



Tesis de Maestría en Química:

Celulasas siccófilas, una innovación en la industria del bioetanol

Lic. Lorena Herrera

Orientadoras:

Dra. Laura Franco Fraguas

(Cátedra de Bioquímica, Facultad de Química, Udelar)

Dra. Susana Castro

(Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Udelar)

2019

Índice

Resumen.....	8
1. Introducción	9
1.1 Pared celular vegetal.....	9
1.2 Celulasas.....	15
1.3 CAZymas	15
1.3.1 Glicosil hidrolasas	17
1.4 Celulasas y la industria:	18
1.5 Producción de celulasas	19
1.6 Microorganismos adaptados al frío y celulasas sicrófilas	20
1.7 Biocombustibles: la celulosa como fuente de azúcares para la producción de bioetanol	21
1.8 Bioetanol	22
1.8.1 Sacarificación.....	22
1.8.2 Fermentación	23
1.8.3 Sacarificación y fermentación ¿secuencial o simultánea?	24
Hipótesis y objetivos	26
2. Materiales y métodos	27
2.1 Selección del microorganismo productor de celulasas.....	28
2.2 Microscopía de barrido electrónico de células de <i>Flavobacterium</i> sp. AUG42	28
2.3 Obtención del preparado enzimático a partir de <i>Flavobacterium</i> sp. AUG42. Caracterización del perfil de crecimiento y la cinética de producción de celulasas.....	29
2.3.1 Preparación del inóculo.....	29
2.3.2 Condiciones de cultivo para la producción de celulasas	29
2.3.3 Determinación del perfil de crecimiento y la cinética de la producción de celulasas	29
2.3.4 Temperatura óptima para la producción de celulasas.....	30
2.4 Determinación de las actividades CMCasa y PASCasa	30
2.4.1 Actividad PASCasa	30
2.4.2 Actividad CMCasa	31
2.4.3 Detección de azúcares reductores: Método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).....	31
2.4.4 Determinación de las condiciones de velocidad inicial para las actividades CMCasa y PASCasa	32
2.5 Caracterización parcial del preparado enzimático	32

2.5.1 Condiciones óptimas de temperatura y pH	32
2.5.2 Determinación del efecto de diferentes agentes químicos sobre las actividades CMCasa y PASCasa	33
2.5.3 Estabilidad del preparado en diferentes condiciones de almacenamiento.....	33
2.5.4 Ensayos de actividades celobiasa y amilasa	34
2.5.5 Análisis del secretoma.....	35
2.5.6 Búsqueda de posibles celulasas en el genoma de AUG42: análisis del genoma y CAZoma	36
2.5.7 <i>Shotgun</i> de proteínas: estudio del secretoma por espectrometría de masas	37
2.5.8 Modelado y <i>docking</i> de algunas proteínas	37
2.6 Aplicación del preparado enzimático para sacarificación y posteriores ensayos de fermentación.....	39
2.6.1 Selección de sustrato a sacarificar	39
2.6.2 Condiciones de sacarificación de CMC.....	39
2.6.3 Preparación de pre-inóculo e inóculo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1	39
2.6.4 Ensayos de sacarificación y fermentación secuencial.....	40
2.6.5 Rendimiento de etanol.....	42
3. Resultados	44
3.1 Selección del microorganismo productor de celulasas.....	44
3.2 Microscopía de barrido electrónico de AUG42.....	44
3.3 Perfil de crecimiento y cinética de producción de celulasas producidas por <i>Flavobacterium</i> sp. AUG42.....	47
3.3.1 Perfil de crecimiento de <i>Flavobacterium</i> sp. AUG42	48
3.3.2 Cinética de producción de celulasas de AUG42	49
3.3.3 Sustratos celulósicos alternativos para inducir la producción de celulasas.....	50
3.3.4 Temperatura óptima para la producción de celulasas.....	51
3.4 Caracterización bioquímica del preparado enzimático.....	53
3.4.1 Determinación de las condiciones de velocidad inicial de la actividad celulasa.....	53
3.4.2 Determinación de la temperatura y pH óptimos	54
3.4.3 Efecto de agentes químicos sobre las actividades enzimáticas	56
3.4.4 Estabilidad de las actividades PASCasa y CMCasa del preparado enzimático	58
3.4.5 Determinación de otras actividades glucolíticas en el preparado enzimático	59
3.4.6 Análisis del secretoma.....	61
3.5 Análisis del genoma de AUG42: Búsqueda de posibles celulasas.....	65

3.6 <i>Shotgun</i> de proteínas, secretoma y genoma de AUG42	68
3.7 Modelado y docking de 265 y 976	72
3.8 Ensayos de sacarificación y fermentación secuencial.....	76
3.8.1 Sacarificación de distintos sustratos.....	77
3.8.2 Búsqueda de condiciones para la sacarificación de CMC	77
3.8.3 Fermentación alcohólica	81
4. Discusión	84
Producción de celulasas en medio líquido.....	84
<i>Flavobacterium</i> sp. AUG42.....	84
Optimización de la producción de celulasas de AUG42.....	85
Condiciones óptimas para la actividad celulasa.....	88
Microscopía electrónica de Barrido Electrónico	93
Otras actividades enzimáticas tipo glicosidasa	94
Genoma y CAZoma.....	95
Caracterización del secretoma de AUG42: zimogramas y espectrometría de masas.....	95
Modelado y docking de las proteínas 265 y 976.....	98
Sacarificación y Fermentación alcohólica	98
Potenciales implicancias de las celulasas producidas por AUG42 en su ambiente natural.....	102
5. Conclusiones y perspectivas.....	104
BIBLIOGRAFÍA.....	105
PUBLICACIÓN ASOCIADA.....	116
ANEXO	125
1. Medios de cultivo	125
1.1 Medio de cultivo M9	125
1.2 Medio de cultivo GS2	125
1.2.2 Soluciones traza utilizadas para 1L de M9 ó GS2	126
1.3 LB.....	126
1.4 Medio ingeniería	126
1.5 Medio Inóculo para <i>S. cerevisiae</i>	127
2. <i>Buffers</i>	127
2.1 <i>Buffers</i> de actividad.....	127
2.1.1. <i>Buffer</i> acetato de sodio 1 M pH 5,5	127
2.1.2 <i>Buffer</i> mezcla.....	127

2.2 <i>Buffer</i> para electroforesis y zimogramas	128
2.2.1 <i>Buffer</i> de corrida 10 X.....	128
2.2.2 <i>Buffer</i> de carga 4 X	128
2.2.3 <i>Buffer</i> Tris 1,5 M pH 8,8	128
2.2.4 <i>Buffer</i> Tris 0,5 M pH 6,8	128
3. Geles de poliacrilamida	129
3.1 Gel concentrador 6%.....	129
3.2 Gel separador 10 %	129
3.3 Gel con CMC 14% m/v.....	129
4. Otras mezclas y soluciones.....	130
4.1 Solución de acrilamida/bisacrilamida	130
4.2 PASC: <i>Phosphoric acid swollen cellulose</i> , sustrato de PASCasas.....	130
4.3. Reactivo DNS	130
4.4. Tinción con R-250.....	131
4.5. Tinción con G-250.....	131
5. Curvas de calibración	132
5.1 Glucosa por el método de DNS	132
5.2. Etanol por GC-FID	133

Agradecimientos:

A todas las instituciones que hicieron posible el desarrollo de mi maestría, en particular a la Universidad de la República y al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas.

A las instituciones financiadoras de mi posgrado: la Agencia Nacional de Investigación e Innovación y la Comisión Académica de Posgrados. A la comisión CABBIO por las becas en cursos de posgrado.

A mis orientadoras, la Dra. Susana Castro y la Dra. Laura Franco Fraguas por su constante apoyo durante la ejecución de la maestría y la redacción del trabajo.

A los integrantes del Tribunal de Tesis por aceptar ser parte de él.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 314, por el excelente ambiente de trabajo y su constante colaboración en cada experimento.

A la sección de Bioquímica de Facultad de Ciencias, a la Cátedra de Bioquímica de Facultad de Química, al Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable y al Laboratorio Tecnológico del Uruguay.

A mis amigos de Facultad, a mis amigas de la vida.

A mi novio y su familia, por el apoyo constante.

A mi familia: en especial a mi mamá, mi hermana, mi cuñado, Emi e Ián por llenarme de alegría, brindarme amor y apoyo constantemente.

Abreviaciones

AA: *auxiliary activities* (enzimas con actividades auxiliares a otras CAZymas)

CAZymes: *Carbohydrate Active enZymes* (CAZymas: enzimas activas en carbohidratos)

CBM: *Carbohydrate-Binding Module* (modulo de union a carbohidrato)

CDH: *cellobiose dehydrogenase* (enzima que oxida a la celobiosa)

CE: *carbohydrate esterase* (enzima esterasa de carbohidratos)

CMC: carboximetilcelulosa

DNS: *Dinitrosalicylic acid* (ácido 3,5-Dinitrosalicílico)

EC: *Enzyme Comission* (Comisión de Enzimas)

GC-FID: cromatografía de gases con detector de ionización de llama

GH: *glycosyl hydrolase* (enzima hidrolasa de carbohidratos)

GT: *glycosyl transferase* (enzima transferasa de carbohidratos)

IEF: Isoelectroenfoque

LPMO: *lytic polysaccharide monoxygenases* (enzimas que despolimerizan carbohidratos por mecanismos oxidativos)

PAGE: *polyacrylamide gel electrophoresis* (electroforesis en gel de poliacrilamida)

PASC: *phosphoric acid swollen cellulose* (celulosa tratada con ácido fosfórico)

PL: *polysaccharide lyase* (enzima liasa de carbohidratos)

rpm: revoluciones por minuto

SDS: *sodium dodecyl sulfata* (dodecilsulfato sódico)

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SFS: Sacarificación y fermentación simultáneas

PI: Punto isoeléctrico

UFC: unidades formadoras de colonia

UV: Ultra violeta

Resumen

La celulosa es el biopolímero más abundante de la Tierra, y representa una materia prima para variados rubros de la industria, destacándose en este trabajo su uso en la obtención de bioetanol. La degradación biológica de la celulosa la realiza un conjunto de enzimas denominadas celulasas. Estas enzimas son producidas por un grupo amplio de organismos, principalmente hongos y bacterias. En la industria del bioetanol, las celulasas se utilizan para sacarificar material celulósico y así obtener azúcares fermentables. Este proceso generalmente requiere de altas temperaturas, ya que durante el mismo se suelen utilizar enzimas mesófilas (con temperaturas óptimas de actividad superiores a la temperatura ambiente, producidas por microorganismos mesófilos). Luego de la sacarificación, se debe enfriar el material sacarificado para agregar el microorganismo fermentador y comenzar la producción de bioetanol. Estos procesos podrían realizarse en forma simultánea utilizando celulasas psicrófilas, las cuales son activas a temperaturas más bajas que las enzimas mesófilas (cercana a la temperatura de fermentación), ahorrando así tiempo y energía.

En esta Tesis se presenta la optimización de la producción de celulasas extracelulares provenientes de un microorganismo antártico: *Flavobacterium* sp. AUG42. Se estudió la cinética de producción de estas enzimas y se obtuvo un preparado enzimático con actividad celulasa. Mediante zimogramas, espectrometría de masas y análisis del genoma anotado, se determinó que el preparado presenta numerosas CAZymas (enzimas activas sobre carbohidratos), incluyendo varias celulasas. Los estudios de condiciones óptimas de actividad mostraron que éstas son estables a bajas temperaturas e inestables a altas temperaturas, y conservan el 100 % de actividad luego de ser liofilizadas. A su vez, son activas en condiciones de pH y temperatura compatibles con los procesos de sacarificación y fermentación simultánea. Dos de estas celulasas se seleccionaron para realizar estudios de modelado y “docking” con sustratos celulósicos *in silico*, los cuales mostraron que se trataría en ambos casos, de endocelulasas. El preparado puede sacarificar diferentes materiales celulósicos, siendo la carboximetilcelulosa el sustrato que libera mayor cantidad de azúcares reductores en las condiciones ensayadas. Por ello, se lo seleccionó para realizar ensayos de sacarificación (con el preparado enzimático) y fermentación (con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1). El potencial de sacarificación del preparado fue bajo, y consecuentemente se obtuvo una baja producción de bioetanol, determinado por GC-FID. Como perspectiva se buscará optimizar la producción de estas enzimas mediante tecnología de ADN recombinante, en otro hospedero. Parte de los resultados están publicados en un artículo, adjuntado al final de esta Tesis.

1. Introducción

La celulosa es el biopolímero más abundante de nuestro planeta, pues se estima que anualmente se producen más de $1,5 \times 10^{12}$ toneladas de celulosa (Klemm et al., 2005). Desde épocas tempranas la celulosa ha despertado el interés humano, teniendo relevancia desde lo cultural (los egipcios y sus papiros), hasta lo textil (telas de algodón). Hoy en día, la celulosa tiene múltiples usos en la vida cotidiana y abarca importantes industrias. La celulosa se utiliza como materia prima para la fabricación de muchos productos: algunos compuestos de la industria farmacéutica (excipientes de medicamentos, laxantes, emulsificantes, entre otros); materiales de laboratorio (filtros, matrices de uso bioquímico); sensores (UV, humo, humedad), entre otros. Aparte de los usos mencionados, la celulosa es una fuente renovable de azúcares que se pueden fermentar para la producción de biocombustibles, como el bioetanol (Ueda et al., 1994; Ummartyotin & Manuspiya, 2015). Aunque la celulosa tiene amplios usos, esta Tesis se focalizará en el último punto mencionado: **el uso de la celulosa para la producción de un biocombustible: el bioetanol.**

La celulosa es sintetizada por un importante grupo de organismos: algunos del dominio Bacteria, animales (tunicados), la mayor parte de las algas y todas las plantas (Wilson, 2011). En especial, como se mencionará a continuación, estas últimas contienen celulosa tanto en la pared vegetal primaria como en la secundaria, y son las responsables de producir la mayor parte de este tipo de biomasa.

1.1 Pared celular vegetal

La principal reserva de carbohidratos de nuestro planeta está presente en la biomasa vegetal. Las paredes celulares de las plantas están compuestas por diversos carbohidratos, entre los que se destaca la celulosa (polisacárido que es uno de los puntos claves del trabajo de esta tesis). La pared celular tiene numerosas funciones en la planta, pues representa una continuidad molecular con la membrana celular y el citoesqueleto, por lo que resulta esencial para mantener la forma de la célula y responder frente al estrés osmótico. Esta estructura es fundamental para algunas células diferenciadas, por ejemplo las células que forman tejidos vasculares (xilema y floema), encargados del transporte de agua, nutrientes y savia elaborada por toda la planta. Por otro lado, cuando se produce un daño físico en la pared (ambiental o por patógenos), ésta responde produciendo

moléculas señales: péptidos y oligosacáridos, denominados DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) que son reconocidos por complejos proteicos asociados a la membrana, que activan la respuesta inmune (Bacete et al., 2018; Carpita & Gibeaut, 1993).

La composición química de la pared celular vegetal varía según la especie, el tejido, el estado fisiológico y la etapa de crecimiento de la planta. Brevemente, se pueden describir en ella dos niveles estructurales: una pared celular primaria, que rodea las células capaces de crecer o en crecimiento, y una pared celular secundaria, que rodea a las células que ya dejaron de crecer (Keegstra, 2010). La pared celular primaria está compuesta por microfibras de celulosa, asociadas mediante enlaces cruzados con otros polisacáridos, como la hemicelulosa y la pectina (ver Figura 1.1). La pectina a su vez es el principal componente de la lámina media, estructura más externa de la pared celular (Alberts et al., 2002; Wang et al., 2018).

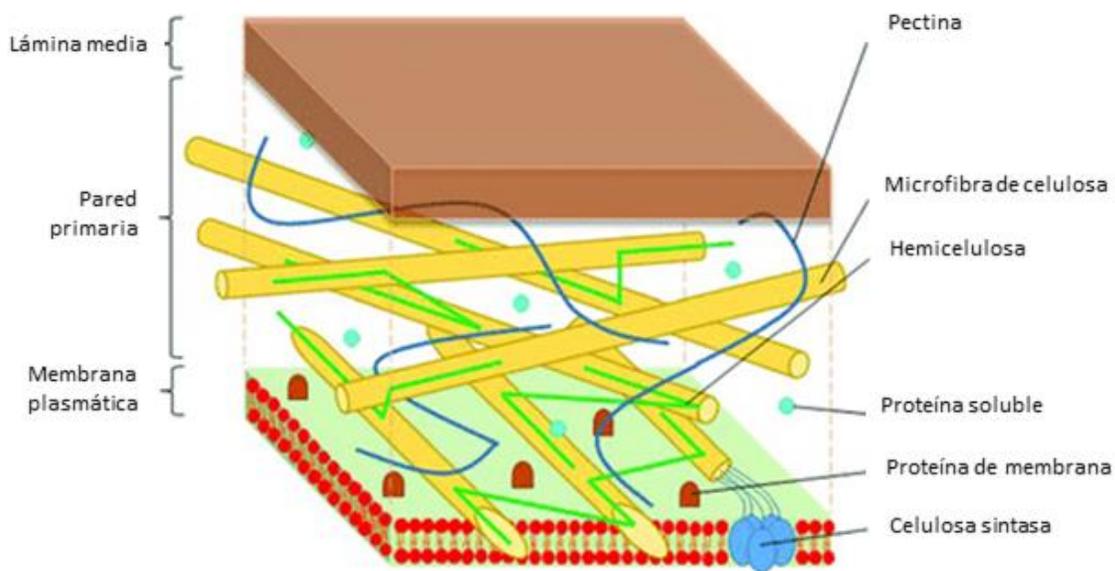


Figura 1.1. Modelo de pared celular vegetal primaria. Modificación de imagen extraída del trabajo publicado por Loix et al., (2017).

La pared celular secundaria (Figura 1.2) presenta una composición similar a la pared primaria, pero en vez de presentar pectina, tiene lignina. Este último, hace a la pared celular más rígida e impermeable (Vanholme et al., 2010).

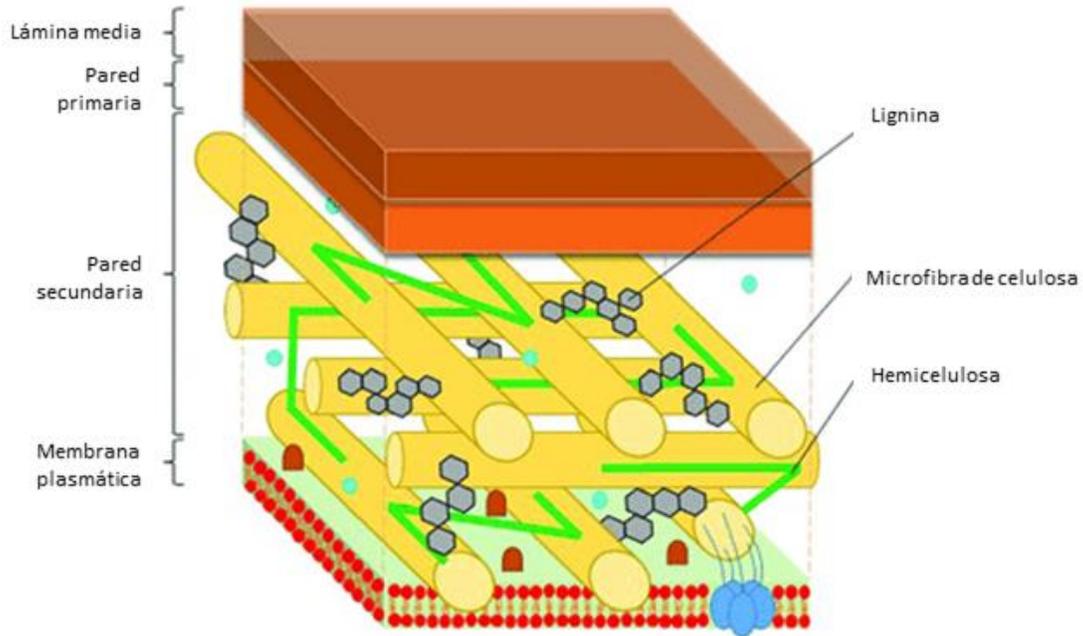


Figura 1.2. Modelo de pared celular vegetal secundaria. Modificación de imagen extraída del trabajo publicado por Loix et al., (2017).

¿Cómo es la estructura química de los polímeros de la pared celular?

La lignina es un heteropolímero formado por diversos compuestos aromáticos (Figura 1.3). Es el principal componente no-carbohidrato de la pared celular secundaria.

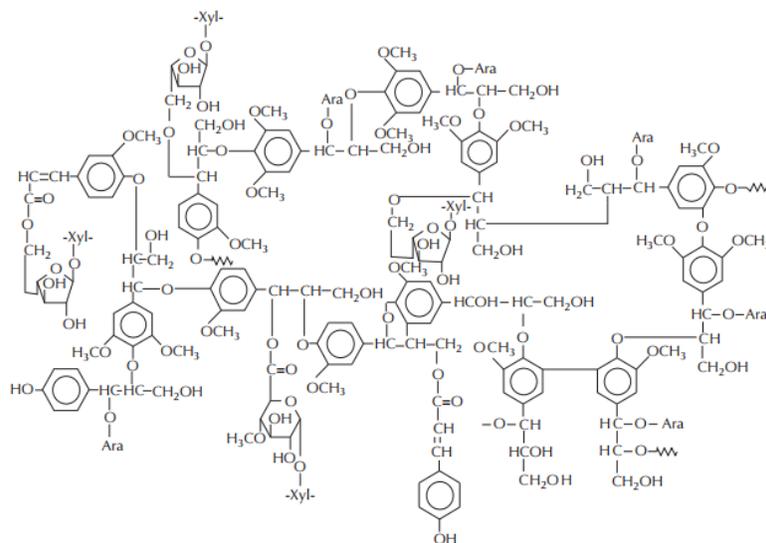
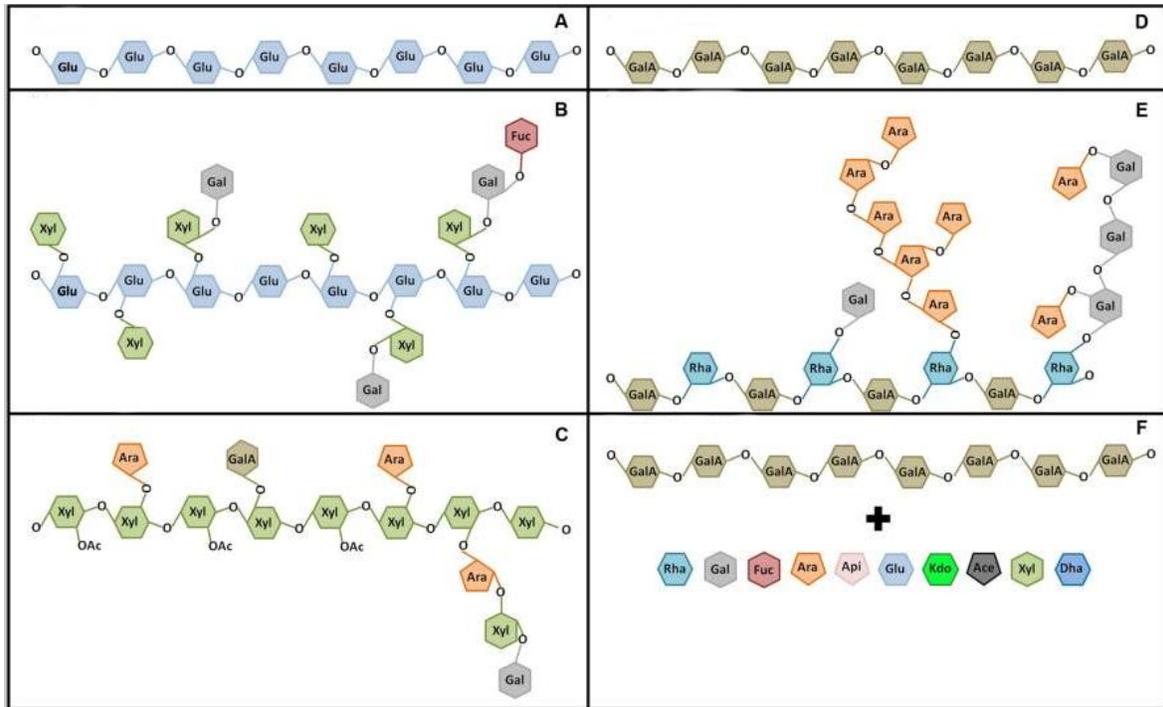


Figura 1.3. Modelo de estructura de lignina de paja de trigo. Imagen extraída del capítulo “Structure, ultrastructure, and chemical composition” del libro *Cereal straw as a resource for sustainable biomaterials and biofuels* (Xu, 2010).

La hemicelulosa y la pectina son heteropolisacáridos de composición muy variable (ver Figura 1.4). La hemicelulosa está compuesta por xilanos y xiloglucanos (polímeros de arabinosa, xilosa, manosa, galactosa, glucosa, entre otros, y modificaciones de éstos; por ejemplo con grupos acetilo). La pectina está formada principalmente por homogalacturonano, ramnogalacturonano I y ramnogalacturonano II (polímeros formados principalmente por ácido galacturónico, galactosa, ramnosa y arabinosa, entre otros; sin o con modificaciones tales como acetilaciones, metilaciones).



 Ramnosa	 Glucosa
 Galactosa	 3-desoxi-D-mano-oct-2-ácido ulusónico
 Fucosa	 O-acetil-L-acido acérico
 Arabinosa	 Xilosa
 Apiosa	 3-deoxy-D-lyxo-heptulosaric acid

- A. Celulosa
- B. Xiloglucano
- C. Xilano
- D. Homogalacturonano
- E. Ramnogalacturonano I
- F. Ramnogalacturonano II

Figura 1.4. Esquema de las estructuras de los polisacáridos más abundantes de la pared celular de la raíz de *Arabidopsis*. Imagen extraída y modificada del trabajo “Cell Wall Heterogeneity in Root Development of *Arabidopsis*” (Somssich et al., 2016).

La celulosa en cambio es un homopolímero, compuesto por un solo monosacárido: glucosa. Las moléculas de glucosa (D-glucosa) se encuentran unidas por enlaces glucosídicos del tipo β -1,4, que suelen formar cadenas largas. La cantidad de glucosas unidas determina el largo de la cadena, precisamente el grado de polimerización (Klemm et al., 2005). En una molécula de celulosa hay dos extremos: uno no reductor que contiene el OH original en el C₄ de la glucosa, y otro reductor que tiene el OH en el C₁ en equilibrio con su estructura aldehídica (ver Figura 1.5).

La celulosa es insoluble en agua y en muchos solventes orgánicos, pero se puede disolver en agua a pH extremos, en particular si se agrega un co-soluto de polaridad intermedia. La insolubilidad en agua se debe a la importante interacción de los enlaces de hidrógeno entre las moléculas de celulosa que mantienen unidas fuertemente las cadenas, formando fibras de longitud y espesor variable (Medronho et al., 2012).

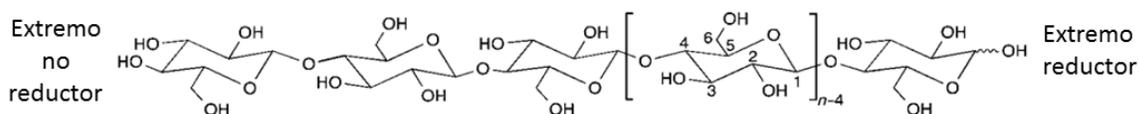


Figura 1.5. Estructura de molécula de celulosa (conformación silla). n indica el grado de polimerización. Imagen tomada y modificada del trabajo de Klemm et al. (2005).

Mediante difracción de rayos X, Fink et al. (1987) distinguieron regiones cristalinas y regiones amorfas, en la estructura de celulosa purificada. Las regiones cristalinas reciben este nombre por el patrón de difracción que producían (patrón de difracción no difuso y bien definido, característico para cada tipo de celulosa), mientras que las regiones amorfas se denominan así porque irrumpen la continuidad de la estructura cristalina. Los estudios mediante rayos X permitieron comprobar que la posición de los enlaces de hidrógeno intercatenarios (intermoleculares) condiciona la estructura de la celulosa, resultando en estructuras amorfas o cristalinas, de distintos tipos.

Dentro de los polimorfismos existentes en la celulosa, los más importantes están dados por las conformaciones estereoquímicas de los sustituyentes hidroximetilados respecto a la piranosa, pues éstos son quienes forman enlaces de hidrógeno con las moléculas cercanas. Esto es la causa de las diversas estructuras de la celulosa, por ejemplo la celulosa cristalina I y la celulosa cristalina II que se muestran en la Figura 1.6.

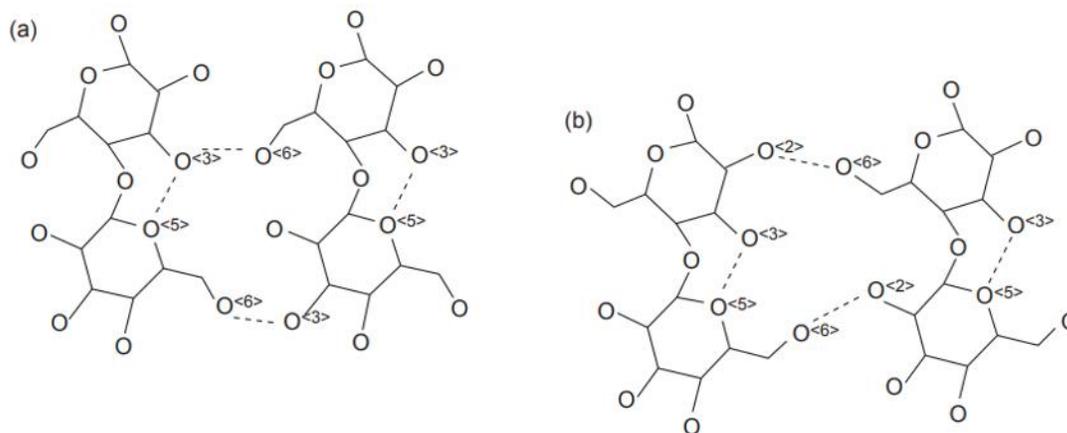


Figura 1.6 Proyección planar de estructuras de celulosa cristalina de celulosa I (a) y celulosa II (b). En línea punteada se muestra el patrón de enlaces de hidrógeno formados entre las cadenas de celulosa. Imagen extraída del trabajo publicado por O'Sullivan (1997).

Algunos tratamientos en medio ácido, modifican la estructura de la celulosa cristalina, transformándola en estructuras con un mayor contenido amorfo. Por ejemplo, cuando se trata la celulosa con ácido fosfórico se obtiene lo que se denomina PASC (sigla proveniente del inglés *phosphoric acid swollen cellulose*) (Reese, 1956).

Otros tratamientos permiten solubilizar la celulosa mediante la adición de grupos más hidrofílicos, por ejemplo por la adición de grupos carboximetilos, para producir carboximetilcelulosa (CMC) (Figura 1.7). Ésta se forma por una reacción entre la celulosa y moléculas de monocloroacetato de sodio; siendo este último el que reacciona con el hidroxilo del carbono C₂, C₃ o C₆ de la glucosa, y forma un enlace éter. Estos sustituyentes poseen un carboxilo ionizado en su extremo, que favorece su interacción con el agua mediante interacciones ion-dipolo, y por lo tanto aumentan su solubilidad (Early, 1998).

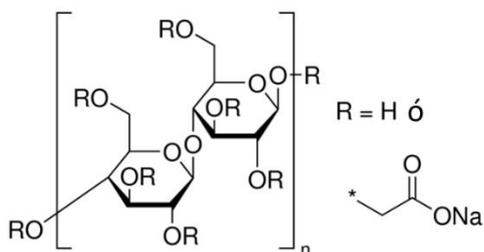


Figura 1.7. Esquema de la estructura de carboximetilcelulosa (CMC). Los R son los sustituyentes del oxígeno, que pueden ser H (hidrógenos) o carboximetilos. Imagen modificada, tomada del catálogo de SIGMA-ALDRICH (<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/419311?lang=en®ion=UY>).

1.2 Celulasas

Las celulasas son las enzimas responsables de la degradación de la celulosa. Según el lugar de la molécula de celulosa que ataquen, se pueden clasificar como endocelulasas, exocelulasas o β -glucosidasas. Cuando las enzimas atacan la celulosa en el interior de la cadena polisacáridica en forma aleatoria, se dice que son endocelulasas, y su producto final suele ser variable (cadenas de tres o más unidades de glucosa). La actividad exocelulasas, refiere a aquellas enzimas que atacan la molécula desde los extremos de la cadena (ya sea el extremo reductor o no reductor), y su producto es la celobiosa (disacárido de glucosa) o glucosa. La actividad β -glucosidasas, refiere a la degradación de celobiosa cuyo producto de degradación sería la glucosa (Hu & Ragauskas, 2012; Saha et al., 1994; Sarkar & Etters, 2001; Christakopoulos et al., 1999) (Figura 1.8).

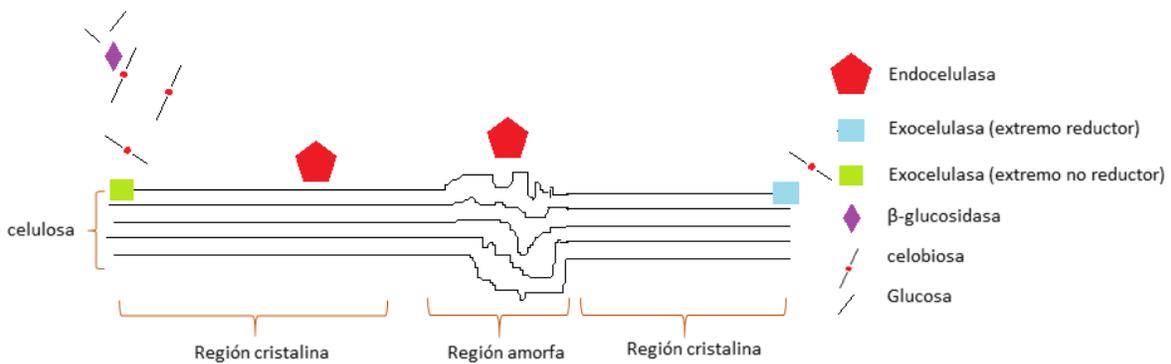


Figura 1.8. Esquema que representa la estructura de la celulosa (regiones cristalinas y amorfas) y las celulasas involucradas en su degradación.

Las celulasas más estudiadas han sido las glicosil hidrolasas (GHs), encargadas de hidrolizar los enlaces glicosídicos, pero también existen otras celulasas clasificadas en diversos grupos. Para comprender la clasificación de las celulasas, y de todas las enzimas involucradas en el metabolismo de los carbohidratos, a continuación se hablará de las CAZymas (del inglés *CAZymes: Carbohydrate Active enZymes*).

1.3 CAZymas

Debido a la enorme diversidad estructural de los carbohidratos, los organismos producen una gran variedad de enzimas que actúan sobre los mismos, tanto en su síntesis como en su degradación

(Cantarel et al., 2008). Al igual que el resto de las enzimas, estas son clasificadas de acuerdo a su actividad por la Comisión de Enzimas (*Enzyme Commission*; EC). Sin embargo, debido a la presencia de una evolución convergente y a la diversidad de sustratos que acepta una misma enzima, se vio la necesidad de realizar otra clasificación, complementaria a la EC (Henrissat, 1991). Desde entonces, colectivamente se nombró CAZymas a aquellas proteínas con dominios involucrados en el metabolismo de carbohidratos (Aspeborg et al., 2012). Aquellos dominios proteicos que presentan homología de secuencia, de estructura tridimensional y al menos uno de ellos está caracterizado bioquímicamente (se conocen el sustrato y el mecanismo de acción), se agrupan en una misma categoría (ver a continuación: GH, GT, entre otras) y una misma familia, identificada con un número (Lombard et al., 2013). Las categorías son:

- GH (del inglés *Glycosyl Hydrolase*), que incluye enzimas con dominios con actividad glicosidasa o transglicosidasa;
- GT (*Glycosyl Transferase*), grupo que involucra dominios que catalizan la formación de enlaces glicosídicos;
- PL (*Polysaccharide Lyase*), que hidrolizan enlaces glicosídicos de polisacáridos que contienen ácido urónico;
- CE (*Carbohydrate Esterase*) que hidrolizan grupos éster presentes en carbohidratos;
- AA (*Auxiliary Activities*), generalmente con actividad oxidasa tales como: ligninoperoxidasas, involucradas en la degradación de materiales lignocelulósicos; LPMOs (del inglés *lytic polysaccharide monoxygenases*); CDHs (del inglés *cellobiose dehydrogenases*), que oxidan celobiosa, entre otras.

Las categorías arriba descritas hacen referencia a dominios catalíticos o actividades específicas; pero también están los dominios no catalíticos, los CBM (*Carbohydrate-Binding Module*), que colaboran en la interacción CAZYma-carbohidrato (Cantarel et al., 2008; Levasseur et al., 2013).

Para clasificar, organizar y comparar este tipo de proteínas, existe una base de datos (CAZy; <http://www.cazy.org>) donde se registran las secuencias proteicas y su respectiva clasificación; y servidores tales como dbCAN (*DataBase for automated Carbohydrate-active enzyme ANnotation*, <http://csbl.bmb.uga.edu/dbCAN/>) que permite anotar las CAZymas presentes en los genomas, metagenomas, o cualquier secuencia proteica (Kameshwar & Qin, 2016; Yin et al., 2010). En particular al conjunto de CAZymas presentes en el genoma de un organismo, se le denomina CAZoma.

Si bien en esta tesis se focalizará en el estudio de las GHs que hidrolizan celulosa, es necesario aclarar que algunas GHs de las familias 13, 65, 94, 112 y 130 no son hidrolasas, son celulasas fosforilasas que actúan sobre la celulosa usando pirofosfato como nucleófilo en vez de agua, en una reacción de fosforólisis, liberando glucosa-1-fosfato (Nihira et al., 2013; Saranraj et al., 2012).

Aparte de las GHs, como ya se mencionó, existen celulasas oxidativas agrupadas dentro de las *Auxiliary Activities* (AAs). Las CDHs (celobiosa deshidrogenasas), oxidan la celobiosa a celobiolactona, utilizando quinonas como aceptores de electrones (Cameron & Aust, 2001; Cohen et al., 1997), o sin aceptor aromático produciendo radicales libres (reacción de Fenton); estos radicales libres atacarían los enlaces β -1,4 de la celulosa produciendo su ruptura (Henriksson et al., 2000). Las LPMO pueden cortar cadenas de celulosa atacando el oxígeno del hidroxilo unido al C₁ o C₄ del azúcar, provocando la descristalización del polímero, y con ello, facilitando el acceso de otras celulasas para despolimerizar la molécula de celulosa.

1.3.1 Glicosil hidrolasas

Particularmente las GHs pueden clasificarse a *grosso modo* según la estructura tridimensional del sitio activo, tal como se muestra en la Figura 1.9. Las endoglucanasas (denominadas así por hidrolizar los enlaces internos de los polisacáridos) suelen presentar un sitio activo abierto en forma de hendidura o surco; las exoglucanasas (hidrolizan el polisacárido desde el extremo de la cadena), suelen presentar un sitio activo en forma de túnel; y las β -glucosidasas (atacan el enlace glicosídico de disacáridos o glicoconjugados) suelen presentar un sitio activo en forma de bolsillo, tal como se muestra en la Figura 1.7 (Davies & Henrissat, 1995; Hildén & Johansson, 2004).

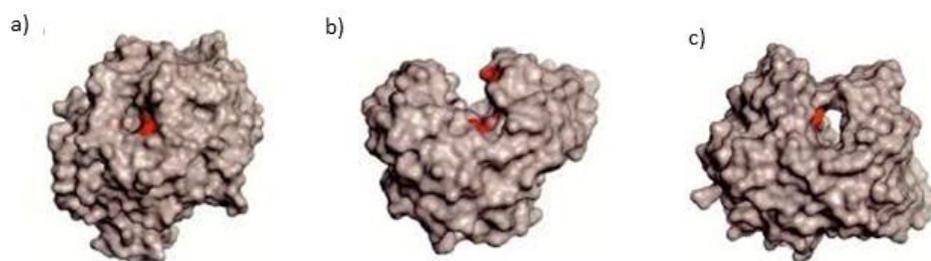


Figura 1.9. Tres tipos de sitios activos presentes en glicosil hidrolasas. a) Sitio activo en forma de bolsillo (glucoamilasa de *Aspergillus awamori*), b) en forma de canal o surco (endoglucanasa de *Trichoderma fusca* y c) de túnel (celobiohidrolasa de *Trichoderma reesei*). Imagen extraída y modificada del artículo de Davies & Henrissat (1995).

Esta clasificación es una simplificación, ya que se han descrito “endoglucanasas” (sitio activo en forma de surco) con acción “*exo-like procesive*”: actividad tipo exoglucanasa (ya que ataca la cadena desde el extremo de la cadena) y procesiva (porque libera el producto de hidrólisis mientras permanece firmemente unida a la cadena de polisacárido); y algunas exocelulasas pueden abrir el sitio activo en forma de túnel, quedando como canal, para permitir una acción significativa tipo endoglucanasa (Hildén & Johansson, 2004).

1.4 Celulasas y la industria:

Las celulasas y hemicelulasas ocupan el 20 % del mercado mundial de enzimas (Mantyla et al., 1998; Bhat, 2000) y tienen numerosas aplicaciones industriales.

En la industria textil, las celulasas se utilizan para el tratamiento de telas producidas con fibras de celulosa (como el algodón) y el lavado de las mismas, pues las celulasas se agregan a detergentes para ropa junto a otras enzimas (como lipasas y proteasas) para optimizar su limpieza y tratamiento. Las celulasas al ponerse en contacto selectivamente con las fibras de celulosa, disminuyen la hidrofobicidad de la tela, facilitando la limpieza. A su vez, mejoran la apariencia del tejido, ya que eliminan fibrillas que se desprenden durante el uso, dejando la superficie más lisa y suave, con el color más visible (Belghith et al., 2001; Cavaco-Paulo, 1998; Ibrahim et al., 2011; Kuhad et al., 2011). En la industria alimenticia, las celulasas se utilizan para la extracción de jugos vegetales, producción de néctares y purés, en la extracción de aceite de oliva, tratamiento de semillas y granos. También se usan en la elaboración de cerveza, vino, en la extracción de carotenoides, entre otros. Se aplican además en la industria de panificados, para aumentar la cantidad de monosacáridos en la masa, incrementando así su elasticidad (Coughlan & Folan, 1979; Nadeem et al., 2009). Además, las celulasas se agregan como aditivos en forrajes, optimizando las propiedades nutritivas de los alimentos al facilitar su digestión (Saranraj et al., 2012).

En la industria papelera, las celulasas y hemicelulasas se utilizan en la obtención y tratamiento de pulpa de celulosa (para reducir asperezas e incrementar el brillo de las fibras de celulosa). A su vez, se utilizan para el tratamiento del papel a reciclar pues las celulasas ayudan a desprender los colorantes presentes en estos, facilitando su reciclaje (Bhat, 2000).

El uso de las celulasas para la degradación (sacarificación) de residuos vegetales representa una prometedora forma de obtener azúcares; y éstos se pueden fermentar para producir etanol. Este etanol de celulosa se conoce con el nombre de “oro verde” (Pichs, 2008) y puede utilizarse como

biocombustible, con algunas ventajas: la obtención de alcohol a partir de una fuente renovable, y la utilización de materiales celulósicos considerados subproductos industriales (Chandel et al., 2012; Knauf & Moniruzzaman, 2004; Zittelli et al., 2013).

Las celulasas son ampliamente demandadas por varias industrias que requieren que estas enzimas actúen en diversas condiciones bioquímicas. Por ejemplo, las celulasas siccófilas podrían utilizarse en la producción de bioetanol para degradar el material celulósico, al mismo tiempo que las levaduras mesófilas (como *Saccharomyces cerevisiae*) fermentan los azúcares liberados, ya que ambos procesos (sacarificación con la enzima siccófila y fermentación) podrían realizarse en un mismo rango de temperatura (Cinelli et al., 2015). Este punto, incluyendo la definición de enzimas siccófilas, será tratado posteriormente en esta sección.

1.5 Producción de celulasas

Las celulasas son enzimas producidas por seres vivos de todos los reinos, destacándose los del reino Procariota y el Fungi (Hildén & Johansson, 2004). En sentido estricto, los verdaderos microorganismos celulolíticos son aquellos capaces de degradar celulosa natural y convertirla en azúcares simples, mediante la acción de enzimas denominadas celulasas (Pringsheim, 1912). Desde 1950 se conoce que la degradación de celulosa debía realizarse al menos en dos pasos: 1) degradación de celulosa natural por celulasas, hasta obtener oligosacáridos lineales (paso que se realiza únicamente por microorganismos celulolíticos) y 2) conversión de los oligosacáridos en azúcares simples, como la glucosa (paso realizado por microorganismos celulolíticos o no celulolíticos en sentido estricto) (Reese et al., 1950). Hoy en día se sabe que el proceso es muy complejo e involucra una gran variedad de CAZymas específicas para los diferentes tipos de celulosa en cuestión.

La mayoría de los microorganismos aeróbicos que producen celulasas producen enzimas individuales o libres, es decir enzimas que no están asociadas con otros complejos proteicos. Estas suelen tener un dominio catalítico unido por un “brazo” flexible a un dominio de unión a carbohidratos. Estas celulasas, si bien se encontrarían libres en el exterior celular, suelen actuar de manera sinérgica con otras celulasas de distinta especificidad para degradar la celulosa, aumentando su actividad específica cuando actúan en conjunto, respecto a las enzimas individuales. Otros microorganismos (específicamente bacterias anaeróbicas) suelen producir un complejo multienzimático denominado celulosoma (Wilson, 2011), que se mantiene anclado a la membrana

celular mediante una proteína de anclaje, y mantiene las distintas actividades celulolíticas en un mismo complejo, facilitando la hidrólisis de los sustratos. En la Figura 1.10 se muestra un modelo de celulosoma, en el cual se detallan las proteínas involucradas: una proteína de anclaje, una escafoldina (con CBM) y varias subunidades enzimáticas, unidas entre sí por dominios cohesina-dockerina.

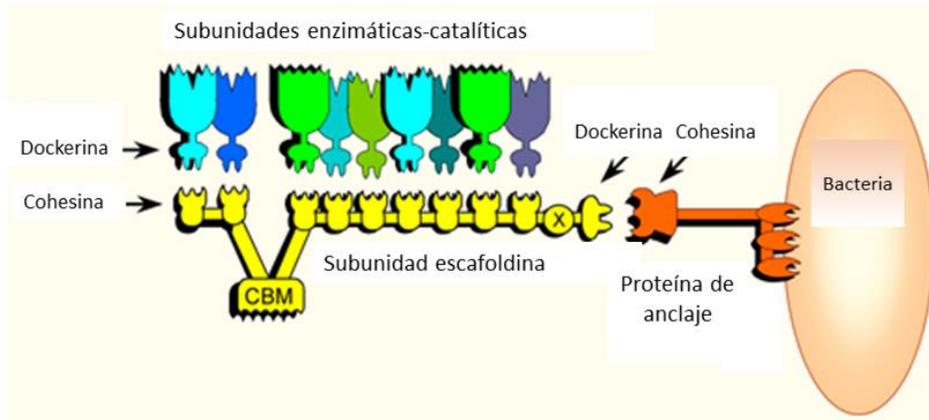


Figura 1.10. Modelo de celulosoma, tomado de (“Cellulosome Systems | Ed Bayer’s Group,” n.d.). En color naranja se muestra la proteína de anclaje a la bacteria, con un dominio cohesina. Ese dominio cohesina se adhiere al dominio dockerina de la siguiente subunidad: la escafoldina (color amarillo). La escafoldina contiene un dominio de unión a carbohidratos (CBM) y numerosos dominios cohesina, que a su vez interactúan con los dominios dockerina de las distintas subunidades enzimáticas-catalíticas (colores celeste, azul, verde).

1.6 Microorganismos adaptados al frío y celulasas sicrofílicas

Los microorganismos han colonizado prácticamente todo el planeta y su adaptación a distintos ambientes se ha acompañado por una adecuación metabólica que les permite vivir en diferentes ambientes, incluso en condiciones humanamente extremas (baja concentración de oxígeno o nutrientes, ambientes muy ácidos o muy básicos, muy calientes o muy fríos, entre otros).

En este trabajo se enfatizará en los microorganismos adaptados a vivir a bajas temperaturas: los sicrofílicos y los sicrotolerantes o sicrotrofos. Estos términos datan ya desde principios del siglo XX, donde Schmidt-Nielsen (1902) denominó microorganismos sicrofílicos a aquellos capaces de crecer a 0 °C. Luego, Morita (1975) los redefinió como aquellos que tienen temperatura óptima de crecimiento igual o inferior a 15 °C, máxima a los 20 °C o menor, y mínima a los 0 °C o inferior (Kasana & Gulati, 2011; Morita, 1975). Los microorganismos sicrotolerantes o sicrotrofos, son aquellos cuya

temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 15 y 20 °C y la temperatura máxima a la cual puede crecer es superior a los 20 °C (Moyer & Morita, 2007).

Estos microorganismos han desarrollado varias estrategias para sobrellevar estas condiciones, entre las que se encuentran la producción de ácidos grasos insaturados que le dan mayor flexibilidad a sus membranas, la producción de moléculas anticongelantes, etcétera. Entre estas adaptaciones también está la producción de enzimas activas a bajas temperaturas, enzimas denominadas psicrófilas (Rodrigues & Silva, 2016).

Estas enzimas poseen alta eficiencia catalítica a temperaturas más bajas comparadas con las enzimas producidas por microorganismos mesófilos y termófilos (microorganismos con temperaturas óptimas de crecimiento entre 20 y 45 °C y por encima de 45 °C, respectivamente) (Smith et al., 1960; Szilágyi & Závodszky, 2000). Además de presentar alta eficiencia catalítica a bajas temperaturas, las enzimas psicrófilas presentan termolabilidad, inactivándose con pequeños aumentos de temperatura. Debido a estas propiedades bioquímicas, las enzimas psicrófilas pueden ser un insumo importante para algunas industrias, especialmente cuando hay que llevar a cabo procesos a bajas temperaturas (por ejemplo, por la inestabilidad de los productos, o para reducir costos energéticos).

1.7 Biocombustibles: la celulosa como fuente de azúcares para la producción de bioetanol

Los biocombustibles son aquellos combustibles obtenidos a partir de biomasa, tales como plantas, algas, residuos animales, entre otros.

Estos pueden clasificarse en primarios o secundarios. Los primarios son los utilizados en forma no procesada (como madera utilizada para obtener energía calorífica o eléctrica). Los biocombustibles secundarios se producen mediante el procesamiento de la biomasa renovable: por ejemplo el bioetanol y el biodiesel. Estos últimos suelen ser más fáciles de transportar comparados con los primarios, y producen residuos gaseosos luego de su combustión, lo que permite su utilización en vehículos y en diversos procesos industriales. A su vez, los biocombustibles secundarios se dividen en biocombustibles de primera, segunda y tercera generación en base al sustrato o la materia prima utilizada para su producción (Nigam & Singh, 2011; Pandey & Tewari, 2018). Los de primera generación se producen a partir de semillas o azúcares; los de segunda generación, a partir de

biomasa no alimentaria, ejemplo: residuos lignocelulósicos; y los de tercera generación a partir de biomasa de microorganismos que no compiten con la producción de alimentos, por ejemplo microalgas (Chakraborty et al., 2012).

En la próxima sección se profundizará en los biocombustibles de segunda generación; en especial el bioetanol.

1.8 Bioetanol

El bioetanol es un biocombustible secundario que se puede producir a partir de diversas fuentes de biomasa. En nuestro país la empresa ALUR (Alcoholes del Uruguay) produce bioetanol a nivel industrial a partir de jugo y melaza de caña, y jugo de sorgo dulce; es decir, de acuerdo a las definiciones antes mencionadas, se produce bioetanol de primera generación. Una vez extraídos los jugos y melaza, la biomasa lignocelulósica excedente se utiliza como biocombustible primario, ya que se quema para producir energía (“ALUR - Complejo Agroenergético - Bella Unión, Artigas,” n.d.). No obstante, se podría utilizar esa biomasa lignocelulósica para producir bioetanol de segunda generación.

Para producir bioetanol de segunda generación se deben seguir los siguientes pasos: 1) Pretratamiento del sustrato: químico (ácidos o bases fuertes), físico (alta presión y temperatura) y/o bioquímico (enzimas deslignificantes), 2) Sacarificación: proceso de liberación de azúcares fermentables a partir de polisacáridos vegetales, 3) Fermentación alcohólica, generalmente llevada a cabo por levaduras y 4) Destilación del producto de interés: el bioetanol (Chakraborty et al., 2012).

1.8.1 Sacarificación

Este proceso se lleva a cabo por enzimas del tipo CAZymas, que actúan en conjunto para liberar azúcares fermentables a partir de la celulosa. Este proceso suele llevarse a cabo por enzimas provenientes de microorganismos mesófilos, generalmente producidas por hongos; que actúan a temperaturas bastante elevadas e hidrolizan el sustrato a medida que éste se va enfriando (pues durante el pretratamiento se suele calentar el sustrato, ya que esto además de pre-tratar físicamente el material, lo desinfecta para pasos posteriores). Sin embargo, cuando se eligen otros pretratamientos que no implican elevar la temperatura, las celulasas provenientes de

microorganismos adaptados al frío resultan más eficientes. Además las enzimas psicrófilas podrían continuar sacarificando durante la fermentación (Barroca et al., 2017).

1.8.2 Fermentación

Existen numerosos microorganismos capaces de fermentar azúcares y producir bioetanol. Sin embargo, *Saccharomyces cerevisiae* es el microorganismo elegido por excelencia para este fin por la industria. Esta levadura, además de ser una excelente fermentadora, posee estrategias de adaptación a altas concentraciones de etanol, pudiendo sobrevivir hasta en un 50 % v/v de este producto (a diferencia por ejemplo de *Zymomonas mobilis*, que muere luego de superar 16 % v/v de etanol). En la Figura 1.11 se muestra un esquema de las vías metabólicas relacionadas a la producción de bioetanol de *S. cerevisiae* (Macedo & Brigham, 2014). Se muestra cómo a partir de glucosa, se obtienen como productos etanol, glicerol, acetato y 2,3-butanodiol, siendo el primero de éstos, el producto de mayor concentración. Aun así, continúan los esfuerzos por parte de la comunidad científica, para modificar genéticamente estas levaduras, y sesgar las vías para producir etanol en forma más eficiente (Babrzadeh et al., 2012).

En esta Tesis se trabajó con la cepa de *S. cerevisiae* CAT-1 (gentileza de la Dra. Silvia Batista y la Mag. Karen Malán). Esta es la cepa más utilizada en fermentaciones de caña de azúcar en Brasil, aislada en este país y que a partir de 1998, se utiliza en forma comercial (Basso et al., 2008). Esta cepa es tolerante a altas temperaturas (hasta 42 °C), presenta altas tasas de brote (cel/mL) y de viabilidad celular en la propagación, alto rendimiento fermentativo y velocidad de fermentación (información recabada de <https://Inf.com.br/acucar-e-etanol.html>).

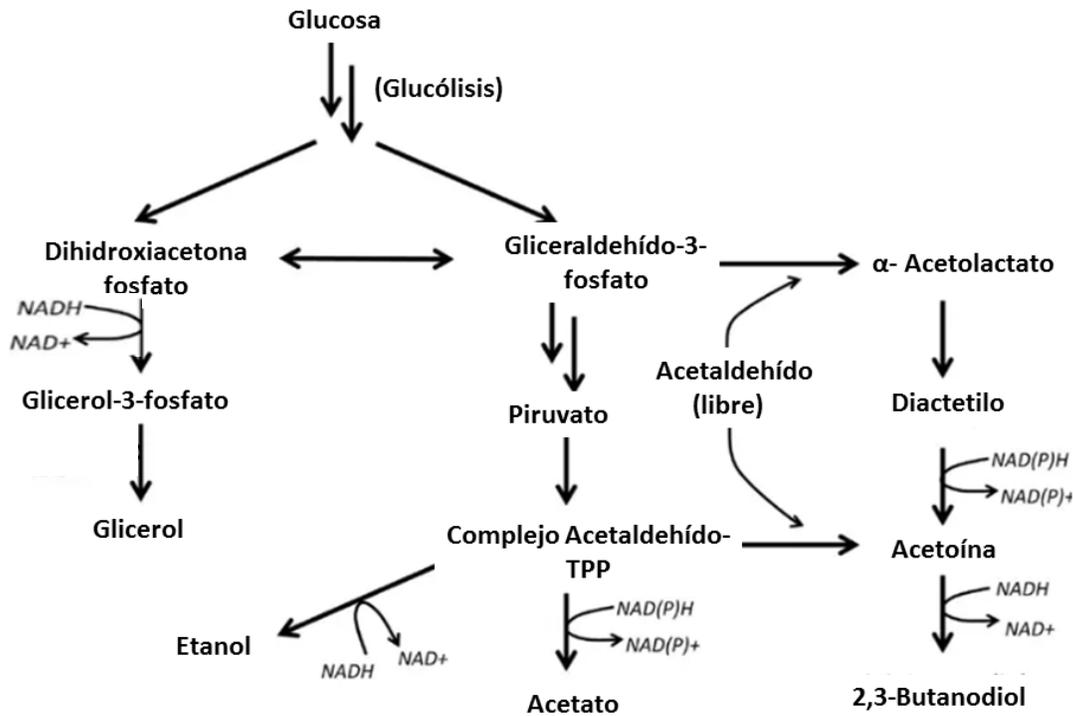


Figura 1.11. Esquema de las vías metabólicas relacionadas al metabolismo fermentativo de *S. cerevisiae*. Esta figura fue traducida al español por quien expone esta Tesis, pero proviene del artículo de Macedo & Brigham (2014).

1.8.3 Sacarificación y fermentación ¿secuencial o simultánea?

Tal como se describió anteriormente, para la obtención de bioetanol de segunda generación se realiza la sacarificación y luego la fermentación en dos pasos independientes. Esto conlleva a un gasto operacional grande, pues: 1) se debe elevar la temperatura del sustrato para ser sacarificado (con celulasas mesófilas), 2) se debe enfriar el sistema, y generalmente ambos procesos (sacarificación y fermentación) suelen realizarse en fermentadores independientes, a temperaturas diferentes, 3) los productos de hidrólisis de la celulosa inhiben las enzimas, por lo tanto se debe utilizar una mayor cantidad de éstas (lo que representa el 20 - 30% del costo de producción del bioetanol) (Hamelinck et al., 2005; Shadbahr et al., 2017).

Una extensa investigación ha demostrado que mediante la sacarificación y la fermentación realizadas de manera simultánea (proceso SFS) se logran mayores rendimientos, ya que los azúcares liberados en la sacarificación se consumen por el microorganismo fermentador (no hay inhibición de las celulasas por el producto). A su vez ambos procesos se llevan a cabo en un mismo fermentador, lo cual disminuye costos operacionales (Cantarella et al., 2004; Shadbahr et al., 2017;

Siriwong et al., 2019). No obstante, el proceso SFS es complejo y su rendimiento está influenciado por muchos factores tales como el tipo de materia prima lignocelulósica, la concentración del sustrato, el tipo y la cantidad de enzimas y/o microorganismos celulolíticos, pH de la solución y temperatura de reacción, agitación, entre otros (Shadbahr et al., 2017). Las condiciones reportadas como óptimas para un proceso SFS serían a pH 5,0 y temperatura de 37 °C (Zhu et al., 2012), aunque siempre están condicionadas al tipo de enzimas que se utilice, y al microorganismo fermentador.

Hipótesis y objetivos

En este trabajo de Tesis se planteó la siguiente **hipótesis de trabajo: dentro de nuestra colección de microorganismos antárticos, deben existir algunos capaces de producir celulasas psicrófilas, cuyas condiciones de catálisis sean compatibles con procesos SFS para la producción de bioetanol celulósico.**

Dicha hipótesis corresponde al objetivo general de este trabajo, que es: **Contribuir al desarrollo de métodos sustentables de producción de biocombustibles a través del uso de enzimas activas a bajas temperaturas.**

Como objetivos específicos se planteó

- Seleccionar un microorganismo productor de celulasas en medio líquido.
- Optimizar la cinética de producción de estas enzimas y obtener un preparado enzimático con actividad celulasa.
- Caracterizar bioquímicamente el preparado: conocer las condiciones óptimas de pH y temperatura de actividad celulasa, evaluar su estabilidad y el efecto de diversos agentes químicos.
- Identificar las proteínas presentes en el preparado, en especial las celulasas, y también conocer el CAZoma del microorganismo seleccionado.
- Aplicar el preparado enzimático en ensayos de sacarificación de diversos sustratos celulósicos.
- Producir bioetanol a partir de la sacarificación de un sustrato celulósico con el preparado enzimático y fermentación de los azúcares liberados con *S. cerevisiae* CAT-1.

2. Materiales y métodos

En el siguiente diagrama (Figura 2.1) se muestra esquemáticamente el transcurso experimental de este trabajo de Tesis, a modo de ubicar al lector en la serie de pasos que se dieron.

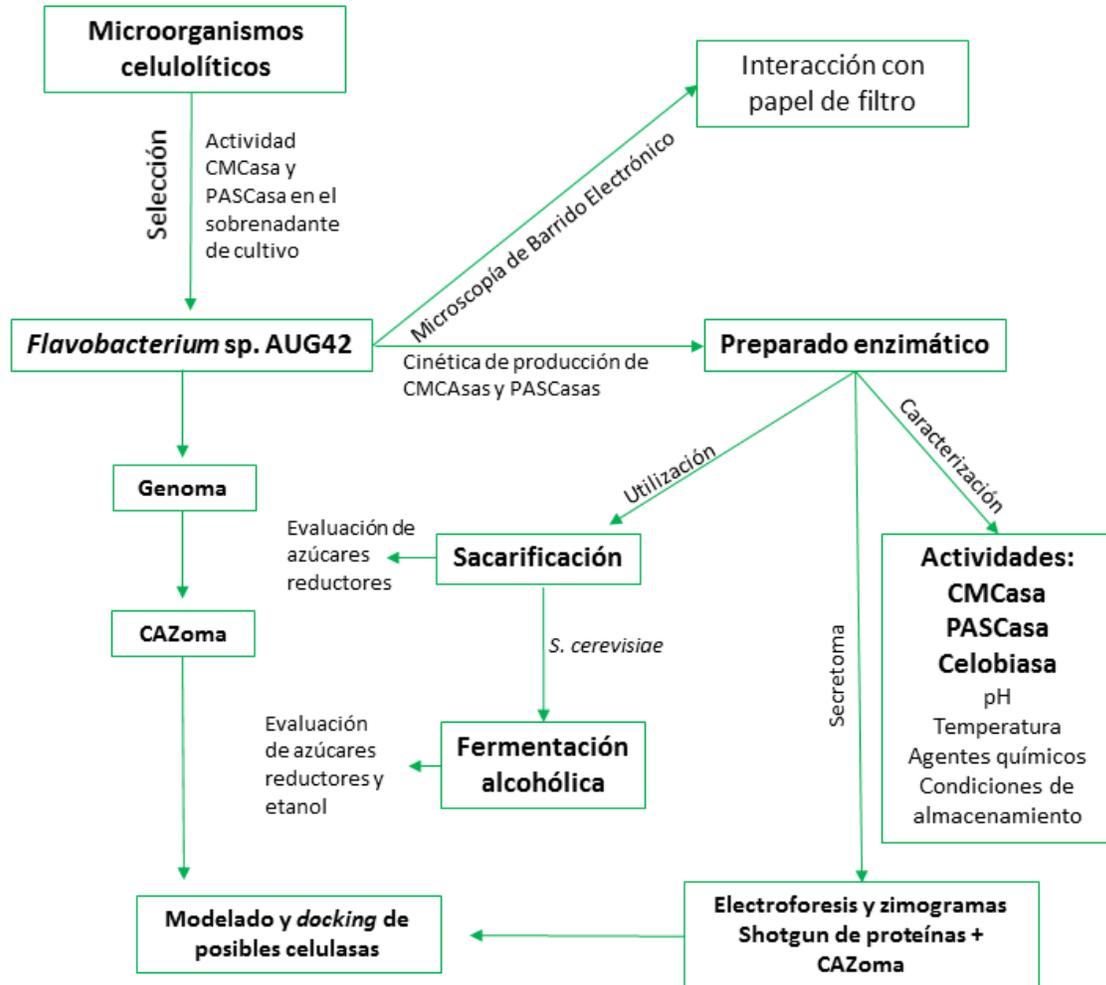


Figura 2.1. Diagrama de transcurso experimental de este trabajo de Tesis.

2.1 Selección del microorganismo productor de celulasas

Se trabajó con una colección de bacterias provenientes de la microflora de un oligoqueto identificado como *Grania* sp., presente en la Isla Rey Jorge, Antártida, capaces de hidrolizar CMC en placas de cultivo (Herrera et al. 2017). Esta colección de microorganismos se mantiene en el Laboratorio de la Sección Bioquímica y Biología Molecular de Facultad de Ciencias.

A partir de colonias aisladas provenientes de un cultivo fresco de los aislamientos (*Flavobacterium* sp. AUG1, *Pseudomonas* sp. AUG8, *Pseudomonas* sp. AUG38, *Flavobacterium* sp. AUG42, *Psychrobacter* sp. AUG47, *Serratia* sp. AUG50, *Psychrobacter* sp. AUG53) se inocularon tubos de precultivo conteniendo 5 mL de medio LB (para la composición de éste y de los medios a utilizar a continuación en esta Tesis, ver Anexo 1. Medios de cultivo). Los tubos se incubaron a 16 °C bajo agitación a 200 rpm por 48 h. Posteriormente se utilizaron para inocular matraces de 500 mL conteniendo 50 mL de los medios M9, GS2 o LB, suplementados con papel de filtro *Whatman* N°1 al 0,5 % m/v como fuente de carbono celulósico y se incubaron por 48 h en las condiciones anteriormente indicadas. Cada cultivo se centrifugó (12000 rpm, 15 min, 4 °C) y el sobrenadante de cultivo se filtró usando filtros de 0,45 µm, para obtener así un cultivo libre de células. En el mismo, se analizaron las actividades CMCasa y PASCasa (usando como sustratos CMC y PASC respectivamente), tal como se indica en los puntos 2.4.1 y 2.4.2.

2.2 Microscopía de barrido electrónico de células de *Flavobacterium* sp. AUG42

Se creció la bacteria en medio GS2, suplementada con papel de filtro (muestra 1) y sin agregado de fuente celulósica (muestra 2). Como control, se incubó medio GS2 con papel de filtro sin bacteria (muestra 3). Los matraces se incubaron a 16 °C, bajo agitación de 200 rpm por 48 h. Luego, para la muestra 1 se tomó una alícuota del cultivo y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y se procedió al tratamiento del *pellet* para su posterior visualización. Para las muestras 2 y 3, se retiró del matraz una tira de papel de filtro para observarlas en el microscopio de barrido electrónico y se procedió con el tratamiento para la visualización. Primero se fijaron las muestras con glutaraldehído al 2.5 % v/v durante una hora, se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol (50, 75, 95 y 100 % v/v) y por último se usó CO₂ como secador de punto crítico. Posteriormente se metalizó con oro. La observación se realizó en el microscopio Jeol JSM 5900 LV.

2.3 Obtención del preparado enzimático a partir de *Flavobacterium* sp. AUG42. Caracterización del perfil de crecimiento y la cinética de producción de celulasas

2.3.1 Preparación del inóculo

Se transfirió una colonia *Flavobacterium* sp. AUG42 (obtenida por siembra en estría en placas de LB incubada por 7 días a 10 °C) de a 5 mL de LB y se suspendió en vórtex. Estos 5 mL se transfirieron a un matraz de 200 mL conteniendo 25 mL de LB, y se incubó bajo agitación (200 rpm), durante 68 h, a 16 °C. Esta suspensión se utilizó como inóculo de los siguientes experimentos.

2.3.2 Condiciones de cultivo para la producción de celulasas

Se transfirieron 5 mL del inóculo obtenido en 2.3.1 a matraces de 2 L conteniendo 500 mL de medio GS2 suplementado con diferentes fuentes de carbono celulósico: carboximetilcelulosa (CMC, SIGMA C5678), papel de filtro *Whatman* N°1, Celulosa (SIGMA 435236) o Avicel (SIGMA 11363) en concentraciones de 0,5 % m/v. Se realizó también un cultivo control, sin el agregado de sustrato celulósico. En todos los casos se incubó durante 72 h a 16 °C, con agitación a 200 rpm y a diferentes tiempos se tomaron alícuotas para la determinación del crecimiento y la producción de celulasas, según se describe a continuación.

2.3.3 Determinación del perfil de crecimiento y la cinética de la producción de celulasas

Se evaluó el crecimiento de AUG42 mediante la determinación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC), para lo cual se tomaron alícuotas del cultivo (cada 12 h) y se realizaron las diluciones seriadas hasta obtener colonias aisladas sobre placas de Petri conteniendo LB-agar, según el método de la gota, que se explicará en el próximo párrafo. También se estimó la concentración celular midiendo la turbidez del cultivo a 620 nm, pero solamente cuando se utilizó CMC como sustrato (único medio que no presentaba partículas en suspensión que interfirieran en la medida de la turbidez). Para ello se utilizó la siguiente estimación: una turbidez a 620 nm igual a 1 equivale aproximadamente a $2,5 \times 10^8$ células/mL (Stevenson et al., 2016).

Asumiendo que existiría un crecimiento bacteriano similar entre el medio conteniendo CMC y el resto de los medios de cultivo, se realizó el cálculo de dilución de los mismos, que permitiera obtener un número contable de células por placa. Se trabajó con tres diluciones seriadas, de forma tal que

la dilución intermedia presentara un número contable de células (entre 5 y 25 colonias por gota). Para cada dilución, se sembraron (por cuadruplicado) gotas de 10 μ L, en un extremo de una placa conteniendo LB-agar y se dejó deslizar la gota hacia el otro extremo de la placa. Las placas se incubaron durante 4 días a 16 °C, se contaron las UFC, y se realizó el cálculo pertinente para obtener las UFC/mL de cultivo.

Al mismo tiempo que se sacó una alícuota para medir el crecimiento, se extrajeron alícuotas de 2 mL del cultivo, se centrifugaron (10 min a 10000 rpm, 4 °C) y el sobrenadante se filtró utilizando filtro estéril de Poliéster sulfona (PES) de 0,45 μ m de poro (se descartó el uso de filtros de celulosa por el posible efecto de las celulasas sobre el material del filtro). Estos sobrenadantes de cultivo libre de células se utilizaron para el análisis de actividad celulasa, mediante el análisis de las actividades PASCasa (usando PASC como sustrato) y CMCasa (usando CMC como sustrato). Los ensayos de actividad se describen en los puntos 2.4.1 y 2.4.2, respectivamente.

Se estudiaron también ambas actividades en los sobrenadantes de cultivo de AUG42 crecido en el medio GS2, utilizando en este caso algodón, swichgrass (pasto varilla) y *Eucalyptus globulus* a una concentración de 0,5 % m/v. Los dos últimos sustratos, fueron previamente tratados por explosión a vapor, 10 min a 200 °C (gentileza de Fabiana Rey, LATU). Se siguió el mismo procedimiento de cultivo descrito anteriormente aunque sólo se tomó una muestra, a las 48 h de iniciado el cultivo. Se preparó un extracto libre de células, tal cual se indicó anteriormente en la sección 2.3.3, y se realizó el análisis de actividades CMCasa y PASCasa.

2.3.4 Temperatura óptima para la producción de celulasas

Una vez seleccionado un sustrato celulósico para la producción de las enzimas, se analizó el perfil de crecimiento y la cinética de producción de celulasas descritos en la sección 2.3.3 a las temperaturas de 11 °C, 16 °C y 21 °C.

2.4 Determinación de las actividades CMCasa y PASCasa

2.4.1 Actividad PASCasa

La mezcla de reacción se preparó incubando 75 μ L de sobrenadante de cultivo libre de células con 25 μ L de *buffer* acetato de sodio 500 mM, pH 5,5 y 150 μ L de PASC (obtenido mediante hidrólisis parcial previa; concentración aproximada 7,5 mg/mL; ver preparación de PASC en Anexo 4. Otras

mezclas y soluciones) durante 3 h a 40 °C, con agitación orbital de 1000 rpm en el equipo Multi-Therm de Benchmark. La reacción se detuvo por enfriamiento en baño de hielo y se centrifugó (12000 rpm, durante 12 min, a 4 °C). En el sobrenadante de mezcla de reacción obtenido, se analizó la liberación de azúcares reductores mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS; Bernfeld, 1955), según se describe en el punto 2.4.3. Una unidad de enzima (U) se definió como la cantidad necesaria de enzima para liberar 1 μmol de azúcares reductores en 1 h a 40 °C en *buffer* acetato de sodio 50 mM, pH 5,5.

2.4.2 Actividad CMCasa

La mezcla de reacción se preparó incubando 80 μL de sobrenadante de cultivo libre de células con 20 μL de *buffer* acetato de sodio 500 mM, pH 5,5 y 100 μL de CMC al 2 % m/v (disuelto en agua), durante 1 h a 40 °C, bajo agitación orbital a 1000 rpm en el equipo Multi-Therm de Benchmark. La reacción enzimática se detuvo por enfriamiento en baño de hielo y se determinó la liberación de azúcares reductores por el método del DNS, según se describe en la sección 2.4.3. Una unidad de enzima (U) se definió como la cantidad necesaria de enzima para liberar 1 μmol de azúcares reductores en 1 h, a 40 °C, en *buffer* acetato de sodio 50 mM, pH 5,5.

2.4.3 Detección de azúcares reductores: Método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

Se mezclaron volúmenes iguales de mezcla de reacción (o sobrenadante de mezcla de reacción, para los ensayos de actividad PASCasa, como se explica en la sección 2.4.1) y de reactivo DNS: 200 μL para la actividad CMCasa y 125 μL para la actividad PASCasa (para la preparación del DNS ver el Anexo 4. Otras mezclas y soluciones). En ambos casos, la mezcla se llevó a ebullición en baño de agua durante 10 min y luego se enfrió en baño de hielo durante 5 min. Posteriormente se midió la absorbancia a 550 nm en lector de placas de 96 pocillos (usando un volumen de 200 μL por pocillo). Se realizó una curva de calibración con glucosa en un rango de concentración de 0 a 0,3 mM (ver Anexo, 5. Curvas de calibración) y a partir de la ecuación de la recta se calculó la concentración de azúcares reductores liberados durante las reacciones enzimáticas, y expresados como equivalentes de glucosa.

2.4.4 Determinación de las condiciones de velocidad inicial para las actividades CMCasa y PASCasa

Para ello se realizaron los ensayos de actividades PASCasa y CMCasa utilizando volúmenes mayores de reacción (1,5 mL) pero conservando las mismas proporciones para la mezcla de reacción detalladas en las secciones 2.4.1 y 2.4.2. Se tomaron alícuotas de 200 μ L para medir el avance de la reacción cada 30 y 15 min, y hasta un máximo de 210 y 90 min, respectivamente. Se analizó el avance de la reacción graficando la liberación de azúcares reductores en función del tiempo de reacción, y se determinó entre qué tiempos la reacción estaría en condiciones de velocidad inicial.

2.5 Caracterización parcial del preparado enzimático

Se definió como “preparado enzimático” al sobrenadante de cultivo de AUG42 libre de células, obtenido en medio GS2 suplementado con papel de filtro, luego de 48 h de crecimiento a 16 °C. Sobre dicho preparado se realizaron los siguientes ensayos de caracterización de las actividades CMCasa y PASCasa: 1) a diferentes temperaturas y pHs; 2) en presencia de diferentes agentes químicos; 3) estabilidad en diferentes condiciones de almacenamiento.

A este preparado se le analizaron además, 4) actividades amilasa y celobiasa, y su correspondiente caracterización parcial de propiedades bioquímicas (pH y temperatura óptimos).

Se procedió luego a un análisis del secretoma (proteínas presentes en el preparado enzimático) mediante: 5) SDS-PAGE e isoelectroenfoque, ambos acoplados a zimogramas (para evaluar proteínas secretadas con actividad CMCasa y conocer su tamaño y punto isoeléctrico).

A su vez, y teniendo a disposición el genoma de AUG42, se realizó 6) el estudio del CAZoma, para identificar los genes relacionados a la producción de celulasas y 7) un *shotgun* de proteínas, para identificar las proteínas secretadas y correlacionar esa información con el CAZoma.

2.5.1 Condiciones óptimas de temperatura y pH

Se analizaron las actividades CMCasa y PASCasa a diferentes temperaturas (20, 30, 40, 50, 60 y 70 °C), en *buffer* acetato de sodio 50 mM, pH 5,5 según se detalló en los puntos 2.4.1 y 2.4.2.

Para determinar el pH óptimo, se determinaron las actividades CMCasa y PASCasa a 40 °C según se describió en los puntos 2.4.1 y 2.4.2, a diferentes pHs (3,5-9,5). Se utilizó el *buffer* de amplio rango de pH denominado *buffer* mezcla (ver Anexo 2. *Buffers*) descrito por Ellis & Morrison (1982), que

mantiene la fuerza iónica constante ($0,10 \pm 0,01$ M), ajustando el pH con soluciones de NaOH 4 M o HCl 4M.

Tanto para la temperatura, como para el pH óptimo, se graficó la cantidad de azúcares reductores liberados (μ moles/mL de preparado enzimático) por hora, en función de la temperatura o pH de reacción.

2.5.2 Determinación del efecto de diferentes agentes químicos sobre las actividades CMCasa y PASCasa

Para este ensayo, se incubaron 35 μ L de solución de agente a evaluar con 45 μ L del preparado enzimático (a 25 °C, en agitación orbital de 1000 rpm, durante 15 min), luego se agregó el sustrato (PASC o CMC 2 % m/v) y *buffer* acetato de sodio 50 mM, pH 5,5 y se procedió tal cual se describió en los puntos 2.4.1 y 2.4.2. Los agentes utilizados fueron los siguientes, en las concentraciones finales indicadas: cloruro de cobalto (CoCl_2) y de manganeso (MnCl_2) en 10 μ M; dodecilsulfato sódico (SDS) en 10 mM, 2 mM y 0.2 mM; fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) en 1 mM; sulfato de cobre (CuSO_4) en 1 mM; sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ en 45 mM; sulfato de magnesio (MgSO_4) en 20 mM y sulfato de potasio (K_2SO_4) en 1 mM; sacarosa en 300 mM; N-etilmaleimida (NEM) en 1 mM; y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en 1 mM y 0,1 mM.

Se realizó un control sin agente químico (agregando agua destilada). Se determinó la actividad remanente, considerando a la actividad registrada para el control, como el 100 %.

A su vez se realizaron controles negativos, invirtiendo el orden de los reactivos en el ensayo: a la solución de sustrato se agregó el agente químico, luego el reactivo DNS y finalmente el preparado enzimático. Para comparar los resultados y obtener una actividad relativa respecto al control positivo, se realizaron análisis estadísticos de los datos por ANOVA mediante el test *Dunnett's Multiple Comparison*.

2.5.3 Estabilidad del preparado en diferentes condiciones de almacenamiento

Para evaluar la estabilidad a largo plazo del preparado enzimático, se midieron las actividades CMCasa y PASCasa al inicio (día que se levantó el cultivo) y al cabo de 30 días de almacenamiento a -20 °C, 4 °C y 20 °C. Se graficó la actividad remanente respecto al inicial (considerada como el 100 %) y los datos se analizaron por ANOVA mediante el test *Dunnett's Multiple Comparison*.

También se evaluó el efecto de la liofilización sobre estas actividades del preparado enzimático. Para ello, se midieron las actividades PASCasa y CMCasa del preparado antes y después a ser liofilizado. El liofilizado se disolvió en agua Milli Ro estéril (en el mismo volumen previo a la liofilización).

2.5.4 Ensayos de actividades celobiasa y amilasa

Estas actividades enzimáticas se analizaron en el preparado enzimático (definido en la sección 2.4) según se describen a continuación.

2.5.4.1 Actividad amilasa

La presencia de amilasas se evaluó incubando 100 μ L de preparado enzimático (sin concentrar y concentrado 5 veces por liofilización, 5X) con 100 μ L de almidón soluble al 1 % m/v (preparado en *buffer* acetato de sodio 50 mM, pH 4,6) a temperatura ambiente. La mezcla se incubó por 1h, 2h, 3h o 24 h y al cabo de los mismos, se agregó DNS (200 μ L) y se llevó a ebullición en baño de agua durante 5 min. Se agregaron 1,5 mL de agua destilada, se enfrió en baño de hielo y se midió la absorbancia a 540 nm. La concentración de azúcares reductores se calculó usando una curva de calibración con glucosa (concentración entre 0 y 0,6 mg/mL).

2.5.4.2 Actividad celobiasa

Para la mezcla de reacción se incubaron 400 μ L de preparado enzimático con 100 μ L de celobiosa 40 mM disuelta en el *buffer* acetato de sodio 50 mM, pH 5,5 por 2 h, a 40 °C, bajo agitación orbital de 1000 rpm en el equipo Multi-Therm. Luego de cada reacción, la cantidad de glucosa liberada se midió utilizando el kit Glucosa-Spinreact (Ref 1001191), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incubaron 20 μ L de mezcla de reacción con 200 μ L de reactivo (provisto por el kit) durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se midió la absorbancia a 505 nm y los valores de absorbancia se correlacionaron con una curva de calibración realizada con glucosa en concentraciones conocidas (0,1 a 0,8 mg/mL). Como control positivo de actividad celobiasa se utilizó una mezcla de enzimas comerciales (pCL5 Cytolase).

Se determinaron también, el pH (entre 3,5 - 9,5 a 40 °C, utilizando el *buffer* mezcla) y temperatura (entre 10 y 60 °C, a pH 5,5, utilizando el *buffer* acetato de sodio tal cual se describe en el párrafo anterior) óptimos del ensayo de actividad.

2.5.5 Análisis del secretoma

Se definió secretoma al conjunto de proteínas presentes en el preparado enzimático. Este se estudió mediante técnicas de electroforesis, espectrometría de masas (*shotgun* de proteínas) y análisis bioinformáticos asociados especialmente a la búsqueda de celulasas.

2.5.5.1 Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) acoplada a zimograma

Se analizó el preparado enzimático mediante SDS-PAGE en condiciones desnaturizantes y reductoras (la muestra se trató con SDS y β -mercaptoetanol en el *buffer* de muestra) pero *sin* calentar a ebullición. Se sembraron 5 μ L de la muestra (2,5 veces concentrado por liofilización; 2,5X) en diferentes carriles, en gel de poliacrilamida (separador al 12% y concentrador al 6%) y se realizó la corrida durante 75 min a 110 V (la preparación de *buffers* y geles de poliacrilamida se describen en el Anexo 3. Geles de poliacrilamida). Para estimar el tamaño molecular de las proteínas se utilizó el marcador Color Plus (NEB Cat: P7711S), con proteínas de tamaño en el rango de 10 a 230 kDa.

Luego de la corrida electroforética el gel se dividió en dos partes, dejando por un lado un carril sembrado con la muestra (parte A) y por otro lado una mitad de gel donde se sembró la muestra y el marcador de tamaño molecular (parte B).

Sobre el gel de la parte A, se realizó el zimograma: las proteínas se transfirieron por contacto a un segundo gel de poliacrilamida preparado al 10 % de entrecruzamiento con CMC incluida a una concentración de 0,14 % m/v. Ambos geles, siempre en contacto entre ellos, se sumergieron en *buffer* acetato de sodio 50 mM, pH 5,5 a 37 °C. Luego de 1 h ambos geles se separaron. El gel con CMC se incubó con solución de Rojo Congo al 0,1 % m/v a temperatura ambiente durante 15 min y luego se lavó tres veces con NaCl 1M. La hidrólisis del CMC se visualiza como bandas más claras de color blanco-amarillo en un fondo rojo.

El gel de la parte B se incubó con solución de Coomassie R-250 (ver su preparación en el Anexo 4. Otras mezclas y soluciones) para la visualización de bandas proteicas. Considerando que la corrida electroforética se desarrolló de manera uniforme, se compararon indirectamente las partes A y B del mismo gel. Las bandas de actividad celulasa del zimograma se confrontaron con las bandas de proteínas del gel B (muestra y marcador de tamaño molecular), identificando así el tamaño molecular aparente de las celulasas.

2.5.5.2 Isoelectroenfoque acoplado a zimograma

El preparado enzimático (25X, con alta concentración de sales provenientes del medio de cultivo) se desaló utilizando una columna de gel filtración comercial (NAP-5, GE Healthcare), pre-equilibrada con una solución de NaCl 0,15 M. Se aplicaron 500 µL del preparado enzimático concentrado y se eluyeron con 1 mL de NaCl 0,5 M (la concentración final del preparado enzimático fue de 12,5X). El mismo procedimiento se realizó también para un preparado enzimático 5X (luego de eluido, concentración final de la muestra 2,5X).

El isoelectroenfoque (IEF) se realizó en el equipo automatizado PhastSystem (Farmacia LKB, Suecia), sembrando la muestra en el gel comercial PhastGel IEF 3-9 (con gradiente de pH entre 3 y 9) y siguiendo las especificaciones indicadas por el fabricante. Las bandas proteicas se visualizaron por tinción automática en el mismo equipo, mediante tinción con plata (gel A).

Se realizó un segundo IEF (sin la etapa de tinción automática), se realizó la transferencia a un gel de poliacrilamida con CMC (gel B) y se revelaron las bandas con actividad celulasa tal cual se indicó más arriba (sección 2.5.5.1). Luego se sumergió el gel en ácido acético 0,1 M para modificar su color de rojo a azul y facilitar la visualización.

Por comparación del perfil de proteínas entre ambos geles, el marcador de punto isoeléctrico (pI) y las bandas con actividad celulasa (comparación de los geles A y B), se determinó el pI de las proteínas con actividad celulasa.

2.5.5.3 SDS-PAGE e identificación de bandas presentes en el preparado enzimático.

Se realizó una SDS-PAGE desnaturizante, de igual manera que se detalló en sección 2.5.5.1, pero esta vez la muestra tratada se calentó en baño a ebullición durante 5 min. Las bandas visibles, luego de la tinción con Coomassie R-250, se enviaron a identificar al servicio de espectrometría de masas (UbyPA) del Institut Pasteur (Montevideo, Uruguay). Los péptidos obtenidos se compararon con el genoma anotado de la cepa tipo de *Flavobacterium frigidarium*, bacteria de alta homología con AUG42 según la secuencia del gen codificante para ARN ribosomal 16S (al momento de este ensayo no contábamos con el genoma de la cepa AUG42 secuenciado).

2.5.6 Búsqueda de posibles celulasas en el genoma de AUG42: análisis del genoma y CAZoma

Durante el desarrollo de la Maestría, se envió a secuenciar el genoma de *Flavobacterium* sp. AUG42, el cual se ensambló y anotó por un integrante de nuestro grupo de trabajo en el servidor RAST

Versión 2.0 (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*) (Aziz et al., 2008). Las secuencias proteicas de AUG42 se analizaron utilizando la base de datos PFAM 31.0 (<https://pfam.xfam.org/>) que realiza la búsqueda basada en similitudes de dominios, para la identificación de proteínas (Finn et al., 2016).

Para la identificación particular de las enzimas activas sobre carbohidratos (CAZymas, en inglés *Carbohydrate Active Enzymes, CAZymes*), todas las secuencias aminoacídicas se analizaron mediante la base de datos dbCAN (Yin et al., 2012), un servidor web utilizado para identificar las CAZymas y los dominios de unión a carbohidratos. Los resultados obtenidos por dbCAN también se analizaron manualmente mediante BLASTP utilizando la base de datos UniprotKB-SwissProt (<https://www.uniprot.org/statistics/Swiss-Prot>) y PDB (<https://www.rcsb.org/>). Al conjunto de secuencias aminoacídicas posiblemente involucradas en el metabolismo de carbohidratos se le denominó CAZoma.

2.5.7 *Shotgun* de proteínas: estudio del secretoma por espectrometría de masas

Se analizó el preparado enzimático mediante un análisis total de las proteínas presentes mediante espectrometría de masas, definido como *shotgun* de proteínas. Para ello, se liofilizaron tres réplicas del preparado enzimático, se suspendieron en agua destilada y se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976). Se realizó una SDS-PAGE sembrando los preparados tratados en condiciones desnaturalizantes, calentando en baño a ebullición durante 5 min (cantidad de proteína conocida, ver Sección 3. Resultados) y se procedió de igual manera que se explica en la sección 2.5.5.1.

La corrida electroforética se detuvo luego que las muestras ingresaran 1 cm en el gel separador. Se realizó la fijación y tinción con Coomassie G-250 (ver Anexo 4. Otras mezclas y soluciones), se recortaron las bandas proteicas y se enviaron a identificar al servicio CEQUIBIEM (Universidad de Buenos Aires/CONICET, Argentina). Luego de realizada la espectrometría de masas se consideraron aquellas proteínas representadas por al menos dos péptidos. Contando con el genoma del microorganismo (particularmente el CAZoma), se realizó una comparación para identificar las proteínas presentes en el secretoma.

2.5.8 Modelado y *docking* de algunas proteínas

Se construyeron los modelos de los sitios catalíticos (módulos GH) de las proteínas 265 y 976, detectados a partir del análisis en dbCAN. Para la proteína 265, el módulo catalítico a modelar fue

el GH9, comprendido entre los aminoácidos 31 - 467, y para la proteína 976, el módulo catalítico fue el GH5, comprendido entre los aminoácidos 50 - 307. Para ello, se utilizó el servidor SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>), donde se incluyó la secuencia de aminoácidos correspondiente al dominio GH a modelar. Se eligieron los tres moldes de mayor puntaje (proteínas con estructura resuelta usadas como molde), y se construyeron los modelos en el mismo sitio web. Se eligió el modelo que presentó mayor GMQE (*Global Model Quality Estimate*), se visualizaron los aminoácidos en posiciones permitidas y no permitidas, según el gráfico de Ramachandran, y se continuó trabajando con los modelos en el programa Chimera 1.13.1 (<http://www.rbvi.ucsf.edu/chimera>). Posteriormente, se utilizó el servidor PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) para obtener la estructura de los sustratos celulósicos: celotetraosa (cuatro unidades de glucosa unidas por enlaces β -1,4) y celobiosa. Dichos sustratos se utilizaron para realizar el *docking* en el programa Chimera.

Para realizar los *docking* fue necesario conocer previamente la zona probable del sitio activo del modelo. Para ello se realizó una búsqueda de un “modelo semilla”, una estructura proteica cristalizada con su sustrato (proveniente de la lista de posibles moldes, obtenida por SWISS-MODEL). Se compararon ambas estructuras mediante una búsqueda de homología estructural con la herramienta MatchMaker del programa Chimera. Se visualizó la probable zona del sitio activo y se registraron las coordenadas del sitio. Posteriormente, se abrieron las estructuras de interés para el *docking*: modelo de celulosa creado (o ligando) y celotetraosa (o sustrato) y se prepararon para *docking* mediante la herramienta Dock Prep, del programa Chimera. Posteriormente, se utilizó la herramienta AutoDock Vina (también del programa Chimera) para proceder al *docking*.

Para el caso de la proteína 265 se realizó un segundo *docking* con una molécula de celobiosa. Luego de realizado el *docking*, se señaló la superficie del modelo, el sustrato y las estructuras secundarias del modelo y se enfatizó en los aminoácidos involucrados en el sitio activo, especialmente los enlaces de hidrógeno entre la proteína y el sustrato, y los aminoácidos catalíticos.

2.6 Aplicación del preparado enzimático para sacarificación y posteriores ensayos de fermentación

2.6.1 Selección de sustrato a sacarificar

Se analizaron distintos sustratos factibles de sacarificar: CMC, papel de diario con tinta negra, papel de diario sin tinta, α -celulosa (SIGMA C8002), avicel (SIGMA, 11363), celulosa microcristalina (SIGMA, 435236), switchgrass, *E. globulus* y papel de filtro *Whatman* N° 1 en concentración final de 0,5 % m/v. Se incubaron 150 μ L de preparado enzimático con 150 μ L de sustrato en *buffer* acetato de sodio 50mM pH 5,5 (ó con el sustrato dispuesto en cinta torneada, como en el caso de los papeles) durante 4 h a 40 °C y bajo agitación orbital a 1000 rpm en Thermomixer. Luego se midieron los azúcares reductores liberados, mediante el método del DNS.

2.6.2 Condiciones de sacarificación de CMC

Una vez seleccionada la CMC como sustrato, se evaluó la capacidad de sacarificación del preparado enzimático, en dos condiciones: 1) en *buffer* acetato de sodio, y 2) en un medio mínimo de cultivo utilizado en ensayos de fermentación alcohólica (Medio Ingeniería, ver Anexo 1. Medios de cultivo), ambos a pH 5,5.

Los ensayos se realizaron según se describió en la Sección 2.6.1, pero en volúmenes mayores (2 mL de volumen final). Se tomaron alícuotas cada 12 h aproximadamente, durante 55 h, a las cuales se les determinaron los azúcares reductores por el método del DNS.

Para el ensayo 1), se mezclaron 800 μ L de preparado enzimático con 1000 μ L de CMC 2 % m/v (concentración final 1 % m/v) y 200 μ L *buffer* acetato de sodio 500 mM (concentración final 50 mM), a pH 5,5. Para el ensayo 2), se mezclaron 800 μ L de preparado enzimático con 1000 μ L de CMC 2 % m/v, suspendido en Medio Ingeniería (preparado al doble de su concentración, 2X) a pH 5,5 y 200 μ L de agua destilada. Ambas reacciones se incubaron a 30 °C bajo agitación orbital a 1000 rpm. Se graficaron los azúcares reductores obtenidos (la absorbancia medida a 550 nm) en función del tiempo de incubación.

2.6.3 Preparación de pre-inóculo e inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1

El realizó un pre-inóculo de *S. cerevisiae*, colocando de manera aséptica una colonia de la levadura en un tubo de precultivo con 5 mL de Medio Inóculo (ver Anexo 1. Medios de cultivo). Se creció toda

la noche a 37 °C, bajo agitación a 200 rpm. Se agregó este pre-inóculo (1% v/v) a un matraz de 1L conteniendo 200 mL de Medio Inóculo, se creció en las mismas condiciones que el pre-inóculo durante 24 h y se midió la turbidez a 620 nm. Se centrifugó el cultivo (10000 rpm, 10 min, 4 °C), se descartó el sobrenadante y se suspendió el *pellet* celular en 400 mL NaCl 0,9 % m/v estéril. La suspensión se centrifugó en las mismas condiciones, se descartó nuevamente el sobrenadante y se suspendió el *pellet* en NaCl 0,9 % m/v estéril hasta llegar a un volumen total conocido, por ende una turbidez conocida, tal que permitiera una turbidez final de 10 unidades en los viales de fermentación (ver más adelante, Sección 2.6.4).

2.6.4 Ensayos de sacarificación y fermentación secuencial

Se realizaron distintos ensayos de sacarificación y fermentación secuencial (como se muestra en la Figura 2.2). En los mismos se variaron: 1) la cantidad de preparado enzimático (liofilizado y disuelto en el mínimo volumen de agua Milli Ro) en el rango de actividad CMCasa entre 0,8 y 44,3 U/mL; 2) el tamaño de los viales (100 mL o 20 mL); 3) el volumen de medio de fermentación en los viales (Medio Ingeniería): 40 mL para los viales de 100 mL y 10 o 15 mL de medio para los viales de 20 mL; 4) la temperatura de pre-sacarificación (30, 37 o 50 °C) y 5) la concentración de sustrato celulósico, CMC (en el rango de 1 % a 5 % m/v).

El medio de fermentación se distribuyó en los viales, que posteriormente se sellaron y esterilizaron por autoclave. Se inyectó de manera aséptica el preparado enzimático (filtrado a esterilidad por filtros de 0,45µm) conteniendo una cantidad conocida de unidades CMCasas y se procedió a la pre-sacarificación. La misma se evaluó durante un tiempo determinado (rango de 20 a 40 h), a una temperatura controlada (30, 37 o 50 °C) y bajo agitación orbital a 200 rpm. Se extrajo de manera aséptica una alícuota de 1 mL (volumen pequeño para no alterar de manera significativa el volumen de fermentación en *batch*) para determinar azúcares reductores. Posteriormente, se inyectó un inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* CAT1 en los viales. La concentración de este inóculo fue tal que luego de su inyección en los viales, la concentración final celular en el medio de fermentación tuviera una turbidez de 10 unidades (medida a 620 nm, camino óptico de 1 cm). La fermentación se dejó transcurrir por 48 h. Se realizaron controles positivos: 1) con glucosa 1 % m/v como sustrato, 2) con glucosa 1 % m/v y preparado enzimático y; 3) utilizando celulasas comerciales (*Mix* de celulasas producidas por *Aspergillus niger*; SIGMA, 22178) (concentración final de 17,5 mg/mL). También se realizaron controles negativos: 1) fermentaciones sin preparado enzimático y 2) sin sustrato (ni CMC ni glucosa).

En otros ensayos, se incorporó una celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei* (SIGMA, E6412) a una concentración de 0,22 U/mL de actividad CMCasa, a los efectos de reforzar el preparado enzimático. Se tomaron alícuotas de 1 mL en manera aséptica cada 24 h, se filtraron por filtro de 0,22 μm y se congelaron a -20 °C hasta su posterior análisis. Luego, se midió la cantidad de azúcares reductores liberados por el método del DNS y la cantidad de etanol producido por fermentación luego de las 48 h de fermentación, utilizando el equipo GC-FID Shimadzu 2010 plus, inyectando la muestra con 1-butanol como estándar interno. Los primeros ensayos de Fermentación (extracción de muestras y medida de etanol), fueron realizados por la Mag. Victoria Braña en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

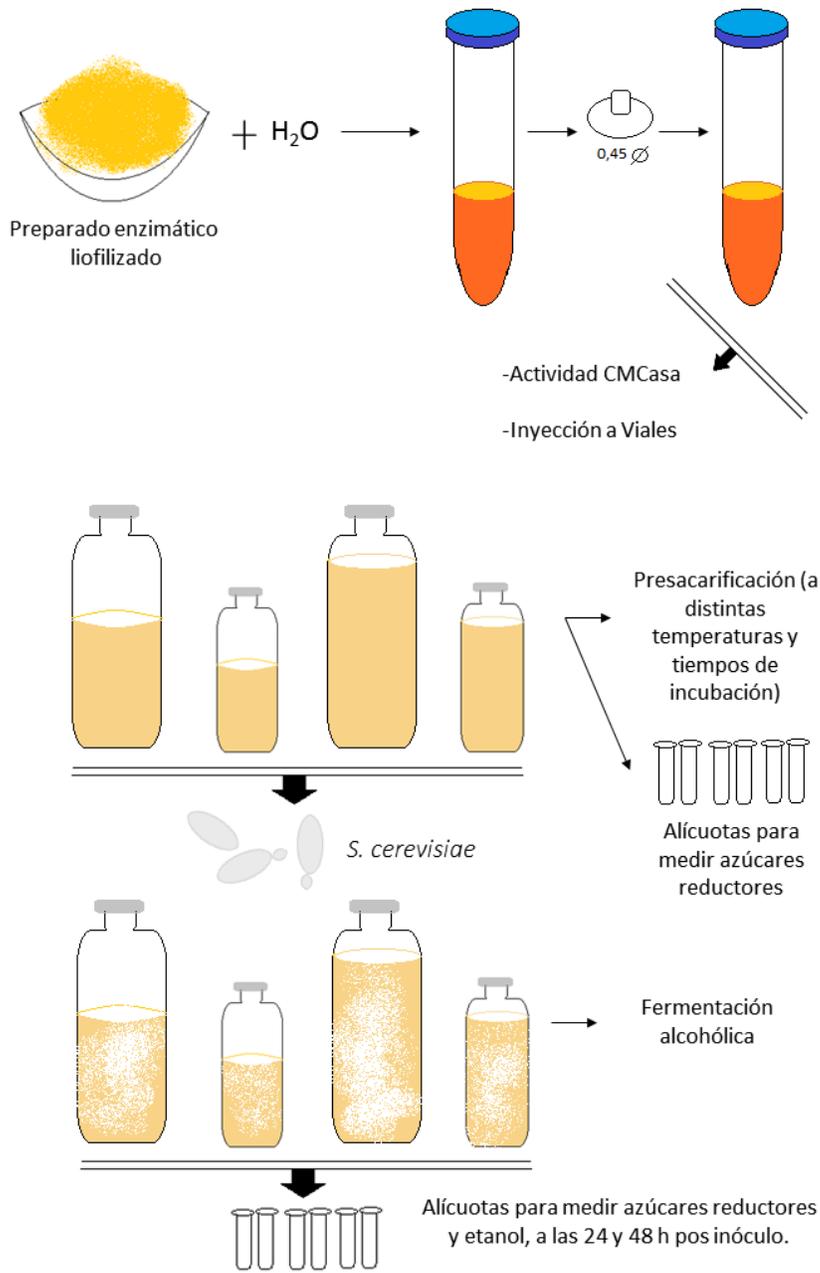


Figura 2.2. Esquema que representa el procedimiento de sacarificación y fermentación alcohólica

2.6.5 Rendimiento de etanol

Se calculó el rendimiento porcentual de producción de bioetanol, asumiendo que rendimiento ideal que sigue la siguiente relación: 1 mol de glucosa se convierte en 2 moles de etanol. Esta relación, equivale a decir que cada 1 g de glucosa se obtienen 0,51 g de etanol.

Cuando se utilizó un sustrato celulósico (CMC, con grado de carboximetilación entre 0,65 y 0,90), se promedió el peso molecular de la glucosa probablemente sustituida con grupos carboximetil-sodio, siendo este de 232,7 g/mol. Esto equivale a decir que en un rendimiento ideal (100 %), por cada 1 g de CMC existirían 4,3 mili-moles de glucosa, que se convertirían en 8,62 mili-moles de etanol, por lo tanto, 1 g de CMC se convertiría en 0,40 g de etanol.

3. Resultados

3.1 Selección del microorganismo productor de celulosas

En las etapas iniciales de esta Tesis, se trabajó con siete aislamientos bacterianos (entre los cuales estaba *Serratia* sp. AUG50, microorganismo propuesto inicialmente en el proyecto de Tesis). Como resultado, no se detectó actividad PASCasa ni CMCasa en el sobrenadante de cultivo de ninguno de los aislamientos, a excepción de *Flavobacterium* sp. AUG42. Este aislamiento fue el único que produciría enzimas con actividades CMCasa y PASCasa en medio líquido con papel de filtro como fuente de carbono celulósico, razón por la que se lo eligió para centrar los estudios de esta Tesis.

3.2 Microscopía de barrido electrónico de AUG42

Para determinar el tamaño y la forma de las células de *Flavobacterium* sp. AUG42, y su comportamiento con el papel de filtro, se recurrió al análisis de microscopía de barrido electrónico. Se trata de un bastón de aproximadamente 2 μm de largo y 0,5 μm de ancho. Cuando creció en medio GS2, sin el agregado de una fuente celulósica, se formaron cadenas de bacterias unidas en sus extremos, y probables vesículas que se conectan entre si formando estructuras denominadas collares de perlas (Figuras 3.1 y 3.2). Cuando creció en medio GS2 con papel de filtro, se observaron colonias aisladas, distribuidas de manera aleatoria sobre la superficie del papel (Figuras 3.3 y 3.4). La estructura del papel, no se vio significativamente afectada respecto a la muestra control de papel sin cultivo bacteriano (Figuras 3.3, 3.4 y 3.5).

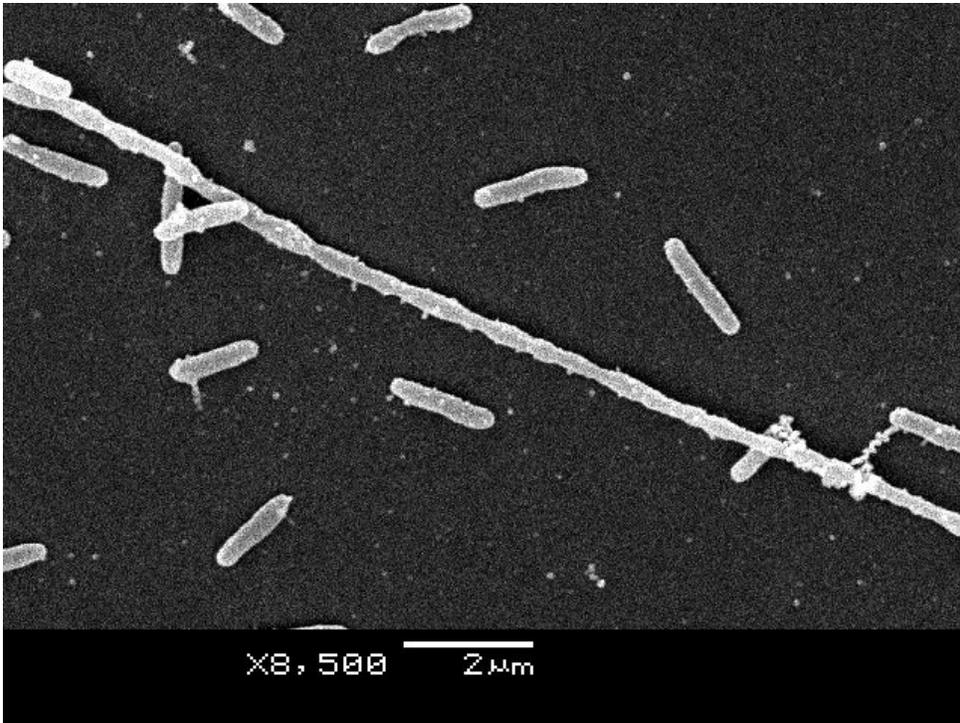


Figura 3.1. *Flavobacterium* sp. AUG42 8500X, microscopía electrónica de barrido (MEB). Se observa un agrupamiento de las bacterias formado cadenas largas.

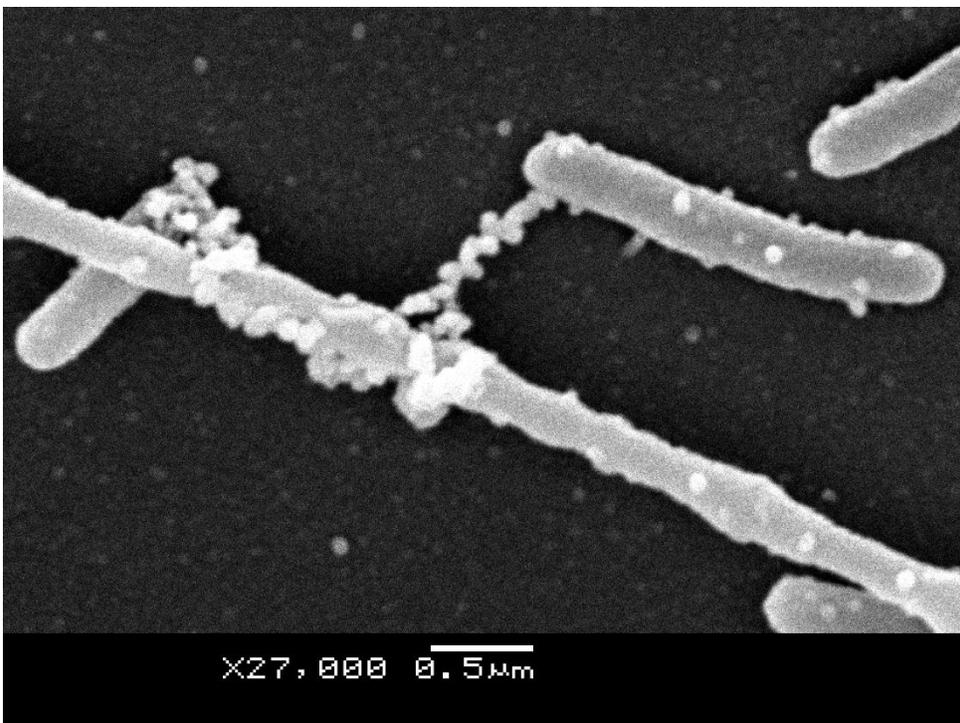


Figura 3.2. *Flavobacterium* sp. AUG42 27000X, MEB. Se muestra como las bacterias interactúan entre sí, mediante los “collares de perlas”: cadenas de vesículas que conectan las células.

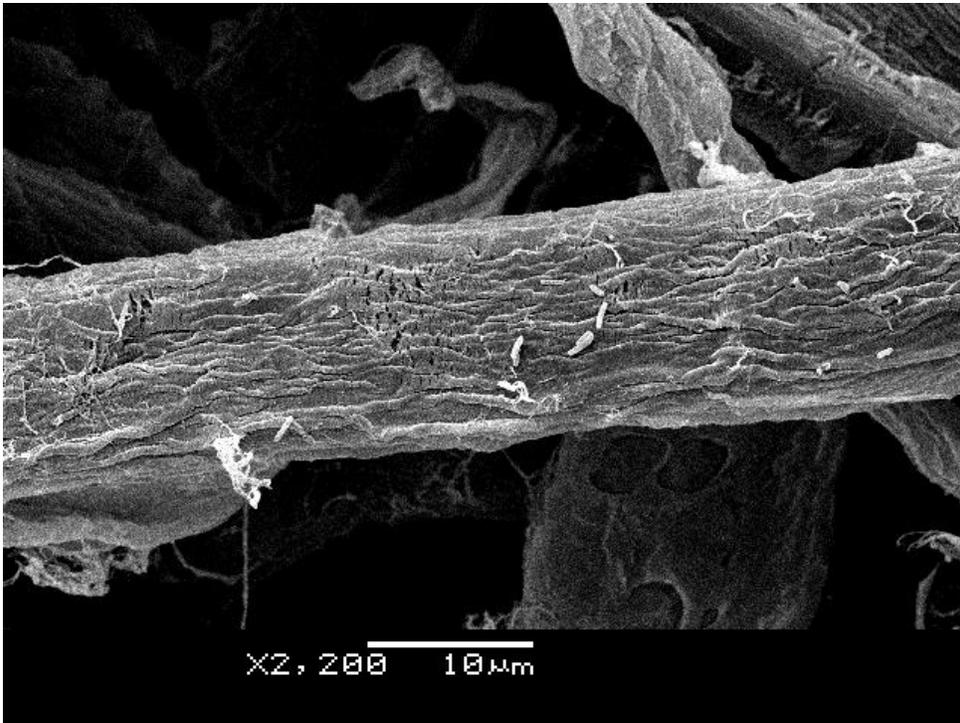


Figura 3.3. *Flavobacterium* sp. AUG42 crecida en GS2 con papel de filtro Whatman N°1 como sustrato celulósico, 2200X, MEB. Se muestra la estructura superficial de la celulosa, con las bacterias sobre su superficie.

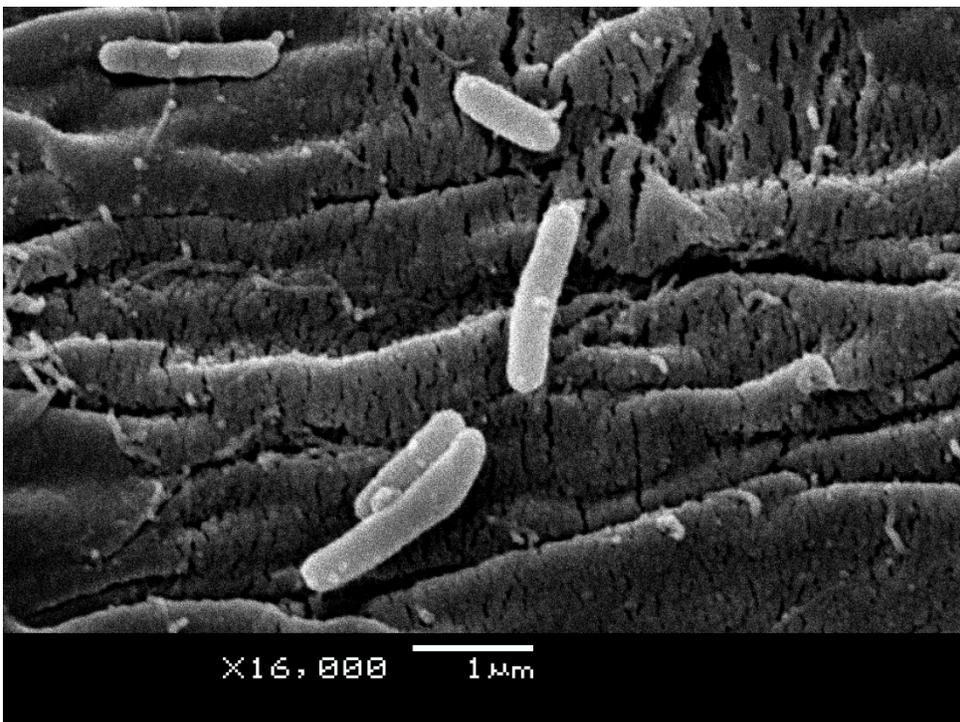


Figura 3.4. *Flavobacterium* sp. AUG42 crecida en GS2 con papel de filtro Whatman N°1, 16000X, MEB.

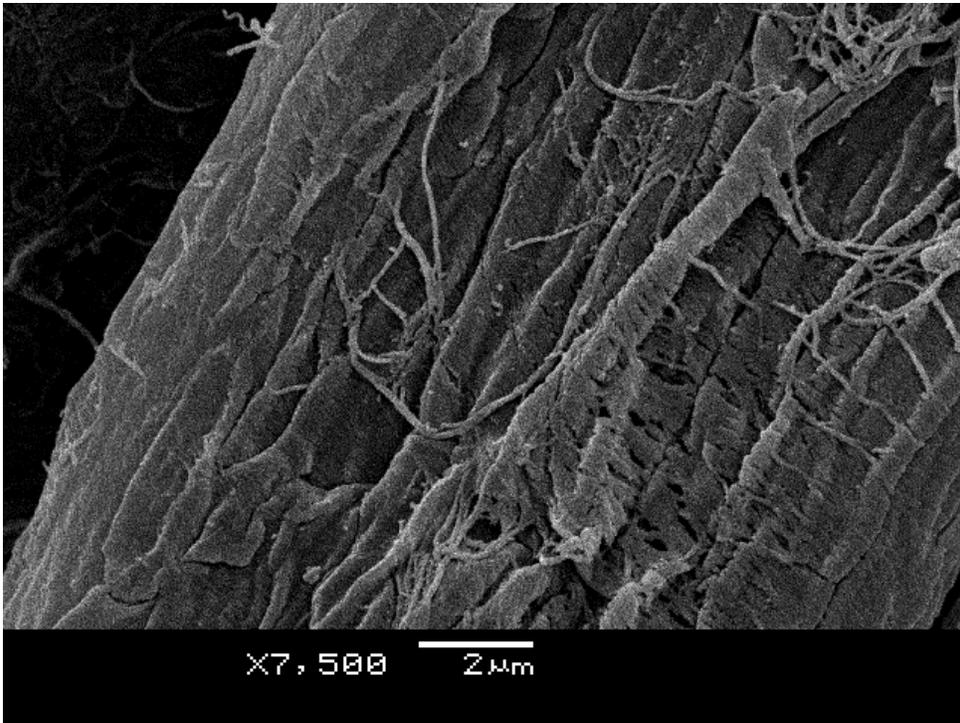


Figura 3.5 Papel de Filtro Whatman N° 1 incubado por 48 h en medio GS2 a 16 °C, 200 rpm. Aumento 7500X, MEB.

3.3 Perfil de crecimiento y cinética de producción de celulasas producidas por *Flavobacterium* sp. AUG42

A partir del resultado presentado en el punto 3.1, se decidió evaluar otros sustratos celulósicos (además del papel de filtro) para determinar si éstos eran también inductores de la producción de celulasas; y además, dilucidar entre ellos, cuál sería el mejor inductor para AUG42. Para ello, se estudió el perfil de crecimiento (Figura 3.6) y la cinética de producción de celulasas (Figura 3.7, y 3.8) utilizando el medio de cultivo GS2, suplementado con distintas fuentes celulósicas (CMC, avicel y celulosa) y como control, se utilizó el medio sin fuente celulósica agregada.

3.3.1 Perfil de crecimiento de *Flavobacterium* sp. AUG42

Los resultados se muestran en la Figura 3.6 y revelan que AUG42 tiene un perfil de crecimiento similar en las cuatro fuentes celulósicas ensayadas, destacándose la CMC como el sustrato que permitió obtener el mayor valor de UFC/mL. Para el caso control (sin sustrato celulósico), la bacteria creció de manera exponencial durante las primeras 24 h de cultivo, con un tiempo de generación similar al observado para los cultivos suplementados con fuentes celulósicas ($3,3 \pm 0,3$ h). Luego de este tiempo (24 h), el número de bacterias viables se mantuvo estable, es decir, el cultivo comenzó la fase de crecimiento estacionaria alcanzando un máximo de $1 \text{ E } 9$ UFC/mL el cual se mantuvo hasta las 72 h de crecimiento.

Para los otros cultivos (GS2 con diferentes sustratos celulósicos) se observó un crecimiento diáuxico con cambio de fuente de carbono y energía: durante las primeras 26 h el cultivo creció en presencia de extracto de levadura, luego la bacteria utiliza los sustratos celulósicos para continuar creciendo hasta las 40 - 48 h de crecimiento, tiempo en el cual se alcanzó la mayor cantidad de UFC/mL ($1 \text{ E } 10$ UFC/mL, aproximadamente). Luego de este tiempo, el número de bacterias viables continuó en el mismo orden (fase estacionaria) hasta las 72 h de crecimiento.

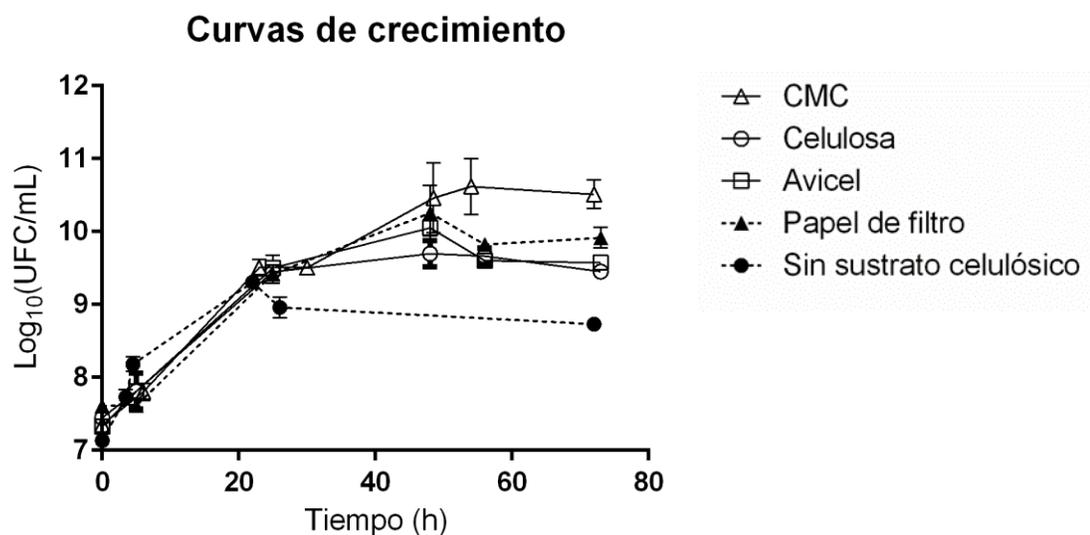


Figura 3.6. Curvas de crecimiento de *Flavobacterium* sp. AUG42 en medio GS2 suplementado con distintos sustratos celulósicos, a 16 °C y 200 rpm. El crecimiento está expresado en Log_{10} (UFC/mL) en función del tiempo de crecimiento. Las barras de error corresponden al desvío estándar.

3.3.2 Cinética de producción de celulasas de AUG42

La producción de celulasas se siguió mediante los ensayos de actividades PASCasa y CMCasa, y los resultados se muestran en las Figuras 3.7 y 3.8, respectivamente.

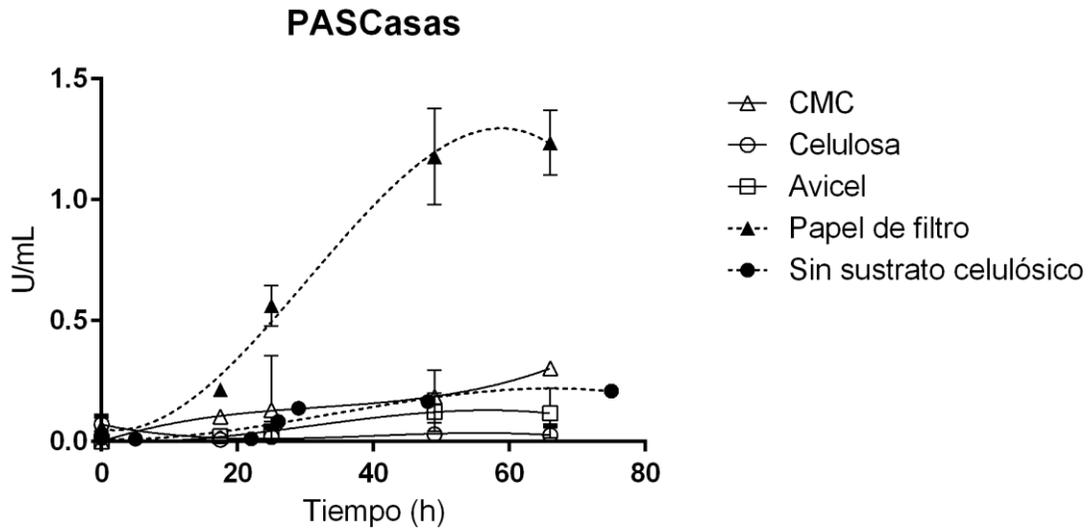


Figura 3.7. Actividad PASCasa de los sobrenadantes de cultivo de *Flavobacterium* sp. AUG42 crecida en medio GS2 suplementado con distintos sustratos celulósicos, a 16 °C y 200 rpm, en función del tiempo de crecimiento. Las barras de error corresponden al desvío estándar.

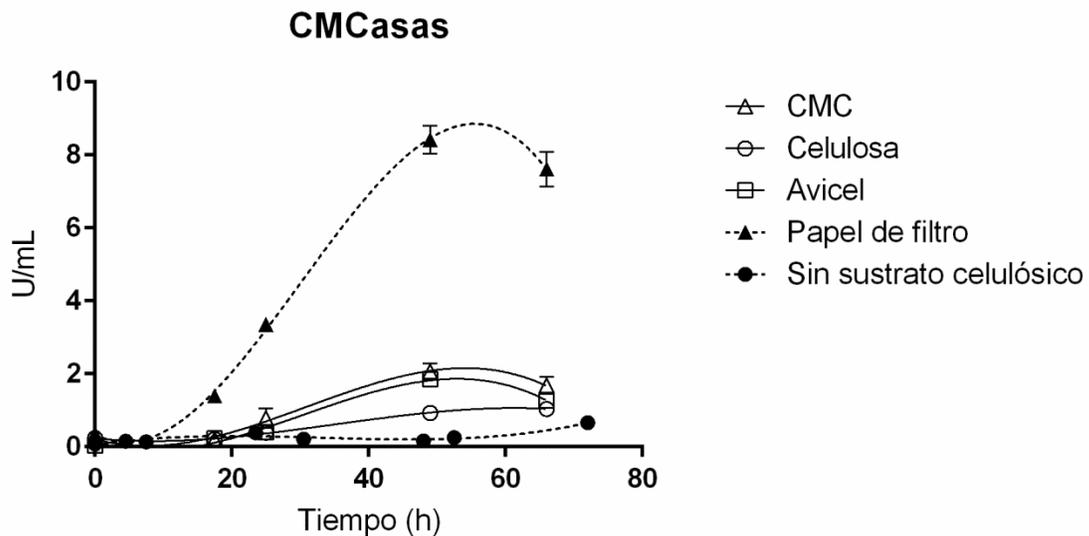


Figura 3.8. Actividad CMCasa de los sobrenadantes de cultivo de *Flavobacterium* sp. AUG42 en medio GS2 suplementado con distintos sustratos celulósicos, a 16 °C y 200 rpm, en función del tiempo de crecimiento. Las barras de error corresponden al desvío estándar.

Se observó que en ambos casos la actividad enzimática presente en los sobrenadantes libres de células, fue máxima cuando el microorganismo creció con papel de filtro como sustrato celulósico. A su vez, la mayor actividad sobre ambos sustratos (PASC y CMC) se logró alrededor de las 48 h de crecimiento, tiempo que coincide con una fase de crecimiento exponencial tardía, principios de la fase estacionaria.

Estos resultados sugieren que todos los sustratos celulósicos evaluados inducen la producción de celulasas en AUG42; que el papel de filtro es el mejor inductor; y que la máxima producción ocurre durante la fase exponencial tardía, principios de la fase estacionaria. En base a esto, se probó si otros sustratos celulósicos eran capaces de inducir la producción de celulasas, a las 48 h de crecimiento.

3.3.3 Sustratos celulósicos alternativos para inducir la producción de celulasas

Se exploró también el potencial de otros sustratos celulósicos como posibles inductores de la producción de celulasas, pero analizando la actividad a un único tiempo de crecimiento (48 h), el tiempo que coincide con la mayor producción de celulasas en los medios antes explorados. Los resultados (Tabla 3.1) muestran que ninguno de los tres nuevos sustratos (algodón, switchgrass y *E. globulus*) resultó ser buen inductor de la producción de PASCas. Sin embargo, se obtuvo una actividad CMCasa de $4,3 \pm 0,3$ U/mL cuando AUG42 creció con switchgrass como sustrato celulósico, lo cual representa un 50 % de la actividad CMCasa detectada en el sobrenadante de cultivo de la bacteria crecida en papel de filtro, para un mismo tiempo de crecimiento.

Tabla 3.1. Actividad PASCasa y CMCasa, medida en el sobrenadante de cultivo de *Flavobacterium* sp. AUG42 luego de 48 h de crecimiento a 16 °C y 200 rpm..

Sustrato celulósico (0,5 % m/v)	PASCas (U/mL)	CMCasas (U/mL)
Algodón	$0,17 \pm 0,01$	$2,4 \pm 0,2$
Switchgrass	$0,26 \pm 0,02$	$4,3 \pm 0,3$
<i>E. globulus</i>	$0,13 \pm 0,03$	$0,43 \pm 0,04$
Avicel	$0,17 \pm 0,08$	$2,0 \pm 0,1$
CMC	$0,18 \pm 0,08$	$2,0 \pm 0,1$
Celulosa	$0,06 \pm 0,09$	$1,0 \pm 0,1$

Papel de filtro	$1,2 \pm 0,2$	$8,2 \pm 0,1$
Control sin fuente celulósica	$0,08 \pm 0,08$	$0,1 \pm 0,1$

3.3.4 Temperatura óptima para la producción de celulasas

Una vez establecido que se trabajaría con el aislamiento AUG42 crecido en el medio GS2 suplementado con papel de filtro como fuente de carbono celulósico, se analizaron el perfil de crecimiento y la cinética de producción de celulasas, a diferentes temperaturas.

Para ello, se varió la temperatura de crecimiento de la bacteria y se determinaron las actividades CMCasa y PASCasa en los sobrenadantes de cultivo libres de células a tres temperaturas: 16 ± 5 °C (11 °C y 21 °C). Los resultados se muestran en las Figuras 3.9 (curvas de crecimiento) y 3.10 (actividades PASCasa y CMCasa).

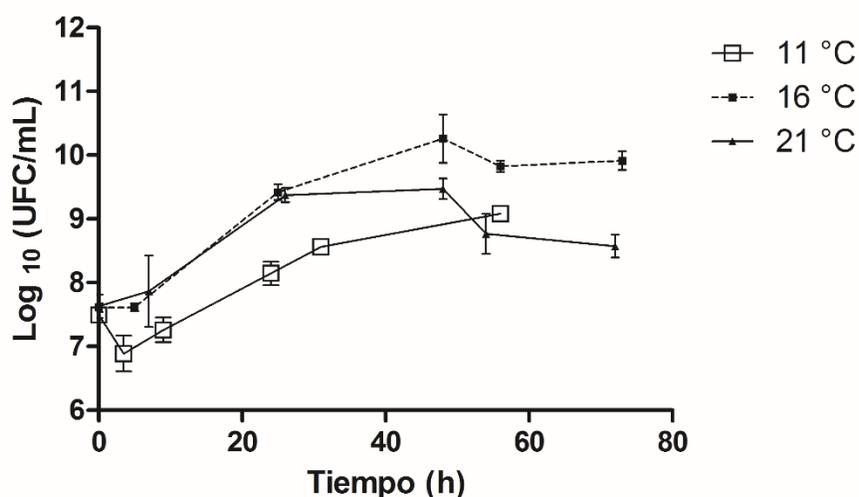


Figura 3.9. Crecimiento de *Flavobacterium* sp. AUG42 a temperaturas de 11, 16 y 21 °C, en medio GS2 suplementado con papel de filtro como sustrato celulósico. Las barras de error corresponden al desvío estándar.

Flavobacterium sp. AUG42 mostró mayor crecimiento a 16 °C (Figura 3.9), donde se obtuvo el mayor número de células viables [$1 \text{ E } (10,3 \pm 0,4) \text{ UFC/mL}$] comparado con el crecimiento a 21 °C [$1 \text{ E } (9,4 \pm 0,1) \text{ UFC/mL}$] y 11 °C [$1 \text{ E } (9,0 \pm 0,1) \text{ UFC/mL}$].

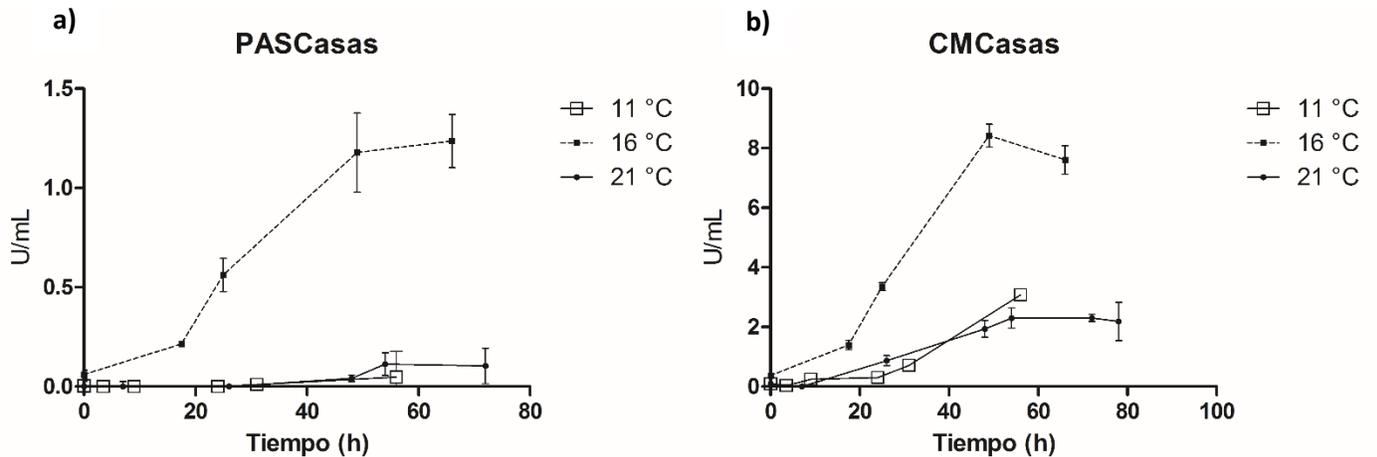


Figura 3.10. Cinética de producción de celulasas a diferentes temperaturas de crecimiento. **a)** Actividad PASCasa y **b)** actividad CMCasa de los sobrenadantes de cultivo de AUG42 crecida a 11, 16 y 21 °C, en función del tiempo de crecimiento. Las barras de error corresponden al desvío estándar.

Para las tres temperaturas probadas, el máximo valor de UFC/mL se obtuvo a las 48 h de crecimiento. Luego de este tiempo, la cantidad de bacterias viables se estabilizó (comienza la fase estacionaria) o incluso disminuyó, como se observa a los 16 y 21 °C, sugiriendo que la cantidad de células que mueren es mayor a la cantidad que se está generando (fase de muerte). AUG42 presentó un tiempo de generación durante la fase de crecimiento exponencial de: 1) $3,3 \pm 0,3$ h a 16 °C; 2) $3,8 \pm 0,3$ h a 21 °C; y 3) $5,0 \pm 0,3$ h a 11 °C.

Respecto a los niveles de actividades enzimáticas, presentes en los sobrenadantes de cultivo de AUG42 crecida a las tres temperaturas mencionadas (Figura 3.10), se encontró que la mayor actividad celulasa (tanto PASCasa como CMCasa) se detectó cuando la bacteria creció a 16 °C luego de 48 h de crecimiento.

A partir de los resultados anteriores, se definió como “preparado enzimático” al sobrenadante de cultivo de AUG42 obtenido luego de crecer la bacteria en medio GS2 suplementado con papel de filtro por 48 h a 16 °C. A continuación se describe la caracterización bioquímica realizada al mismo.

3.4 Caracterización bioquímica del preparado enzimático

3.4.1 Determinación de las condiciones de velocidad inicial de la actividad celulasa

Si bien la determinación de actividad enzimática en condiciones de velocidad inicial se realiza con enzimas puras, en este caso se buscaba conocer en qué tiempos de incubación, del preparado enzimático con el sustrato, las condiciones se acercan a las de velocidad inicial. Para ello, se lo incubó con los sustratos celulósicos CMC y PASC durante diferentes tiempos y se siguió a la reacción mediante la liberación de azúcares reductores, en condiciones de pH y temperatura controladas. Los resultados se muestran en las Figuras 3.11 y 3.12 (para actividades PASCasa y CMCasa, respectivamente). Para los mismos se buscó el mejor ajuste de las series de datos, siendo éste un ajuste hiperbólico, pero también se realizó una regresión lineal de los datos determinándose que dentro de los primeros 180 y 60 min de incubación (actividades PASCasa y CMCasa, respectivamente) la cantidad de producto liberado estuvo en una proporción directa respecto al tiempo de incubación, mostrando un R^2 de 0,96 y 0,97, respectivamente. Por ello, se continuó trabajando con la concentración de sustrato y tiempos de incubación detallada en Materiales y Métodos.

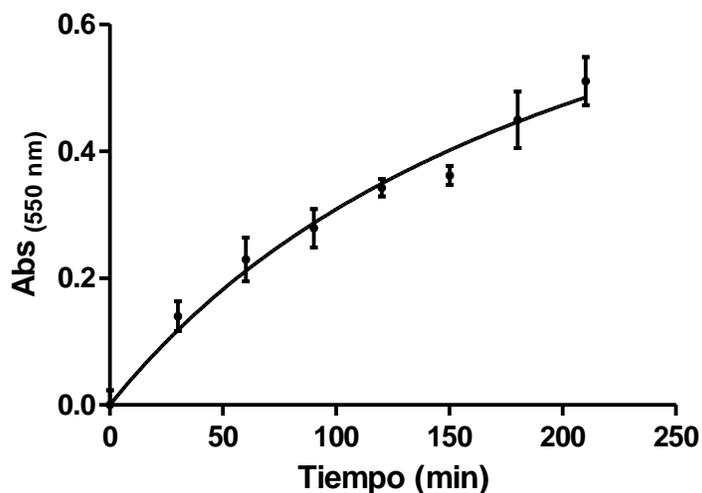


Figura 3.11. Actividad PASCasa en función del tiempo de incubación del preparado enzimático con el sustrato PASC (a 40 °C y pH 5,5). Ajuste realizado de tipo no lineal, hiperbólico. Las barras de error corresponden al desvío estándar.

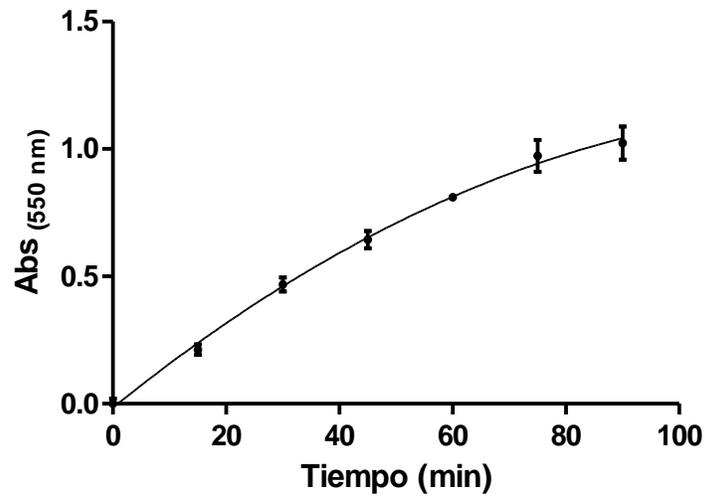


Figura 3.12. Actividad CMCasa en función del tiempo de incubación del preparado enzimático con el sustrato CMC (a 40 °C y pH 5,5). Ajuste realizado de tipo no lineal hiperbólico. Las barras de error corresponden al desvío estándar.

3.4.2 Determinación de la temperatura y pH óptimos

Para determinar la temperatura a la cual se obtiene la mayor cantidad de producto por unidad de tiempo, se incubó el preparado enzimático con ambos sustratos, variando la temperatura del ensayo entre 20 y 70 °C, y trabajando a pH constante (5,5). Los resultados se muestran en la Figura 3.13 y se observa que tanto para la actividad PASCasa como para la CMCasa, la mayor cantidad de azúcares reductores liberados se obtuvo cuando el ensayo se realizó a 50 °C. Realizando un análisis del gráfico, y considerando como 100 % los azúcares reductores producidos a 50 °C, se calcularon los porcentajes relativos de los azúcares reductores liberados a partir de ambos sustratos celulósicos (PASC y CMC), los cuales se presentan la Tabla 3.1.

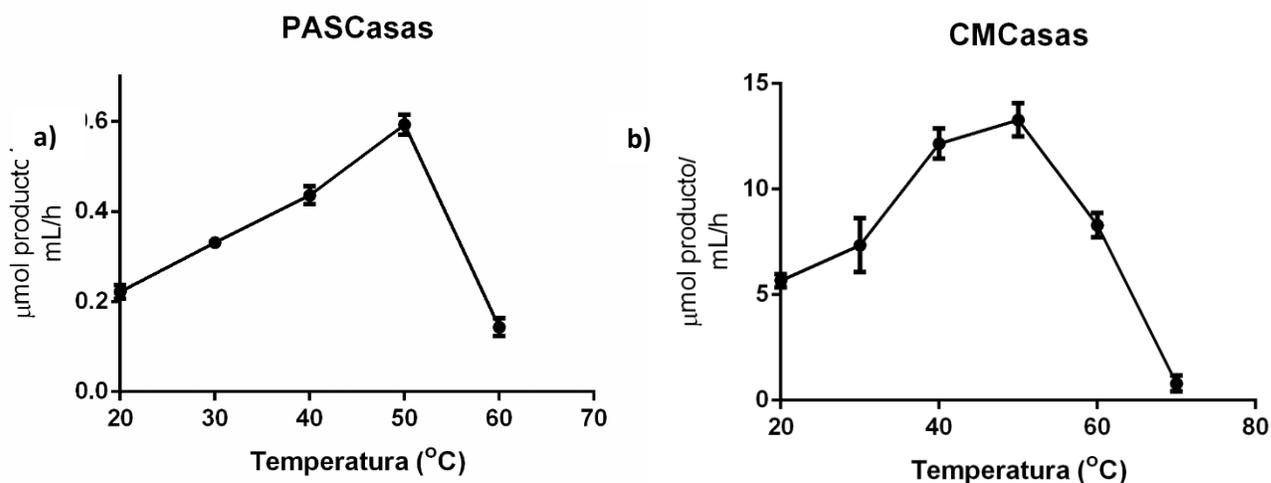


Figura 3.13. Actividades PASCasa **a)** y CMCasa **b)** del preparado enzimático a diferentes temperaturas. Se muestran los μmoles de azúcares reductores liberados por mL del preparado enzimático en una hora de reacción, en buffer acetato de sodio 50 mM, pH 5, 5. Las barras de error corresponden al desvío estándar.

Tabla 3.1. Azúcares reductores liberados a partir de PASC y CMC, utilizando el preparado enzimático a distintas temperaturas de incubación.

Sustratos	Porcentaje de azúcares reductores relativo a distintas temperaturas				
	60 °C	50 °C	40 °C	30 °C	20 °C
PASC	27	100	75	55	35
CMC	60	100	94	50	45

Basados en estos resultados, la caracterización del pH óptimo se realizó a 40 °C, condición que se acerca a la temperatura óptima para la fermentación etanólica por levaduras. Para ello, se realizaron los ensayos enzimáticos a diferentes pHs en un rango de 3,5 a 9,5, utilizando el *buffer* mezcla descrito en el ANEXO 2. *Buffers*. Los resultados se muestran en la Figura 3.14 (a y b).

El pH óptimo para la actividad PASCasa fue de 5,5 (Figura 3.14a) y para la actividad CMCasa fue de 6,5 (Figura 3.14b). De acuerdo al perfil de los gráficos obtenidos, ambas enzimas actuarían mejor a pHs neutros-levemente ácidos, mostrando una notoria pérdida de actividad a pHs básicos.

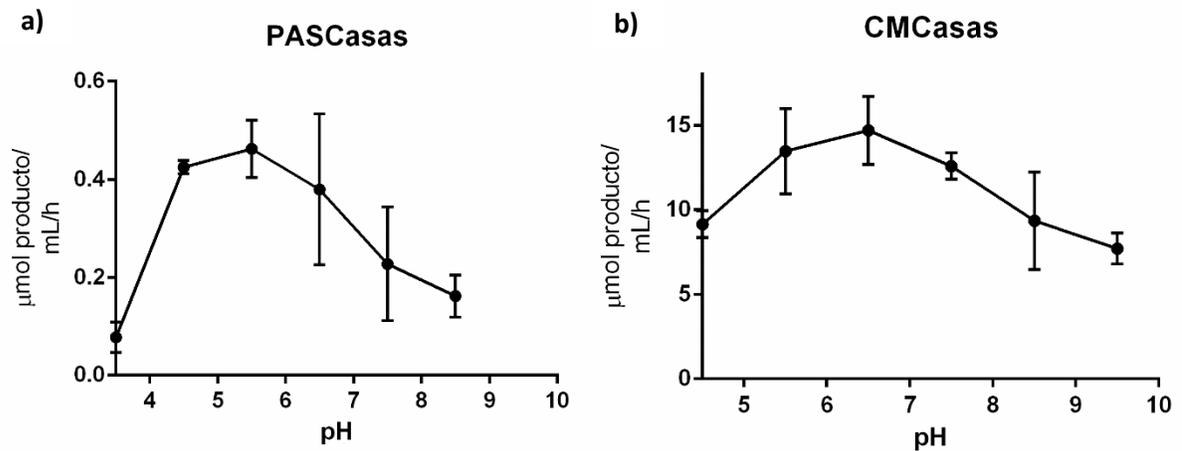


Figura 3.14. Determinación de pH óptimo para las actividades PASCasa **a)** y CMCasa **b)**. Se muestran los valores de azúcares reductores liberados por hora de reacción, a 40 °C en *buffer* mezcla, por mL de preparado enzimático. Las barras de error corresponden al desvío estándar.

El resto de la caracterización de las actividades enzimáticas se realizó a pH 5,5 y 40 °C, condiciones cercanas a las utilizadas durante la fermentación etanólica, y que no se alejan de las óptimas de actividad del preparado enzimático.

3.4.3 Efecto de agentes químicos sobre las actividades enzimáticas

Con el fin de identificar posibles moléculas capaces de potenciar o inhibir las actividades CMCasa y PASCasa, se incubó el preparado enzimático con diferentes agentes y posteriormente se agregó el sustrato correspondiente (CMC o PASC) y se prosiguió con el ensayo enzimático, como se detalla en Materiales y Métodos. Como control positivo, el preparado enzimático se incubó con agua destilada. La actividad de este control se consideró como 100 % y se calculó la actividad relativa o remanente para cada uno de los agentes analizados. Los resultados se muestran en las Figuras 3.15 y 3.16.

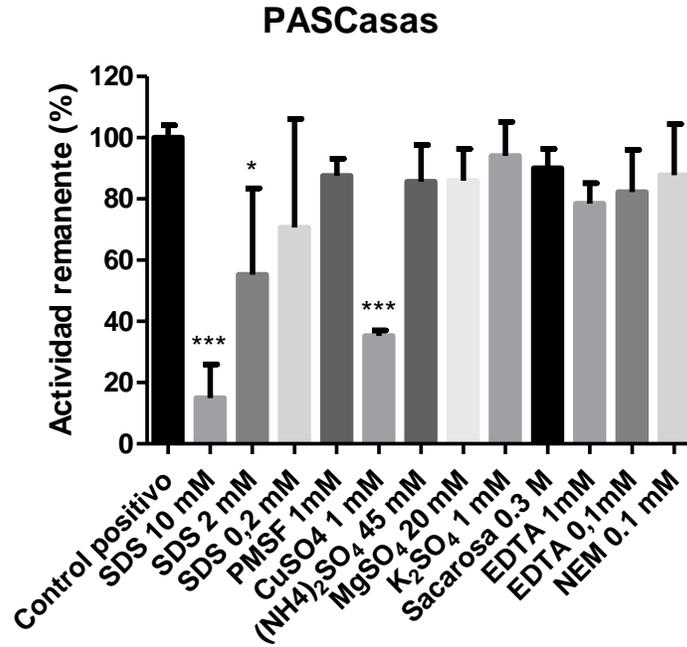


Figura 3.15. Actividad PASCasa frente a diferentes agentes químicos. Actividad remanente obtenida luego de incubar el preparado enzimático con distintos compuestos químicos. Análisis estadístico realizado con *One way ANOVA*, *Dunnett's Multiple Comparison Test*. Las barras de error corresponden al desvío estándar.

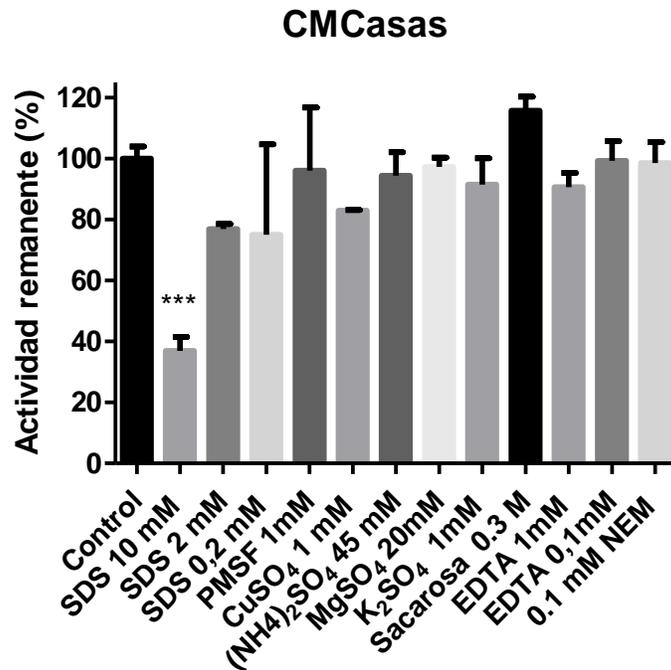


Figura 3.16. Actividad CMCasa frente a diferentes agentes químicos. Actividad remanente obtenida luego de incubar el preparado enzimático con distintos compuestos químicos. Análisis estadístico realizado con *One way ANOVA*, *Dunnett's Multiple Comparison Test*. Las barras de error corresponden al desvío estándar.

Estos resultados revelaron que el detergente aniónico SDS, a una concentración de 10 mM, disminuyó en un 60 % y 80 % las actividades relativas CMCasa y PASCasa, respectivamente. A concentraciones menores (2mM y 0,2 mM), este agente no modificó la actividad celulasa de manera significativa según el test utilizado.

El ion cobre Cu^{2+} inhibió la actividad PASCasa, obteniéndose un 40 % de la actividad remanente, en las condiciones ensayadas.

El efecto de los cationes Mn^{2+} y Co^{2+} no se analizó, ya que los mismos reaccionaron con el DNS, desarrollando valores de absorbancia superiores al rango de sensibilidad del reactivo (incluso en controles realizados sin la enzima).

Ninguno de los agentes utilizados incrementó la actividad celulasa de manera significativa, por lo tanto, no se detectó ningún activador de las actividades CMCasa ni PASCasa.

3.4.4 Estabilidad de las actividades PASCasa y CMCasa del preparado enzimático

Se estudió la estabilidad del preparado enzimático, evaluando las actividades PASCasa y CMCasa luego de 30 días de almacenamiento a diferentes temperaturas: -20, 4 y 20 °C. Los resultados se muestran en la Figuras 3.17a y 3.17b.

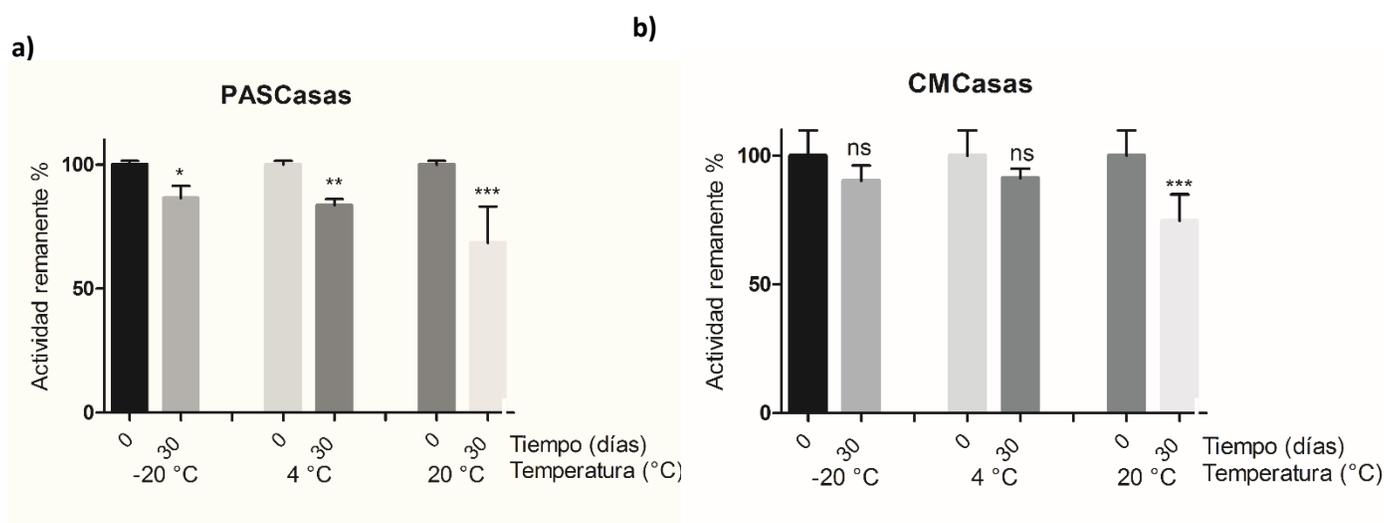


Figura 3.17. Estabilidad a diferentes temperaturas. **a)** Actividad PASCasa y **b)** CMCasa. Se graficó el porcentaje (%) de la actividad remanente del preparado enzimático luego de su almacenamiento a distintas temperaturas durante 30 días, analizado estadísticamente con ANOVA mediante el test *Dunnett's Multiple Comparison*. * significa "grado de significancia", y ns significa "no significativo". Las barras de error corresponden al desvío estándar.

Se observó que luego de 30 días de almacenamiento el preparado mantiene más del 60 % de la actividad inicial a todas las temperaturas evaluadas, con la particularidad de que a 20 °C, el % de actividad remanente fue menor que a 4 y a -20 °C. La actividad PASCasa disminuyó significativamente en las tres temperaturas de almacenamiento. Según el *test Dunnett's Multiple Comparison*, se encontró un grado de significancia para -20 °C y dos y tres grados de significancia para 4 y 20 °C respectivamente, respecto al control (actividad medida el día cero). En tanto, la actividad CMCasa disminuyó de manera significativa (utilizando el mismo test estadístico que en el caso anterior), sólo cuando el preparado se almacenó a 20 °C.

Evaluando otras condiciones de almacenamiento (que a su vez pudieran facilitar el transporte y manejo del preparado enzimático, sobre todo en un contexto industrial), se liofilizó el preparado enzimático. Como resultado, se vio que el preparado mantuvo el 100% de ambas actividades luego de liofilizarlo.

Estos resultados permitieron afirmar que era posible almacenar el preparado enzimático a 4 °C durante 30 días, sin una gran pérdida de actividades CMCasa y PASCasa, y que a su vez es posible concentrarlo por liofilización, dato relevante por ejemplo, para almacenarlo, transportarlo o para concentrarlo y profundizar en su caracterización.

3.4.5 Determinación de otras actividades glucolíticas en el preparado enzimático

Se analizó su potencial para degradar otros sustratos glucosídicos como almidón (polímero de D-glucosas, unidas por enlaces α -1,4 y α -1,6) y celobiosa (dímero de D-glucosa unidas por un enlace β -1,4). En ninguna de las condiciones evaluadas se detectó la presencia de actividad amilasa, pues se probó el preparado enzimático concentrado, sin concentrar, a distintos tiempos de incubación, entre otros y no se detectaron azúcares reductores.

Cuando se evaluó la presencia de actividad celobiasa en el preparado enzimático, (realizada de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, Sección 2.5.4), se detectó una liberación de $0,50 \pm 0,05$ μ moles de glucosa por mL de preparado enzimático, por hora de reacción en *buffer* acetato de sodio 10 mM, pH 5,5 y a 40 °C.

Posteriormente se evaluó esta actividad a distintos pHs (Figura 3.18) y temperaturas (Figura 3.19).

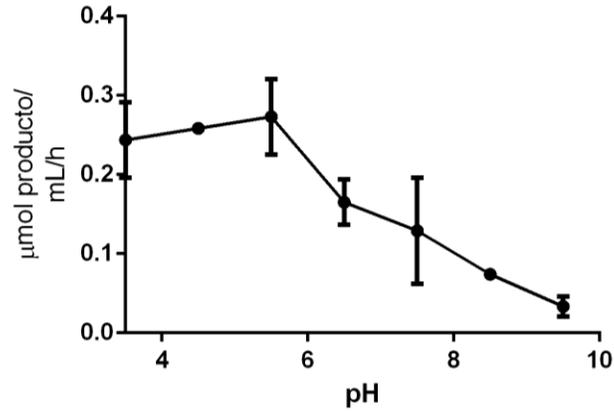


Figura 3.18. Actividad celobiasa en función del pH, utilizando *Buffer* mezcla ajustado a distintos pHs. Las barras de error corresponden al desvío estándar.

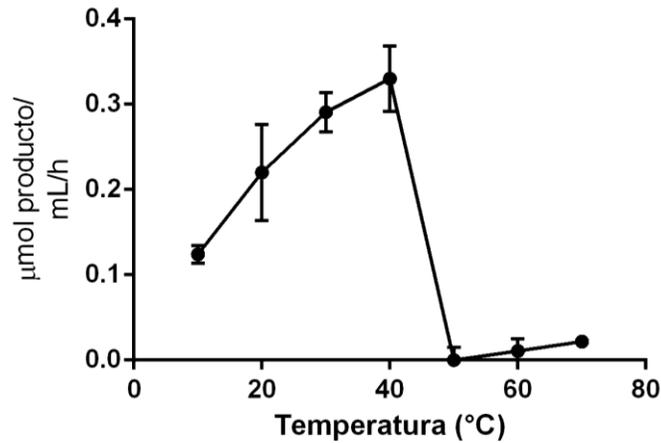


Figura 3.19. Actividad celobiasa del preparado enzimático, en función de la temperatura de incubación. Las barras de error corresponden al desvío estándar.

Como resultado se determinó que el pH óptimo de la actividad celobiasa es de 5,5. Al igual que las actividades CMCasa y PASCasa, la actividad celobiasa también funcionaría bien a pHs levemente ácido-neutros presentando además, un notorio descenso de actividad a pH básicos. En cuanto al efecto de la temperatura, se vio que a 40 °C se obtuvo la mayor liberación de producto. A temperaturas superiores a 50 °C la actividad celobiasa es nula. A su vez, se observó un 30 % de actividad remanente a 10 °C (considerando el 100% de actividad a 40 °C), dato que puede interesar para diversos ámbitos de la industria de enzimas siccófilas.

3.4.6 Análisis del secretoma

En esta sección, se denominó “secretoma” específicamente a las proteínas presentes en el preparado enzimático, que por tratarse de un sobrenadante de cultivo libre de células, incluiría únicamente las proteínas secretadas por AUG42. No se analizaron otros posibles metabolitos que se pudieran haber secretado.

Los experimentos anteriores nos permitieron conocer que el secretoma contenía enzimas con actividades PASCasa, CMCasa y celobiasa. Para acercarnos a la identificación de estas enzimas se realizaron varios estudios: 1) análisis electroforéticos (SDS-PAGE, isoelectroenfoque y zimogramas), que permitieron conocer el número de bandas proteicas con actividad CMCasa, sus tamaños moleculares y sus puntos isoeléctricos y 2) ensayos analíticos/bioinformáticos (*shotgun* de proteínas comparado con el CAZoma de AUG42), que permitieron identificar las glicosil hidrolasas presentes en el secretoma.

3.4.6.1 Análisis electroforéticos

La Figura 3.20 muestra un zimograma acoplado a una SDS-PAGE (con la muestra sin desnaturalizar por calor) donde se visualizaron cuatro bandas de hidrólisis (señaladas con flechas), dos de ellas de aproximadamente 80 y 100 kDa (con mayor actividad) y otras dos de menor tamaño, alrededor de 30 kDa (con menor actividad). Respecto a los tamaños moleculares es válido destacar que las muestras no fueron desnaturalizadas por calor, por lo tanto, se trata de tamaños moleculares aparentes.

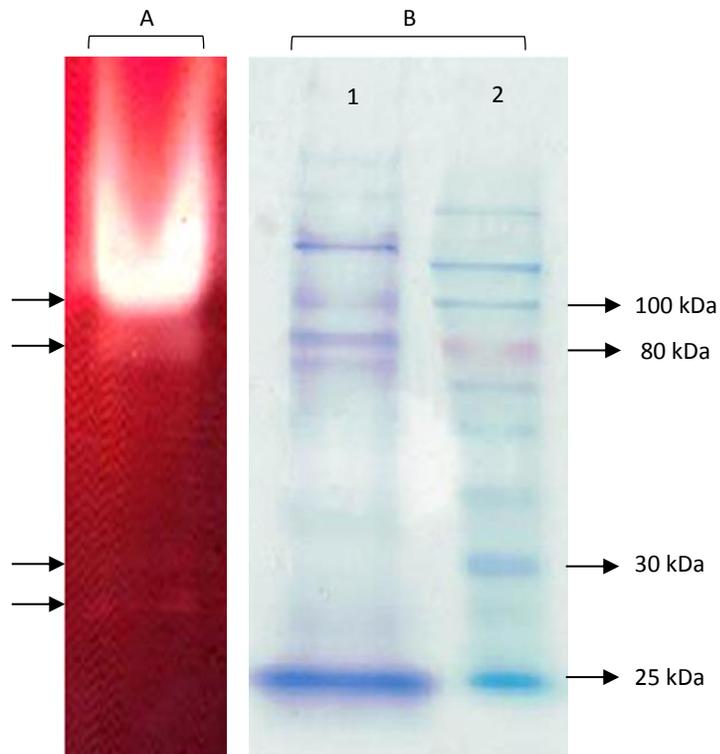


Figura 3.20. Zimograma y SDS PAGE. A. zimograma, B. SDS-PAGE (carril 1: Preparado enzimático 5X concentrado por liofilización y disuelto en agua Milli Q, carril 2: marcador de tamaño molecular Color Plus NEB Cat: P7711S).

Para determinar los puntos isoeléctricos de las CMCasas, se realizó un isoelectroenfoque y un zimograma acoplado, tal como se detalla en Materiales y Métodos.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.21. El preparado enzimático presentaría varias enzimas con actividad CMCasa, cuyos puntos isoeléctricos varían desde 5,8 a 7,4, aproximadamente. Se destacan dos bandas de hidrólisis más intensas, con puntos isoeléctricos alrededor de 6,0 y 7,3. La multiplicidad de bandas de hidrólisis, correspondientes a enzimas de distintos puntos isoeléctricos, podría deberse a la presencia de isoenzimas con distinta carga neta, y/o glicosilaciones, entre otras.

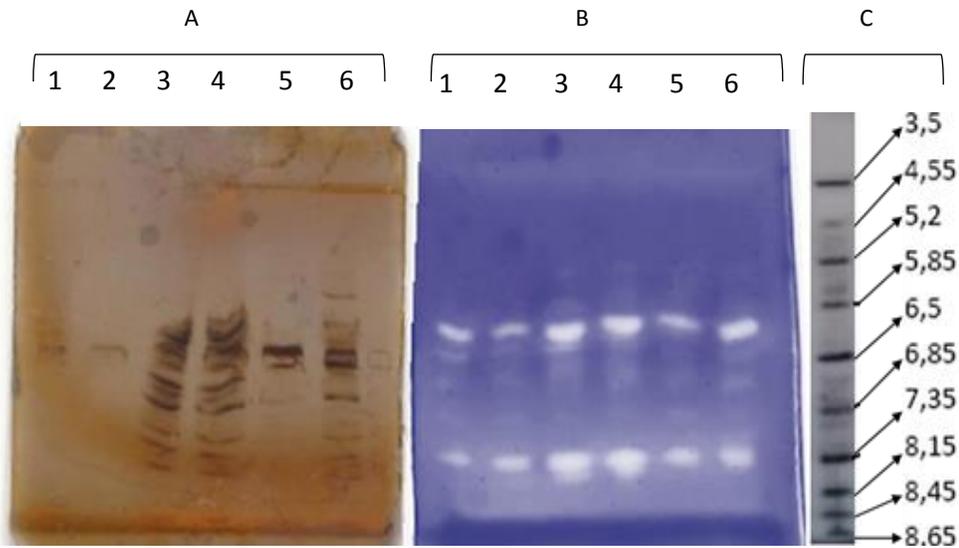


Figura 3.21. A: Isoelectroenfoque del preparado enzimático y revelado de proteínas con tinción con plata. B: Zimograma realizado a partir del isoelectroenfoque. Pocillos 1, 2 y 5: preparado enzimático 2,5 X; pocillos 3, 4 y 6: preparado enzimático 12,5 X. C: Marcador de puntos isoeléctricos.

Como resumen, se puede concluir que el preparado enzimático presentaría al menos cuatro proteínas con actividad CMCasa, de tamaños moleculares aparentes entre los 100 y 30 kDa, y puntos isoeléctricos variables entre 5,8 y 7,4.

3.4.6.2 Identificación de proteínas por Espectrometría de Masas

Se realizó también una SDS-PAGE de las muestras desnaturalizadas por calor, y para identificar las bandas presentes se utilizó el servicio de espectroscopía de masas (MS-MALDI/TOF), de UBYPA del Institut Pasteur. Se enviaron a identificar cinco bandas proteicas, señaladas en la Figura 3.22.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.2. Estos resultados no permitieron identificar las celulasas, probablemente porque la comparación peptídica se realizó contra la base de datos del genoma anotado de una bacteria del mismo género que AUG42 (*Flavobacterium frigidarium*), pero se desconoce si AUG42 pertenece a la misma especie. Dos de tres bandas, no presentan homología significativa con ninguna de las proteínas presentes en la base de datos utilizada. Pese a ello, se identificó una proteína como una xilosa isomerasa, proteína que normalmente está involucrada en el metabolismo de la hemicelulosa, ya que isomeriza xilosa a glucosa.

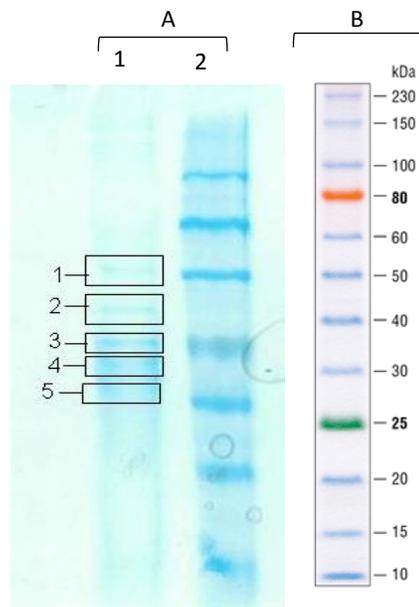


Figura 3.22. SDS-PAGE realizada para identificación de proteínas. A. SDS-PAGE, carril 1: se muestra el perfil de proteínas del preparado enzimático y en el carril 2: el marcador de tamaño molecular. B. Marcador de tamaño molecular utilizado: Color Plus NEB Cat: P7711S. La imagen es la parte superior del gel, ya que no se observaron bandas menores a 40 kDa.

Tabla 3.2. Resultados de la identificación de proteínas por espectrometría de masa.

Muestra	Proteína identificada por Espectrometría de masa	Masa mol. teórica (kDa.)
1	"xylose isomerase" de <i>Flavobacterium frigidarium</i>	48.8
2	"methionine adenosyltransferase" de <i>Flavobacterium frigidarium</i>	45.5
3	"dihydrolipoyl dehydrogenase" de <i>Flavobacterium frigidarium</i>	49.4
4	No identificada	-
5	No identificada	-

En la primera columna se detalla el número de la muestra, en la segunda columna se describe la proteína con mayor homología presente en las bases de datos, y en la tercera columna está la masa molecular teórica de la proteína de mayor homología.

3.5 Análisis del genoma de AUG42: Búsqueda de posibles celulasas

En esta etapa, se buscó identificar las enzimas involucradas en la degradación de los sustratos celulósicos, a nivel del genoma de la bacteria. De esta manera, por análisis y comparación de datos *in silico* fue posible obtener el conjunto de proteínas involucradas en el metabolismo de carbohidratos, también conocido como CAZoma.

Es de mencionar que el ensamblado y anotación del genoma de AUG42 fue realizada por el Lic. Danilo Morales, integrante de nuestro grupo de trabajo. Basados en este trabajo previo, en esta Tesis se identificó un total de 157 proteínas con 179 dominios relacionados al metabolismo de carbohidratos. Los resultados se muestran en la Tabla 3.3 y la Figura 3.23. Algunas proteínas presentaron dominios de unión a carbohidratos (CBM, del inglés *Carbohydrate Binding Module*), y/o dominios de actividad enzimática del tipo “CAZymas” (del inglés *CAZymes: Carbohydrate Active Enzymes*). Dentro de ellas, se identificaron 34 CBM, 46 dominios GH, 9 dominios PL, 23 dominios CE, 64 GT y 3 dominios AA.

En el gráfico de proyección solar (Figura 3.18) se puede ver que la mayoría de los dominios relacionados al metabolismo de carbohidratos corresponde a glicosil transferasas, seguido por una gran variedad de glicosil hidrolasas. Respecto a los dominios con actividades auxiliares, solo se detectaron tres, y no corresponderían directamente a oxidasas de carbohidratos, sino a peroxidasas o catalasas del metabolismo general.

En particular, dentro de las GHs, se identificaron posibles celulasas, xilanasas, β -glucosidasas, mananasas, agarasas, liqueninasas, quitinasas, neopululanasas y amilasas; esto convierte a esta bacteria en un nicho de genes codificantes para numerosas enzimas del tipo carbohidrato hidrolasas.

Tabla 3.3. Anotación de proteínas en dbCAN. Se muestran los dominios correspondientes a polisacárido liasas (PL), glicosil transferasas (GT), dominios con actividades auxiliares (AA), glicosil hidrolasas (GH), carbohidrato esterasas (CE) y dominios de unión a carbohidratos (CBM)

Dominio		Cantidad
PL	PL12	1
	PL17	1
	PL5	1
	PL6	1
	PL7	4
	PL9	1
	GT20	1
GT27	1	
GT28	2	
GT30	1	
GT4	19	
GT5	2	
GT51	5	
GT7	1	
GT81	1	
GT9	2	
GT10	1	
GT13	1	
GT19	1	
GT2	26	
AA	AA2	2
	AA3	1
Dominio		Cantidad
GH	GH10	3
	GH109	3
	GH113	1
	GH127	1
	GH13	3
	GH130	1
	GH15	1
	GH16	5
	GH19	3
	GH23	2
	GH25	1
	GH3	5
	GH30	2
	GH31	2
	GH42	1
	GH43	1
	GH5	3
	GH64	1
	GH65	1
	GH73	1
GH74	1	
GH8	1	
GH82	1	
GH9	1	
GH99	1	
Dominio		cantidad
CE	CE1	8
	CE10	4
	CE11	1
	CE14	2
	CE3	4
	CE4	3
	CE7	1
CBM	CBM13	3
	CBM16	1
	CBM20	1
	CBM23	2
	CBM3	1
	CBM32	1
	CBM44	3
	CBM48	1
	CBM5	1
	CBM50	14
	CBM6	1
	CBM60	1
	CBM 67	1
CBM 70	1	
CBM 9	2	

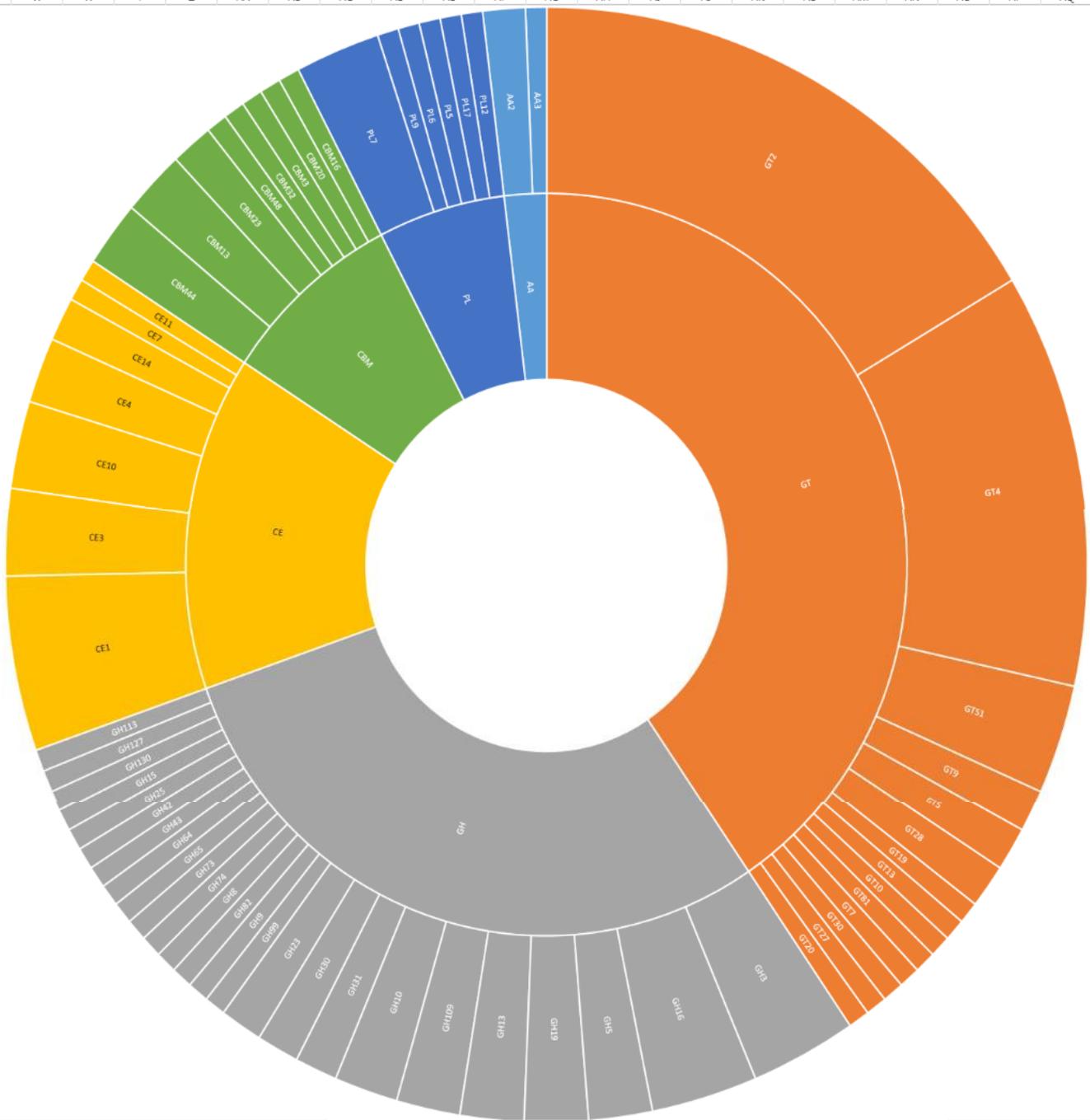


Figura 3.23. Gráfico de jerarquía tipo proyección solar, que muestra según los colores presentes la diversidad de dominios relacionados al metabolismo de carbohidratos, presentes en el genoma. El gráfico sigue el mismo código de colores que la Tabla 3.3.

Tras la búsqueda con énfasis en las CAZymas que podrían liberar azúcares reductores a partir de los sustratos CMC, PASC y celobiosa, se realizó una curación manual de todo el CAZoma. Para ello, todas

las proteínas con dominios GHs de familias 3, 5, 9, 10 y 30 (posiblemente involucradas en la hidrólisis de enlaces del tipo β -1,4 presente en sustratos celulósicos, ver Tabla 3.4) se analizaron en otras bases de datos, tal como se explica en Materiales y Métodos.

Como consecuencia del análisis del genoma de AUG42, también se encontraron genes codificantes para proteínas de transporte de carbohidratos que normalmente se encuentran en la membrana de las bacterias Gram-negativas, como SusC, SusD y TonB; que estarían involucradas en la internalización de carbohidratos, incluyendo derivados de la celulosa (trealosa y celobiosa, cadenas de 3 y 2 moléculas de glucosa respectivamente, unidas por enlaces β -1,4). La búsqueda de proteínas con dominios dockerina y/o cohesina no arrojaron resultados positivos.

3.6 *Shotgun* de proteínas, secretoma y genoma de AUG42

Para conocer cuáles proteínas del CAZoma estaban presentes en el preparado enzimático, (secretoma) se realizó una identificación masiva de proteínas (*shotgun* de proteínas), tal como se explica en Materiales y Métodos. Se enviaron a identificar al servicio de CEQUIBIEM, tres réplicas biológicas del preparado enzimático (con 93, 85 y 58 μ g de proteínas totales).

Mediante este ensayo, se identificaron una totalidad de 312 ± 12 proteínas (el error proviene de las réplicas biológicas), representadas por al menos dos péptidos. Se esperaba que la mayoría de las proteínas presentes fueran extracelulares; sin embargo, también se encontraron proteínas de localización y función intracelular, probablemente liberadas al medio de cultivo por la muerte y/o lisis de algunas bacterias durante el crecimiento, centrifugación del cultivo, filtración, u otros.

Tras la comparación del secretoma con el CAZoma, se identificaron 16 proteínas con al menos un dominio relacionado al metabolismo de carbohidratos. Estas proteínas están contenidas en la Tabla 3.4 (representadas con un asterisco). Además la Tabla contiene las proteínas del CAZoma con dominios GH posiblemente involucrados en la hidrólisis de enlaces β -1,4.

Tabla 3.4. Análisis y curación manual del CAZoma y secretoma de *Flavobacterium* sp. AUG42.

Proteína	Blastp/Uniprot-Swissprot Código de acceso (%cov/%iden)	Blastp/PDB Código de acceso (%cov/%iden)	Dominios PFAM	Dominios DBCAN	PI/PM (Da)
265*	Endoglucanase E-4 P26221.2 (52/54)	Chain A, endoexocellulase:cellobiose from <i>Thermomonospora</i> 1JS4 (51/54)	PF00759.18 GH9 PF00942.17 CBM3	GH9 CBM3	7.13 / 125643.81
266*	Cellulase E1 P54583.1 (42/45)	Chain A, <i>Acidothermus cellulolyticus</i> Endocellulase E1 1ECE (42/46)	PF00150.17 Cellulase	GH5	6.22 / 91976.75
282*	No significant similarity found	No significant similarity found	PF01833.23 TIG (immunoglobulin like)	CBM23	
283*	Endo-1,4-beta-xylanase Q59675.2 (64/36)	Native Xylanase10c From <i>Cellvibrio</i> <i>Japonicus</i> 1US3 (64/36)	PF00331.19 GH10	GH10	5.52 / 50405.16
293	Endo-1,4-beta-xylanase A P49942.1 (90/41)	Crystal structure of a novel reducing- end xylose-releasing exo- oligoxylanase 4PMV (87/64)	PF00331.19 GH10	GH10	6.48 / 43802.97
394*	Beta-porphyranase D7GXG3.1 (45/38)	Beta-Porphyrane Bpgh16b (Bacple_01689) From <i>Bacteroides</i> <i>Plebeius</i> 4AWD (44/36)	PF14200.5 RicinB lectin2	CBM13	8.02 / 71004.74
439	Beta-hexosaminidase P40406.1 (99/28)	Beta-n-hexosaminidase (ybbs) From <i>Bacillus subtilis</i> 3BMX (99/28)	PF00933.20 GH3	GH3	5.71 / 59206.93
565*	GlcNAc-Mal deacetylase 1 Q81ST8.1 (99/38)	Putative Deacetylase Bc1534 From <i>Bacillus Cereus</i> 2IXD (94/37)	PF02585.16 PIG-L	CE14	5.41 / 26495.08
649	Beta-N- acetylglucosaminidase/beta- glucosidase Q7WUL3.1 (38/28)	Crystal Structure Of Mutant (d318n) <i>Bacillus subtilis</i> Family 3 Glycoside Hydrolase 4GIJ (51/30)	PF00933.20 GH3 PF00144.23 Beta lactamase PF01915.21 GH3_C	GH3	8.25 / 112589.87

Proteína	Blastp/Uniprot-Swissprot Código de acceso (%cov/%iden)	Blastp/PDB Código de acceso (%cov/%iden)	Dominios PFAM	Dominios DBCAN	PI/PM (Da)
719*	2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoate hydrolase P9WNH4.1 (96/28)	Probable hydrolytic enzyme (PA3053) from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 4FOJ (99/50)	PF00561.19 Abhydrolase PF12146.7 Hydrolase 4 PF12697.6 Abhydrolase 6 PF03096.13 Ndr	CE1	8.42 / 31876.78
750*	Catalase-peroxidase Q6D5X9.1 (95/79)	Catalase-peroxidase, Katg, from <i>Synechococcus Pcc7942</i> (3WNU) (95/76)	PF00141.22 Peroxidase	AA2 AA2	5.03 / 83019.97
890*	Glycosyl hydrolase family protein 3B A7LXU3.1 (99/46)	Xyloglucan Pul Gh3b With Bound Glucose from <i>Bacteroides ovatus</i> 5JPO (96/47)	PF00933.20 GH3 PF01915.21 GH3_C PF14310.5 FN3 like	GH3	5.72 / 83592.27
891*	Acid beta-glucosidase Q9BDT0.1 (86/33)	Acid-Beta-Glucosidase 2V3D (86/33)	PF02055.15 GH30 PF17189.3 GH30_C	GH30	7.60 / 54726.14
976*	Cellulase Z P07103.2 (41/59)	Cellulase Cel5 From <i>Erwinia chrysanthemi</i> 1EGZ (36/65)	PF00150.17 Cellulase	GH5 CBM60 CBM5	5.75 / 85670.49
1483*	Acidic endochitinase SP2 P42820.1 (9/33)	Endolysin from <i>Salmonella typhimurium</i> 4OK7 (6/42)	PF01551.21 Peptidase M23 PF00182.18 GH19	GH19	7.73 / 114613.32
1608*	Prolyl tripeptidyl peptidase Q7MUW6.1 (45/28)	Dipeptidyl Aminopeptidase Iv From <i>Stenotrophomonas Maltophilia</i> 2 EFC (55/27)	PF00326.20 Peptidase S9 PF00930.20 DPPIV N PF02129.17 Peptidase S15	CE10	6.50 / 87117.45
1719*	Prolyl endopeptidase P27028.1 (96/64)	Appep_d622n Opened State 3IUN (96/61)	PF02897.14 Peptidase S9 N PF00326.20 Peptidase S9	CE10	6.75 / 78016.95

Proteína	Blastp/Uniprot-Swissprot Código de acceso (%cov/%iden)	Blastp/PDB Código de acceso (%cov/%iden)	Dominios PFAM	Dominios DBCAN	PI/PM (Da)
1992	Cellulase 2 P37701.1 (77/41)	Endoglucanase A From <i>Clostridium thermocellum</i> At Atomic Resolution 1IS9 (72/39)	PF01270.16 GH8	GH8	8.76 / 53495.18
2218	Cellobiase P33363.2 (94/42)	Crystal structure of GH3 beta-glucosidase from <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> 5XXL (94/46)	PF00933.20 GH3 PF01915.21GH3_C PF14310.5 FN3 like	GH3	5.85 / 84425.56
2261*	Carboxylesterase 2 Q53547.1 (97/29)	Esterase Pe8 5DWD (83/27)	PF02230.15 Abhydrolase 2 PF00756.19 Esterase PF03959.12 FSH1 PF01738.17 DLH PF07819.12 PGAP1 PF10503.8 Esterase phd	CE1	5.23 / 24447.66
3439	Probable mannan endo-1,4-beta-mannosidase Q0C8J3.1 (21/29)	Native Structure Of Endo-1,4-Beta-D-Mannanase From <i>Thermotoga petrophila</i> Rku-1 3PZ9 (24/25)	PF00150.17 Cellulase PF02836.16 GH2_C	GH5	8.69 / 61002.69
3507*	Probable dipeptidyl-aminopeptidase B B2A951.1 (85/35)	<i>Porphyromonas gingivalis</i> Dipeptidyl Peptidase 4 5OLJ (97/46)	PF00930.20 DPPIV N PF00326.20 Peptidase S9 PF02129.17 Peptidase S15 PF07676.11 PD40 PF01738.17 DLH	CE1	5.80 / 81846.38

En la columna 1, se identifica el nombre de la proteína: cuando está seguida de un asterisco (*) significa que está presente en el secretoma. En las columnas 2 y 3 se incluye el nombre de la proteína que presentó mayores valores de cobertura e identidad respecto a la secuencia aminoacídica, comparándola con las bases de datos Uniprot-SwissProt, y PDB respectivamente. En la columna 4, se describen los dominios PFAM y su correspondiente función, y en la 5 los dominios dbCAN. En la columna 6 se muestran los puntos isoeléctricos y el peso molecular teóricos.

Este análisis permitió confirmar la presencia de celulasas en el preparado enzimático, indicando que las mismas serían las proteínas identificadas como 265, 266 y 976; y que además posee otras GHs, probablemente involucradas en la degradación de hemicelulosa como la 283, la 293, entre otras.

3.7 Modelado y docking de 265 y 976

Dentro de las GHs identificadas por el análisis de proteínas, se seleccionaron dos para estudiarlas estructuralmente, mediante modelado y simulacro de interacción con sustratos (*docking*). Se eligieron las proteínas identificadas como 265 y 976, ya que eran las únicas identificadas como celulasas con alto porcentaje de homología con las bases de datos consultadas que cuentan con módulos de unión a carbohidratos (ver Tabla 3.4). Primeramente, se identificó, a nivel de estructura primaria, la distribución de los distintos dominios tal como lo muestra la Figura 3.24. La enzima 265 presenta un dominio catalítico GH9, y la 976 un dominio GH5.

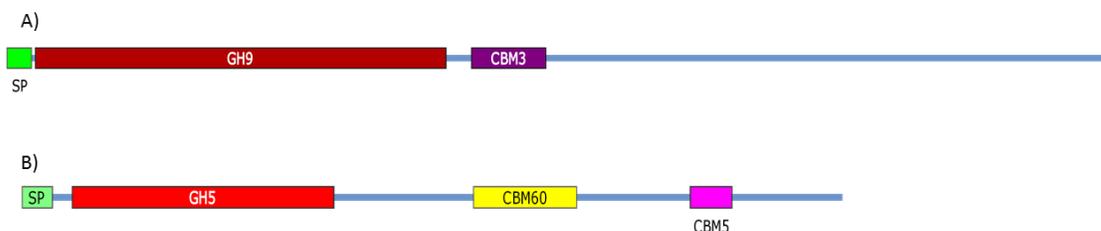


Figura 3.24. Distribución de dominios CAZy detectados por dbCAN para la proteína 265 (A) y la proteína 976 (B). En color verde se muestra el péptido señal, en color bordó y rojo muestran los dominios catalíticos GH9 y GH5; en color violeta el CBM3, en amarillo el CBM60 y en fucsia el CBM5.

En principio, ninguna de las dos proteínas pudo modelarse por completo, ya que no existen moldes disponibles con homología adecuada para la secuencia completa. Por ello, se decidió modelar solamente sus dominios GHs.

Se utilizaron los moldes suministrados por el servidor SwissModel (los de mayores puntajes proporcionados por el servidor) y se realizaron los modelos con este mismo servidor.

Se evaluó la calidad de los modelos mediante los valores de: GMQE (sigla proveniente del inglés *Global Model Quality Estimation*) que refiere a un valor indicador de la calidad global del modelo (cuanto más cercano a uno, mejor es la calidad) y QMEAN (sigla proveniente del inglés *Qualitative*

Model Energy Analysis) cuyo valor debe ser mayor a -3 para ser aceptable; ambos indicaron una buena calidad de los modelos. Éstos a su vez, se analizaron mediante gráficos de Ramachandran, los cuales arrojaron un alto porcentaje de residuos aminoacídicos ubicados en zonas favorables (Tabla 3.5). Estos valores permitieron continuar trabajando con ellos ya que se trataría de modelos de calidad aceptable.

Tabla 3.5 Calidad de modelado de los módulos catalíticos GH9 y GH5 de las proteínas 265 y 976 respectivamente.

Celulasa	Calidad del modelo					Docking				
	Molde	Identidad de secuencia/ cobertura	GMQE	QMEAN	Ramachandran (posición favorable)	Modelo semilla	Sustrato	Enlaces de hidrógeno aminoácido y distancia en Å	Aminoácidos involucrados en unión a Calcio	Aminoácidos catalíticos
265	1js4	63,74 %/ 99 %	0,83	-1,88	94,94 %	1js4	Celo-tetraosa y celobiosa	F(228) 2,131 W(284) 2,105 R (341) 1,991 R (341) 1,409 L (413) 2,353 R (403) 2,167	S (237) D (241) E (242)	D (81) D (84) E (453)
976	4m1r	71,66 %/ 96 %	0,85	-0,04	94,72 %	2a3h	Celo-tetraosa	H (140) 2,383 K (300) 2,028 Q (212) 1,818	N .D.	E (261) E (173)

N.D. significa no detectado.

*La posición se considera desde la primer metionina de la secuencia codificante entera.

Una vez obtenidos los modelos, éstos se utilizaron para realizar estudios de interacción (*docking*) con sustratos celulósicos, como se muestra en la Figura 3.25 y en la Tabla 3.5.

El dominio catalítico modelado de la celulasa 265 tiene la estructura tridimensional característica de la familia GH9. Tiene una estructura en barril formada por 12 cadenas α (α/α)₆, con un surco ubicado donde las cadenas α dan el giro, con capacidad para acomodar una cadena larga de al menos seis glucosas. El modelo conservó uno de los dos sitios de unión a Ca²⁺ presentes en el molde, que probablemente tenga un rol activo en la catálisis enzimática.

Mediante el *docking* realizado, se pudo inferir que el sustrato ingresaría al surco catalítico por el extremo no reductor y que la hidrólisis estaría catalizada por los aminoácidos E (453), D (81) y D (84), aminoácidos reportados como involucrados directamente en la hidrólisis del enlace glicosídico (Figura 3.25).

También se realizó un modelado de la celulasa 265 incluyendo el dominio de unión a carbohidratos (CBM3) donde se vio que el CBM presenta continuidad entre su dominio de unión y el surco del sitio activo del GH9 (Figura 3.26).

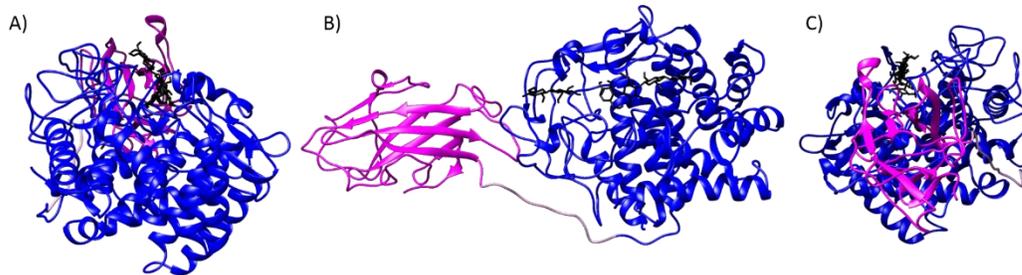


Figura 3.26. Modelo parcial de la proteína 265 (módulo GH9 en azul y CBM3 en rosado; sustrato en color negro). Se muestra la proteína parcialmente modelada, vista desde el dominio catalítico GH9 (A), vista lateral (B) y vista desde el dominio CBM3 (C). Las imágenes A y C permiten visualizar una continuidad entre el dominio de unión a carbohidratos y el dominio catalítico.

Esto coincide con lo demostrado por Sakon et al. (1997), lo cual podría estar sugiriendo un carácter procesivo de la enzima, con clivaje de la cadena de celulosa y producción de oligosacáridos de cuatro glucosas de longitud, lo que la define como una endocelulasa.

Para el caso de la celulasa 976, el modelado del dominio catalítico sugiere que esta tiene las características típicas de un dominio GH5. Presentó una forma de barril (α/β)₈, formado por ocho cadenas α externas y ocho β internas. Su sitio activo se observó como un surco ubicado en el final de las cadenas α y comienzo de las β , y cuenta con dos aminoácidos catalíticos E(173) y E(261) ubicados en la lámina β ₄ y β ₇ respectivamente, que atacarían el enlace glicosídico mediante el mecanismo de doble desplazamiento de Koshland, donde uno de los ácidos glutámicos actuaría como nucleófilo y el otro como electrófilo, tal cual se ha descrito para otras GH5. Esta proteína tendría una alta homología estructural con la proteína 4m1r (pues es el molde elegido por el servidor Swiss-Model), cristalizada por Alvarez et al. (2013), quienes reportaron actividad endocelulasa para la enzima producida de manera recombinante.

3.8 Ensayos de sacarificación y fermentación secuencial

Una vez culminada la caracterización parcial del preparado enzimático, el mismo se utilizó para la sacarificación y posterior producción de etanol, según se describe a continuación.

3.8.1 Sacarificación de distintos sustratos

Se exploraron diez sustratos celulósicos para evaluar el potencial celulolítico del preparado enzimático, de los cuales sólo tres (PASC, CMC y celobiosa) demostraron interaccionar con el preparado, de acuerdo a los valores obtenidos de azúcares reductores liberados. No se detectó liberación de azúcares reductores luego de la incubación del preparado enzimático con papel de filtro, papel de diario (con o sin tinta), α -celulosa, avicel y celulosa microcristalina, *E. globulus*, switchgrass, en las condiciones ensayadas.

De los tres sustratos que dieron resultados positivos, la CMC fue el sustrato donde se detectó la mayor liberación de azúcares reductores; por lo tanto, se eligió como sustrato celulósico para realizar los ensayos de sacarificación y fermentación, tal cual se describió en Materiales y Métodos, cuyos resultados se expresan a continuación.

3.8.2 Búsqueda de condiciones para la sacarificación de CMC

Se realizó una sacarificación mezclando el sustrato CMC al 1% (preparado en buffer acetato de sodio 50 mM y en Medio Ingeniería, ver composición en ANEXO 1. Medios de cultivo; ambos a pH 5,5) y el preparado enzimático y se determinó la liberación de azúcares reductores a lo largo del tiempo, expresados como Absorbancia a 550nm (Fig. 3.22). Se vio que luego de 16 h de incubación, la cantidad de azúcares reductores deja de aumentar de manera lineal, y por más que se incremente el tiempo de incubación, la misma no aumenta de manera significativa. Por otra parte, si el ensayo de sacarificación se realizaba en el Medio Ingeniería, la cantidad de azúcares reductores era cercana al 75% de los valores obtenidos cuando el ensayo se realizaba en buffer acetato de sodio. Entonces se concluyó que las sacarificaciones se realizarían en un rango de 16 - 20 h de incubación, y aunque en el Medio Ingeniería se detectó 25% menos eficiencia de sacarificación, se continuaría utilizando para los ensayos de sacarificación y fermentación.

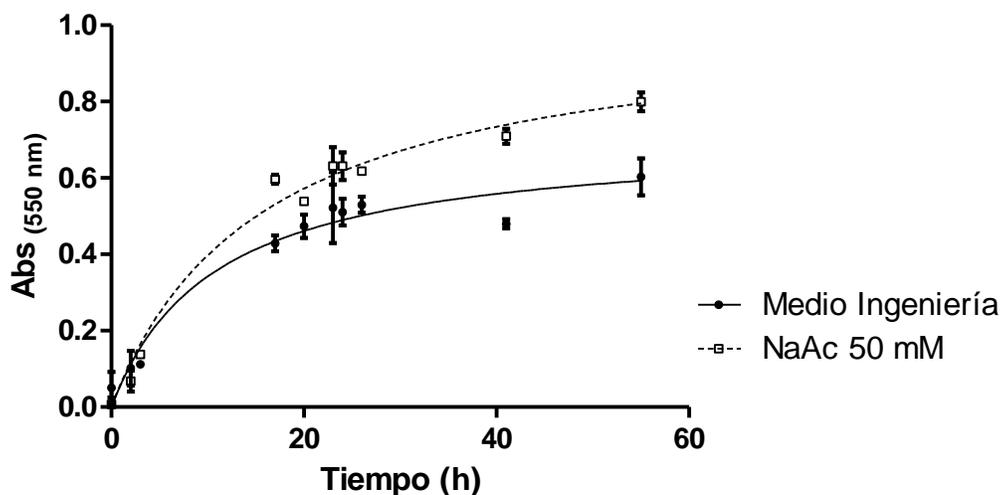


Figura 3.27. Ensayo de sacarificación en función del tiempo de incubación enzima-sustrato. La liberación de azúcares reductores se presenta como Absorbancia a 550 nm. Los ensayos se realizaron en Medio Ingeniería y en buffer acetato de sodio 50mM, ambos a pH 5,5, 30 °C. Las barras de error corresponden al desvío estándar.

Basados en estos resultados, se procedió a realizar las sacarificaciones en viales de distintos volúmenes, como se explica en Materiales y Métodos. Los resultados se muestran en la Tabla 3.6.

A continuación se describen las condiciones de cada uno de los experimentos realizados.

Experimento A - En una primera instancia se agregaron 0,8 U/mL de CMCasas (liofilizado del preparado enzimático, suspendido en agua) a un volumen de 40 mL de CMC al 1% m/v en Medio Ingeniería. La cantidad de azúcares reductores obtenidos fue muy baja: menor a 0,3 g/L de azúcares reductores. Por lo tanto, se decidió aumentar la cantidad de preparado enzimático a agregar.

Experimento B - En el siguiente ensayo, se triplicó la cantidad de enzima y el ensayo se realizó en las mismas condiciones que el experimento anterior. En esta oportunidad se incrementó al doble la cantidad de azúcares reductores liberados, sugiriendo que posiblemente se obtengan mejores resultados si se aumenta la carga de enzimas aplicadas.

Experimento C - En otro ensayo, se disminuyó el volumen del vial y de líquido a sacarificar (10 mL en viales de 20 mL) y se mantuvo la misma cantidad de enzima (2,9 U/mL) y demás condiciones de trabajo, obteniéndose prácticamente la misma cantidad de azúcares reductores. Por lo tanto, se decidió seguir trabajando con los viales de menor tamaño.

Experimento D - El próximo paso fue aumentar la temperatura de sacarificación (de 30 a 37 °C). La cantidad de azúcares reductores obtenida fue prácticamente igual, sugiriendo que un aumento de 7 °C en la temperatura de reacción no tendría un efecto importante en la sacarificación.

Experimento E - Posteriormente, se incrementó la cantidad de enzima (se pasó de 2,9 a 7,13 U/mL) y la temperatura de sacarificación (de 30 a 50 °C, temperatura óptima de trabajo de la actividad CMCasa), obteniéndose como resultado una cantidad de azúcares reductores prácticamente igual a la cantidad obtenida en los experimentos B a D.

También se aumentó el volumen de medio en los viales, con el fin de generar condiciones más anaeróbicas para la posterior fermentación alcohólica. Hasta este momento y con todas las variaciones ensayadas, no se logró incrementar la cantidad de azúcares reductores. Ello nos llevó a pensar en la posibilidad de que el sustrato (CMC) fuese limitante por lo que se decidió aumentar la concentración del mismo.

Experimento F – Se duplicó entonces, la concentración del sustrato CMC (pasando de 1 a 2 %, m/v) y se repitió el ensayo en las condiciones utilizadas en el Experimento E. Los resultados mostraron que en este caso, fue posible duplicar la cantidad de azúcares reductores liberados.

A partir de este resultado, se decidió incrementar la concentración de sustrato hasta llegar a 5% m/v (en concentraciones mayores, el CMC quedaba muy viscoso, con aspecto de gel) y se decidió también seguir trabajando a 30 °C para mantener la sacarificación en condiciones cercanas a las utilizadas durante la fermentación alcohólica.

Experimento G – Al aumentar la concentración de sustrato (5% m/v) se logró mejorar el proceso de sacarificación (mayor cantidad de azúcares reductores).

Experimento H - Posteriormente, se duplicó el tiempo de sacarificación, pero esta modificación no incrementó la cantidad de azúcares reductores liberados, surgiendo que un tiempo de sacarificación cercano a las 20 h sería suficiente, al igual que lo informado anteriormente en este mismo punto.

Experimento I – En este experimento se evaluó: la cantidad de glucosa, dentro de los azúcares reductores liberados. Para ello se utilizó un kit específico para determinación de glucosa. Como resultado, se observó que sólo una parte de los azúcares reductores eran glucosa (3,7 µmol/mL de glucosa presentes en 10,3 µmol/mL de azúcares reductores).

Experimentos J y K - En última instancia, se quintuplicó el agregado de preparado enzimático (con actividad CMCasa) y en uno de los experimentos (K) se agregó celobiohidrolasa comercial para determinar si era posible aumentar la cantidad de glucosa liberada, para su posterior fermentación. En ambos experimentos se duplicó la cantidad de azúcares reductores con respecto a los resultados

obtenidos en el experimento I. Además, se vio que los valores de concentración de glucosa (determinados por el kit Glucosa-Spinreact (Ref 1001191)) eran similares a los valores de concentración total de azúcares reductores, de lo que podría inferirse que todos los azúcares reductores medidos por el ensayo de DNS serían glucosa.

A pesar de ello, la concentración de glucosa presente continuó siendo baja para los objetivos de fermentación: alrededor de 20 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ que representan 3,6 g/L de glucosa. El agregado de celobiohidrolasa comercial no produjo diferencias significativas en la liberación de glucosa, por lo cual se concluyó que no sería necesario su agregado.

Tabla 3.6. Resultados de los experimentos de sacarificación de CMC.

Experimento	CMC (% m/v)	Vol. tot. Vial (mL)	Vol. de Fermentación (mL)	CMCasas (U/mL)	Tiempo sacarificación (h)	Temperatura sacarificación (°C)	Azúcares reductores ($\mu\text{mol}/\text{mL}$)	Glucosa ($\mu\text{mol}/\text{mL}$)
A	1	100	40	0,8	20	30	1,61±0,05	NM
B	1	100	40	2,9	20	30	3±1	NM
C	1	20	10	2,9	20	30	3,8±0,3	NM
D	1	20	10	2,9	20	37	3,6±0,5	NM
E	1	20	15	7,13	20	50	3,3±0,2	NM
F	2	20	15	7,13	20	50	6,0±0,1	NM
G	5	20	15	10	20	30	9,1±0,1	NM
H	5	20	15	11	40	30	8,4±0,1	NM
I	5	20	15	9	24	30	10,3±0,1	3,7±0,1
J	5	20	15	44	21,5	30	17±2	21±1
K	5	20	15	44*	21,5	30	19±2	20±1

NM: No medido.

*Preparado enzimático suplementado con celobiohidrolasa comercial (SIGMA, E6412) (CMCasas 0,22 U/mL). Primera columna: identifica el experimento. Segunda columna: concentración de CMC (% m/v). Tercera columna: volumen total del vial de pre-sacarificación. Cuarta columna: volumen de fermentación. Quinta columna: Unidades de enzima usadas por mL de sustrato. Sexta columna: tiempo de presacarificación.

Séptima columna: temperatura de presacarificación. Octava columna: azúcares reductores obtenidos luego de la presacarificación, y Novena columna: cantidad de glucosa obtenida luego de la presacarificación.

3.8.3 Fermentación alcohólica

Luego de realizada la sacarificación se agregó la levadura fermentadora, hasta llegar a una turbidez final de 10 (medida a 620 nm, camino óptico 1 cm) y se incubó a 30 °C y 200 rpm, según se explica en Materiales y Métodos. Los resultados se muestran en la Tabla 3.7.

En ninguno de estos ensayos se obtuvo cantidad significativa de etanol, dado que los valores fueron en su mayoría inferiores a 1,5 g/L (valor mínimo utilizado para realizar la curva de calibración, ver ANEXO 5. Curvas de calibración). En los primeros ensayos (del A al I) no se consumieron los azúcares reductores disponibles, por lo cual se justifica la baja producción de etanol. En los ensayos J y K la levadura consumió los azúcares reductores, y produjo etanol, pero la concentración obtenida del mismo es un estimado, ya que se encuentra en el límite inferior de la curva de calibración.

Tabla 3.7 Resultados de fermentación alcohólica.

	Azúcares reductores ($\mu\text{mol/mL}$)			Azúcares reductores Equivalentes (g/L)			Etanol (g/L) Rendimiento (%)
	0h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h	48 h
Tiempo Pos-inóculo							
Control positivo (glucosa 1% m/v)	58 \pm 2	58 \pm 2	58 \pm 2	10,4 \pm 0,4	0,05 \pm 0,05	0,05 \pm 0,2	5,3 \pm 0,6 / 99 %
Control positivo (CMC 1% m/v + celulasas SIGMA 22178)	NM	NM	NM	NM	NM	NM	5,5 \pm 1,3 / 137 %

Control negativo (sin sustrato)	0,6 ± 0,3	0,6 ± 0,3	0,6 ± 0,3	0,11 ± 0,05	0,11 ± 0,05	0,11 ± 0,05	0,02 ± 0,02
Control negativo (sin preparado enzimático)	0,07 ± 0,03	0,08 ± 0,03	0,04 ± 0,07	0,12 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Fermentación experimento A	1,61 ± 0,05	1,68 ± 0,06	1,8 ± 0,2	0,29 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,32 ± 0,04	0,04 ± 0,04
Fermentación experimento B	3 ± 1	2,8 ± 0,2	2,86 ± 0,06	0,54 ± 0,2	0,50 ± 0,04	0,51 ± 0,01	0,06 ± 0,03
Fermentación experimento D	3,6 ± 0,5	2,77 ± 0,05	2,91 ± 0,04	0,65 ± 0,1	0,50 ± 0,01	0,52 ± 0,01	0,18 ± 0,09
Fermentación experimento E	3,3 ± 0,2	3,8 ± 0,2	3,5 ± 0,1	0,59 ± 0,04	0,68 ± 0,04	0,63 ± 0,02	0,06 ± 0,04
Fermentación experimento G	9,1 ± 0,1	7,78 ± 0,04	8,1 ± 0,5	1,64 ± 0,02	1,40 ± 0,01	1,46 ± 0,1	1,02 ± 0,09/ 5 %
Fermentación experimento H	8,4 ± 0,1	8,35 ± 0,07	8,0 ± 0,7	1,51 ± 0,02	1,500 ± 0,001	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,3/ 6,5 %

Fermentación experimento I	10,3 ± 0,1	9,8 ± 0,8	8,7 ± 0,8	1,85 ± 0,02	1,8 ± 0,1	1,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1
Fermentación experimento J	17 ± 2	0,6 ± 0,3	0,6 ± 0,3	3,0 ± 0,4	0,11 ± 0,05	0,11 ± 0,05	1,6 ± 0,2/ 8 %
Fermentación experimento K	19 ± 2	0,6 ± 0,3	0,6 ± 0,3	3,4 ± 4	0,11 ± 0,05	0,11 ± 0,05	1,7 ± 0,3/ 9 %

4. Discusión

Producción de celulasas en medio líquido

Como un primer objetivo de esta Tesis nos planteamos encontrar un microorganismo de nuestra colección que produjera y secretara celulasas en medio líquido, seleccionándose a la cepa bacteriana *Flavobacterium* sp. AUG42. Si bien existían reportes de producción de celulasas por miembros de los géneros *Serratia* (Sethi et al., 2013), *Pseudomonas* (Bakare et al., 2002) y *Psychrobacter* (Kim et al., 2011), probablemente nuestras cepas necesiten otras condiciones de cultivo para producir estas enzimas, tales como: la temperatura de crecimiento, pH del medio de cultivo, tiempo de producción, agitación, nutrientes, fuente de carbono celulósico u otros sustratos inductores (Mountfort & Asher, 1985; Gashe, 1992).

A partir de este resultado, el trabajo de Tesis se centró en el estudio del potencial de AUG42 para producir celulasas.

Flavobacterium sp. AUG42

AUG42 es parte del microbioma de un oligoqueto antártico (*Grania* sp.), que habita la Rey Jorge, Antártida (Herrera et al., 2017). Esta bacteria pertenece al filo Bacteroidetes. El 22% de los organismos de este filo contienen en su genoma al menos tres genes codificantes para celulasas (Medie et al., 2012); por lo tanto, se consideró probable que AUG42 produjera varias celulasas (un coctel de enzimas con actividad celulolítica), hipótesis que posteriormente abordamos a través de análisis de espectrometría de masas y zimogramas.

Los estudios de Gram realizados anteriormente por nuestro grupo (Herrera et al., 2017) y de Microscopía de Barrido Electrónico realizados en esta Tesis, mostraron que se trata de una bacteria Gram negativa, aeróbica, de color anaranjado, con forma de bacilo (0,5 x 2 µm), que suele asociarse entre sí formando cadenas largas de microorganismos (estreptobacilos), lo cual ya había sido reportado para bacterias de este género (McCammon & Bowman, 2000). AUG42 presenta formaciones que rodean a su membrana (estructuras similares a vesículas), que en ocasiones se disponen en cadena. Estas estructuras y su potencial relación con la producción de celulasas se discutirán posteriormente en esta sección.

Optimización de la producción de celulasas de AUG42

Nuestro siguiente objetivo fue determinar cuál sustrato celulósico actúa como un inductor eficiente de la producción de estas enzimas, y en qué fase de crecimiento se logra una mayor secreción de celulasas. La selección de AUG42 se había dado en medio GS2 incluyendo papel de filtro como sustrato celulósico, sustrato previamente reportado como inductor de celulasas (Alvelo-Maurosa et al., 2016; Li et al., 2017), pero era necesario probar otros posibles sustratos. La literatura reporta varios casos de inducción de la producción de celulasas por distintas fuentes celulósicas; por ejemplo, Liang et al. (2014) observaron como una cepa de *Paenibacillus terrae* incrementaba la producción de CMCasas cuando crecía en medio con CMC, y que quintuplicaba dicha actividad en presencia de salvado de trigo, respecto a un control sin fuente celulósica. Para algunas cepas de hongos de los géneros *Trichoderma*, *Neocallimastix* y *Volvariella*, se encontró que los mejores inductores eran el papel de filtro y el avicel (Cai et al., 1999).

Dado que no se tenía información sobre la inducción de la producción de celulasas en microorganismos del género *Flavobacterium*, se evaluó una serie de diferentes fuentes de carbono celulósico. Se trabajó con: 1) celulosa altamente purificada: avicel y celulosa de Sigma, ambos con tamaño de partícula definido (50-51 μm de diámetro y una densidad similar de 0,6 g/cm^3 , con alto porcentaje de celulosa cristalina); y celulosa soluble: CMC (con grado de sustitución de 0,65 - 0,90, es decir, los polímeros contienen unidades de anhidroglucosa sustituidas de acuerdo a la siguiente fórmula general: $[\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_2(\text{OH})_x(\text{OCH}_2\text{COONa})_y]_n$, donde n es el grado de polimerización, x = de 2,05 a 2,35; y = de 0,65 a 0,95; x + y = 3,0 (datos colectados a partir de las hojas de especificaciones de los productos SIGMA, <https://www.sigmaaldrich.com>); 2) sustratos con alto porcentaje de celulosa: papel de filtro y algodón; y 3) otros sustratos más complejos, conteniendo celulosa, hemicelulosa y lignina, como switchgrass y *E. globulus*.

Al igual que lo observado para algunos hongos y bacterias, AUG42 produjo celulasas sólo en presencia de sustratos celulósicos, al menos en las condiciones ensayadas. De acuerdo al estudio del perfil de crecimiento de AUG42, se observó un mayor número de células cuando la bacteria creció en presencia de CMC, pero el hecho de que creciera más no implicó una mayor producción de celulasas. Por otro lado, se observó que esta bacteria produce mayores niveles de celulasas (unidades de enzima por mL de cultivo) en presencia de papel de filtro como fuente celulósica. Nos preguntamos entonces, ¿por qué AUG42 crece mejor usando CMC como fuente de carbono celulósico pero produce más celulasas cuando la fuente es el papel?

Para responder esto manejamos diversas hipótesis. La primera, sería que la determinación del número de UFC/mL en el medio con papel de filtro está subestimada, probablemente porque parte de las células se encuentren adheridas al papel. Los estudios de microscopía realizados, confirmaron que muchas células de AUG42 se encuentran asociadas al papel de filtro, aunque las células se encuentran bastante separadas, por lo tanto la subestimación no sería tan significativa.

Una segunda hipótesis, sería que la CMC es más fácil de degradar que los otros sustratos utilizados, y por ello AUG42 no produce tantas celulasas, pues la bacteria de alguna manera *sensit* (del latín *sentio*, usa los sentidos) la cantidad de azúcares disponibles como parte de la regulación de la expresión de las celulasas. La CMC tiene un grado de polimerización menor que los otros sustratos y es soluble o se dispersa en agua (dadas las interacciones ión-dipolo entre el carboxilo del CMC y el agua presente en el medio, a diferencia de los otros sustratos que contienen celulosa cristalina, estructura química más compleja de degradar y más recalcitrante para las celulasas), por lo tanto está uniformemente distribuida en el medio y es más accesible a las enzimas con actividad celulasa. A favor de esta hipótesis se vio que la cantidad de azúcares reductores presentes en el sobrenadante de cultivo de AUG42 cuando había crecido en medio con CMC, era mayor que la presente en el medio con papel de filtro o los otros sustratos. Con una mayor disponibilidad de azúcares, la bacteria crecería más en CMC que en los otros sustratos, sin “necesidad” de producir tantas enzimas, habiendo una regulación de expresión de las enzimas dependiente del producto. Esta hipótesis resulta más fuerte que la anterior, y se retomará más adelante en esta discusión.

Respecto a la fase de crecimiento en la que se detectó la mayor actividad celulasa (fase exponencial tardía - comienzos de fase estacionaria), se proponen dos hipótesis, de acuerdo a los resultados. La primera es que estas enzimas comienzan a producirse una vez que las otras fuentes de carbono y energía más accesibles (extracto de levadura) se acaban (hipótesis ya abordada por otros autores [Sanchez et al., 1999]). Experimentalmente, a favor de este hecho, observamos que cuando AUG42 crece sin sustrato celulósico, comienza su fase estacionaria de crecimiento a las 26 h (momento en el cual el extracto de levadura, única fuente de carbono y energía del medio GS2 sin suplemento celulósico, comenzaría a escasear). En los otros cultivos, luego de este tiempo se hace más notoria la actividad celulasa. Esto indicaría que la bacteria está secretando estas enzimas para contrarrestar la falta de una fuente de carbono disponible (extracto de levadura ya agotado) y pasa a atacar la siguiente fuente de carbono: la celulosa. Observando las curvas de crecimiento a su vez, se observa un crecimiento diáuxico, con una acentuada fase de crecimiento exponencial en presencia de

extracto de levadura, y luego una segunda etapa de crecimiento, utilizando la fuente celulósica gracias a las celulasas presentes. Como segunda hipótesis, se planteó que la mayoría de estas celulasas podrían estar adheridas a la pared celular de las bacterias, o incluso en el espacio periplasmático o en el citoplasmático (para aquellas enzimas que actúan sobre oligómeros) (Ransom-Jones et al., 2012), y por eso lo que se estaría detectando en el sobrenadante de cultivo sería el contenido liberado de las células muertas. En las primeras horas de cultivo, hay pocas bacterias muertas, por lo tanto se detectaría baja actividad celulasa en el sobrenadante de cultivo. Cuando comienza la fase estacionaria, la velocidad de división y muerte de las células es similar, y las células que mueren liberan su contenido intracelular; por lo cual, de haber producción de celulasas intracelular, en el espacio periplasmático o adheridas a la pared, se detectarían al liberarse al sobrenadante de cultivo. Esta hipótesis también fue abordada por Berg et al. (1972) para *Cellvibrio fulvus*, donde detectaron una mayor cantidad de celulasas a comienzos de la fase estacionaria en el sobrenadante de cultivo (libre de células); pero cuando medían la actividad celulasa en el cultivo homogéneo (con las células, sin filtrar ni centrifugar) la misma fue mayor durante la fase exponencial. Para sustentar esta hipótesis, se debería realizar un ensayo similar, durante el crecimiento de AUG42, midiendo la actividad celulasa en el sobrenadante de cultivo libre de células, y en el cultivo sin filtrar, y ver si la diferencia es significativa o no. Otro abordaje sería determinar la actividad celulasa en preparaciones de extracto intracelular y extracto periplasmático. También se podrían realizar ensayos moleculares, como una PCR cuantitativa, y comparar la cantidad de transcriptos específicos de celulasas (ARN mensajeros) a lo largo de la fase exponencial y la fase estacionaria del cultivo (Goyal et al., 2011). Todas estas interrogantes, surgidas a partir de los resultados de esta Tesis, constituyen importantes insumos para las perspectivas del trabajo.

Ahora, ¿por qué el papel de filtro es un inductor de la producción de celulasas más eficiente que las otras fuentes de celulosa utilizadas? Como se discutió anteriormente, quizás la CMC está más accesible en el medio líquido de cultivo comparado con la celulosa presente en el papel de filtro, y por lo tanto la bacteria no necesitaría producir tanta cantidad de enzima para liberar los azúcares necesarios para el metabolismo celular. Y es más, podría haber una regulación génica que impida la expresión de las celulasas en presencia de monosacáridos y disacáridos libres, productos de la hidrólisis de la CMC tal como lo vieron Han et al. (2003). Curiosamente, el papel de filtro tiene además de celulosa, un pequeño porcentaje de otros azúcares, como la fructosa y la manosa, tal cual fue detectado por Bonn et al. (1984) por HPLC; y dependiendo del origen, el papel podría tener otro tipo de azúcares hemicelulósicos como la xilosa. La presencia de estos monosacáridos podría

explicar la preferencia de este sustrato en la inducción de la producción de celulasas. Este aspecto se abordará nuevamente más adelante, con el estudio de las CAZymas del preparado enzimático, y su posible relación con la expresión génica de las celulasas. Se podría decir que quizá, la regulación de la expresión de las celulasas producidas por AUG42 esté coordinada con la expresión de otras glicosil hidrolasas, como las xilanasas, tal cual reportan otros autores (Mach-Aigner et al., 2008).

El siguiente paso en nuestro trabajo fue investigar cuál era la temperatura óptima para producir estas enzimas, y ver si esta temperatura coincidía con la temperatura óptima de crecimiento de AUG42. Al tratarse de un microorganismo antártico, sabíamos que al menos sobrevivía a bajas temperaturas, pero dentro de este género existen tanto microorganismos termófilos (*Flavobacterium thermophilum*, *Flavobacterium autothermophilum*) como mesófilos (*Flavobacterium granuli*), aunque la mayoría de las especies descritas son sicrotolerantes o sicrofílicas (Oshima & Yamakawa, 1974; Goto et al., 1978; Aslam et al., 2005; Bernardet & Bowman, 2006). Los resultados apuntan a que, según su perfil de crecimiento, AUG42 sería una bacteria sicrotolerante y la temperatura óptima de crecimiento coincide con la temperatura de mayor producción de celulasas. Pero para afirmar que es una bacteria sicrotolerante, se debería determinar la temperatura óptima de crecimiento realizando ensayos que cubrieran otras temperaturas más allá de las analizadas en esta Tesis, pues de acuerdo a Moyer & Morita, (2007) una bacteria sicrotolerante tiene una temperatura óptima de crecimiento superior a los 15 °C, y en este trabajo sólo se comprobó que crece mejor a 16 °C que a 11 °C y 21 °C. Por supuesto, las definiciones tienen temperaturas precisas, pero sabemos que en biología no se puede hablar de números sino de rangos, y con los datos obtenidos se observó que esta bacteria tendría un comportamiento sicrotolerante.

Condiciones óptimas para la actividad celulasa

A partir de las condiciones determinadas para la producción de celulasas (y por ende, para la obtención del preparado enzimático), nos planteamos las siguientes interrogantes: ¿Cuáles son las condiciones óptimas de trabajo de estas enzimas (pH y temperatura)? ¿Existe algún agente químico potenciador o inhibidor de la actividad? ¿Este preparado, tendría propiedades bioquímicas compatibles con su uso en la industria de los biocombustibles? Sabemos que las determinaciones de condiciones óptimas de actividad enzimática refieren directamente a enzimas puras; pero, en esta Tesis, estos conceptos se manejaron asociados al comportamiento bioquímico de un

“preparado enzimático”, teniendo presente que los resultados para cada experimento son en realidad, la sumatoria de los resultados para cada enzima presente en el mismo.

Nuestro objetivo era contar con un preparado enzimático capaz de ser utilizado para sacarificar material celulósico y fermentar los productos de la sacarificación para producir bioetanol, en un proceso SFS. Las condiciones óptimas de fermentación alcohólica llevada a cabo por *Saccharomyces cerevisiae* suelen estar en el entorno de los 30 °C y pH ácido (Z. Li et al., 2017; Tomás-Pejó et al., 2008); por lo tanto, deseábamos que nuestro preparado enzimático tuviera actividad celulósica cercana a estas condiciones de pH y temperatura. Los ensayos de temperatura óptima de actividad celulasa mostraron que 50 °C es la mejor temperatura para sacarificar los sustratos CMC y PASC, en los tiempos fijados (1 y 3 h respectivamente). Este resultado fue inesperado, ya que tratándose de un microorganismo sicrotolerante se esperaba que produjera enzimas sicrófilas, es decir con temperaturas óptimas más bajas. Sin embargo, el origen de los microorganismos adaptados al frío está bastante discutido, algunos autores proponen que éstos provienen de mesófilos, por lo tanto, muchas de sus enzimas tendrían una temperatura óptima similar a la que exhiben los mesófilos (Feller, 2017). Por otra parte, la expresión de genes del microorganismo en su propio bioma es desconocida, y seguramente difieran de la expresión dada en el preparado enzimático. Sin embargo, experimentalmente se determinó que existía una disminución de actividad a 60 °C (en la actividad PASCasa prácticamente es nula), lo cual es característico de las enzimas activas en frío, o enzimas sicrófilas (D'Amico et al., 2002).

A pesar de estar trabajando con un preparado enzimático (mezcla de diferentes enzimas), nuestros resultados se asemejan a los obtenidos por Ueda et al. (2018), quienes caracterizaron una celulasa de *Bellamyia chinensis* (bacteria sicrotolerante) con temperatura óptima de 50 °C y con alto porcentaje de actividad remanente a temperaturas inferiores (alrededor del 70 %, a 30 °C); curiosamente, nuestro preparado presenta la misma temperatura óptima y conserva más del 50 % de la actividad a 30 °C.

Es válido considerar que la temperatura óptima de las enzimas se afecta por la presencia de determinados agentes químicos y/o por la fuerza iónica del medio, entre otros; Nunokawa & McDonald, [1968]).

En relación al pH óptimo, vemos que el preparado enzimático presentaba actividad celulasa máxima a pHs levemente ácidos, lo que lo hace compatible con procesos de SFS y a su vez, en otros usos biotecnológicos, como la clarificación de bebidas, como jugos frutales y vinos, procesos que también se realizan a pHs ácidos (Colagrande et al., 1994; Vaillant et al., 1999).

El estudio del efecto de diferentes agentes químicos sobre las actividades enzimáticas del preparado permitió determinar que el SDS inhibe las actividades PASCasa y CMCasa. Este detergente aniónico posiblemente interactúe con las celulasas alterando el microambiente que las rodea, o incluso alterando su estructura nativa, afectando el sitio activo, sitios de unión a sustratos, etc., justificándose así, la pérdida de actividad celulasa observada. Nuestros resultados coinciden con numerosas publicaciones (Kim, 1995; Ueda et al., 1994; Yin et al., 2010) donde se sugiere que este tipo de celulasas no podrían utilizarse en productos que contengan SDS, ni probablemente cualquier otro detergente iónico. De todos modos, esto no invalidaría su uso en los procesos SFS.

Existen trabajos que reportan una disminución de la actividad celulasa en presencia de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). El PMSF se une específicamente a residuos de serina del sitio activo de algunas proteasas inhibiéndolas y por ende, minimizando su capacidad para degradar celulasas y otras proteínas (Gaur & Tiwari, 2015). En nuestro preparado, la actividad celulasa no se vio afectada por este agente. Este resultado permite considerar el uso de PMSF como conservante del preparado enzimático (en caso que hubiera proteólisis de las celulasas por parte de proteasas propias de AUG42, o durante su eventual producción recombinante en otro microorganismo; Kim et al. [2008]).

Trabajos recientes han demostrado que las LPMO (del inglés *lytic polysaccharide monoxygenase*) pueden aumentar el rendimiento hidrolítico de los cócteles de celulasas, principalmente al mejorar la accesibilidad de las enzimas al componente celulósico (Isaksen et al., 2014; Rubio et al., 2016). Como las LPMO suelen activarse en presencia del catión Cu^{2+} (Song et al., 2018), se estudió el efecto de este agente sobre la actividad celulasa del preparado. Los resultados no evidenciaron un aumento significativo en las actividades medidas, por lo tanto, se podría descartar la posibilidad de que el preparado contenga LPMOs dependientes de cobre (dato que posteriormente se verificó tras el análisis por espectrometría de masas e identificación proteica en el CAZoma). Sí se observó que este catión actuó como inhibidor de la actividad PASCasa. ¿Por qué inhibiría la actividad PASCasa y no la CMCasa? Este resultado sugeriría que las enzimas involucradas en la degradación del sustrato PASC no serían exactamente las mismas que las encargadas de degradar la CMC. ¿Son estos sustratos específicos de algún tipo de enzima? Numerosos son los artículos que describen al PASC como sustrato ideal para la determinación de la actividad exocelulasa, y la CMC para endocelulasa; sin embargo, cuando se analizan los productos de hidrólisis de estos sustratos por HPLC, en ambos casos los autores encuentran azúcares de largo de cadena variable, sin permitir una clara distinción entre una actividad endocelulasa y exocelulasa dependiente del tipo de sustrato utilizado. Los reportes previos de Geiger et al. (1998) muestran que una concentración de 0,2 mM de Cu^{2+}

disminuía la actividad en un 50 % de una celulasa producida por *Trichoderma viride*, usando avicel como sustrato. Xu et al. (2009) observaron además, como el Cu^{2+} oxidaba extremos reductores del PASC, disminuyendo la cantidad de sustrato disponible para las exocelulasas, enzimas que atacan este sustrato desde los extremos reductores.

¿Podríamos considerar entonces que en nuestro preparado enzimático hay exocelulasas que atacan desde los extremos reductores? (pues también existen exocelulasas que atacan desde el extremo no reductor). En este caso el metal actuaría sobre el sustrato, y no como inhibidor de las enzimas propiamente dicho. Sería interesante realizar ensayos para verificarlo, por ejemplo, medir los extremos reductores de PASC, y luego medir la cantidad de extremos reductores del PASC tratado con Cu^{2+} con el mismo reactivo (DNS); si la cantidad de extremos reductores disminuye en presencia de cobre, se evidenciaría la oxidación química del sustrato (ver a continuación en Perspectivas). En caso de evidenciar la oxidación de sustrato, coincidiríamos con los autores que afirman que el PASC es un sustrato para las exocelulasas, y el CMC es el preferido para endocelulasas, algo que no queda claro en la bibliografía consultada y que simplemente muchos investigadores dan por hecho. Como consecuencia, podríamos también sugerir que nuestro preparado presenta ambos tipos de enzimas: endocelulasas y exocelulasas, siendo estas últimas, catalíticas del extremo reductor.

¿Qué importancia tendría la potencial inhibición de la actividad celulasa por el Cu^{2+} en el contexto del uso de este preparado enzimático en procesos SSF? Si se pretendiera por ejemplo, utilizar madera reciclada para sacarificar y producir bioetanol (Johnson et al., 2009) habría que tener en cuenta la procedencia de ésta, pues si la madera fue tratada con algún conservante químico, como sulfato de cobre o el CCA (cromo-cobre-arsénico) utilizados con frecuencia en el “curado” de maderas (Hattori et al., 2015; Robey et al., 2018), este preparado tendría baja eficiencia en la degradación de sus fibras celulósicas.

También se estudió la actividad celulasa frente a sales como sulfato de amonio, de magnesio y de potasio, ya que éstos son comúnmente utilizados en los medios de fermentación alcohólica de *S. cerevisiae* (Demiray et al., 2018b, 2018a). Según los resultados obtenidos, estas sales no interferirían en la capacidad de sacarificación del preparado enzimático, por lo tanto podrían utilizarse sin problemas en el medio de fermentación.

Resulta importante poder determinar si las actividades enzimáticas del preparado enzimático sufren inhibición por producto. Existen reportes de que altas concentraciones de monosacáridos inhiben las actividades de estas enzimas (Hsieh et al., 2014; Xiao et al., 2004). Ello no fue posible con el método del DNS, usado a lo largo de la Tesis para determinar azúcares reductores. Para realizar

estos ensayos de inhibición convendría analizar los productos de hidrólisis por HPLC o similar, y contar con los patrones que permitan discriminar los distintos azúcares reductores en los cromatogramas (Hsieh et al., 2014).

Dentro de potenciales inhibidores de naturaleza glucídica, decidimos incluir la sacarosa, dado que este disacárido no tiene extremos reductores y por lo tanto, no interfiere con las medidas de actividad por el método del DNS, o sea la determinación de la liberación de azúcares reductores. Los resultados demostraron que este disacárido no altera la actividad del preparado. Esto nos permite además, inferir que el preparado enzimático no presenta actividad de invertasa (Wan et al., 2018), pues en el ensayo control (donde se incubó el agente químico: sacarosa, con el preparado enzimático, sin sustrato celulósico), no se detectaron azúcares reductores por el método del DNS. Si hubiera actividad invertasa en el preparado enzimático, se habrían liberado fructosa y glucosa, quienes hubieran reaccionado con el DNS. A favor de esto, en el genoma no se habían detectado secuencias codificantes para este tipo de enzimas.

Otros agentes químicos como la N-etilmaleimida (NEM, compuesto utilizado para la metilación de grupos tioles y capaces de modificar cisteínas y enlaces disulfuro de las proteínas) y como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, agente quelante de metales divalentes que muchas veces pueden ser esenciales para la actividad de algunas enzimas), tampoco modificaron las actividades analizadas, al menos en las condiciones trabajadas. Esto también fue reportado por Prabhu et al. (2017), donde en concentraciones similares a las ensayadas en nuestro trabajo, la actividad CMCasa no disminuía significativamente, al contrario de lo que reportaron Mushimiyimana & Tallapragada (2015), quienes determinaron que el EDTA era un fuerte inhibidor de las celulasas.

Probablemente, las celulasas de nuestro preparado enzimático no presenten enlaces disulfuro o cisteínas relevantes para su actividad, ni necesiten cationes divalentes para su actividad. Igualmente se incluyó en el estudio otros metales divalentes (aparte del cobre y el magnesio) que pudiesen potenciar la actividad del preparado enzimático. Se evaluó el efecto de manganeso y cobalto, que habían sido reportados como potenciadores de la actividad celulasa por Hartati et al. (2012) y Wang et al. (2012), respectivamente. Pero encontramos que éstos reaccionaron con el DNS (dando valores muy altos de absorbancia del control negativo), lo cual impidió evaluar el efecto de estos metales en las actividades, utilizando el método del DNS. Posteriormente a este resultado encontramos en la literatura, una mención a este hallazgo, abordado por Sinigani & Emtiazi (2006), quienes reportaron que estos cationes reaccionan con el reactivo DNS, provocando cambios en la coloración de la mezcla de reacción independientemente de la concentración de los azúcares reductores. Este

reporte pondría en duda el resultado expresado por Hartati y Wang. Y en nuestro caso, para conocer el efecto de estos metales, se deberían analizar los productos de reacción por HPLC, con los patrones adecuados (ver Perspectivas).

Finalmente, respecto a la estabilidad con el tiempo de las actividades PASCasas y CMCasas, luego de almacenar el preparado enzimático a distintas temperaturas, se puede inferir que a mayores temperaturas de almacenamiento es menor la estabilidad del mismo, por lo que sugerimos almacenar el preparado a -20°C o liofilizado.

Microscopía electrónica de Barrido Electrónico

La observación de esta bacteria por microscopía electrónica de barrido, nos permitió conocer su forma y tamaño, y como se mencionó, permitió visualizar formaciones vesiculares en su superficie. Si efectivamente se tratara de vesículas, éstas probablemente liberen su contenido al medio de cultivo, algo que ya se ha visto en otros microorganismos (Arias et al., 2012). Algunas vesículas estaban dispuestas en cadenas, formando lo que se conoce como “collares de perlas” que conectarían diferentes células entre sí, siendo una particular forma de comunicación entre células (Gilbert et al., 2013; Møller et al., 2005). Estos collares de perlas también fueron observados por otros autores, al menos en un aislamiento de *Flavobacterium frigidarium* (Møller et al., 2005).

No se observaron células de AUG42 adheridas propiamente dicho al papel de filtro (no se observaron estructuras típicas de adherencia como fimbrias por ejemplo), ni estructuras tipo celulosomas como los observados por Shoham et al. (1999) y Ferdinand et al. (2013) para bacterias del género *Clostridium*. Esto podría deberse a que la resolución del equipo no fue lo suficientemente alta, o simplemente, porque esta bacteria no produce estas estructuras. La ausencia del complejo celulosoma fue posteriormente confirmada por el análisis del genoma, ya que no se detectaron proteínas con dominios dockerina, ni cohesina.

Aun así, sería interesante realizar ensayos inmunológicos (con anticuerpos marcados anti-GH) de co-localización de las GH presentes en el CAZoma, para ver si en algún momento estas presentan adherencia a la superficie celular, tal como lo hicieron Artzi et al. (2018), pues podrían haber celulasas ancladas a la superficie celular sin necesidad de formar un complejo del tipo celulosoma. Este punto se volverá a plantear en Perspectivas.

Otras actividades enzimáticas tipo glicosidasa

Para conocer mejor nuestro preparado enzimático, se evaluó también la posible hidrólisis de almidón y de celobiosa. El preparado enzimático no hidrolizó almidón sugiriendo que el mismo no contendría proteínas con actividad amilasa, al menos en las condiciones ensayadas. Esto no coincide con lo descrito previamente por nuestro grupo, donde se reportó actividad amilasa cuando AUG42 creció en medio sólido con almidón (Herrera et al., 2017), pero las condiciones de crecimiento de AUG42 no fueron las mismas, lo que podría explicar esta diferencia. Curiosamente, en el genoma de AUG42 se identificaron varios genes codificantes para amilasas (con dominios PFAM o dominios CAZy característicos de amilasas; proteínas: 2341, PF02806.17, GH13; 3479, PF00128.23, GH13; 3488, PF00128.23, GH13 y 3670, PF02806.17, PF02922.17, PF00128.23, GH13 y CBM48), pero probablemente estos genes no se estarían expresando en las condiciones ensayadas (las proteínas tampoco se detectaron en el estudio del secretoma por espectrometría de masas).

En cambio, sí se detectó actividad celobiasa. La celobiosa es el sustrato de algunas β -glucosidasas, también consideradas celulasas, y suele ser el producto del clivaje de polisacáridos por parte de algunas exocelulasas (conocidas como celobiohidrolasas). Evaluamos la temperatura óptima de la actividad celobiasa, y se vio que tenía un comportamiento similar al que presentan las enzimas sicrófilas (D'Amico et al., 2002), aunque de nuevo, hay que reiterar que probablemente esta actividad tenga involucrada a más de una enzima de nuestro preparado. Un aspecto que queda pendiente a futuro (ver Perspectivas), es la realización de zimogramas para determinar el número de posibles celobiasas presentes en el preparado enzimático. Si bien no se encontraron técnicas en la bibliografía para la realización de zimogramas que impliquen degradación explícita de celobiosa, se encontraron protocolos para realizar zimogramas de actividad β -glucosidasa, utilizando esculina como sustrato. La esculina es un glucósido formado por una glucosa y un compuesto aromático denominado esculetina (ver Figura 4.1). Este último, al ser liberado de la glucosa por acción de una β -glucosidasa, reacciona con Fe^{3+} y se colorea de marrón, lo cual permitiría identificar la/s banda/s de hidrólisis (Saqib & Whitney, 2006).

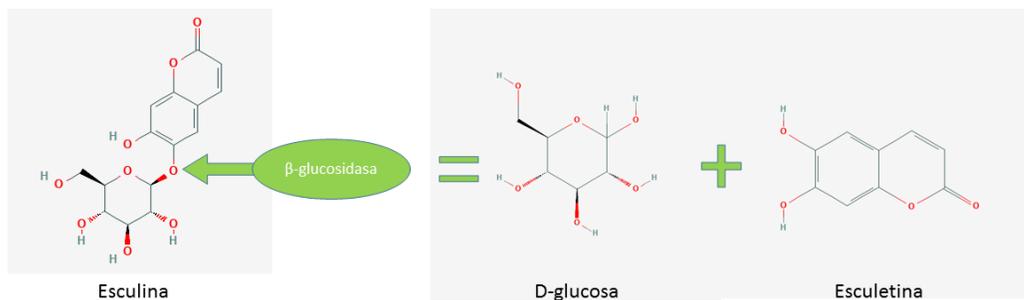


Figura 4.1. Esculina (6,7-dihidroxicoumarin-β-D-glucosa), sustrato de β-glucosidasas, que por hidrólisis del sustrato liberan glucosa y esculetina.

Genoma y CAZoma

A través del estudio del genoma, en particular del CAZoma, identificamos numerosos genes involucrados en la degradación de carbohidratos, destacándose los codificantes para posibles celulasas, xilanasas, β-glucosidasas, mananasas, agarasas, liqueninasas, quitinasas, neopolulanasa y amilasas. Además, se encontraron genes codificantes de polisacárido liasas, enzimas involucradas en la degradación de alginato, polisacárido aniónico presente en las paredes celulares de las algas marinas pardas (posible fuente de nutrientes de AUG42; [Herrera et al., 2017]). También se encontraron numerosos genes de glicosil transferasas, revelando el potencial de síntesis y modificación de carbohidratos de AUG42, por ejemplo con un rol durante la formación de biofilms, tal como exponen varios autores para bacterias de este género (Cai et al., 2013; Duchaud et al., 2007).

Este resultado resalta el gran potencial de AUG42 para hidrolizar diferentes polisacáridos, sobre todo si tenemos en cuenta que se detectaron quince tipos de dominios de unión a carbohidratos.

Caracterización del secretoma de AUG42: zimogramas y espectrometría de masas

En esta Tesis se utilizó el término “secretoma” para describir al conjunto de proteínas presentes en el preparado enzimático, sin considerar en esta denominación a cualquier otra biomolécula presente en el mismo.

La actividad CMCasa se estudió mediante zimogramas, sin embargo ello no fue posible para la actividad PASCasa, ya que el PASC (al no ser soluble) no se distribuyó en forma homogénea cuando se lo incluyó en un gel de poliacrilamida. La multiplicidad de bandas de hidrólisis de la CMC

detectadas en el zimograma evidenció la presencia de varias enzimas con actividad CMCasa. Posteriormente con el *shotgun* de proteínas y el estudio del CAZoma, se pudo verificar la presencia de varias GH, probablemente involucradas en la degradación de la celulosa. No se encontraron GHs correspondientes a celulasas fosforilasas, ni AAs correspondientes a LPMOs, ni a CDHs, lo cual indicaría que la degradación de la CMC sería por hidrólisis mediante las GHs.

En ambos zimogramas (SDS-PAGE e IEF acoplados a geles con CMC) se destacaron dos intensas bandas de hidrólisis de CMC. Esto nos llevó a pensar que se trataría de las mismas dos CMCasas. Sin embargo, los ensayos que realizamos no permiten correlacionar las GHs encontradas en el CAZoma con estas bandas de hidrólisis. A futuro, deberían identificares esas proteínas correspondientes a las bandas de actividad por espectrometría de masas, y correlacionarlas con la notación de CAZymas de AUG42.

En el zimograma acoplado a la SDS-PAGE se observaron bandas de 100, 80 y 30 kDa, aproximadamente. Considerando que en nuestro caso el preparado enzimático no se desnaturalizó por calor, el tamaño molecular observado no necesariamente corresponde con los tamaños de los patrones utilizados (Weber et al., 1972). Lo que sí resulta llamativo, es que en el CAZoma no se detectaron GHs con tamaños moleculares cercanos a 30 kDa (todas las GH identificadas superan los 50 kDa, diferencia muy notable con lo visualizado en la SDS-PAGE y zimograma, ensayo repetido en cuatro instancias). Para interpretar este resultado, nos planteamos una hipótesis: ¿existen celulasas que pudiesen ser degradadas por proteasas en un patrón particular, tal que parte del producto de degradación sean estructuras proteicas con tamaños cercanos a 30 kDa, conteniendo el módulo catalítico que degrada CMC? Entonces, ¿podría ser que la banda de 30 kDa sea el producto de la digestión de una celulasa, y solo corresponda a su sitio catalítico? Ya hay reportes de proteólisis de celulasas, donde los productos de hidrólisis conservan la actividad hidrolítica, pero disminuyen la afinidad por el sustrato, sugiriendo que existiría una proteólisis que libera el módulo GH del CBM (Langsford et al., 1987). En nuestro secretoma se identificaron algunas proteasas (como la 1608), pero para discernir esta duda, lo más adecuado sería identificar la proteína presente en la banda de hidrólisis del gel de zimograma, con tamaño aparente de 30 kDa, y realizar un análisis por espectrometría de masas comparado con el genoma anotado de AUG42. Respecto a las bandas de alrededor de 100 kDa, este tamaño podría corresponder a varias celulasas del CAZoma de AUG42 (proteínas 265, 266 y 976).

Respecto al análisis del secretoma por espectrometría de masas se evidenció la presencia de varias CAZymas. Se detectaron CEs; que podrían actuar sobre la hemicelulosa, en especial para liberar grupos acetilo presentes en algunos azúcares (Biely et al., 1985; Jeffries, 1991).

También se detectaron numerosas GHs. Tres de ellas presentan módulos catalíticos, probablemente celulolítico (dos con GH5 y una con GH9). Dos de ellas presentaron dominio de unión a carbohidratos, lo cual es característico de las celulasas individuales (no asociadas a un complejo del tipo celulosoma) (Talamantes et al., 2016). Estas proteínas se caracterizaron *in silico* mediante su modelado y estudios de *docking* (lo que se discutirá más adelante). También se encontraron dos proteínas con dominio GH tipo endoxilanasas (proteínas 283 y 890) y se detectó una proteína (282) que no presentó homología significativa con ninguna de las bases de datos analizadas (PDB y SwissProt), pero que tiene un dominio CBM23 en el extremo C-terminal (dominio de unión a manosa) y su gen codificante se encuentra adyacente al gen codificante para la proteína 283 (ubicado aguas arriba). La proximidad física de las secuencias codificantes de estas proteínas en la molécula de ADN indicaría una probable regulación bajo un mismo promotor, por lo tanto podrían tener una función similar o coordinada. Por ejemplo, estas proteínas podrían estar involucradas en el reconocimiento e hidrólisis de algunas hemicelulosas, cuyos oligómeros podrían transportarse hacia el periplasma y/o citoplasma hasta su completa degradación (Ransom-Jones et al., 2012; Tauzin et al., 2016).

Algunos azúcares podrían ser responsables de inducir la expresión de los genes codificantes de las celulasas de AUG42, tal cual describieron Stricker et al. (2006) para *Hypocrea jecorina*. Estos autores reportaron que *Xyr1*, un gen codificante para un regulador de la producción de xilanasas, era fundamental para la expresión de xilanasas y celulasas. Quizá la proteína 282, 283, y/o 890 sean responsables de degradar el papel de filtro liberando azúcares presentes en su fracción hemicelulósica (xilosa o manosa), desencadenando la producción de celulasas. Esto explicaría por qué se producen bajos niveles de celulasas en presencia de celulosa pura, pero sí en presencia de papel de filtro (el algodón y el switchgrass también indujeron la producción de celulasas). Para verificar esta hipótesis, se deberían realizar mutaciones de estos genes y ver si esto afecta la inducción de celulasas o no. Si se comprueba su relación, se podría probar la inducción de celulasas en AUG42 nativa utilizando azúcares hemicelulósicos como la xilosa, manosa, etc. (ver en Perspectivas).

Modelado y docking de las proteínas 265 y 976

Modelar *in silico* una proteína muchas veces ayuda a entender su mecanismo de acción, sobre todo si se realizan estudios de interacción con el sustrato. Sin embargo, para obtener un modelo es necesario contar con un molde confiable, una proteína con estructura similar resuelta por cristalografía. En nuestro caso, las proteínas escogidas (265 y 976) para realizar los estudios de modelado y *docking* permitieron modelar los módulos catalíticos de ambas (los GHs), y en particular dilucidar su sitio activo, lográndose detectar los aminoácidos posiblemente involucrados.

A partir de este análisis, podría sugerirse que las proteínas 265 y 976 serían endocelulasas, siendo la primera probablemente una enzima procesiva.

Sacarificación y Fermentación alcohólica

Luego de evaluar el potencial sacarificante del preparado enzimático frente a distintas fuentes celulósicas, se vio que éste no degradaba celulosa cristalina, al menos en las condiciones ensayadas. Correlacionando este hecho con la definición de microorganismos celulolíticos propuesta en la introducción, se podría inferir que *Flavobacterium* sp. AUG42 no es un microorganismo estrictamente celulolítico. Sin embargo, se debe considerar que quizá los sustratos a sacarificar ofrecidos no fueron los adecuados para determinar el potencial del preparado enzimático. Hay casi infinitos esteroisómeros de celulosa, y seguramente existan celulasas específicas para cada tipo.

Nuestro objetivo se enfocaba en que el preparado enzimático liberara azúcares reductores de algún material que fuera ambientalmente y económicamente viable para producir bioetanol a gran escala (como el switchgrass y/o *E. globulus*). Entre otros, resultaría interesante ensayar el preparado enzimático sobre sustratos celulósicos provenientes de algas antárticas, sustrato que coincide con la fuente de alimentación del gusano desde el cual este microorganismo fue aislado (Herrera et al., 2017).

Si bien nos interesaba desarrollar procesos de sacarificación y fermentación simultánea, los resultados nos muestran que el poder de sacarificación de nuestro preparado enzimático no fue suficiente para sacarificar la CMC a un ritmo adecuado para alimentar al microorganismo fermentador. Se decidió entonces, incubar previamente el sustrato y el preparado enzimático (pre-sacarificación), de este modo se estaría agregando la levadura cuando el medio ya tuviera algo de azúcares libres para su fermentación. De esta manera, se realizaron ensayos de sacarificación y fermentación secuencial, que difieren de los procesos industriales discutidos en la introducción, ya que ambas etapas se realizan a una misma temperatura (en prácticamente todos los ensayos), y en

el mismo recipiente, condiciones en las cuales las enzimas podrían continuar sacarificando el sustrato luego del agregado de la levadura; lo cual era congruente con la “filosofía de ahorro” de los procesos de sacarificación y fermentación simultánea.

Como describimos en las secciones anteriores (Materiales y Métodos, y Resultados) se realizaron numerosas modificaciones a los ensayos, con el fin de mejorar los procesos. En las condiciones ensayadas sólo fue posible obtener una cantidad de producto equivalente a 3,6 g/L de glucosa; y las cantidades de etanol fueron tan bajas, que prácticamente no superaron la mínima concentración utilizada para la curva de calibración. Si bien se podía haber realizado una curva de calibración con menores concentraciones de etanol, no se realizó, dado que rendimientos tan bajos no tendrían sentido a nivel de su aplicación.

Los distintos controles realizados nos permiten afirmar que la levadura CAT-1 produce alcohol frente a glucosa, tal como estaba reportado para esta cepa (Basso et al., 2008), mostrando un rendimiento prácticamente igual al teórico; que el preparado enzimático no inhibía la fermentación de glucosa, por lo tanto no sería tóxico para la levadura (no se encontró en la bibliografía consultada ninguna mención a que bacterias de este género pudiese tener efectos antifúngicos sobre las levaduras; pero habría que realizar ensayos de determinación del posible efecto antagónico entre cepas). A su vez, confirmamos que CAT-1 produce etanol a partir de CMC, sacarificado con una mezcla de celulasas comerciales.

Por otro lado, durante la fermentación encontramos que la cantidad de azúcares reductores totales nunca aumentó, incluso en algunos ensayos los mismos disminuyeron. En esto nos basamos para organizar esta parte de la discusión, donde todos los ensayos realizados se dividieron en dos grupos: los experimentos A, B, C, D, E, H e I en el grupo “X” (donde la cantidad de azúcares reductores se mantuvo constante) y los experimentos J y K en el grupo “Z” (donde los valores de azúcares disminuyeron durante la fermentación).

Para los resultados obtenidos a partir de los experimentos del grupo X, se proponen dos hipótesis:

- 1) La cantidad de azúcares reductores se mantuvo constante porque a medida que éstos se iban consumiendo, las enzimas liberaban más producto. Luego, la levadura sobrevivió fermentando estos azúcares (ya que en los viales había poco oxígeno como para tener un metabolismo aeróbico), produciendo bajas cantidades de Bioetanol.
- 2) Los azúcares producidos no fueron consumidos por la levadura, lo que se basaría en que la CMC que se utilizó tenía un grado de sustitución de 0,65 - 0,90, es decir que un alto porcentaje de los

monómeros liberados durante el proceso de sacarificación contenían un grupo carboximetilo, y éstos probablemente no fueron metabolizados por *S. cerevisiae*.

Se ha reportado que la carboximetilación de celulosa puede afectar su reconocimiento por algunas enzimas. Por ejemplo, Wirick (1968) describió que a mayor grado de sustitución de distintos éteres de celulosa, menor era la actividad celulasa de un preparado enzimático de *Aspergillus niger*. En este trabajo vieron que era necesaria la presencia de tres o más glucosas sin sustituyente para que las enzimas puedan atacar la cadena celulósica. Además existen reportes que afirman que las celobiohidrolasas (exocelulasas que liberan celobiosa) no son activas frente a CMC, ya que no reconocen los extremos de las cadenas si estos presentan sustituyentes en los grupos hidroxilo (Jeffries, 1987).

Se postula que los azúcares reductores presentes provendrían de oligosacáridos de CMC y que realmente las unidades de glucosa libre, serían muy pocas. Con esto se concluiría que la etapa de degradación de oligómeros de CMC sería la limitante de la cadena de reacciones necesaria para la liberación de glucosa. A su vez, la carboximetilación conforme incide en la actividad celulasa, podría incidir en la actividad de algunas enzimas de las vías metabólicas de *S. cerevisiae*. Si esto fuera así, la levadura no reconocería los productos carboximetilados como sustratos válidos para metabolizar. La última hipótesis sería la más apropiada para explicar los resultados obtenidos, por lo tanto se continuará la discusión a partir de dicho supuesto.

Para analizar los resultados obtenidos a partir de los experimentos del grupo Z, donde la cantidad de azúcares reductores disminuyó luego de agregar la levadura, debemos mencionar que hubieron dos grandes diferencias entre estos ensayos y los del grupo X: la primera, fue la cantidad de preparado enzimático que se utilizó (en los experimentos del grupo Z se quintuplicó las unidades de enzima, respecto a los X); y la segunda, fue que para los ensayos del grupo Z se utilizó un preparado enzimático que había sido liofilizado inmediatamente después de su obtención (en seguida que se finalizó el cultivo, se centrifugó, filtró y liofilizó). Mientras que para los ensayos del grupo X, el preparado enzimático se había liofilizado luego de 24 h de obtenido.

En estos ensayos Z, la cantidad de glucosa coincide con la cantidad de azúcares reductores, y la glucosa sí podría ser metabolizada por la levadura. En este punto, pensamos que la pregunta a contestar es: ¿existe alguna enzima que actúe sobre los grupos carboximetilo de la glucosa modificada y la convierte en glucosa? En este caso, esta enzima sería muy inestable y se inactivaría en menos de 24 h, y se mantendría estable luego de liofilizar el preparado inmediatamente a su producción. Se realizó una búsqueda bibliográfica, y no se encontraron trabajos que reporten la

descarboximetilación biológica de CMC; y en algunos trabajos probaron que efectivamente esto no ocurría (Levinson et al., 1951). Podríamos proponer que AUG42 produce una enzima encargada de la descarboximetilación de los azúcares y que sería una eterasa que reconoce el enlace éter (formado entre un hidroxilo del azúcar en el carbono 2, 3 o 6 y el sustituyente, ver Figura 1.4 de la sección Introducción). Sin embargo, tras buscar eterasas en el genoma anotado, no se encontró ninguna proteína con esta posible función. Por lo tanto, descartamos esta posibilidad para AUG42. Planteamos a su vez, que la CMC fue completamente metabolizada en el control positivo realizado con en Mix de celulasas comerciales, debido a la presencia de eterasas que quitan los carboximetilo sustituyentes, dejando unidades de glucosa disponibles para fermentar.

De esta discusión, resulta claro que nuestro preparado enzimático presenta actividad celulasa pero la misma es de niveles bajos, quizá insuficientes para sacarificar adecuadamente el sustrato ofrecido, y así, no habría suficientes azúcares reductores para fermentar. Todos los ensayos realizados sugieren que la cantidad de enzima (o preparado enzimático) sería limitante en las condiciones ensayadas, y que sería necesario aumentar aún más la cantidad de enzima aplicada para obtener valores de glucosa libre compatibles con una fermentación eficiente desde el punto de vista comercial. Quizá la actividad celulasa esté estancada en algún producto, y éste actúe como inhibidor de la actividad celulasa en general. Esto se podría aclarar analizando los productos de hidrólisis por HPLC, de esta manera conocer el problema en la sacarificación para poder resolverlo.

En resumen, en todos los ensayos de sacarificación se detectó una baja cantidad de glucosa disponible para su fermentación por *S. cerevisiae*, y la levadura no contó con sustrato suficiente para producir bioetanol. En el caso que se obtuvo mayor cantidad de azúcares se utilizó mucho preparado enzimático (se liofilizaron dos litros de sobrenadante de cultivo para inyectar nueve viales con una concentración de 44 U por mL de medio de fermentación), lo cual deja de ser económicamente y ecológicamente redituable, dígase que la sacarificación en estas condiciones no sería industrialmente factible. Si consideramos algunas publicaciones disponibles, en otros ensayos de sacarificación y fermentación de sustratos celulósicos el agregado de enzima fue mucho mayor, se agregaban 50 veces más de unidades de enzima para obtener resultados positivos (Asgher et al., 2014; de Almeida et al., 2014; Sawisit et al., 2018).

En conjunto, los resultados permiten concluir que la producción de celulasas, en las condiciones que seleccionamos, es insuficiente para producir un preparado enzimático con poder sacarificador adecuado para la industria de etanol celulósico. Por este motivo, lo más conveniente sería identificar los genes codificantes para las celulasas presentes en el preparado enzimático (que ya se realizó en

esta Tesis), para clonarlos y expresarlos en forma recombinante en otro organismo, y obtener mayor cantidad de enzima (más U/mL), entre otros.

Potenciales implicancias de las celulasas producidas por AUG42 en su ambiente natural

En este trabajo se discutió la caracterización de las propiedades bioquímicas del preparado enzimático, y su potencial uso en la industria de los biocombustibles, pero también es interesante discutir cuál sería la importancia de la producción de CAZymas de AUG42 en su ambiente nativo.

Resulta difícil recrear el contexto natural donde esta bacteria produciría celulasas, pero teniendo en consideración de que AUG42 sería parte de la microbiota del gusano antártico *Grania* (quien se alimenta de algas rojas y pardas; Herrera et al. [2017]), se podría proponer que la degradación de los sustratos celulósicos presentes en las algas produjera nutrientes biodisponibles suficientes para alimentar estas bacterias y al gusano, sobre todo teniendo en cuenta un ambiente oligotrófico como lo es la Antártida. Basados en la complejidad de la constitución de las paredes celulares de las plantas, la mayoría de los microorganismos que degradan este tipo de biomasa exhiben una batería de enzimas con una función sinérgica. Como se esperaba, AUG42 produce un conjunto de enzimas con actividad sinérgica para degradar el material celulósico. Mediante el análisis por la espectrometría de masas se identificaron glicosil hidrolasas que probablemente estén cooperando en la degradación de diferentes sustratos celulósicos. El análisis *in silico* de las proteínas identificadas en el secretoma sugiere que estas enzimas pueden reconocer un conjunto de polisacáridos como la celulosa, la quitina (un polímero de cadena larga de N-acetilglucosamina, componente de las paredes celulares en los hongos, los exoesqueletos de insectos, entre otros) y xilanos (un grupo de hemicelulosas que se encuentran en las paredes celulares de las plantas y algunas algas). Guo et al. (2017) informaron que un extracto enzimático (un cóctel de celulasas, xilanasa y laccasa) producido por una bacteria celulolítica, crecida en un medio de sales minerales y salvado de trigo como fuente de carbono, hidroliza eficientemente las paredes celulares de las algas, facilitando la liberación de compuestos involucrados en los ciclos de carbono. Aunque durante esta tesis no nos enfocamos en el estudio de las celulasas producidas por las células de AUG42 en su ambiente natural (en asociación con el gusano *Grania*), los resultados sugieren que *Flavobacterium* sp. AUG42 contiene información genética suficiente para producir un grupo de celulasas que podrían ayudar en la descomposición de las algas. En caso que estas se expresaran, esta capacidad

puede tener un papel central en la alimentación del gusano *Grania* sp. y en el ciclo del carbono, contribuyendo así a la descomposición y al reciclaje de nutrientes en el ecosistema antártico. De todos modos, para conocer la expresión de proteínas *in situ* se deberían realizar estudios de proteómica, de manera tal que se pudieran identificar las proteínas presentes en el ambiente natural.

5. Conclusiones y perspectivas

En nuestra colección de microorganismos antárticos se encontró una bacteria capaz de producir y liberar celulasas al medio de cultivo, y se pusieron a punto algunas condiciones de su producción. Además, se caracterizó el potencial de AUG42 para sintetizar y degradar carbohidratos a través del estudio del genoma, y se determinó cuáles serían las enzimas secretadas al medio de cultivo mediante *shotgun* de proteínas. Estas celulasas serían capaces de hidrolizar CMC, PASC y celobiosa, y lo harían en condiciones compatibles con los procesos de sacarificación y fermentación simultánea. Sin embargo, la baja actividad del preparado no permitiría obtener azúcares reductores en cantidades suficientes para que la levadura fermentadora produzca bioetanol en concentraciones industrialmente significativas.

Como ya se evidenció durante la Discusión, los resultados generados en esta Tesis abren una serie de interrogantes, cuya respuesta puede ayudar a comprender los resultados. Teniendo contextualizadas las perspectivas del trabajo en la sección anterior, a continuación se listarán brevemente las propuestas:

- Optimizar la producción de celulasas de AUG42 incluyendo como inductores en el medio de cultivo otros monosacáridos como xilosa, fructosa y manosa.
- Analizar los productos de hidrólisis de los sustratos celulósicos por HPLC.
- Analizar la ubicación de las celulasas de AUG42 (extracelular o intracelular, asociadas a membrana o pared, etc.).
- Mutar genes posiblemente relacionados al reconocimiento de carbohidratos hemicelulósicos y evaluar la expresión de las celulasas.
- Evaluar la oxidación de PASC con cobre, y su posible relación con la actividad exocelulasa.
- Estudiar la actividad celobiasa mediante zimogramas.
- Analizar el potencial del preparado enzimático de degradar hemicelulosa, pectina y lignina de distintos vegetales.
- Seleccionar los posibles genes codificantes para celulasas, clonarlos y expresarlos en otro organismo, como forma de aumentar los niveles de producción enzimática.

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Walter, P., Raff, M., Roberts, K., 2002. *Molecular Biology of the Cell* 4th Edition: International Student Edition.
- ALUR - Complejo Agroenergético - Bella Unión, Artigas [WWW Document], n.d. URL <http://www.alur.com.uy/agroindustrias/bella-union/> (accessed 2.5.19).
- Alvarez, T.M., Paiva, J.H., Ruiz, D.M., Cairo, J.P., Pereira, I.O., Paixao, D.A., de Almeida, R.F., Tonoli, C.C., Ruller, R., Santos, C.R., Squina, F.M., Murakami, M.T., 2013. Structure and function of a novel cellulase 5 from sugarcane soil metagenome. *PLoS One* 8, e83635–e83635. <https://doi.org/10.2210/PDB4M1R/PDB>
- Alvelo-Maurosa, J.G., Lee, S.J., Hazen, S.P., Leschine, S.B., 2016. Direct image-based enumeration of clostridium phytofermentans cells on insoluble plant biomass growth substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 972–978.
- Arias, C.R., LaFrentz, S., Cai, W., Olivares-Fuster, O., 2012. Adaptive response to starvation in the fish pathogen *Flavobacterium columnare*: cell viability and ultrastructural changes. *BMC Microbiol.* 12, 266.
- Artzi, L., Dadosh, T., Milrot, E., Moraïs, S., Levin-Zaidman, S., Morag, E., Bayer, E.A., 2018. Colocalization and Disposition of Cellulosomes in *Clostridium clariflavum* as Revealed by Correlative Superresolution Imaging. *MBio* 9, e00012-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.00012-18>
- Asgher, M., Bashir, F., Iqbal, H.M.N., 2014. A comprehensive ligninolytic pre-treatment approach from lignocellulose green biotechnology to produce bio-ethanol. *Chem. Eng. Res. Des.* 92, 1571–1578. <https://doi.org/10.1016/J.CHERD.2013.09.003>
- Aslam, Z., Im, W.-T., Kim, M.K., Lee, S.-T., 2005. *Flavobacterium granuli* sp. nov., isolated from granules used in a wastewater treatment plant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 747–751.
- Aspeborg, H., Coutinho, P.M., Wang, Y., Brumer, H., Henrissat, B., 2012. Evolution, substrate specificity and subfamily classification of glycoside hydrolase family 5 (GH5). *BMC Evol. Biol.* 12, 186.
- Babrzadeh, F., Jalili, R., Wang, C., Shokralla, S., Pierce, S., Robinson-Mosher, A., Nyren, P., Shafer, R.W., Basso, L.C., de Amorim, H. V., 2012. Whole-genome sequencing of the efficient industrial fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain CAT-1. *Mol. Genet. genomics* 287, 485–494.
- Bacete, L., Mérida, H., Miedes, E., Molina, A., 2018. Plant cell wall-mediated immunity: cell wall changes trigger disease resistance responses. *Plant J.* 93, 614–636.
- Bakare, M., Adewale, I., Ajayi, A., Shonukan, O., 2002. African journal of biotechnology., African Journal of Biotechnology. Academic Journals.
- Barroca, M., Santos, G., Gerday, C., Collins, T., 2017. Biotechnological Aspects of Cold-Active Enzymes, in: *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 461–475. https://doi.org/10.1007/978-3-319-57057-0_19

- Basso, L.C., De Amorim, H. V, De Oliveira, A.J., Lopes, M.L., 2008. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Res.* 8, 1155–1163.
- Belghith, H., Ellouz-Chaabouni, S., Gargouri, A., 2001. Biostoning of denims by *Penicillium occitanis* (Pol6) cellulases. *J. Biotechnol.* 89, 257–262. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00309-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00309-1)
- Berg, B., Hofsten, B. v, Pettersson, G., 1972. Growth and cellulase formation by *Cellvibrio fulvus*. *J. Appl. Bacteriol.* 35, 201–214.
- Bernardet, J.-F., Bowman, J.P., 2006. The genus flavobacterium, in: *The Prokaryotes*. Springer, pp. 481–531.
- Bhat, M.K., 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 18, 355–383. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00041-0](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00041-0)
- Biely, P., Puls, J., Schneider, H., 1985. Acetyl xylan esterases in fungal cellulolytic systems. *FEBS Lett.* 186, 80–84. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(85\)81343-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)81343-0)
- Bonn, G., Pecina, R., Burtscher, E., Bobleter, O., 1984. Separation of wood degradation products by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 287, 215–221.
- Cai, W., De La Fuente, L., Arias, C.R., 2013. Biofilm formation by the fish pathogen *Flavobacterium columnare*: development and parameters affecting surface attachment. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5633–42. <https://doi.org/10.1128/AEM.01192-13>
- Cai, Y.J., Chapman, S.J., Buswell, J.A., Chang, S.T., 1999. Production and distribution of endoglucanase, cellobiohydrolase, and beta-glucosidase components of the cellulolytic system of *Volvariella volvacea*, the edible straw mushroom. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 553–559.
- Cameron, M.D., Aust, S.D., 2001. Cellobiose dehydrogenase—an extracellular fungal flavocytochrome. *Enzyme Microb. Technol.* 28, 129–138.
- Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., Henrissat, B., 2008. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* 37, D233–D238.
- Cantarella, M., Cantarella, L., Gallifuoco, A., Spera, A., Alfani, F., 2004. Comparison of different detoxification methods for steam-exploded poplar wood as a substrate for the bioproduction of ethanol in SHF and SSF. *Process Biochem.* 39, 1533–1542. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00285-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00285-1)
- Carpita, N.C., Gibeaut, D.M., 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3, 1–30. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1993.tb00007.x>
- Cavaco-Paulo, A., 1998. Mechanism of cellulase action in textile processes. *Carbohydr. Polym.* 37, 273–277. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(98\)00070-8](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(98)00070-8)
- Cellulosome Systems | Ed Bayer's Group [WWW Document], n.d. URL http://www.weizmann.ac.il/Biomolecular_Sciences/Bayer/research-activities/cellulosome-systems (accessed 1.28.19).

- Chakraborty, S., Aggarwal, V., Mukherjee, D., Andras, K., 2012. Biomass to biofuel: a review on production technology. *Asia-Pacific J. Chem. Eng.* 7, S254–S262. <https://doi.org/10.1002/apj.1642>
- Chandel, A.K., Chandrasekhar, G., Silva, M.B., Silvério da Silva, S., 2012. The realm of cellulases in biorefinery development. *Crit. Rev. Biotechnol.* 32, 187–202. <https://doi.org/10.3109/07388551.2011.595385>
- Christakopoulos, P., Hatzinikolaou, D.G., Fountoukidis, G., Kekos, D., Claeysens, M., Macris, B.J., 1999. Purification and Mode of Action of an Alkali-Resistant Endo-1,4- β -glucanase from *Bacillus pumilus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 364, 61–66. <https://doi.org/10.1006/ABBI.1999.1102>
- Cinelli, B.A., Castilho, L.R., Freire, D.M.G., Castro, A.M., 2015. A brief review on the emerging technology of ethanol production by cold hydrolysis of raw starch. *Fuel* 150, 721–729. <https://doi.org/10.1016/J.FUEL.2015.02.063>
- Cohen, J.D., Bao, W., Renganathan, V., Subramaniam, S.S., Loehr, T.M., 1997. Resonance Raman Spectroscopic Studies of Cellobiose Dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 341, 321–328.
- Colagrande, O., Silva, A., Fumi, M.D., 1994. Recent applications of biotechnology in wine production. *Biotechnol. Prog.* 10, 2–18. <https://doi.org/10.1021/bp00025a001>
- Coughlan, M.P., Folan, M.A., 1979. Cellulose and cellulases: Food for thought, food for the future? *Int. J. Biochem.* 10, 103–108. [https://doi.org/10.1016/0020-711X\(79\)90104-6](https://doi.org/10.1016/0020-711X(79)90104-6)
- D'Amico, S., Claverie, P., Collins, T., Georgette, D., Gratia, E., Hoyoux, A., Meuwis, M.-A., Feller, G., Gerday, C., 2002. Molecular basis of cold adaptation. *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.* 357, 917 LP – 925.
- Davies, G., Henrissat, B., 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3, 853–859. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00220-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00220-9)
- de Almeida, M.N., Guimarães, V.M., Falkoski, D.L., Paes, G.B.T., Ribeiro, J.I., Visser, E.M., Alfenas, R.F., Pereira, O.L., de Rezende, S.T., 2014. Optimization of Endoglucanase and Xylanase Activities from *Fusarium verticillioides* for Simultaneous Saccharification and Fermentation of Sugarcane Bagasse. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172, 1332–1346. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0572-9>
- Demiray, E., Ertuğrul Karatay, S., Ekici, H., Dönmez, G., 2018a. Introducing a new salty waste for second-generation bioethanol production. *Energy Sources, Part A Recover. Util. Environ. Eff.* 40, 2070–2078.
- Demiray, E., Karatay, S.E., Dönmez, G., 2018b. Evaluation of pomegranate peel in ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*. *Energy* 159, 988–994.
- Duchaud, E., Boussaha, M., Loux, V., Bernardet, J.-F., Michel, C., Kerouault, B., Mondot, S., Nicolas, P., Bossy, R., Caron, C., Bessières, P., Gibrat, J.-F., Claverol, S., Dumetz, F., Hénaff, M. Le, Benmansour, A., 2007. Complete genome sequence of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Nat. Biotechnol.* 25, 763–769. <https://doi.org/10.1038/nbt1313>
- Early, R., 1998. *Technology of dairy products*. Springer Science & Business Media.

- Ellis, K.J., Morrison, J.F., 1982. [23] Buffers of constant ionic strength for studying pH-dependent processes, in: Purich, D.L.B.T.-M. in E. (Ed.), *Enzyme Kinetics and Mechanism - Part C: Intermediates, Stereochemistry, and Rate Studies*. Academic Press, pp. 405–426. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(82\)87025-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879(82)87025-0)
- Feller, G., 2017. Cryosphere and Psychrophiles: Insights into a Cold Origin of Life? *Life* 7, 25.
- Ferdinand, P.-H., Borne, R., Trotter, V., Pagès, S., Tardif, C., Fierobe, H.-P., Perret, S., 2013. Are Cellulosome Scaffolding Protein CipC and CBM3-Containing Protein HycP, Involved in Adherence of *Clostridium cellulolyticum* to Cellulose? *PLoS One* 8, e69360.
- Fink, H.-P., Philipp, B., Paul, D., Serimaa, R., Paakkari, T., 1987. The structure of amorphous cellulose as revealed by wide-angle X-ray scattering. *Polymer (Guildf)*. 28, 1265–1270.
- Gashe, B.A., 1992. Cellulase production and activity by *Trichoderma* sp. A-001. *J. Appl. Bacteriol.* 73, 79–82.
- Gaur, R., Tiwari, S., 2015. Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from *Bacillus vallismortis* RG-07. *BMC Biotechnol.* 15, 19. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0129-9>
- Geiger, G., Brandl, H., Furrer, G., Schulin, R., 1998. The effect of copper on the activity of cellulase and β -glucosidase in the presence of montmorillonite or Al-montmorillonite. *Soil Biol. Biochem.* 30, 1537–1544.
- Gilbert, H.J., Knox, J.P., Boraston, A.B., 2013. Advances in understanding the molecular basis of plant cell wall polysaccharide recognition by carbohydrate-binding modules. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 23, 669–677.
- Goto, E., Kodama, T., Minoda, Y., 1978. Growth and taxonomy of thermophilic hydrogen bacteria. *Agric. Biol. Chem.* 42, 1305–1308.
- Goyal, G., Tsai, S.-L., Madan, B., DaSilva, N.A., Chen, W., 2011. Simultaneous cell growth and ethanol production from cellulose by an engineered yeast consortium displaying a functional mini-cellulosome. *Microb. Cell Fact.* 10, 89. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-89>
- Guo, H., Chen, H., Fan, L., Linklater, A., Zheng, B., Jiang, D., Qin, W., 2017. Enzymes produced by biomass-degrading bacteria can efficiently hydrolyze algal cell walls and facilitate lipid extraction 109, 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.03.025>
- Hamelinck, C.N., Hooijdonk, G. van, Faaij, A.P., 2005. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy* 28, 384–410. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2004.09.002>
- Han, S.O., Yukawa, H., Inui, M., Doi, R.H., 2003. Regulation of Expression of Cellulosomal Cellulase and Hemicellulase Genes in *Clostridium cellulovorans*; *J. Bacteriol.* 185, 6067 LP – 6075. <https://doi.org/10.1128/JB.185.20.6067-6075.2003>
- Hartati, I., Kurniasari, L., Riwayati, I., Budiarti, A., 2012. EFFECT OF pH AND MANGANESE KATION ON THE ACTIVITY OF COW RUMEN FLUID CELLULASE ENTRAPPED IN CALCIUM ALGINATE BEADS. *Momentum* 8.
- Hattori, T., Hisamori, H., Suzuki, S., Umezawa, T., Yoshimura, T., Sakai, H., 2015. Rapid copper transfer and precipitation by wood-rotting fungi can effect copper removal from copper

- sulfate-treated wood blocks during solid-state fungal treatment. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 97, 195–201.
- Henriksson, G., Johansson, G., Pettersson, G., 2000. A critical review of cellobiose dehydrogenases. *J. Biotechnol.* 78, 93–113.
- Henrissat, B., 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280, 309–316.
- Herrera, L.M., García-Laviña, C.X., Marizcurrena, J.J., Volonterio, O., de León, R.P., Castro-Sowinski, S., 2017. Hydrolytic enzyme-producing microbes in the Antarctic oligochaete *Grania* sp.(Annelida). *Polar Biol.* 40, 947–953.
- Hildén, L., Johansson, G., 2004. Recent developments on cellulases and carbohydrate-binding modules with cellulose affinity. *Biotechnol. Lett.* 26, 1683–1693.
<https://doi.org/10.1007/s10529-004-4579-8>
- Hsieh, C.C., Cannella, D., Jørgensen, H., Felby, C., Thygesen, L.G., 2014. Cellulase Inhibition by High Concentrations of Monosaccharides. *J. Agric. Food Chem.* 62, 3800–3805.
<https://doi.org/10.1021/jf5012962>
- Hu, F., Ragauskas, A., 2012. Pretreatment and lignocellulosic chemistry. *Bioenergy Res.* 5, 1043–1066.
- Ibrahim, N.A., EL-Badry, K., Eid, B.M., Hassan, T.M., 2011. A new approach for biofinishing of cellulose-containing fabrics using acid cellulases. *Carbohydr. Polym.* 83, 116–121.
<https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2010.07.025>
- Isaksen, T., Westereng, B., Aachmann, F.L., Agger, J.W., Kracher, D., Kittl, R., Ludwig, R., Haltrich, D., Eijsink, V.G.H., Horn, S.J., 2014. A C4-oxidizing lytic polysaccharide monoxygenase cleaving both cellulose and cello-oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 289, 2632–42.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.530196>
- Jeffries, T.W., 1991. Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes, in: *Physiology of Biodegradative Microorganisms*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 163–176.
https://doi.org/10.1007/978-94-011-3452-1_7
- Jeffries, T.W., 1987. Physical, chemical and biochemical considerations in the biological degradation of wood.
- Johnson, T., Johnson, B., Scott-Kerr, C., & Kiviahio, J., 2009. Bioethanol-status report on bioethanol production from wood and other lignocellulosic feedstocks. 63rd Appita Annu. Conf. Exhib. 3.
- Kameshwar, A.K.S., Qin, W., 2016. Lignin degrading fungal enzymes, in: *Production of Biofuels and Chemicals from Lignin*. Springer, pp. 81–130.
- Kasana, R.C., Gulati, A., 2011. Cellulases from psychrophilic microorganisms: a review. *J. Basic Microbiol.* 51, 572–579.
- Keegstra, K., 2010. Future Perspectives in Plant Biology Plant Cell Walls 1. *Plant Physiol.* 154, 483–486. <https://doi.org/10.1104/pp.110.161240>
- Kim, C.-H., 1995. Characterization and substrate specificity of an endo-beta-1, 4-D-glucanase I (Avicelase I) from an extracellular multienzyme complex of *Bacillus circulans*. *Appl. Environ.*

Microbiol. 61, 959–965.

- Kim, H.-J., Lee, Y.-J., Gao, W., Chung, C.-H., Son, C.-W., Lee, J.-W., 2011. Statistical optimization of fermentation conditions and comparison of their influences on production of cellulases by a psychrophilic marine bacterium, *Psychrobacter aquimaris* LBH-10 using orthogonal array method. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 16, 542–548. <https://doi.org/10.1007/s12257-010-0457-5>
- Kim, N., Choo, Y.M., Lee, K.S., Hong, S.J., Seol, K.Y., Je, Y.H., Sohn, H.D., Jin, B.R., 2008. Molecular cloning and characterization of a glycosyl hydrolase family 9 cellulase distributed throughout the digestive tract of the cricket *Teleogryllus emma*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 150, 368–376.
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.-P., Bohn, A., 2005. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angew. Chemie Int. Ed.* 44, 3358–3393. <https://doi.org/10.1002/anie.200460587>
- Knauf, M., Moniruzzaman, M., 2004. Lignocellulosic biomass processing: A perspective. *Int. sugar J.* 106, 147–150.
- Kuhad, R.C., Gupta, R., Singh, A., 2011. Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Res.* 2011, 280696. <https://doi.org/10.4061/2011/280696>
- Langsford, M.L., Gilkes, N.R., Singh, B., Moser, B., Miller, R.C., Warren, R.A.J., Kilburn, D.G., 1987. Glycosylation of bacterial cellulases prevents proteolytic cleavage between functional domains. *FEBS Lett.* 225, 163–167. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)81150-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)81150-X)
- 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. *Biotechnol. Biofuels* 6, 41.
- Levinson, H.S., Handels, G.R., Reese, E.T., 1951. Products of enzymatic hydrolysis of cellulose and its derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.* 31, 351–365. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(51\)90150-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(51)90150-6)
- Li, S., Shao, N., Luo, Y., Liu, H., Cai, S., Dong, X., 2017. Transcriptome and Zymogram Analyses Reveal a Cellobiose-Dose Related Reciprocal Regulatory Effect on Cellulase Synthesis in *Cellulosilyticum ruminicola* H1. *Front. Microbiol.* 8, 2497.
- Li, Z., Wang, D., Shi, Y.-C., 2017. Effects of nitrogen source on ethanol production in very high gravity fermentation of corn starch. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 70, 229–235.
- Liang, Y.-L., Zhang, Z., Wu, M., Wu, Y., Feng, J.-X., 2014. Isolation, screening, and identification of cellulolytic bacteria from natural reserves in the subtropical region of China and optimization of cellulase production by *Paenibacillus terrae* ME27-1. *Biomed Res. Int.* 2014.
- Loix, C., Huybrechts, M., Vangronsveld, J., Gielen, M., Keunen, E., Cuypers, A., 2017. Reciprocal Interactions between Cadmium-Induced Cell Wall Responses and Oxidative Stress in Plants. *Front. Plant Sci.* 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01867>
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P.M., Henrissat, B., 2013. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* 42, D490–D495.
- Macedo, N., Brigham, C., 2014. From Beverages to Biofuels: The Journeys of Ethanol-Producing

Microorganisms, International Journal of Biotechnology for Wellness Industries.
<https://doi.org/10.6000/1927-3037.2014.03.03.1>

- Mach-Aigner, A., Mach, R., L.H. Graaff, de, 2008. Regulation of transcription of cellulases- and hemicellulases-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*), *Appl Environ Microbiol.*
- McCammon, S.A., Bowman, J.P., 2000. Taxonomy of Antarctic *Flavobacterium* species: description of *Flavobacterium gillisiae* sp. nov., *Flavobacterium tegetincola* sp. nov. and *Flavobacterium xanthum* sp. nov., nom. rev. and reclassification of [*Flavobacterium*] *salegens* as *Salegentibacter salegens* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 1055–1063.
<https://doi.org/10.1099/00207713-50-3-1055>
- Medie, F.M., Davies, G.J., Drancourt, M., Henrissat, B., 2012. Genome analyses highlight the different biological roles of cellulases. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 227.
- Medronho, B., Romano, A., Miguel, M.G., Stigsson, L., Lindman, B., 2012. Rationalizing cellulose (in)solubility: reviewing basic physicochemical aspects and role of hydrophobic interactions. *Cellulose* 19, 581–587. <https://doi.org/10.1007/s10570-011-9644-6>
- Møller, J.D., Barnes, A.C., Dalsgaard, I., Ellis, A.E., 2005. Characterisation of surface blebbing and membrane vesicles produced by *Flavobacterium psychrophilum*. *Dis. Aquat. Organ.* 64, 201–209.
- Morita, R.Y., 1975. Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 39, 144.
- Mountfort, D.O., Asher, R.A., 1985. Production and regulation of cellulase by two strains of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 1314–1322.
- Moyer, C.L., Morita, R.Y., 2007. Psychrophiles and psychrotrophs. *Encycl. life Sci.* 1.
- Mushimiyimana, I., Tallapragada, P., 2015. Agro wastes residues as strategy to produce cellulase. *Int J ChemTech Res* 8, 89–97.
- Nadeem, M.T., Butt, M.S., Anjum, F.M., Muhammad, A., 2009. Improving bread quality by carboxymethyl cellulase application. *Int. J. Agric. Biol.* 11, 727–730.
- Nigam, P., Singh, A., 2011. Production of liquid biofuels from renewable resources, *Progress in Energy and Combustion Science.* <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2010.01.003>
- Nihira, T., Saito, Y., Nishimoto, M., Kitaoka, M., Igarashi, K., Ichi Ohtsubo, K., Nakai, H., 2013. Discovery of cellobionic acid phosphorylase in cellulolytic bacteria and fungi.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.09.014>
- Nunokawa, Y., McDonald, I.J., 1968. Extracellular proteolytic enzymes of psychrophilic bacteria. I. Purification and some properties of enzymes of an obligately psychrophilic red-pigmented bacterium. *Can. J. Microbiol.* 14, 215–224.
- O'sullivan, A.C., 1997. Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose* 4, 173–207.
- Oshima, M., Yamakawa, T., 1974. Chemical structure of a novel glycolipid from an extreme thermophile, *Flavobacterium thermophilum*. *Biochemistry* 13, 1140–1146.
- Pandey, R.K., Tewari, L., 2018. Mycotechnology for Lignocellulosic Bioethanol Production: An

Emerging Approach to Sustainable Environment, in: *Microbial Biotechnology in Environmental Monitoring and Cleanup*. IGI Global, pp. 28–43.

- Pichs, R., 2008. Temas relevantes del debate actual sobre energía y desarrollo. *Cent. Investig. LA Econ. Mund.* 117.
- Prabhu, R.R., Parashar, D., Satyanarayana, T., 2017. Production and characteristics of the recombinant extracellular bifunctional endoglucanase of the polyextremophilic bacterium *Bacillus halodurans* and its applicability in saccharifying agro-residues. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 40, 651–662.
- Pringsheim, H., 1912. Über den fermentativen Abbau der Cellulose. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiol. Chemie* 78, 266–291.
- Ransom-Jones, E., Jones, D.L., McCarthy, A.J., McDonald, J.E., 2012. The Fibrobacteres: an important phylum of cellulose-degrading bacteria. *Microb. Ecol.* 63, 267–281.
- Reese, E.T., 1956. Enzymatic hydrolysis of cellulose. *Appl. Microbiol.* 4, 39.
- Reese, E.T., Siu, R.G.H., Levinson, H.S., 1950. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *J. Bacteriol.* 59, 485.
- Robey, N.M., Solo-Gabriele, H.M., Jones, A.S., Marini, J., Townsend, T.G., 2018. Metals content of recycled construction and demolition wood before and after implementation of best management practices. *Environ. Pollut.* 242, 1198–1205.
- Rodrigues, T.B., Silva, A.E.T., 2016. *Molecular Diversity of Environmental Prokaryotes*. CRC Press.
- Rubio, M.V., Tramontina, R., Augusto, T., Squina, A.R. de L.D., 2016. Heterologous Expression of Carbohydrate-Active Enzymes in Filamentous Fungi. *Mycol. Curr. Futur. Dev. Fungal Biotechnol. Biofuel Prod.* 1, 148.
- Saha, B.C., Freer, S.N., Bothast, R.J., 1994. Production, purification, and properties of a thermostable β -glucosidase from a color variant strain of *Aureobasidium pullulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3774–3780.
- Sakon, J., Irwin, D., Wilson, D.B., Karplus, P.A., 1997. Structure and mechanism of endo/exocellulase E4 from *Thermomonospora fusca*. *Nat. Struct. Biol.* 4, 810.
- Sanchez, C.R., Peres, C.S., Barbosa, H.R., 1999. Growth and endoglucanase activity of *Acetivibrio cellulolyticus* grown in three different cellulosic substrates. *Rev. Microbiol.* 30, 310–314.
- Saqib, A.A.N., Whitney, P.J., 2006. Esculin gel diffusion assay (EGDA): A simple and sensitive method for screening β -glucosidases. *Enzyme Microb. Technol.* 39, 182–184.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.09.013>
- Saranraj, P., Stella, D., Reetha, D., 2012. Microbial cellulases and its applications. *Int. J. Biochem. Biotechnol. Sci* 1, 1–12.
- Sarkar, A.K., Ethers, J.N., 2001. Kinetics of the Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. *AATCC Rev.* 1.
- Sawisit, A., Jampatesh, S., Jantama, S.S., Jantama, K., 2018. Optimization of sodium hydroxide pretreatment and enzyme loading for efficient hydrolysis of rice straw to improve succinate production by metabolically engineered *Escherichia coli* KJ122 under simultaneous

- saccharification and fermentation. *Bioresour. Technol.* 260, 348–356.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.107>
- Schmidt-Nielsen, S., 1902. Ueber einige psychrophile Mikroorganismen und ihr Vorkommen. *Zentr. Bakteriolog. Parasitenkd. Infekt. Hyg. Abt.* 9, 145–147.
- Sethi, S., Datta, A., Gupta, B.L., Gupta, S., 2013. Optimization of cellulase production from bacteria isolated from soil. *ISRN Biotechnol.* 2013.
- Shadbahr, J., Khan, F., Zhang, Y., 2017. Kinetic modeling and dynamic analysis of simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to bioethanol. *Energy Convers. Manag.* 141, 236–243. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.08.025>
- Shoham, Y., Lamed, R., Bayer, E.A., 1999. The cellulosome concept as an efficient microbial strategy for the degradation of insoluble polysaccharides. *Trends Microbiol.* 7, 275–281.
[https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(99\)01533-4](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(99)01533-4)
- Sinegani, A.A.S., Emtiazi, G., 2006. The relative effects of some elements on the DNS method in cellulase assay. *J. Appl. Sci. Environ. Manag.* 10, 93–96.
- Siriwong, T., Laimheheriwa, B., Aini, U.N., Cahyanto, M.N., Reungsang, A., Salakkam, A., 2019. Cold hydrolysis of cassava pulp and its use in simultaneous saccharification and fermentation (SSF) process for ethanol fermentation. *J. Biotechnol.* 292, 57–63.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.01.003>
- Smith, D.T., Conant, N.F., Willett, H.P., 1960. *Zinsser Microbiology*, Ed. 12, New York, Appleton, Century, Crofts.
- Somssich, M., Khan, G.A., Persson, S., 2016. Cell Wall Heterogeneity in Root Development of *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* 07, 1242. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01242>
- Song, B., Li, B., Wang, X., Shen, W., Park, S., Collings, C., Feng, A., Smith, S.J., Walton, J.D., Ding, S.-Y., 2018. Real-time imaging reveals that lytic polysaccharide monooxygenase promotes cellulase activity by increasing cellulose accessibility. *Biotechnol. Biofuels* 11, 41.
- Stevenson, K., McVey, A.F., Clark, I.B.N., Swain, P.S., Pilizota, T., 2016. General calibration of microbial growth in microplate readers. *Sci. Rep.* 6, 38828.
- Stricker, A.R., Grosstessner-Hain, K., Würleitner, E., Mach, R.L., 2006. Xyr1 (xylanase regulator 1) regulates both the hydrolytic enzyme system and D-xylose metabolism in *Hypocrea jecorina*. *Eukaryot. Cell* 5, 2128–37. <https://doi.org/10.1128/EC.00211-06>
- Szilágyi, A., Závodszy, P., 2000. Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: results of a comprehensive survey. *Structure* 8, 493–504. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00133-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00133-7)
- Talamantes, D., Biabini, N., Dang, H., Abdoun, K., Berlemont, R., 2016. Natural diversity of cellulases, xylanases, and chitinases in bacteria. *Biotechnol. Biofuels* 9, 133.
<https://doi.org/10.1186/s13068-016-0538-6>
- Tauzin, A.S., Laville, E., Xiao, Y., Nouaille, S., Le Bourgeois, P., Heux, S., Portais, J.-C., Monsan, P., Martens, E.C., Potocki-Veronese, G., Bordes, F., 2016. Functional characterization of a gene locus from an uncultured gut *Bacteroides* conferring xylo-oligosaccharides utilization to

- Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 102, 579–592. <https://doi.org/10.1111/mmi.13480>
- Tomás-Pejó, E., Oliva, J.M., Ballesteros, M., Olsson, L., 2008. Comparison of SHF and SSF processes from steam-exploded wheat straw for ethanol production by xylose-fermenting and robust glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. Biotechnol. Bioeng. 100, 1122–1131.
- Ueda, M., Konemori, Y., Nakazawa, M., Sakamoto, T., Sakaguchi, M., 2018. Heterologous Expression and Characterization of a Cold-Adapted Endo-1,4- β -glucanase Gene from *Bellamyia chinensis laeta*, Process Biochemistry. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.07.008>
- Ueda, M., Koo, H., Wakida, T., Yoshimura, Y., 1994. Cellulase Treatment of Cotton Fabrics: Part II: Inhibitory Effect of Surfactants on Cellulase Catalytic Reaction. Text. Res. J. 64, 615–618.
- Ummartyotin, S., Manuspiya, H., 2015. A critical review on cellulose: from fundamental to an approach on sensor technology. Renew. Sustain. Energy Rev. 41, 402–412.
- Vaillant, F., Millan, P., O'Brien, G., Dornier, M., Decloux, M., Reynes, R., 1999. Crossflow microfiltration of passion fruit after partial enzymatic liquefaction, Journal of Food Engineering. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(99\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(99)00124-7)
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., Boerjan, W., 2010. Lignin biosynthesis and structure. Plant Physiol. 153, 895–905. <https://doi.org/10.1104/pp.110.155119>
- Wan, H., Wu, L., Yang, Y., Zhou, G., Ruan, Y.-L., 2018. Evolution of sucrose metabolism: the dichotomy of invertases and beyond. Trends Plant Sci. 23, 163–177.
- Wang, D., Yeats, T.H., Uluisik, S., Rose, J.K.C., Seymour, G.B., 2018. Fruit Softening: Revisiting the Role of Pectin. Trends Plant Sci. 23, 302–310. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.01.006>
- Wang, G., Zhang, X., Wang, Li, Wang, K., Peng, F., Wang, Linsong, 2012. The activity and kinetic properties of cellulases in substrates containing metal ions and acid radicals. Adv. Biol. Chem. 2, 390.
- Weber, K., Pringle, J.R., Osborn, M., 1972. [1] Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel, in: Methods in Enzymology. Elsevier, pp. 3–27.
- Wilson, D.B., 2011. Microbial diversity of cellulose hydrolysis. Curr. Opin. Microbiol. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.04.004>
- Wirick, M.G., 1968. A study of the enzymic degradation of CMC and other cellulose ethers. J. Polym. Sci. Part A-1 Polym. Chem. 6, 1965–1974. <https://doi.org/10.1002/pol.1968.150060718>
- Xiao, Z., Zhang, X., Gregg, D.J., Saddler, J.N., 2004. Effects of Sugar Inhibition on Cellulases and β -Glucosidase During Enzymatic Hydrolysis of Softwood Substrates, in: Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 4–7, 2003, in Breckenridge, CO. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 1115–1126. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-837-3_90
- Xu, F., 2010. Structure, ultrastructure, and chemical composition. Cereal straw as a Resour. Sustain. Biomater. biofuels.
- Xu, F., Ding, H., Tejirian, A., 2009. Detrimental effect of cellulose oxidation on cellulose hydrolysis

by cellulase. *Enzyme Microb. Technol.* 45, 203–209.

Yin, L.-J., Lin, H.-H., Xiao, Z.-R., 2010. Purification and characterization of a cellulase from *Bacillus subtilis* YJ1. *J. Mar. Sci. Technol.* 18, 466–471.

Zhu, M., Li, P., Gong, X., Wang, J., 2012. A Comparison of the Production of Ethanol between Simultaneous Saccharification and Fermentation and Separate Hydrolysis and Fermentation Using Unpretreated Cassava Pulp and Enzyme Cocktail. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76, 671–678. <https://doi.org/10.1271/bbb.110750>

Zittelli, G.C., Rodolfi, L., Bassi, N., Biondi, N., Tredici, M.R., 2013. Photobioreactors for Microalgal Biofuel Production, in: *Algae for Biofuels and Energy*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 115–131. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5479-9_7



Contents lists available at ScienceDirect

Microbiological Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/micres

Characterization of the cellulase-secretome produced by the Antarctic bacterium *Flavobacterium* sp. AUG42

Lorena M. Herrera^a, Victoria Braña^b, Laura Franco Fraguas^c, Susana Castro-Sowinski^{a,b,*}

^a Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Sciences, Universidad de la República (UdelaR), Igúá 4225, 11400, Montevideo, Uruguay

^b Molecular Microbiology, Instituto Clemente Estable, Av. Italia 3318, 11600, Montevideo, Uruguay

^c Cátedra de Bioquímica, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República, Av. Gral. Flores 2124, 11800, Montevideo, Uruguay



ARTICLE INFO

Keywords:
Antarctica
Carbon cycle
Cellulase
Flavobacterium
Saccharification

ABSTRACT

Flavobacterium sp. AUG42 is a cellulase-producing bacterium isolated from the Antarctic oligochaete *Grania* sp. (Annelida). In this work, we report that AUG42 produces a glycoside hydrolase cocktail with CMCase, PASCase and cellobiase activities (optimum pHs and temperatures ranging from 5.5 to 6.5 and 40 to 50 °C, respectively). The time-course analyses of the bacterial growth and cellulase production showed that the cocktail has maximal activity at the stationary phase when growing at 16 °C with filter paper as a cellulosic carbon source, among the tested substrates. The analyses of the CAZome and the identification of secreted proteins by shotgun Mass Spectrometry analysis showed that five glycoside hydrolases are present in the bacterial secretome, which probably cooperate in the degradation of the cellulosic substrates. Two of these glycoside hydrolases may harbor putative carbohydrate binding modules, both with a cleft-like active site. The cellulolytic cocktail was assayed in saccharification experiments using carboxymethylcellulose as a substrate and results showed the release of glucose (a fermentable sugar) and other reducing-sugars, after 24 h incubation. The ecological relevance of producing cellulases in the Antarctic environment, as well as their potential use in the bio-refinery industry, are discussed.

1. Introduction

The term cellulase refers to a group of enzymes which, acting together, hydrolyze cellulose mainly yielding cellobiose and glucose molecules. They are usually defined as β -1,4 glucanohydrolases that catalyze the hydrolysis of cellulose and some related polysaccharides. The cellulases are mainly classified as endoglucanases (E.C. 3.2.1.4), exoglucanases also called cellobiohydrolases (E.C. 3.2.1.176, E.C. 3.2.1.91, E.C. 3.2.1.74) and β -glucosidases or cellobiases (E.C. 3.2.1.21), according to the position of the hydrolyzed *o*-glycosidic linkage (Watanabe and Tokuda, 2010; Medie et al., 2012; Peralta et al., 2017).

Worldwide, the photosynthetic fixation of carbon dioxide (CO₂) is mainly responsible for the production of cellulose, hemicellulose and lignin and, the degradation of these compounds from the vegetal biomass, in turns, release CO₂ to the atmosphere. In this carbon cycling, cellulases play an important role, because the released oligo- and monomeric carbohydrate molecules from the vegetal biomass are used as carbon or/and energy source by many organisms, thus contributing to the degradation of the carbon pool from any environment (Horwath,

2015). In this regards, Antarctica is not an exception; the vegetation of the Antarctic environment is characterized by low coverage and low productivity, being mainly composed of two vascular plants (*Deschampsia antarctica* and *Colobanthus quitensis*), as well as other phototrophic organisms such as algae, and lichens (Borchhardt et al., 2017; Ogaki et al., 2019; Schultz and Rosado, 2019).

Cellulases are also widely used in many different industries including animal feed processing, food and brewery production, textile processing, detergent production and laundry, paper pulp manufacture and production of biofuels and chemicals from renewable resources, among others (Juturu and Wu, 2014). They constitute 10% of the worldwide industrial enzyme demands and in addition, they represent 48% of the ethanol sales price in the biofuel industry (Liu et al., 2016). The global market of enzymes has been expected to reach USD 10,519 million by 2024 (Global Enzymes Market Expected to Reach Global Enzymes Market Expected to Reach \$10, 2019,519 Million by 2024, n.d) and the factors that drive this growth include the upsurge in demand mainly for cellulosic- and amylosic- based biofuels, followed by paper and pulp manufacturer, among others. Globally, it has been projected that the biofuel consumption will increase to USD 57.8 billion

* Corresponding author.

E-mail address: scs@fcien.edu.uy (S. Castro-Sowinski).

<https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.03.009>

Received 4 December 2018; Received in revised form 28 January 2019; Accepted 22 March 2019

Available online 23 March 2019

0944-5013/ © 2019 The Authors. Published by Elsevier GmbH. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

gallons by 2020 (Market Research Report Collections, 2019- WWW.StrategyR.com), a process that has boosted the demand for cellulolytic enzymes. Considering this market demand, the search for novel cellulases with improved properties is continuously growing.

Most of the enzymes used in industrial processes are actually produced by mesophilic microbes (microorganisms with optimum growth temperature ranging from 20 °C to 45 °C) that produce the so-called “mesophilic enzymes” (maximal enzyme activities between 50–60 °C). On the other side, the cold-loving microbes (psychrophilic and cold-tolerant microbes, with optimum growth temperatures of 10 °C or lower, and 20 °C, respectively) produce psychrophilic enzymes. These ones have maximal temperatures of activities around 30–40 °C and are easily heat inactivated (thermolability) (D'Amico et al., 2002; Feller and Gerday, 2003). These two properties (activity at low temperature and thermolability) place psychrophilic enzymes as good candidates for some biotechnological applications, including the design of new products and/or processes. Psychrophilic enzymes play an important role in the global market due to their potential applications in enzymatically unfavorable industrial conditions. More information and examples of commercial psychrophilic enzymes are available in Martínez-Rosales et al. (2012), Sharma (2019), Yarzabal (2016). An interesting example constitutes the potential use of psychrophilic cellulases in the biofuel industry (bioethanol production), in a simultaneous saccharification and fermentation (SSF) process (Paulova et al., 2015). Thus, our aim was to contribute to the biofuel industry, by using cellulases produced by a cold-tolerant bacterium.

In a previous work, we explored the cellulolytic potential of microorganisms that inhabit the Antarctic oligochaete *Grania* sp. (Annelida) (Herrera et al., 2017). Among 31 cellulase-producing yeast and bacteria isolated from this worm, the bacterium identified as *Flavobacterium* sp. AUG42, a cold-tolerant microbe, produced halos of hydrolysis when growing in plates with growth medium supplemented with carboxymethylcellulose (CMC) at low temperatures (10 °C and 20 °C). This result encouraged us to attempt the production of cellulolytic enzymes from strain AUG42 using different cellulosic substrates, the partial biochemical characterization of the cell-free supernatant, and the analysis of its saccharification potential for the future design of SSF processes. In addition, this work reports the CAZome from AUG42 and the identification of secreted carbohydrases by shotgun Mass Spectrometry analysis. The CAZome describes the collection of carbohydrate-active enzymes (CAZymes) encoded by the genome of an organism and provides an insight into the nature and extent of the metabolism of complex carbohydrates of the species (Carbohydrate active enzymes, 2019a; Carbohydrate active enzymes, 2019b). The different categories of CAZymes (glycoside hydrolases, GHs; glycosyltransferases, GTs; polysaccharide lyases, PLs; carbohydrate esterases, CEs; auxiliary activities, AAs with redox activity that act in conjunction with other CAZymes) and carbohydrate-binding modules (CBMs) are fully described in the CAZY (Carbohydrate-Active enZYme) database (Carbohydrate active enzymes, 2019a; Carbohydrate active enzymes, 2019b). In summary, we aimed to identify the cellulases produced by AUG42, to perform the partial biochemical characterization of the cellulolytic-supernatant and to analyze their saccharolytic potential.

2. Materials and methods

2.1. Bacterium and growth media

The cold-tolerant cellulase-producing *Flavobacterium* sp. AUG42 strain was used in this work (Herrera et al., 2017). The strain was maintained in Luria-Bertani broth (LB) and stored in 15% (v/v) glycerol at –80 °C.

2.2. Time-course of cellulase production: growth rate versus enzymatic activities

Pre-cultures of strain AUG42 (5 mL of LB) were transferred to 2 L flasks containing 500 mL of a modified GS2 medium (without resazurin and with an adapted mineral micronutrient solution) at pH 7.0 (Artzi et al., 2015). The GS2 medium contained 5 g per liter of yeast extract as carbon and energy source, and the following minerals: 53 μM CaCl₂, 10 nM CuSO₄, 10 nM ZnSO₄, 10 nM Na₂B₄O₇, 80 nM MnCl₂, 30 nM CoCl₂, 3 nM Na₂MoO₄. The growth medium was supplemented with different cellulosic substrates at 0.5% (w/v): Carboxymethylcellulose (CMC, SIGMA, C5678), Avicel (SIGMA, 11363), Grade 1 Whatman filter paper and microcrystalline cellulose (SIGMA, 435236). The flasks were incubated in aerobic conditions (200 rpm) at different temperatures (11 °C, 16 °C and 21 °C) and the time-course of cell growth was monitored by the determination of colony-forming units (CFU) in Petri dishes containing LB medium. The cellulolytic preparation or cell-free supernatant was obtained by centrifugation of cultures (10,000 rpm, 30 min, 4 °C), filtered through 0.45 μm Millipore filters and finally stored at 4 °C until use. When indicated, the preparation was lyophilized. The cell-free supernatant obtained from AUG42 cells grown at 16 °C with filter paper as a cellulosic carbon source, was used for the partial characterization of the cell-free supernatant as indicated below.

2.3. CMCase and PASCCase activities

CMC and phosphoric acid-swollen cellulose (PASC) were used as cellulosic substrates for the determination of CMCase and PASCCase activities, respectively. PASC was produced by treatment of Avicel by phosphoric acid (7.5 mg/ml) as described by Morais et al. (2010). The cellulolytic preparations were incubated with 1% (w/v) CMC or 60% (v/v) PASC in 50 mM acetate buffer at pH 5.5 during 1 or 3 h at 40 °C, respectively. The mixture was stirred under orbital agitation (1000 rpm), cooled in an ice bath and then centrifuged (14,000 rpm, 5 min, 4 °C). The released reducing sugars in the supernatant were analyzed by the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay as described by Miller (1959) with minor modifications. Essentially, the supernatant was mixed with an equal volume of DNS solution, boiled for 10 min in a water bath, cooled in an ice bath, and the absorbance was measured at 550 nm. Glucose was used as a standard. One unit of enzyme activity (U) was defined as the amount of enzyme required for releasing 1 μmol of reducing sugars (expressed as glucose) per hour, under the assay conditions.

2.4. Cellobiase activity

Cellobiase activity was determined using D-(+) cellobiose (SIGMA, C7252) as the substrate, dissolved in the “buffer mix” described by Ellis and Morrison (1982) (0.05 M acetic acid, 0.05 M MES, and 0.1 M TRIS), at pH 5.5 and 40 °C. The cell-free supernatant (400 μL) was incubated with the substrate (100 μL of 40 mM cellobiose, prepared in buffer mix), for 2 h under stirring at 1000 rpm in an orbital shaker and then, boiled during 5 min in water bath. The concentration of the released glucose was determined using the GLUCOSE-TR Kit (from SPINREACT, Ref 1001191). One unit of enzyme activity (U) was defined as the amount of enzyme required for releasing 1 μmol of glucose per hour under the assay conditions.

2.5. Effects of pH and temperature on enzyme activities

The pH effect on CMCase, PASCCase and cellobiase activities was determined in the range of 3.5–10, using the “buffer mix” described above. The effect of temperature on the enzymatic activities was determined by fixing the pH at 5.5 and varying the temperature in the range 10 °C–60 °C. The thermal stability of the enzymes was also evaluated, by measuring the residual activities in the cell-free supernatant

after 30 days of incubation at different temperatures, and after lyophilization.

2.6. Electrophoretic analyses

SDS-PAGE was carried out as described by Laemmli (1970), using 10% and 5% acrylamide for the resolving and the stacking gels, respectively. Proteins were visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue R-250. Isoelectric focusing was done in the Pharmacia Phast-System equipment (Pharmacia, Uppsala, Sweden) according to the manufacturer's instructions, by using the broad isoelectric point (pI) calibration kit run on PhastGel IEF 3–9 (GE Healthcare), and proteins were silver stained. For zymographic experiments two SDS-PAGE and two isoelectric focusing gels were run in parallel; one gel was commonly stained for protein visualization, and the other was blotted to a 10% acrylamide gel containing 0.14% (w/v) CMC (CMC-gel) by soaking in 0.05 M sodium acetate buffer pH 5.5 during 1 h at 37 °C. Specific stain for activity was performed by soaking the CMC-gel in 0.1% (w/v) Congo-Red for 1 h and then washing the gel with 1.0 M NaCl. Active bands became clearly visible as a yellow band(s) against a red background.

2.7. CAZome analysis

The genome of strain AUG42 was sequenced, annotated and functionally categorized as described by Morel et al. (2016). Briefly, a highly pure genomic DNA sample was sequenced at Macrogen using a HiSeq2000 Illumina system by shotgun library sequencing. The quality of reads was analyzed using the FASTQC program, the raw material was assembled using the SPAdes 3.13.0 assembly software (SPAdes – Center for Algorithmic Biotechnology, 2019) and contigs were built using ABACAS (ABACAS, 2019). The draft genome was annotated using the RAST Version 2.0 (Rapid Annotation using Subsystem Technology) server (Aziz et al., 2008) (the manuscript regarding AUG42 draft genome is currently in preparation). The predicted proteins from AUG42 were analyzed using the web tool PFAM (PFAM, 2019). The PFAM (Finn et al., 2015) is a database that performs the search based on domains similarities, for the identification of proteins. For the particular identification of carbohydrate-active enzymes, all the predicted proteins were analyzed by dbCAN (database for the automated Carbohydrate-active enzyme annotation) (Yin et al., 2012), this web server is commonly used for the identification of CAZymes. The results obtained by dbCAN were also analyzed through BLASTP using the UniProtKB-SwissProt and PDB database (BLAST: Basic Local Alignment Search Tool, n.d.).

2.8. Shotgun Mass Spectrometry analysis of secreted proteins (secretome)

Cell-free supernatant fluids were loaded onto an SDS-PAGE 10% acrylamide gel allowing a short (1 cm) migration, Coomassie G-stained and those portions of gels containing proteins were excised for shotgun Mass Spectrometry (MS) analysis. Protein digestion and MS analysis were performed at the Proteomics Core Facility CEQUIBIEM, at the University of Buenos Aires/CONICET (National Research Council), as described by Ghio et al. (2018), using a Thermo Scientific Q Exactive hybrid quadrupole-Orbitrap mass spectrometer. The raw data were processed using the Proteome Discoverer software (version 1.4 from Thermo Scientific) and searched against the *Flavobacterium* sp. AUG42 protein sequence database obtained by genome annotation. The results obtained by shotgun of secreted proteins and by the dbCAN were compared to identify possible cellulases.

2.9. Protein modeling

The *in silico* protein structure from cellulases 265 and 976, in particular, the catalytic domains were performed using the homology-

modeling Swiss-model server (SWISS-MODEL, 2019). The proteins with the highest scores were chosen as a template to model both AUG42 proteins. Those structures with the highest GMQE (Global Model Quality Estimate) were chosen and the position of amino acids was analyzed by Ramachandran plot, in the same server (Swiss-model). The active sites were identified using the Chimera 1.13.1 program (UCSF Chimera Home Page, 2019) by comparison with a “seed model” cellulase using the MatchMaker tool. Then, the active site and a putative carbohydrate substrate (a β -1,4 cellotetraose and β -1,4 cellobiose) were open and prepared using the Dock Prep tool in the Chimera program. Finally, the docking was performed using the AutoDock Vina tool.

2.10. Saccharification assays

The assay was performed by using 5% CMC as the substrate, in 20 mL vials containing 15 mL of ING medium (a medium commonly used in ethanol fermentation; chemical composition as follows: 7 mM KH_2PO_4 , 26 mM K_2SO_4 , 4.5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and 10 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 5.5). Vials were injected with a volume of AUG42 water-reconstituted lyophilized cell-free supernatant containing 44.3, 3.1 and 4.5 U/mL (final concentration at the vials) of CMCase, PASCcase and cellobiase activities, respectively. The mixture was incubated for 24 h at 200 rpm and 30 °C. The efficiency of the saccharification process was monitored by determining the amount of released reducing sugars as well as the glucose concentration, as described above.

2.11. Nucleotide sequence accession numbers

The glycoside hydrolases sequences detected by the CAZome analysis were submitted to the GenBank. Accession numbers are as follows: MH510337 (gene 265), MH510338 (gene 266), MH510339 (gene 439), MH510340 (gene 649), MH510341 (gene 890), MH510342 (gene 891), MH510343 (gene 976), MH510344 (gene 1992), MH510345 (gene 2218) and MH510346 (gene 3439).

2.12. Statistics

At least three technical and three biological replicates were performed for each experiment. The statistical correlation of data was analyzed by the GraphPad Prism (6 version) software. Data are reported as means \pm S.E.

3. Results

The production of extracellular cellulolytic enzymes from the Antarctic bacterium *Flavobacterium* sp. AUG42 was evaluated, when the bacterium was growing in GS2 liquid medium supplemented with different cellulosic carbon sources. The time-course of bacterial growth (log CFU/ml vs time) and the production of cellulases (evaluated by CMCcase and PASCcase activities) are shown in Figs. 1a and 2. The results showed that AUG42 cells grew in the tested cellulosic carbon sources, while almost no growth was observed in the non-supplemented GS2 medium (just yeast extract as carbon and energy source, as described in Materials and Methods), suggesting that this bacterium may produce extracellular enzymes involved in the degradation of these cellulosic carbon sources. The curves exhibited a similar growth pattern, reaching always the stationary phase at 40 to 48 h of growth (Fig. 1a).

The analyses of the time-course of CMCcase and PASCcase production (Fig. 2a and b, respectively) revealed that both activities were maximal at the stationary phase when growing on filter paper, compared with other cellulosic carbon sources. Both activities were 4-fold and 6-fold higher respectively, compared to the activities observed when using cellulose or Avicel as a cellulosic carbon source.

Hence, the time-course of growth and production of cellulases at different temperatures were both attempted using filter paper as the

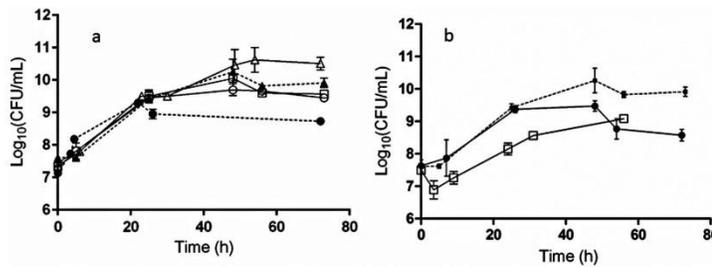


Fig. 1. Growth characteristics of *Flavobacterium* sp. AUG42: a) on different cellululosic substrates at 16 °C and b) at different temperatures using filter paper as cellululosic substrate.

Mean and SDs were obtained from three separate measurements in each experiment, at least three experiments were performed for each substrate. Error bars were in some cases smaller than the size of the symbol. a) GS2 medium supplemented with: CMC (Δ), Microcrystalline Cellulose (\circ), Avicel (\square) and Filter paper (\blacktriangle). Control: GS2 medium (\bullet). b) Growth at 11 °C (\square), 16 °C (\dashrightarrow), and 21 °C (\blackrightarrow).

carbon source. The results showed that AUG42 cells did not grow at 30 °C, but they grew at similar rates at 16 °C and 21 °C, and at a significantly slower rate at 11 °C (Fig. 1b; Table 1), reinforcing that strain AUG42 is a cold-tolerant rather than a psychrophilic bacterium. At the stationary growth phase, the values of CMCase and PASCCase activities were significantly higher when growing at 16 °C compared at 11 °C and 21 °C (Table 1), suggesting that the production of cellulases was higher at 16 °C. Interestingly, there was cell growth when using GS2 medium without a mineral solution (with filter paper as carbon source); however, we did not detect any cellulase activity, suggesting that at least one or more of these salts are important for cellulase production or activity (data not shown). Although the time-course of cellobiase production was not specifically evaluated, this activity was detected (0.50 ± 0.05 U/mL) in the cell-free supernatant fluids from AUG42 collected at the stationary phase (growth at 16 °C). All these results together suggest that AUG42 produces a cocktail of glycosyl-hydrolases. Based on these findings, the cell-free supernatant produced by AUG42 cells growing in GS2 medium supplemented with 0.5% (w/v) filter paper at 16 °C, were used for further experiments (biochemical characterization and saccharification experiments).

A number of proteins with cellulase activity and their apparent molecular masses were determined by electrophoretic analysis coupled to zymographic gels (Figs. 3 and 4). Isoelectric focusing gel electrophoresis coupled to CMC-gels (zymogram) showed that the cell-free supernatant fluids contain at least four proteins with cellulase (CMCase) activity, with pIs ranging from 5.8 to 7.4 (Fig. 3). The results obtained after blotting of proteins from the SDS-PAGE gel to the CMC-gel also showed at least four protein bands with CMCase activity. Comparison of both gels (SDS-PAGE and CMC-zymographic gels) indicates that these cellulases may have apparent molecular masses ranging from 30 kDa to 100 kDa (Fig. 4).

Table 1
Growth characteristics and cellulase production at different temperatures.

Temperature of growth (°C)	Generation time (h)	Stationary phase at (h)	CMCase (U/mL)	PASCCase (U/mL)
21	3.8 ± 0.3	25	0.87 ± 0.10	0.00 ± 0.01
16	3.3 ± 0.3	48	8.41 ± 0.40	1.20 ± 0.20
11	5.0 ± 0.3	48	3.07 ± 0.10	0.05 ± 0.10

The generation times (tg) were calculated from the specific growth rate (μ) corresponding to the exponential phase, according to the following equation: $tg = \ln 2 / \mu$. Values for CMCase and PASCCase activities were determined at the stationary phase stage.

The effect of pH and temperature on the cellulolytic activity of the cell-free supernatant fraction showed optimal activities at pH 6.5 and 5.5 for CMCase and PASCCase, respectively, and in both cases at 50 °C, a temperature commonly associated to mesophilic enzymes. However, both activities abruptly decreased at 60 °C (10% remaining activities, compared to values at 50 °C), suggesting that these enzymes are thermolabile, a feature mostly associated to psychrophilic enzymes. Cellobiase activity was highest at pH 5.5 and 40 °C, with a total inactivation at 50 °C, suggesting the psychrophilic character of this enzymatic activity. The data regarding the effect of pH and temperature on these enzymatic activities are shown as Supplementary Material.

At this point, we centered our attention into the analysis of the saccharolytic potential of the cell-free supernatant fluid, showing that after 24 h incubation at 30 °C and pH 5.5, the amount of total reducing sugars and glucose raised from 1.4 ± 0.3 to 17.0 ± 2.0 and from 0 to 21 ± 1 $\mu\text{mol/mL}$, respectively. This amount of glucose represents the release of 3.8 g/L of a fermentable sugar.

The analysis of the draft genome of strain AUG42 (manuscript in

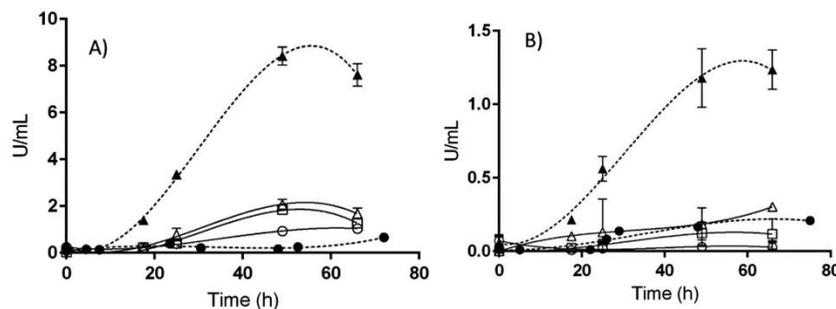


Fig. 2. Production of cellulose-degrading enzymes during the growth of *Flavobacterium* sp. AUG42.

A) CMCase and B) PASCCase activities measured at 40 °C and pH 5.5. Mean and SDs were obtained from three separate measurements of a representative experiment, at least three experiments were performed for each condition. Error bars were in some cases smaller than the size of the symbol. GS2 medium supplemented with CMC (Δ), Microcrystalline Cellulose (\circ), Avicel (\square), Filter paper (\blacktriangle). Control: GS2 medium (\bullet).

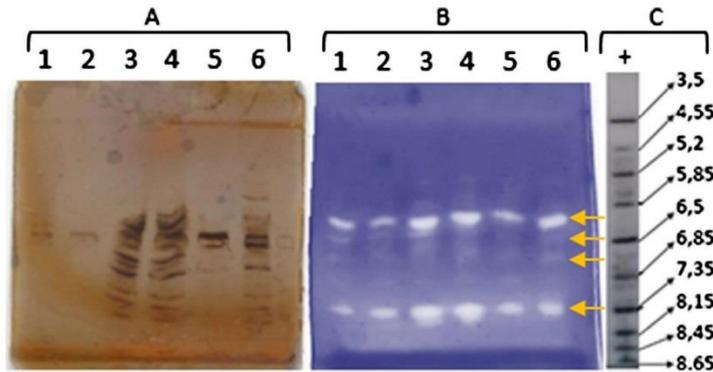


Fig. 3. Isoelectric focusing of the cell-free supernatant of *Flavobacterium* sp. AUG42 coupled to CMC-gels.

A) Isoelectric focusing gel, silver stained; B) zymographic CMC-gel stained with Congo-Red; and C) pI markers. Lanes 1, 2 and 5 were loaded with 1 μ L of the cellulolytic cocktail (2-fold concentrated by lyophilization); lanes 3, 4 and 6 were loaded with 1 μ L of the cellulolytic cocktail (12-fold concentrated by lyophilization). Arrows show the position of the active bands.

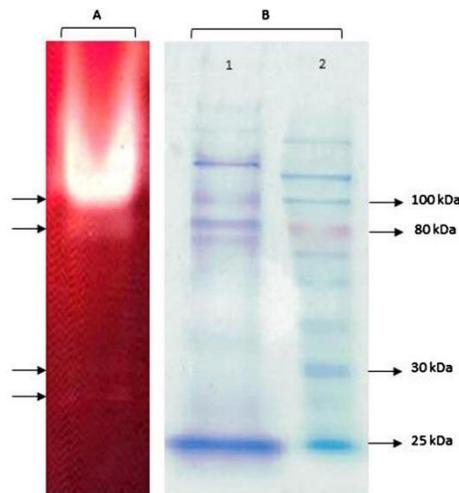


Fig. 4. SDS-PAGE of the cell-free supernatant of *Flavobacterium* sp. AUG42 coupled to CMC-gels.

A) Zymographic CMC-gel after blotting from the SDS-PAGE gel; arrows show the position of the active bands. B) SDS-PAGE gel. Lane 1 was loaded with 5 μ L of the cellulolytic cocktail (2-fold concentrated by lyophilization) and lane 2 was loaded with 5 μ L of the molecular marker Color Plus NEB (selected band sizes are indicated in the gel).

preparation) allowed the identification of at least ten open reading frames (ORFs) related to glycoside hydrolases probably involved in the hydrolysis of cellulosic materials (Table 2). The shotgun Mass Spectrometry analysis of secreted proteins showed that from these ten proteins, five GHs were present in the secretome of strain AUG42 under the assayed conditions. These glycoside hydrolases belong to the GH3, GH5, GH9 and GH30 families (Table 2). The search for carbohydrate binding modules (CBM) showed that glycoside hydrolases 265 (GH9) and 976 (GH5) harbor putative CBMs that may recognize cellulose, N-acetylglucosamine and xylans (Fig. 5). When the *in silico* modeling was performed using the entirely 265 and 976 proteins, they did not blast with any crystallized protein deposited in the database. However, it was possible to model the catalytic sites of both proteins, as well as the CBM of the 265 protein. The modeling and docking analyses of both catalytic

sites seem to display cleft or groove-shaped active sites (Fig. 6), resembling those exhibited by endoglucanase enzymes (Gupta, 2016). The catalytic amino acids and the potential hydrogen bonds between the catalytic amino acids and the substrate are also shown (Table 3).

4. Discussion

Although fungi play an important role as biomass-degrading microorganisms, being responsible for the degradation of most biomass in nature (Payne et al., 2015), bacteria stand out like recalcitrant matter-degrading microorganisms. Among bacteria, members from the genus *Flavobacterium* are recognized as natural cellulosic fiber degraders (Lednická et al., 2000). In the present work, we report the production of cellulases and the characterization of the cellulolytic cocktail produced by the Antarctic cold-tolerant bacterium *Flavobacterium* sp. AUG42. The implications of the production of cellulases from an environmental and industrial point of view are also analyzed.

First, we attempted to answer the following questions: which is the preferred substrate and growth temperature of AUG42 to produce cellulolytic enzymes? and which kind of cellulases are produced by AUG42? The results showed that AUG42 produces glycoside hydrolases with CMCase, PASCCase and cellobiase activities with a major production at the stationary growth phase when growing on filter paper as a cellulosic carbon source and 16 $^{\circ}$ C, among tested conditions. These activities were not detected when cells were grown in cellulosic-substrate-free medium, suggesting that the cellulosic material is needed for the enzymes production. Many reports showed that different cellulosic sources induce the production of cellulases at different extent; *i.e.* (Liang et al., 2014) informed that the bacterium *Paenibacillus terrae* requires the addition of CMC to the growth medium in order to produce CMCases, but the production showed a fivefold increase in the presence of wheat bran, as compared with the control experiment without cellulosic source. As AUG42 does, fungi from different genera prefer filter paper over CMC as an inducer of cellulase production during growth (Cai et al., 1999). Cellulases were mainly detected during the stationary phase, probably due to their participation in the secondary metabolism, as reported by (Sanchez et al., 1999).

Our next step was to answer whether this cellulolytic cocktail has biochemical properties which resemble those from psychrophilic enzymes. As reviewed by D'Amico et al. (2002), mesophilic and psychrophilic enzymes show maximal temperatures of activities close to 30 $^{\circ}$ C and 60 $^{\circ}$ C, respectively; hence, the cellulases produced by AUG42 might not be strictly classified as psychrophilic or cold-adapted enzymes; however, they are produced by a cold-tolerant microorganism, as described by Herrera et al. (2017). Although the optimum temperature for both CMCase and PASCCase activities was close to 50 $^{\circ}$ C,

Table 2
CAZome or functional carbohydrate-active enzymes (CAZymes) from AUG42.

Protein identification	Blastp/Uniprot-Swissprot Access code (% coverage/%identity)	Blastp/PDB Access code (%coverage/%identity)	PFAM Domains	DBCAN	pI/MW
265*	Endoglucanase E-4 P26221.2 (52/54)	Chain A, endoexocellulase:cellobiose from <i>Thermomonospora</i> 1Js4 (51/54)	PF00759.18 GH9 PF00942.17 CBM3	GH9 CBM3	7.13 / 125643.81
266*	Cellulase E1 P54583.1 (42/45)	Chain A, <i>Acidothermus cellulolyticus</i> Endocellulase E1 1ECR (42/46)	PF00150.17 Cellulase	GH5	6.22 / 91976.75
439	Beta-hexosaminidase P40406.1 (99/28)	Beta-n-hexosaminidase (ybbd) From <i>Bacillus subtilis</i> 3BMX (99/28)	PF00933.20 GH3	GH3	5.71 / 59206.93
649	Beta-N-acetylglucosaminidase/beta-glucosidase Q7WUL3.1 (38/28)	Crystal structure of mutant (d318n) <i>Bacillus subtilis</i> Family 3 glycoside hydrolase 4GLJ (51/30)	PF00933.20 GH3 PF00144.23 Beta lactamase	GH3	8.25 / 112589.87
890*	Glycosyl hydrolase family protein 3B A7LXU3.1 (99/46)	<i>Bacteroides ovatus</i> Xyloglucan Pul Gh3b with bound glucose 5JP0 (96/47)	PF00933.20 GH3 PF01915.21 GH3_C PF14310.5 FN3 like	GH3	5.72 / 83592.27
891*	Acid beta-glucosidase Q9BD10.1 (86/33)	Acid-Beta-Glucosidase 2V3D (86/33)	PF02055.15 GH30 PF17189.3 GH30_C	GH30	7.60 / 54726.14
976*	Cellulase Z P07103.2 (41/59)	Cellulase Cel5 from <i>Erwinia chrysanthemi</i> 1EGZ (36/65)	PF00150.17 Cellulase	GH5 CBM60 CBM5	5.75 / 85670.49
1992	Cellulase 2 P37701.1 (77/41)	Endoglucanase A from <i>Clostridium thermocellum</i> at atomic resolution 1IS9 (72/39)	PF01270.16 GH8	GH8	8.76 / 53495.18
2218	Cellobiase P33363.2 (94/42)	Crystal structure of GH3 beta-glucosidase from <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> 5XXL (94/46)	PF00933.20 GH3 PF01915.21 GH3_C PF14310.5 FN3 like	GH3	5.85 / 84425.56
3439	Probable mannan endo-1,4-beta-mannosidase Q0C8J3.1 (21/29)	Native structure Of Endo-1,4-Beta-D-Mannanase from <i>Thermotoga petrophila</i> Rku-1 3PZ9 (24/25)	PF00150.17 Cellulase PF02836.16 GH2_C	GH5	8.69 / 61002.69

The identification of carbohydrases using different databases (PFAM, dbCAN and UniprotKB-SwissProt), and a few theoretical properties, such as isoelectric point (pI) and Molecular Weight (MW), are shown. Proteins with asterisks (*) were identified in the secretome from AUG42, by shotgun as described in Materials and Methods.

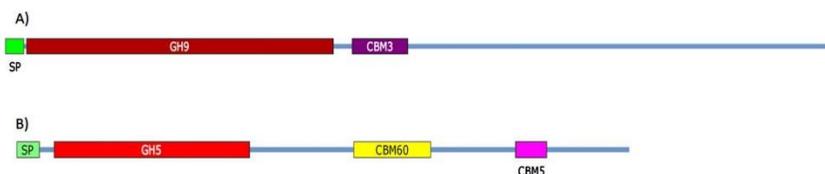


Fig. 5. Modular structure of cellulases 265 and 976.

A) Cellulase 265 (1178 amino acids) showing a GH9 catalytic domain located between amino acids 31 and 467 and a CBM3 domain located at the C-terminal (putative recognition of cellulose, between amino acids 496 and 574). B) Cellulase 976 (807 amino acids) showing a GH5 catalytic domain located between amino acids 50 and 307 and two putative CBMs, a CBM60 (putative recognition of N-acetylglucosamine, located between amino acids 446 and 547) and a CBM5 (recognition of xylans, located between amino acids 660 and 700). SP represents the signal peptides found by search in the SignalP 4.1 server.

their thermostability resembles a psychrophilic enzyme. Notwithstanding, this will be elucidated after the out coming recombinant production, purification, and characterization of each enzyme.

Another question we arise was the identification of the cellulases present in the cell-free supernatant by comparing the data from the Mass Spectrometry study of the secreted proteins and the genome sequencing analysis. The results suggested that AUG42 produces a cocktail composed by five enzymes involved in the degradation of cellulosic matter, mainly endocellulases and a beta-glucosidase, in agreement with the CMCase, PASCCase and cellobiase activities already found in the cell-free supernatant. The production of cellulolytic cocktails has also been reported for microorganisms such as *Aspergillus fumigatus* (Das et al., 2013) and *Bacillus licheniformis* (van Dyk et al., 2009), among others. Hence, the production of enzymatic cocktails may stand as a strategy to degrade complex polymeric substrates in their natural environment.

Interestingly, two cellulases with carbohydrate binding modules were identified in the secretome from AUG42, the so-called cellulases 265 and 976. When exploring their structural features, we found that

these cellulases did not entirely blast with any previously crystallized protein deposited in the homology-modeling Swiss-model server. The herein reported results encourage us to face soon the resolution of their crystallographic structures. The *in silico* structure modeling of cellulases 265 and 976 revealed interesting protein features. The catalytic module-3D structure of 265 resembles the structure of proteins from the GH9 family, a barrel constituted by 12 α -helix in an $(\alpha/\alpha)_6$ arrangement, and a characteristic catalytic site able to accommodate an oligosaccharide substrate containing at least six glucose units. When modeled with its CBM, the 265 structure showed that the catalytic and cellulose-binding domains interact, as it has been described for the protein 1Js4 (a cellulase from *Thermomonospora fusca* with both exo- and endocellulase activities) by Sakon et al. (1997). The authors also reported that 1Js4 is a processive enzyme, able to hydrolyze the cellulose chain releasing oligosaccharides containing four glucose as the CBM progresses in the cellulose strand. Thus, according to the shape of the catalytic site, we infer that 265 could be a processive endoglucanase. This cellulase also may possess a Ca^{2+} binding site, as found in the template 1Js4.

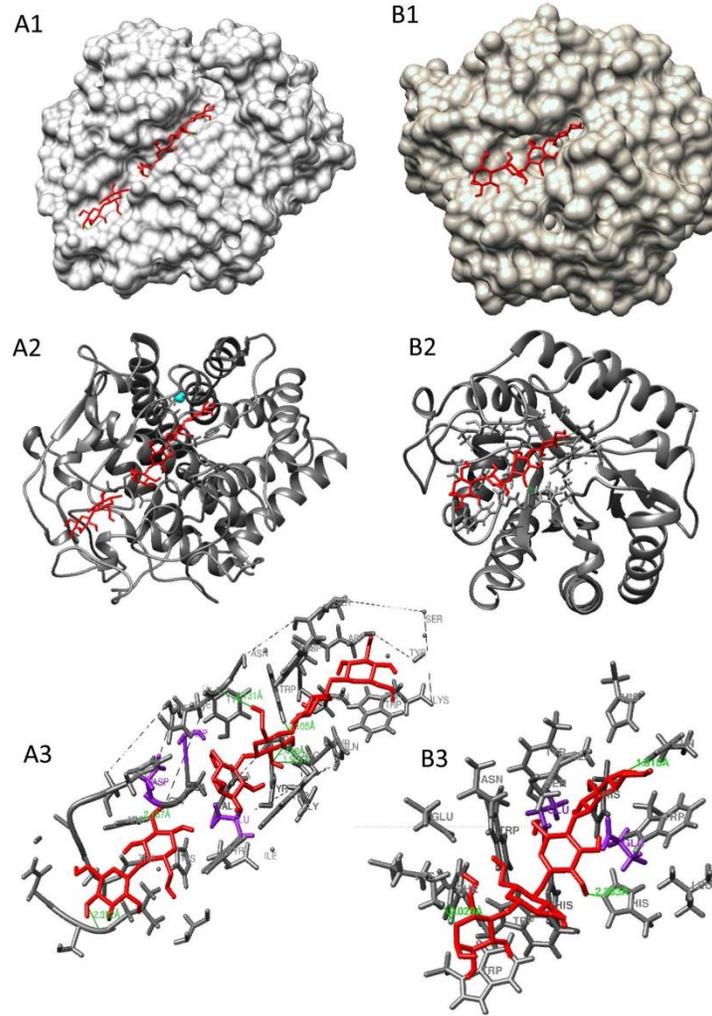


Fig. 6. Building a homology model for cellulases: 265 (A) and 976 (B). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

A1 and B1 are the surface representation; A2 and B2 are the Ribbon diagrams. A3 and B3 show the amino acids and hydrogen bonds that may interact with a substrate (shown in red).

The catalytic module-3D structure of 976 resembles the structure of a typical GH5 cellulase, a barrel constituted by eight external α chains and eight internal β or a $(\alpha/\beta)_8$ arrangement. The catalytic site seems to be located at the end of the α chains and the beginning of the β ones, thus the substrate can be attacked by following the Koshland double-displacement mechanism [i.e. two glutamic acids, one acting as nucleophile and the other as electrophile (Cazylopedia, 2019)]. In addition, structural features of 976 protein are quite similar to those present in the template 4m1r, an enzyme reported as an endocellulase (Alvarez et al., 2013) (Table 3).

The next challenge dealt with the potential use of the cellulolytic

cocktail during a saccharification process. The cocktail works at neutral or slightly acidic medium, a property that may be of interest in industrial applications (e.g. simultaneous saccharification and fermentation processes, clarification of fruit juice, etc.). Both, the optimum pH and temperature values of the enzymatic cocktail suggest that this could be used as an alternative tool for conventional and/or simultaneous saccharification and fermentation processes. Based on the theoretical yield of ethanol production from glucose (51.1% w/w) (Zhang and Bao, 2012) it can be inferred that a production of 3.8 g/L glucose may yield an amount of 2 g ethanol per liter, which represents a 0.2% w/w ethanol production. Clearly, the efficiency of saccharification is low and

Table 3
General information of modelling.

Cellulase	Modelling parameters					Docking			
	Template; Sequence identity; Coverage	GMQE	QMEAN	Amino acids in favored regions of the Ramachandran plot	Seed model	Substrate	Hydrogen bonding: amino acid, and distance to the substrate in Å	Amino acids involved in the coordination of Calcium	Catalytic amino acids
265	1js4; 63.74 %; 99 %	0,83	−1,88	94,94 %	1js4	Cellotetraose and cellobiose	F(228) 2,131 W(284) 2,105 R (341) 1,991 R (341) 1,409 L (413) 2,353 R (403) 2,167	S (237) D (241) E (242)	D (81) D (84) E (453)
976	4mlr; 71,66 %; 96 %	0,85	−0,04	94,72 %	2a3h	cellotetraose	H (140) 2,383 K (300) 2,028 Q (212) 1,818	No detected	E (261) E (173)

Catalytic amino acids, hydrogen bonding interactions involved in the substrate positioning in the catalytic site, amino acids involved in calcium coordination; the position of amino acids within the protein are indicated in parenthesis. GMQE means Global Model Quality Estimation, and QMEAN means Qualitative Model Energy Analysis.

needs to be upgraded; as an alternative, we are currently facing a strategy that includes the recombinant production of these enzymes for their use in SSF processes, particularly those proteins 976 and 265 with putative endo-cellulase activity (Table 2).

Recent works reported the saccharification of laminarin by an immobilized laminarinase from *Flavobacterium* sp. strain UMI-01 (Mitsuya et al., 2017) and the seaweed saccharification by a recombinant produced alginate lyases from *Flavobacterium* sp. FALy (Manns et al., 2016), among others; however, to the best of our knowledge this is the first report regarding the characterization of a cellulolytic cocktail produced by an Antarctic *Flavobacterium* isolate, with a potential application in the saccharification of cellulosic matter for the biofuel industry.

We finally discussed the potential role of AUG42 in the natural environment. Based on the complexity of plant cell walls, most biomass-degrading microorganisms display a battery of enzymes with a synergistic function to break down complex polysaccharides. As expected, AUG42 produces a set of enzymes with synergic activity to degrade the cellulosic material. By shotgun Mass Spectrometry analysis of the secreted proteins, we herein identified five glycoside hydrolyses which probably cooperate in the degradation of different cellulosic substrates. The *in silico* analysis of the identified secreted proteins suggests that these enzymes may recognize a set of polysaccharides such as cellulose, chitin (a long-chain polymer of N-acetylglucosamine, component of cell walls in fungi, the exoskeletons of insects, among others) and xylans (a group of hemicelluloses found in plant cell walls and some algae). Guo et al. (2017) reported that an enzymatic extract (a cocktail of cellulases, xylanase and laccase) obtained from a biomass-degrading bacterium after growth in a mineral salt medium containing wheat bran as a carbon source, efficiently hydrolyzes algal cell walls, facilitating the release of compounds involved in the carbon and nitrogen cycles. Although we did not focus our work on the cellulases produced by AUG42 cells in the natural environment (in association with the *Grania* worm), the results suggest that *Flavobacterium* sp. AUG42 produces a group of cellulases that might assist into the decomposition of algae. This ability may have a central role in the feeding of the worm *Grania* sp. and in the carbon cycling, thus contributing to the decomposition and nutrient recycling in the Antarctic ecosystem.

5. Conclusions

In summary, we showed that the Antarctic bacterial isolate *Flavobacterium* sp. AUG42 possess the genetic potential to produce ten carbohydrate-degrading enzymes and at least five of them were identified in the secretome by the shotgun proteins analysis. The

degradation of algae by AUG42 cellulases need still to be evaluated, although the results suggest that this bacterium may provide available carbon sources from algae, thus improving the sustainability and nutrient balance of the Antarctic ecosystem through the decomposition of cellulosic materials. Finally, the enzymatic cocktail has biochemical properties that deserve attention from an industrial point of view, mainly as a resource for the biofuel industry.

Conflict of interest and ethical approval

The authors declare that they have no conflict of interest. This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Acknowledgments

This work was partially supported by PEDECIBA (Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas) and ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación) (FSE_1_2104_1_102649). The work of LMH was supported by ANII. The authors thank the Uruguayan Antarctic Institute for the logistic support during the stay in the Antarctic Base Artigas. S. Castro-Sowinski and L. Franco Fraguas are members of the National Research System (SNI, Sistema Nacional de Investigadores).

The authors especially thanks to Prof. Edward A. Bayer, Dr. Lior Artzi and Melina Shamshoum from the Department of Biomolecular Sciences, Weizmann Institute of Sciences (Rehovot, Israel), for their support and valuable suggestions and revision of the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.03.009>.

References

- ABACAS [WWW Document], n.d. URL <http://abacas.sourceforge.net/> (Accessed 23 January 2019).
- Alvarez, T.M., Paiva, J.H., Ruiz, D.M., Cairo, J.P.L.F., Pereira, I.O., Paixão, D.A.A., de Almeida, R.F., Tonoli, C.C.C., Ruller, R., Santos, C.R., Squina, F.M., Murakami, M.T., 2013. Structure and function of a novel cellulase 5 from sugarcane soil metagenome. *PLoS One* 8, e83635.
- Artzi, L., Morag, E., Barak, Y., Lamed, R., Bayer, E.A., 2015. Clostridium clariflavum: key cellulosome players are revealed by proteomic analysis. *MBio* 6 <https://doi.org/10.1128/mBio.00411-15>. e00411-e415.
- Aziz, R.K., Bartels, D., Best, A.A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R.A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E.M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G.J., Olson, R., Osterman, A.L., Overbeek, R.A., McNeil, L.K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G.D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A., Zagnitko, O., 2008. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9, 75.

- <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>.
- BLAST: Basic Local Alignment Search Tool** [WWW Document], n.d. URL <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Accessed 23 January 2019).
- Borchhardt, N., Schiefelbein, U., Abarca, N., Boy, J., Mikhailyuk, T., Sipman, H.J.M., Karsten, U., 2017. Diversity of algae and lichens in biological soil crusts of Ardley and King George islands, Antarctica. *Antarct. Sci.* 29, 229–237.
- Cai, Y.J., Chapman, S.J., Buswell, J.A., Chang, S.T., 1999. Production and distribution of endoglucanase, cellobiohydrolase, and beta-glucosidase components of the cellulolytic system of *Volvariella volvacea*, the edible straw mushroom. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 553–559.
- Carbohydrate active enzymes** [WWW Document], n.d. URL <http://www.cazy.org/genomes> (Accessed 23 January 2019a).
- Carbohydrate active enzymes** [WWW Document], n.d. URL <http://www.cazy.org> (Accessed 23 January 2019b).
- Cazypedia** [WWW Document], n.d. URL http://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_Hydrolase_Family_9 (Accessed 23 January 2019).
- D'Amico, Salvino, Claverie, P., Collins, T., Georlette, D., Gratia, E., Hoyoux, A., Meuwis, M.-A., Feller, G., Gerday, C., 2002. Molecular basis of cold adaptation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 357, 917 LP-925.
- Das, A., Paul, T., Halder, S.K., Jana, A., Maity, C., Das Mohapatra, P.K., Pati, B.R., Mondal, K.C., 2013. Production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus fumigatus* ABK9 in wheat bran-rice straw mixed substrate and use of cocktail enzymes for deinking of waste office paper pulp. *Bioresour. Technol.* 128, 290–296. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.080>.
- Ellis, K.J., Morrison, J.F., 1982. 23] Buffers of constant ionic strength for studying pH-dependent processes. In: Purich, D.L.B.T.-M. (Ed.), *Enzyme Kinetics and Mechanism - Part C. Intermediates, Stereochemistry, and Rate Studies*. Academic Press, pp. 405–426. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(82\)87025-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(82)87025-0).
- Feller, G., Gerday, C., 2003. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nat. Rev. Microbiol.* 1, 200.
- Finn, R.D., Coghill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Mistry, J., Mitchell, A.L., Potter, S.C., Punta, M., Qureshi, M., Sangrador-Vegas, A., 2015. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res.* 44, D279–D285.
- Ghio, S., Ontañón, O., Piccini, F.E., de Villegas, R.M.D., Talia, P., Grasso, D.H., Campos, E., 2018. *Paenibacillus* sp. A59 GH10 and GH11 extracellular endoxylanases: application in biomass bioconversion. *Bioenergy Res.* 11, 174–190.
- Global Enzymes Market Expected to Reach \$10, 2019. 519 Million by 2024.** [WWW Document], n.d. URL <https://www.primewire.com/news-releases/global-enzymes-market-expected-to-reach-10-519-million-by-2024-898959866.html> (Accessed 23 January 2019).
- Guo, H., Chen, H., Fan, L., Linklater, A., Zheng, B., Jiang, D., Qin, W., 2017. Enzymes produced by biomass-degrading bacteria can efficiently hydrolyze algal cell walls and facilitate lipid extraction. *Renew. Energy* 109, 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.03.025>.
- Gupta, V.G., 2016. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Cellulase System Properties and Applications. Elsevier.
- Herrera, L.M., García-Laviña, C.X., Marizcurrena, J.J., Volonteri, O., de León, R.P., Castro-Sowinski, S., 2017. Hydrolytic enzyme-producing microbes in the Antarctic oligochaete *Grania* sp (Annelida). *Polar Biol.* 40, 947–953.
- Horvath, W., 2015. Carbon Cycling: The Dynamics and Formation of Organic Matter. Academic Press, London.
- Juturu, V., Wu, J.C., 2014. Microbial cellulases: engineering, production and applications. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 33, 188–203.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680.
- Lednická, D., Mergaert, J., Cnockaert, M.C., Swings, J., 2000. Isolation and identification of cellulolytic bacteria involved in the degradation of natural cellulosic fibres. *Syst. Appl. Microbiol.* 23, 292–299.
- Liang, Y.-L., Zhang, Z., Wu, M., Wu, Y., Feng, J.-X., 2014. Isolation, screening, and identification of cellulolytic bacteria from natural reserves in the subtropical region of China and optimization of cellulase production by *Paenibacillus terrae* ME27-1. *Biomed Res. Int.* 2014.
- Liu, G., Zhang, J., Bao, J., 2016. Cost evaluation of cellulase enzyme for industrial-scale cellulose ethanol production based on rigorous Aspen Plus modeling. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 39, 133–140.
- Manns, D., Nyffenegger, C., Saake, B., Meyer, A.S., 2016. Impact of different alginate lyases on combined cellulase-lyase saccharification of brown seaweed. *RSC Adv.* 6, 45392–45401. <https://doi.org/10.1039/C6RA06669K>.
- Market Research Report Collections WWW.StrategyR.com [WWW Document], n.d. URL <https://www.strategy.com/pressMCP-7664.asp> (Accessed 23 January 2019).
- Martínez-Rosales, C., Fullana, N., Musto, H., Castro-Sowinski, S., 2012. Antarctic DNA moving forward: genomic plasticity and biotechnological potential. *FEMS Microbiol. Lett.* 331, 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02531.x>.
- Medie, F.M., Davies, G.J., Drancourt, M., Henrissat, B., 2012. Genome analyses highlight the different biological roles of cellulases. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 227.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428.
- Mitsuya, D., Yamamoto, M., Okai, M., Inoue, A., Suzuki, T., Ojima, T., Urano, N., 2017. Continuous saccharification of Laminarin by immobilized laminarinase ULam111 followed by ethanol fermentation with a marine-derived yeast. *Adv. Microbiol.* 07, 387–403. <https://doi.org/10.4236/aim.2017.75032>.
- Morais, S., Heyman, A., Barak, Y., Caspi, J., Wilson, D.B., Lamed, R., Shoseyov, O., Bayer, E.A., 2010. Enhanced cellulose degradation by nano-complexed enzymes: synergism between a scaffold-linked exoglucanase and a free endoglucanase. *J. Biotechnol.* 147, 205–211.
- Morel, M.A., Iriarte, A., Jara, E., Musto, H., Castro-Sowinski, S., 2016. Revealing the biotechnological potential of *Deiftia* sp. JD2 by a genomic approach. *AIMS Bioeng.* 3, 156–175.
- Ogaki, M.B., de Paula, M.T., Ruas, D., Pellizzari, F.M., García-Laviña, C.X., Rosa, L.H., 2019. Marine fungi associated with Antarctic macroalgae. *The Ecological Role of Micro-Organisms in the Antarctic Environment*. Springer, pp. 239–255.
- Paulova, L., Patakova, P., Branska, B., Rychtera, M., Melzoch, K., 2015. Lignocellulosic ethanol: technology design and its impact on process efficiency. *Biotechnol. Adv.* 33, 1091–1107.
- Payne, C.M., Knott, B.C., Mayes, H.B., Hansson, H., Himmel, M.E., Sandgren, M., Stahlberg, J., Beckham, G.T., 2015. Fungal cellulases. *Chem. Rev.* 115, 1308–1448.
- Peralta, R.M., da Silva, B.P., Córrea, R.C.G., Kato, C.G., Seixas, F.A.V., Bracht, A., 2017. Enzymes from basidiomycetes—peculiar and efficient tools for biotechnology. *Biotechnology of Microbial Enzymes*. Elsevier, pp. 119–149.
- PFAM database** [WWW Document], n.d. URL <https://pfam.xfam.org/> (Accessed 13 March 2018).
- Sakon, J., Irwin, D., Wilson, D.B., Karplus, P.A., 1997. Structure and mechanism of endo/exocellulase E4 from *Thermomonospora fusca*. *Nat. Struct. Biol.* 4, 810.
- Sanchez, C.R., Peres, C.S., Barbosa, H.R., 1999. Growth and endoglucanase activity of *Acetivibrio cellulolyticus* grown in three different cellulosic substrates. *Rev. Microbiol.* 30, 310–314.
- Schultz, J., Rosado, A.S., 2019. Microbial role in the ecology of Antarctic plants. *The Ecological Role of Micro-Organisms in the Antarctic Environment*. Springer, pp. 257–275.
- Sharma, M., 2019. Thermophiles vs. Psychrophiles: cues from microbes for sustainable industries. *Environmental Biotechnology: For Sustainable Future*. Springer, Singapore, Singapore, pp. 323–340. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7284-0_13.
- SPAdes – Center for Algorithmic Biotechnology SPAdes – Center for Algorithmic Biotechnology** [WWW Document], n.d. URL <http://cab.spbu.ru/software/spades/> (Accessed 23 January 2019).
- SWISS-MODEL** [WWW Document], n.d. URL <https://swissmodel.expasy.org> (Accessed 23 January 2019).
- UCSF Chimera Home Page** [WWW Document], n.d. URL <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/> (Accessed 23 January 2019).
- van Dyk, J.S., Sakka, M., Sakka, K., Pletschke, B.I., 2009. The cellulolytic and hemi-cellulolytic system of *Bacillus licheniformis* SVD1 and the evidence for production of a large multi-enzyme complex. *Enzyme Microb. Technol.* 45, 372–378. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.06.016>.
- Watanabe, H., Tokuda, G., 2010. Cellulolytic systems in insects. *Annu. Rev. Entomol.* <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085319>.
- Yarzabal, L.A., 2016. Antarctic psychrophilic microorganisms and biotechnology: history, current trends, applications, and challenges. *Microbial Models: From Environmental to Industrial Sustainability*. Springer, Singapore, Singapore, pp. 83–118. https://doi.org/10.1007/978-981-10-2555-6_5.
- 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 Res.* 40, W445–W451.
- Zhang, J., Bao, J., 2012. A modified method for calculating practical ethanol yield at high lignocellulosic solids content and high ethanol titer. *Bioresour. Technol.* 116, 74–79.

ANEXO

1. Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados (M9, GS2, LB y Medio Ingeniería) se esterilizaron por calor húmedo en autoclave, durante 20 min a 121 °C (1,02 atm).

1.1 Medio de cultivo M9

Reactivo	Cantidad
NaCl	0,5 g
NH ₄ Cl	1 g
KH ₂ PO ₄	3 g
Na ₂ HPO ₄ anhidro	6 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	3 E -9 g *
Soluciones traza**	7,8 mL
H ₂ O Milli Ro	Cantidad suficiente para (C.S.P) 1 L

*Reactivos agregados luego que el medio estaba listo, estéril por filtración.

** Soluciones traza, ver Anexo Soluciones trazas utilizadas para 1L de M9 o GS2

1.2 Medio de cultivo GS2

Reactivo	Cantidad
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,5 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g
MOPS	10,5 g
Extracto de levadura	5 g
Soluciones traza*	7,8 mL
H ₂ O Milli Ro	C.S.P. 1L

Se ajustó a pH 7,0.

* Soluciones traza, ver Anexo Soluciones trazas utilizadas para 1L de M9 o GS2

1.2.2 Soluciones traza utilizadas para 1L de M9 ó GS2

Solución	Cantidad
CaCl ₂ (10g/L)	775 µL
CuSO ₄ .5H ₂ O (1g/L)	2,5 µL
ZnSO ₄ (1g/L)	1,8 µL
Na ₂ B ₄ O ₇ (0.1g/L)	5 µL
MnCl ₂ (1g/L)	15,7 µL
CoCl ₂ (1g/L)	7,1 µL
Na ₂ MoO ₄ (1g/L)	4,3 µL
H ₂ O Milli Ro	7 mL

1.3 LB

Reactivo	Cantidad
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O Milli Ro	C.S.P 1L

*Para realizar LB-agar, se agregaron 15 g de agar.

1.4 Medio ingeniería

Reactivo	Cantidad
KH ₂ PO ₄	0,6 g
K ₂ SO ₄	4,6 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,6 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,4 g
H ₂ O Milli Ro	C.S.P 1L

El pH fue ajustado a 5,5 con HCl 4 M

1.5 Medio Inóculo para *S. cerevisiae*

Reactivo	Cantidad
Sacarosa	100 g
Extracto de levadura	10 g
Peptona	20 g
H ₂ O Milli Ro	C.S.P 1L

2. Buffers

2.1 Buffers de actividad

Las actividades enzimáticas (CMCasa, PASCasa y celobiasa) se midieron en soluciones de *buffer* acetato de sodio, *buffer* mezcla o directamente, en Medio Ingeniería.

2.1.1. Buffer acetato de sodio 1 M pH 5,5

Reactivo	Cantidad
Ácido acético glacial, CH ₃ COOH	0,152 mol
Acetato de sodio , C ₂ H ₃ NaO ₂	0,848 mol
H ₂ O Milli Ro	C.S.P 1L

2.1.2 Buffer mezcla

Reactivo	Cantidad
Ácido acético	0,5 mol
MES	0,5 mol
Trizma base	1 mol
H ₂ O Milli Ro	C.S.P 1L

*El pH se ajustó con NaOH 4 M y HCL 4 M, en el rango de 3,5 a 9,5.

2.2 Buffer para electroforesis y zimogramas

2.2.1 Buffer de corrida 10 X

Reactivo	Cantidad
Glicina	72 g
SDS	5 g
Trizma base	15,1 g
H ₂ O Milli Ro	C.S.P 500 mL

2.2.2 Buffer de carga 4 X

Reactivo	Cantidad
Trizma base	0,76 g
SDS	1 g
Azul de bromofenol	0,5 mg
β-mercaptoetanol	1 mL
Glicerol	10 mL
H ₂ O Milli Ro*	C.S.P 25 mL

* El pH se ajustó a 6,8 con HCl 4 M, previo al ajuste de volumen final con agua.

2.2.3 Buffer Tris 1,5 M pH 8,8

Reactivo	Cantidad
Trizma Base	27,23 g
H ₂ O Milli Ro*	C.S.P. 150 mL

* El pH se ajustó a 8,8 con HCl 4 M, previo al ajuste de volumen final con agua destilada.

2.2.4 Buffer Tris 0,5 M pH 6,8

Reactivo	Cantidad
Trizma Base	6 g
H ₂ O Milli Ro*	C.S.P. 100 mL

* El pH se ajustó a 6,8 con HCl 4 M, previo al ajuste de volumen final con agua destilada.

3. Geles de poliacrilamida

3.1 Gel concentrador 6%

Reactivo	Cantidad (mL)
H ₂ O Milli Q	2,70
Acrilamida/bisacrilamida	1,00
Tris 0,5 M pH 6,8	1,25
SDS 10 % (m/v)	0,05
APS* 10 % (m/v)	0,03
TEMED	0,005

* Persulfato de amonio

3.2 Gel separador 10 %

Reactivo	Cantidad (mL)
H ₂ O Milli Q	4,1
Acrilamida/bisacrilamida	3,3
Tris 1,5 M pH 8,8	2,5
SDS 10 % (m/v)	0,1
APS 10 % (m/v)	0,05
TEMED	0,005

3.3 Gel con CMC 14% m/v

Reactivo	Cantidad (mL)
H ₂ O Milli Q	0,6
Acrilamida/bisacrilamida	3,4
Tris 0,5 M pH 6,8	5,2
CMC 2 % (m/v)	0,7
APS 10 % (m/v)	0,05
TEMED	0,005

4. Otras mezclas y soluciones

4.1 Solución de acrilamida/bisacrilamida

Reactivo	Cantidad
Acrilamida	30 g
Bisacrilamida	0,8 g
H ₂ O Milli Ro	C.S.P. 100 mL

*La solución se filtró con filtro de 45 µm y se almacenó a 4°C en frasco ámbar.

4.2 PASC: *Phosphoric acid swollen cellulose*, sustrato de PASCasas

En un matraz de vidrio de 2 L se colocaron 1,5 g de avicel con 5 mL de H₂O Milli Ro. Luego se agregaron 75 mL de ácido fosfórico 85 % y se dejó agitando durante 3 h en campana de extracción de gases. La solución se volvió translúcida. Posteriormente, se trasvasó ese contenido lentamente con agitación, a un matraz de 2 L conteniendo 375 mL de H₂O Milli Ro. Se centrifugó a 10000 RPM durante 35 min, se descartó el sobrenadante. Se agregó 375 mL de H₂O Milli Ro, y se agitó con vórtex para suspender y lavar el *pellet*. Se centrifugó y se descartó el sobrenadante. La operación de lavado se repitió 3 veces para eliminar el ácido. Por último se suspendió el *pellet* en 200 mL de H₂O Milli Ro y se ajustó el pH a 7 con solución de NaOH 4M. Se guardó a 4 °C.

4.3. Reactivo DNS

En un vaso de bohemia de 2 L se disolvieron 16 g de hidróxido de sodio (NaOH) y 300 g de tartrato de sodio y potasio (KNaC₄H₄O₆·4H₂O) en aproximadamente 600ml de agua destilada.

Posteriormente se adicionaron 10 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) y se colocó en agitador magnético con calentador, controlando que la temperatura no fuera superior a los 50 °C. Cuando la solución quedó homogénea, se aforó a 1 L con agua destilada. La solución se reservó en frasco ámbar, protegido de la luz.

4.4. Tinción con R-250

Solución de tinción

Reactivo	Cantidad
H ₂ O Milli Ro	500 mL
Etanol 95 % v/v	400 mL
Ácido acético glacial	100 mL
Azul Brillante de Coomassie R-250	1 g

Solución decolorante

Reactivo	Cantidad
H ₂ O Milli Ro	500 mL
Etanol 95 % v/v	400 mL
Ácido acético glacial	100 mL

4.5. Tinción con G-250

Solución fijadora

Reactivo	Cantidad
Etanol absoluto	30 mL
Ácido fosfórico 85 % v/v	2,37 mL
H ₂ O Milli Ro	C.S.P. 100 mL

Solución de tinción

Reactivo	Cantidad
Metanol	18 mL
Sulfato de amonio, (NH ₄) ₂ SO ₄	17 g
Ácido fosfórico 85 % v/v	2,37 mL

Azul de coomasie G-250	0,05g
H ₂ O Milli Ro	C.S.P. 100 mL

Solución de decoloración

Reactivo	Cantidad
Metanol	35 mL
Ácido acético glacial	2 mL
H ₂ O Milli Ro	C.S.P. 100 mL

5. Curvas de calibración

5.1 Glucosa por el método de DNS

Se trabajó con una cantidad variable y conocida de glucosa en el rango de 0 a $3 \times 10^{-1} \mu\text{mol}$.

Se mezclaron 100 μL de la solución de glucosa con 100 μL de DNS. Se colocó en baño de agua en ebullición durante 10 min, y se detuvo la reacción en hielo. Luego se colocó todo el volumen (200 μL) en pocillos de placa de ELISA (de 96 pocillos), y midió la absorbancia a 550 nm. Se realizó el ensayo por triplicado, y se calculó el promedio de los valores con su respectivo desvío estándar. A cada uno de los valores se les restó el promedio del “blanco” (valor de absorbancia de 0 μmol de glucosa) y se graficaron los valores obtenidos. Se realizó una línea de tendencia lineal, con la respectiva ecuación de recta que se utilizó para extrapolar los valores de absorbancia desconocida a cantidad de glucosa (Figura Anexo 1).

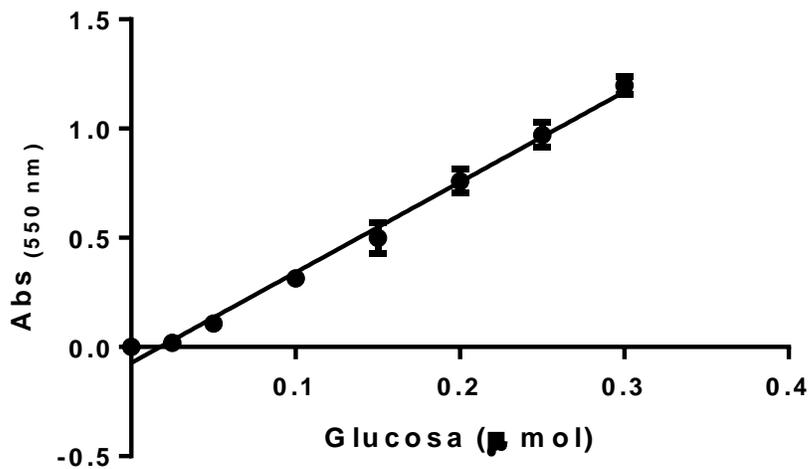


Figura Anexo 1. Curva de calibración, utilizando la glucosa como azúcar reductor. La ecuación de la recta que respalda la regresión lineal realizada muestra un $R_{square}=0,993$ y la ecuación de la recta obtenida es $Y = 4,138 x - 0,07251$

5.2. Etanol por GC-FID

Se realizó una curva de calibración utilizando tres réplicas para cada concentración de etanol, manteniendo una concentración constante de 1-butanol.

Se graficó el área promedio de los cromatogramas obtenidos, dividido el área de 1-butanol, en función de la concentración de etanol (ver Figura anexo 2). A partir de una regresión lineal se obtuvo una ecuación de recta que permitió extrapolar la concentración de etanol presente en las muestras de fermentación.

[EtOH] (g/L)	Tiempo ret. \pm desvest (min)	Prom. Área \pm desvest	[1-butanol] (g/L)	Tiempo ret. (min)	Prom. Área \pm desvest
1,25	$3,477 \pm 0,001$	$(8 \pm 1) E3$	10	$8,216 \pm 0,001$	$1,6 \pm 0,1 E5$
2,5	$3,478 \pm 0,006$	$(2,0 \pm 0,3) E4$	10	$8,25 \pm 0,07$	$1,9 \pm 0,1 E5$
5	$3,479 \pm 0,009$	$(5,0 \pm 0,5) E4$	10	$8,26 \pm 0,07$	$1,9 \pm 0,2 E5$
10	$3,49 \pm 0,01$	$(7,0 \pm 0,5) E4$	10	$8,26 \pm 0,09$	$1,160 \pm 0,002 E5$
15	$3,49 \pm 0,01$	$(2,0 \pm 0,06) E5$	10	$8,26 \pm 0,06$	$1,920 \pm 0,009 E5$

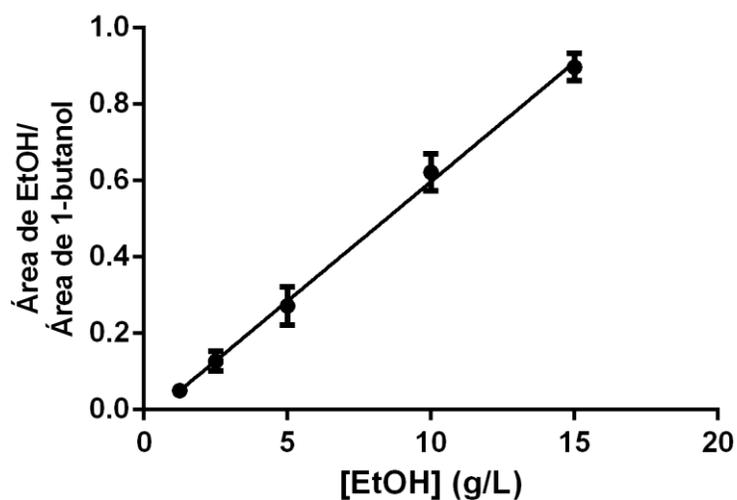


Figura Anexo 2. Curva de calibración, utilizando etanol en distintas concentraciones y 1-butanol como estándar interno. La ecuación de la recta que respalda la regresión lineal realizada muestra un $R_{square} = 0,9982$ y la ecuación de la recta obtenida es $Y = (0,06252 \pm 0,001529)x - 0,02807$