilcelulosa como única fuente de carbono. Además, no solo la cantidad es una característica interesante de este estudio, sino también los valores obtenidos del análisis de índice enzimático (IE); en este estudio, 12 cepas mostraron valores elevados de IE (≥ 3.0) y se consideraron como potenciales productores de la enzima de interés, por lo que se seleccionaron para ensayos enzimáticos cuantitativos. Estos resultados nos llevan a pensar que la colección biológica evaluada en el presente trabajo presenta un alto potencial para hidrólisis de celulosa.

Este estudio destaca el potencial biotecnológico de la cepa *Streptomyces* sp._CH565 para la producción de la enzima Endoglucanasa. (Actividad volumétrica 0.21 U/mL y actividad específica calculada del extracto crudo de 149 U/mg). Luego de la evaluación cinética, su potencial de biodegradación fue analizado utilizando un enfoque basado en minería genómica. El análisis comparativo del genoma reveló genes específicos codificados para el complejo enzimático celulolítico.

Se identificó y caracterizó las familias de enzimas responsables de la degradación de celulosa de la cepa potencial contrastando la información anotada con la base de datos para enzimas activas sobre carbohidratos (CAZy). En total 133 GH y CBM unidas a ellas, más cinco copias de AA10 fueron anotadas para *Streptomyces* sp._CH565, del total

determinado (244 dominios CAZy), lo que representa un 56% de todo su CAZyoma dedicado exclusivamente a la hidrólisis de carbohidratos. El gran número de genes codificantes para CAZymes en el genoma de *Streptomyces* sp._CH565, destacan su potencialidad para hidrolizar múltiples carbohidratos y constituye un reservorio de enzimas de interés biotecnológico.

Se determinó el modelo para la hidrólisis enzimática de la celulosa, que en resumen estaría compuesto de los dominios CAZy GH6, GH12, CBM2+GH6 y AA10 e identificadas como proteínas que serían secretadas al medio extracelular por el mecanismo de péptido señal (mecanismo clásico), así como otros dominios no asociados al mecanismo de péptido señal como GH10 (Xilanasa), GH26, GH51 y AA10+CBM2. Este complejo, fue encontrado en otras investigaciones asociados a cepas de *Streptomyces* que exhibieron alta actividad celulolítica. El CBM2 representa un papel importante en este complejo, dado que, como dominios funcionales, los CBM tienen características atractivas, como promover la unión al sustrato y, por lo tanto, respaldar la función catalítica de la enzima; además, otros estudios han demostrado que este dominio puede usarse para analizar evolutivamente

Taxonómicamente la cepa CH565 se estableció previamente dentro del género *Streptomyces*, lo cual fue luego analizado por las puntuaciones promedio de identidad de nucleótidos (ANI) y de ácidos nucleicos (AAI), donde el genoma de CH565 comparte 89.4% (ANI) y 89.8% (AAI) de fracción del genoma con *Streptomyces olivaceus* NZCP043317; estas puntuaciones sugieren un acercamiento a la especie de nuestro genoma de interés con *Streptomyces olivaceus*, sin embargo, el porcentaje que se comparte es por debajo del 90% por lo que no es posible establecer la identidad a nivel de especie, con este análisis.

El análisis filogenético basado en una región altamente conservada (la secuencia completa de la subunidad ribosomal 16s), soporta la hipótesis del endemismo de la cepa de estudio, particularmente del sistema de laguna intermedia Churince, dado que los *Streptomyces* con quien comparte clado fueron aislados de esta poza (*Streptomyces* y corresponden a

Streptomyces sp. strain STCH_207.C, *Streptomyces* sp. strain STCH_610.A, *Streptomyces* sp. strain STCH_617. D).

Finalmente, este estudio representa una evidencia más del tesoro que representa CCB en términos de diversidad y riqueza procariota, (así como acá se demostró) y su poderoso potencial biotecnológico único en México y en el mundo y que, obliga a la comunidad en general a apropiarse del conocimiento y a hacer esfuerzos para proteger este lugar tan amenazado por la sobreexplotación y el cambio climático.

10 PERSPECTIVAS

Las crecientes preocupaciones sobre el medio ambiente entre las personas y los científicos, así como, la creciente demanda de biocombustibles permite observar los resultados de este estudio como potenciales para la continuación de un proceso de caracterización de la actividad enzimática en diferentes condiciones de pH y temperatura, así como la purificación de la enzima y la optimización de la fermentación para la obtención de un extracto enzimático que pueda ser utilizado posteriormente para la hidrólisis de biomasa lignocelulósica.

Otros enfoques también podrían considerarse. *Streptomyces* sp._CH565 es capaz de secretar enzima Endoglucanasa utilizando CMC como única fuente de carbono, además, su análisis genómico nos muestra un robusto sistema para la hidrólisis completa de la celulosa, además, potencial para la obtención de otras enzimas lignocelulósicas, según el análisis de su CAZyoma. Por lo que, el aislamiento y la expresión heteróloga de los genes involucrados en la hidrólisis de la lignocelulosa podrían contemplarse en futuros estudios.

La utilización de enzimas multifuncionales es otro enfoque aclamado. Por lo tanto, es crucial el desarrollo de nuevos cócteles, con todas las enzimas necesarias en la proporción justa, apropiada para cada tipo de biomasa, de manera que los resultados presentados abren una ventana de oportunidad para la ingeniería de este tipo de enzimas a partir de esta cepa, que complementen las existentes actividades.

11 REFERENCIAS

- Alcaraz, L. D., Olmedo, G., Bonilla, G., Cerritos, R., Hernández, G., Cruz, A., Ramírez, E., Putonti, C., Jiménez, B., Martínez, E., López, V., Arvizu, J. L., Ayala, F., Razo, F., Caballero, J., Siefert, J., Eguiarte, L., Vielle, J.-P., Martínez, O., ... Herrera-Estrella, L. (2008). The genome of *Bacillus coahuilensis* reveals adaptations essential for survival in the relic of an ancient marine environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(15), 5803–5808. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800981105>
- Arevalo-Gallegos, A., Ahmad, Z., Asgher, M., Parra-Saldivar, R., & Iqbal, H. M. N. (2017). Lignocellulose: A sustainable material to produce value-added products with a zero waste approach—A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *99*, 308–318. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.097>
- Arocha Garza, H. F. (2018). *Diversidad y bioprospección de actinobacterias de Cuatro Ciénegas, Coahuila con potencial farmacéutico* [Phd, Universidad Autónoma de Nuevo León]. <http://eprints.uanl.mx/17893/>
- Arocha-Garza, H. F., Canales-Del Castillo, R., Eguiarte, L. E., Souza, V., & De la Torre-Zavala, S. (2017). High diversity and suggested endemicity of culturable Actinobacteria in an extremely oligotrophic desert oasis. *PeerJ*, *5*(May), e3247. <https://doi.org/10.7717/peerj.3247>
- Asha, B. M., Masilamani, R., Amit, Y., & Natarajan, S. (2012). Purification and Characterization of a Thermophilic Cellulase from a Novel Cellulolytic Strain, *Paenibacillus barcinonensis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *22*(11), 1501–1509. <https://doi.org/10.4014/jmb.1202.02013>
- Bajpai, P. K. (2010). SOLVING THE PROBLEMS OF RECYCLED FIBER PROCESSING WITH ENZYMES. *BioResources*, *5*(2), 1311–1325. https://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/view/BioRes_05_2_1311_Bajpai_Solve_Problems_Recycle_Enzymes
- Balla, A., Silini, A., Cherif-Silini, H., Bouket, A. C., Boudechicha, A., Luptakova, L., Alenezi, F. N., & Belbahri, L. (2022). Screening of Cellulolytic Bacteria from Various Ecosystems and Their Cellulases Production under Multi-Stress Conditions. *Catalysts*, *12*(7), 769. <https://doi.org/10.3390/catal12070769>
- Ballesteros, M. (2010). 6—Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. In K. Waldron (Ed.), *Bioalcohol Production* (pp. 159–177). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845699611.2.159>
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *80*(1), 1–43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>
- Beckham, G. T., Bomble, Y. J., Bayer, E. A., Himmel, M. E., & Crowley, M. F. (2011). Applications of computational science for understanding enzymatic deconstruction of cellulose. *Current Opinion in Biotechnology*, *22*(2), 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.11.005>

- Behera, B. C., Sethi, B. K., Mishra, R. R., Dutta, S. K., & Thatoi, H. N. (2017). Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *15*(1), 197–210. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.12.001>
- Berlemont, R. (2017). Distribution and diversity of enzymes for polysaccharide degradation in fungi. *Scientific Reports*, *7*(1), 222. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00258-w>
- Berlemont, R., & Martiny, A. C. (2013). Phylogenetic distribution of potential cellulases in bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(5), 1545–1554. <https://doi.org/10.1128/AEM.03305-12>
- Bernardes, A., Pellegrini, V. O. A., Curtolo, F., Camilo, C. M., Mello, B. L., Johns, M. A., Scott, J. L., Guimaraes, F. E. C., & Polikarpov, I. (2019). Carbohydrate binding modules enhance cellulose enzymatic hydrolysis by increasing access of cellulases to the substrate. *Carbohydrate Polymers*, *211*, 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.108>
- Bhardwaj, N., Kumar, B., Agrawal, K., & Verma, P. (2021). Current perspective on production and applications of microbial cellulases: A review. *Bioresources and Bioprocessing*, *8*(1), 95. <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00447-6>
- Bhat, M. K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, *18*(5), 355–383. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00041-0](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00041-0)
- Bhat, M. K., & Bhat, S. (1997). Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*, *15*(3), 583–620. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(97\)00006-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(97)00006-2)
- Bhaturiwala, R., Jain, N., & Modi, H. (2017). Enzyme profiling of selected chitinase producing Actinomycetes. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, *5*(1), 39–43.
- Bissaro, B., Røhr, Å. K., Müller, G., Chylenski, P., Skaugen, M., Forsberg, Z., Horn, S. J., Vaaje-Kolstad, G., & Eijsink, V. G. H. (2017). Oxidative cleavage of polysaccharides by monocopper enzymes depends on H₂O₂. *Nature Chemical Biology*, *13*(10), 1123–1128. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2470>
- Book, A. J., Lewin, G. R., McDonald, B. R., Takasuka, T. E., Wendt-Pienkowski, E., Doering, D. T., Suh, S., Raffa, K. F., Fox, B. G., & Currie, C. R. (2016). Evolution of High Cellulolytic Activity in Symbiotic *Streptomyces* through Selection of Expanded Gene Content and Coordinated Gene Expression. *PLoS Biology*, *14*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002475>
- Boraston, A. B., Bolam, D. N., Gilbert, H. J., & Davies, G. J. (2004). Carbohydrate-binding modules: Fine-tuning polysaccharide recognition. *The Biochemical Journal*, *382*(Pt 3), 769–781. <https://doi.org/10.1042/BJ20040892>
- Bosetto, A., Justo, P. I., Zanardi, B., Venzon, S. S., Graciano, L., dos Santos, E. L., & de Cássia Garcia Simão, R. (2016). Research Progress Concerning Fungal and Bacterial β -Xylosidases. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *178*(4), 766–795. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1908-4>

- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. In *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* (Vol. 72, pp. 248–254).
- Breitbart, M., Hoare, A., Nitti, A., Siefert, J., Haynes, M., Dinsdale, E., Edwards, R., Souza, V., Rohwer, F., & Hollander, D. (2009). Metagenomic and stable isotopic analyses of modern freshwater microbialites in Cuatro Ciénegas, Mexico. *Environmental Microbiology*, *11*(1), 16–34. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01725.x>
- Brunecky, R., Subramanian, V., M. Yarbrough, J., S. Donohoe, B., B. Vinzant, T., A. Vanderwall, T., C. Knott, B., B. Chaudhari, Y., J. Bomble, Y., E. Himmel, M., & R. Decker, S. (2020). Synthetic fungal multifunctional cellulases for enhanced biomass conversion. *Green Chemistry*, *22*(2), 478–489. <https://doi.org/10.1039/C9GC03062J>
- Budihal, S. R., Agsar, D., & Patil, S. R. (2016). Enhanced production and application of acidothermophilic *Streptomyces* cellulase. *Bioresource Technology*, *200*, 706–712. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.098>
- Bull, A. T. (2011). Actinobacteria of the Extremobiosphere. In K. Horikoshi (Ed.), *Extremophiles Handbook* (pp. 1203–1240). Springer Japan. https://doi.org/10.1007/978-4-431-53898-1_58
- Carder, J. H. (1986). Detection and quantitation of cellulase by Congo red staining of substrates in a cup-plate diffusion assay. *Analytical Biochemistry*, *153*(1), 75–79. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90063-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90063-1)
- Celaya-Herrera, S., Casados-Vázquez, L. E., Valdez-Vázquez, I., Barona-Gómez, F., Bideshi, D. K., & Barboza-Corona, J. E. (2021). A Cellulolytic *Streptomyces* Sp. Isolated from a Highly Oligotrophic Niche Shows Potential for Hydrolyzing Agricultural Wastes. *Bioenergy Research*, *14*(1), 333–343. <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10174-z>
- Cerritos, R., Eguarte, L. E., Avitia, M., Siefert, J., Travisano, M., Rodríguez-Verdugo, A., & Souza, V. (2011). Diversity of culturable thermo-resistant aquatic bacteria along an environmental gradient in Cuatro Ciénegas, Coahuila, México. *Antonie van Leeuwenhoek*, *99*(2), 303–318. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9490-9>
- Chakdar, H., Kumar, M., Pandiyan, K., Singh, A., Nanjappan, K., Kashyap, P. L., & Srivastava, A. K. (2016). Bacterial xylanases: Biology to biotechnology. *3 Biotech*, *6*(2), 150. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0457-z>
- Chellapandi, P., & Jani, H. M. (2008). Production of endoglucanase by the native strains of *Streptomyces* isolates in submerged fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, *39*(1), 122–127. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220080001000026>
- Cockburn, D. W., Suh, C., Medina, K. P., Duvall, R. M., Wawrzak, Z., Henrissat, B., & Koropatkin, N. M. (2018). Novel carbohydrate binding modules in the surface anchored α -amylase of *Eubacterium rectale* provide a molecular rationale for the range of starches used by this organism in the human gut. *Molecular Microbiology*, *107*(2), 249–264. <https://doi.org/10.1111/mmi.13881>

- Collins, T., Gerday, C., & Feller, G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(1), 3–23. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.06.005>
- Cragg, S. M., Beckham, G. T., Bruce, N. C., Bugg, T. D., Distel, D. L., Dupree, P., Etxabe, A. G., Goodell, B. S., Jellison, J., McGeehan, J. E., McQueen-Mason, S. J., Schnorr, K., Walton, P. H., Watts, J. E., & Zimmer, M. (2015). Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life. *Current Opinion in Chemical Biology*, 29, 108–119. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.10.018>
- Dadwal, A., Sharma, S., & Satyanarayana, T. (2020). Progress in Ameliorating Beneficial Characteristics of Microbial Cellulases by Genetic Engineering Approaches for Cellulose Saccharification. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2020.01387>
- Daniels, W., Bouvin, J., Busche, T., Rückert, C., Simoens, K., Karamanou, S., Van Mellaert, L., Friðjónsson, Ó. H., Nicolai, B., Economou, A., Kalinowski, J., Anné, J., & Bernaerts, K. (2018). Transcriptomic and fluxomic changes in *Streptomyces lividans* producing heterologous protein. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 198. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-1040-6>
- Dassanayake, R., Acharya, S., & Abidi, N. (2018). *Biopolymer-Based Materials from Polysaccharides: Properties, Processing, Characterization and Sorption Applications* (pp. 1–24). <https://doi.org/10.5772/intechopen.80898>
- Davies, G., & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure (London, England: 1993)*, 3(9), 853–859. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00220-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00220-9)
- de Paula, C. C. P., Montoya, Q. V., Rodrigues, A., Bichuette, M. E., & Selegim, M. H. R. (2016). Terrestrial filamentous fungi from Gruta do Catão (São Desidério, Bahia, Northeastern Brazil) show high levels of cellulose degradation. *Journal of Cave and Karst Studies*, 78(3), 208–217. <https://doi.org/10.4311/2016MB0100>
- Den, W., Sharma, V. K., Lee, M., Nadadur, G., & Varma, R. S. (2018). Lignocellulosic Biomass Transformations via Greener Oxidative Pretreatment Processes: Access to Energy and Value-Added Chemicals. *Frontiers in Chemistry*, 6. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fchem.2018.00141>
- Dodd, D., & Cann, I. K. O. (2009). Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *GCB Bioenergy*, 1(1), 2–17. <https://doi.org/10.1111/j.1757-1707.2009.01004.x>
- Eida, M. F., Nagaoka, T., Wasaki, J., & Kouno, K. (2012). Isolation and Characterization of Cellulose-decomposing Bacteria Inhabiting Sawdust and Coffee Residue Composts. *Microbes and Environments*, 27(3), 226–233. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME11299>
- Elser, J. J., Schampel, J. H., Garcia-Pichel, F., Wade, B. D., Souza, V., Eguiarte, L., Escalante, A., & Farmer, J. D. (2005a). Effects of phosphorus enrichment and grazing snails on modern stromatolitic microbial communities. *Freshwater Biology*, 50(11), 1808–1825. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2005.01451.x>
- Elser, J. J., Schampel, J. H., Garcia-Pichel, F., Wade, B. D., Souza, V., Eguiarte, L., Escalante, A., & Farmer, J. D. (2005b). Effects of phosphorus enrichment and

- grazing snails on modern stromatolitic microbial communities. *Freshwater Biology*, 50(11), 1808–1825. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2005.01451.x>
- Enzymes Market Size & Share, Growth Trends | Industry Report 2020-2025* /. (n.d.). Retrieved April 1, 2022, from <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/enzyme-market-46202020.html>
- Escalante, A. E., Eguiarte, L. E., Espinosa-Asuar, L., Forney, L. J., Noguez, A. M., & Souza Saldivar, V. (2008). Diversity of aquatic prokaryotic communities in the Cuatro Ciénegas basin. *FEMS Microbiology Ecology*, 65(1), 50–60. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00496.x>
- Escudero, J., Daza, Z., Gil, N., & Mora, O. Y. (2013). Evaluation of cellulolytic enzymes produced by native fungi through solid state fermentat. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(1), 108–117.
- Espósito, E., & de Azevedo, J. L. (2010). *Fungos—Uma Introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia*. <https://fundacao.ucs.br/site/editora/catalogo/biotecnologia/fungos-uma-introducao-biologia/>
- Fatokun, E. N., Nwodo, U. U., & Okoh, A. I. (2016). Classical Optimization of Cellulase and Xylanase Production by a Marine Streptomyces Species. *Applied Sciences*, 6(10), 286. <https://doi.org/10.3390/app6100286>
- Fernández-Abalos, J. M., Ruiz-Arribas, A., Garda, A. L., & Santamaría, R. I. (1997). Effect of carbon source on the expression of celA1, a cellulase-encoding gene from *Streptomyces halstedii* JM8. *FEMS Microbiology Letters*, 153(1), 97–103. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10469.x>
- Florencio, C., Couri, S., & Farinas, C. S. (2012). Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by trichoderma strains. *Enzyme Research*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/793708>
- Furukawa, T., Bello, F. O., & Horsfall, L. (2014). Microbial enzyme systems for lignin degradation and their transcriptional regulation. *Frontiers in Biology*, 9(6), 448–471. <https://doi.org/10.1007/s11515-014-1336-9>
- Galié, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E. M., Villar, C. J., & Lombó, F. (2018). Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. *Frontiers in Microbiology*, 9, 898. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00898>
- Gastelum-Arellanez, A., Paredes-López, O., & Olalde-Portugal, V. (2014). Extracellular endoglucanase activity from *Paenibacillus polymyxa* BEb-40: Production, optimization and enzymatic characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(11), 2953–2965. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1723-z>
- Georgiadou, D. N., Avramidis, P., Ioannou, E., & Hatzinikolaou, D. G. (2021). Microbial bioprospecting for lignocellulose degradation at a unique Greek environment. *Heliyon*, 7(6). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07122>
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59(2). <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>

- Gilbert, H. J. (2010). The biochemistry and structural biology of plant cell wall deconstruction. *Plant Physiology*, *153*(2), 444–455.
<https://doi.org/10.1104/pp.110.156646>
- Gong, X., Xiang, W., Cao, X., Yu, Y., Hao, Y., Li, L., Wang, Q., Zou, H., & Qian, C. (2020). *Microbispora cellulosisiformans* sp. Nov., a novel actinomycete with cellulase activity isolated from soil in the cold region. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *113*(12), 2053–2062. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01477-4>
- González, V., Vargas-Straube, M. J., Beys-da-Silva, W. O., Santi, L., Valencia, P., Beltrametti, F., & Cámara, B. (2020). Enzyme Bioprospection of Marine-Derived Actinobacteria from the Chilean Coast and New Insight in the Mechanism of Keratin Degradation in *Streptomyces* sp. G11C. *Marine Drugs*, *18*(11), 537. <https://doi.org/10.3390/md18110537>
- Grigorevski de Lima, A. L., Pires do Nascimento, R., da Silva Bon, E. P., & Coelho, R. R. R. (2005). *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. *Enzyme and Microbial Technology*, *37*(2), 272–277.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.03.016>
- Guarnizo Franco, A., Martínez Yepes, P. N., & Valencia Sanchez, H. A. (2009). PRETRATAMIENTOS DE LA CELULOSA Y BIOMASA PARA LA SACARIFICACIÓN. *Scientia et Technica*, *15*(42), 7.
- Gupta, P., Samant, K., & Sahu, A. (2012). Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. *International Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1155/2012/578925>
- Hemsworth, G. R., Davies, G. J., & Walton, P. H. (2013). Recent insights into copper-containing lytic polysaccharide mono-oxygenases. *Current Opinion in Structural Biology*, *23*(5), 660–668. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2013.05.006>
- Hernández-Santoyo, Alejandra García-Hernández, Enrique Rodríguez-Romero, A. (1999). Ceulosomas: Sistemas multienzimáticos. *Journal of the Mexican Chemical Society*, *43*(3–4), 137–142.
- Ibrahim, A. M., Hamouda, R. A., El-Naggar, N. E.-A., & Al-Shakankery, F. M. (2021). Bioprocess development for enhanced endoglucanase production by newly isolated bacteria, purification, characterization and in-vitro efficacy as anti-biofilm of *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, *11*(1), 9754.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-87901-9>
- Jang, H.-D., & Chang, K.-S. (2005). Thermostable cellulases from *Streptomyces* sp.: Scale-up production in a 50-l fermenter. *Biotechnology Letters*, *27*(4), 239–242.
<https://doi.org/10.1007/s10529-004-8356-5>
- Jaradat, Z., Dawagreh, A., Ababneh, Q., & Saadoun, I. (2008). Influence of Culture Conditions on Cellulase Production by *Streptomyces* Sp. (Strain J2). *1*(4), 6.
- Jayasekara, S., & Ratnayake, R. (2019). Microbial Cellulases: An Overview and Applications. In *Cellulose*. IntechOpen.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.84531>

- Johansen, K. S. (2016). Discovery and industrial applications of lytic polysaccharide mono-oxygenases. *Biochemical Society Transactions*, 44(1), 143–149.
<https://doi.org/10.1042/BST20150204>
- Khawwaja, P., Ahmed, J., Hasan Sohag, M., Islam, K., & Kalam Azad, A. (2016). Isolation, Screening and Characterization of Cellulase Producing Bacterial Isolates from Municipal Solid Wastes and Rice Straw Wastes. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*. <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000280>
- Kim, D. (2018). Physico-Chemical Conversion of Lignocellulose: Inhibitor Effects and Detoxification Strategies: A Mini Review. *Molecules*, 23(2), 309.
<https://doi.org/10.3390/molecules23020309>
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.-P., & Bohn, A. (2005). Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angewandte Chemie International Edition*, 44(22), 3358–3393. <https://doi.org/10.1002/anie.200460587>
- Kucharska, K., Rybarczyk, P., Hołowacz, I., Łukajtis, R., Glinka, M., & Kamiński, M. (2018). Pretreatment of Lignocellulosic Materials as Substrates for Fermentation Processes. *Molecules*, 23(11), 2937. <https://doi.org/10.3390/molecules23112937>
- Kuhad, R. C., Gupta, R., & Singh, A. (2011). Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Research*, 2011, 1–10.
<https://doi.org/10.4061/2011/280696>
- Kumar, A., & Chandra, R. (2020). Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. *Heliyon*, 6(2).
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03170>
- Kumar, D., & Murthy, G. S. (2016). Chapter 7 - Enzymatic Hydrolysis of Cellulose for Ethanol Production: Fundamentals, Optimal Enzyme Ratio, and Hydrolysis Modeling. In V. K. Gupta (Ed.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 65–78). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63507-5.00007-1>
- Kumar, P., Ryan, B., & Henehan, G. T. M. (2017). β -Glucosidase from *Streptomyces griseus*: Nanoparticle immobilisation and application to alkyl glucoside synthesis. *Protein Expression and Purification*, 132, 164–170.
<https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.01.011>
- Kurasin, M., & Våljamäe, P. (2011). Processivity of cellobiohydrolases is limited by the substrate. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(1), 169–177.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.161059>
- Lamilla, C., Pavez, M., Santos, A., Hermosilla, A., Llanquinao, V., & Barrientos, L. (2017). Bioprospecting for extracellular enzymes from culturable Actinobacteria from the South Shetland Islands, Antarctica. *Polar Biology*, 40(3), 719–726.
<https://doi.org/10.1007/s00300-016-1977-z>
- Lennartsson, P. R., Erlandsson, P., & Taherzadeh, M. J. (2014). Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products. *Bioresour. Technol.*, 165, 3–8.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.127>
- Levasseur, A., Drula, E., Lombard, V., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2013). Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate

- auxiliary redox enzymes. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 41. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-41>
- Lim, J.-H., Lee, C.-R., Dhakshnamoorthy, V., Park, J. S., & Hong, S.-K. (2016). Molecular characterization of *Streptomyces coelicolor* A(3) SCO6548 as a cellulose 1,4- β -cellobiosidase. *FEMS Microbiology Letters*, 363(3), fnv245. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv245>
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), 490–495. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>
- Lu, L., Zeng, G., Fan, C., Zhang, J., Chen, A., Chen, M., Jiang, M., Yuan, Y., Wu, H., Lai, M., & He, Y. (2014). Diversity of Two-Domain Laccase-Like Multicopper Oxidase Genes in *Streptomyces* spp.: Identification of Genes Potentially Involved in Extracellular Activities and Lignocellulose Degradation during Composting of Agricultural Waste. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(11), 3305–3314. <https://doi.org/10.1128/AEM.00223-14>
- Lynd, L. R., & Weimer, P. J. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *MICROBIOL. MOL. BIOL. REV.*, 66, 72.
- Machado, A. A., & Gil, H. H. A. (2012). Métodos utilizados en el destintado de papel desperdicio – aproximación al estado del arte. *Investigaciones Aplicadas*, 6(1), 9–25. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5001688>
- Maki, M., Leung, K. T., & Qin, W. (2009). The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *International Journal of Biological Sciences*, 5(5), 500–516. <https://doi.org/10.7150/ijbs.5.500>
- Malik, A., Kim, Y. R., Jang, I. H., Hwang, S., Oh, D.-C., & Kim, S. B. (2020). Genome-based analysis for the bioactive potential of *Streptomyces yeochonensis* CN732, an acidophilic filamentous soil actinobacterium. *BMC Genomics*, 21, 118. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6468-5>
- Manni, A., & Filali-Maltouf, A. (2022). Diversity and bioprospecting for industrial hydrolytic enzymes of microbial communities isolated from deserted areas of south-east Morocco. *AIMS Microbiology*, 8(1), 5–25. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2022002>
- Manzanares, P. (2010). 8—Integrated hydrolysis, fermentation and co-fermentation of lignocellulosic biomass. In K. Waldron (Ed.), *Bioalcohol Production* (pp. 205–223). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845699611.3.205>
- Meena, B., Anburajan, L., Nitharsan, K., Vinithkumar, N. V., & Dharani, G. (2021). Existence in cellulose shelters: Industrial and pharmaceutical leads of symbiotic actinobacteria from ascidian *Phallusia nigra*, Andaman Islands. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(7), 120. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03090-7>
- Minckley, W. L., & Cole, G. A. (1968). Preliminary Limnologic Information on Waters of the Cuatro Ciénegas Basin, Coahuila, Mexico. *The Southwestern Naturalist*, 13(4), 421–431. <https://doi.org/10.2307/3668909>

- Mohammadipanah, F., & Wink, J. (2016). Actinobacteria from Arid and Desert Habitats: Diversity and Biological Activity. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.01541>
- Moreau, C., Tapin-Lingua, S., Grisel, S., Gimbert, I., Le Gall, S., Meyer, V., Petit-Conil, M., Berrin, J.-G., Cathala, B., & Villares, A. (2019). Lytic polysaccharide monoxygenases (LPMOs) facilitate cellulose nanofibrils production. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 156. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1501-0>
- Moreno-Letelier, A., Olmedo-Alvarez, G., Eguiarte, L. E., & Souza, V. (2012). Divergence and Phylogeny of Firmicutes from the Cuatro Ciénegas Basin, Mexico: A Window to an Ancient Ocean. *Astrobiology*, 12(7), 674–684. <https://doi.org/10.1089/ast.2011.0685>
- Morgenstern, I., Powlowski, J., & Tsang, A. (2014). Fungal cellulose degradation by oxidative enzymes: From dysfunctional GH61 family to powerful lytic polysaccharide monoxygenase family. *Briefings in Functional Genomics*, 13(6), 471–481. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elu032>
- Olson, D. G., McBride, J. E., Shaw, A. J., & Lynd, L. R. (2012). Recent progress in consolidated bioprocessing. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(3), 396–405. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.11.026>
- Parkkinen, T., Koivula, A., Vehmaanperä, J., & Rouvinen, J. (2008). Crystal structures of *Melanocarpus albomyces* cellobiohydrolase Cel7B in complex with cello-oligomers show high flexibility in the substrate binding. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 17(8), 1383–1394. <https://doi.org/10.1110/ps.034488.108>
- Payne, C. M., Knott, B. C., Mayes, H. B., Hansson, H., Himmel, M. E., Sandgren, M., Ståhlberg, J., & Beckham, G. T. (2015). Fungal cellulases. *Chemical Reviews*, 115(3), 1308–1448. <https://doi.org/10.1021/cr500351c>
- Pollet, A., Delcour, J. A., & Courtin, C. M. (2010). Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(3), 176–191. <https://doi.org/10.3109/07388551003645599>
- Qin, S., Li, W.-J., Dastager, S. G., & Hozzein, W. N. (2016). Editorial: Actinobacteria in Special and Extreme Habitats: Diversity, Function Roles, and Environmental Adaptations. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01415>
- Quinlan, R. J., Teter, S., & Xu, F. (2010). 7—Development of cellulases to improve enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. In K. Waldron (Ed.), *Bioalcohol Production* (pp. 178–201). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845699611.2.178>
- Rajagopal, G., & Kannan, S. (2017). Systematic characterization of potential cellulolytic marine actinobacteria *Actinoalloteichus* sp. MHA15. *Biotechnology Reports*, 13, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.12.003>
- Rebollar, E. A., Avitia, M., Eguiarte, L. E., González-González, A., Mora, L., Bonilla-Rosso, G., & Souza, V. (2012). Water–sediment niche differentiation in ancient

- marine lineages of *Exiguobacterium* endemic to the Cuatro Ciénegas Basin. *Environmental Microbiology*, *14*(9), 2323–2333. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02784.x>
- Reyes-Ortiz, V., Heins, R. A., Cheng, G., Kim, E. Y., Vernon, B. C., Elandt, R. B., Adams, P. D., Sale, K. L., Hadi, M. Z., Simmons, B. A., Kent, M. S., & Tullman-Ercek, D. (2013). Addition of a carbohydrate-binding module enhances cellulase penetration into cellulose substrates. *Biotechnology for Biofuels*, *6*(1), 93. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-93>
- Robak, K., & Balcerek, M. (2018). Review of Second Generation Bioethanol Production from Residual Biomass. *Food Technology and Biotechnology*, *56*(2), 174–187. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.02.18.5428>
- Sahoo, K., Sahoo, R. K., Gaur, M., & Subudhi, E. (2020). Cellulolytic thermophilic microorganisms in white biotechnology: A review. *Folia Microbiologica*, *65*(1), 25–43. <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00710-6>
- Saini, A., Aggarwal, N. K., Sharma, A., & Yadav, A. (2015). Actinomycetes: A Source of Lignocellulolytic Enzymes. *Enzyme Research*, *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/279381>
- Sakdapetsiri, C., Fukuta, Y., Aramsirirujwet, Y., Shirasaka, N., & Kitpreechavanich, V. (2016). Antagonistic activity of endo- β -1,3-glucanase from a novel isolate, *Streptomyces* sp. 9X166, against black rot in orchids: Screening antagonistic actinomycetes and glucanase characterization. *Journal of Basic Microbiology*, *56*(5), 469–479. <https://doi.org/10.1002/jobm.201500709>
- Sharma, A., Tewari, R., Rana, S. S., Soni, R., & Soni, S. K. (2016). Cellulases: Classification, Methods of Determination and Industrial Applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *179*(8), 1346–1380. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2070-3>
- Shepherd, M. D., Kharel, M. K., Bosserman, M. A., & Rohr, J. (2010). Laboratory Maintenance of *Streptomyces* Species. *Current Protocols in Microbiology*, *18*(1), 10E.1.1-10E.1.8. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc10e01s18>
- Shi, P., Yao, G., Yang, P., Li, N., Luo, H., Bai, Y., Wang, Y., & Yao, B. (2010). Cloning, characterization, and antifungal activity of an endo-1,3- β -d-glucanase from *Streptomyces* sp. S27. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *85*(5), 1483–1490. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2187-1>
- Sidar, A., Albuquerque, E. D., Voshol, G. P., Ram, A. F. J., Vijgenboom, E., & Punt, P. J. (2020). Carbohydrate Binding Modules: Diversity of Domain Architecture in Amylases and Cellulases From Filamentous Microorganisms. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fbioe.2020.00871>
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Sukumaran, R. K., Larroche, C., & Pandey, A. (2013). Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technology*, *127*, 500–507. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.012>

- Soares, F. L., Melo, I. S., Dias, A. C. F., & Andreote, F. D. (2012). Cellulolytic bacteria from soils in harsh environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(5), 2195–2203. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1025-2>
- Souza, V., Eguiarte, L. E., Siefert, J., & Elser, J. J. (2008). Microbial endemism: Does phosphorus limitation enhance speciation? *Nature Reviews Microbiology*, 6(7), 559–564. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1917>
- Souza, V., Espinosa-Asuar, L., Escalante, A. E., Eguiarte, L. E., Farmer, J., Forney, L., Lloret, L., Rodriguez-Martinez, J. M., Soberon, X., Dirzo, R., & Elser, J. J. (2006a). An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahuan desert. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(17), 6565–6570. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601434103>
- Souza, V., Espinosa-Asuar, L., Escalante, A. E., Eguiarte, L. E., Farmer, J., Forney, L., Lloret, L., Rodriguez-Martinez, J. M., Soberon, X., Dirzo, R., & Elser, J. J. (2006b). An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahuan desert. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(17), 6565–6570. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601434103>
- Souza, V., Moreno-Letelier, A., Travisano, M., Alcaraz, L. D., Olmedo, G., & Eguiarte, L. E. (2018). The lost world of Cuatro Ciénegas Basin, a relictual bacterial niche in a desert oasis. *ELife*, 7, e38278. <https://doi.org/10.7554/eLife.38278>
- Souza, V., Siefert, J. L., Escalante, A. E., Elser, J. J., & Eguiarte, L. E. (2012). The Cuatro Ciénegas Basin in Coahuila, Mexico: An Astrobiological Precambrian Park. *Astrobiology*, 12(7), 641–647. <https://doi.org/10.1089/ast.2011.0675>
- Spasic, J., Mandic, M., Radivojevic, J., Jeremic, S., Vasiljevic, B., Nikodinovic-Runic, J., & Djokic, L. (2018). Biocatalytic potential of *Streptomyces* spp. Isolates from rhizosphere of plants and mycorrhizosphere of fungi. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 65(6), 822–833. <https://doi.org/10.1002/bab.1664>
- Stalin, T., Sathya Priya, B., & Selvam, K. (2012). Ecofriendly application of cellulase and xylanase producing marine *Streptomyces clavuligerus* as enhancer in biogas production from waste. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 6(6). <https://doi.org/10.5897/AJEST12.034>
- Steele, B. C. H., & Heinzl, A. (2010). Materials for fuel-cell technologies. In *Materials for Sustainable Energy* (pp. 224–231). Co-Published with Macmillan Publishers Ltd, UK. https://doi.org/10.1142/9789814317665_0031
- Stein, B., Kutner, L. S., & Adams, J. S. (Eds.). (2000). *Precious Heritage: The Status of Biodiversity in the United States*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/oso/9780195125191.001.0001>
- Sujatha, L., & Hemalatha, K. P. J. (2020). *Isolation, Screening and Identification of Cellulolytic Streptomyces Corchorusii(Mn244066) From Soil Sample of Visakhapatnam*. <https://doi.org/10.22376/ijpbs/lpr.2020.10.1.151-59>
- Sukharnikov, L. O., Cantwell, B. J., Podar, M., & Zhulin, I. B. (2011). Cellulases: Ambiguous non-homologous enzymes in a genomic perspective. *Trends in Biotechnology*, 29(10), 473–479. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.04.008>

- Sureshkumar, C., & Prathaban, M. (2015). *Optimization of Process Parameters for Carboxymethyl Cellulase Production under Submerged Fermentation by Streptomyces lividians*. 3(8), 9.
- Talamantes, D., Biabini, N., Dang, H., Abdoun, K., & Berlemont, R. (2016). Natural diversity of cellulases, xylanases, and chitinases in bacteria. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0538-6>
- Teather, R. M., & Wood, P. J. (1982). Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(4), 777–780. <https://doi.org/10.1128/aem.43.4.777-780.1982>
- Teeravivattanakit, T., Baramée, S., Phitsuwan, P., Waeonukul, R., Pason, P., Tachaapaikoon, C., Sakka, K., & Ratanakhanokchai, K. (2016). Novel Trifunctional Xylanolytic Enzyme Axy43A from *Paenibacillus curdlanolyticus* Strain B-6 Exhibiting Endo-Xylanase, β -d-Xylosidase, and Arabinoxylan Arabinofuranohydrolase Activities. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(23), 6942–6951. <https://doi.org/10.1128/AEM.02256-16>
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Toushik, S. H., Lee, K.-T., Lee, J.-S., & Kim, K.-S. (2017). Functional Applications of Lignocellulolytic Enzymes in the Fruit and Vegetable Processing Industries. *Journal of Food Science*, 82(3), 585–593. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13636>
- Ulrich, A., Klimke, G., & Wirth, S. (2008). Diversity and activity of cellulose-decomposing bacteria, isolated from a sandy and a loamy soil after long-term manure application. *Microbial Ecology*, 55(3), 512–522. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9296-0>
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., & Boerjan, W. (2010). Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiology*, 153(3), 895–905. <https://doi.org/10.1104/pp.110.155119>
- Veiga, M., Esparis, A., & Fabregas, J. (1983). Isolation of Cellulolytic Actinomycetes from Marine Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(1), 286–287. <https://doi.org/10.1128/aem.46.1.286-287.1983>
- Walia, A., Guleria, S., Mehta, P., Chauhan, A., & Parkash, J. (2017). Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: A review. *3 Biotech*, 7(1), 11. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0584-6>
- Watve, M. G., Tickoo, R., Jog, M. M., & Bhole, B. D. (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of Microbiology*, 176(5), 386–390. <https://doi.org/10.1007/s002030100345>
- Wilson, D. B. (1992). Biochemistry and Genetics of Actinomycete Cellulases. *Critical Reviews in Biotechnology*, 12(1–2), 45–63. <https://doi.org/10.3109/07388559209069187>

- Wolaver, B. D., Crossey, L. J., Karlstrom, K. E., Banner, J. L., Cardenas, M. B., Ojeda, C. G., & Sharp, J. M., Jr. (2013). Identifying origins of and pathways for spring waters in a semiarid basin using He, Sr, and C isotopes: Cuatrociénegas Basin, Mexico. *Geosphere*, *9*(1), 113–125. <https://doi.org/10.1130/GES00849.1>
- Woo, J.-B., Kang, H.-N., Woo, E.-J., & Lee, S.-B. (2014). Molecular cloning and functional characterization of an endo- β -1,3-glucanase from *Streptomyces matensis* ATCC 23935. *Food Chemistry*, *148*, 184–187. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.137>
- Wu, H., Liu, B., Ou, X., Pan, S., Shao, Y., & Huang, F. (2018). *Streptomyces thermoalkaliphilus* sp. Nov., an alkaline cellulase producing thermophilic actinomycete isolated from tropical rainforest soil. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *111*(3), 413–422. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0964-x>
- WU, H., SHIMOI, H., & ITO, K. (2002). Purification and Characterization of β -1,6-Glucanase of *Streptomyces rochei* Application in the Study of Yeast Cell Wall Proteins. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *66*(11), 2515–2519. <https://doi.org/10.1271/bbb.66.2515>
- Wyman, C. E. (1994). Ethanol from lignocellulosic biomass: Technology, economics, and opportunities. *Bioresource Technology*, *50*(1), 3–15. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(94\)90214-3](https://doi.org/10.1016/0960-8524(94)90214-3)
- Yin, Y., Mao, X., Yang, J., Chen, X., Mao, F., & Xu, Y. (2012). dbCAN: A web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Research*, *40*(W1), W445–W451. <https://doi.org/10.1093/nar/gks479>
- Yoon, J. H., Park, J. E., Suh, D. Y., Hong, S. B., Ko, S. J., & Kim, S. H. (2007). Comparison of dyes for easy detection of extracellular cellulases in fungi. *Mycobiology*, *35*(1), 21–24. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2007.35.1.021>
- Yuan, M., Yu, Y., Li, H. R., Dong, N., & Zhang, X. H. (2014). Phylogenetic diversity and biological activity of actinobacteria isolated from the chukchi shelf marine sediments in the arctic ocean. *Marine Drugs*, *12*(3). <https://doi.org/10.3390/md12031281>

12 ANEXO A

Tabla 12-1. Características generales y descripción del tamizaje en medio de cultivo CCM1 del banco de Actinobacterias evaluado en este estudio.

Código del aislado	Referencia de origen	Poza	medio aislamiento	Crecimiento sobre CCM1 *Este estudio
AN_172	(Arocha Garza, 2018)	Anteojó	SFM	negativo
AN_174	(Arocha Garza, 2018)	Anteojó	Q1	positivo
AN_176	(Arocha Garza, 2018)	Anteojó	Q1	positivo
AN_177	(Arocha Garza, 2018)	Anteojó	Q1	positivo
AN_178	(Arocha Garza, 2018)	Anteojó	ALMIDON	positivo
AN_179	(Arocha Garza, 2018)	Anteojó	SFM	positivo
AN_180	(Arocha Garza, 2018)	Anteojó	Q1	positivo
AN_182	(Arocha Garza, 2018)	Anteojó	ALMIDON	positivo
AN_183	(Arocha Garza, 2018)	Anteojó	Q1	positivo
AN_184	(Arocha Garza, 2018)	Anteojó	Q1	positivo
AN_510	(Arocha Garza, 2018)	Anteojó	SFM	positivo
AN_511	(Arocha Garza, 2018)	Anteojó	SFM	negative
AN_514	(Arocha Garza, 2018)	Anteojó	SFM	positivo
AN_517	(Arocha Garza, 2018)	Anteojó	TS	positivo
AN_518	(Arocha Garza, 2018)	Anteojó	SFM	positivo

AN_562	(Arocha Garza, 2018)	Anteoyo	SFM	negative
AD_625	(Arocha Garza, 2018)	Archaean Domo	Q1	positivo
AD_681	(Arocha Garza, 2018)	Archaean Domo	ISP4	positivo
NOCH_1.A	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	ISP2	positivo
NOCH_2.A	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	ISP2	negativo
NOCH_3.A	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	ISP2	negativo
NOCH_4.A	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	ISP2	negativo
NOCH_5.A	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	ISP2	negativo
NOCH_6.A	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	ISP2	positivo
NOCH_7.A	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	ISP2	positivo
NOCH_10.F	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	ISP2	positivo
NOCH_11.A	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	ISP2	positivo
NOCH_12.C	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	ISP2	positivo
NOCH_13.C	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	ISP2	positivo
NOCH_14_F	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	ISP2	positivo
NOCH_15.A	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	ISP2	positivo
NOCH_29.F	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	ISP2	negativo
NOCH_36_F	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	SFM	positivo
STCH_30.F	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	ISP2	negativo
STCH_53.A	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	SFM	positivo
STCH_106.F	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	ALMIDON	positivo

STCH_160.C	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	SFM	negativo
STCH_163.C	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	SFM	positivo
STCH_169.F	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	Q1	positivo
STCH_171.E	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	SFM	positivo
STCH_185_E	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	SFM	positivo
STCH_186.F	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	SFM	positivo
STCH_189_C	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	Q1	positivo
STCH_193.B	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	ALMIDON	positivo
STCH_194.C	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	SFM	positivo
STCH_195.C	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	SFM	negativo
STCH_612.D	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	Q1	positivo
STCH_201.A	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	SFM	positivo
STCH_207.C	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	SFM	positivo
STCH_230.C	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	SFM	negativo
STCH_235.B	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	ALMIDON	positivo
STCH_403.D	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	SFM	positivo
STCH_409.C	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	SFM	positivo
STCH_500.A	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	TS	positivo
STCH_506.D	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	SFM	positivo
STCH_516.B	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	SFM	positivo
STCH_565.A	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	TS	positivo

STCH_577.C	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	SFM	negativo
STCH_580.B	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	Q1	positivo
STCH_605.D	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	SFM	positivo
STCH_610.A	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	Q1	positivo
STCH_636.B	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	Q1	positivo
STCH_649.E	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	Q1	positivo
STCH_665.C	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	Q1	positivo
STCH_671.D	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	Q1	positivo
STCH_673.D	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	Q1	positivo
STCH_676.A	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	ISP3	negativo
STCH_698.E	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	Q1	positivo
STCH_699.E	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	ISP4	positivo
STCH_678.D	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	ISP3	positivo
STCH_209.E	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	SFM	positivo
STCH_602.E	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	ISP4	positivo
STCH_648.C	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	Q1	positivo
STCH_619.D	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	Q1	positivo
STCH_630.D	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	Q1	negativo
STCH_196.E	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	ALMIDON	positivo
NPCH_614.B	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	Q1	negativo
NPCH_164.B	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	SFM	positivo

NPCH_192.E	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	ALMIDON	positivo
NPCH_208.E	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	ALMIDON	negativo
NPCH_221.C	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	Q1	positivo
NPCH_232.A	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	TS	positivo
NPCH_236.A	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	ALMIDON	positivo
NPCH_237.A	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	Q1	positivo
NPCH_401.D	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	SFM	negativo
NPCH_667.B	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	ISP4	positivo
GMCH_233.B	(Arocha-Garza et al., 2017)	Churince	ALMIDON	positivo
CH_168	(Arocha Garza, 2018)	Churince	SFM	positivo
CH_222	(Arocha Garza, 2018)	Churince	Q1	positivo
CH_400	(Arocha Garza, 2018)	Churince	S/D	positivo
CH_563	(Arocha Garza, 2018)	Churince	Q1	positivo
CH_567	(Arocha Garza, 2018)	Churince	ALMIDON	positivo
CH_575	(Arocha Garza, 2018)	Churince	SFM	positivo
CH_601	(Arocha Garza, 2018)	Churince	SFM	positivo
CH_603	(Arocha Garza, 2018)	Churince	ISP4	positivo
CH_608	(Arocha Garza, 2018)	Churince	ISP3	positivo
CH_613	(Arocha Garza, 2018)	Churince	Q1	positivo
CH_672	(Arocha Garza, 2018)	Churince	ISP3	positivo
CH_677	(Arocha Garza, 2018)	Churince	HV	positivo

CH_162	(Arocha Garza, 2018)	Churince	SFM	positivo
CH_166	(Arocha Garza, 2018)	Churince	SFM	positivo
CH_167	(Arocha Garza, 2018)	Churince	SFM	positivo
CH_191	(Arocha Garza, 2018)	Churince	ALMIDON	positivo
CH_206	(Arocha Garza, 2018)	Churince	ALMIDON	positivo
CH_224	(Arocha Garza, 2018)	Churince	Q1	positivo
CH_564	(Arocha Garza, 2018)	Churince	Q1	positivo
CH_566	(Arocha Garza, 2018)	Churince	SFM	positivo
CH_585	(Arocha Garza, 2018)	Churince	TS	positivo
CH_634	(Arocha Garza, 2018)	Churince	SFM	positivo
CH_659	(Arocha Garza, 2018)	Churince	Q1	positivo
CH_576	(Arocha Garza, 2018)	Churince	TS	positivo
CH_641	(Arocha Garza, 2018)	Churince	AH	positivo
CH_664	(Arocha Garza, 2018)	Churince	SFM	positivo
CH_661	(Arocha Garza, 2018)	Churince	SFM	positivo
CH_615	(Arocha Garza, 2018)	Churince	ISP3	positivo
CH_231	(Arocha Garza, 2018)	Churince	SFM	positivo
CH_620	(Arocha Garza, 2018)	Churince	Q1	positivo
CH_662	(Arocha Garza, 2018)	Churince	SFM	positivo
CH_595	(Arocha Garza, 2018)	Churince	ALMIDON	positivo
CH_607	(Arocha Garza, 2018)	Churince	Q1	negativo

CH_669	(Arocha Garza, 2018)	Churince	ISP4	negativo
CH_161	(Arocha Garza, 2018)	Churince	SFM	negativo
CH_618	(Arocha Garza, 2018)	Churince	Q1	negativo
CH_666	(Arocha Garza, 2018)	Churince	SFM	negativo
CH_656	(Arocha Garza, 2018)	Churince	ISP3	negativo
CH_666	(Arocha Garza, 2018)	Churince	SFM	negativo
CH_211	(Arocha Garza, 2018)	Churince	SFM	negativo
CH_624	(Arocha Garza, 2018)	Churince	Q1	negativo
CH_202-1	(Arocha Garza, 2018)	Churince	SFM	negativo
CH_596	(Arocha Garza, 2018)	Churince	SFM	negativo
CH_647	(Arocha Garza, 2018)	Churince	ISP3	negativo
CH_657	(Arocha Garza, 2018)	Churince	ISP3	negativo
CH_205	(Arocha Garza, 2018)	Churince	SFM	negativo
CH_593	(Arocha Garza, 2018)	Churince	SFM	negativo
MO_210	(Arocha Garza, 2018)	Mojarral	SFM	positivo
MO_212	(Arocha Garza, 2018)	Mojarral	SFM	positivo
MO_213	(Arocha Garza, 2018)	Mojarral	SFM	negativo
MO_214	(Arocha Garza, 2018)	Mojarral	SFM	positivo
MO_217	(Arocha Garza, 2018)	Mojarral	ALMIDON	positivo
MO_220	(Arocha Garza, 2018)	Mojarral	SFM	negativo
MO_238	(Arocha Garza, 2018)	Mojarral	SFM	positivo

MO_408	(Arocha Garza, 2018)	Mojarral	SFM	positivo
MO_513	(Arocha Garza, 2018)	Mojarral	TS	positivo
MO_583	(Arocha Garza, 2018)	Mojarral	ALMIDON	positivo
MO_584	(Arocha Garza, 2018)	Mojarral	Q1	positivo
MO_590	(Arocha Garza, 2018)	Mojarral	Q1	positivo
MO_591	(Arocha Garza, 2018)	Mojarral	Q1	negativo
MO_592	(Arocha Garza, 2018)	Mojarral	SFM	positivo
PA_616	(Arocha Garza, 2018)	Poza azul	Q1	negativo
PA_631	(Arocha Garza, 2018)	Poza azul	ISP4	positivo
PA_640	(Arocha Garza, 2018)	Poza azul	ALMIDON	positivo
PA_650	(Arocha Garza, 2018)	Poza azul	ALMIDON	positivo
PA_668	(Arocha Garza, 2018)	Poza azul	ISP4	positivo
PA_670	(Arocha Garza, 2018)	Poza azul	ISP4	positivo
PA_674	(Arocha Garza, 2018)	Poza azul	ISP4	positivo
PA_679	(Arocha Garza, 2018)	Poza azul	ISP4	positivo
PA_680	(Arocha Garza, 2018)	Poza azul	Q1	positivo
PA_683	(Arocha Garza, 2018)	Poza azul	ISP4	negativo
BE_741	(Arocha Garza, 2018)	Poza Becerra	SFM	positivo
PB-7	Vilchis-Marquez, C., 2017)	Poza Becerra	SFM	positivo
PB-8	Vilchis-Marquez, C., 2017)	Poza Becerra	SFM	positivo
PB-11	Vilchis-Marquez, C., 2017)	Poza Becerra	SFM	positivo

PB-13	Vilchis-Marquez, C., 2017)	Poza Becerra	SFM	positivo
PB-14	Vilchis-Marquez, C., 2017)	Poza Becerra	SFM	positivo
PB-15	Vilchis-Marquez, C., 2017)	Poza Becerra	SFM	positivo
PB-8-1	Vilchis-Marquez, C., 2017)	Poza Becerra	SFM	negativo
PR_561	(Arocha Garza, 2018)	Pozas Rojas	M2	positivo
PR_568	(Arocha Garza, 2018)	Pozas Rojas	M2	positivo
PR_660	(Arocha Garza, 2018)	Pozas Rojas	SFM	positivo
PR-60	Vilchis-Marquez, C., 2017)	Pozas Rojas	QUITINA	positivo
PR-69	Vilchis-Marquez, C., 2017)	Pozas Rojas	ALMIDON	positivo
PR-79	Vilchis-Marquez, C., 2017)	Pozas Rojas	QUITINA	positivo
PR-105	Vilchis-Marquez, C., 2017)	Pozas Rojas	ALMIDON	positivo
PR-108	Vilchis-Marquez, C., 2017)	Pozas Rojas	ALMIDON	positivo
PR-33	Vilchis-Marquez, C., 2017)	Pozas Rojas	ISP2	positivo
PR-35	Vilchis-Marquez, C., 2017)	Pozas Rojas	ISP2	positivo
PR-114	Vilchis-Marquez, C., 2017)	Pozas Rojas	ALMIDON	positivo
PR-81	Vilchis-Marquez, C., 2017)	Pozas Rojas	QUITINA	positivo
PR_570	(Arocha Garza, 2018)	Pozas Rojas	SFM	positivo
PR_571	(Arocha Garza, 2018)	Pozas Rojas	SFM	positivo
PR_574	(Arocha Garza, 2018)	Pozas Rojas	M2	positivo
PR_589	(Arocha Garza, 2018)	Pozas Rojas	SFM	positivo
PR_587	(Arocha Garza, 2018)	Pozas Rojas	ALMIDON	positivo

PR-59	Vilchis-Marquez, C., 2017)	Pozas Rojas	QUITINA	positivo
PR-96	Vilchis-Marquez, C., 2017)	Pozas Rojas	QUITINA	positivo
PR-115	Vilchis-Marquez, C., 2017)	Pozas Rojas	ALMIDON	positivo
PR_572	(Arocha Garza, 2018)	Pozas Rojas	SFM	negativo
PR-85	Vilchis-Marquez, C., 2017)	Pozas Rojas	QUITINA	negativo
PR-107	Vilchis-Marquez, C., 2017)	Pozas Rojas	ALMIDON	negativo
743	(Arocha Garza, 2018)			positivo
600	(Arocha Garza, 2018)			positivo
658	(Arocha Garza, 2018)			positivo
33	(Arocha Garza, 2018)			positivo
107	(Arocha Garza, 2018)			negativo
742	(Arocha Garza, 2018)			negativo

13 ANEXO B

Tabla 13-1. Descripción de los genes y proteínas que contienen módulos catalíticos pertenecientes a enzimas activas sobre carbohidratos (CAZyme) y módulos de unión a carbohidratos (CBM) de la cepa *Streptomyces sp._CH565*. Entre paréntesis, posición de inicio y final del gen.

Gene ID	Dominio CAZy	SignalP
fig 6666666.875706.peg.1001	GT2_Glycos_transf_2(8-121)	N
fig 6666666.875706.peg.1008	GT4(216-363)	N
fig 6666666.875706.peg.1012	GH25(129-311)	N
fig 6666666.875706.peg.107	CE4(78-222)	Y(1-26)
fig 6666666.875706.peg.1102	GH31(223-661)	N
fig 6666666.875706.peg.1108	GT2_Glyco_tranf_2_3(39-252)	N
fig 6666666.875706.peg.1129	CE1(81-246)	Y(1-34)
fig 6666666.875706.peg.1155	GT2_Glycos_transf_2(11-159)	N
fig 6666666.875706.peg.1181	CE4(65-189)	Y(1-36)
fig 6666666.875706.peg.1339	CBM13(116-264)	N
fig 6666666.875706.peg.1340	CBM13(327-481)	N
fig 6666666.875706.peg.138	GH3(62-289)	N
fig 6666666.875706.peg.1396	GT4(202-381)	N
fig 6666666.875706.peg.1400	CE4(113-244)	Y(1-28)
fig 6666666.875706.peg.1401	GT4(190-310)	N
fig 6666666.875706.peg.1456	GH3(141-366)	Y(1-37)
fig 6666666.875706.peg.1501	PL12_3(415-554)	N
fig 6666666.875706.peg.1518	GH13_30(42-407)	N
fig 6666666.875706.peg.1526	GT2_Glycos_transf_2(7-137)	N
fig 6666666.875706.peg.1547	GT76(82-259)	N
fig 6666666.875706.peg.1548	GT2_Glycos_transf_2(16-178)	N
fig 6666666.875706.peg.157	CBM32(94-207)+GH92(604-1133)	Y(1-32)
fig 6666666.875706.peg.1645	CE4(138-258)	Y(1-56)
fig 6666666.875706.peg.1646	CE4(55-174)	Y(1-28)
fig 6666666.875706.peg.1668	GH23(118-258)	Y(1-37)
fig 6666666.875706.peg.1756	GT87(82-320)	N
fig 6666666.875706.peg.1774	GT4(274-415)	N
fig 6666666.875706.peg.1840	GH23(67-193)	N
fig 6666666.875706.peg.1842	AA7(82-522)	Y(1-25)

fig 6666666.875706.peg.1904	GT4(277-432)	N
fig 6666666.875706.peg.1920	GH10(261-575)	N
fig 6666666.875706.peg.1952	GH3(5-205)	N
fig 6666666.875706.peg.2081	GH13_3(65-285)	N
fig 6666666.875706.peg.2083	CBM13(113-263)	N
fig 6666666.875706.peg.2091	GH13_16(2-129)	N
fig 6666666.875706.peg.2144	GT51(75-261)	N
fig 6666666.875706.peg.2220	GH13_16(1-173)	N
fig 6666666.875706.peg.2221	GH13_16(2-173)	N
fig 6666666.875706.peg.2228	CE14(10-146)	N
fig 6666666.875706.peg.2313	GT51(93-272)	N
fig 6666666.875706.peg.2346	GH18(61-335)	Y(1-36)
fig 6666666.875706.peg.237	GH18(76-245)	Y(1-43)
fig 6666666.875706.peg.2418	GT2_Glyco_tranf_2_3(18-253)	N
fig 6666666.875706.peg.2475	CE14(8-143)	N
fig 6666666.875706.peg.251	GH76(77-368)	Y(1-34)
fig 6666666.875706.peg.258	GH125(25-418)	N
fig 6666666.875706.peg.2704	CBM35(677-803)	Y(1-35)
fig 6666666.875706.peg.2718	CE1(144-360)	N
fig 6666666.875706.peg.2725	GH19(40-244)	Y(1-30)
fig 6666666.875706.peg.2726	AA10(31-169)	Y(1-31)
fig 6666666.875706.peg.2751	GH3(105-322)	N
fig 6666666.875706.peg.2752	GH5_19(18-297)	N
fig 6666666.875706.peg.2794	GH38(255-511)	N
fig 6666666.875706.peg.2796	GH5_18(19-300)	N
fig 6666666.875706.peg.2807	GH92(240-757)	Y(1-29)
fig 6666666.875706.peg.2809	GT5(63-391)	N
fig 6666666.875706.peg.2832	PL7_3(69-279)	N
fig 6666666.875706.peg.2843	GH87(495-1424)	Y(1-32)
fig 6666666.875706.peg.2848	GH13_30(35-382)	N
fig 6666666.875706.peg.3031	GH15(219-585)	N
fig 6666666.875706.peg.3072	CE8(57-366)	Y(1-33)
fig 6666666.875706.peg.3073	PL1_6(159-370)	Y(1-42)
fig 6666666.875706.peg.3075	GH43_10(10-283)	N
fig 6666666.875706.peg.3103	CE14(9-144)	N
fig 6666666.875706.peg.3129	GH2(90-637)+GH2(820-1167)	Y(1-47)
fig 6666666.875706.peg.3155	GT1(9-397)	N
fig 6666666.875706.peg.3187	GH46(47-264)	Y(1-41)
fig 6666666.875706.peg.3200	GH154(21-371)	N

fig 6666666.875706.peg.3219	AA10(50-233)	Y(1-50)
fig 6666666.875706.peg.3249	GH65(313-721)	N
fig 6666666.875706.peg.3297	CBM2(35-131)+GH18(239-603)	Y(1-31)
fig 6666666.875706.peg.3355	CBM48(209-296)+GH13_9(357-662)	Y(1-55)
fig 6666666.875706.peg.3412	GH13_13(348-744)	Y(1-29)
fig 6666666.875706.peg.3413	GH13_32(58-321)	Y(1-27)
fig 6666666.875706.peg.3414	GH13_30(53-410)	N
fig 6666666.875706.peg.3567	GH18(54-412)	Y(1-44)
fig 6666666.875706.peg.3573	GT2_Glycos_transf_2(25-187)	N
fig 6666666.875706.peg.3585	GT4(198-338)	N
fig 6666666.875706.peg.3586	GT4(201-346)	N
fig 6666666.875706.peg.361	GT51(163-326)	N
fig 6666666.875706.peg.3790	CE4(98-224)+GT2_Glyco_tranf_2_3(404-621)	N
fig 6666666.875706.peg.3822	GH26(168-310)	N
fig 6666666.875706.peg.3823	CE4(74-209)	N
fig 6666666.875706.peg.3824	GT2_Glycos_transf_2(117-221)	N
fig 6666666.875706.peg.3920	CE3(2-211)	N
fig 6666666.875706.peg.4052	GT39(82-353)	N
fig 6666666.875706.peg.4098	GT76(53-209)	N
fig 6666666.875706.peg.4118	AA10(34-211)	Y(1-29)
fig 6666666.875706.peg.4125	CE4(67-198)	N
fig 6666666.875706.peg.4126	GT2_Glycos_transf_2(23-195)	N
fig 6666666.875706.peg.4127	GT2_Glycos_transf_2(62-182)	N
fig 6666666.875706.peg.4155	GH171(67-425)	Y(1-32)
fig 6666666.875706.peg.4179	GH2(28-480)	N
fig 6666666.875706.peg.4193	GH1(13-439)	N
fig 6666666.875706.peg.4250	GT2_Glycos_transf_2(5-140)	N
fig 6666666.875706.peg.4252	GT2_Glycos_transf_2(13-147)	N
fig 6666666.875706.peg.4262	GT1(61-398)	N
fig 6666666.875706.peg.4263	GT1(45-416)	N
fig 6666666.875706.peg.4264	AA7(47-489)	N
fig 6666666.875706.peg.4268	GT1(8-387)	N
fig 6666666.875706.peg.4278	GT1(5-389)	N
fig 6666666.875706.peg.443	GH35(65-240)	Y(1-32)
fig 6666666.875706.peg.444	GH51(3-500)	N
fig 6666666.875706.peg.4578	AA10(39-229)+CBM2(266-354)	N
fig 6666666.875706.peg.4579	GH12(112-257)	Y(1-38)

fig 6666666.875706.peg.4582	GT2_Glycos_transf_2(6-129)	N
fig 6666666.875706.peg.4610	GH2(329-794)	Y(1-33)
fig 6666666.875706.peg.4611	GH43_34(44-324)+CBM66(340-495)	Y(1-34)
fig 6666666.875706.peg.4734	CE4(45-185)	N
fig 6666666.875706.peg.4738	CBM67(345-518)+GH78(549-1041)	Y(1-35)
fig 6666666.875706.peg.4739	GH106(50-1118)	Y(1-33)
fig 6666666.875706.peg.4740	GH146(65-588)	Y(1-36)
fig 6666666.875706.peg.4771	GH93(64-394)+CBM13(426-560)	Y(1-37)
fig 6666666.875706.peg.4862	GH77(172-685)	N
fig 6666666.875706.peg.4864	CBM35(581-698)	Y(1-37)
fig 6666666.875706.peg.4873	GH4(2-177)	N
fig 6666666.875706.peg.4895	GH3(70-290)	N
fig 6666666.875706.peg.50	GT1(41-409)	N
fig 6666666.875706.peg.5070	GT83(65-506)	N
fig 6666666.875706.peg.5071	GT2_Glycos_transf_2(27-192)	N
fig 6666666.875706.peg.5082	CE1(375-601)	N
fig 6666666.875706.peg.5086	AA10(30-199)	Y(1-30)
fig 6666666.875706.peg.5097	PL1_5(103-284)	Y(1-35)
fig 6666666.875706.peg.5120	CBM2(42-138)+GH18(205-454)	Y(1-38)
fig 6666666.875706.peg.5121	GH1(8-464)	N
fig 6666666.875706.peg.5127	GH1(16-477)	N
fig 6666666.875706.peg.5177	CBM48(20-109)+GH13_11(183-536)	N
fig 6666666.875706.peg.5190	CE1(213-431)	N
fig 6666666.875706.peg.5238	GH64(52-400)	Y(1-30)
fig 6666666.875706.peg.5243	GH65(327-694)	N
fig 6666666.875706.peg.5256	GH109(5-192)	N
fig 6666666.875706.peg.5427	GH19(94-296)	Y(1-31)
fig 6666666.875706.peg.5459	CBM67(133-300)+GH78(324-845)	N
fig 6666666.875706.peg.5461	GH28(84-445)	N
fig 6666666.875706.peg.5462	GH28(61-422)	N
fig 6666666.875706.peg.5467	GH140(103-365)	N
fig 6666666.875706.peg.5468	GH33(65-368)	N
fig 6666666.875706.peg.5475	PL1_2(109-293)	Y(1-45)
fig 6666666.875706.peg.5477	CE8(188-488)	Y(1-44)
fig 6666666.875706.peg.5479	GH127(26-552)	N
fig 6666666.875706.peg.5480	GH95(49-773)	Y(1-30)
fig 6666666.875706.peg.5481	GH141(48-575)	Y(1-40)

fig 6666666.875706.peg.5484	GH28(66-436)	Y(1-31)
fig 6666666.875706.peg.5522	GH38(262-523)	N
fig 6666666.875706.peg.5523	GH2(18-577)	N
fig 6666666.875706.peg.5531	GT5(322-531)	N
fig 6666666.875706.peg.5545	GH75(90-264)	Y(1-25)
fig 6666666.875706.peg.5557	CE7(3-319)	N
fig 6666666.875706.peg.5574	GH87(184-1118)	Y(1-36)
fig 6666666.875706.peg.5601	AA3(7-505)	N
fig 6666666.875706.peg.5695	AA4(26-246)	N
fig 6666666.875706.peg.5713	GH20(129-480)	N
fig 6666666.875706.peg.5731	CE4(88-213)+GT2_Glyco_tranf_2_3(361-579)	N
fig 6666666.875706.peg.5755	GH20(192-520)	Y(1-36)
fig 6666666.875706.peg.5787	AA3(4-508)	N
fig 6666666.875706.peg.5803	GT4(231-382)	N
fig 6666666.875706.peg.5825	CE1(80-347)	Y(1-42)
fig 6666666.875706.peg.5828	GH1(7-442)	N
fig 6666666.875706.peg.5834	GH3(35-245)	N
fig 6666666.875706.peg.5835	GH158(56-212)+CBM32(467-584)	Y(1-41)
fig 6666666.875706.peg.5837	GH55(291-548)	Y(1-43)
fig 6666666.875706.peg.5852	GT35(249-638)	N
fig 6666666.875706.peg.5860	CBM48(91-187)+GH13_11(271-623)	N
fig 6666666.875706.peg.5868	GH25(5-163)	N
fig 6666666.875706.peg.589	GH1(7-457)	N
fig 6666666.875706.peg.593	GH31(239-669)	N
fig 6666666.875706.peg.5955	GH25(73-255)	Y(1-35)
fig 6666666.875706.peg.60	GH13_11(176-528)	N
fig 6666666.875706.peg.6015	GT4(197-357)	N
fig 6666666.875706.peg.6060	GH114(38-227)	Y(1-27)
fig 6666666.875706.peg.61	GH13_26(39-307)	N
fig 6666666.875706.peg.6132	GH42(26-395)	N
fig 6666666.875706.peg.6206	GH43_26(54-337)	Y(1-41)
fig 6666666.875706.peg.6212	GH2(16-509)	N
fig 6666666.875706.peg.6248	GH43(99-434)	Y(1-34)
fig 6666666.875706.peg.6273	GH64(36-394)	Y(1-34)
fig 6666666.875706.peg.6276	GH16_3(43-280)	Y(1-31)
fig 6666666.875706.peg.6277	GH64(35-393)	Y(1-33)
fig 6666666.875706.peg.6365	CE1(22-232)	N

fig 6666666.875706.peg.64	GH13_10(104-422)	N
fig 6666666.875706.peg.6420	GH92(277-798)+CBM6(1019-1150)	Y(1-45)
fig 6666666.875706.peg.645	GH3(86-307)	N
fig 6666666.875706.peg.6465	GT2_Glycos_transf_2(46-156)	N
fig 6666666.875706.peg.6468	GT8(33-243)	N
fig 6666666.875706.peg.6475	CBM48(143-230)+GH13_9(291-590)	N
fig 6666666.875706.peg.6524	GT2_Glycos_transf_2(9-143)	N
fig 6666666.875706.peg.6525	GT2_Glycos_transf_2(5-112)	N
fig 6666666.875706.peg.6526	GT2_Glycos_transf_2(5-118)	N
fig 6666666.875706.peg.6554	GT2_Glycos_transf_2(25-150)	N
fig 6666666.875706.peg.6591	CBM13(324-442)	N
fig 6666666.875706.peg.6651	CBM2(37-136)+GH6(180-521)	Y(1-25)
fig 6666666.875706.peg.6657	GH33(40-392)	Y(1-29)
fig 6666666.875706.peg.666	AA1(83-477)	N
fig 6666666.875706.peg.6671	GH109(37-220)	N
fig 6666666.875706.peg.6673	CBM6(708-831)	Y(1-48)
fig 6666666.875706.peg.6693	CE14(20-125)	N
fig 6666666.875706.peg.6709	GH16_3(49-283)+CBM13(298-414)	Y(1-32)
fig 6666666.875706.peg.675	GH13_30(39-405)	N
fig 6666666.875706.peg.6794	GT4(186-333)	N
fig 6666666.875706.peg.6914	GH6(69-324)	Y(1-37)
fig 6666666.875706.peg.6915	AA5(2-644)	N
fig 6666666.875706.peg.6916	GT2_Glyco_trans_2_3(259-450)	N
fig 6666666.875706.peg.6938	GT51(97-273)	N
fig 6666666.875706.peg.6966	CBM2(104-202)	N
fig 6666666.875706.peg.699	GH36(144-423)	N
fig 6666666.875706.peg.6999	GT2_Glycos_transf_2(16-127)	N
fig 6666666.875706.peg.7001	GT9(82-305)	N
fig 6666666.875706.peg.7003	GT4(213-367)	N
fig 6666666.875706.peg.7008	GH109(7-157)	N
fig 6666666.875706.peg.701	GH109(10-158)	N
fig 6666666.875706.peg.7015	CE4(49-162)	Y(1-45)
fig 6666666.875706.peg.7016	GH11(54-228)	Y(1-42)
fig 6666666.875706.peg.7169	GT4(202-344)	N
fig 6666666.875706.peg.7171	GH15(234-601)	N
fig 6666666.875706.peg.7236	GT4(345-512)	N
fig 6666666.875706.peg.7239	GH135(23-241)	N

fig 6666666.875706.peg.7334	CE4(48-166)	N
fig 6666666.875706.peg.7335	GH15(236-581)	N
fig 6666666.875706.peg.7381	GH20(82-313)	N
fig 6666666.875706.peg.7382	PL14_3(114-314)	Y(1-51)
fig 6666666.875706.peg.7386	GH109(9-149)	Y(1-38)
fig 6666666.875706.peg.7410	GH10(49-340)+CBM13(354-476)	Y(1-42)
fig 6666666.875706.peg.7420	GH114(71-246)	Y(1-48)
fig 6666666.875706.peg.7425	GH4(10-188)	N
fig 6666666.875706.peg.7530	GT4(232-390)	N
fig 6666666.875706.peg.7536	GH97(42-680)	Y(1-42)
fig 6666666.875706.peg.7598	AA3(13-563)	N
fig 6666666.875706.peg.760	GT2_Glyco_tranf_2_3(15-259)	N
fig 6666666.875706.peg.7613	GH114(61-239)	Y(1-33)
fig 6666666.875706.peg.7675	CE9(9-372)	N
fig 6666666.875706.peg.7677	CBM35(209-311)	N
fig 6666666.875706.peg.7691	GT2_Glycos_transf_2(5-113)	N
fig 6666666.875706.peg.7765	CE14(15-126)	N
fig 6666666.875706.peg.7767	GH109(4-381)	N
fig 6666666.875706.peg.7902	GT20(7-466)	N
fig 6666666.875706.peg.7904	GT81(12-314)	N
fig 6666666.875706.peg.7940	CBM16(40-150)+GH18(274-589)	Y(1-36)
fig 6666666.875706.peg.8016	PL8(415-658)	Y(1-35)
fig 6666666.875706.peg.8028	GH4(7-183)	N
fig 6666666.875706.peg.8029	GH16_3(55-314)+CBM6(328-465)	Y(1-41)
fig 6666666.875706.peg.865	GT2_Glycos_transf_2(7-124)	N
fig 6666666.875706.peg.866	GT2_Glycos_transf_2(27-182)	N
fig 6666666.875706.peg.867	GT9(88-291)	N
fig 6666666.875706.peg.881	CE4(9-130)	N

14 ANEXO C

No. total de aislados	Nombre del taxón_ID	Localización	No. Celulolíticos	% Celulolíticos	Referencia
196	Actinobacterias de columna de agua y sedimento	Cuatro Ciénegas Basin, Mexico	156	78	Este estudio
364	Bacteria cultivable	Erg Iihoudi (Desierto Sahara, Marruecos)	No especificados	13	(Manni & Filali-Maltouf, 2022)
		Mhamid Elghizlane (Desierto Sahara, Marruecos)		15	
		Merzouga (Desierto Sahara, Marruecos)		34	
25	Actinomicetos	India	13	52	(Bhaturiwala et al., 2017)
30	Actinomicetos	Sedimentos de Tiruchendhur coastal areas deTamil Nadu, India	9	30	(Stalin et al., 2012)
34	Bacteria	Suelos de Wadi El Natrun, Beheira Governorate, Egipto	23	68	(Ibrahim et al., 2021)
75	Actinobacterias de origen marino	Costa Chilena	No especificados	87	(González et al., 2020)
19	Actinobacterias marinas	Sedimentos de la isla de Havelock, Andamán.	13	63	(Rajagopal & Kannan, 2017)
63	Bacteria	Lago Keri, Grecia	No especificados	55	(Georgiadou et al., 2021)

10	Actinobacteria	Islas Andamán, india	3	30	(Meena et al., 2021)
254	Bacteria	Suelo semi-arido Caatinga, Brazilia	No especificados	56	(Soares et al., 2012)
		Suelo Antártica			
118	<i>Streptomyces</i> sp.	Rizosfera de plantas y de micorrizosfera de hongos	No especificados	31	(Spasic et al., 2018)
30	Actinobacteria	Suelo, rizosfera de plantas <i>Deschampsia antarctica</i> plants, sedimento de lago y marino, y agua de mar del sur las Islas Shetland, Antártica	7	23	(Lamilla et al., 2017)
398	Bacteria cultivable	Cueva, ruinas, “chott”, estación termal, y rizosfera de regiones áridas y semiáridas de Algeria	26	6.5	(Balla et al., 2022)