



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Enzimas modificadoras de la pared celular vegetal. Celulasas de interés biotecnológico papelero

Liliana Cerda-Mejía

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Programa de Doctorado Microbiología Ambiental y Biotecnología

Departamento de Microbiología

Facultad de Biología

ENZIMAS MODIFICADORAS DE LA PARED CELULAR VEGETAL. CELULASAS DE INTERES BIOTECNOLOGICO PAPELERO

Memoria presentada por Liliana Cerda-Mejía para optar al grado de Doctora por la
Universidad de Barcelona

Tesis realizada bajo la dirección de Dr. Francisco I. Javier Pastor Blasco

Visto Bueno del Director

La Doctoranda

Francisco I. Javier Pastor Blasco

Liliana Cerda-Mejía

Barcelona, Julio 2016

A mis padres.....

Esto va por ustedes

La presente Tesis Doctoral ha sido financiada por el Gobierno de Ecuador a través de la Secretaria de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación, a través de una beca de la Convocatoria Abierta 2012 fase 2, durante los años 2013-2016.

AGRADECIMIENTOS

Es difícil creer que han pasado varios años desde el día que decidí iniciar esta aventura, nuevos amigos, nuevas costumbres, nuevo continente. A lo largo de todos estos años, he tenido la oportunidad de conocer personas maravillosas y he tenido un crecimiento a nivel académico, personal y emocional. Varias personas han sido parte de este crecimiento y quiero darles las gracias.

Especialmente quiero agradecerle a mi jefecito, Javier, muchas gracias por la paciencia (sobre todo por la paciencia) y siempre estar dispuesto a responder mis inquietudes. Gracias especialmente en este período de escritura, sé que ha sido muy difícil para usted. Gracias por todo.

A Pilar, gracias por todos los conocimientos y por estar siempre disponible para ayudarme con mis dudas.

A Josefina, gracias por todo el tiempo invertido, por los consejos, por esas palmadas en la espalda que a veces son tan necesarias para seguir.

A la Dra. Blanca Roncero y Dra. Teresa Vidal, gracias por todo el apoyo académico que me brindaron en Terrassa. Gracias a todo el equipo papelero por acogerme esas semanas en su departamento.

Gracias al equipo del Dr. Julio Rozas por la toda la colaboración, especialmente a Cristina Frías por las intensas horas de trabajo en el ensamblaje de genoma.

A todos aquellos que han formado parte del Lab 2, gracias por todo. Gracias PerePi, Amanda, Mónica, Susana. Y no menos importantes mis niños: Sergi, Daniela, Pepe (María José), Anna, Judit², Guillem², Julia, Pau, Andrea y lo siento si me olvido de alguien han sido demasiados ☺. Obviamente no me olvide tí Carol!!!!, sabes que cuentas conmigo pequeña ☺. Gracias especialmente a tí Alba mi peliroja favorita, por escucharme mis eternos "que pereza", por las largas caminatas, comiendo gofres o tomando medio vaso de sangría ☺, les espero en Ecuador. Los extrañare a todos!!!!!!

Los amigos son la familia que uno escoge y creo que soy muy afortunada al contar con varios de ellos. Quiero agradecer a todos aquellos que han sido parte de mi vida en estos años. Espero no olvidarme de alguien y si lo hago lo siento.

Especialmente a ti Tania, bru de mí 🤍, gracias por todo (patelito), por todas las aventuras que vivimos juntas, viajes 🗺️, cenas 🍷, comidas 🍴 y más cenas. Gracias por cada momento, ya sea muertas de la risa, tomando 🍷 con 🍷, chevechitas 🍷 o simplemente comiendo chocolate a la 1 de mañana, gracias por estar ahí conmigo. Gracias por sostenerme en los días grises 🌧️ y por enseñarme nuevos rumbos 🗺️ y caminos 🌟. Por darte el tiempo de conocerme. Tienes mi amistad incondicional, sabes dónde encontrarme, solo tienes que mandarme un mensaje y estaré ahí junto a ti. No es una despedida, porque nuestra amistad tiene bases muy sólidas.. Sobre todo gracias por dejarme ser parte de tu familia.

Adri no quería incluirte en el lab2, no porque no seas parte del lab, sino porque te considero mi amigo, desde ya te echo de menos, sé que estas súper ocupado con tu MBA y por eso me tienes tan abandonada, pero bueno te perdono 😊 y quiero que sepas que siempre puedes contar conmigo, que te agradezco por todo, por estar ahí para escucharme o simplemente estar conmigo para hincharnos a 🍷 😊, porque de una o de otra forma más que un amigo, te considero como mi hermanito pequeño. Sé que te espera un futuro prometedor, no solo porque eres brillante sino porque te lo mereces. Te espero en Ecuador, mi casa es tu casa 😊. Gracias también a ti Laura. Son mi pareja favorita, si se casan me tienen que invitar y si tienen hijos yo tengo que ser la madrina de uno de ellos 😊.

Gracias Lu por tu amistad incondicional, que aunque ya no estás en Barcelona, siempre estas pendiente de mí, te llevo en mi mente y en mi corazón, espero visitarte pronto en Montevideo. Gracias a mis queridos amigos Eloy, Marcelle, Yexe, Ceci por las largas conversaciones, por las risas, porque cada desayuno o comida con ustedes fue muy especial, les visitare en Perú, Brasil y Panamá, así que tengan una cama para mí eeh 😊. Gracias Williberto (William Ricardo 😊) porque más que un paisano eres un amigo, gracias por aguantarme en aquellos días, estaré siempre muy agradecida contigo, no sé a dónde nos lleve la corriente, solo quiero que sepas que si me necesitas ahí estaré. De verdad que les extrañare mucho a todos.

Quiero agradecer también a todo el equipo de la secretaria del Departamento de Micro. Por estar siempre disponibles para resolver mis dudas administrativas y surtirme de caramelos 😊, hojas, cartulinas y bueno de muchas cosas más. Especialmente quiero agradecer a Susana y Bea, dos grandes mujeres que me han brindado su amistad, gracias por las palabras de aliento y por estar pendientes de mí en esta etapa 😊.

Gracias a todos los compañeros de Departamento no quiero mencionar fases ni laboratorios, simplemente gracias a todos.

Gracias Esther y Manu, encontrar amigos como ustedes, es muy difícil, gracias a los dos por aguantarme las intensas quejas, especialmente gracias a tí Esther, gracias por las locas aventuras, porque al salir contigo no sé lo que me espera. Gracias por enseñarme que la vida es una verbena. Te extrañare..... Les espero en Ecuador, mi casa es su casa☺.

Y por último y no por eso menos importante quiero agradecer a mi madre, gracias mamá, por apoyarme para cumplir este sueño, gracias por dejarme volar y nunca cortarme las alas. No solo le agradezco por esto, sino por todo, por la vida, por confiar en mí, por aguantarme el mal carácter, porque sé que soy muy difícil, gracias mamá. Aunque hace mucho tiempo no estas físicamente conmigo, quiero agradecerte papá por cuidarme, por enseñarme a ser perseverante, sobre todo les agradezco mamá y papá por darme el mejor de los regalos: mis hermanos yo sin ustedes no soy nadie. Gracias Nellita, porque siempre estás ahí pendiente de todo, apoyándome, gran parte de esto te lo debo a tí. Gracias Yoyita, Rodrigo, Carlos, Diana y Galito, porque los mejores años de mi vida los he compartido con ustedes, porque a pesar de estar lejos siempre han estado presentes cada día en mi mente y corazón.

Lily

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCION	3
1.1. Composición y estructura de la pared celular vegetal	4
1.1.1. Celulosa	6
1.1.1.1. Aplicaciones de la celulosa	8
1.1.2. Hemicelulosa	10
1.1.2.1. Xilano	11
1.1.2.2. β -1,3-1,4-glucanos	12
1.1.3. Lignina	13
1.2. Degradación de la lignocelulosa	14
1.2.1. Hidrolisis enzimática de la celulosa. Celulasas	14
1.2.2. Modificación de la celulosa por expansión	17
1.2.3. Oxidación enzimática de la celulosa por monooxigenasas líticas de polisacáridos	19
1.2.4. Despolimerización de la hemicelulosa	21
1.2.4.1. Xilanasas	21
1.2.4.2. β -1,3-1,4-glucanasas o liquenasas	22
1.2.5. Despolimerización de la lignina	23
1.3. <i>Paenibacillus barcinonensis</i>	23
1.4. Fabricación de papel	24
1.4.1. Fibras procedentes de plantas herbáceas	26
1.4.2. Proceso de refinado	27
1.5. Aplicación industrial de las celulasas	28
2. OBJETIVOS	33
2. Objetivos e interés del trabajo realizado	35
3. MATERIALES Y METODOS	37
3.1. Microorganismos utilizados	39
3.2. Medio de cultivo y mantenimiento de microorganismos	40
3.2.1. Inductores y antibióticos	42
3.3. Técnicas de análisis y manipulación de ácidos nucleicos	43
3.3.1. Extracción de ADN genómico	43
3.3.2. Plásmidos utilizados	43
3.3.3. Oligonucleótidos utilizados	43
3.3.4. Amplificación de fragmentos de ADN por PCR	45
3.3.5. Método <i>QuikChange</i> ®	46
3.3.6. Análisis electroforético de ADN	47
3.3.7. Purificación de ADN de productos de PCR y extracción de ADN de geles de agarosa	47
3.3.8. Digestión del ADN con enzimas de restricción	47
3.3.9. Desfosforilación del ADN	48
3.3.10. Ligación de moléculas de ADN	48

3.3.11. Extracción de ADN plásmidico	48
3.3.12. Cuantificación de ácidos nucleicos por espectrofotometría	48
3.3.13. Técnica del <i>Gene Walking</i>	49
3.3.14. Secuenciación de ADN	49
3.3.15. Análisis informático de secuencias	49
3.4. Técnicas de transformación	50
3.4.1. Transformación de <i>Escherichia coli</i> por el método de CaCl ₂	50
3.4.2. Transformación de <i>Bacillus megaterium</i>	51
3.4.2.1. Obtención de protoplastos de <i>Bacillus megaterium</i>	51
3.4.2.2. Transformación de protoplastos de <i>Bacillus megaterium</i>	51
3.5. Fraccionamiento Celular	52
3.5.1. Extracción de proteínas por <i>french press</i>	52
3.5.2. Sonicación	52
3.6. Purificación de proteínas	53
3.6.1. Purificación de proteína por unión a Avicel	53
3.6.2. Cromatografía en columna de afinidad (AKTA FPLC)	53
3.7. Técnicas de análisis de proteínas	54
3.7.1. Cuantificación de la concentración de proteína	54
3.7.2. Electroforesis de proteínas en geles de acrilamida (SDS-PAGE)	54
3.7.3. Tinción de proteínas con <i>BlueSafe</i>	56
3.7.4. Zimograma de actividad endoglucanasa y β -glucanasa	56
3.8. Detección y valoración de actividad enzimática	56
3.8.1. Determinación de los productos de reacción mediante cromatografía en capa fina	56
3.8.2. Valoración de actividad enzimática mediante ensayos colorimétricos	57
3.8.3. Influencia de las condiciones ambientales en la actividad enzimática	58
3.8.3.1. Determinación de la especificidad de sustrato	58
3.8.3.2. Determinación de pH	59
3.8.3.3. Determinación de la temperatura óptima	59
3.8.3.4. Determinación de temperatura y pH óptimo por RSM	59
3.8.3.5. Ensayos de termoestabilidad	60
3.8.3.6. Determinación del efecto de pH sobre la estabilidad	60
3.8.3.7. Efecto de iones sobre la actividad enzimática	60
3.8.3.8. Ensayos de unión a sustratos celulósicos	61
3.9. Técnicas de preparación de celulosa hinchada y amorfa	61
3.9.1. Preparación de celulosa hinchada (PASC)	61
3.9.2. Preparación de celulosa amorfa regenerada	61
3.10. Técnicas de análisis de propiedades de pasta de papel	62
3.10.1. Determinación de propiedades físicas de fibras de pasta de papel	62
3.10.2. Determinación de propiedades ópticas de papel	62
3.10.3. Determinación de propiedades de resistencia de papel	63
3.11. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	63

4. RESULTADOS	65
4.1. CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE Lic16A DE <i>Paenibacillus barcinonensis</i> BP-23	67
4.1.1. Clonación de la liquenasa Lic16A de <i>Paenibacillus barcinonensis</i>	67
4.1.2. Caracterización de la enzima recombinante	68
4.1.3. Análisis de productos de hidrolisis de β -glucano de cebada	70
4.2. SECUENCIACION DE GENOMA DE <i>Paenibacillus barcinonensis</i> BP-23	73
4.2.1. Secuenciación MacroGen Inc.	73
4.2.2. Ensamblaje	75
4.3. CARACTERIZACION DE LA CELULASA Cel6D DE <i>Paenibacillus barcinonensis</i> BP-23	79
4.3.1. Clonación de la celulasa Cel6D de <i>Paenibacillus barcinonensis</i>	79
4.3.2. Caracterización bioquímica de la celulasa Cel6D de <i>Paenibacillus barcinonensis</i> BP-23	80
4.3.2.1. Expresión y purificación de la celulasa Cel6D	80
4.3.2.2. Actividad específica	81
4.3.2.3. Análisis de los productos de hidrólisis	82
4.3.2.4. Determinación de pH y temperatura óptimos mediante RSM	84
4.3.2.5. Determinación de estabilidad	86
4.3.2.6. Efecto de cationes metálicos sobre la actividad enzimática	86
4.3.3. Ingeniería Proteica de la celulasa Cel6D de <i>Paenibacillus barcinonensis</i> BP-23	87
4.3.3.1. Mutagénesis Dirigida	89
4.3.3.2. Diseño y clonación de celulasas truncadas derivadas de Cel6D	90
4.3.3.3. Caracterización de las celulasas truncadas	91
4.3.3.4. Determinación de la especificidad de sustrato	92
4.3.3.5. Estudio de la capacidad de unión a sustratos insolubles	93
4.3.4. Sinergismo de las celulasa Cel6D con las endoglucanasas de <i>Paenibacillus barcinonensis</i> BP-23	94
4.3.4.1. Producción, purificación de Cel9B de <i>P. barcinonensis</i> BP-23	94
4.3.4.2. Producción de Cel5A de <i>P. barcinonensis</i> BP-23	94
4.3.4.3. Análisis del sinergismo entre Cel6D con Cel9B y Cel5A de <i>Paenibacillus barcinonensis</i>	95
4.3.4. Producción de Cel6D de <i>Paenibacillus barcinonensis</i> en <i>Bacillus megaterium</i>	98
4.3.4.1. Clonación de Cel6D de <i>Paenibacillus barcinonensis</i>	98
4.3.4.2. Producción de la celulasa Cel6D en <i>Bacillus megaterium</i>	99
4.4. CLONACION DE ENZIMAS MODIFICADORAS DE CELULOSA SIN ACTIVIDAD HIDROLITICA	100
4.4.1. Identificación y clonación de CBP3	100
4.4.1.1. Identificación de CBP3	100
4.4.1.2. Clonación, expresión y purificación de CBP3 de <i>Paenibacillus illinoisensis</i>	103
4.4.1.3. Análisis de actividad monooxigenasa de CBP3	104
4.4.2. Producción y purificación de BsEXLX1 de <i>Bacillus subtilis</i> 497	106

4.5. EVALUACION DE ENZIMAS CON ACTIVIDAD SOBRE LA CELULOSA EN PROCESOS DE REFINO DE PASTA DE PAPEL	108
4.5.1. Aplicación de nuevas enzimas en pastas de papel	109
4.5.1.1. Liberación de azúcares reductores	109
4.5.1.2. Análisis de productos de reacción por cromatografía en capa fina.	110
4.5.1.3. Análisis de la morfología de las fibras	112
4.5.2. Acondicionamiento de la pasta de lino	114
4.5.2.1. Prerrefino de la pasta de papel de lino	114
4.5.2.2. Definición de la dosificación de Cel9B	115
4.5.3. Evaluación del efecto de Cel6D en el refinado de pasta de lino	120
4.5.3.1. Propiedades Físicas de la pasta de lino	120
4.5.3.2. Análisis de los efluentes residuales	128
4.5.3.3. Análisis de la morfología de las fibras	128
5. DISCUSION	131
5.1. CARACTERIZACION DE Lic16A DE <i>Paenibacillus barcinonensis</i> BP-23	133
5.2. SECUENCIACION DEL GENOMA DE <i>Paenibacillus barcinonensis</i>	135
5.3. CARACTERIZACION BIOQUIMICA, INGENIERIA PROTEICA Y ESTUDIOS DE SINERGISMO DE Cel6D	136
5.3.1. Relación estructura-función y estabilidad enzimática de Cel6D	136
5.3.2. Ingeniería proteica de Cel6D	141
5.3.3. Estudios de sinergismo de Cel6D con endoglucanasas	142
5.4. ENZIMAS MODIFICADORAS DE CELULOSA SIN ACTIVIDAD HIDROLITICA EN PASTA DE PAPEL	144
5.5. APLICACIÓN DE CELULASAS EN PROCESOS DE REFINO CONVENCIONAL	145
6.CONCLUSIONES	149
7. BIBLIOGRAFIA	155
8. PUBLICACIONES	173

1. INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

El trabajo de la presente tesis doctoral se centra en el estudio de enzimas despolimerizadoras o modificadoras de polisacáridos, en concreto β -1,3-1,4-glucanasas, celulasas, monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMO's) y expansinas bacterianas. Las β -1,3-1,4-glucanasas y las celulasas forman parte del gran grupo enzimático de las glicosil hidrolasas. Las β -1,3-1,4-glucanasas actúan sobre los β -glucanos mixtos, que son polisacáridos poco abundantes, mientras que las celulasas son responsables de la hidrólisis de los enlaces β -1,4 de la celulosa, el polímero de gran abundancia. Las LPMO's representan un principio único de degradación oxidativa de polisacáridos insolubles recalcitrantes. Por último, las expansinas bacterianas pueden contribuir a la disgregación de la estructura celulósica por medios no líticos (amorfogénesis). Estas enzimas presentan un gran interés comercial debido a su aplicación industrial en la conversión de biomasa celulósica para la producción de biocombustibles y en numerosos procesos biotecnológicos donde mejoran la eficiencia productiva, disminuyen el impacto medio ambiental y reducen los costes económicos (Eibinger *et al.* 2014; Georgelis *et al.* 2015).

La producción y la descomposición de la biomasa vegetal, son procesos de grandes dimensiones en la naturaleza. La fijación anual de CO₂ por las plantas, consume aproximadamente el 15% del total de carbono de la atmósfera. Alrededor de la mitad de este carbono es incorporado en forma de polisacáridos estructurales y lignina, que colectivamente son nombrados como lignocelulosa. La lignocelulosa es el principal y más abundante componente de la biomasa producida por la fotosíntesis, anualmente se forman 200,000 millones de toneladas en el mundo (Ragauskas *et al.* 2006). La pared celular de las plantas está formada por lignocelulosa, cuya composición de polímeros varía entre las especies de plantas, incluso entre la edad y la etapa de crecimiento de la planta (Cuervo *et al.* 2009). Se compone de tres tipos principales de polímeros: celulosa, hemicelulosas y lignina, que están fuertemente entrelazados y unidos entre sí por enlaces no covalentes y por enlaces covalentes (Figura 1.1). Siendo la pared celular vegetal, la fuente principal de celulosa, que constituye la materia prima para la fabricación de papel, textiles, películas, espesantes y una gran variedad de productos (Pérez *et al.* 2002; Cosgrove 2005). El principal impedimento tecnológico para la utilización de la biomasa vegetal es, en general, la ausencia de una tecnología de bajo costo dirigida a disminuir la recalcitrancia de la lignocelulosa. Se han desarrollado diversos métodos que mejoran la

hidrólisis de la lignocelulosa, como los pretratamientos fisicoquímicos y biológicos. La finalidad del pretratamiento es separar la lignina, hidrolizar la hemicelulosa a azúcares fermentables, y reducir la cristalinidad de la celulosa para liberar la glucosa (Cuervo *et al.* 2009).

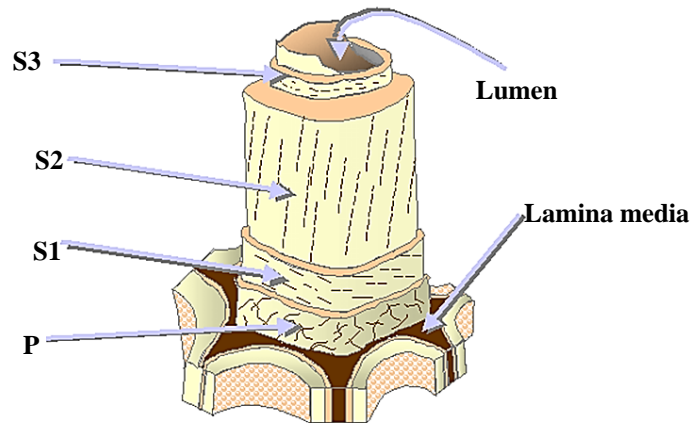


Figura 1.1. Estructura de la fibra de madera. P (Pared celular primaria), S1 (Pared celular secundaria exterior), S2 (pared celular secundaria intermedia), S3 (pared celular interior). Imagen modificada de Hubbe *et al.* 2007.

1.1. Composición y estructura de la pared celular vegetal

La pared de las células vegetales cumple varias funciones en la planta. Una de las más importantes es determinar el tamaño y la forma de las células. Es una estructura compleja formada por una pared primaria y secundaria, compuestas a su vez por una increíble amalgama de hidratos de carbono, proteínas, lignina, agua y otros compuestos inorgánicos que varían entre especies de plantas y tipos de células. Los principales componentes de la pared primaria son polisacáridos como celulosa, hemicelulosas, pectinas y agua (60-70%) (Figura 1.2A). La pared secundaria está formada por celulosa, hemicelulosas, lignina, y agua (5%) (Figura 1.2B) (Showalter 1993; Cosgrove 2005; Loqué *et al.* 2015).

En la estructura de la pared celular podemos distinguir dos fases: la fase fibrilar y la fase amorfa. La fase fibrilar está formada por celulosa mientras que la fase amorfa está formada por hemicelulosas, compuestos pécticos, glicoproteínas y lignina. Las hemicelulosas cubren a la celulosa y en conjunto con la pectina, contribuyen a unir las fibras de celulosa. La lignina es una molécula compleja de la fase amorfa que confiere

rigidez a la pared, mientras que cutina y suberina, también de la fase amorfa, vuelven impermeables a las paredes celulares, especialmente aquellas expuestas al aire (Somerville 2006).

En la pared primaria predomina la matriz amorfa formada por polisacáridos no celulósicos y la fase fibrilar está reducida al 8-25%. En la pared secundaria predomina la fase fibrilar (60%) y la matriz amorfa está formada por hemicelulosas y lignina (30%), mientras que los compuestos pécticos son inexistentes (Somerville *et al.* 2004).

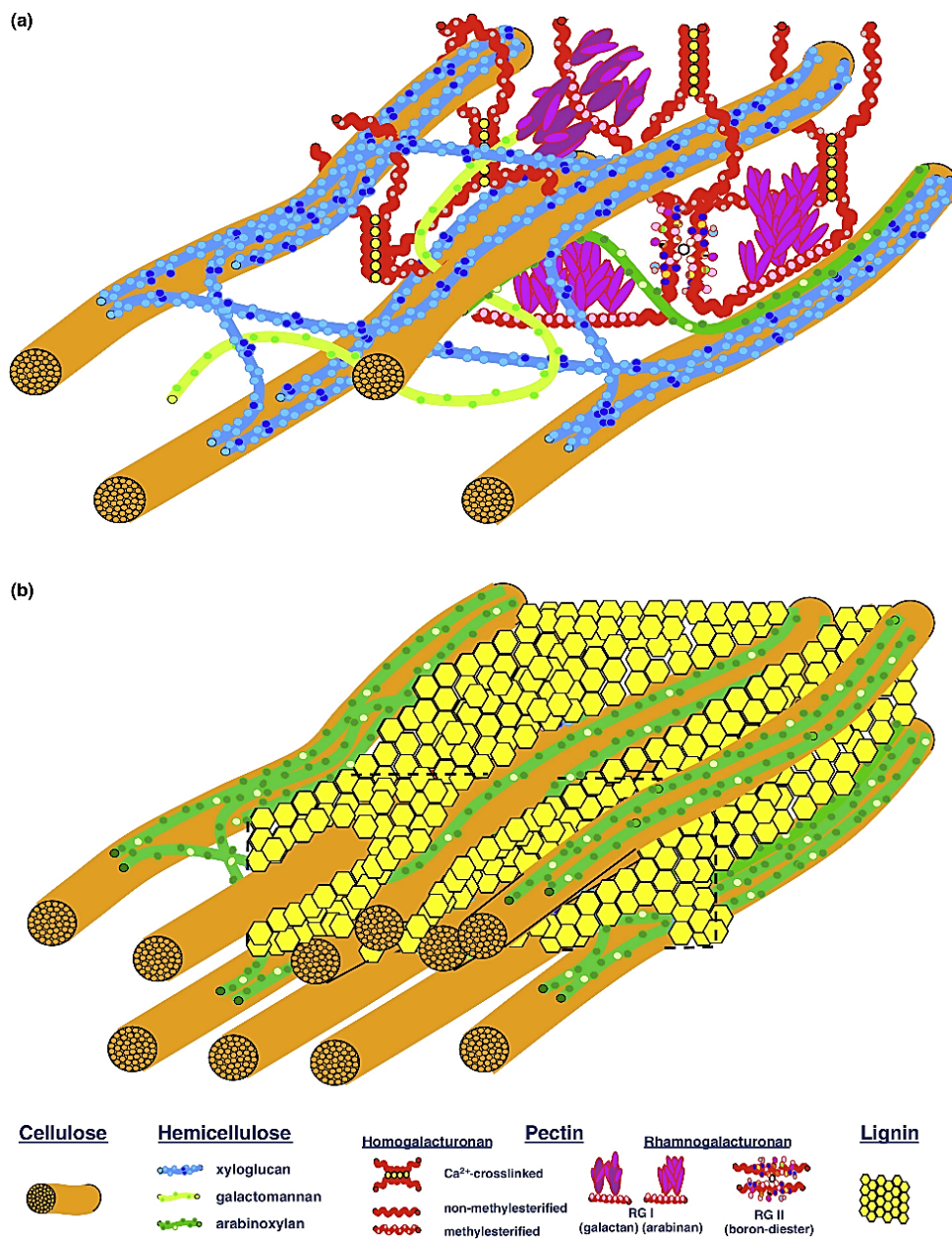


Figura 1.2. Modelos esquemáticos de la pared celular vegetal. Pared celular primaria (A), Pared celular secundaria (B). Imagen tomada de Loqué *et al.* 2015.

1.1.1. Celulosa

La celulosa es uno de los compuestos orgánicos más abundantes. Es el principal polisacárido de las plantas y constituye el componente estructural principal de la pared celular. La celulosa constituye aproximadamente el 45% del peso seco de la madera. Es un polímero lineal de 500-1500 unidades de glucosa unidas por enlaces β -1,4, formando cadenas largas no ramificadas (Fengel & Wegener 1984). Cada residuo de glucosa presenta una rotación de 180° con respecto al siguiente residuo, por lo que la celobiosa es la unidad básica de la celulosa. La cadena de celulosa consiste en un extremo una unidad de D-glucosa con un grupo C4-OH original (extremo no reductor) y el otro extremo termina con un grupo C1-OH original, que está en equilibrio con la estructura aldehído (extremo reductor) (Figura 1.3). Las cadenas de glucosa forman una serie de enlaces de puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals con otras cadenas laterales originando una estructura con elevada cristalinidad (Klemm *et al.* 2005).

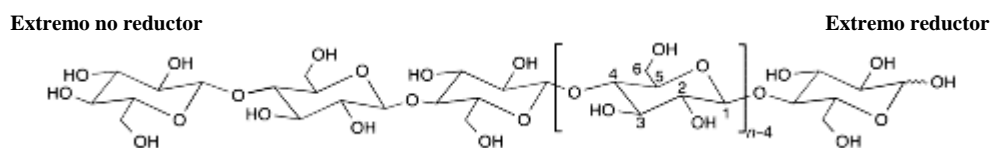


Figura 1.3. Estructura de la celulosa. (n =DP, grado de polimerización, *degree of polymerization*). Imagen modificada de Klemm *et al.* 2005.

La celulosa está organizada por una estructura celular jerárquica compuesta de fibrillas elementales, un grupo de fibrillas elementales se asocian formando las microfibrillas y un grupo de microfibrillas juntas constituyen la fibra de celulosa (Figura 1.4) (Nishiyama *et al.* 2002; Zhu *et al.* 2014). Cada unidad de glucosa forma enlaces de puentes de hidrógeno intramoleculares e intermoleculares con la cadena paralela. La existencia de los enlaces tiene un efecto profundo sobre la morfología, rigidez, orientación, resistencia y reactividad de las cadenas celulósicas. Los enlaces de puentes de hidrógeno intermoleculares permiten una estructura terciaria fibrilar lateral de orden elevado (alta cristalinidad). Las zonas de elevada cristalinidad están constituidas entre el 55-75% de la fibra de celulosa, son difíciles de penetrar por disolventes y reactivos. Por el contrario, las zonas relativamente más desordenadas (amorfás) son más accesibles y más susceptibles a todas las reacciones químicas. Las zonas cristalinas y amorfás no

poseen fronteras bien definidas y en conjunto constituyen la base de todos los soportes celulósicos conjuntamente con la hemicelulosa y la lignina (Pérez *et al.* 2002; Mathews *et al.* 2015).

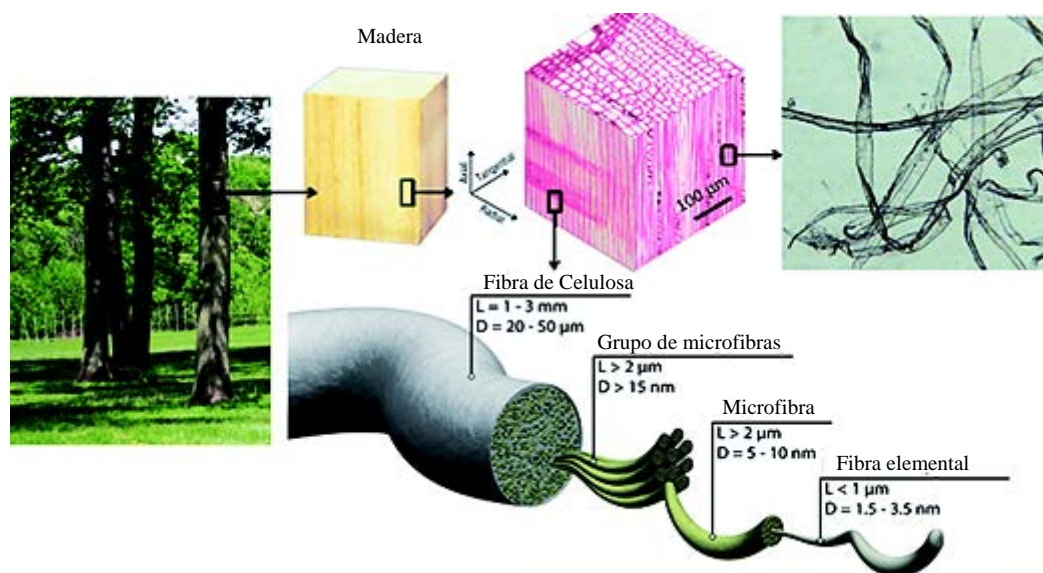


Figura 1.4. Esquema de la estructura jerárquica de fibras de madera. Imagen modificada de Zhu *et al.* 2014.

La biosíntesis de los polisacáridos de la pared celular se realiza mediante vías distintas para los componentes de la matriz (hemicelulosas) y para la celulosa. La celulosa se sintetiza por un complejo proteico de membrana llamado celulosa sintasa (CESA, *cellulose synthase*). Está formada por seis polipéptidos, que interactúan para formar un hexámero o una subunidad roseta, que a su vez se asocia con cinco subunidades más para formar la roseta. Cada roseta contiene por lo tanto seis subunidades formadas a su vez por seis proteínas CESA dando un total de 36 proteínas por roseta. La organización de las subunidades hexáméricas de la roseta no se encuentra bien entendida, ya que al parecer sus proteínas constituyentes, codificadas por tres genes distintos, están en forma dimérica. Cada proteína CESA sintetiza una cadena de β -glucano y probablemente los complejos de membrana contienen proteínas adicionales que ayudan a la organización jerárquica de las cadenas de celulosa para la formación de las microfibrillas. La actividad polimerizadora del complejo CESA da lugar a cadenas de glucosa, que a medida que se polimerizan interaccionan por puentes de hidrógeno con las cadenas paralelas para formar

una microfibrilla de celulosa primaria (Figura 1.5) (Delmer & Amor 1995; Cosgrove 1997; Doblin *et al.* 2002). El complejo enzimático de las proteínas CESA tienen un par de “dedos de zinc” en el amino terminal mediante los cuales forman las estructuras ordenadas de la planta (Kimura *et al.* 1999; Somerville 2006; Lerouxel *et al.* 2006). En la formación de las paredes primaria y secundaria están implicados genes CESA distintos, precisándose al menos 3 productos génicos CESA para un complejo celulosa sintasa activo.

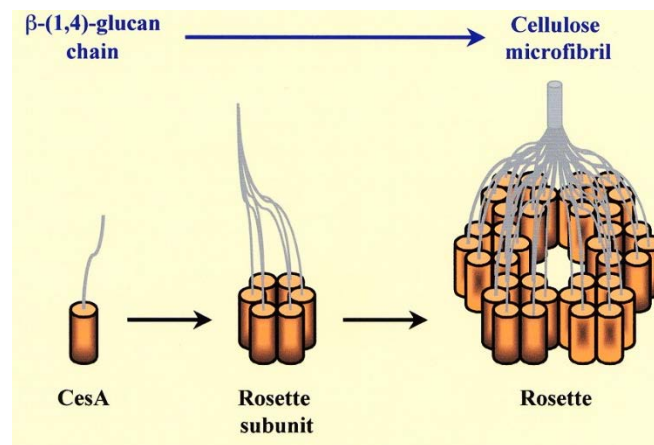


Figura 1.5. Modelo de la estructura de la roseta. Imagen modificada de Doblin *et al.* 2002.

1.1.1.1. Aplicaciones de la celulosa

La celulosa es probablemente el compuesto orgánico con usos más versátiles y frecuentes. Se usa en diversidad de industrias como las de madera, papel, fibras y ropa, alimentos veterinarios, cosmética y farmacéutica entre otras.

El principal consumidor mundial de celulosa es la industria de papel. Ello determina, que la demanda de celulosa a nivel mundial crece según la demanda de papel. En este contexto la producción mundial de papel fue de 400 millones de toneladas en 2013 y sigue incrementando proporcionalmente. Las fibras de celulosa que se utilizan en la fabricación de papel pueden ser fibra virgen o recuperada. Entre las fibras más usadas la madera figura como la materia prima básica de la industria papelera.

La demanda de madera y productos forestales seguirá creciendo a medida que crece la población y los ingresos mundiales (Tabla 1.1). Las proyecciones más recientes

realizadas por la FAO estiman que para 2030, el consumo global de madera aumentará un 60% respecto a los niveles actuales hasta alcanzar aproximadamente los 2.400 millones de m³. Existiendo la posibilidad de que se produzcan aumentos importantes en el consumo de productos de papel y cartón (FAO 2015).

Tabla 1.1 Consumo Anual de Madera.

<i>Material</i>	<i>Producto</i>	<i>Toneladas por año</i>
<i>Madera</i>	Energía	1,05 x 10 ⁹
	Celulosa y papel	0,95 x 10 ⁹

Datos publicados por Pauly & Keegstra 2008.

La celulosa tiene alto potencial de funcionalización debido a la presencia de 3 grupos hidroxilo libres en cada residuo de glucosa. Esto permite el enlace químico de diferentes reactivos dando lugar a derivados de celulosa. No obstante la estructura cristalina y la red de puentes de hidrógeno existentes en la macromolécula hacen necesarios tratamientos previos para desensamblar su estructura y hacer disponibles los grupos OH, es decir para aumentar la reactividad y accesibilidad de la celulosa (Klemm *et al.* 2005). Uno de estos procesos, el proceso viscosa, consiste en disolver la celulosa en medio básico con CS₂ para después regenerarla en medio ácido en forma de fibras de aplicación textil (Rayón), membranas de aplicación como envolturas de alimentos (celofán) y esponjas.

Muchos derivados de celulosa se utilizan ampliamente en la industria farmacéutica y cosmética. Entre ellos los éteres y ésteres de celulosa son los dos principales derivados, con diferentes propiedades fisicoquímicas y mecánicas (Kothari *et al.* 2002), que se utilizan generalmente en la formulación de productos de farmacéuticos y sanitarios. Estos compuestos juegan un papel importante como sistemas de administración osmótica, bioadhesivos y mucoadhesivos, potenciadores de compresibilidad en tabletas, agentes espesantes en dosificaciones líquidas, aglutinantes y agentes gelificantes en muchos productos farmacéuticos (Kangarlou *et al.* 2008). Entre los ésteres de celulosa son destacables el acetato de celulosa y el nitrato de celulosa, ampliamente utilizados para la fabricación de membranas de filtración y en las técnicas

de separación, donde se cubre todos el espectro de filtración, incluyendo ultrafiltración y ósmosis inversa (Klemm *et al.* 2005).

Varias formas de derivados de celulosa son reconocidas generalmente como sustancias seguras para la alimentación (GRAS) según la FDA. Muchas de ellas son ampliamente utilizadas en la industria de alimentos, por ejemplo: la carboximetilcelulosa (CMC) que se utiliza como espesante en productos derivados lácticos y como estabilizantes de una amplia gama de alimentos, ya que es resistente a medios ácidos y no cambia sus propiedades después de los procesos térmicos, como por ejemplo la deshidratación de sopas (Arancibia *et al.* 2015).

Actualmente, la búsqueda de alternativas para la obtención de etanol como combustible, se centra en la aplicación de la celulosa como fuente de glucosa en la fermentación alcohólica para obtención de biocombustibles de segunda generación (Eijsink *et al.* 2008; Horn *et al.* 2012; Beeson *et al.* 2015).

1.1.2. Hemicelulosa

La hemicelulosa es el segundo componente principal de la pared celular vegetal. Es un conjunto de polisacáridos más complejos que la celulosa, formado por monosacáridos enlazados en cadenas lineales con ramificaciones. Son químicamente heterogéneos constituidos por combinaciones de monosacáridos diferentes de cinco (xilosa, arabinosa) o seis carbonos (glucosa, manosa, galactosa). Esta mezcla compleja de polisacáridos puede constituir entre el 25 y 30% del peso total de la biomasa vegetal. Las cadenas individuales de las hemicelulosas son más cortas que las de celulosa y normalmente están formadas entre 100 y 200 residuos (Collins *et al.* 2005). Estos polisacáridos forman varias estructuras poliméricas que están asociadas con la celulosa y actúan como matriz de soporte para las microfibrillas de celulosa en la pared celular vegetal (García-Hortal 1993). Entre los carbohidratos poliméricos que constituyen la hemicelulosa, se incluyen xilano, xiloglucano, manano, glucomanano, galactoglucomanano y calosa (Tabla 1.2) (Collins *et al.* 2005).

Tabla 1.2. Hemicelulosas de la pared celular vegetal.

<i>Hemicelulosas</i>	
<i>Xilanos</i>	Cadenas de xilosa β -(1,4) con cadenas laterales cortas de otros azúcares unidos al C2 o al C3 de los residuos de la cadena principal.
<i>Mananos</i>	Cadenas de manosa β -(1,4) que pueden contener ramificaciones de α -galactosa enlazada al C6 de los residuos de manosa.
<i>Glucomananos</i>	Cadenas de manosa β -(1,4) que contienen residuos de glucosa. La relación manosa: glucosa es de 3:1.
<i>Galactoglucomananos</i>	Como los glucomananos, pero con residuos de α -galactosa simples unidos al C6 de los residuos de manosa de la cadena principal.
<i>Xiloglucanos</i>	Cadenas de glucosa β -(1,4) con cadenas laterales cortas de α -xilosa unidas al C6 de los residuos de glucosa de la cadena principal.
<i>Calosa</i>	Polímero no ramificado de glucosa con enlaces β -(1,3).

1.1.2.1. Xilano

El xilano es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, que representa aproximadamente un tercio de todo el carbono orgánico renovable en la tierra (Prade 1996). Es un polímero lineal de residuos de xilosa unidos por enlaces β -(1,4). En la mayoría de xilanos, la cadena de xilosa contiene ramificaciones de ácido glucurónico (GlcA), ácido 4-O-metilglucurónico (Me-GlcA), arabinosa y grupos acetilo (Figura 1.6) (Coughlan & Hazlewood 1993; Rogowski *et al.* 2015). El xilano presenta diferente composición entre las distintas especies vegetales e incluso entre los tejidos en la misma planta (Rennie & Scheller 2014). El xilano en las fuentes vegetales se produce como un heteropolisacárido, y los términos glucuronoxilano y glucuronoarabinoxilano se usan comúnmente para describir al xilano de maderas duras y blandas respectivamente. El xilano de gramíneas se conoce como arabinoxilano, debido a su gran contenido en residuos arabinosa (Pastor *et al.* 2007).

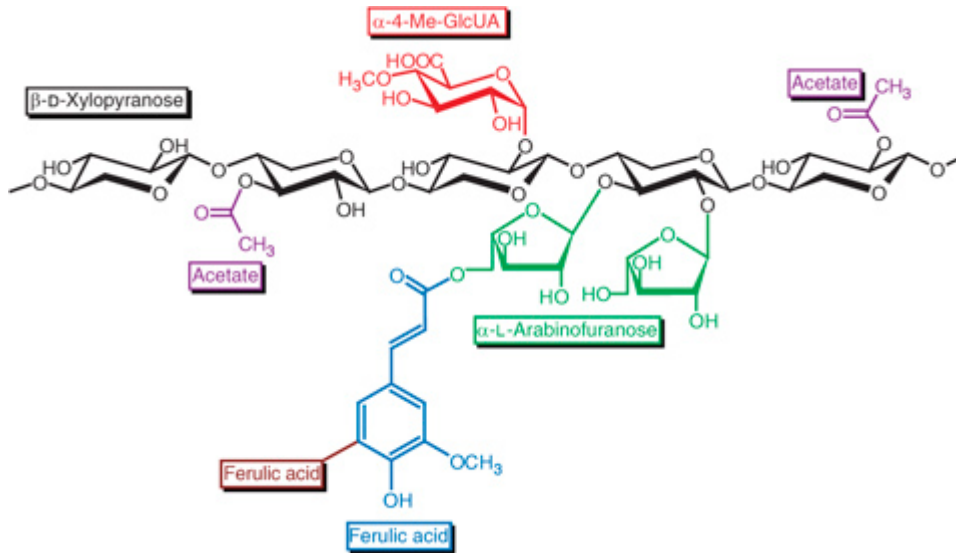


Figura 1.6. Esquema de la estructura del xilano. Imagen tomada de Dodd & Cann 2009.

1.1.2.2. β -1,3-1,4-glucanos

Los β -1,3-1,4-glucanos son carbohidratos complejos formados por unidades de glucosa unidas por enlaces β -1,3 y β -1,4. Son polímeros lineales de hasta 1200 residuos β -D-glucosa que muestran variación en la proporción enlaces glucosídicos β -1,3 y β -1,4 (25-30% β -1,3) (Planas 2000).

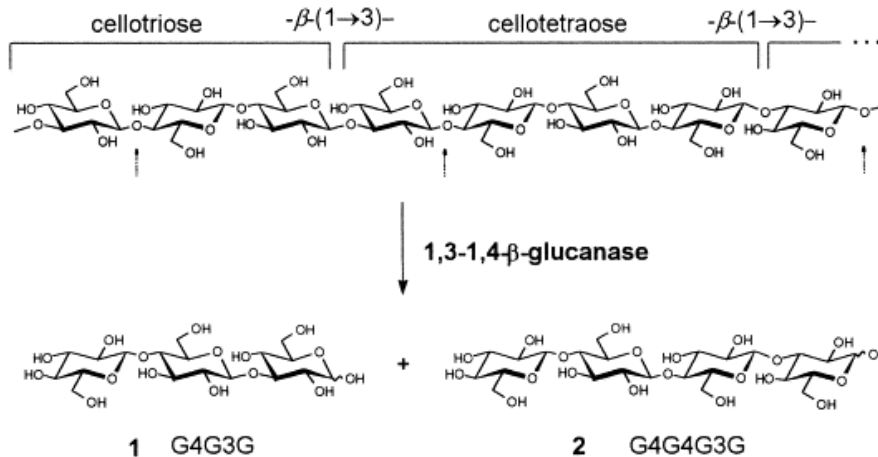


Figura 1.7. Estructura y despolimerización de β -glucanos mixtos. Imagen tomada de Planas 2000.

Se encuentran en la pared celular de la familia de las *Poaceae*, y están restringidos a los miembros de las gramíneas, siendo particularmente abundantes en la pared celular del endospermo de los cereales como el trigo, arroz, cebada, zahína, avena y centeno. A

pesar de que este β -glucano solo constituye una pequeña porción del total de polisacáridos de la cebada, representa aproximadamente un 75% del total de polisacáridos en la pared celular del endospermo. Aproximadamente el 90% de estos β -glucanos de cebada consisten en residuos celotriosa y celotetraosa unidos por enlaces β -1,3 (Figura 1.7) (Planas 2000).

1.1.3. Lignina

La lignina es el polímero aromático más abundante de la naturaleza. Se encuentra en la mayoría de las plantas vasculares donde constituye aproximadamente entre el 15 y 40 % de la pared (Ragauskas *et al.* 2014). Las ligninas son heteropolímeros aromáticos derivados de tres monómeros, los alcoholes *p*-cumarílico (4-hidroxicinamílico), coniferílico (4-hidroxi-3-metoxicinamílico) y sinapílico (4-hidroxi-3,5-dimetoxicinamílico), que se enlazan por polimerización oxidativa, dando lugar a una red tridimensional con diferentes tipos de enlaces (Figura 1.8). Este polímero es depositado principalmente en la pared celular secundaria y mantiene unidas las fibras celulósicas. Confiere rigidez a la planta e impermeabilidad a los materiales lignificados, es muy resistente a la biodegradación, protegiendo a la pared del ataque microbiano (Vanholme *et al.* 2010).

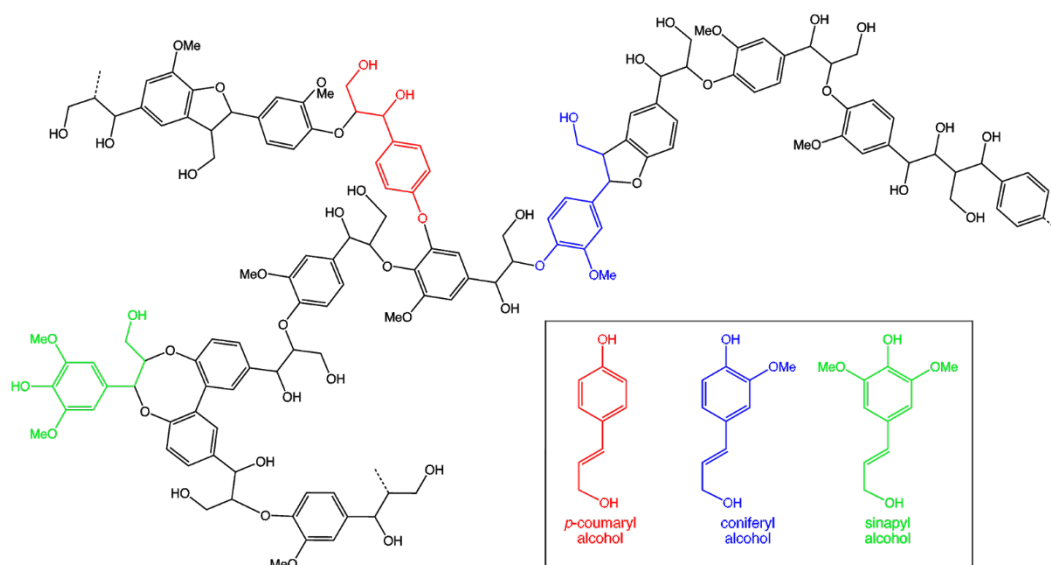


Figura 1.8. Estructura y composición de la lignina. Imagen modificada de Boerjan *et al.* 2003.

1.2. Degradación de la lignocelulosa

La biodegradación de residuos vegetales ricos en lignocelulosa es un proceso indispensable para el ciclo del carbono en la naturaleza. La biomasa lignocelulósica es un sustrato complejo y su degradación no depende solamente de la capacidad degradadora de la población microbiana sino también de las condiciones medioambientales. En la velocidad y grado de degradación de la lignocelulosa son factores determinantes la variedad y cantidad de enzimas de la carga microbiana del ambiente y la actuación sinérgica entre las mismas (Van Dyk & Pletschke 2012). Las enzimas degradadoras del material lignocelulósico tienen un amplio campo de aplicación incluyendo a industrias como la de biocombustibles, alimentación, detergencia y papelera (Gündüz Ergün & Çalık 2015). Además de las enzimas despolimerizantes de lignocelulosa, existen también enzimas implicadas en la modificación de la pared celular (expansinas), que facilitan su posterior degradación por enzimas despolimerizantes (French 2009).

Dado el gran interés industrial que genera el uso de celulosa como materia prima principal de amplios usos versátiles en la industria, los diferentes mecanismos químicos y biológicos para su despolimerización y modificación son ampliamente investigados en la actualidad.

1.2.1. Hidrólisis enzimática de la celulosa. Celulasas

La hidrólisis de la celulosa mediante el uso de enzimas es una de las principales etapas en la conversión de biomasa lignocelulósica. Las celulasas son un grupo muy diverso de enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos β -1,4, que mantienen unida la cadena de celulosa (Wilson 2011; Sandgren *et al.* 2013). Según su actividad pueden clasificarse en endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas. La degradación de la celulosa depende de la actividad individual de las mismas y de los efectos sinérgicos entre ellas (Maïté *et al.* 2015). En una reacción heterogénea, que en ocasiones tiene limitaciones importantes en cuanto al grado de conversión, son aspectos muy importantes la morfología del sustrato celulósico y la evolución del mismo durante la etapa de hidrólisis (Bansal *et al.* 2009). La actividad global de las enzimas se encuentra fuertemente ligada al aspecto morfológico de la matriz celulósica (Van Dyk & Pletschke 2012).

La mayoría de celulasas tienen una estructura modular que contiene varios dominios estructuralmente independientes: un módulo catalítico y varios dominios adicionales, siendo los más comunes los módulos de unión a carbohidratos (CBM's). Usualmente estos dominios están conectados mediante *linkers* cortos y flexibles. Los módulos catalíticos, son la parte de la celulasas donde se lleva a cabo la hidrólisis de las cadenas de celulosa, generalmente estos dominios son la parte más grande de las enzimas y varían de tamaño entre las diferentes celulasas. Los *linkers* son regiones de interconexión entre los dominios, su longitud varía desde al menos 20 a 40 aminoácidos y son ricos en serinas, treoninas y prolina. La función de los mismos, es mantener los dominios separados y la restricción del movimiento, de modo que los módulos catalíticos se encuentre siempre a distancias cortas del resto de los dominios (Harrison *et al.* 1998). Los módulos de unión a carbohidratos tiene como función la unión a la superficie de polisacáridos. Los más frecuentes los módulos de unión a celulosa (*Cellulose Binding Domain*, CBD), que sirven como un ancla para los módulos catalíticos, manteniéndolos fuertemente ligados a la superficie del polisacárido, reduciendo la necesidad de una unión fuerte del dominio catalítico y permitiendo que las enzimas tengan una mayor tasa de conversión (Wu *et al.* 2013). Los CBM's se clasifican en al menos 30 familias (Tomme *et al.* 1995). Otro tipo de módulos estructurales son los módulos de fibronectina tipo 3, que son comúnmente encontrados en las glicosil hidrolasas extracelulares bacterianas. La función de estos dominios no es clara, pero se ha sugerido que su presencia puede ser esencial para la hidrólisis de celulosa, mediante la modificación de la superficie (Kataeva *et al.* 2002).

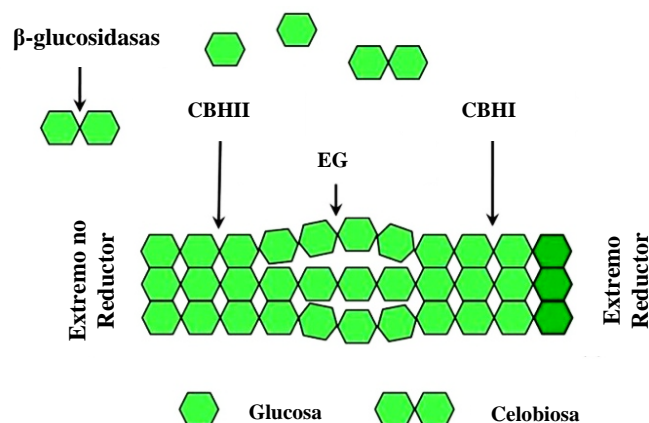


Figura 1.9. Hidrólisis enzimática de celulosa. Imagen modificada de Ratanakhanokchai *et al.* 2013.

En la base de datos CAZy se detallan por lo menos once familias de celulasas, que están clasificadas en base a la similitud de la secuencia de aminoácidos de su módulo catalítico (GH). Estudios estructurales de las diferentes familias muestran que las celulasas presentan ocho diferentes tipos de plegamientos proteicos y estructuras tridimensionales (Figura 1.10).

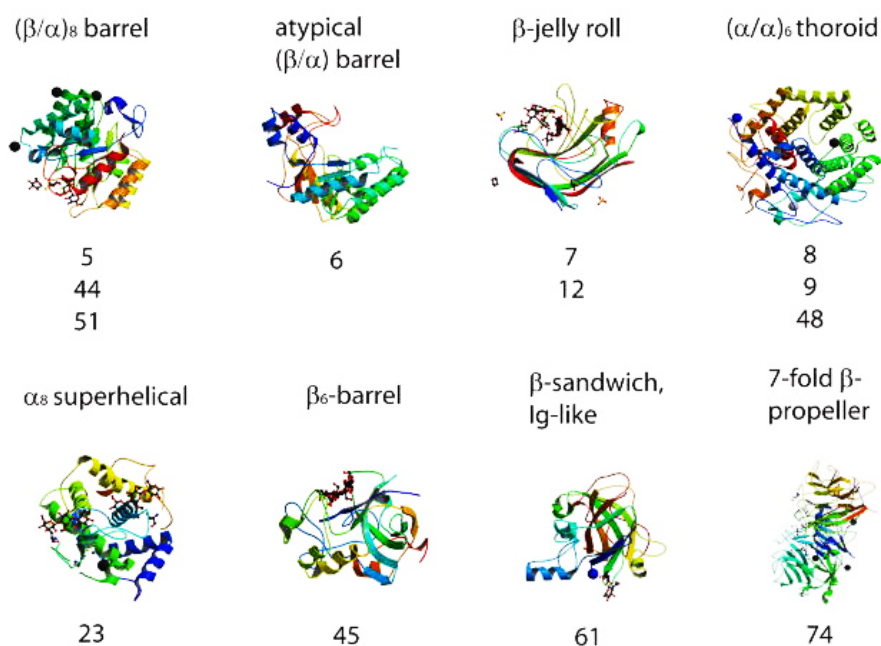


Figura 1.10. Conservación estructural y diversidad de celulasas. Debajo de cada tipo de plegamiento se indican las familias de glicosil hidrolasas correspondientes. Imagen tomada de Sukharnikov *et al.* 2011.

Todas las celulasas son glicosil hidrolasas, enzimas que hidrolizan el enlace glucosídico mediante un mecanismo de catálisis acido-base, bien con inversión o con retención de la configuración anomérica de la glucosa (Davies & Henrissat 1995). Existen dos tipos comunes de centro activo de las celulasas. Las celulasas con el centro activo abierto, que exhiben típicamente actividad endoglucanasa, que se unen en cualquier lugar a lo largo de la cadena de celulosa. Por el contrario las que exhiben un centro activo en forma de túnel tiene actividad exocelulasa, que se unen a los extremos de las cadenas de celulosa. Comúnmente las exocelulasas son enzimas procesivas, es decir que se mantienen unidas a la cadenas de celulosa actuando sobre ellas hasta que están completamente hidrolizadas, mientras que las endocelulasas pueden ser procesivas y no procesivas (Sukharnikov *et al.* 2011).

Las endoglucanasas (EGs) (EC 3.2.1.4) son enzimas que hidrolizan la celulosa amorfa. Rompen al azar enlaces internos de las cadenas de celulosa, produciendo oligosacáridos de diferentes tamaños con la consiguiente generación de nuevos extremos reductores y no reductores de las cadenas, que son susceptibles a la acción de las exoglucanasas (Quiroz-Castañeda & Folch-Mallof 2013). Las exoglucanasas o celobiohidrolasas (CBHs) (EC 3.2.1.91) son enzimas que actúan desde los extremos de las cadenas de celulosa liberando moléculas de celobiosa como producto principal. Las exoglucanasas representan entre el 40 al 70% del total del sistema celulítico de un organismo e hidrolizan celulosa cristalina (Teeri *et al.* 1998). Las exoglucanasas han demostrado especificidad en los extremos de la celulosa, dividiéndose en celobiohidrolasas que actúan en los extremos reductores de la cadena de celulosa (CBH I) y las que actúan sobre los extremos no reductores CBH II (Figura 1.9) (Koivula *et al.* 1998).

Las β -D-glucosidasas hidrolizan celobiosa y celodextrinas con un grado de polimerización máximo de 6, con el fin de producir glucosa (Figura 1.9) (Tomme *et al.* 1995). Las β -glucosidasas facilitan la hidrólisis eficiente de la celulosa en condiciones específicas y evitan la inhibición de las exoglucanasas por celobiosa. Los aspectos importantes que hay que tomar en cuenta en la evaluación de las β -glucosidasas es su velocidad de hidrólisis, la inhibición por producto y la estabilidad térmica, ya que estos factores a menudo representan una restricción para el mantenimiento de altas tasas de conversión de la celulosa (Sørensen *et al.* 2013).

1.2.2. Modificación de la celulosa por expansión

Las expansinas son proteínas de la pared celular vegetal dependientes del pH necesarias para la extensión y la expansión de las células en varios procesos, entre ellos durante el crecimiento celular (Cosgrove 1997). Aunque su mecanismo de acción aún no es bien conocido, juegan un papel importante en la disociación del complejo de polisacáridos asociados en la pared celular, lo que promueve un deslizamiento entre estos polímeros y la eventual extensión de la pared (Cosgrove 2000; 2005).

Estas proteínas están codificadas por familias multigénicas ampliamente representadas en el reino vegetal desde briofitas a las angiospermas (McQueen-Mason & Cosgrove 1994). Las expansinas no tienen actividad hidrolítica y por lo que se cree que

su actividad se centra en la ruptura de enlaces de hidrógeno entre las fibras de celulosa o entre la celulosa y otros polisacáridos, utilizando un mecanismo diferente a las celulasas. Las expansinas presentan potencial para contribuir a la degradación de la celulosa por celulasas y por lo tanto para mejorar la eficiencia de los procesos de bioconversión de celulosa (McQueen-Mason & Cosgrove 1994; Li *et al.* 2003).

Inicialmente las expansinas fueron descritas en plantas. Años más tarde se descubrió una proteína en el sistema enzimático de *Trichoderma reesei* con una identidad de secuencia significativa con las expansinas vegetales. Esta proteína fúngica fue nombrada como swollenina (SWO1). La swollenina ha sido ensayada tanto en algodón como en papel de filtro, sustratos que se componen de celulosa relativamente pura. Al parecer la swollenina es capaz de romper los enlaces de hidrógeno de las fibras de algodón, sin la producción de azúcares reductores detectables, en concordancia con los resultados publicados de las expansinas vegetales, detectándose su capacidad de hinchar las fibras de algodón. El análisis estructural muestra que SWO1 es una proteína modular que contiene una secuencia de expansina en el C-terminal, un dominio de unión a carbohidratos de familia 1 (CBM1) en el extremo N-terminal, y un módulo de fibronectina tipo 3 (Fn3) entre ambos (Saloheimo *et al.* 2002).

El descubrimiento de SWO1 de *Trichoderma reesei* amplió la posibilidad de encontrar proteínas similares en otros microorganismos que colonizan la superficie de las plantas, como las bacterias. Por similitud a la β -expansina del maíz se descubrió en *Bacillus subtilis* 168 una enzima con estructura similar, que fue nombrada BsEXLX1 (Kerff *et al.* 2008). Posteriormente se han identificado varias otras expansinas bacterianas. El análisis evolutivo indicó que estas expansinas se originaron por transferencia horizontal de genes de plantas. El análisis cristalográfico de BsEXLX1 muestra que, similarmente a la β -expansina del maíz, está formada por dos dominios: un dominio D1 con un plegamiento similar a las glicosil hidrolasas de familia 45 pero sin los residuos catalíticos en el N-terminal, y un dominio D2 (módulo de unión a carbohidratos de familia 63, CBM63) con un plegamiento β -sándwich que contiene tres residuos aromáticos que unen β -1,4-glucanos a través de interacciones hidrofóbicas (Figura 1.11). Las expansinas bacterianas han generado gran interés recientemente, debido a su uso potencial en la conversión de biomasa celulósica para la producción de biocombustibles, ya que podrían desagregar las estructuras celulósicas por medios no líticos conocidos como amorfogénesis (Georgelis *et al.* 2015).

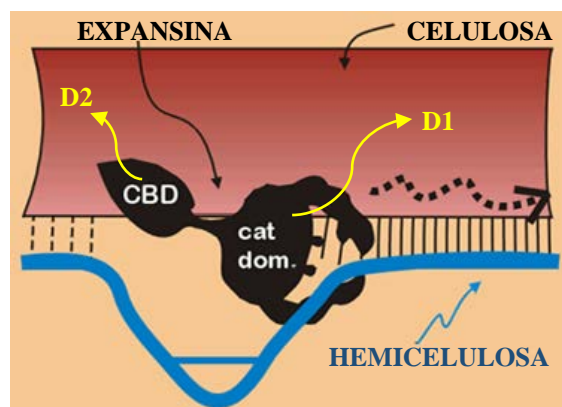


Figura 1.11. Modelo de acción de las expansinas. Imagen modificada de Cosgrove 2015.

1.2.3. Oxidación enzimática de la celulosa por monooxigenasas líticas de polisacáridos

La conversión enzimática de polisacáridos provenientes de la biomasa vegetal actualmente se ha transformado en un reto, ya que se ha convertido en un tema clave para el desarrollo industrial. En campos como los combustibles de segunda generación (bioetanol), la modificación de los soportes celulósicos en la industria papelera y la obtención nuevos materiales, tiene gran interés la identificación y conocimiento de las enzimas necesarias para la modificación y/o despolimerización de la celulosa. La eficiencia en la despolimerización de la celulosa depende de la capacidad de las enzimas para hidrolizar las zonas cristalinas, que permitan el acceso a las cadenas individuales del polímero (Eijsink *et al.* 2008). Recientemente se han descubierto enzimas oxidativas que desafían el modelo clásico de la degradación de polisacáridos mediante la vía hidrolítica (Hemsworth *et al.* 2013). Estas enzimas, denominadas monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMO's) catalizan la despolimerización oxidativa de polisacáridos insolubles recalcitrantes. Constituyen un factor significativo en la eficiencia en la despolimerización enzimática de biomasa lignocelulósica por hidrolasas (Forsberg *et al.* 2011). La actividad LPMO sobre diferentes sustratos de celulosa ha sido demostrada por la liberación de oligosacáridos oxidados a partir de estos polímeros (Eibinger *et al.* 2014). Estas enzimas previamente consideradas como glicosil hidrolasas de la familia 61 (GH61), enzimas fúngicas, o dominios de unión a carbohidratos de la familia 33 (CBM33), enzimas bacterianas, se han reclasificado como actividades auxiliares AA9 y AA10 respectivamente (CAZy; Isaksen *et al.* 2014).

Las AA9 y AA10 presentan un mecanismo de ruptura del enlace glucosídico que supone la oxidación mediante la inserción de un oxígeno en 2 posiciones alternativas. La oxidación del C1 del sustrato produce la liberación de una lactona, seguido de la apertura del anillo formando ácido aldónico, mientras que la oxidación en el C4 y libera un azúcar 4-keto en el extremo no reductor (Figura 1.12) (Kim *et al.* 2014).

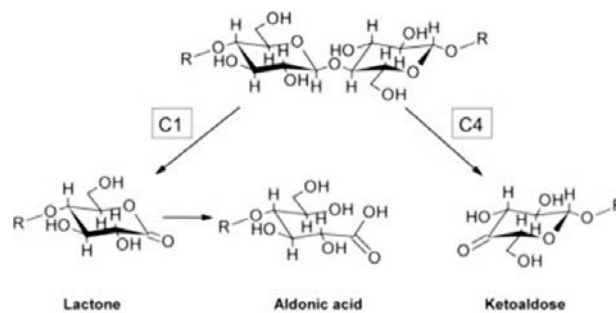


Figura 1.12. Productos oxidados liberados por las LPMO's. Imagen tomada de Dimarogona *et al.* 2012.

Las monooxigenasas líticas de polisacáridos han surgido como un nuevo paradigma de la degradación de la biomasa lignocelulósica, ya que mejoran la actividad de los cocteles enzimáticos para la despolimerización de la celulosa, con la consiguiente disminución de la carga enzimática y reducción de costos de la etapa de sacarificación en la producción de etanol de segunda generación (Vaaje-Kolstad *et al.* 2010; Corrêa *et al.* 2015). La inclusión de la nueva familia de actividades auxiliares (AA11), amplía potencialmente la gama de sustratos a despolimerizar (Figura 1.13) (Hemsworth *et al.* 2014).

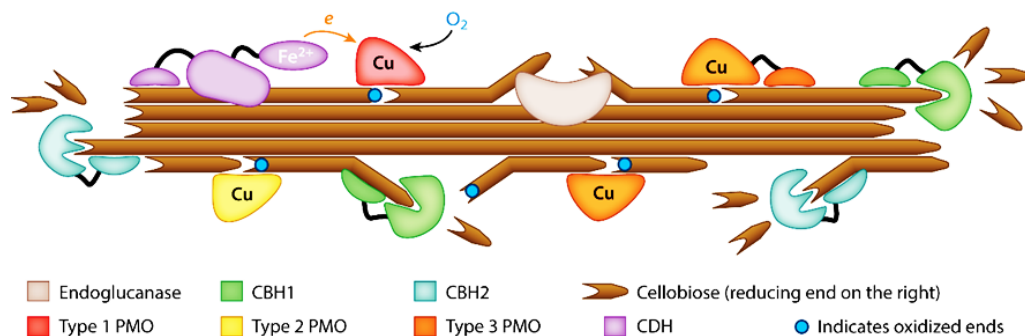


Figura 1.13. Hidrólisis Oxidativa Directa de Celulosa. Mecanismo propuesto de acción de LPMOs (PMO), PMO tipo 1 (AA9), PMO tipo 2 (AA10), PMO tipo 3 (AA11), CDH (celobiosa deshidrogenasa).

Imagen tomada de Beeson *et al.* 2015.

1.2.4. Despolimerización de la hemicelulosa

La despolimerización de las hemicelulosas se produce por la acción de endo-enzimas que hidrolizan internamente la cadena principal, exo-enzimas que liberan azúcares desde los extremos de las cadenas y enzimas auxiliares que hidrolizan las cadenas laterales de los polímeros u oligosacáridos producidos por los enzimas anteriores. Existen varias tipos de estas enzimas, que son específicos de las hemicelulosas sobre las que actúan.

1.2.4.1. Xilanasas

Las xilanasas son enzimas hidrolíticas que despolimerizan el xilano. Existen diversas formas de estas enzimas, que presentan mecanismo de acción, especificidad de sustrato, características físico-químicas y diferentes plegamientos (Collins *et al.* 2005; Pollet *et al.* 2010). La degradación completa del xilano depende de la cooperación de toda una batería enzimática. Entre este complejo grupo de enzimas destacamos las β -1,4-endoxilanasas (EC 3.2.1.8), que hidrolizan los enlaces β -1,4 que unen las xilosas del esqueleto de xilano de manera aleatoria, produciendo xilooligosacáridos de tamaños variables, y las β -xilosidasas (EC 3.2.1.37), que hidrolizan los xilooligosacáridos formados por las endoxilanasas. Las cadenas laterales presentes en el xilano se hidrolizan por la acción de α -L-arabinofuranosidasas, α -glucuronidasas, acetilxilano esterasas y feruloil esterasas (Figura 1.14). Recientemente se ha descrito un nuevo tipo de enzimas, las glucuronoil esterasas, que hidrolizan enlaces éster de las ramificaciones de ácido glucurónico con alcoholes aromáticos de la lignina, enlaces recientemente propuestos que unirían covalentemente el xilano y la lignina (Spániková & Biely 2006; Topakas *et al.* 2010).

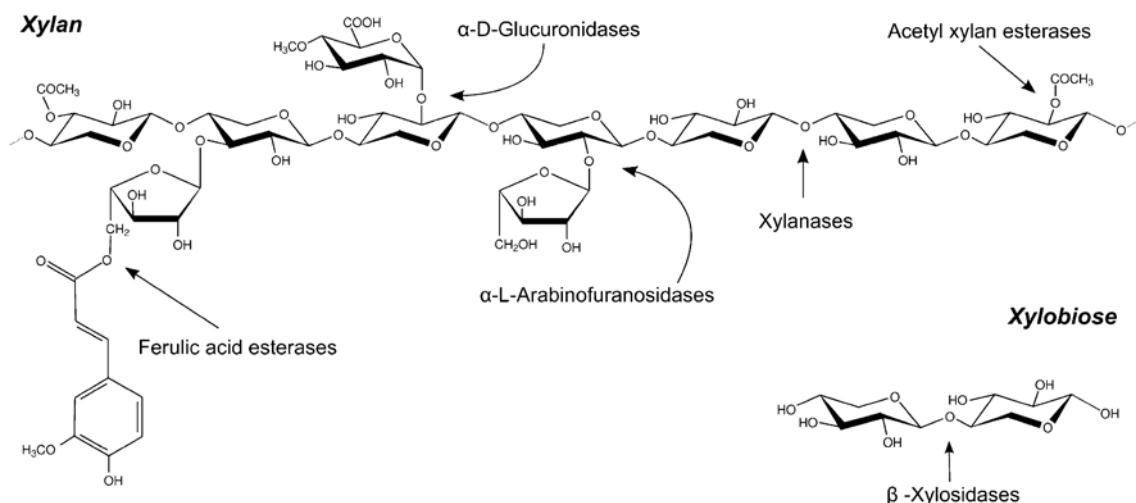


Figura 1.14. Enzimas xilanólíticas implicadas en la hidrólisis de xilano. Imagen tomada de Pastor *et al.* 2007.

1.2.4.2. β -1,3-1,4-glucanasas o liquenasas

La despolimerización de los β -1,3-1,4-glucanos (glucanos mixtos) está catalizada por tres tipos de glicosil hidrolasas que difieren en la especificidad de sustrato: endoglucanasas (EC 3.2.1.4), que hidrolizan enlaces β -1,4; laminarinasas (EC 3.2.1.39), que hidrolizan enlaces β -1,3; y liquenasas (EC 3.2.1.73) también denominadas endo- β -1,3-1,4-glucanasas, que son las más activas sobre los glucanos mixtos. Las liquenasas hidrolizan los enlaces glucosídicos β -1,4 adyacentes a los enlaces β -1,3 de glucanos mixtos como el glucano de cebada o el liquenano, pero no presentan actividad sobre los enlaces glucosídicos de β -1,4-glucanos como la celulosa o la carboximetilcelulosa (Planas 2000; Gaiser *et al.* 2006). Los principales productos de hidrólisis de los β -glucanos mixtos son trisacáridos (3-O- β -celobiosil-D-glucopiranosas) y tetrasacáridos (3-O- β -celotriosil-D-glucopiranosas) que contienen simultáneamente ambos enlaces β -1,3 y β -1,4 (Figura 1.7) (Gaiser *et al.* 2006).

Estos polímeros causan problemas de producción en la industria cervecera, ya que la cantidad y el tamaño de los β -glucanos de la malta afectan a la viscosidad del mosto y la cerveza, dificultando los procesos de filtración de cerveza con tierra de diatomeas o membranas. Los β -glucanos de la cebada están relacionados también con la turbidez de la cerveza. El conocimiento de los mecanismos de la degradación de los β -glucanos y la agregación de estos polímeros ayudan al cervecero a adoptar medidas preventivas y correctivas para minimizar las dificultades en el proceso relacionadas con los β -glucanos.

1.2.5. Despolimerización de la lignina

La lignina es altamente resistente a la degradación química y biológica debido a su complejidad estructural, alto peso molecular e insolubilidad. Los hongos de podredumbre blanca (*white rot fungi*) son los microorganismos más eficientes en la degradación de lignina, siendo la especie *Phanerochaete chrysosporium* una de las más utilizadas para la biodegradación de lignina. La despolimerización de la lignina está catalizada por enzimas inespecíficas extracelulares con alto poder oxidativo que forman productos altamente oxidados e inestables que mediante diferentes reacciones catalizan la degradación de la lignina. Entre estas enzimas se encuentran las lacasas y las peroxidasas. Las lacasas necesitan oxígeno para su actividad mientras que las peroxidasas requieren agua oxigenada. Existen varios tipos de peroxidasas, lignina peroxidasa, manganeso peroxidasas y peroxidasas versátiles (Pérez *et al.* 2002; Martínez *et al.* 2005; Furukawa *et al.* 2014).

1.3. *Paenibacillus barcinonensis*

Paenibacillus barcinonensis es una nueva especie bacteriana aislada por el grupo de investigación con anterioridad a partir de suelos de arrozales del delta del Ebro (Figura 1.15) (Blanco & Pastor 1993; Sánchez *et al.* 2005). Este es un lugar rico en material vegetal en descomposición y por lo tanto adecuado para aislar microorganismos degradadores de polisacáridos. La cepa fue seleccionada por su elevada actividad xilanolítica y celulolítica, y, en general, por la diversidad de enzimas degradadores de carbohidratos que produce.

Paenibacillus barcinonensis es un bacilo gram positivo endoesporulado que crece en un amplio margen de condiciones ambientales. Posee un sistema multienzimático para la degradación del xilano y de celulosa del que hasta la fecha se han identificado, clonado y caracterizado multitud de enzimas. Muchas de ellas han sido evaluadas biotecnológicamente con excelentes resultados. Entre las xilanasas de la cepa destaca Xyn10A por su efectividad en el bioblanqueo de la pasta de eucalipto (Blanco *et al.* 1995) y Xyn30D por su contribución a la eliminación de ácidos hexenurónicos de las pastas (Valenzuela *et al.* 2014a). En cuanto a enzimas degradadores de celulosa, hasta la fecha se han caracterizado varias enzimas, las endoglucanasas Cel5A y Cel9B, y la celobiohidrolasa Cel48C. La celulasa Cel9B ha sido ensayada en biotecnología papelera

mostrando ser altamente eficiente en el proceso refinado de pastas de papel de eucalipto y lino (García *et al.* 2002; Garcia-Ubasart *et al.* 2013). La acción de la enzima equivale a un biorefino, modifica la superficie de las fibras y determina un notable aumento de las propiedades de resistencia del papel. Es destacable que mediante ingeniería proteica se ha conseguido una nueva celulasa derivada de la celulasa original, que muestra una efectividad muy superior en el biorefinado de las pastas (Chiriac *et al.* 2010; Cadena *et al.* 2010).

Los exitosos resultados que presentan las celulasas a nivel industrial en numerosos procesos, junto a sus prometedoras aplicaciones, que están siendo ampliamente desarrolladas, determinan el interés de incrementar el conocimiento de estas enzimas en función de obtener mejores biocatalizadores. Los buenos resultados obtenidos con las enzimas de *Paenibacillus barcinonensis* estimulan el escrutinio de nuevas celulasas para mejorar los procesos industriales de transformación de la biomasa y los productos basados en celulosa.

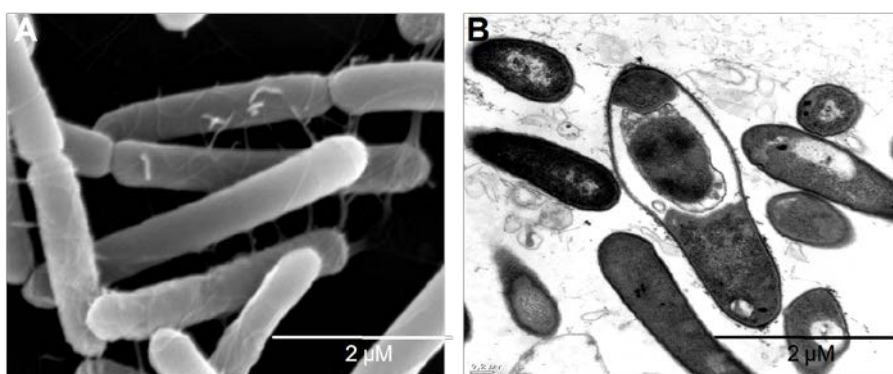


Figura 1.15. Observación microscópica de células de *Paenibacillus barcinonensis*. Imagen obtenida mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) (A). Imagen obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) de una célula endosporulada (B). Imagen tomada de Sánchez *et al.* 2005.

1.4. Fabricación de papel

De una manera muy simplificada y coloquial, se podría decir que el papel se define como un material en forma de lámina constituido por fibras celulósicas que establecen enlaces entre ellas. En la formación del papel, las fibras deben desarrollar uniones que

permitan la obtención de papeles con determinada calidad (García-Hortal 1993; Cadena 2009).

La pasta de papel es el producto resultante de la individualización de las fibras de celulosa a partir de la madera y otros materiales fibrosos. Es un producto intermedio dentro del proceso global de transformación de las materias primas en papel. La pasta de papel se obtiene por el proceso de pasteado, que consiste en la separación de las fibras de celulosa que se encuentran cementadas por la lignina y el xilano. Las propiedades del papel obtenido dependerán de la fuente de fibras de celulosa, del proceso de pasteado que haya sido utilizado y de los tratamientos al que se haya sometido la pasta de papel. En la fabricación de pasta de papel se utilizan diferentes materiales lignocelulósicos de distintas fuentes forestales y agrícolas. La madera actualmente es el recurso más utilizado en la industria papelera. Es un recurso renovable compuesto por celulosa (45%), hemicelulosa (30%) y lignina (25%). Tiene menos de 5 % de sustancias como terpenos, resinas y ácidos grasos. En los países industrializados las plantas herbáceas son destinadas frecuentemente para la producción de papeles especiales. Por otro lado, para cubrir la demanda mundial de papel, en las últimas décadas está incrementando el uso de papel reciclado como fuente de celulosa.

El proceso de fabricación de pasta de papel es conocido como pasteado o cocción. La cocción kraft se realiza en condiciones alcalinas, utilizando sulfuro sódico e hidróxido de sodio. Este tipo de cocción es el más extendido a nivel mundial (más del 50% del total de la pasta) ya que permite obtener pastas con gran resistencia. Al degradar un gran porcentaje de lignina, las pastas kraft presentan unas cantidades de residuales de lignina y grupos cromóforos que se pueden eliminar en el proceso de blanqueo. Este proceso es empleado para la eliminación de la lignina residual y sus productos de degradación con el fin de incrementar la blancura y obtener de papeles de calidad de impresión y escritura (Fengel & Wegener 1984). En los procesos químicos de obtención de pastas (cocción y blanqueo) es de gran interés preservar la resistencia de las fibras, con el fin de evitar la formación de puntos débiles en el papel. Las mejores condiciones para la posterior fabricación del papel se obtienen cuando se elimina la lignina y se retienen importantes cantidades de hemicelulosas. Para potenciar la capacidad de enlace interfibrilar y optimizar su contribución a las propiedades fisicomecánicas de resistencia del papel se introduce la etapa de refinado (Torres *et al.* 2004). El refinado es la operación en la preparación de la pasta por la cual, mediante la acción de un trabajo mecánico en

presencia de agua, modifica la morfología de las fibras y su estructura físico-química. A partir de aquí se realizará la formación de la hoja, es decir, se tratará de transformar un caudal de esa pasta diluida en una lámina delgada, ancha y uniforme, con todos los componentes perfectamente distribuidos. Esta lámina constituye lo que más tarde será la hoja de papel. La formación de la hoja es el proceso por el cual las fibras se entrelazan unas con otras mediante la formación de enlaces no covalentes que determinarán la resistencia mecánica del papel. Estos enlaces se forman principalmente durante el secado, que reduce la humedad del papel hasta un 5%, y su formación depende del grado de fibrilación y modificación superficial de las fibras.

1.4.1. Fibras procedentes de plantas herbáceas

Los cultivos de plantas no madereras constituyen una alternativa al uso de materiales forestales para diferentes usos industriales. La importancia de las fibras de estas plantas radica en que son de fácil disponibilidad, que constituyen una fuente abundante de fibras de bajo costo y que contribuyen a la disminución de la tala masiva e indiscriminada de árboles. En algunos países industrializados estas fibras constituyen la fuente principal o en ocasiones única fuente aprovechable para la fabricación de papel. Estas fibras juegan un papel importante en la industria de pasta y papel a nivel mundial, debido a que dependiendo de la fuente de la fibra se pueden producir cualquier tipo de papel sin la necesidad de añadir madera a la pasta obtenida.

Entre las principales fuentes de fibras celulósicas no madereras usadas en la industria papelera se encuentran la morera de papel, la mitsumata (Avataneo & Sablier 2016) y plantas dicotiledóneas como el lino, cáñamo, yute, abacá y sisal.

El lino es una angiosperma perteneciente a la familia de las plantas dicotiledóneas. De todas las especies de lino únicamente el *Linum usitatissimum* es cultivada por razones comerciales, tanto por las semillas como por las fibras. Las semillas de lino tienen un valor alto comercial, ya que producen un aceite secante utilizado como componente de las tintas grasas, pintura y en la fabricación de derivados de linóleo. Las fibras de lino son utilizadas en la industria textil y también en la papelera. Las fibras de lino, en concreto las liberianas, tienen paredes gruesas y lumen muy estrecho, y son extremadamente largas. La relación longitud/diámetro de las mismas, 1300:1, es de entre las más altas de todas las fibras utilizadas en la industria papelera, siendo superada únicamente por las

fibras del algodón (García-Hortal 1993). Estas características hacen al lino una materia prima de óptima calidad para la fabricación de diferentes tipos especiales de papel, como papel filtro, papel moneda y papel con marcas de seguridad (Smeder & Liljedahl 1996).

1.4.2. Proceso de refinado

El proceso de refinado consiste en un tratamiento mecánico por medio de un dispositivo que aplica compresión y fuerzas de cizallamiento, para obtener fibras capaces de interactuar entre ellas para formar una red (Figura 1.16). El proceso de refinado provoca el desarrollo de las fibras, lo que consiste en causar fibrilación, una modificación de la superficie de las fibras tanto externa como interna, y aumentar la flexibilidad de las fibras para mejorar sus propiedades de enlace (Torres *et al.* 2012). En esta operación la pasta adquiere propiedades específicas según el tipo de papel: papel para impresión, embalaje, vegetal. etc. Durante el proceso de refinado las paredes primarias y secundarias de la fibra se rompen y se eliminan parcialmente. Se produce un fenómeno llamado *peeling*, que es la exposición de pared celular secundaria de celulosa, lo que hace posible la penetración de agua en el interior de la fibra y su hinchamiento. Los principales efectos del proceso de refinado en las fibras son fibrilación interna y externa, formación de finos, corte de longitud de fibra (Figura 1.17) (Gil *et al.* 2009; Torraspapel 2009). El refinado incrementa el área superficial de las fibras y por lo tanto permite aumentar los enlaces, o uniones, fibra a fibra que dan lugar a que la mayoría de las propiedades de resistencia del papel aumenten, ya que dependen de estas uniones. El refinado también aumenta la flexibilidad y la densidad del papel (Biermann 1996a).

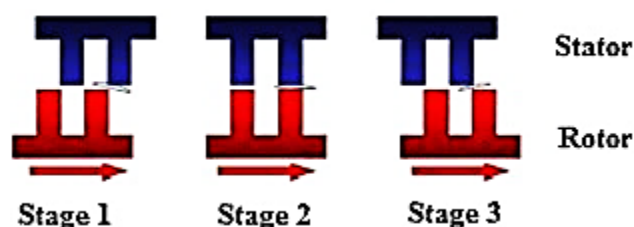


Figura 1.16. Proceso de refinado. Toma de fibra y primer impacto (**Stage 1**). Compresión entre cuchillas (**Stage 2**). Expulsión de fibras (**Stage 3**). Imagen tomada de Gharekhani *et al.* 2015.

Durante el refinado, las fibras se ven obligadas a pasar entre un rotor y un estator, en un molino PFI, o entre discos que giran en sentido contrario, si se utiliza un refinador de disco. Las fuerzas de compresión y de cizallamiento a que son sometidas las fibras deslaminan gradualmente y fibrilan la pared celular de la fibra (Hubbe *et al.* 2007).

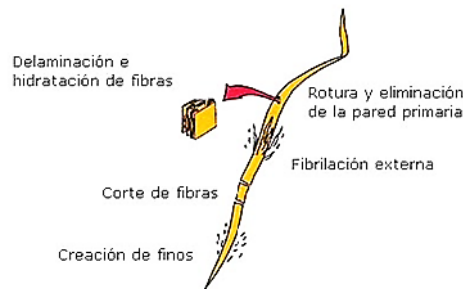


Figura 1.17. Efectos del Proceso de Refino en las fibras de celulosa. Imagen tomada de Cadena 2009.

La intensidad del proceso de refinado dependerá de las propiedades deseadas en el papel. Este proceso que representa el 15-18% de la energía eléctrica total requerida en la producción de papel (Lecourt *et al.* 2010). Por ello, un tratamiento anterior en la pasta de papel que promueva un menor consumo de energía durante el proceso de refinado, afectaría positivamente el consumo energético global de la industria papelera (Pang *et al.* 2013). La introducción de un pretratamiento (hidrólisis enzimática) a nivel industrial con un coctel de celulasas y hemicelulasas puede permitir reducciones en el requerimiento de energía de 25kWh/tonelada de pasta (Gil *et al.* 2009).

1.5. Aplicación industrial de las celulasas

Debido a la capacidad de estas enzimas de degradar o modificar la celulosa, las celulasas tienen un amplio rango de aplicaciones. Son actualmente unas de las enzimas industriales más utilizadas, debido a su uso en el procesamiento de algodón, como enzimas en detergentes, en la extracción de zumos y como aditivos de alimentos para animales. Las celulasas tienen también creciente aplicación en las industrias de combustibles, farmacéutica y papelera (Bhat & Bhat 1997; Sharma *et al.* 2016).

En la industria alimentaria se utilizan las celulasas en procesos como en la extracción de zumos de fruta y aceite de las semillas y la clarificación de zumos de frutas.

Se usan también en la eliminación de la capa externa de la soja para la producción de alimentos fermentados como salsa de soja y miso, en el aislamiento de proteínas de soja y coco, y para el aislamiento del almidón de maíz y patata. Para la gelatinización de algas con el fin de aumentar su digestibilidad y para la extracción de agar de algas marinas también presentan aplicación. Las celulasas también se utilizan para mejorar la calidad nutritiva de los alimentos fermentados, mejora de la rehidratación de legumbres secas y mezclas de sopa, la producción de celooligosacáridos, glucosa y otros azúcares solubles a partir de residuos celulósicos (Bhat & Bhat 1997).

En las industrias cerveceras y vinícola. Las celulasas y las liquenasas se utilizan para hidrolizar β -1,3-1,4-glucanos, que se encuentran en el endospermo de la cebada y mejorar la filtración de la cerveza, disminuir su turbidez, y para aumentar el aroma de los vinos (Bhat 2000).

En la industria de la alimentación animal. Las celulasas juegan un papel crucial en el incremento de la tasas de digestión de la fibra, ya que mejoran el tratamiento de ensilaje para mejorar la digestibilidad de los rumiantes (Sharma *et al.* 2016).

En la industria textil de algodón, las celulasas se utilizan en el proceso de biolavado de las prendas vaqueras para eliminar el exceso de tinte (azul de índigo) y dar a las prendas suavidad y aspecto gastado, permitiendo la eliminación parcial o total del uso de piedra pómez. También en el proceso de biopulido, que mediante la hidrólisis controlada de las microfibrillas de la superficie de las telas, mejorar el aspecto, color y brillo de las prendas de algodón (Bhat & Bhat 1997).

En la industria de los biocombustibles, las celulasas se utilizan en la bioconversión de residuos agroindustriales, y en general de la biomasa, en bioetanol. Los biocombustibles proporcionan una alternativa a los combustibles fósiles ya que además de usar materias primas renovables no contribuyen al incremento del dióxido de carbono atmosférico. La utilización de la biomasa celulolítica es una alternativa al uso de azúcar y maíz, al no competir con alimentos para la nutrición humana. Por ejemplo, la conversión de la paja de arroz en etanol es un reto muy atractivo, dado que este residuo agrícola representa el 50% de la biomasa agraria mundial. La producción de combustibles de segunda generación (que no compiten con alimentos) supone la conversión efectiva de compuestos lignocelulósicos recalcitrantes en azúcares fermentables, que necesita varios pasos secuenciales: reducción del tamaño de la materia prima, pretratamiento para la

eliminación de la lignina, hidrólisis enzimática de la celulosa con enzimas microbianas y fermentación de los azúcares a etanol por microorganismos fermentadores (Dodd & Cann 2009; Wilson 2009; Sharma *et al.* 2016). Para una eficiente hidrólisis de la celulosa para la producción de bioetanol se requieren celulasas robustas y de elevada actividad. La búsqueda de nuevas celulasas con características superiores a las de las celulasas actuales, así como la de otras enzimas que contribuyan y mejoren la sacarificación de la biomasa por celulasas, es uno de los principales retos de investigación en este campo.

En la industria papelera el uso de las celulasas va en aumento por su potencial para disminuir los costos de producción y para lograr un impacto medioambiental reducido. En procesos papeleros específicos las celulasas pueden contribuir a reducir la utilización de productos químicos y de energía. Las celulasas tienen aplicación en el reciclado del papel para el destintado de las fibras (*deinking*). El principal beneficio del biodestintado, es la disminución del uso de álcali requerido, la reducción de la contaminación ambiental y la mejora de las propiedades ópticas y resistencia de las fibras (Bajpai 2010).

Uno de los aspectos de mayor interés tecnológico en la industria papelera es la disminución del consumo energético, donde el proceso de refinado es el principal consumidor. La aplicación de enzimas que modifiquen la superficie de las fibras puede potenciar los mecanismos de cohesión interfibra e incrementar las propiedades mecánicas del papel. En este contexto, el uso de celulasas previamente al refinado mecánico puede facilitar dicho proceso y por tanto disminuir el gasto energético del mismo (Gil *et al.* 2009). La evaluación de enzimas comerciales y de desarrollo como coadyuvantes del refinado ha originado resultados muy dispares. La aplicación de endoglucanasas puede deteriorar las propiedades mecánicas del papel, mientras que las celobiohidrolasas no suelen producir efectos significativos (Pere *et al.* 1995). Otras investigaciones describen que la celobiohidrolasa CBHI de *Trichoderma reesei* como etapa previa al refinado, da lugar a un ahorro de energía de hasta el 40% con mejoras de la resistencia mecánica, mientras que el tratamiento con la endoglucanasa EGI de *Trichoderma reesei* disminuye ligeramente el consumo de energía, pero afecta las propiedades mecánicas del papel (Bhat 2000; Bajpai 2010). En este contexto es de gran interés la identificación de nuevas enzimas que produzcan la fibrilación externa e interna de las fibras sin dañarlas. Los estudios de aplicación de la celulasa Cel9B de *Paenibacillus barcinonensis* previamente al refinado muestran un incremento notable en las propiedades mecánicas del papel

eucalipto y lino (índice de tracción y estallido) (García *et al.* 2002; Cadena *et al.* 2010; Garcia-Ubasart *et al.* 2013). Los resultados obtenidos con Cel9B, muestran que la enzima facilita el proceso de refinado permitiendo ahorros importantes de energía, además de mejorar notablemente las propiedades mecánicas del papel.

Las celulasas han demostrado su potencial de biorefinado, este efecto depende del tipo de enzima, sustrato, condiciones y tiempo de aplicación. La dosificación de las celulasas es muy importante, ya que si la dosis es muy elevada, las propiedades mecánicas del papel pueden verse afectadas drásticamente. Es por ello de importancia tecnológica la identificación y desarrollo de celulasas monocomponente que modifiquen las fibras celulósicas y aporten propiedades únicas a los productos obtenidos, disminuyendo el consumo de energía y el impacto medioambiental de la industria papelera.

2. OBJETIVOS

2. Objetivos e interés del trabajo realizado

El trabajo realizado forma parte de las tareas de investigación del grupo de enzimas microbianas de la UB, dedicado a la identificación y el estudio de enzimas con capacidad de despolimerizar polímeros de la pared celular vegetal o de modificar su estructura, y su posterior evaluación biotecnológica para la valorización de la biomasa.

El grupo dispone de una amplia colección propia de microorganismos seleccionados por su elevada actividad degradadora de celulosa y polímeros vegetales. De entre ellos, *Paenibacillus barcinonensis* BP-23 ha sido y es objeto de estudios detallados por la amplia variedad de enzimas despolimerizadoras de polisacáridos que secreta, muchas de las cuales han sido evaluadas en biotecnología papelera con excelentes resultados. Entre estas enzimas destaca la celulasa Cel9B por haber mostrado ser altamente eficiente como potenciador del refinado de las pastas de papel de eucalipto y lino. Esta aplicación tiene gran interés biotecnológico por su potencial para disminuir los costes energéticos del proceso de refinado mecánico de las pastas papeleras.

El trabajo de la presente Tesis Doctoral se enmarca en dos proyectos consecutivos financiados, dedicados a la identificación y desarrollo de enzimas para la mejora biotecnológica de las fibras de celulosa y la biomodificación del papel con el fin de obtener productos de valor añadido. En este contexto, los buenos resultados obtenidos con la celulasa Cel9B y la elevada actividad degradadora de polisacáridos de *P. barcinonensis* BP-23 estimularon la búsqueda exhaustiva en la cepa de nuevas enzimas con actividad hidrolítica sobre celulosa y en general sobre β -glucanos. Al mismo tiempo, y dado el potencial de nuevos tipos de enzimas con actividad sobre celulosa recientemente descubiertos, se amplió el estudio a enzimas con actividad despolimerizante no hidrolítica, como monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMO's) y a enzimas modificadoras sin actividad despolimerizante (expansinas). Con el fin de ampliar el abanico de nuevas enzimas, se procedió también al escrutinio de las mismas en otros microorganismos, tales como *Paenibacillus illinoisensis* C37, aislado por el grupo a partir de suelos subtropicales de Brasil, y cepas de colecciones de cultivo.

El trabajo se ha centrado en la identificación y caracterización de enzimas con capacidad de hidrólisis, oxidación o modificación de la celulosa, y en su posterior aplicación en fibras celulósicas para evaluar su efecto en la mejora de las mismas, y en la

facilitación del refinado de la pasta de papel. Concretamente, los objetivos del presente trabajo han sido:

1. Clonación y caracterización de la β -1,3-1,4-glucanasa Lic16A de *Paenibacillus barcinonensis* BP-23.
2. Secuenciación y ensamblaje del genoma de *Paenibacillus barcinonensis* BP-23, con el fin de identificar nuevas enzimas degradadoras o modificadores de celulosa.
3. Clonación y caracterización de la celulasa Cel6D de *Paenibacillus barcinonensis* BP-23.
4. Identificación y caracterización de enzimas con actividad sobre celulosa distinta a la hidrolítica.
5. Evaluación de las enzimas caracterizadas en la modificación de fibras papeleras y en el proceso de refinado de pastas de lino

3. MATERIALES Y METODOS

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Microorganismos utilizados

Las enzimas objetos de estudio del presente trabajo son: la celulasa Cel6D y la liquenasa Lic16A, que provienen del *Paenibacillus barcinonensis* (Blanco *et al.* 1993; Sánchez *et al.* 2005), es una especie aislada a partir de suelo de arrozal del delta del Ebro, mediante cultivos enriquecidos con paja de arroz. La especie presenta elevada actividad degradadora de xilano, celulosa y carbohidratos combinados. La celulasa Cel6D ha sido descubierta en el ensamblaje de la secuenciación del genoma del *Paenibacillus barcinonensis*, se realizó la clonación de la misma directamente en pET28a para obtener sobreexpresión de la misma. La liquenasa Lic16A fue descubierta previamente con el método de *Genome Walking* en estudios anteriores realizados por el grupo de investigación.

La enzima CBP3 es una potencial monooxigenasa lítica de polisacáridos, identificada en la cepa *Paenibacillus illinoisensis* C37, es una cepa aisladas de suelos semiáridos de São João do Cariri, Paraíba, ubicado en el Noreste de Brasil. Esta enzima fue descubierta por la amplificación de oligonucleótidos degenerados diseñados a partir de secuencias de proteínas que presentan actividad oxidativa. Con el fin de obtener la secuencia entera de la enzima, se utilizó la técnica del *Genome Walking*, y una vez obtenida la secuencia completa, se realizó la clonación en el plásmido de expresión pET28a.

Los microorganismos huéspedes utilizados en los experimentos de clonación se muestran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Cepas de *Escherichia coli* y *Bacillus* utilizadas.

Cepa	Genotipo	Referencia
DH5 α	F ⁻ ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> (r κ ⁻ , <i>mκ⁺</i>) <i>phoA</i> <i>supE44</i> λ - <i>thi</i> - 1 <i>gyrA96</i> <i>relA1</i>	(Hanahan, 1983)

<i>Cepa</i>	<i>Genotipo</i>	<i>Referencia</i>
<i>BL21(DE3)</i>	F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal λ</i> (DE3)	<i>Invitrogen</i>
<i>BLR(DE3)</i>	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> _B (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) Δ(<i>srl-recA</i>)306::Tn10 (Tet ^R)	<i>Novagen</i>
<i>Bacillus megaterium</i>	Defined deletion mutant of wild type strain DSM319: Δ <i>nprM</i> , Δ <i>xylA</i>	<i>Mobitec</i>

3.2. Medios de cultivo y mantenimiento de microorganismos

El cultivo, aislamiento y selección de las diferentes cepas bacterianas de *Paenibacillus* y clones recombinantes, se utilizó el medio de cultivo LB (Luria Broth) (Sambrook & Russel 1989). La composición del medio es 10 g/L de bacto triptona, 5 g/L de extracto de levadura y 5 g/L de NaCl y los medios sólidos contenían agar 1.5%. Todos los medios de cultivo y soluciones fueron preparados con agua destilada. El material de vidrio y plástico se esterilizaban con calor húmedo y presión en autoclave a 121°C y 1 atmósfera de presión durante 20 min.

Para la cepa de huésped *Bacillus megaterium* se utilizaron diferentes medios y soluciones (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Medios y soluciones para *Bacillus megaterium*.

<i>Medios</i>	<i>Reactivos</i>	<i>Esterilización</i>
<i>Penassay Broth IX</i> (11)	1,5 g Extracto de levadura 1,5 g Extracto de carne 5 g Peptona 1 g Dextrosa 3,5 g NaCl 3,68 g K ₂ HPO ₄ 1,32g KH ₂ PO ₄ Agua destilada hasta 1l	Autoclavar 20 min.

<i>Medios</i>	<i>Reactivos</i>	<i>Esterilización</i>
<i>Penassay Broth 4X</i> (250 ml)	1,5 g Extracto de levadura	Autoclavar 20 min
	1,5 g Extracto de carne	
	5 g Peptona	
	1 g Dextrosa	
	3,5g NaCl	
	3,68 g K ₂ HPO ₄	
	1,32 g KH ₂ PO ₄	
<i>SMM 2X</i> (250 ml)	Agua destilada hasta 250 ml	Filtración
	1,16g Ácido málico (40 mM)	
	800 mg NaOH (80mM)	
	2,03 g MgCl ₂ (40mM)	
	85,58 g Sacarosa (1M)	
<i>SMMP</i>	Agua destilada hasta 250 ml	Preparación al momento del uso
	2X Penassay Broth 2X SMM (1:1)	
<i>PEG-P</i> (50 ml)	20 g PEG-6000	Autoclave 10 min
	1X SMM	
<i>12% Prolina</i> (25 ml)	3 g L-prolina	Filtración
	25 ml Agua	
<i>20% Glucosa</i> (25 ml)	5 g glucosa	Autoclave o filtración
	25 ml Agua	
<i>CR5-top-agar Solución A</i> (250 ml)	51,5 g sacarosa	Filtración
	3,25 gr MOPS	
	300 mg NaOH	
	Ajustar a pH7,3 con NaOH	
	Agua hasta 250 ml	
<i>CR5-top-agar Solución B</i> (142,5 ml)	2g agar	Autoclave 15 min
	100 mg casaminoácidos	
	5 g extracto de levadura	
	Agua hasta 142,5 ml	

<i>Medios</i>	<i>Reactivos</i>	<i>Esterilización</i>
<i>CR5-top-agar</i> 8x CR5-salt (625 ml)	1,25 g K ₂ SO ₄ 50 g MgCl ₂ x 6 H ₂ O 250 mg KH ₂ PO ₄ 11 g CaCl ₂ Agua hasta 625 ml	Autoclave 15 min

Todas las cepas se conservaron viables mediante resiembras en placa, adicionalmente se conservaron a -80°C en glicerol al 20%. La cepas de *Paenibacillus barcinonensis* BP-23 y *Paenibacillus illinoisensis* C37 se conservaban a 4°C, con resiembras progresivas cada mes en placas de agar LB, que eran incubadas a 37°C durante 16h.

Las cepas de *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium* y los clones derivados se guardaron a 4°C, resemebrándolas 1 vez cada mes en placas de agar LB suplementados con los antibióticos correspondientes, eran incubadas a 37°C durante 16h. Generalmente, los cultivos en medio líquido de las cepas antes mencionadas se realizaba a 37°C con agitación a 180 rpm.

3.2.1. Inductores y antibióticos

La selección y/o mantenimiento de los clones recombinantes de *E. coli*, los medios de cultivo se suplementaron con diferentes antibióticos, preparados según las indicaciones de Sambrook & Russel 1989. Todos los antibióticos fueron esterilizados por filtración y guardados a -20°C.

Ampicilina (*Sigma-Aldrich*): se preparó la ampicilina a una concentración de 100 mg/ml en agua bidestilada, a la que se le añadió NaOH 10N hasta su completa disolución. La concentración final utilizada fue de 100 µg/ml.

Kanamicina (*Sigma-Aldrich*): se preparó la kanamicina a una concentración de 50 mg/ml en agua destilada. La concentración final utilizada fue de 50 µg/ml.

Tetraciclina (*Sigma-Aldrich*): se preparó la tetraciclina a una concentración de 50 mg/ml en etanol. La concentración final utilizada fue de 10 µg/ml.

IPTG (isopropil- β -tiogalactopiranosido, *Sigma-Aldrich*): se preparó el IPTG a una concentración de 1M en agua bidestilada. Se guardó a -20°C hasta su utilización. Para la inducción de la expresión génica se utilizó el IPTG a concentración final de 0,5mM.

Xilosa (*Sigma-Aldrich*): se preparó la xilosa a una concentración de 20% w/v en agua bidestilada. Se guardaba a 4°C. Para la inducción se utilizó la xilosa a concentración final de 0,5%.

3.3. Técnicas de análisis y manipulación de ácidos nucleicos

3.3.1. Extracción de ADN genómico

La extracción del ADN genómico de *Paenibacillus barcinonensis* y *Paenibacillus illinoisensis* C37, se realizó mediante el kit comercial *GeneJET Genomic ADN Purification kit* de *Thermo Scientific™*, para utilizar este kit se siguieron detalladamente las instrucciones de la casa comercial. Para comprobación de la pureza del cultivo utilizado en la extracción del ADN se realizaba la secuenciación del 16S. Se eliminó totalmente el RNA con *RNasa*.

3.3.2. Plásmidos utilizados

Los vectores utilizados en los experimentos de clonación y los plásmidos recombinantes construidos se muestran en la Tabla 3.3.

3.3.3. Oligonucleótidos utilizados

Los oligonucleótidos utilizados en los experimentos de clonación fueron sintetizados por *Sigma-Aldrich*. En la Tabla 3.4 y 3.6 se muestran los oligonucleótidos específicos para cada proteína (Lic16A, CBP3, BsEXLX1, Cel6D) y los oligonucleótidos utilizados para la identificación del CBP3 mediante el protocolo de *Genome Walking* (Tabla 3.5).

Tabla 3.3. Vectores de clonación, expresión y plásmidos recombinantes.

Plásmido	Característica	Referencia
<i>pET 101-TOPO</i>	Vector de expresión para <i>E. coli</i> (Amp ^r). Cola de histidinas	<i>Invitrogen</i>
<i>pET28a</i>	Vector de expresión para <i>E. coli</i> (Kan ^r). Cola de histidinas	Studiery Moffatt (1986), <i>Novagen</i>
<i>pMM1522</i>	Vector de expresión para <i>E. coli/Bacillus megaterium</i> (Amp ^r /Tet ^r)	<i>Mobitec</i>
<i>pET101-Lic16A</i>	Derivado de <i>pET101-TOPO</i> , contiene el gen <i>lic16A</i>	Presente investigación
<i>pET28aCel6D</i>	Derivado de <i>pET28a</i> , contiene el gen <i>cel6D</i>	Presente investigación
<i>pET28aCel6D-GH6Fn3Fn3</i>	Derivado de <i>pET28a</i> , contiene el dominio catalítico y Fn3 de <i>Cel6D</i>	Presente investigación
<i>pET28aCel6D-GH6</i>	Derivado de <i>pET28a</i> , contiene el dominio catalítico de <i>Cel6D</i>	Presente investigación
<i>pET28aCel6D-CBM3</i>	Derivado de <i>pET28a</i> , contiene el módulo <i>CBM3</i> de <i>Cel6D</i>	Presente investigación
<i>pMM1522Cel6D</i>	Derivado de <i>pMM1522</i> , contiene el gen <i>cel6D</i>	Presente investigación
<i>pET28aCBP3</i>	Derivado de <i>pET28a</i> , contiene el gen <i>cbp3</i> de <i>Paenibacillus illinoisensis C37</i>	Presente investigación
<i>pET101Expansina</i>	Derivado de <i>pET101-TOPO</i> , contiene el gen <i>expansina</i> de <i>Bacillus subtilis</i>	Padilla, 2013

Tabla 3.4. Oligonucleótidos específicos utilizados para la clonación de las enzimas.

Nombre	Diana	Secuencia de nucleótidos	Construcción
<i>Lic-fw</i>	-	5' <u>CACCATGATGAAGAGGAAAACAT</u> 3'	<i>pET101/Lic16A</i>
<i>Lic-bw</i>	-	5' <u>CTGGGTGAAATATACGAGCAAC</u> 3'	
<i>Cel6Bmfw</i>	<i>SacI</i>	5' <u>AAGAGCTCTCGAAAGGCAAGAAG</u> 3'	<i>pMM1522/Cel6D</i>
<i>Cel6Bmrv</i>	<i>KpnI</i>	5' <u>AGGTACCTGGCTCAATGCCCATAC</u> 3'	
<i>CBP3-fw</i>	<i>NcoI</i>	5' <u>AAACCATGGCAACTTATGTCTCGA</u> 3'	<i>pET28a/CBP3</i>
<i>CBP3-rv</i>	<i>HindIII</i>	5' <u>CGCAAGCTTTATGTTACCCGAGT</u> 3'	
<i>BsEXLX1fw</i>	-	5' <u>CACCATGAAAAGATCATGAGTG</u> 3'	<i>pET101/BsEXLX1</i>
<i>BsEXLX1rv</i>	-	5' <u>TTCAGGAAACTGAACATGGCCC</u> 3'	

Tabla 3.5. Oligonucleótidos utilizados en la técnica *Gene Walking*.

<i>Nombre</i>	<i>Secuencia de nucleótidos</i>
<i>CBP3Fw1</i>	5'CCTTTTGCTTCCACACTCTGTGGTTCATAT3'
<i>CBP3Rv1</i>	5'CATGCAAACAGGAAGCCAAACATTTACCTG3'
<i>CBP3Fw2</i>	5'ATGGACCTCCTATCGGAAAGTTTCCTTTTGCT3'
<i>CBP3Rv2</i>	5'AGAACGTTGGACGAAGCTGGACATGCAAACAG3'
<i>CBP3Fw3</i>	5'ATCGGAGCATTAGGGTTCCAGTCTTTCCTTGG3'
<i>CBP3Rv3</i>	5'ACTTACACTTCGTTGGCATCCTTCGACTGATA3'
<i>CBP3Fw4</i>	5'AGTCTTTCCTTGGTTATGTAATATTTCCACTC3'
<i>CBP3Fw4.1</i>	5'TACGTTCAATCGGAGCATTAGGGTTCCAGTC3'
<i>CBP3Rv4</i>	5'GCCGTCAAGCTCACACATCCATATATACTTGG3'
<i>CBP3Fw5</i>	5CCACACTCTGTGGTTCATATTGAACCTGACCG'3'
<i>CBP3Rv5</i>	5'CGCTATCGCTCCAGGGGCAATTATGACTGCGA3'

Tabla 3.6. Oligonucleótidos utilizados para las células truncadas derivadas de Cel6D

<i>Oligo</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Diana</i>	<i>Construcción</i>
<i>FwCel6</i>	CTTT <u>CCATGGT</u> TGCGTAAAGGTGTA	<i>NcoI</i>	wt, 1, 2
<i>FwCBM3</i>	AAGT <u>CCATGG</u> ACTTGGTACTGCAA	<i>NcoI</i>	3
<i>RvCel6</i>	GGCCG <u>CAAGCTT</u> TGGCTCAATGCCCA	<i>HindIII</i>	wt, 3
<i>RvGH6Fn3</i>	GGCCG <u>CAAGCTT</u> ACTTGTTCGGTACAAC	<i>HindIII</i>	1
<i>RvGH6</i>	GGCCG <u>CAAGCTT</u> CACCAGCTGTACAAA	<i>HindIII</i>	2

3.3.4. Amplificación de fragmentos de ADN por PCR

La síntesis de ADN *in vitro* se realizó por amplificación por PCR (Sambrook & Russel 1989), en un termociclador T100TM *Thermal Cycler* (*Bio-Rad*) con el uso de ADN polimerasas de alta fidelidad (*Pfu DNA Polymerase*, *Stratagene*, *Expand High Fidelity PCR System*, *Roche*, *Biotoools* y *Thermo ScientificTM* respectivamente). En los experimentos de comprobación/selección se utilizó la polimerasa Taq de *Thermus thermophilus* (*Biotoools*). Los dNTP's fueron adquiridos en *Thermo ScientificTM*. Las reacciones se realizaron en volúmenes de 25 o 50 μ L, según las especificaciones de las casas comerciales.

3.3.5. Método *QuikChange*®

El método *QuikChange*® permitió la generación de los mutantes de la celulasa Cel6D de *P. barcinonensis* de una manera fácil y rápida. Una adaptación del método *QuikChange*® fue usada para llevar a cabo la mutagénesis dirigida, para cambiar una base puntual, con el fin de modificar los aminoácidos de interés. Este método permite la mutación específica en cualquier plásmido de doble cadena, generando mutantes en cuatro pasos (Figura 3.1).

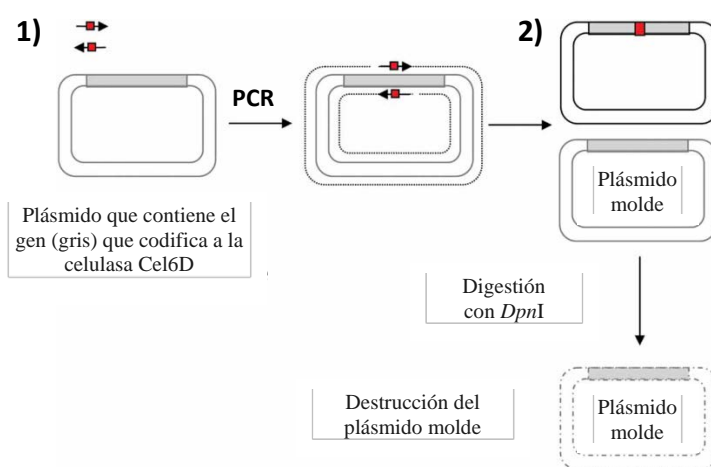


Figura 3.1. Esquema del método PCR *QuikChange*®. Diseño de oligonucleótidos que contengan la mutación (1), Gen mutando (2). Imagen modificada de Bassegoda Puigdomènech 2011.

El procedimiento básico del método PCR *QuikChange*®, es una reacción de PCR, que utilizó como molde un plásmido de doble hebra, en este caso este plásmido contenía el gen de *cel6d*, con dos oligonucleótidos que contenían la mutación deseada. Los oligonucleótidos (Tabla 3.7) fueron complementarios a la cadena opuesta del plásmido. La incorporación de los oligonucleótidos generó un par de plásmidos mutados que contenían las mutaciones de interés. Una vez terminada la PCR, el producto amplificado se digirió con *DpnI*, la misma que permite la eliminación del plásmido wt y el producto obtenido de esta digestión se transformó en células competentes de *E.coli* DH5 α .

Tabla 3.7. Oligonucleótidos utilizados en *QuikChange*®.

<i>Oligo</i>	<i>Secuencia</i>
<i>Cel6D-D97AFw</i>	ttgccgggcccgggCttgtcatgccctgcacctaacggggagctt
<i>Cel6D-D97ARv</i>	gagggcatgacaaGcccggcccggcaaattataataacaaa
<i>Cel6D-D146AFw</i>	attattgaaccggCcagtctgccgaatctggaacgaaccttagt
<i>Cel6D-D146ARw</i>	attcggcagactgGccggttaataatggcaatgatccgaatgtc

3.3.6. Análisis electroforético del ADN

Las muestras de ADN plasmídico y amplificaciones de ADN por PCR se analizaron en geles de agarosa al 0,8% (*Sigma-Aldrich*) en tampón TAE 1X y *GreenSafe Premium* de *NZYTech* (2µl por 50 ml de agarosa). A las muestras se les añadió tampón de carga 5X (Sambrook & Russel 1989), y se incluyó en la electroforesis un marcador de peso molecular *GeneRuler High Range DNA Ladder* de *Thermo Scientific*TM. Posteriormente se lleva a cabo la electroforesis en cubetas horizontales *Mini.Sub*®*Cell GT* (*Bio-Rad*), con un voltaje de 100 voltios mediante una fuente de alimentación de PAC300 (*Bio-Rad*).

3.3.7. Purificación de ADN de productos de PCR y extracción de ADN de geles de agarosa

La purificación de ADN proveniente de productos de PCR, se realizó mediante el kit comercial *GeneJET Extraction and DNA Cleanup Micro Kit* de *Thermo Scientific*TM, para utilizar este kit se siguieron detalladamente las instrucciones de la casa comercial. La purificación se realizaba a partir de productos de PCR puros. Cuando se obtenía en la amplificación más de dos bandas, se cortaba la banda de interés y se seguía el protocolo del kit para la extracción del ADN desde geles de agarosa.

3.3.8. Digestión del ADN con enzimas de restricción

La digestión del ADN se realizaba con enzimas de restricción *FastDigest* de *Thermo Scientific*TM. En este caso particular, no se siguieron las condiciones establecidas por la casa comercial. Se establecieron nuevas condiciones: 37°C durante 2h en agitación

de 200 rpm. La digestión se realizaba con el fin de aislar los fragmentos de ADN de interés para su posterior clonación. Adicionalmente estas digestiones se realizaban para la comprobación de las construcciones genéticas que tenían un patrón de restricción conocido.

3.3.9. Desfosforilación del ADN

Con el fin de evitar un religamiento de los vectores linealizados se realizaba un paso de desfosforilación con *FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase* de *Thermo Scientific™*, se siguieron detalladamente las instrucciones de la casa comercial.

3.3.10. Ligación de moléculas de ADN

Las ligaciones se realizaron utilizando *T4 DNA Ligase* de *Thermo Scientific™*. Las proporciones molares vector: inserto utilizadas en estas ligaciones fueron 1:3 y 1:5 para las clonaciones con extremos cohesivos. Generalmente se utilizaba 50 ng de vector por reacción. Las condiciones de ligación fueron 4°C durante 16-18h.

3.3.11. Extracción de ADN plasmídico

Para la extracción de ADN plasmídico se utilizó el kit comercial *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* de *Thermo Scientific™*, se siguieron detalladamente las instrucciones de la casa comercial.

3.3.12. Cuantificación de ácidos nucleicos por espectrofotometría

La concentración de las muestras de ADN se determinó midiendo la densidad óptica a 260 nm de longitud de onda (λ) mediante un espectrofotómetro NanoDrop® ND1000 (*NanoDrop Technologies, Inc.*). La lectura a 260 permitió calcular la concentración de ácidos nucleicos. A una densidad óptica de 280 nm de longitud de onda absorben las proteínas, por lo que la relación entre densidades ópticas a 260nm y 280nm (DO_{260n}/DO_{280}) nos proporcionaba una estimación de la pureza del ácido nucleico. Las muestras puras de ADN poseen valores aproximados de DO_{260n}/DO_{280} de alrededor de 1,8.

3.3.13. Técnica del *Gene Walking*

El *Gene Walking* es un método para obtener secuencias de ADN desconocidas adyacentes a una secuencia génica conocida (Siebert *et al*, 1995). En la investigación realizada se utilizó una variante de dicha técnica mediante el uso del *GenomeWalker™ Universal kit* de *Clontech*. El primer paso fue la digestión del ADN genómico de *Paenibacillus illinoisensis* C37 con unas enzimas de restricción que generaban extremos romos. Los resultados de las digestiones se ligaron al adaptador suministrado por el kit. A continuación se realizó la amplificación de ADN por PCR con un oligonucleótido específico para la secuencia conocida del gen y segundo oligonucleótido específico de la secuencia del adaptador (AP1). El resultado de la amplificación fue secuenciado, permitiendo de esta manera conocer un fragmento más de la secuencia del gen en estudio, que permitió el diseño de un nuevo oligonucleótido para una segunda reacción de amplificación, y de este modo, se determinó de forma progresiva la secuencia del gen completo, y su posterior ensamblaje mediante el programa *Vector NTI Advance®* de *Invitrogen*.

3.3.14. Secuenciación de ADN

La secuenciación de los fragmentos de ADN, se inició con una mezcla de 100ng por 500 pb de ADN y 3,2 picomoles del oligonucleótido, que eran desecados totalmente a 80°C durante 20 min. La secuencia de los fragmentos de ADN de interés eran analizados en los Servicios Técnicos-Científicos de la Universidad de Barcelona.

3.3.15. Análisis informático de secuencias

El análisis de homología de las secuencias de nucleótidos y la determinación de las secuencias aminoacídicas de las proteínas se realizaba con los siguientes programas *Blast* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y *ExPASy translate* (<http://web.expasy.org/translate/>) respectivamente.

Los alineamientos de dos o más secuencias se realizaron con el programa de alineamiento múltiple MEGA7. La modelización de las proteínas se realizó con mediante el uso de *Phyre²* (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>). El análisis de la estructura con *PyMOL Geowall 3D*.

Los parámetros físico-químicos de las proteínas deducidas fueron analizados el programa *ProtParm tool* (<http://web.expasy.org/protparam/>) (Kyte & Doolittle, 1982) y en la identificación de los posibles péptido señal de la secuencia de las proteínas se utilizó el programa *SignalP 4.1* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

3.4. Técnicas de transformación

3.4.1. Transformación de *Escherichia coli* por el método de CaCl₂

Las células competentes utilizadas para la transformación se obtuvieron por el método del CaCl₂ (Cohen *et al.* 1972). Este procedimiento se inició con cultivos nocturnos de *E. coli* (DH5 α , BL21 (DE3), BLR (DE3)) en 5ml de LB con el antibiótico correspondiente si era necesario, a partir de cultivos en fase exponencial temprana de crecimiento (DO₆₀₀ 0,3-0,5), se recogieron las células por centrifugación a 3900 g durante 3 min a 4°C, se resuspendieron en 1/10 del volumen inicial de CaCl₂ 50mM frío y se mantienen durante 2h en hielo (0°C). Transcurrido este tiempo se recogieron por centrifugación a 3900 g durante 3 min y se resuspendieron en 1/20 del volumen inicial de CaCl₂ 50mM con 15% de glicerol 50 mM frío y se mantuvieron en hielo 4h aproximadamente. Si la transformación no se llevaba a cabo el mismo día las células competentes se guardaban a -80°C en alícuotas de 100 μ l. Para la transformación de *E. coli* DH5 α y *E. coli* BL21 (DE3) utilizó el método del choque térmico. Para ello se utilizó una alícuota de células competentes, se añadió el ADN de interés y se mantienen durante 5 min en hielo. Transcurrido este tipo se realiza un choque térmico a 42°C durante 45 seg en un *Thermo-Shaker* TS-100C (*Biosan*) y rápidamente se transfirió los tubos al hielo. Se añadieron 250 μ l de LB y se incubó durante 1h a 37°C con agitación en *Thermo-Shaker* TS-100C (*Biosan*). Transcurrido este tiempo se sembró en placas de LB que contenían el antibiótico correspondiente para la selección del transformante, se incubaban las placas a 37°C durante toda la noche. En la transformación en una cepa de expresión (*E. coli* BL21 (DE3)), después de la incubación se inocula cultivos líquidos de 5ml de LB con el antibiótico correspondiente y se incubaban a 37°C toda la noche con agitación 180rpm.

3.4.2. Transformación de *Bacillus megaterium*

3.4.2.1. Obtención de protoplastos de *Bacillus megaterium*

Para la obtención de protoplastos se inició con un cultivo nocturno de *Bacillus megaterium* en 5 ml de Penassay Broth, se inoculó 650 μ l del cultivo nocturno en 65 ml de Penassay Broth, que fueron incubados a 37°C hasta una D.O₆₀₀ de 0,5-0,6. De este cultivo líquido se utilizaron 50 ml, se recogieron las células mediante centrifugación a 8000 rpm durante 10 min en una centrifuga *Beckman High-speed*, las células fueron resuspendidas en 5 ml SMMP con lisozima 20mg/ml (4,5 ml SMMP + 0,5 ml lisozima 20 mg/ml). Se mantuvieron las células a 37°C en agitación orbital suave hasta que al microscopio se observó la formación de protoplastos. Los protoplastos obtenidos fueron sometidos a un proceso de centrifugación a 2600g durante 15 min. Se eliminó el sobrenadante y fueron lavados con 5 ml de SMMP y centrifugados a 2600g durante 10 min. Se resuspendió suavemente el pellet de protoplastos en 5ml de SMMP con 20% de glicerol, se hicieron alícuotas de 500 μ l en tubos de 1,5 ml y fueron guardados a -80°C.

3.4.2.2. Transformación de protoplastos de *Bacillus megaterium*

La transformación se inició con la descongelación progresiva de una alícuota de protoplastos, se mezcló, 500 μ l de una suspensión de protoplastos con 3-5 μ g de ADN plasmídico en un tubo de 15 ml. Se añadió 1,5 ml de PEP-G, se mezcló y se incubó durante 2 min a temperatura ambiente, se adicionó SMMP y se mezcló girando cuidadosamente. Se recogieron las células por centrifugación a 1300 g durante 10 min a temperatura ambiente en una centrifuga de sobremesa *Beckman Allegra*, se removió el sobrenadante cuidadosamente y se adicionaron 500 μ l de SMMP, se incubó a 37°C durante 90 min con una agitación de 100 rpm. Se preparó una alícuota de CR5-top-agar en tubos estériles, donde se agregó a la mezcla anterior, después del periodo de incubación, se mezcló girando cuidadosamente, no debe aplicarse *vortex*. Esta mezcla se colocó en placas de LB con el antibiótico correspondiente, se incubó a 37°C durante 16h. El tamaño y el diámetro de las colonias varían, ya que el agar cubre el acceso del aire.

Para preparar una porción de 2,5 ml de CR5-top-agar se añadió:

- 1,25 ml de solución A
- 288 μ l de CR5-salts

- 125 µl de prolina al 12%
- 125 µl de glucosa 20%

Cabe destacar que 90 min antes de la transformación se hirvió la solución B, que fueron añadidos (713 µl) a la mezcla anterior y posteriormente se sembraron en placas de LB con tetraciclina previamente calentadas.

3.5. Fraccionamiento celular

3.5.1. Extracción de proteínas por french press

Para obtener los extractos celulares de las proteínas de interés, se partía de cultivos de 50ml de LB suplementados con el antibiótico correspondiente incubados a 37°C durante 16h con agitación de 180 rpm, con estos inóculos se escalaba a cultivos de 800ml de LB suplementados con el antibiótico correspondiente y se incubaba hasta fase exponencial (D.O₆₀₀ 0,6-0,8). Una vez se encontraban los cultivos en esta fase se realizó una inducción con IPTG a una concentración de 0,5mM e incubación posterior a 16°C durante 16h. El cultivo (500-800ml) se repartía en tubos *Beckman* de 500ml y se recogían las células por centrifugación a 8000 rpm durante 20 min a 5°C en una centrifuga *Beckman High-speed*. Se descartó el sobrenadante y se resuspendían las células en 20 ml de Tris 20mM pH7. Para obtener los extractos celulares se lisaban con presión mediante *french press* (*French Pressure Cell Press, SLM AMINCO*), que somete a las células a presión de 1000 psi, después de lisar se centrifugó a 8000 rpm a 4°C durante 20 min en la centrifuga *Beckman High-speed* con el fin de eliminar restos celulares, se alícuota la fracción soluble se guardaban a -20°C.

3.5.2. Sonicación

Esta técnica se aplicaba cuando los volúmenes no superaban los 10ml de cultivo inicial. El procedimiento es el mismo que se mencionó anteriormente hasta el momento de la inducción, se recogían las células por centrifugación a 14000rpm durante 1 min en una centrifuga de tubos de 1,5ml. Se descartaban los sobrenadantes y las células se resuspendían en 250 µl de Tris 20mM pH7. Para obtener los extractos celulares, se realizó tres ciclos de sonicación durante 1 min con pausas de 30 seg en un Sonicador Labsonic1510 (*B. Braun*). Después de la sonicación, se centrifugaban los extractos a

14000rpm por 5 min para eliminar los restos celulares. La fracción soluble fue guardada a -20°C para su posterior análisis.

3.6. Purificación de proteínas

3.6.1. Purificación de proteína por unión a Avicel

La celulasa Cel9B se purificó mediante ensayos de unión a Avicel, los extractos crudos se mezclaron con Avicel a una concentración final de 5% en tampón Tris 100mM pH7, se incubó a 4°C durante 1h con agitación orbital, después de la incubación se centrifugo a 14000 rpm durante 10 min. El pellet fue lavado sucesivamente con tampón Tris 50, 25 y 10 mM pH7. Con el fin de eliminar las proteínas no unidas (Tris 50mM) y las proteínas unidas inespecíficamente (Tris 25, 10 mM). La celulasa Cel9B unida al Avicel se eluyó mediante dos lavados de 30 min en 1 volumen de agua bidestilada con agitación orbital suave a 4°C. Después de cada uno de los lavados con agua se centrifugó y se guardaron los sobrenadantes a -20°C. Las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de acrilamida.

3.6.2. Cromatografía en columna de afinidad (AKTA FPLC)

Las cepas recombinantes correspondientes a la liquenasa Lic16A y celulasa Cel6D de *Paenibacillus barcinonensis*, la LPMO CBP3 de *Paenibacillus illinoisensis* C37 y la BsEXLX1 (expansina) de *Bacillus subtilis* 497, están fusionadas a una cola de histidina en el extremo C-terminal, fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad a columnas de níquel IMAC (*His-Trap columns, Amersham-Pharmacia*) en un equipo AKTA-FPLC. En la Tabla 3.8 se describen los tampones utilizados. Se inyectaban 2 ml de extracto celulares de las proteínas mencionadas anteriormente en el inyector del aparato, y con la columna equilibrada con 5 volúmenes de una mezcla de 40% la solución A y 60% de la solución B. Las proteínas retenidas se eluyeron de la columna con un gradiente lineal de la solución B. Las fracciones fueron analizadas por electroforesis en geles de acrilamida.

Tabla 3.8. Soluciones de purificación.

<i>Tampón</i>	<i>Composición</i>
<i>Solución A. Lavado</i>	20 mM tampón Na ₂ H ₂ PO ₄ pH 6,5
	500 mM NaCl
<i>Solución B. Elución*</i>	20 mM tampón Na ₂ H ₂ PO ₄ pH 6,5
	500 mM NaCl
	300 mM Imidazol 300

* Ajustar a pH 6,5.

3.7. Técnicas de análisis de proteínas

3.7.1. Cuantificación de la concentración de proteína

La concentración de las proteínas purificadas se determinó por el método de Bradford (1976) usando el reactivo *Quick Star™ Bradford 1x Dye Reagent (Bio-Rad)* y con una recta patrón, se realizó una serie de diluciones de suero de albumina bovina (BSA, *Sigma-Aldrich*) entre 0 a 2 mg/ml.

Adicionalmente se hacía una cuantificación de la concentración de proteína con el uso del NanoDrop® ND-1000 (*NanoDrop Technologies, Inc*), para ello se usaba datos específicos de las proteínas el peso molecular y coeficiente de extinción. Estos parámetros mencionados se determinaron en función de la secuencia de aminoácidos mediante *ProtParam (Expasy)*.

3.7.2. Electroforesis de proteínas en geles de acrilamida (SDS-PAGE)

El análisis de las diferentes muestras proteicas se realizó por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) (Laemmli 1970). De esta manera se pueden separar las proteínas según su peso molecular. Para ello se utilizó el aparato *Mini-Protean® Tetra System (Bio-Rad)*. Los geles utilizados constaban de dos fases: un gel de empaquetamiento con poliacrilamida al 5% y un gel separador de 12 o 15% de poliacrilamida (Tabla 3.9). La composición de los tampones utilizados para la preparación de los geles y para el tratamiento de la muestra se detalla en la Tabla 3.10. Previamente a la carga se añadió a las muestras tampón de carga y se sometió a una incubación a 100°C durante 10 min. Las electroforesis se llevaron a cabo a 75 voltios en

la fase del gel de empaquetamiento y a 200 voltios en el gel de separación mediante la fuente de alimentación PAC300 (*Bio-Rad*). Se incluyó el marcador de peso molecular *PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific™)*.

Tabla 3.9. Composición de los geles de acrilamida (SDS-PAGE).

	<i>Gel separador</i>	<i>Gel de empaquetamiento</i>
	15%	12%
<i>Solución acrilamida*</i>	3 ml	2,4 ml
<i>Tampón correspondiente</i>	1,56 ml	1,56 ml
<i>Agua destilada</i>	1,4 ml	2 ml
<i>Persulfato amónico al 10%</i>	30 µl	30 µl
<i>TEMED</i>	5 µl	5 µl

* 30% Acrylamide/Bis Solution, 37,5:1 (2,6% C) de Bio-Rad.

Tabla 3.10. Tampones de los geles de acrilamida (SDS-PAGE).

<i>Tampón</i>	<i>Composición</i>
<i>Separación</i>	1,5M Tris-HCl, pH8,8 0,4% SDS
<i>Empaquetamiento</i>	0,5M Tris-HCl, pH6,8 0,4% SDS
<i>Electroforesis 10X</i>	0,25M Tris-HCl, pH8,3 1,92M Glicina 1% SDS
<i>Carga 3X</i>	10% Glicerol 5% β-mercaptoetanol 2,3% SDS 62,5mM Tris-HCl, pH6,8 0,02% Azul de bromofenol

3.7.3. Tinción de proteínas con *BlueSafe*

Una vez se finalizada la electroforesis se realizó la tinción con *BlueSafe* (*NZYTech*), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Terminada la tinción los geles se sumergían en ácido acético al 10% y fueron revelados en Gel Doc™ XR (*Bio-Rad*).

3.7.4. Zimograma de actividad endoglucanasa y β -glucanasa

En este análisis los geles y las muestras fueron preparados como se detalló anteriormente, y se adicionaba en los geles separadores una solución de carboximetilcelulosa (CMC, *Sigma-Aldrich*) o β -glucano de cebada (*Sigma-Aldrich*) a una concentración final de 0,2%. Se desarrollaba la electroforesis de manera habitual y una vez concluida la electroforesis los geles fueron lavados con Tritón x-100 (*Sigma-Aldrich*) al 2,5% durante 30 min, con el fin de eliminar el SDS y renaturalizar las proteínas. A continuación se realizaron dos lavados de 30 min con tampón 50mM al pH adecuado de la proteína analizada. A continuación los geles se incubaron en el mismo tampón a 50°C durante 30 min. Una vez finalizada la incubación se tiñeron los geles con Rojo Congo al 1% durante 15 min y se destiñeron con NaCl 1M, hasta que se apreciaron las bandas de degradación de CMC o β -glucano de cebada. Después del proceso de destinción, los geles fueron sumergidos en ácido acético al 10% y revelados en Gel Doc™ XR (*Bio-Rad*).

3.8. Detección y valoración de actividad enzimática

3.8.1. Determinación de los productos de reacción mediante cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina TLC (*Thin layer chromatography*) se utilizó para analizar los productos de hidrólisis generados por la actividad enzimática de la liquenasa Lic16A sobre liquenano y β -glucano de cebada y de la celulasa Cel6D sobre diferentes sustratos celulósicos cortos y largos. Para este análisis se incubó una cantidad determinada de proteína purificada con sustratos al 1,5% en tampón fosfato o acetato 50mM, en las condiciones de pH y temperaturas adecuadas para cada muestra de proteína. En los intervalos de tiempo establecidos se extrajeron alícuotas, se centrifugaron a 14000

rpm durante 3 min y congelados. Las alícuotas de 10µl de los sobrenadantes fueron cargadas en placas de sílica gel (*Kieselgel 20 F254 20x20 cm, Merck*), en paralelo con una mezcla de azúcares patrón: glucosa, celobiosa, celotriosa, celotetraosa y celopentaosa (*Sigma-Aldrich*). La fase móvil consistió en una mezcla de cloroformo, ácido acético y agua (30:60:10 v/v/v). Se realizaron dos ascensos de la fase móvil, se secaron las placas y se rociaron con una solución de H₂SO₄ al 5% en etanol. Finalmente las placas fueron reveladas mediante calor con un secador, hasta observar la aparición de las manchas correspondientes a los productos de degradación.

3.8.2. Valoración de actividad enzimática mediante ensayos colorimétricos

La actividad enzimática de las proteínas se determinó por valoración de azúcares reductores mediante el ensayo de Nelson-Somogyi (*Marais et al. 1966*). Este método permite cuantificar los extremos reductores, que se producen cuando se rompen enlaces glucosídicos de polisacáridos por la actividad de enzimas hidrolíticas. Para valorar la actividad enzimática las muestras se incubaron con sustratos celulósicos a una concentración final de 1,5% en una solución tampón en las condiciones de pH, tiempo y temperatura adecuados para cada enzima. El volumen final de la mezcla fue de 100 µl. Las mezclas de reacción se prepararon en hielo, una vez terminado el tiempo de incubación se enfriaron en hielo durante 5 min y se agregó 150 µl de agua bidestilada. Se añadió 250 µl del reactivo alcalino de cobre, el cual se prepara inmediatamente antes de su utilización mezclando las soluciones I y II en relación 4:1 (Tabla 3.11).

Tabla 3.11. Reactivo alcalino de cobre.

<i>Reactivo</i>	<i>Composición</i>	<i>Preparación</i>
<i>Solución I</i> (1000 ml)	15 g Tartrato sódico potásico 30 g Na ₂ CO ₃ 20 g NaHCO ₃ 180 g NaSO ₄	Se disolvieron en primer lugar el tartrato sódico potásico y el Na ₂ CO ₃ . Después se añadió el NaHCO ₃ y el Na ₂ SO ₄ disueltos previamente.
<i>Solución II</i> (250 ml)	5 g CuSO ₄ .5H ₂ O 45 g NaSO ₄	Se disolvieron los reactivos en agua destilada

Las muestras se incubaron a 100°C durante 10 min y fueron enfriadas inmediatamente en hielo, luego se añadieron 250 µl de la mezcla de la solución de arsenomolibdato con H₂SO₄ 1,5N en relación 1:2 (Tabla 3.12), esta mezcla debe hacerse unos minutos antes de usada, se realizó una agitación leve y se agregaron 750 µl de agua. Finalmente se centrifugan las muestras 5 min a 4°C y se medía la absorbancia a 520 nm de los sobrenadantes. Cada reacción se realiza por triplicado y cada reacción tenía un blanco al que se le agregaba la enzima después de añadir el reactivo de cobre.

Tabla 3.12. Composición de la solución de arsenomolibdato.

<i>Reactivo</i>	<i>Composición</i>	<i>Preparación</i>
<i>Solución de arsenomolibdato (500 ml)</i>	25 g (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O 21 ml H ₂ SO ₄ 96% 3g Na ₂ HAsO ₄ .7H ₂ O	Se disolvió el (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O en agua destilada, se añadió el H ₂ SO ₄ 96%, se agitó y se añadió el Na ₂ HAsO ₄ .7H ₂ O previamente disuelto en agua. Se incubó durante 48 h a 37°C y se guardó en un envase opaco.
<i>H₂SO₄</i>	1,5N	

3.8.3. Influencia de las condiciones ambientales en la actividad enzimática

3.8.3.1. Determinación de la especificidad de sustrato

En la determinación de la especificidad de sustrato se utilizó el método descrito anteriormente. Para la liqenasa se hicieron los ensayos sobre los siguientes sustratos: β - glucano de cebada, xilano de madera de haya, xilano de avena espelta, xilano de madera de abedul, 4-O-metil glucoronoxilano, pectina, almidón, ácido poligalacturónico, carboximetilcelulosa (CMC) y la laminarina que se adquirieron en *Sigma-Aldrich*. Arabinoxilano de trigo y liquenano fueron adquiridos de *Megazyme* y Avicel (*Fluka*).

En la determinación de especificidad de sustrato de la celulasa Cel6D adicionalmente se utilizó: celulosa hinchada (PASC), celulosa amorfa regenerada (RAC), Papel filtro (*Whatman*) y pNP-G2 (*Sigma-Aldrich*). El PASC y el RAC fueron preparados en el laboratorio.

3.8.3.2. Determinación de pH

El pH óptimo de la liquenasa Lic16A, se determinó valorando la actividad a diferentes pH entre 3-10 en intervalos de 0,5 y 1 por el método Nelson-Somogyi. Se utilizó soluciones tampón Britton-Robinson que fueron ajustadas al pH requerido y para pH 6,5 se utilizó tampón fosfato 50mM.

3.8.3.3. Determinación de la temperatura óptima

La determinación de la temperatura óptima se realizó valoraciones de actividad liquenasa, a diferentes temperaturas de incubación, en el rango de 20-70°C, con intervalos de 5 y 10°C. Los ensayos se realizaron en tampón fosfato 50 mM, pH 6,5.

3.8.3.4. Determinación de temperatura y pH óptimo por RSM

Se utilizó el *Response Surface Methodology* (RSM) (Box *et al.* 1978) para determinar las condiciones óptimas de la actividad de Cel6D. Para estudiar el efecto de dos variables pH y temperatura se siguió el diseño de compuesto central (DCC). Las dos variables independientes se codificaron como x i y, cada una con cinco niveles: $-\alpha$, -1, 0, +1 y $+\alpha$. La actividad enzimática (mU/mg) se estableció como variable de respuesta z. La función de respuesta presentaba componentes lineales, cuadráticos, de interacción y se representaron utilizando la siguiente función polinómica de segundo grado:

$$z = \beta_0 + \beta_{1x} + \beta_{2y} + \beta_{11}x^2 + \beta_{22}y^2 + \beta_{12}xy$$

Donde β_0 : es la constante, β_1, β_2 : son los coeficientes lineales, β_{11}, β_{22} : son los coeficientes cuadráticos y β_{12} : es el coeficiente de interacción. Se generó una tabla de análisis de varianza (ANOVA), y la significación de todos los términos en la ecuación polinómica se juzgaron estadísticamente a una probabilidad (P) de 0,05. A continuación en la Tabla 3.13 se detalla el diseño experimental que se siguió en la experimentación.

En los diferentes puntos de pH se utilizó la solución tampón Britton-Robinson ajustada al pH requerido para la experimentación. El análisis de la varianza y los gráficos se obtuvieron mediante el software *Statistica*.

Tabla 3.13. Valores de las variables independientes de la determinación de RSM.

<i>Experimentos</i>	<i>Variables Independientes</i>	
	<i>pH</i>	<i>Temperatura (°C)</i>
<i>1</i>	3	36
<i>2</i>	3	64
<i>3</i>	5	36
<i>4</i>	5	64
<i>5</i>	4	50
<i>6</i>	4	50
<i>7</i>	4	50
<i>8</i>	4	30
<i>9</i>	4	70
<i>10</i>	2,6	50
<i>11</i>	5,4	50

3.8.3.5. Ensayos de termoestabilidad

Se evaluó el efecto de temperatura sobre la estabilidad de las enzimas, incubando las muestras a diferentes temperaturas entre 25 y 65°C, durante diferentes intervalos de tiempo a un pH determinado. Finalizada la incubación se medía la actividad residual con el método colorimétrico descrito previamente.

3.8.3.6. Determinación del efecto de pH sobre la estabilidad

La estabilidad de las enzimas se determinó incubando las distintas muestras a diferentes pHs, en el rango de 2 a 11 durante 3h a las temperaturas determinadas. Finalizada la incubación se medía la actividad residual con el método colorimétrico descrito previamente.

3.8.3.7. Efecto de iones sobre la actividad enzimática

Con el fin de estudiar el efecto de diferentes iones metálicos en la actividad enzimática, se midió la actividad enzimática en presencia de los diferentes iones a una concentración final de 1 mM y 10 mM, y para los demás aditivos 5 y 10%. Los iones y aditivos utilizados fueron: AlCl₃, BaCl₂, CaCl₂, CuSO₄, FeSO₄, HgCl₂, KCl, LiCl₂, MgCl₂, MnCl₂, NaCl, NH₄Cl₂, ZnSO₄, EDTA, SDS, Tween 80, Tritón X-100, DMSO. La actividad residual se medía mediante el método Nelson-Somogyi.

3.8.3.8. Ensayos de unión a sustratos celulósicos

Los ensayos de unión a sustratos celulósicos insolubles (Avicel) fueron ensayados en la celulasa Cel6D y el clon derivado Cel6D-CBM3. Se utilizó enzimas purificadas, controles de BSA y muestras de enzimas sin Avicel para descartar la pérdida de proteína por precipitación inespecífica. Siguiendo el protocolo descrito anteriormente para la purificación de proteínas por unión a sustratos celulósicos insolubles.

3.9. Técnicas de preparación de celulosa hinchada y amorfa

3.9.1. Preparación de celulosa hinchada (PASC)

Wood (1988) describe un método para la obtención de celulosa hinchada, el mismo que tiene como fundamento tratar celulosa cristalina con ácido fosfórico al 70%. Para ello se resuspendió 1 g de Avicel en 100 ml de H₃PO₄ al 70% y se incubó a 60°C durante 4h. Transcurrido este tiempo se añadió 1L de agua bidestilada fría y se dejó reposar a 4°C hasta sedimentar por completo el Avicel. Una vez sedimentado, se eliminó el sobrenadante teniendo cuidado de no eliminar alguna cantidad de sedimento. A continuación se realizaron varios lavados con agua fría hasta conseguir que el Avicel modificado tenga pH neutro. Una vez que el Avicel se encontró a pH neutro se resuspendió en agua.

3.9.2. Preparación de celulosa amorfa regenerada

Zhang *et al.*, (2006) menciona que para tratamientos de celulosa cristalina con porcentajes mayores a 70%, se observa que la celulosa presenta una disolución de cristal sin afectar el grado de polimerización de la cadena. Describiendo el siguiente protocolo que se detalla a continuación.

Se utilizó una suspensión que contenía 0,2 g de Avicel con 0,6ml de agua, a esta suspensión se le agregó poco a poco 10 ml de H₃PO₄ al 85% previamente enfriado en hielo, después de cada adición se sometía a una agitación fuerte. La suspensión obtenida se incubó en hielo durante 1h, pasado este tiempo se añadió 40 ml de agua fría de la misma manera que con el ácido. La preparación fue centrifugada a 3901 g a 4°C durante 20 min en una centrifuga de mesa *Allegra X-22R (Beckman Coulter)*, se eliminó el

sobrenadante y se añadió 0,5 ml de Na₂CO₃ 2M en el último lavado con el fin de neutralizar completamente el ácido. Se realizaron 2-3 lavados hasta tener pH neutro. El Avicel sedimentado se resuspendió en 10 ml de agua y se almacenó a 4°C.

3.10. Técnicas de análisis de propiedades de pasta de papel

La pasta de papel de lino ECF fue suministrada por CELESA y la pasta de papel de eucalipto ECF fue suministrada ENCE. La pasta de papel de lino fue acondicionada en agua durante 24h, a continuación desintegrada y después se refinó en molino PFI según un procedimiento normalizado ISO-5264.

La formación de las hojas de papel se realizó en el equipo Rapid-Köthen, que sigue el procedimiento normalizado de la ISO-5269, con una suspensión fibrosa de 2.3 g/L para un gramaje equivalente a 75 g/m² (este peso es referente al peso seco de la pasta). Las hojas fueron secadas por medio de vacío, presión y calor (92,2°C) durante 12 min.

3.10.1. Determinación de propiedades físicas de fibras de pasta de papel

Para determinar las propiedades físicas de las fibras de la pasta en procesos de refino partimos de su suspensión fibrosa. En la misma se determinó la resistencia al desgote (°SR) siguiendo la norma ISO-5267:1999 con el refinómetro Schopper-Riegler. La determinación del índice de retención de agua (%IRA) se realizó según la norma ISO-23714:2007; Merkblatt-IV/33/57. Las características de las fibras como longitud de fibra y porcentaje de finos fueron ensayadas en un analizador de imagen Kajaani FS300 (ISO-16065:2001; Tappi-271).

3.10.2. Determinación de propiedades ópticas de papel

Las propiedades ópticas medidas en papel dan información acerca del grado de enlace fibra a fibra de las muestras analizadas. Se determinó el coeficiente de *Light scattering* y absorción (ISO 9416:2009).

3.10.3. Determinación de propiedades de resistencia de papel

El análisis del papel incluyó medidas físicas, de resistencia y permeabilidad (ISO-5270). Las mediciones se realizaron sobre hojas de papel acondicionadas en un ambiente normalizado de 23°C y 50% de humedad relativa (ISO-187).

El gramaje (ISO-536) y espesor (ISO-534) son medidas utilizadas en la determinación de la densidad y volumen específico (ISO-534:2003). Conjuntamente con la permeabilidad al aire “Bendtsen” (ISO-5636:2003) son pruebas no destructivas.

Las pruebas sobre las propiedades mecánicas del papel que se realizaron fueron: Resistencia a la tracción (ISO-1924:1994), Resistencia al estallido (ISO-2758:2001), Resistencia al desgarrado (ISO-1974:1990), Resistencia al plegado (ISO-5626) y WZSTS (ISO 15361:2000).

3.11. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Para el análisis de la morfología de las fibras de la pasta de papel se usaron pequeños trozos de papel de cada muestra que se observaron con un microscopio JEOL JSM- 6400. Las muestras se recubrieron primero con una capa muy delgada (14nm de grosor) de oro-paladio en un rociador de bombardeo iónico SCD005, con el fin de obtener una superficie conductora.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE Lic16A DE *Paenibacillus barcinonensis* BP-23

4.1.1. Clonación de la liquenasa Lic16A de *Paenibacillus barcinonensis*

En análisis previos del sistema de degradación xilanolítico de *Paenibacillus barcinonensis* BP-23, se identificó un marco abierto de lectura con homología a β -1,3-1,4-glucanasas en proximidad al gen codificante de la xilanasa Xyn11E previamente caracterizada (Valenzuela *et al.* 2014b). La secuencia completa del marco abierto de lectura fue determinada por *Gene Walking* desde el gen de la xilanasa y se le denominó *lic16A*. La secuencia de aminoácidos deducida de *lic16A* era una proteína de 239 aminoácidos que mostraban en el extremo N-terminal una región de 25 residuos con las características de un péptido señal. El peso molecular y punto isoeléctrico teóricos de la proteína madura fueron 25,83 kDa y 6,71 respectivamente. La comparación de la secuencia de aminoácidos deducida de *lic16A* con secuencias contenidas en las bases de datos mostró homología con liquenasas de familia GH16. La mayor homología encontrada fue con la liquenasa putativa de *Paenibacillus sp. W-61* (Fukuda *et al.* 2009), que muestra el 92% de identidad con la enzima clonada. Las endo- β -1,3-1,4-glucanasas de *Paenibacillus sp. F-40* (Yang *et al.* 2007), *Paenibacillus polymyxa* (Gosalbes *et al.* 1991) y *Paenibacillus macerans* (Borriss *et al.* 1990) mostraron el 89, 89 y 84% de identidad con Lic16A, mientras que la β -1,3-1,4-glucanasas de *Bacillus subtilis* (Murphy *et al.* 1984) y *Bacillus amyloliquefaciens* (Hofemeister *et al.* 1986) mostraron el 72 y 73% de identidad con la enzima clonada.

El gen *lic16A* de *P. barcinonensis* fue amplificado y clonado en *Escherichia coli* obteniendo la cepa recombinante *E. coli* BL21 (DE3)/pET101Lic16A. Esta construcción tiene fusionada una cola de histidina en el extremo C-terminal. El análisis por SDS-PAGE del extracto celular obtenido a partir del clon recombinante mostró una banda prominente con un tamaño molecular aparente de 27 kDa, que concordaba con el peso molecular deducido a partir de la secuencia de aminoácidos. La enzima fue purificada mediante cromatografía de afinidad a columnas de níquel HisTrap y fue analizada por SDS-PAGE y zimograma (Figura 4.1). El resultado indicó la correcta expresión de *lic16A* en forma activa.

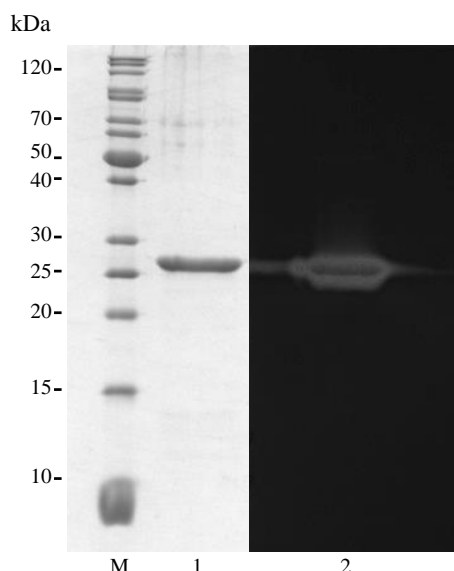


Figura 4.1. Análisis en gels de poliacrilamida con SDS-PAGE de Lic16A. Proteína purificada (1), Zimograma (2), Marcador de pesos moleculares (M).

4.1.2. Caracterización de la enzima recombinante

La actividad hidrolítica de la enzima purificada se determinó sobre varios sustratos. La enzima mostró una alta actividad sobre β -1,3-1,4-glucanos mixtos como β -glucano de cebada (197,86 U/mg) y liquenano (118,37 U/mg), mientras que no mostró actividad sobre β -1,4-glucanos (CMC, Avicel), β -1,3-glucanos (laminarina) ni otros polisacáridos ensayados, como xilanos, almidón y pectina. La actividad específica de la enzima, muestra actividad exclusiva sobre glucanos con enlaces mixtos β -1,3-1,4, lo que indica que es una liquenasa.

Se determinó a continuación el efecto de la temperatura y el pH en la actividad de la enzima sobre β -glucano de cebada. Las condiciones óptimas para la actividad enzimática fueron 55°C y pH 6,5 respectivamente (Figura 4.2). La enzima presentó más del 50% de la actividad máxima entre 40 y 60°C. Respecto al pH, fuera del estrecho margen entre pH 6,0 y 7,0, la enzima mostró menos del 50% de la actividad máxima. Los ensayos de estabilidad mostraron que Lic16A se mantuvo estable después de 3h de incubación a 55°C y pH 6,5. Mientras que a 65°C la enzima se inactivó casi por completo en 30 min. Se determinaron también los parámetros cinéticos de la enzima sobre liquenano. La enzima mostró V_{max} de 266,09 U/mg y K_m de 16,88 mg/ml.

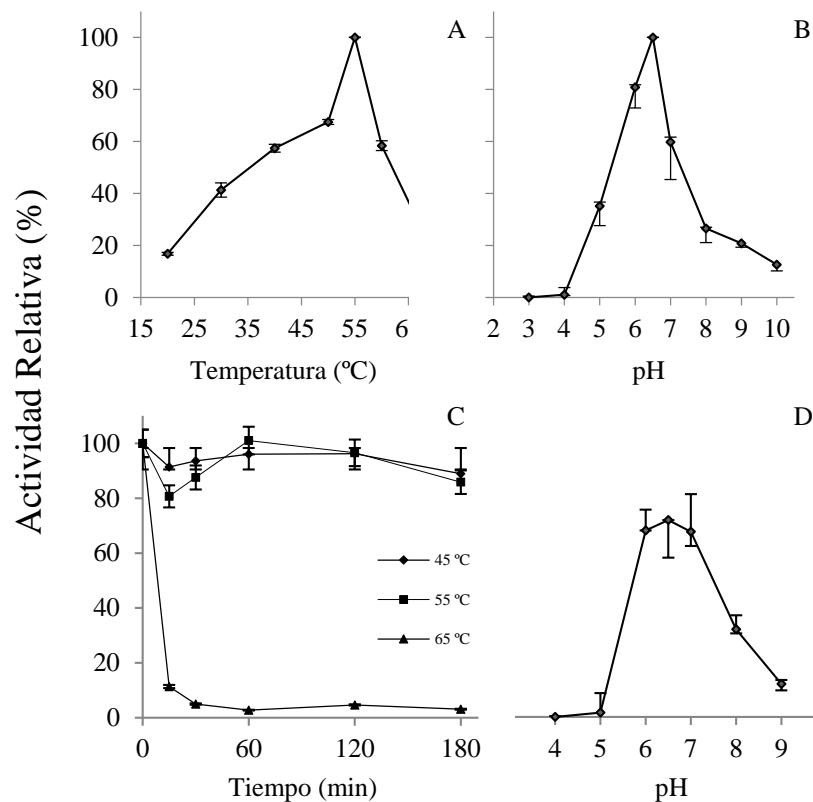


Figura 4.2. Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad de Lic16A. Efecto de la temperatura sobre la actividad de Lic16A (A). Efecto del pH sobre la actividad de Lic16A (B). Termoestabilidad de Lic16A(C) a pH 6,5 y 45°C (◆), 55°C (■) o 65°C (▲). Efecto del pH en la estabilidad de Lic16A a 55°C en soluciones tampón a diferentes pH durante 3h (D).

Se analizó el efecto de iones metálicos diferentes a concentración de 1 o 10 mM sobre la actividad enzimática de Lic16A (Figura 4.3). La liquenasa Lic16A fue inhibida fuertemente por Al^{3+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} y Fe^{2+} . En contraste los iones Mg^{2+} , Ba^{2+} y Na^+ a la concentración de 1 mM, produjeron un efecto estimulante (134 %, 141 % y 142 % respectivamente). El estudio del efecto de diferentes agentes químicos sobre la actividad de la enzima mostró que Tritón X- 100 y Tween 80 inhibieron totalmente la actividad de Lic16A.

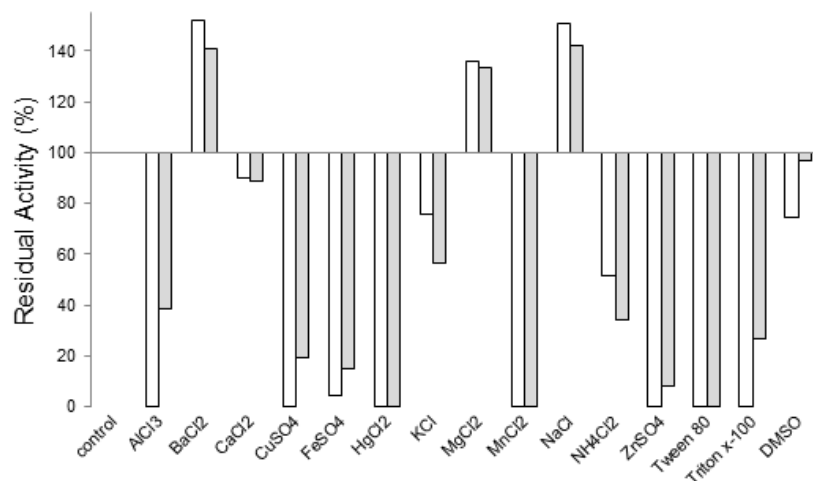


Figura 4.3. Influencia de varios aditivos sobre la actividad de Lic16A. Concentración 1mM (■), 10 mM (□).

4.1.3. Análisis de productos de hidrólisis de β -glucano de cebada

Los productos de hidrólisis de β -glucano de cebada y liquenano se analizaron por cromatografía de capa fina (TLC) (Figura 4.4). Los principales productos liberados de estos sustratos fueron oligosacáridos de diferente movilidad que los celooligosacáridos utilizados como estándar. El β -glucano de cebada origina un patrón complejo de hidrólisis, dando lugar a un oligosacárido que migró por delante de la celotriosa y a un producto con movilidad intermedia entre celotriosa y celotetraosa como productos principales. Estos oligosacáridos pueden ser considerados como 3-O- β -celobiosil-D-glucosa y 3-O- β -celotriosil-D-glucosa, es decir oligosacáridos que contienen enlaces β -1,3 y β -1,4 (Grishutin *et al.* 2006). Además se encontraron varios otros oligómeros de movilidad intermedia entre los celooligosacáridos estándar lo que sugiere que también contenían enlaces β -1,3. En el liquenano el patrón de hidrólisis que se obtuvo fue similar, con una menor cantidad de productos, aunque todos ellos con los rasgos descritos anteriormente, ya que migraron por delante de los celooligosacáridos estándar o tenían una movilidad intermedia. Para una mejor caracterización de los productos de hidrólisis de β -glucano de cebada y liquenano, éstos se analizaron por MALDI-TOF MS (Tabla 4.1). El espectro de masas confirmó que los productos de hidrólisis eran glucooligosacáridos de grado de polimerización 3, 4, 5, 6, 7 y superior. La diferencia en la movilidad con los celooligosacáridos control observadas en el análisis por TLC indicaban tal como se ha sugerido anteriormente la presencia de enlaces β -1,3, uniendo

los restos de glucosa en estos oligómeros, que pueden contener una cantidad variable de enlaces β -1,3 dependiendo del sustrato utilizado. Los diferentes patrones de productos de hidrólisis de los glucanos mixtos ensayados pueden reflejar las diferencias en el tipo y distribución de los enlaces β -1,3 y β -1,4 entre ellos. Ambos β -glucanos se componen principalmente por celotriosa y unidades celotetraosa unidos por enlaces β -1,3, sin embargo la proporción entre enlaces β -1,3 y β -1,4 es de 1:2 en el liquenano y 1:2,3;2,5 en el β -glucano de cebada (Bielecki & Galas 1991; Izydorczyk *et al.* 1998). El mayor número de enlaces glucosídicos β -1,4 en el β -glucano de cebada es un factor importante para la mayor actividad de la enzima sobre este polímero.

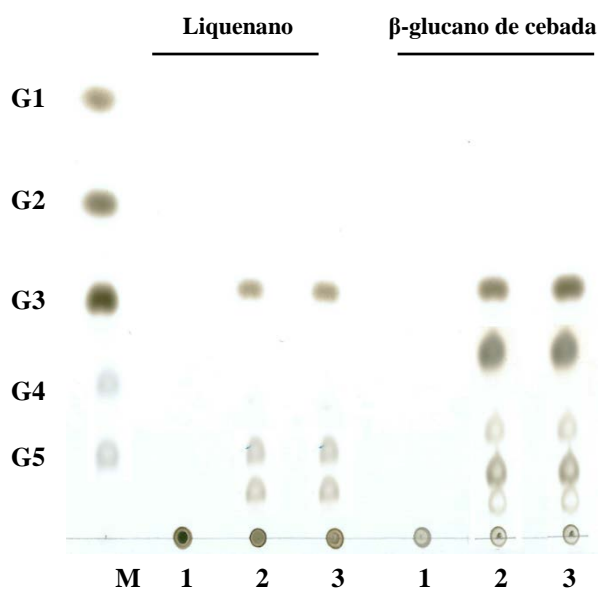


Figura 4.4. Análisis mediante cromatografía de capa fina (TLC) de los productos de hidrólisis liberados por Lic16A a partir de liquenano y β -glucano de cebada. La liquenasa Lic16A purificada (75 ng) se incubó a 55 °C y pH 6,5 con β -glucano o liquenano (1,5%) a tiempos de incubación de 0 min (1), 15 min (2), 60 min (3). Estándar de azúcares (M): glucosa (G1), celobiosa (G2), celotriosa (G3), celotetraosa (G4), celopentaosa (G5).

Tabla 4.1. Glucooligosacáridos identificados por MALDI-TOF MS tras la hidrólisis de β -glucano de cebada y liquenano por Lic16A.

<i>Glucooligosacáridos</i>	M_r^a	<i>m/z</i>	
		Na^+	
		<i>β-glucano de cebada</i>	<i>Liquenano</i>
<i>G3</i>	504	527,1	527,1
<i>G4</i>	666	689,1	689,1
<i>G5</i>	828	851,2	851,2
<i>G6</i>	990	1013,3	1013,3
<i>G7</i>	1152	1175,3	-
<i>G8</i>	1314	1337,4	-
<i>G9</i>	1476	1499,4	-

^a M_r Peso molecular.

4.2. SECUENCIACIÓN DE GENOMA DE *Paenibacillus barcinonensis* BP-23

Dado el interés por los enzimas degradadores de biomasa y la elevada actividad degradadora de material lignocelulósico de *Paenibacillus barcinonensis*, con el fin de conocer de forma más completa su maquinaria enzimática e identificar los enzimas responsables, se procedió a secuenciar su genoma. El objetivo de la secuenciación fue la identificación de genes que pudieran ser posteriormente caracterizados bioquímicamente y funcionalmente para ser aplicados en diferentes industrias, como la textil, papelera, alimentaria o en la producción de biocombustibles.

4.2.1. Secuenciación del genoma

A partir de ADN genómico se realizó la secuenciación del genoma por la empresa MACROGEN KOREA (Macrogen Inc.) mediante la plataforma Illumina con la técnica HiSeq 2000. Los datos de secuencia se procesaron a continuación con el programa CASAVA V1.82, que efectúa un alineamiento de las secuencias procedentes del Illumina con un genoma de referencia, un análisis de la variante y la posterior obtención de los reads. Tras este análisis se obtuvieron un total de 81.686.590 reads.

En la Tabla 4.2 se observan los datos preliminares que la empresa suministró. En el análisis de la calidad de la secuencia con el programa Sanger Quality (ASCII Character Code = Phred Quality Value + 33) mostró que el 3,46% de los reads tenían un phred score (Q20) por debajo de 20, y el 8,2% de los reads un phred score menor de 30 (Q30). Un phred score por debajo de 20 supone una probabilidad de menos del 99% de exactitud en la secuencia y un phred score de 30 supone una probabilidad del 99,9% de exactitud. Tras eliminar los read de baja calidad de phred score inferior a 30, se obtuvo una secuencia que presentaba un contenido de 45,87% de GC.

Tabla 4.2. Análisis de reads obtenidos de la secuenciación del genoma de *Paenibacillus barcinonensis* por la Empresa Macrogen Inc.

Sample	Total Bases	Read Count	N(%)	GC(%)	Q20(%)	Q30(%)
BP-23	8.250.345.590	81.686.590	0,023	45,87	96,54	91,80

El ensamblaje por referencia o *mapping* realizado por la empresa Macrogen fue tomado como referencia la secuencia de genoma de *Paenibacillus polymyxa* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_014483.2) y varias de las herramientas bioinformáticas utilizadas se detallan en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Herramientas bioinformáticas para el ensamblaje por referencia de la secuencia del genoma de *Paenibacillus barcinonensis*.

<i>Acción</i>	<i>Programa</i>	<i>Entrada</i>
<i>Alignment Software</i>	BWA v0.5.9-r16	http://bio-bwa.sourceforge.net/
<i>Remove PCR Duplicates</i>	Picard v1.79	http://picard.sourceforge.net/
<i>Variant Detection</i>	Samtools v0.1.18	http://samtools.sourceforge.net/
<i>Sequencing Data Analysis Tool</i>	GATK v1.4.11	http://www.broadinstitute.org/gsa/wiki/index.php/The_Genome_Analysis_Toolkit

En la Tabla 4.4 se pueden observar los resultados obtenidos del *mapping*. Se consiguió una cobertura total del 1,918% y de un total de 81.686.590 reads se mapearon un 0,42%, debiéndose principalmente a que la cepa de referencia *Paenibacillus polymyxa* es lejana filogenéticamente. Esta especie fue escogida debido a que era la única que se encontraba secuenciada y anotada en las bases de datos en ese momento.

Tabla 4.4. Resultados del ensamblaje por referencia de la secuencia del genoma de *Paenibacillus barcinonensis*.

<i>Sites (Ref. Length)</i>	<i>Mapped Sites (>=1x)</i>	<i>Coverage (>=1x) (%)</i>	<i>Total Read</i>	<i>Mapped Read</i>	<i>Mapped Read (%)</i>	<i>Mapped Bases</i>	<i>Mean Depth</i>
5394884	102859	1,918	81.686.590	341355	0,42	30980692	5,74

4.2.2. Ensamblaje

Debido a que el ensamblaje suministrado por la empresa MacroGen consiguió solo un mapeo del 0,42% del total de los reads y no proporcionó la información requerida de genes de hidrolasas, se utilizaron otras estrategias para el ensamblaje del genoma.

El nuevo ensamblaje del genoma de *Paenibacillus barcinonensis* se realizó en colaboración con el Grupo “Evolutionary Genomics & Bioinformatic” del Departamento de Genética de la Universidad de Barcelona a cargo del Dr. Julio Rozas con la participación de Cristina Frías López.

El primer paso para iniciar con el ensamblaje del genoma fue un análisis de la calidad de las secuencias utilizando un programa distinto al utilizado por la empresa MacroGen Inc., en concreto se utilizó el programa NGS QC Toolkit IlluQC.pl v.2.2.3. En la Tabla 4.5 se detallan los parámetros del análisis.

Tabla 4.5. Parámetros utilizados para el análisis de calidad de read con NGS QC Toolkit.

<i>Parámetros</i>	Paired-end	
<i>Library type</i>		
<i>Input files</i>	ADNg-BP-23_1.fastq	ADNg-BP-23_2.fastq
<i>Primer/Adaptor library</i>	NA	NA
<i>Cut-off read length for HQ</i>	70,00%	70,00%
<i>Cut-off quality score</i>	20	20
<i>Only statistics</i>	Off	Off
<i>Number of processes</i>	1	1

Con el fin de filtrar reads de mala calidad se estableció como phred score Q20, es decir que los reads que presentaron valores por debajo de 20 fueron eliminados. En el análisis de calidad de secuencia realizado con este nuevo programa de los dos archivos FASTAq ADNg-BP-23_1.fastq (1) y ADNg-BP-23_2.fastq (2) que MacroGen Inc., suministró, fueron eliminados un 5,36% de reads (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Datos de filtrado de reads de baja calidad con NGS QC Toolkit.

QC statistics

<i>File name</i>	(1)	(2)
<i>Total number of reads</i>	40843295	40843295
<i>Total number of HQ reads</i>	38652576	38652576
<i>Percentage of HQ reads</i>	94,64%	94,64%
<i>Total number of bases</i>	4125172795	4125172795
<i>Total number of bases in HQ reads</i>	3903910176	3903910176
<i>Total number of HQ bases in HQ reads</i>	3846807729	3836914361
<i>Percentage of HQ bases in HQ reads</i>	98,54%	98,28%
<i>Number of Primer/Adaptor contaminated HQ reads</i>	NA	NA
<i>Total number of HQ filtered reads</i>	38652576	38652576
<i>Percentage of HQ filtered reads</i>	94,64%	94,64%

HQ: High quality

Una vez concluido el análisis y eliminación de reads de baja calidad se procedió al ensamblaje de la secuencia por el método *de novo*. El ensamblaje *de novo* se suele utilizar para la secuenciación de genomas pequeños y de los que no exista información previa. Aunque en ocasiones no es posible completar el ensamblaje completo de genoma, se pueden construir scaffolds y contigs fiables a partir de los datos suministrados. Se realizó el ensamblaje *de novo* con el programa SGA (String Graph Assembler). Se obtuvieron un total 6166415 de bases ensambladas y 559 scaffolds. Obteniendo un tamaño estimado del genoma de *Paenibacillus barcinonensis* de 6510186 pb con un contenido estimado de 45,8% de GC.

La presencia de los genes de interés se determinó comparando los scaffolds con las secuencias de genes codificantes de las glicosil hidrolasas previamente identificadas en *Paenibacillus barcinonensis* y de hidrolasas de especies cercanas. Se aplicó el algoritmo tBLASTn para traducir las secuencias de los scaffolds en las 6 pautas posibles de lectura, alineándolos con las secuencias de las proteínas conocidas. Las regiones de los scaffolds que proporcionaron hit de BLAST fueron extraídas utilizando las coordenadas del Hit de tBLASTn utilizando scripts escritos de Perl. Se identificaron un total de 19 nuevas pautas abierta de lectura (ORF), de las cuales 12 de ellas eran de interés

para el grupo de investigación, ya que codificaban hipotéticas enzimas involucradas en la despolimerización de polisacáridos.

Tabla 4.7. Enzimas caracterizadas y putativas encontradas en el ensamblaje del genoma de *Paenibacillus barcinonensis*.

<i>Enzimas</i>	<i>Familia de las Glicosil Hidrolasas</i>	<i>Nombre</i>
<i>Celulasas</i>	GH5	Cel5A
	GH6*	Cel6D*
	GH9	Cel9B
	GH48	Cel48C
<i>Xilanasas</i>	GH8*	Xyn8F*
		Xyn10A
		Xyn10B
	GH10	Xyn10C
		Xyn10G*
		Xyn10H*
	Xyn11E	
	Xyn30D	
	GH30	Xyn30I*
<i>Arabinofurosidasas</i>		GH43A*
		GH43B*
		GH43C*
	GH43*	GH43D*
		GH43E*
		GH43F*
		GH43G*

* En negrita se muestran las nuevas enzimas identificadas.

En concreto se encontraron genes putativos que codificaban cuatro xilanasas nuevas, siete arabinofurosidasas putativas y una nueva celulasa (Tabla 4.7). Dado que en este trabajo se deseaba conocer el sistema celulolítico de *Paenibacillus barcinonensis*, se decidió continuar la investigación con la nueva celulasa identificada. Para obtener la secuencia completa de la pauta abierta de lectura de esta celulasa se extrajeron 1000 pb upstream y downstream a partir de las coordenadas obtenidas anteriormente, que correspondían a una zona central del gen. La secuencia obtenida fue analizada en el

programa *ORF Finder (Open Reading Frame Finder)* y utilizando BLAST se determinó que la nueva celulasa identificada tenía homología con las celulasas de la familia 6 de las glicosil hidrolasas. Esta celulasa se eligió para su análisis detallado en el presente trabajo.

Con el resto de las hipotéticas enzimas encontradas, se llevarán a cabo posteriormente estudios adicionales para confirmar la función que realizan. Además, se realizará la búsqueda de genes involucrados en los procesos metabólicos de la bacteria y a continuación se llevará a cabo la anotación de la secuencia completa del genoma, que en el futuro revelará características únicas de la cepa *Paenibacillus barcinonensis* BP-23 relacionadas con su elevado interés biotecnológico.

4.3. CARACTERIZACION DE LA CELULASA Cel6D DE *Paenibacillus barcinonensis*

4.3.1. Clonación de la celulasa Cel6D de *Paenibacillus barcinonensis*

Para comprobar si el marco abierto de lectura encontrado en el ensamblaje del genoma codificaba para una proteína activa y sus características correspondían a una celulasa de familia 6 de glicosil hidrolasas, se realizó su clonación en *E. coli* utilizando el vector de expresión pET28a. La secuencia nucleotídica de *cel6D* permitió el diseño de oligonucleótidos específicos (Tabla 3.6) para la amplificación por PCR del gen codificante y la clonación en la dirección adecuada dentro del *polylinker* del vector pET28a, fusionando una cola de histidinas al extremo C-terminal.

Para la clonación de Cel6D se hizo una digestión con las enzimas de restricción *NcoI* y *HindIII* tanto del vector como del gen amplificado por PCR, seguida de ligación de los dos fragmentos. La ligación permitió la obtención del plásmido pET28aCel6D que fue introducido por transformación en células competentes de *E. coli* DH5 α . Los clones recombinantes obtenidos tras la transformación, fueron seleccionados por su capacidad de crecer en placas de LB suplementadas con kanamicina. Se realizó la extracción de DNA plasmídico de los clones obtenidos fue secuenciado con el fin de comprobar que no se hubieran producido mutaciones durante la amplificación. Después de verificar las secuencias se escogió uno de los clones y se hicieron ensayos de actividad con el fin de conocer si la proteína obtenida se encontraba en su forma activa. Estos ensayos se realizaron a varios pH entre 4,2 y 9,0, a temperatura de 50°C, tiempos de incubación entre 30 min y 18h sobre varios sustratos celulósicos como CMC (carboximetilcelulosa), RAC (celulosa regenerada), PASC (celulosa hinchada), Avicel y papel filtro. La actividad fue medida cuantificando la liberación de azúcares reductores por el método Nelson-Somogyi. De entre todos los sustratos anteriores se obtuvo actividad únicamente sobre PASC a pH 4,2. Estos resultados indicaban que la enzima clonada presentaba actividad celulasa, aunque sobre un estrecho margen de sustratos.

El análisis de la secuencia aminoacídica deducida del gen *cel6D* indica que la celulasa Cel6D es una enzima multidominio de 801 aminoácidos que está conformada por un módulo catalítico, dos módulos de fibronectina y un módulo de unión a carbohidratos de familia 3b. En la región N-terminal de Cel6D el análisis mediante el

programa SignalP 4.1 reveló una secuencia de 30 aminoácidos compatible con un péptido señal. El hipotético péptido señal cortaría la proteína entre los aminoácidos Ala30 y Ala31, generando una proteína madura de 771 aminoácidos con un peso molecular teórico de 83837,9 Da y un punto isoelectrico deducido de 4,94.

4.3.2. Caracterización bioquímica de la celulasa Cel6D de *Paenibacillus barcinonensis*

4.3.2.1. Expresión y purificación de la celulasa Cel6D

Con el objetivo de producir la enzima para su purificación y caracterización, el plásmido pET28aCel6D se introdujo en la cepa huésped de expresión *E. coli* BL21 (DE3). La cepa recombinante *E. coli* BL21 (DE3)/pET28aCel6D, fue cultivada, se obtuvieron los extractos celulares de la misma y se procedió a purificar la celulasa a partir de la fase soluble de los extractos celulares mediante cromatografía de afinidad a níquel. Las muestras obtenidas fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Figura 4.5). Se observó que la proteína purificada presentaba un tamaño molecular aparente de 84 kDa, en concordancia con el peso molecular teórico de la proteína madura deducido de la secuencia génica.

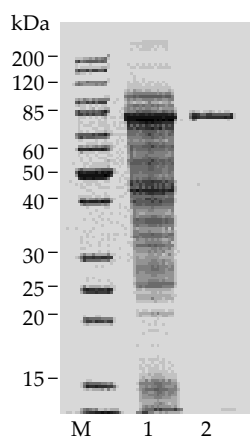


Figura 4.5 Análisis en geles de poliacrilamida con SDS. Extracto celular fase soluble de *E. coli* BL21 (DE3)/pET28aCel6D después de la inducción con IPTG (0,5mM) durante 18h a 16°C (1). Proteína purificada Cel6D mediante cromatografía de afinidad a níquel IMAC- FPLC (2). Marcador de pesos moleculares (M).

Para la caracterización bioquímica de la celulasa Cel6D, la enzima purificada fue sometida a un paso adicional por una columna de desalado, debido a que en ensayos previos de actividad se determinó que Cel6D se inactivaba con la presencia de imidazol y NaCl, componentes de los tampones de elución de la columna de afinidad.

4.3.2.2. Actividad específica

Para determinar la especificidad de sustrato de Cel6D, se realizaron ensayos de actividad enzimática sobre diferentes sustratos celulósicos y polisacáridos como CMC, Avicel, PASC, RAC, papel filtro, β -glucano de cebada, liquenano, pectina, almidón, 4-O-metil glucuronoxilano, ácido poligalacturónico y xilano de madera de avena. La concentración final de los sustratos utilizada fue de 1,5%, excepto para el xilano que fue del 0,5% y para el PASC que fue 1,6% (Tabla 4.8).

Tabla 4.8. Actividad Específica de Cel6D.

<i>Sustratos</i>	<i>Actividad Específica U mg⁻¹</i>
<i>PASC</i>	0,66
<i>Avicel</i>	0,01
<i>RAC</i>	0,01
<i>CMC</i>	N.D.
<i>pNPG2</i>	N.D.
<i>Papel filtro</i>	N.D.
<i>Liquenano</i>	N.D.
<i>β-glucano de cebada</i>	N.D.
<i>Xilano de madera de avena</i>	N.D.
<i>Pectina</i>	N.D.
<i>Almidón</i>	N.D.
<i>4-O-metil glucuronoxilano</i>	N.D.
<i>Ácido poligalacturónico</i>	N.D.

N.D. no detectada.

La celulasa Cel6D presentó actividad únicamente sobre algunos sustratos de celulosa cristalina como PASC, Avicel y RAC, pero sin embargo no presento actividad sobre sustratos de celulosa amorfa como CMC. Cel6D presentó máxima actividad específica sobre PASC, mostrando una gran preferencia por este sustrato, sobre el que

presentó una actividad más de 50 veces superior a la mostrada sobre otras celulosas cristalinas. La enzima no mostró actividad sobre ninguno de los otros sustratos ensayados, incluyendo el *p*Nitrophenil- β -celobiósido (*p*NPG2).

4.3.2.3. Análisis de los productos de hidrólisis

Para determinar el modo de acción enzimática de Cel6D se analizaron mediante cromatografía en capa fina (TLC) los productos de hidrólisis de varios sustratos. En concreto, se analizaron los productos liberados a partir de PASC y también de varios oligosacáridos como celobiosa, celotriosa, celotetraosa, celopentaosa y *p*NPG2.

La enzima originó celobiosa como único producto de hidrólisis de PASC. En incubaciones de larga duración (18h) se observó también glucosa en los cromatogramas. Probablemente este monosacárido se produjo como degradación inespecífica de la celobiosa liberada por la enzima (Figura 4.6).

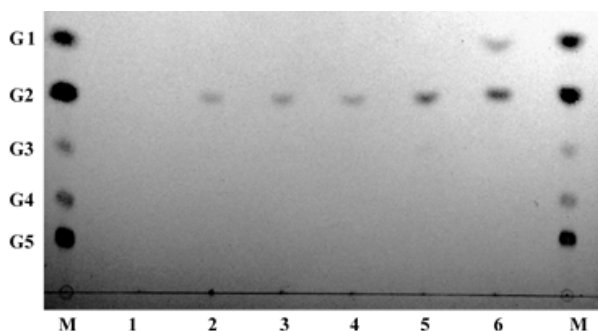


Figura 4.6. Análisis mediante cromatografía en capa fina (TLC) de los productos de hidrólisis de PASC. Cel6D (0,6 μ g) se incubó con PASC (1,6%) a 47°C y pH 4. Se tomaron muestras a tiempo 0 (1), 30 min (2), 60 min (3), 120 min (4), 240 min (5), 18h (6). Estándar de azúcares (M): glucosa (G1), celobiosa (G2), celotriosa (G3), celotetraosa (G4) y celopentaosa (G5).

El análisis de los productos de hidrólisis de celooligosacáridos de entre 2 y 5 unidades de glucosa (G2-G5) mostró que Cel6D es activa sobre oligosacáridos de al menos 3 unidades ya que no tiene actividad sobre celobiosa. Presenta actividad sobre celotriosa, celotetraosa y celopentaosa originando como principal producto de hidrólisis celobiosa. (Figura 4.7).

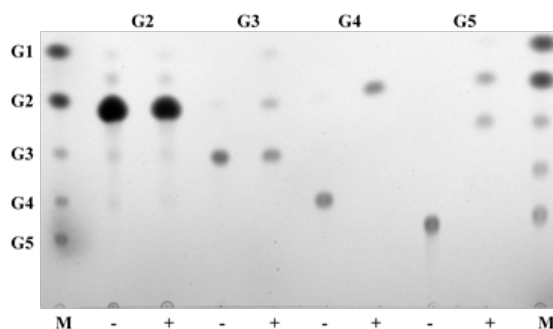


Figura 4.7. Análisis mediante cromatografía en capa fina (TLC) de los productos de hidrólisis de celooligosacáridos G2-G5. Cel6D (0,6 μ g) se incubó con celooligosacáridos (0,6 mg/ml) a 47°C, pH 4 durante 30 min. Control (-), Tratamiento con enzima (+). Estándar de azúcares (M): glucosa (G1), celobiosa (G2), celotriosa (G3), celotetraosa (G4) y celopentaosa (G5).

Por último, aunque se había determinado previamente la falta de actividad sobre *p*NPG2 por ensayo colorimétrico, para verificar la acción Cel6D sobre dicho sustrato, se analizó por TLC el resultado de dicha reacción enzimática. Los análisis mostraron que Cel6D no libera ningún producto a partir de *p*NPG2 (Figura 4.8).

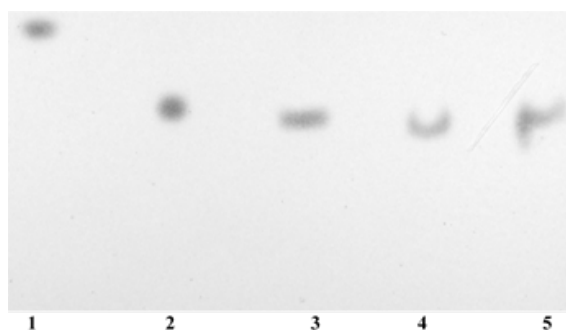


Figura 4.8. Análisis mediante cromatografía en capa fina (TLC) de los productos de hidrólisis de *p*Np-G2. Cel6D (2,4 μ g) se incubó con *p*Np-G2 (10mM) a 47°C, pH 4 se tomaron muestras a tiempo 0 (3), 30 min (4), 18h (5). Control: *p*NpG1 (1), *p*NpG2 (2).

Los resultados obtenidos mostraron la actividad exclusiva de la enzima sobre celulosa cristalina y la liberación de celobiosa como único producto principal de reacción, indican claramente que Cel6D tiene las características de una celobiohidrolasa. La especificidad de sustrato y modo de acción encontrados son comparables con la de la celobiohidrolasa Cel6A de *Trichoderma reesei*, aunque esta enzima muestra la máxima

actividad sobre Avicel y celulosa bacteriana microcristalina y tiene menor actividad sobre PASC (Fägerstam & Pettersson 1980; Koivula *et al.* 1998).

4.3.2.4. Determinación de pH y temperatura óptimos mediante RSM

El efecto de la temperatura y pH sobre la actividad enzimática de Cel6D y la interacción entre estos dos factores fueron determinados por RSM (Tabla 4.9).

Tabla 4.9. Niveles experimentales de las variables para el análisis multifactorial.

<i>Variables Independientes</i>	<i>Niveles codificados de las variables</i>				
	-α	-1	0	1	A
<i>Temperatura (°C)</i>	30	36	50	64	70
<i>pH</i>	2,6	3	4	5	5,4

Se llevaron a cabo 11 ensayos de actividad enzimática sobre PASC siguiendo el análisis estadístico de diseño compuesto central (DCC). En la Tabla 4.10 se observan los valores de pH y temperatura que se utilizaron en la determinación y los valores de actividad enzimática observados y predichos.

Tabla 4.10. Análisis multifactorial de la actividad enzimática de Cel6D que incluyen las respuestas observadas y previstas.

<i>Experimentos</i>	<i>Variables Independientes</i>		<i>Actividad (mU/mg)</i>	
	<i>pH</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Observada</i>	<i>Prevista</i>
1	3	36	173,31	274,05
2	3	64	35,89	108,29
3	5	36	248,38	245,44
4	5	64	106,65	75,37
5	4	50	478,51	475,30
6	4	50	477,48	475,30
7	4	50	469,69	475,30
8	4	30	287,35	233,89
9	4	70	8,20	-5,98
10	2,6	50	366,32	256,82
11	5,4	50	175,16	213,75

La ecuación resultante del análisis estadístico fue la siguiente:

$$z = -3396,45 + 968,11 * x - 122,46 * x^2 + 84,64 * y - 0,91 * y^2 - 0,08 * x * y + 0,$$

Donde z es la actividad enzimática en mU/mg, x: pH e y: temperatura en °C.

Como resultado las condiciones de actividad óptimas de Cel6D fueron determinadas en 47 °C y pH 3,9. La Figura 4.9 muestra la representación tridimensional de la influencia de los dos factores. El análisis de varianza (ANOVA) mostró que todos los valores son significativos (Tabla 4.11).

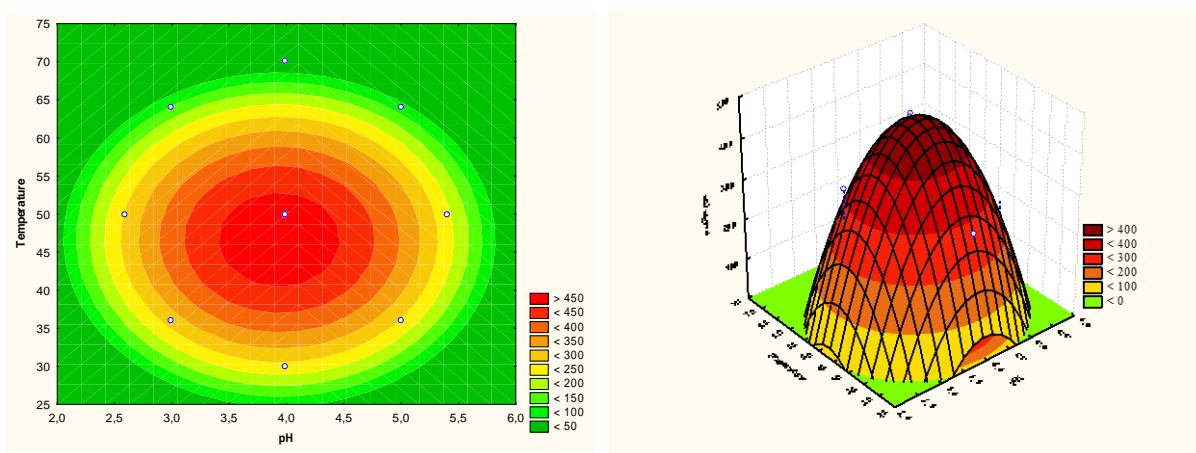


Figura 4.9. Representación gráfica de la superficie de respuesta que representa los efectos de la temperatura y pH sobre la actividad celulasa (mU/mg) de Cel6D. Los puntos representan la media de dos réplicas.

Tabla 4.11. Análisis de Varianza (ANOVA) del modelo polinomial de segundo orden para la optimización de la actividad celulolítica de Cel6D.

Factor	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media Cuadrática	F (modelo significativo)	Valor ρ
<i>pH</i> (L)	1873,8	1	1873,8	84,625	0,011611
<i>pH</i> (Q)	81924,1	1	81924,1	3699,973	0,000270
<i>Temperatura</i> (L)	56966,8	1	56966,8	2572,815	0,000388
<i>Temperatura</i> (Q)	183069,2	1	183069,2	8268,030	0,000121
<i>Error puro</i>	44,3	2	22,1		

* Factores significativos ($p < 0.05$).

Se determinaron a continuación los parámetros cinéticos de Cel6D sobre PASC al 10%. Los datos obtenidos se analizaron con el software GraphPad Prism 5. La enzima

presentó una V_{max} de 1,73 U/mg, K_m de 68,73 mg/mL y la constante catalítica (k_{cat}) de $0,22 \text{ ms}^{-1}$.

4.3.2.5. Determinación de Estabilidad

Se determinó el efecto que la temperatura en el rango de 25 a 55°C y el pH entre 2 y 10 ejerció sobre la estabilidad de la enzima. Los ensayos mostraron que Cel6D permanece estable a 25°C durante 3h de incubación a pH 4, mantiene aproximadamente el 57% de la actividad a 45°C, mientras que a 55°C se inactiva casi por completo en las mismas condiciones (Figura 4.10A). Al analizar la influencia del pH sobre la estabilidad de la enzima se observó que Cel6D retiene más del 60% de su actividad inicial tras la incubación a 47°C durante 3h en soluciones tampón a pH entre 4 y 6 (Figura 4.10B). Por el contrario se observó que a pH superiores a 6 la enzima se inactiva por completo en las mismas condiciones.

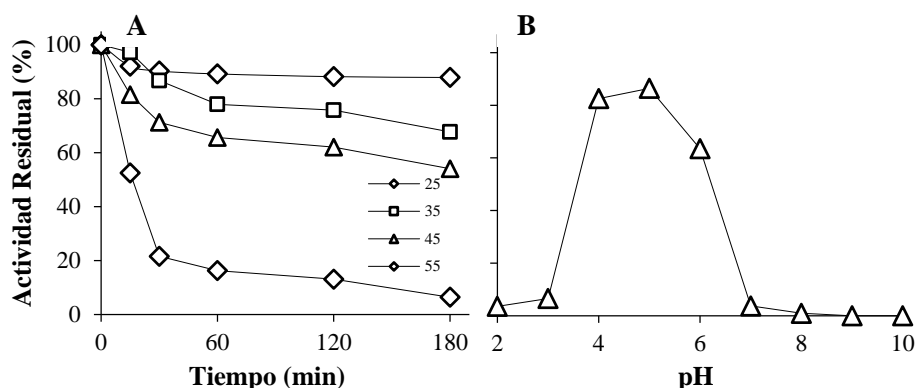


Figura 4.10. Efecto de la temperatura y pH sobre la estabilidad de Cel6D. **A:** Efecto de la Temperatura. Las muestras fueron incubadas en tampón acetato de sodio pH 4.0 y la actividad residual fue determinada a diferentes intervalos de tiempo. **B:** Efecto del pH. Las muestras fueron incubadas a 47°C en soluciones tampón a diferentes pHs por 3h y la actividad residual fue determinada.

4.3.2.6. Efecto de cationes metálicos sobre la actividad enzimática

En la Figura 4.11 se observa el efecto de distintos cationes metálicos a diferentes concentraciones (1-10 mM) sobre la actividad de Cel6D. La enzima fue inhibida completamente por Hg^{2+} . Con el resto de cationes utilizados la actividad resultó inhibida aproximadamente en un 50%. Por el contrario Ca^{2+} y Li^+ a una concentración de 1mM

colaboran con un ligero incremento en la actividad enzimática. También se analizó el efecto de distintos agentes químicos en la actividad enzimática. Los resultados mostraron una completa inhibición por Tween80, Tritón X-100 y DMSO mientras que el SDS (1mM) provocó una inhibición aproximadamente del 50%.

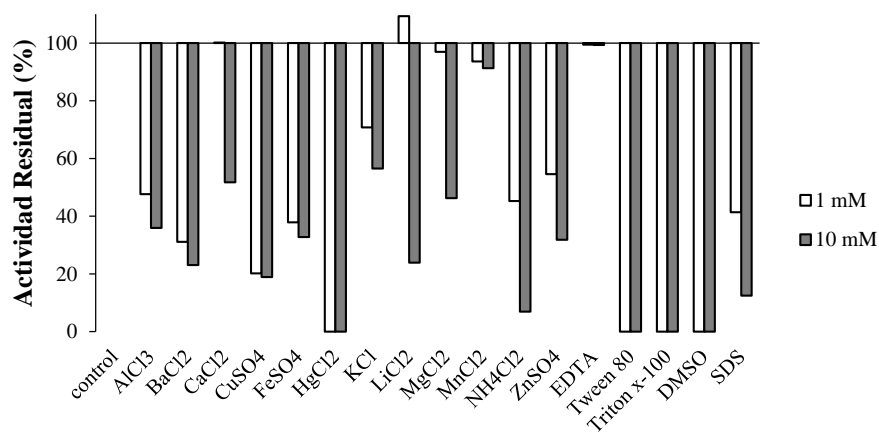


Figura 4.11. Influencia de varios aditivos sobre la actividad de Cel6D.

4.3.3. Ingeniería Proteica de la celulasa Cel6D de *Paenibacillus barcinonensis*

Tal como se mencionó anteriormente, la celulasa Cel6D es una proteína multidominio compuesta por tres tipos de dominios: un dominio catalítico de la familia 6 de las glicosil hidrolasas (GH6), un dominio de unión a celulosa de la familia 3 (CBM3) y dos dominios de unión a fibronectina tipo III (Fn3) (Figura 4.14). Se realizó un análisis de homología del módulo catalítico con celulasas caracterizadas de la familia 6 de las glicosil hidrolasas. La mayor homología encontrada fue con Cel6B de *Cellulomonas fimi* (Meinke *et al.* 1994) con la que presenta 58% de identidad. Las celulasas Cel6B de *Thermobifida fusca* YX (Zhang *et al.*, 1995), CBHII de *Streptomyces sp. M23* (Park *et al.* 2005) y Cel6A de *Trichoderma reesei* QM9414 (Fägerstam & Pettersson 1980) mostraron el 48, 47 y 34% de identidad con el dominio catalítico de la enzima clonada, respectivamente. Un análisis de homología del módulo de unión a carbohidratos CBM3 de la enzima reveló que presenta el 42% de identidad con CBM3b de *Clostridium thermocellum* (Yaniv *et al.* 2012).

Se realizó a continuación el alineamiento (Figura 4.12) con las dos celulasas más representativas de la familia 6 de las glicosil hidrolasas, Cel6A de *Trichoderma reesei* y

Cel6B de *Thermobifida fusca*. Para la determinación de los putativos residuos catalíticos de Cel6D de *Paenibacillus barcinonensis* se utilizó la descripción del centro activo de Cel6A de *Trichoderma reesei* (Rouvinen *et al.* 1990; Koivula *et al.* 1996; Koivula *et al.* 2002) que ha establecido que el centro activo de Cel6A contiene dos residuos de ácido aspártico que se encuentran involucrados directamente en la hidrólisis. Estos aminoácidos son Asp221 (D221), como el ácido catalítico, y Asp175 (D175), que afecta a la protonación de D221 y contribuye a la estabilidad en el estado de transición. Por los datos proporcionados del alineamiento de los módulos catalíticos de las dos enzimas, los putativos residuos catalíticos del centro activo de Cel6D de *Paenibacillus barcinonensis* serían los ácidos aspárticos Asp146 (D146) y Asp97 (D97), que actuarían como el ácido catalítico y el aminoácido necesario en el estado de transición.

Cel6D	-EAHVDNPFVGGATAYINQDYASLVDTSIALTSDAKLKAQMATVKSYPYAVWIDRMAAIYG	57
Cel6B	--EKVDNPFEGAKLYVNPVWS-----AKAAAEPPGGSANAVANESTAVWLDTRIGAI EG	186
Cel6A	TATYSGNPFVGVTPWANAYYASEVSSLAIPSLTGAMATAAAAVAKVPSFMWLD-----	137
	.*** *.. : * :: . . :*: . . :*:*	
Cel6D	G-AENAGRKSVVEEHLDAVLAQKKPGVPITASFVIYNLPGRDCHALASNGELPLTQAALQT	116
Cel6B	NDSPTTGSMLGRDHLEEAQRSG-GDPLTIQVVIYNLPGRDCAALASNGELGPDE--LDR	243
Cel6A	---TLDKTPLMEQTLADIRDTANKNGGNYAGQFVVDLPDRDCAALASNGEYSIADGGVAK	194
	::: * . * : ..*:*:*.*** ***** : :	
Cel6D	YKTDYIDVIADIFAN-PKYQDIRIIAIEEPD SLPNLVTNLS----TPACGQAASTGIYEA	171
Cel6B	YKSEYIDPIADIMWDFADYENLRIVAIIEID SLPNLVTNVGGNGGTELCAYMKQNGGYVN	303
Cel6A	YK-NYIDTIRQIVVE---YSDIRTLVIEPDSL ANLVTNLG----TPKCANAQS--AYLE	244
	** :*** * :*. : * .:*. : : ** ***.*****. : * * . *	
Cel6D	GVKYALDKLHAIPNVYNYLDIGHSGWLGWDNNRSGAVELYTDVVGGLGGLSSADGFITN	231
Cel6B	GVGYALRKLGEIPNVYNYIDAAHHGWIGWDSNFGPSVDIFYEAAANASGSTVDYVHGFISN	363
Cel6A	CINYAVTQLN-LPNVAMYLDAGHAGWLGWPANQDPAAQLFANVYKN-ASSPRALRGLATN	302
	: ** : * :*** *:* . * **:* * . .: : : : . . * : **	
Cel6D	TANTTPLSEPNLSNPDNLNIGGQPIRSKAFYEWNPYFDETDFTAKLYADFVQAGWPASTGF	291
Cel6B	TANYSATVEPYLD-VNGTVNGQLIRQSKWVDWNQYVDELSFVQDLRQALIAKGFERSDIGM	422
Cel6A	VANYN-----GWNITSPPSYTGNAVYNEKLYIHAIGPLL ANHGWSNAF-F	347
	.** . . : . . : : * : * : : : * : :	
Cel6D	LIDTSRNGWGGVNRP-ATATGNNINDYVNSGRVDRREHRGNWCNASGAGIGEAPKAAPGP	350
Cel6B	LIDTSRNGWGGPNRPTGPSSTDLNTYVDESRI DR IHPGNWCNAGAGLGERPTVNPAP	482
Cel6A	ITDQGRSGK-----QPTGQQWGDWCNVI GTGFGIRPSANTGD	385
	: * . * . * : : : : * : * * : * : *	
Cel6D	AHLDAYVWVKPPGESDGSSEIPNNEGKGFDRMCDPTYTTKD-----	392
Cel6B	G-VDAYVWVKPPGESDGASEEIPNDEKGFDRMCDPTYQGNARNGNPSGALPNAPISGH	541
Cel6A	SLLDSFVWVKPGGECGTS---DSSAPRFDSHCALPDALQP-----APQAGA	429
	. :*:***** **.*:* :... ** * . :	
Cel6D	-----	
Cel6B	WFSAQFRELLANAYPPL-	558
Cel6A	WFQAYFVQLLTNANPSFL	447

Figura 4.12. Alineamiento múltiple de secuencias. Cel6A de *Trichoderma reesei*, Cel6B de *Thermobifida fusca* y Cel6D de *Paenibacillus barcinonensis*. Se indica la posición correspondiente de los residuos de Cel6A de *T. reesei*. Try169 (■), Asp175, Ser181, Asp221 (residuos implicados en el ataque nucleofílico) (■), Trp272 (■), residuos implicados en la formación del túnel hidrolítico (■). Las secuencias de proteína se alinearon y se analizaron usando ClustalW2 (EMBL-EBI).

4.3.3.1. Mutagénesis dirigida

Con el fin de comprobar si los residuos mencionados, Asp146 y Asp97 de Cel6D de *P. barcinonensis*, eran necesarios para la actividad catalítica de la enzima se realizó mutagénesis dirigida por la técnica de QuickChange®, cambiándolos a alanina. Se obtuvieron los mutantes Cel6D-D97A y Cel6D-D146A, que fueron clonados en pET28a con una cola de histidinas y purificados mediante cromatografía de afinidad a níquel a partir de la fase soluble de los extractos celulares de los clones recombinantes correspondientes, *E. coli* BL21 (DE3)/pET28D97A y *E. coli* BL21 (DE3)/pET28D146A. Las muestras obtenidas fueron analizadas por SDS-PAGE (Figura 4.13). Se observó que las proteínas purificadas presentaban un tamaño molecular aparente de 84 kDa, en concordancia con el peso molecular de las proteínas maduras deducidas.

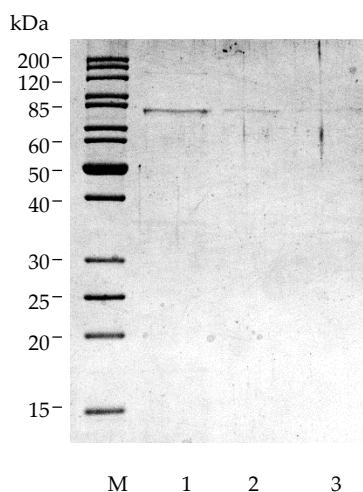


Figura 4.13. Análisis en geles de poliacrilamida con SDS de las proteínas mutantes purificadas. Cel6wt (1), Cel6D-D97A (2) y Cel6D-D146A (3). Marcador de pesos moleculares (M).

Se realizó a continuación el ensayo enzimático de actividad celulasa de las enzimas mutantes Cel6D-D97A y Cel6D-D146A purificadas. Ninguna de las dos mostró actividad sobre PASC ni sobre el resto de sustratos celulósicos analizados. Esto indica que los dos residuos de ácido aspártico mutados son esenciales para la catálisis, ya que su modificación elimina completamente la actividad enzimática.

4.3.3.2. Diseño y clonación de celulasas truncadas derivados de Cel6D

Dada la estructura modular de Cel6D se propuso construir un conjunto de proteínas derivadas, con el fin de analizar la función de los diferentes dominios en la actividad de la enzima y determinar cuál era la estructura básica para mantener una actividad comparable a la de la enzima completa. En la Tabla 4.12 se muestra la arquitectura modular de la enzima y la delimitación de sus dominios.

Tabla 4.12. Delimitación de los dominios estructurales de Cel6D de *P. barcinonensis*.

<i>Dominio</i>	<i>Delimitación (inicio y fin de dominio)</i>
<i>Péptido señal</i>	1-30
<i>Dominio catalítico GH6</i>	46-415
<i>Dominio de unión a fibronectina (Fn3)</i>	487-549
<i>Dominio de unión a fibronectina (Fn3)</i>	580-642
<i>Dominio de unión a celulosa CBM3</i>	664-737

En concreto se construyeron tres formas truncadas de la enzima con distintas combinaciones de dominios, que se representan en forma esquemática en la Figura 4.14. Para facilitar la purificación de las construcciones, se fusiono una cola de histidinas en el C-terminal de las mismas.

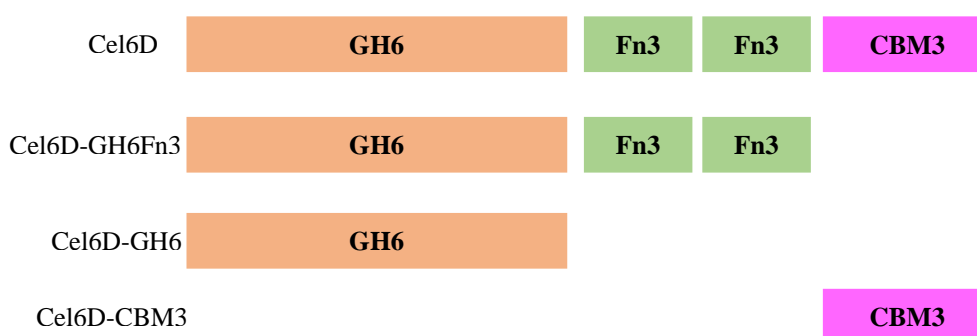


Figura 4.14. Representación esquemática de la estructura modular de Cel6D y de las proteínas truncadas construidas.

Las construcciones se realizaron mediante amplificación del ADN correspondiente con oligonucleótidos específicos que contenían los sitios de restricción para su posterior clonación. El diseño de los oligonucleótidos se realizó a

partir de la secuencia de nucleótidos y tomando en cuenta las delimitaciones de cada módulo.

Todos los fragmentos amplificados obtenidos fueron digeridos, posteriormente ligados al vector pET28a entre los sitios de restricción correspondientes y se clonaron en la cepa huésped *E. coli* DH5 α . Tras verificación de su secuencia, los plásmidos recombinantes fueron transformados en la cepa de expresión *E. coli* BL21 (DE3). Se obtuvieron los clones recombinantes *E. coli* BL21 (DE3)/pET28Cel6D-GH6Fn3, *E. coli* BL21 (DE3)/pET28Cel6D-GH6 y *E. coli* BL21 (DE3)/pET28Cel6D-CBM3. En la Tabla 4.13 se muestra el peso molecular teórico de las proteínas truncadas construidas.

Tabla 4.13. Parámetros moleculares y fisicoquímicos de las proteínas derivadas de Cel6D.

<i>Construcción</i>	<i>Peso molecular (kDa)</i>	<i>Punto isoeléctrico (pi)</i>	<i>Coficiente de extinción</i>
<i>Cel6D-GH6Fn3</i>	68,31	5,32	103960
<i>Cel6D-GH6</i>	48,00	5,05	78060
<i>Cel6D-CBM3</i>	15,55	4,25	35410

4.3.3.3. Caracterización de las celulasas truncadas

La expresión de las proteínas recombinantes se realizó mediante un cultivo en medio líquido de los clones recombinantes que se indujeron con 0,5mM de IPTG e incubaron posteriormente a 16 °C durante 16h. En el caso del clon recombinante de *E. coli* BL21 (DE3)/pET28Cel6D-GH6, que expresaba la proteína Cel6D-GH6, conteniendo únicamente el módulo catalítico, se hicieron ensayos para aumentar su expresión con otras tres concentraciones de IPTG y diferentes temperaturas de incubación y en todos los casos se obtuvo una expresión similar de la proteína.

Las celulasas truncadas fueron purificadas por cromatografía de afinidad a columnas de níquel y a continuación analizadas por SDS-PAGE. La Figura 4.15 muestra el grado de pureza de las enzimas, que presentan tamaños moleculares de 84, 69, 50 y 15 kDa en concordancia con los pesos moleculares teóricos deducidos de la secuencia de aminoácidos.

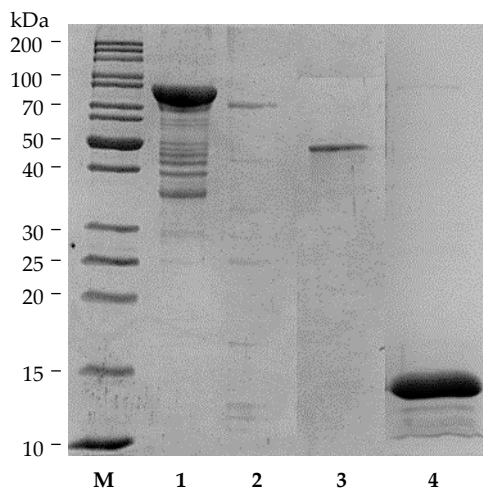


Figura 4.15. Análisis en geles de poliacrilamida con SDS de las enzimas derivadas de Cel6D. Cel6D (1), Cel6D-GH6Fn3 (2), Cel6D-GH6 (3), Cel6D-CBM3 (4), Marcador de pesos moleculares (M).

4.3.3.4. Determinación de la especificidad de sustrato

La especificidad de sustrato de las proteínas derivadas de Cel6D se determinó en las condiciones óptimas de la enzima salvaje para poder realizar una comparación posterior (Tabla 4.14).

Tabla 4.14. Especificidad de sustrato de las celulasas truncadas derivadas de Cel6D.

<i>Sustratos</i>	<i>Actividad Específica U mg⁻¹</i>		
	<i>Cel6D wt</i>	<i>Cel6D-GH6Fn3</i>	<i>Cel6D-GH6</i>
<i>PASC</i>	0,66	0,07	N.D.
<i>Avicel</i>	0,01	N.D.	N.D.
<i>RAC</i>	0,01	N.D.	N.D.
<i>CMC</i>	N.D.	N.D.	N.D.
<i>Papel filtro</i>	N.D.	N.D.	N.D.

N.D.: no detectada.

La celulasa Cel6D-GH6Fn3 que contiene el módulo catalítico y los 2 módulos Fn3, mostró una especificidad de sustrato similar al de la celulasa wt presentando únicamente actividad importante sobre PASC. Al comparar con la actividad de Cel6Dwt (Tabla 4.8), se puede observar que esta celulasa truncada pierde el 89% de actividad sobre PASC, mientras que sobre Avicel y RAC la actividad es indetectable. Estos hechos indicarían la importancia del módulo de unión a carbohidratos CBM3b para la eficiencia de la enzima. Por el contrario la celulasa Cel6D-GH6, que contiene únicamente el modulo

catalítico no muestra actividad sobre ninguno de los sustratos ensayados. Estos resultados indicarían que para que la enzima sea activa se necesita la presencia de los módulos Fn3 conjuntamente con el módulo catalítico.

4.3.3.5. Estudio de la capacidad de unión a sustratos insolubles

Se analizó la unión a polisacáridos insolubles tanto de Cel6Dwt como de la construcción Cel6D-CBM3. Se ensayó la unión en Avicel (celulosa cristalina) utilizando BSA como control. Posteriormente se analizaron por SDS-PAGE las fracciones unidas o no a los sustratos analizados (Figura 4.16). Se puede observar que la enzima wt se unió completamente a Avicel, sin aparecer ni en los lavados ni en la fracción no unida. El ensayo de unión de Cel6D-CBM3 dio resultados similares comprobándose la capacidad de unión a celulosa del módulo de unión a carbohidratos CBM3 aislado. Sin embargo se puede observar que la eficiencia de la unión es menor ya que aparecieron pequeñas cantidades de Cel6D-CBM3 en la fracción no unida y en los lavados.

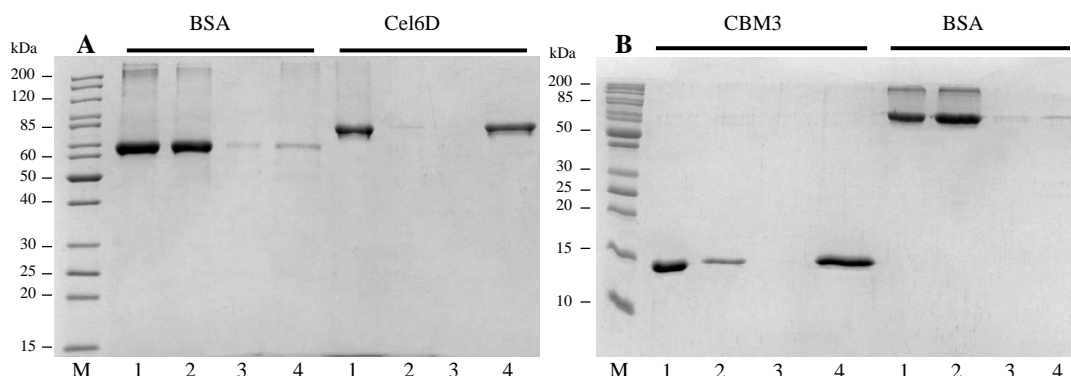


Figura 4.16. Análisis en geles de poliacrilamida con SDS de la unión a Avicel de Cel6Dwt (A) y Cel6D-CBM3 (B). Las proteínas fueron mezcladas con Avicel durante 1h a 4°C. Las fracciones unidas y no unidas fueron separadas por centrifugación. Control (1), Fracción no unida (2), Lavado (3), Fracción unida a Avicel (4), Marcador de pesos moleculares (M).

4.3.4. Estudio del sinergismo de la celulasa Cel6D con las endoglucanasas de *Paenibacillus barcinonensis*

La celulasa Cel6D pertenece al sistema degradador de celulosa de *Paenibacillus barcinonensis*. Dada la complejidad de la degradación de este polímero y de la elevada actividad celulolítica de la cepa, se procedió al estudio del efecto conjunto de las celulasas de la misma, en concreto de la acción simultánea de Cel6D con las endoglucanasas Cel9B y Cel5A, clonadas previamente en el grupo de investigación, en la despolimerización de la celulosa. Para ello se procedió en primer lugar a su producción y purificación.

4.3.4.1. Producción, purificación de Cel9B de *P. barcinonensis*

La celulasa Cel9B es una endoglucanasa procesiva de 103 kDa que presenta una estructura modular que contiene un módulo de unión a celulosa CBD3, muestra alta actividad sobre celulosa amorfa y baja sobre celulosa cristalina (Chiriac *et al.* 2010). La celulasa Cel9B desprovista de cola de histidinas se encontraba clonada en el vector pET28a, en la cepa recombinante *E. coli* BLR (DE3)/pET28aCel9Bwt. Tras su verificación se transformó el plásmido pET28aCel9Bwt en una cepa de expresión diferente *E. coli* BL21 (DE3), obteniendo la cepa recombinante *E. coli* BL21 (DE3)/pET28aCel9Bwt. Se cultivó la cepa, se obtuvieron extractos celulares y se purificó la celulasa Cel9B mediante unión a Avicel siguiendo el método descrito por Chiriac *et al.* 2010. Tal como se observa en el análisis por SDS-PAGE y zimografía se obtuvo la enzima activa con el peso molecular de 103 kDa correspondiente de Cel9B, que presentaba un alto grado de purificación (Figura 4.17).

4.3.4.2. Producción de Cel5A de *P. barcinonensis*

La celulasa Cel5A de *P. barcinonensis* es una endoglucanasa monodominio con un peso molecular de 40 kDa, que muestra actividad sobre celulosa amorfa y glucanos mixtos y es inactiva sobre celulosa cristalina (Blanco *et al.* 1998). La celulasa Cel5A se encontraba clonada en el plásmido pLATE11 y desprovista de cola de histidinas en la cepa recombinante *E. coli* DH5 α /pLATE11Cel5A. Se procedió al aislamiento del plásmido, posterior secuenciación y verificación de la secuencia de Cel5A. Se hizo la transformación del plásmido en la cepa de expresión *E. coli* BL21 (DE3). A partir de la misma se procedió a la producción de la enzima y a la obtención de extractos celulares

solubles que se analizaron por SDS-PAGE y zimograma, mostró que la producción de la enzima y expresión en forma activa fue correcta (Figura 4.18).

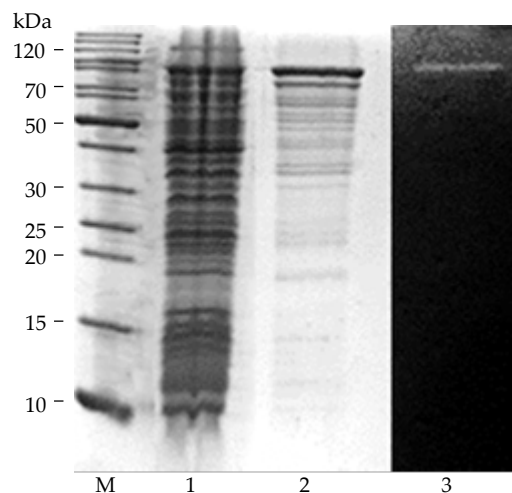


Figura 4.17. Análisis en geles de poliacrilamida con SDS de Cel9B. Extracto celular (1), Proteína purificada (2), Zimograma (3), Marcador de pesos moleculares (M).

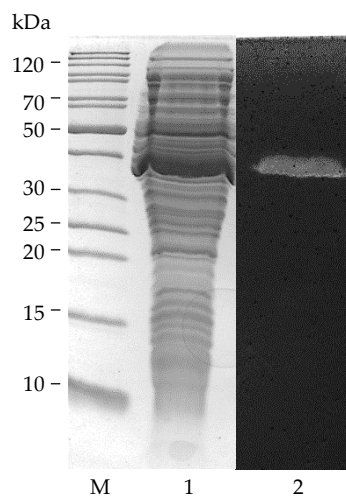


Figura 4.18. Análisis en geles de poliacrilamida con SDS de Cel5A. Extracto celular (1), Zimograma (2), Marcador de pesos moleculares (M).

4.3.4.3. Análisis del sinergismo entre Cel6D, Cel9B y Cel5A de *P. barcinonensis*

Las condiciones para realizar los estudios de sinergismo fueron establecidas atendiendo los perfiles de actividad y estabilidad de las celulasas a distintas temperaturas y pH previamente establecidas (Tabla 4.15) (Blanco *et al.* 1998; Chiriac *et al.* 2010).

Tabla 4.15. Condiciones óptimas de actividad de las celulasas utilizadas en el estudio de sinergismo.

<i>Celulasa</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Sustrato</i>	<i>pH</i>
<i>Cel5A</i>	40	CMC	4,0
<i>Cel9B</i>	55	CMC	5,5
<i>Cel6D</i>	47	PASC	4,0

(Blanco *et al.* 1998; Chiriac *et al.* 2010, presente trabajo).

Atendiendo a estos factores, en un principio el sinergismo entre Cel6D y Cel9B se evaluó a 45°C y pH 4, sobre PASC. La actividad fue medida cada hora durante 4h de incubación, no se obtuvo resultados positivos, seguramente por la baja actividad de Cel9B sobre PASC (Figura 4.19A). Por ello se establecieron las nuevas condiciones basadas en el perfil de actividad de Cel9B. En concreto se estudió la actividad simultánea de las 2 enzimas a 50°C y pH 5 durante 3h de incubación (Figura 4.19B). En estas condiciones la cantidad de azúcares reductores liberados fue mucho mayor, dado que Cel9B tiene mayor actividad en las mismas. Se observó sinergismo de las dos enzimas sobre el sustrato analizado (PASC) en las primeras horas de incubación, donde la cantidad de azúcares reductores liberados por la acción conjunta de las enzimas fue superior en más de dos veces a la suma de las actividades individuales de las enzimas en solitario.

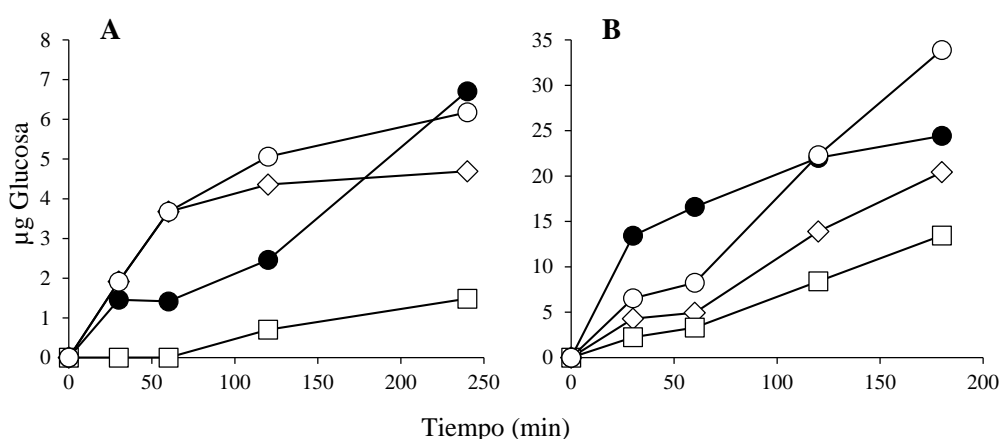


Figura 4.19. Análisis del Sinergismo sobre PASC entre Cel6D y Cel9B. Se muestra la cantidad de azúcares reductores liberada en diferentes condiciones pH 4, 45°C (A), pH 5, 50°C (B). Cel6D (◇), Cel9B (□), Cel6D+Cel9B (●), Valores Teóricos (○).

Por este motivo se ampliaron los estudios de sinergismo a otros sustratos como Avicel, papel filtro y CMC en las condiciones que fueron más adecuadas a las dos enzimas, 50°C, pH 4,0 o 5,0 y durante 1h de incubación. En los análisis a pH 4,0 se puede observar la existencia de sinergismo sobre PASC. Es destacable que sustratos como Avicel y papel filtro que no son hidrolizados de forma detectable por ninguna de las dos enzimas por separado, son despolimerizados por la acción conjunta de las dos enzimas. Sin embargo sobre CMC se observó un fenómeno opuesto, la presencia de Cel6D afecta la eficiencia de Cel9B, ya que en el tratamiento simultáneo con las dos enzimas se obtuvo únicamente el 40% de actividad de Cel9B en solitario (Figura 4.20A). En los análisis realizados a pH 5,0 muestran que los resultados del sinergismo son similares a los obtenidos anteriormente. La inhibición de Cel9B en presencia de Cel6D se mantiene ya que la actividad se ve disminuida aproximadamente en un 60% (Figura 4.20B).

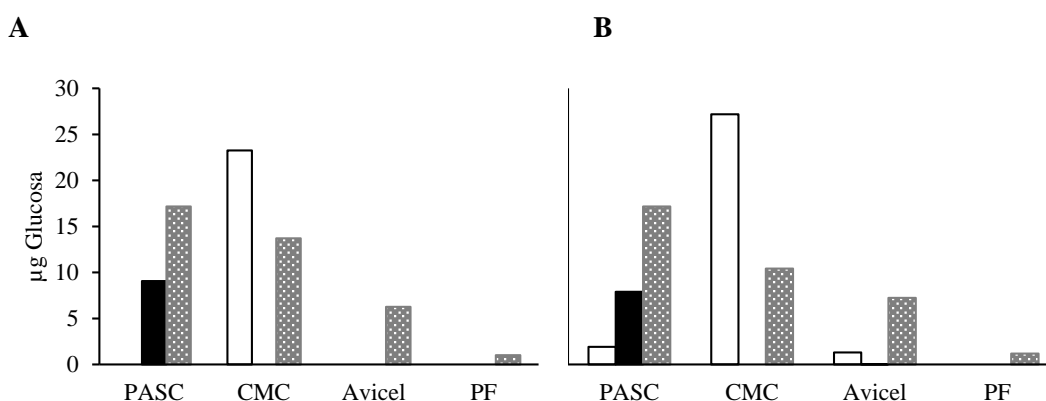


Figura 4.20. Estudio de Sinergismo entre Cel6D y Cel9B. Azúcares reductores liberados en diferentes condiciones (A) pH 4,0; (B) pH 5,0. Cel9B (□), Cel6D (■), Cel9B + Cel6D (▨).

En el estudio de sinergismo entre Cel6D y Cel5A las condiciones de ensayo fueron definidas con mayor facilidad, ya que las dos celulasas presentan pH óptimo idéntico. En cuanto a la temperatura se escogió la óptima de Cel5A, al ser la menor de los 2 enzimas, debido al perfil de termoestabilidad de las mismas. Por ello se realizaron los ensayos a 40 °C, pH 4,0, con mediciones de actividad cada hora hasta las 4h sobre PASC. Los resultados mostraron la ausencia de sinergismo entre estas dos celulasas (Figura 4.21). De hecho sugieren que las dos celulasas interfieren de forma negativa en la hidrólisis de PASC.

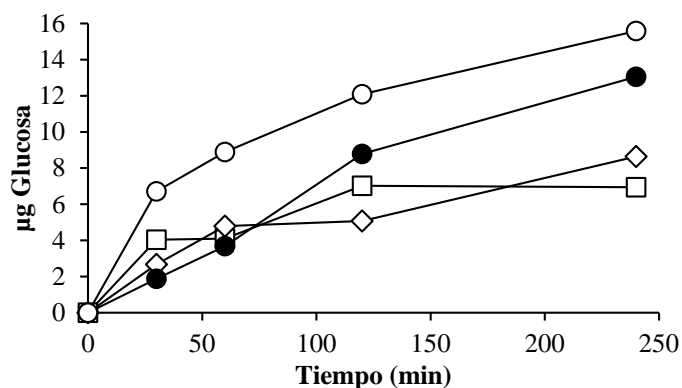


Figura 4.21. Análisis del Sinergismo sobre PASC entre Cel6D y Cel5A. Azúcares reductores liberados por la acción enzimática. Cel6D (◇), Cel5A (□), Cel6D+Cel5A (●), Valores Teóricos (○).

4.3.4. Producción de Cel6D de *Paenibacillus barcinonensis* en *Bacillus megaterium*

Los resultados descritos hasta el momento mostraron la eficiente expresión de Cel6D en *E. coli*. La enzima pese a ser originalmente de secreción, permanece en los comportamientos intracelulares de *E. coli*, al no ser este huésped un organismo secretor. Con el fin de conseguir la secreción de la celulasa recombinante y optimizar su producción se decidió evaluar su expresión en bacterias gram positivas secretoras. En concreto en *Bacillus megaterium*, huésped usado industrialmente durante más de 50 años, que por su elevada capacidad de secreción de exoenzimas puede ser utilizado como sistema de producción de proteínas recombinantes (Biedendieck *et al.* 2011). La cepa escogida *Bacillus megaterium* YYBm1 (Yang *et al.* 2006) es un huésped conveniente para la producción de proteínas intactas, ya que no posee proteasas externas y puede mantener de forma estable una variedad de vectores plasmídicos.

4.3.4.1. Clonación de Cel6D de *Paenibacillus barcinonensis*

Se escogió como plásmido vector lanzadera pMM1522, que puede replicarse en *E. coli* y *Bacillus megaterium*. El vector contiene resistencia a ampicilina para su mantenimiento en *E. coli* y resistencia a tetraciclina para selección en *Bacillus*. Contiene también un lugar de clonación múltiple precedido por un promotor inducible por xilosa (PxylA) que la cepa huésped es incapaz de utilizar como fuente de carbono.

La secuencia nucleotídica de la celulasa permitió el diseño de oligonucleótidos específicos a los que se incorporó dianas de restricción *SacI* y *KpnI* (Tabla 3.4). Con ellos

se amplificó el gen y se clonó en el vector escogido, dando lugar a la cepa recombinante *E. coli* DH5 α /pMM1522Cel6D. De esta cepa se extrajo el plásmido recombinante pMM1522Cel6D, que una vez verificada la secuencia de la celulasa se introdujo en el nuevo huésped dando lugar a la cepa recombinante *Bacillus megaterium* YYBm1/pMM1522Cel6D. Tanto la cepa recombinante como la cepa control *Bacillus megaterium* YYBm1/pMM1522, fueron cultivadas a 37°C hasta una D.O.₆₀₀ de 0,6-0,7, se añadió xilosa al 0,5% y se incubó durante 18h más a 16°C. Se centrifugaron los cultivos con el fin de separar las células, los sobrenadantes obtenidos fueron concentrados 30x por ultrafiltración y analizados por SDS-PAGE (Figura 4.22). En los sobrenadantes de la cepa recombinante se observó una banda adicional de peso molecular de 84 kDa correspondiente a Cel6D, que no aparecía en la cepa control.

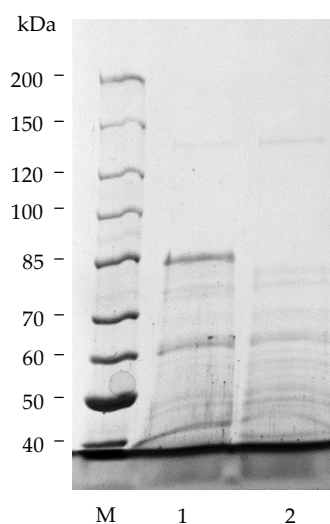


Figura 4.22. Análisis en geles de poliacrilamida con SDS de las cepas recombinantes de *Bacillus megaterium*. Sobrenadantes de *B. megaterium* YYBm1/pMM1522Cel6D (1). Sobrenadantes de *B. megaterium* YYBm1/pMM1522 (2). Marcador de pesos moleculares (M).

4.3.4.2. Producción de la celulasa Cel6D en *Bacillus megaterium*

Se determinó la actividad celulasa de los sobrenadantes concentrados de la cepa *B. megaterium* YYBm1/pMM1522Cel6D en las condiciones óptimas de la enzima sobre PASC. En los ensayos realizados no fue posible detectar la actividad por los métodos colorimétricos habituales, seguramente debido a que la xilosa utilizada como inductor

daba un fondo muy elevado de azúcares reductores y provocaba interferencia. Por este motivo y para verificar la expresión en forma activa de la enzima se realizó un análisis de los productos de hidrólisis de PASC mediante una cromatografía en capa fina (Figura 4.23). Se puede observar que la enzima clonada era activa ya que hidrolizaba el PASC, produciendo celobiosa como producto final, similarmente a lo observado con la enzima recombinante producida en *E. coli*. Sin embargo, el hecho de que sólo se apreciaban los productos de hidrólisis en tiempos largos de incubación (18h), conjuntamente con la falta de detección de la actividad por el ensayo colorimétrico, evidenciaba la baja secreción de la enzima en el nuevo huésped. Motivos por los que se descartó la posibilidad de producción de Cel6D en *Bacillus megaterium*.

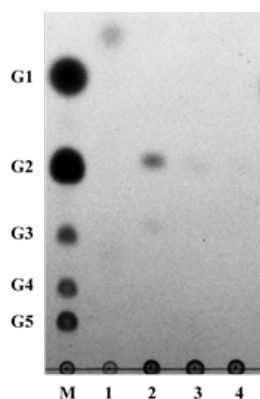


Figura 4.23. Análisis mediante cromatografía en capa fina (TLC) de los productos de hidrólisis de PASC por la enzima producida en *B. megaterium*. Sobrenadantes concentrados de *B. megaterium* YYBm1/pMM1522Cel6D se incubaron con PASC (1,6%) a 47°C y pH 4. Se tomaron muestras a tiempo 0 (1), 18h (2), 60 min (3), 30 min (4). Estándar de azúcares (M): glucosa (G1), celobiosa (G2), celotriosa (G3), celotetraosa (G4) y celopentaosa (G5).

4.4. CLONACION DE ENZIMAS MODIFICADORAS DE CELULOSA SIN ACTIVIDAD HIDROLITICA

Dado el interés de la celulosa como polímero de partida para la producción de nuevos materiales y con el fin de ampliar las posibilidades de modificación y despolimerización de la misma de forma distinta a la que realizan las celulasas, se procedió a la búsqueda de nuevos tipos de enzimas con actividad enzimática distinta a la hidrolítica. Recientemente se han descrito dos tipos de estas enzimas: las expansinas bacterianas y las monooxigenasas líticas de polisacáridos. Por estos motivos nos propusimos la identificación de estas enzimas en nuestra cepa de estudio *Paenibacillus barcinonensis* BP-23.

4.4.1. Identificación y clonación de CBP3

Las monooxigenasas líticas de polisacáridos (Lytic Polysaccharide Monooxygenases, LPMOs) constituyen un nuevo paradigma enzimático de despolimerización de polisacáridos al escindir los enlaces glucosídicos por un mecanismo de oxidación dependiente de cobre. Se han identificado dos grupos de enzimas con esta actividad uno de origen fúngico y otro de origen bacteriano. Estas últimas estaban clasificadas anteriormente en la familia 33 de módulos de unión a carbohidratos (CBM33).

4.4.1.1. Identificación de CBP3

Para iniciar el proceso de identificación de este nuevo tipo de enzimas se utilizaron oligonucleótidos degenerados (Tabla 3.5) que fueron diseñados a partir de zonas conservadas en las secuencias de LPMOs bacterianas caracterizadas depositadas en la base datos CAZy. En concreto, CBP21 de *Serratia marcescens* (Suzuki *et al.* 1998), CBP49 de *Paenibacillus larvae* ATCC 9545 (Garcia-Gonzalez *et al.* 2014) y CBD3 de *Paenibacillus sp. JDR-2* (Chow *et al.* 2012). También se utilizó para el diseño de los oligonucleótidos la hipotética chitin-binding protein de *Paenibacillus mucilaginosus* K02 ([AFH63698.1](#)). En la Figura 4.24 se muestra el alineamiento realizado y se indican las zonas conservadas.



Figura 4.24. Alineamiento múltiple de secuencias. CBP49 de *Paenibacillus larvae* ATCC 9545, CBP (chitin-binding protein) de *Paenibacillus mucilaginosus* K02, CBP21 de *Serratia marcescens*, CBD3 de *Paenibacillus sp. JDR-2*. Se muestran las zonas conservadas y los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de amplificación. CBM33-1Fw/CBM33-1Rv (■), CBM33-2Fw/CBM33-2Rv (■), CBM33-3Fw/CBM33-3Rv (■).

Se diseñaron un conjunto de 3 pares de oligonucleótidos degenerados a partir de las zonas más conservadas, y se realizaron amplificaciones por PCR con 8 diferentes combinaciones de los oligonucleótidos y 5 temperaturas diferentes de hibridación entre 45 y 65°C (Tabla 4.16). En las amplificaciones con ADN de *Paenibacillus barcinonensis* no se obtuvo ningún resultado positivo en ninguna de las combinaciones de oligonucleótidos y temperaturas de amplificación utilizadas. Por este motivo y dado el gran interés por este tipo de enzimas se decidió ampliar la búsqueda de las mismas en otras cepas microbianas de la colección propia del grupo de investigación.

Las cepas escogidas fueron *Bacillus BP-7* cepa aislada de suelos de arrozal de Delta de Ebro y *Paenibacillus illinoisensis* C37, *Paenibacillus favisporus*, y *Paenibacillus flavisporus*, cepas aisladas de suelos semiáridos de São João do Cariri en colaboración con el Dr. Itácio Padilha del Centro Biotecnológico de la Universidad Federal de Paraíba, João Pessoa, Brasil. En ellas se probaron las 8 combinaciones de oligonucleótidos con las 5 temperaturas diferentes de hibridación mencionadas. Se obtuvo resultado positivo de amplificación con la cepa *Paenibacillus illinoisensis* C37. En concreto se amplificó un fragmento de 269 pb que mostró un 68% de identidad de

secuencia con una región interna del gen codificante de la enzima *chitin_bind_3* de *Paenibacillus assamensis* (Saha *et al.* 2005). La secuencia completa del gen de *Paenibacillus illinoisensis* C37 fue obtenida por la técnica de *Gene Walking* mediante el uso de oligonucleótidos diseñados a partir del fragmento conocido. Se obtuvieron varias bandas de amplificación, fueron secuenciadas, analizadas y ensambladas en un contig de 3117 pb. A partir de este contig con el uso del software *ORF Finder* se identificaron dos marcos abiertos de lectura (ORF) de 1191 y 687 pb. El análisis de la secuencia de los mismos dio como resultado 56% de identidad con CBP21 de *Serratia marcescens* (Suzuki *et al.* 1998) y 24% con CelS2 de *Streptomyces coelicolor* A3 (Forsberg *et al.* 2011) para el primer ORF y 50% de identidad con Levodione Reductase de *Corynebacterium aquaticum* M-13 para el segundo. El marco abierto de lectura con homología al codificante de CBP21 fue nombrado *cbp3* de *Paenibacillus illinoisensis* C37 y seleccionado para continuar la investigación.

Tabla 4.16. Combinaciones de oligonucleótidos en las amplificaciones por PCR para la identificación de CBP3.

Combinaciones		Temperaturas de Hibridación (°C)
CBM33-1Fw	CBM33-1Rv	45
	CBM33-2Rv	50
	CBM33-3Rv	55
		60
		65
CBM33-2Fw	CBM33-1Rv	45
	CBM33-2Rv	50
	CBM33-3Rv	55
		60
		65
CBM33-3Fw	CBM33-1Rv	45
	CBM33-3Rv	50
		55
		60
		65

4.4.1.2. Clonación, expresión y purificación de CBP3 de *Paenibacillus illinoisensis*

Una vez obtenida la secuencia del gen *cbp3* se amplificó el mismo y se clonó en *E. coli* en el vector pET28a para expresar la proteína codificada fusionada a una cola de

histidina en el extremo C-terminal. Se obtuvo la cepa recombinante *E. coli* BL21 (DE3)/pET28aCBP3 que fue cultivada, se obtuvieron los extractos celulares y se purificó la enzima CBP3 mediante cromatografía de afinidad a níquel. El análisis por SDS-PAGE de la proteína obtenida reveló que aunque la purificación no había sido a homogeneidad, se obtuvo una banda muy mayoritaria con un tamaño aparente de 50 kDa, correspondiente al peso molecular teórico de la proteína madura (Figura 4.25).

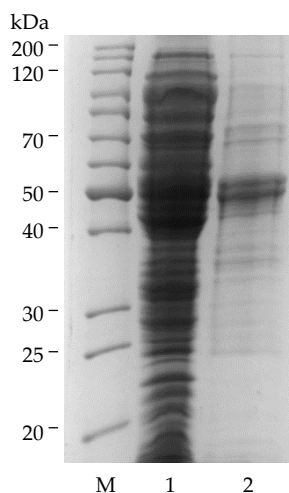


Figura 4.25. Análisis en geles de poliacrilamida con SDS de extractos de *E. coli* BL21 (DE3)/pET28aCBP3. Extracto celular fase soluble (1), CBP3 parcialmente purificado mediante cromatografía de afinidad a níquel IMAC- FPLC (2). Marcador de pesos moleculares (M).

4.4.1.3. Análisis de actividad monooxigenasa de CBP3

Se analizó la actividad enzimática de CBP3 sobre sustratos celulósicos (PASC, RAC, Avicel, CMC) y quitina utilizando los métodos de ensayo estandarizados publicados para las enzimas CBP21, que oxida β -quitina (Vaaje-kolstad 2010), y CelS2, que oxida sustratos celulósicos insolubles (Forsberg *et al.* 2011).

El análisis de los productos solubles liberados de los diferentes sustratos por CBP3 de *Paenibacillus illinoisensis* C37 fue realizado mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF MS). En la Figura 4.26 se puede observar los pesos moleculares de los productos liberados de PASC y en la Figura 4.27 los productos liberados de β -quitina. Se observó que los productos obtenidos no correspondían a los pesos moleculares de los celooligosacáridos o quitooligosacáridos oxidados liberados por las enzimas CelS2 y CBP21 respectivamente, enzimas utilizadas como referencia (Tabla 4.17). El peso

molecular de los productos observados tampoco correspondía al de los oligosacáridos que se liberarían si la enzima tuviera actividad hidrolítica. Se observaron los mismos resultados con el resto de los sustratos celulósicos ensayados. Al repetir los ensayos en varias de las condiciones publicadas para este tipo de enzima tampoco se obtuvo ningún resultado positivo.

Estos resultados eran indicativos que la enzima clonada no despolimerizaba los sustratos ensayados o alternativamente no se había sido capaz de reproducir las condiciones de los ensayos descritos en las publicaciones mencionadas.

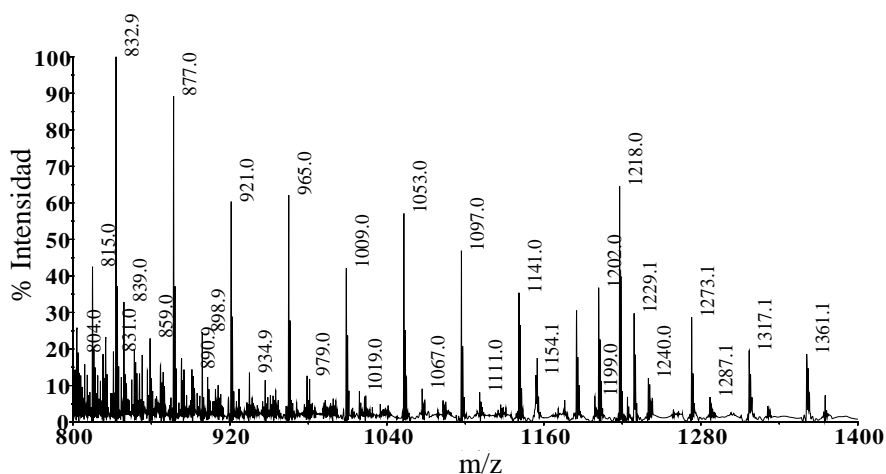


Figura 4.26. Análisis de productos de oxidación/hidrólisis de CBP3 por MALDI-TOF sobre PASC.

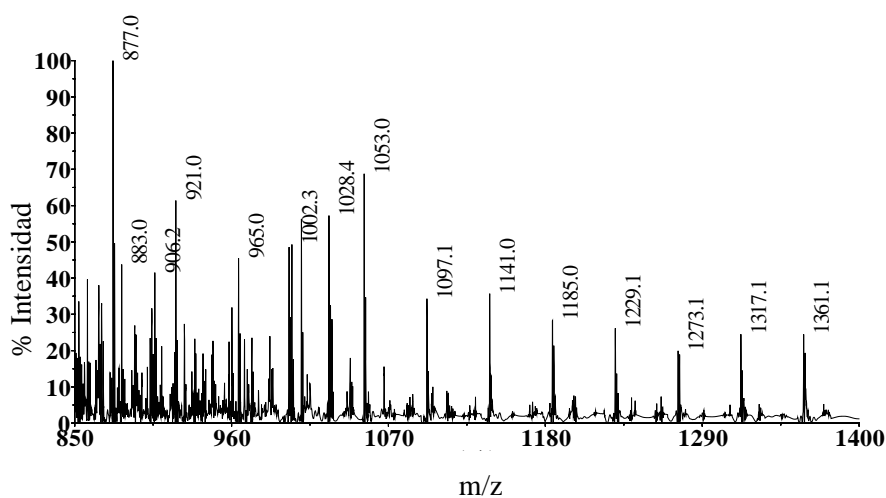


Figura 4.27. Análisis de productos de oxidación/hidrólisis de CBP3 por MALDI-TOF sobre β -quitina.

Tabla 4.17. Oligosacáridos oxidados resultantes de la acción de CelS2 sobre PASC y CBP21 sobre β -quitina identificados por MALDI-TOF MS.

Grado de Polimerización	m/z	
	Celo-oligosacáridos	Quito-oligosacáridos
DP4 _{OX}	721,02	869,31
DP5 _{OX}	883,08	1072,38
DP6 _{OX}	1045,14	1275,47
DP7 _{OX}	1207,20	1478,54
DP8 _{OX}	1369,24	1681,64
DP9 _{OX}	1531,30	1884,70
DP10 _{OX}	1693,36	2087,77

(Vaaje-Kolstad *et al.* 2010; Forsberg *et al.* 2014b).

4.4.2. Producción y Purificación de la expansina BsEXLX1 de *Bacillus subtilis* 497

Las expansinas son proteínas que debilitan los enlaces no covalentes de los polisacáridos de la pared celular (Cosgrove 2000). Se postula que su actividad se centra en la ruptura de enlaces de hidrógeno en las fibras de celulosa o entre la celulosa y otros polisacáridos, utilizando un mecanismo no catalítico. Aunque la expansinas son básicamente de origen vegetal, recientemente se ha descubierto en *Bacillus subtilis* 168 una enzima bacteriana homóloga, con estructura similar a la β -expansina de maíz (Kerff *et al.* 2008; Kim *et al.* 2009). La enzima, denominada BsEXLX1, puede facilitar la degradación de la biomasa celulósica mediante efectos sinérgicos con celulasas (Chen *et al.* 2015).

Con el fin de identificar enzimas homólogas a la expansina de *Bacillus subtilis* se diseñaron oligonucleótidos específicos con los que se realizaron reacciones de amplificación usando como molde ADN genómico de *Paenibacillus barcinonensis*, así como del resto de cepas del género *Paenibacillus* existentes en la colección del grupo. Los resultados de amplificación fueron negativos en todos los casos. Por este motivo, y para poder disponer de una expansina para su posterior evaluación, se optó por clonar la enzima ya conocida a partir de la cepa *Bacillus subtilis* 497. La enzima BsEXLX1 fue clonada en el vector pET101 dando lugar a la cepa recombinante *E. coli* BL21 (DE3)/pET101BsEXLX1, que expresaba la expansina fusionada a una cola de histidinas

en el C-terminal. Se obtuvieron extractos celulares de la cepa recombinante y se purificó la expansina mediante cromatografía de afinidad a níquel. En el análisis por SDS-PAGE (Figura 4.28) se observó que la expansina fue purificada a homogeneidad dando lugar a una banda con un tamaño aparente de 30 kDa correspondiente al peso molecular teórico esperado.

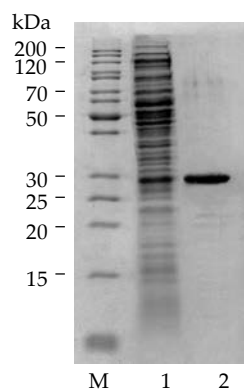


Figura 4.28. Análisis en geles de poliacrilamida con SDS de BsEXLX1. Extracto celular soluble (1), BsEXLX1 purificada (2). Marcador de pesos moleculares (M).

Las enzimas CBP3 y BsEXLX1 fueron producidas a partir de cultivos de 3 L en los medios correspondientes y purificadas con el fin de realizar pruebas sobre sustratos celulósicos para evaluar su efecto en las propiedades de los mismos. Los resultados serán detallados en el siguiente capítulo.

4.5. EVALUACION DE ENZIMAS CON ACTIVIDAD SOBRE CELULOSA EN PROCESOS DE REFINADO DE PASTA DE PAPEL

En la fabricación de papel, el proceso de refinado de las pastas es una operación fundamental para obtener papeles de elevada resistencia. La acción mecánica que se genera sobre las fibras provoca varios efectos primarios y secundarios que son requeridos en la fabricación de papel de calidad (Gharehkhani *et al.* 2015). Los objetivos generales del proceso de refinado son aumentar la capacidad de las fibras para establecer vínculos entre ellas con el fin de producir hojas de papel con una elevada resistencia mecánica y mejores propiedades de impresión. También son objetivos acortar las fibras demasiado largas para mejorar la formación (homogeneidad de la hoja) y desarrollar propiedades de la hoja tales como la absorbancia, la porosidad y la opacidad.

La aplicación de xilanasas y celulasas de *Paenibacillus barcinonensis* genera gran interés debido a que varias de ellas han sido ensayadas sobre distintos sustratos papeleros, y en diferentes etapas del proceso de fabricación de papel, mostrando su efectividad biotecnológica.

Investigaciones previas en procesos de refinado convencional estudiaron el efecto de la aplicación de la celulasa Cel9B de *Paenibacillus barcinonensis* sobre pastas kraft ECF y TCF de eucalipto (*Eucalyptus globulus*). Se observó que el uso de esta celulasa generaba respuesta positiva en el refinado, ya que producía mejoras considerables en las propiedades mecánicas de las hojas obtenidas y permitía por ello importantes ahorros en el consumo de energía (Cadena *et al.* 2010; García *et al.* 2002). De la misma manera se observó que la aplicación de Cel9B sobre pasta de papel TCF de lino (*Linum usitatissimum*) producía mejoras en las propiedades físicas de las pastas y del papel (García-Ubasart *et al.* 2013).

Teniendo en cuenta los resultados positivos obtenidos con Cel9B en procesos de refinado convencional en pasta de papel, se evaluó la actividad de la nueva celulasa Cel6D sobre pastas de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) y lino (*Linum usitatissimum*). Debido al interés que existe en la modificación de materiales celulósicos se valoró también la posibilidad de modificar las fibras con la aplicación de las enzimas no hidrolíticas mencionadas en el capítulo anterior, CBP3 y BsEXLX1. En todos los casos se utilizaron las enzimas purificadas tal como se detalla anteriormente.

4.5.1. Aplicación de las nuevas enzimas en pastas de papel

Se estudió el efecto que la aplicación de la celulasa Cel6D de *Paenibacillus barcinonensis*, la expansina BsEXLX1 de *Bacillus subtilis* 497 y la hipotética LMPO CBP3 de *Paenibacillus illinoisensis* C37, producían sobre fibras ECF de eucalipto y lino. Dados los resultados positivos previos con la celulasa Cel9B se utilizó esta enzima como control del estudio.

4.5.1.1. Liberación de azúcares reductores

En el primer lugar se determinó la liberación de azúcares reductores a partir de las pastas por las enzimas mencionadas. La concentración proteica y las unidades de actividad enzimática utilizadas (U) se muestran en la Tabla 4.18. Las condiciones del ensayo fueron 50°C, pH 5 y 18h de incubación, que son similares a las utilizadas previamente en los estudios de sinergismo entre las dos celulasas.

Tabla 4.18. Concentración de las enzimas recombinantes utilizadas en los ensayos.

Enzima	Concentración		Unidades (U)/gps
	(mg/ml)	(picomoles/ml)	
<i>Cel9B</i>	0,364	3,40	10
<i>Cel6D</i>	0,338	4,03	6
<i>BsEXLX1</i>	0,170	6,40	-
<i>CBP3</i>	0,28	5,60	-

La cantidad de azúcares reductores liberados por las enzimas mencionadas expresada en μg glucosa/gps se muestran en la Tabla 4.19. Los datos obtenidos mostraron que Cel9B liberaba mayor cantidad de azúcares en la pasta de eucalipto en comparación con Cel6D. Sin embargo la cantidad de azúcares reductores liberados de la pasta de lino por las dos celulasas fue comparable, aunque la eficiencia de Cel6D en esta pasta fue ligeramente superior. La aplicación conjunta de las dos celulasas produjo un efecto sinérgico, ya que se puede apreciar una liberación de azúcares superior de 1,5 a 2,5 veces la suma de los liberados por las celulasas de forma individual. La LMPO

CBP3 liberó una cantidad menor de azúcar reductor de las dos muestras de pasta de papel. La liberación de azúcar de las pastas contrasta con la falta de actividad de la enzima sobre celulosas de laboratorio y está seguramente relacionada con las diferencias de composición entre los dos tipos de sustratos. Por el contrario la expansina BsEXLX1 no liberó azúcares reductores de ninguna de las dos pastas, en concordancia con lo descrito en bibliografía.

Tabla 4.19. Azúcares reductores liberados de los tratamientos con las enzimas.

<i>Tratamiento</i>	<i>μg Glucosa/ gps</i>	
	<i>Eucalipto ECF</i>	<i>Lino ECF</i>
<i>Control</i>	-	-
<i>Cel9B</i>	219	301
<i>Cel6D</i>	76	321
<i>Cel9B + Cel6D</i>	432	1586
<i>BsEXLX1</i>	-	-
<i>CBP3</i>	76	49

4.5.1.2. Análisis de productos de reacción por cromatografía en capa fina

Para conocer los productos liberados de las pastas por las enzimas ensayadas se efectuó un análisis de los mismos mediante cromatografía en capa fina. Se realizó el tratamiento con la dosificación de las enzimas mencionada anteriormente y pastas al 10% de consistencia. En la Figura 4.29 se observan los productos liberados por las enzimas a partir de pasta de lino. Se obtuvo como resultado que los azúcares que se liberan por tratamiento con Cel9B fueron celotriosa, celobiosa y glucosa, mientras que en el caso de Cel6D se obtuvo como único producto de hidrólisis celobiosa. En el tratamiento con las dos celulasas se vio una mayor liberación de celobiosa, hecho que indica un efecto sinérgico entre las dos enzimas.

En los tratamientos de la pasta de eucalipto únicamente se observó liberación de celobiosa, tanto en los tratamientos con Cel9B como como Cel6D. Similarmente a la pasta de lino existió un efecto sinérgico entre las celulasas, observándose una mayor liberación de celobiosa (Figura 4.30).

El análisis mediante cromatografía en capa fina no mostró ningún producto liberado por CBP3 y ni por BsEXLX1 a partir de las pastas de lino y eucalipto (Figura 4.29, Figura 4.30). Sin embargo, al comparar con los resultados obtenidos anteriormente de azúcares reductores liberados por CBP3, la falta de productos detectables por TLC se podría deber a que los fragmentos liberados por CBP3 son de gran longitud y no son capaces de migrar en la placa de sílice usada como soporte cromatográfico. La falta de productos de reacción enzimática de BsEXLX1 concuerda con la falta de liberación de azúcar reductor comentado anteriormente.

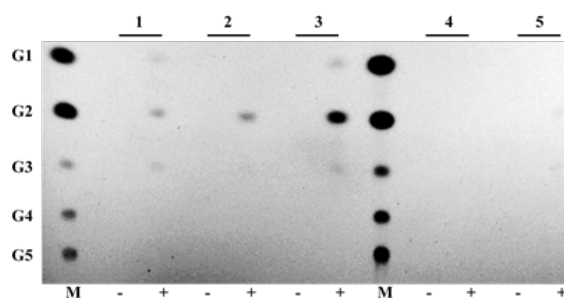


Figura 4.29. Análisis mediante cromatografía en capa fina (TLC) de los productos liberados de la pasta de papel de lino por las enzimas. Control sin enzima (-), Tratamiento enzimático (+). Cel9B (1), Cel6D (2), Cel9B + Cel6D (3), CBP3 (4), BsEXLX1 (5). Estándar de azúcares (M): glucosa (G1), celobiosa (G2), celotriosa (G3), celotetraosa (G4) y celopentaosa (G5).

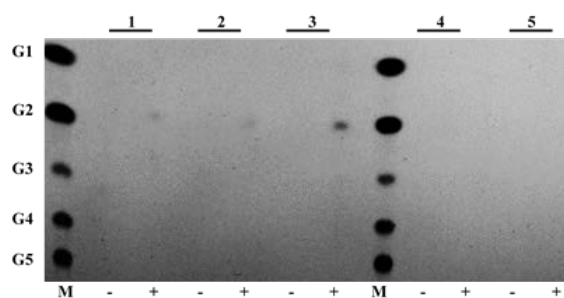


Figura 4.30. Análisis mediante cromatografía en capa fina (TLC) de los productos liberados de pasta de papel de eucalipto por las enzimas. Control sin enzima (-), Tratamiento enzimático (+). Cel9B (1), Cel6D (2), Cel9B + Cel6D (3), CBP3 (4), BsEXLX1 (5). Estándar de azúcares (M): glucosa (G1), celobiosa (G2), celotriosa (G3), celotetraosa (G4) y celopentaosa (G5).

4.5.1.3. Análisis de la morfología de las fibras

Se analizó la morfología de las fibras mediante micrografías tridimensionales de alta resolución obtenidas con la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM). Se analizaron las fibras de los controles y de cada uno de los tratamientos de los dos tipos de pasta de papel.

En la Figura 4.31 se pueden observar las fibras de las pastas de lino de los diferentes tratamientos. Las fibras del tratamiento con Cel9B (Figura 4.31B) se observó que la enzima desprende de la superficie de la fibra unas pequeñas fibrilaciones que no están presentes en el control (Figura 4.31A). Las micrografías del tratamiento con la celulasa Cel6D (Figura 4.31C) revelan que la acción enzimática acelera los cambios morfológicos en las fibras, ya que produjo una fibrilación superficial mucho mayor que en el caso de Cel9B. Una vez más con esta prueba se comprobó que existe un efecto sinérgico entre las celulasas. Se observó que la fibrilación superficial de las pastas de lino era superior a la causada por las celulasas de forma individual (Figura 4.31D), en concordancia con el efecto sinérgico encontrado en la liberación de azúcar. Las pastas tratadas con BsEXLX1 mostraron una morfología diferente al control y a las fibras tratadas con las celulasas. Estas fibras parecían tener una anchura mayor, por lo que se podría decir que la estructura y morfología de las fibras fue modificada (Figura 4.31E). En cuanto a las fibras tratadas con CBP3, se observaron también cambios importantes en la morfología y el aspecto de las fibras (Figura 4.31F).

Las micrografías de las fibras de las pastas de papel de eucalipto se muestran en la Figura 4.32. En ninguno de los tratamientos realizados tanto con las celulasas como con CBP3 y BsEXLX1, se observaron cambios importantes en la superficie de las fibras. Las micrografías mostraron que las fibras tratadas eran muy similares a las del control.

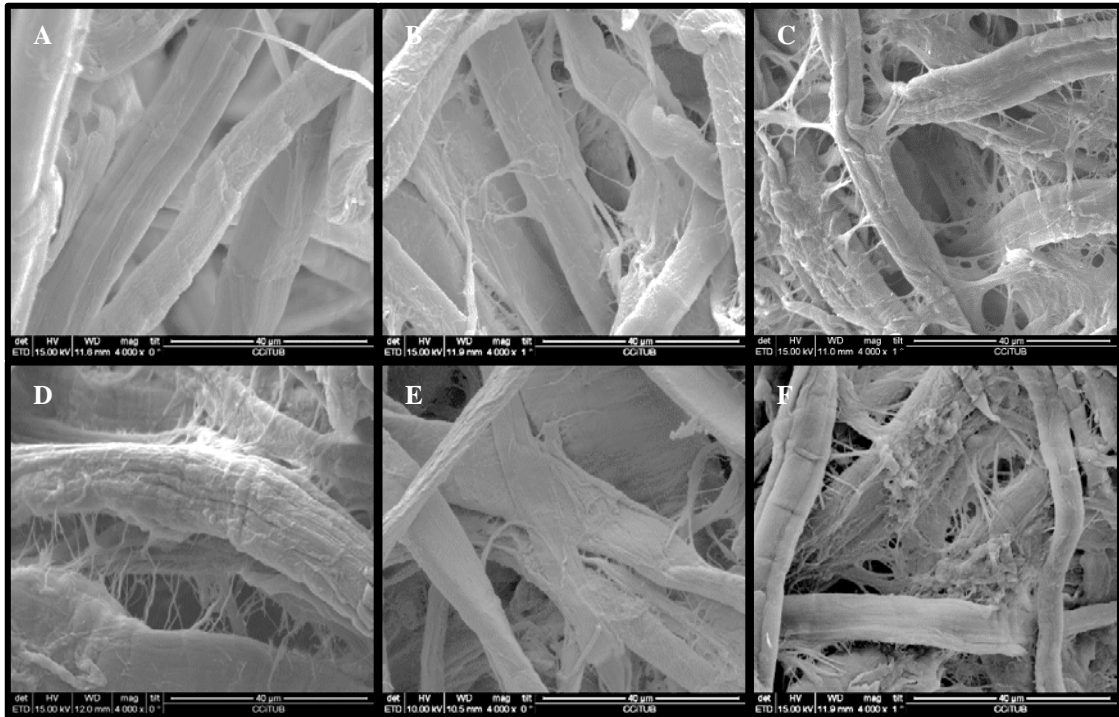


Figura 4.31. SEM de las fibras de pasta de lino tratadas con enzimas. Control (A), Cel9B (B), Cel6D (C), Cel9B + Cel6D (D), BsEXLX1 (E), CBP3 (F).

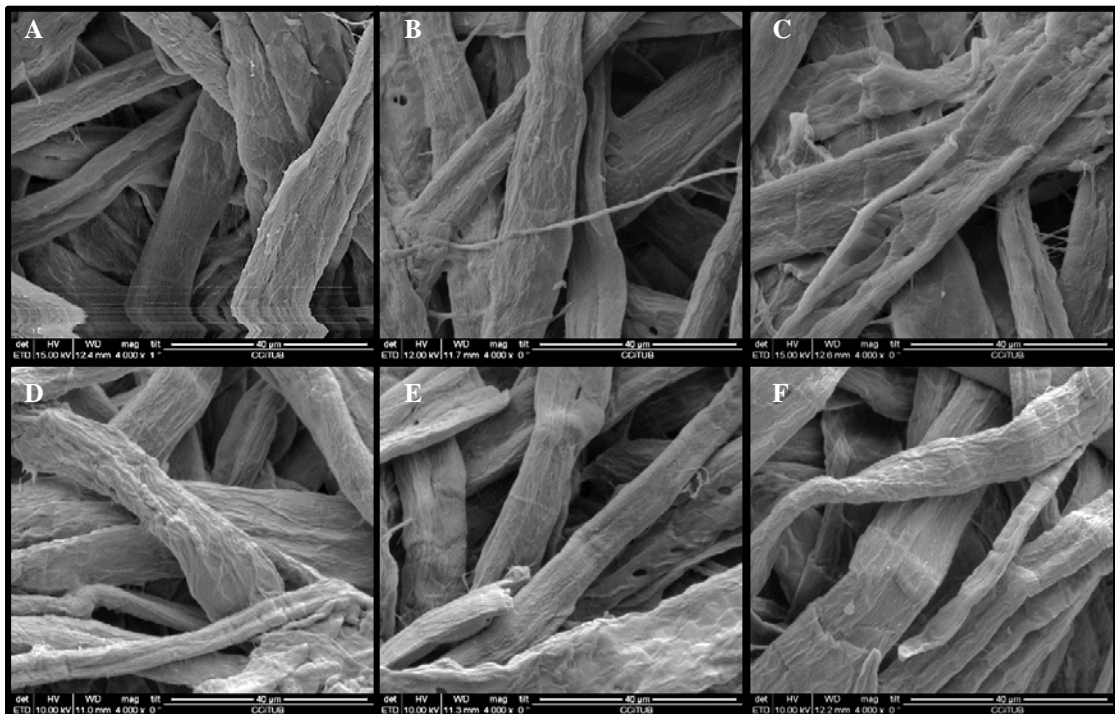


Figura 4.32. SEM de las fibras de pasta de eucalipto tratadas con enzimas. Control (A), Cel9B (B), Cel6D (C), Cel9B + Cel6D (D), BsEXLX1 (E), CBP3 (F).

4.5.2. Acondicionamiento de la pasta de lino y definición de las condiciones de aplicación

Dado el notable efecto modificador que producían las dos celulasas ensayadas en la pasta de lino, se procedió a evaluar su efectividad como adyuvantes en el refinado. La complejidad de los ensayos propuestos hizo posponer para trabajos futuros el ensayo paplero de las enzimas CBP3 y BsEXLX1.

En primer lugar se realizaron unos estudios preliminares para poder definir las condiciones de aplicación de las celulasas Cel6D y Cel9B.

4.5.2.1. Prerrefino de la pasta de papel de lino

La característica principal de las fibras de lino es que son muy largas, con tamaños que varían entre 10 y 55 mm de largo, y entre 12 y 30 μm de ancho (Garcia-Hortal 1993). Siendo esta característica uno de los principales problemas en las operaciones de refinado en el molino PFI, debido a que estas fibras no permiten la formación de una pasta homogénea en el interior del tambor del molino, provocando daños y descalibración de las cuchillas del molón. Por esta razón se realizó un acondicionamiento inicial (prerrefinado) en la pila Valley o pila holandesa, que es un equipo que permite homogenizar la pasta antes de someterla a procesos de refinado en el molino PFI. Según la norma ISO 5264-1 este acondicionamiento se utiliza como etapa preliminar al refino de varias fibras, especialmente el lino.

La presión de refino en la pila Valley es ajustable por medio de pesas, el primer acondicionamiento (prerrefino) que se realizó fue con un peso de 5,5 kg durante 10 min. A continuación se realizó el primer punto de refino en el molino PFI a 1500 rev PFI. Para evaluar el acondicionamiento y el refinado se analizaron dos parámetros: °SR (muestra el grado de refino o la resistencia al desgote) y el Índice de Retención de Agua (%IRA), que es un parámetro que describe directamente la capacidad de hidratación e incremento en la superficie específica de las fibras (Milichovsky & Adamkova 1996). Ambos parámetros se incrementan durante el refinado y por ello son dos formas de medir el nivel de refinado de la pasta. En la Tabla 4.20 se detallan las características de la pasta inicial, pasta prerrefinada y pasta refinada a 1500 rev PFI. Los resultados mostraron que el acondicionamiento inicial ya provocó el refinado de la pasta, es decir el acondicionamiento fue en condiciones muy drásticas. Por ello se decidió realizar un

nuevo acondicionamiento de la pasta con el menor peso posible en la pila Valley (2,2 kg). Se hicieron mediciones de °SR progresivas durante el acondicionamiento en la pila. Entre los diferentes tiempos del tratamiento se escogió el acondicionamiento durante 40 min por dar lugar a valores de °SR y %IRA similares al de la pasta inicial sin prrefinado (Tabla 4.20). Por este motivo se eligió el tratamiento con 2,2 kg durante 40 min como condición para acondicionar la pasta sin refinarla, para su posterior tratamiento en el molino PFI. La pasta acondicionada fue el punto de partida para empezar con los tratamientos enzimáticos y la definición de los puntos de refino en el molino PFI.

Tabla 4.20. °SR y %IRA del acondicionamiento inicial de la pasta de papel de lino.

<i>Peso Pila Valley (kg)</i>	<i>Tiempo (min)</i>	<i>rev PFI</i>	<i>°SR</i>	<i>IRA (%)</i>
0 (pasta inicial)	-	-	39,0	96
5,5	10	-	63,5	129
		1500	67,5	132
2,2	10	-	32,5	N.D
	20	-	32,0	N.D
	40	-	39,5	116

N.D: no determinado.

4.5.2.2. Definición de la dosificación de Cel9B

Para producir las cantidades necesarias de Cel9B y Cel6D para los ensayos papeleros se realizaron cultivos en fermentador de 50 L de los clones recombinantes *E. coli* BLR (DE3)/pET28aCel9B y *E. coli* BL21 (DE3)/pET28aCel6D en el Servicio de Fermentación de la Universidad de Barcelona. A partir de los mismos se produjeron los extractos celulares que fueron aplicados a las fibras. Se obtuvieron un total de 21.900 U de Cel9B y 129 U de Cel6D.

Con el fin de optimizar la dosificación enzimática y la duración del tratamiento enzimático se realizaron ensayos previos en distintas condiciones de aplicación de

Cel9B (Tabla 4.21). A continuación las pastas se refinaron en el molino PFI y se determinaron sus propiedades.

Tabla 4.21. Dosificación y tiempos de incubación de Cel9B sobre pastas de papel de lino.

<i>Parámetros</i>	<i>Cel9B</i>		
<i>Dosis U/gps</i>	10	2,5	2,5
<i>pH</i>	5		
<i>Temperatura (°C)</i>	50		
<i>Tiempo de incubación (h)</i>	2	2	1

En cuanto a la resistencia al desgote °SR se puede observar que aumenta en las pastas tratadas con Cel9B. Las pastas tratadas con enzima (2,5U/gps) sin refinar, mostraron un °SR incrementado el 82% con respecto al control sin refinar (Figura 4.33). Los valores más altos °SR se obtuvieron con el tratamiento con 10U/gps de Cel9B. Los tratamientos con 2,5U/gps durante 1 o 2h de incubación dieron valores similares. Se observó también que no había diferencias significativas entre pastas tratadas con 2,5U/gps durante 1h y refinadas a 500 o 1500 rev PFI.

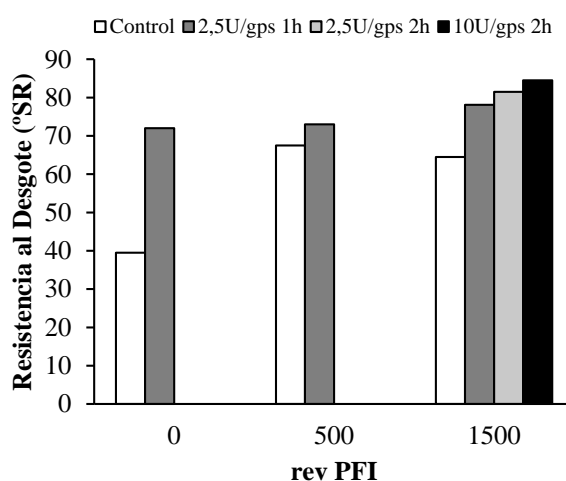


Figura 4.33. Resistencia al desgote (°SR) de las pastas en función del tratamiento enzimático con Cel9B e intensidad de refino.

El tratamiento con Cel9B también aumentó el %IRA. Los valores obtenidos con 10U/gps fueron muy elevados, hecho que indica que la superficie de la fibra estaba

modificada en exceso. Por otra parte el tiempo de tratamiento con 2,5U/gps no produjo diferencias significativas y en cuanto al tratamiento con 2,5U/gps durante 1h se obtuvieron comportamientos similares en el refinado de 500 y 1500 rev PFI (Figura 4.34).

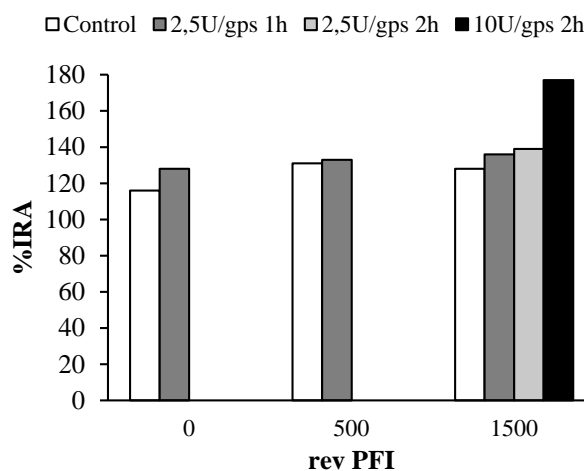


Figura 4.34. %IRA de las pastas en función del tratamiento enzimático con Cel9B e intensidad de refinado.

Uno de los efectos secundarios que genera el proceso de refinado es el acortamiento de la fibra y la formación de finos. En la Tabla 4.22 se detalla la longitud de la fibra y el porcentaje de finos de las distintas muestras tratadas con Cel9B. Se observó que el tratamiento con 10U/gps y refinado a 1500 rev PFI acortó la longitud de las fibras en un 14% con respecto al control y aumentó la formación de finos. El tratamiento con 2,5U/gps durante 1h provocó una pérdida del 4% de la longitud inicial de la fibra y el porcentaje de finos aumentó de 1-2% dependiendo de la intensidad de refinado utilizada.

Tabla 4.22 Longitud de Fibra y porcentaje de finos de las pastas tratadas con Cel9B y refinadas.

rev PFI	Tratamientos con Cel9B							
	Control		2,5U/gps 1h		2,5U/gps 2h		10U/gps 2h	
	Ln	%Fn	Ln	%Fn	Ln	%Fn	Ln	%Fn
0	0,43	41,98	0,44	38,66	N.D	N.D	N.D	N.D
500	0,42	42,18	0,40	43,02	N.D	N.D	N.D	N.D
1500	0,42	41,09	0,40	43,37	0,38	44,02	0,36	44,02

Longitud: Ln (mm), Porcentaje de Fino: %Fn, N.D: no determinado.

Una vez visto el efecto del tratamiento de Cel9B en las propiedades físicas de las pastas, se formaron hojas de papel con las que se determinaron las propiedades mecánicas. En primer lugar se analizaron los índices de tracción y desgarro (Figura 4.35). Tal como era de esperar los valores de índice de tracción aumentaron con la intensidad de refino en la muestra control y en las muestras tratadas enzimáticamente se observó la misma tendencia. Se evidenció que la muestra tratada con 2,5U/gps durante 1h sin refinar presentó valores de índice de tracción similar al control refinado a 500 rev PFI. Este hecho indica la eficiencia de Cel9B en el refinado, confirmando resultados del grupo previamente publicados (Garcia-Ubasart *et al.* 2013). La duración de los tratamientos con 2,5U/gps no influyó directamente en el índice de tracción, ya que no existió diferencia entre las muestras de distintos tiempos refinadas a 1500 rev PFI. La dosis enzimática tampoco mostró diferencia importante en el índice de tracción, ya que la diferencia máxima entre las muestras tratadas con 2,5U/gps y 10U/gps refinadas a 1500 rev PFI fue del 3,5%. En cuanto al índice de desgarro, este parámetro disminuyó al efectuar un refinado convencional. En las muestras tratadas enzimáticamente se observó la misma tendencia. Sin embargo este índice presentó valores más bajos en las muestras tratadas con enzimas y la mayor pérdida de resistencia al desgarro se produjo en el tratamiento con 10U/gps (Figura 4.35).

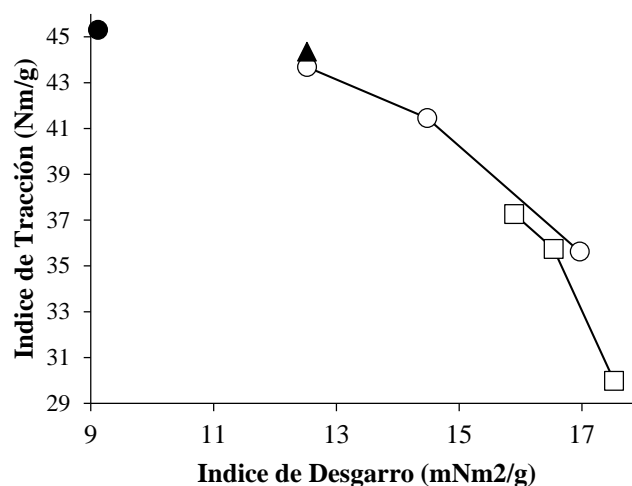


Figura 4.35. Índice de Tracción (Nm/g) versus Índice de Desgarro (mNm²/g) en función del tratamiento enzimático con Cel9B e intensidad de refino, Control (□), 2,5U/gps 1h (○), 2,5U/gps 2h (▲), 10U/gps 2h (●). La intensidad de refino aumenta de derecha a izquierda.

Se analizó también el WZSTS (wet zero-span tensile strength), parámetro que mide la fuerza intrínseca de las fibras (Figura 4.36). El proceso de refinado convencional no afectó la fuerza intrínseca de las fibras. El tratamiento con 2,5UC/gps durante 1h redujo el WZSTS un 12.5%. Este porcentaje de pérdida fue idéntico en los tres puntos de refinado de esta muestra. Al comparar todos los tratamientos enzimáticos con refinado 1500 rev PFI, se observó una disminución del WZSTS cuando se incrementó la dosis de enzima y el tiempo de tratamiento.

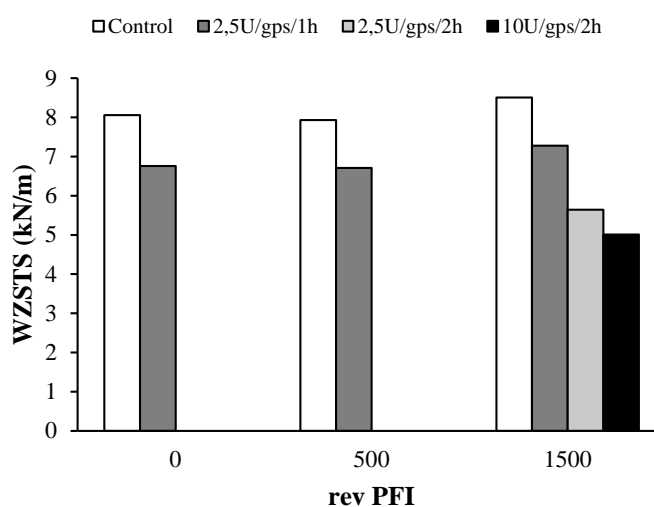


Figura 4.36. WZSTS de las fibras pastas de lino tratadas con Cel9B y refinadas.

De acuerdo a los resultados mostrados la enzima Cel9B acelera los efectos del proceso de refinado de lino en las condiciones ensayadas. El conjunto de pruebas realizadas con Cel9B se llevó a cabo con el fin de determinar las condiciones óptimas aplicación de Cel9B: dosificación, tiempo de incubación y puntos de refinado. Las mejores condiciones para poder utilizar Cel9B como control, con quien comparar el efecto de la nueva enzima, fueron 2,5U/gps durante 1h, con dos puntos de refinado PFI, 0 y 500 rev. Una vez establecidas las condiciones de aplicación de Cel9B, se procedió a evaluar la aplicación de la nueva celulasa Cel6D.

4.5.3. Evaluación del efecto de Cel6D en el refinado de pasta de lino

La introducción de una etapa biotecnológica previa al refinado de la pasta de lino puede generar cambios sustanciales en la morfología y en la superficie de la fibra. Se evaluó la efectividad de Cel6D en el biorefinado y en la mejora de propiedades mecánicas del papel. En la Tabla 4.23 se detallan las condiciones de los tratamientos enzimáticos aplicados. Se ensayó también la efectividad de Cel9B en las mismas condiciones, así como de las dos enzimas conjuntamente. Las pastas tratadas con enzimas fueron refinadas únicamente a 500 rev PFI.

Tabla 4.23. Condiciones de aplicación enzimática en pasta de lino ECF.

<i>Parámetros</i>	<i>Cel9B</i>	<i>Cel6D</i>	<i>Cel9+Cel6D</i>
<i>Dosis U/gps</i>	2,5	0,6	2,5 + 0,6
<i>pH</i>	5	5	5
<i>Temperatura (°C)</i>	50	50	50
<i>Tiempo (h)</i>	1	1	1

4.5.3.1. Propiedades físicas de la pasta de lino

La resistencia al desgote (°SR) de la pasta control refinada por refinado convencional presentó un incremento del 71% a 500 rev PFI. Las pastas tratadas con Cel9B sin refinar mostraron un °SR incrementado en el 80% con respecto al control sin refinar, incremento similar al observado en los ensayos anteriores. Al refinar estas pastas se observó un incremento del 5% en el °SR con respecto su control. La aplicación de la nueva celulasa Cel6D produjo un incremento del 93,5% con respecto al control sin refinar. Al refinar esta pasta no se produjo ningún cambio significativo en el °SR. La aplicación de las dos enzimas simultáneamente tampoco causó incrementos del °SR. Los datos obtenidos muestran la efectividad de Cel6D en el biorefinado de las pastas. Dado a que el tratamiento con Cel6D produjo un °SR superior al refinado convencional a 500 rev PFI y con el fin de comparar mejor la acción de la enzima, las pastas control fueron refinadas a 4500 rev PFI. Los resultados mostraron que este refinado a 4500 rev PFI solo consiguió un incremento del 10% en el °SR comparado con las pastas tratadas con Cel6D (Figura 4.37).

En cuanto al índice de retención de agua (%IRA) las pastas control sometidas a refinado convencional, presentaron un incremento del %IRA aproximado del 9% en cada punto de refinado. Las pastas tratadas con Cel9B tanto sin refinar como refinadas, presentaron una mejora en la capacidad de hidratación (%IRA). El %IRA de las pastas tratadas con Cel6D también mostró un incremento aproximadamente similar, hecho que indica que el tratamiento con Cel6D aumenta la capacidad de absorción de agua de las fibras. El tratamiento simultáneo con las dos enzimas produjo un incremento del %IRA menor que el tratamiento individual con Cel6D. Es destacable el resultado obtenido con el tratamiento con Cel6D y posterior refinado a 500 rev PFI, que produjo un %IRA únicamente 5% inferior al de la pasta control refinada a 4500 rev PFI (Figura 4.38).

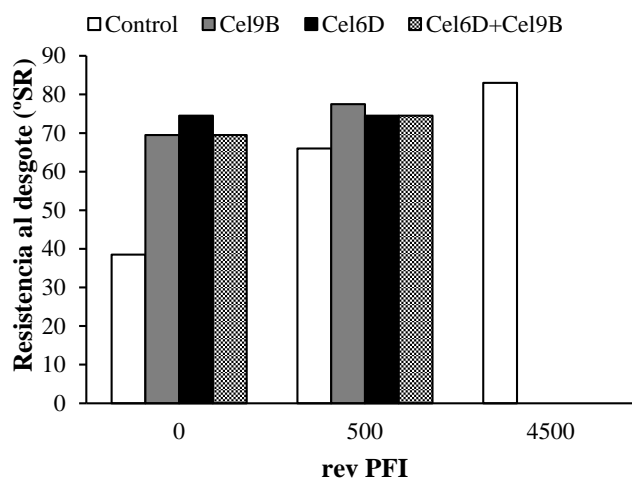


Figura 4.37. Resistencia al desgote (°SR) de las pastas tratadas con celulasas.

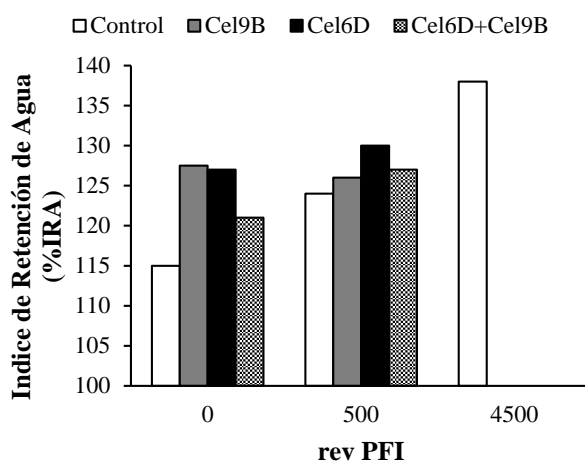


Figura 4.38. Índice de retención de agua (%IRA) de las pastas tratadas con celulasas.

Se calculó también el consumo de energía en las operaciones de refinado. El consumo energético del refinado a 500 rev en el molino PFI de las pastas control y con tratamiento enzimático fue constante y similar en todas las muestras a excepción de la pasta tratada con Cel6D (Tabla 4.24), en la que se produjo un gasto de 1Wh adicional.

Tabla 4.24. Consumo de Energía (Wh) de los puntos de refinado.

<i>rev PFI</i>	<i>Consumo (Wh)</i>			
	<i>Control</i>	<i>Cel9B</i>	<i>Cel6D</i>	<i>Cel9B+Cel6D</i>
500	6	6	7	6
4500	53	-	-	-

En cuanto al análisis de la longitud de fibra y la formación de finos. Las pastas control sometidas al refinado convencional mostraron una acortamiento de la longitud de la fibra del 2% y 13% al refinar a 500 y 4500 rev PFI respectivamente, mientras que exhibieron un aumento en la formación de finos de hasta 6,6% (Tabla 4.25). Los tratamientos con Cel9B sin y con refinado acortaron la longitud fibras entre el 6 y 14% respectivamente y presentaron un aumento de 6% y 8% en la formación de finos con respecto sus controles respectivos. Los tratamientos con Cel6D acortaron la longitud de fibra aunque en menor proporción que Cel9B. La muestra tratada con Cel6D y refinada a 500 rev PFI presentó un acortamiento del 7% respecto al control sin refinar. Sin embargo los tratamientos con Cel6D no modificaron de forma importante el contenido de finos. El efecto que produjo el uso simultáneo de las dos enzimas en la longitud de las fibras y en la formación de finos fue un efecto intermedio al causado por las enzimas individualmente.

Tabla 4.25. Longitud de fibra y porcentaje de finos de las pastas tratadas con celulasas.

<i>rev PFI</i>	<i>Tratamientos</i>							
	<i>Control</i>		<i>Cel9B</i>		<i>Cel6D</i>		<i>Cel9B+Cel6D</i>	
	<i>Ln</i>	<i>%Fn</i>	<i>Ln</i>	<i>%Fn</i>	<i>Ln</i>	<i>%Fn</i>	<i>Ln</i>	<i>%Fn</i>
0	0,44	40,6	0,41	43,0	0,42	41,6	0,40	42,3
500	0,43	40,9	0,37	44,1	0,41	40,3	0,41	42,0
4500	0,38	43,3	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D

Longitud: Ln (mm), Porcentaje de Fino: %Fn, N.D: no determinado.

Una vez visto el efecto de los tratamientos de las celulasas en las propiedades físicas de las pastas, se formaron hojas de papel con las mismas y se determinaron sus propiedades mecánicas y ópticas.

En primer lugar se analizó la permeancia al aire y la densidad de las hojas de papel obtenidas (Figura 4.39). Tal como era de esperar el refinado convencional disminuyó la permeancia al aire y aumentó la densidad con el incremento de la intensidad de refino. Los tratamientos con Cel9B causaron una ligera disminución de la permeancia y de la densidad con respecto al control. Por el contrario el tratamiento con Cel6D originó un comportamiento diferente. Los papeles de los tratamientos con Cel6D mostraron una notable disminución de la permeancia y sobretodo una importante disminución de la densidad. Es de destacar que las hojas obtenidas de las pastas tratadas con Cel6D mostraron un comportamiento distinto al control y a las tratadas con Cel9B, ya que en lugar de aumentar la densidad con el refinado, se originaron papeles cuya densidad disminuyó con el refinado. Esto indica que las hojas que se obtuvieron de pastas tratadas con Cel6D son menos compactas. Este tipo de comportamiento no se encuentra descrito hasta la fecha, ya que se está descrito que pastas más refinadas proporcionan papeles más densos y compactos (Fardim & Durán 2003). Las hojas de pastas tratadas simultáneamente con las dos enzimas mostraron una permeancia al aire y densidad aproximadamente similares a las de las hojas de las pastas control.

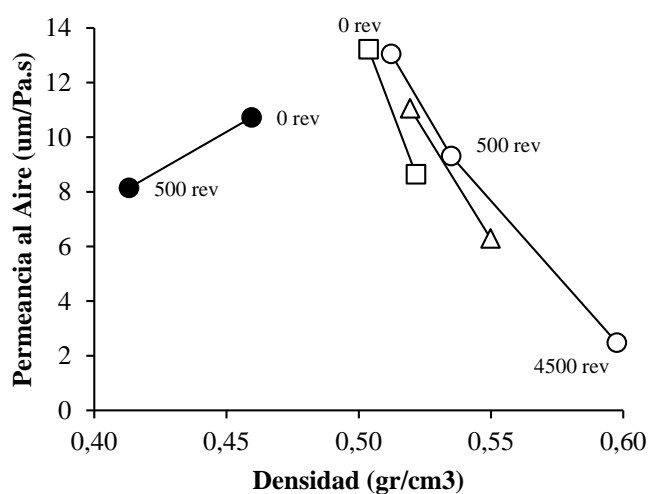


Figura 4.39. Permeancia al aire en función de la densidad. Control (○), Cel9B (□), Cel6D (●), Cel9B+Cel6D (Δ). La intensidad de refino aumenta de izquierda a derecha.

El análisis del coeficiente light scattering en función de la densidad se muestra en la Figura 4.40. En el refinado convencional la evolución del coeficiente light scattering es de manera inversa a la densidad, es decir que a medida que se refina, el coeficiente baja mientras que la densidad sube (Mou *et al.* 2013). Los papeles de los tratamientos con Cel9B mostraron valores de light scattering similares a los de los controles. Por el contrario los papeles obtenidos de las pastas tratadas con Cel6D presentaron un coeficiente light scattering mucho más bajos que sus correspondientes controles. Esto nos indica que el tratamiento con Cel6D originó una capacidad de unión interfibra más alta, es decir papeles más compactos. Estos resultados no concuerdan con la disminución de la densidad del papel que provocó la enzima, ya que parecería indicar papeles menos compactos. Es de destacar que el tratamiento con Cel6D sin refinado posterior originó papeles con light scattering inferior al del papel obtenido de la pasta control refinada a 4500 rev PFI. Interessantemente los papeles obtenidos de la pasta tratada conjuntamente con Cel9B y Cel6D tuvieron un comportamiento diferente, ya que el coeficiente light scattering aumentó en lugar de disminuir cuando se aumentó la intensidad de refinado.

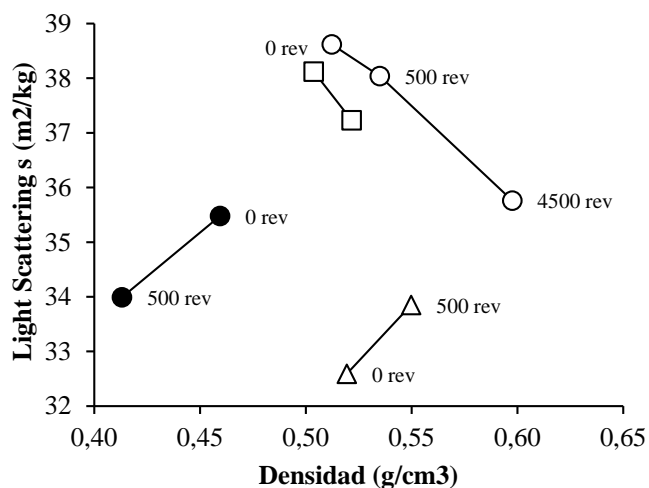


Figura 4.40. Coeficiente Light Scattering (s) en función de la densidad. Control (○), Cel9B (□), Cel6D (●), Cel9B+Cel6D (Δ). La intensidad de refinado aumenta de izquierda a derecha.

En el análisis de las propiedades de resistencia mecánica de las hojas obtenidas de los tratamientos enzimáticos y de los controles incluyó la medición de propiedades como resistencia a la tracción, al estallido, al desgarro, WZSTS (wet zero-span tensile strength) y la resistencia al plegado.

En el proceso de refinado convencional las propiedades mecánicas del papel se desarrollan con un aumento progresivo de la resistencia a la tracción y estallido y una disminución progresiva del desgarro. La resistencia a la tracción y la resistencia al desgarro dependen principalmente de las características morfológicas de las fibras y del contenido de finos (Ferreira *et al.* 1999; Gharekhani *et al.* 2015). Las propiedades de resistencia de los papeles obtenidos de las pastas tratadas con Cel9B se vieron modificadas, ya que la enzima mejoró la resistencia a la tracción y disminuyó la resistencia al desgarro. El análisis del índice de tracción en función al índice de desgarro se muestra en la Figura 4.41. Los papeles de las pastas tratadas con Cel9B sin refinar mostraron valores del índice de tracción similares a los del control refinado a 500 rev PFI. La aplicación de Cel6D, causo una modificación más acusada de las propiedades mecánicas del papel. Se produjeron incrementos muy importantes en el índice de tracción y consecuentemente una disminución también notable en el índice de desgarro. Es de destacar que el papel obtenido del tratamiento con Cel6D y refinado a 500 rev presentó valores incluso más altos que los del control refinado a 4500 rev PFI.

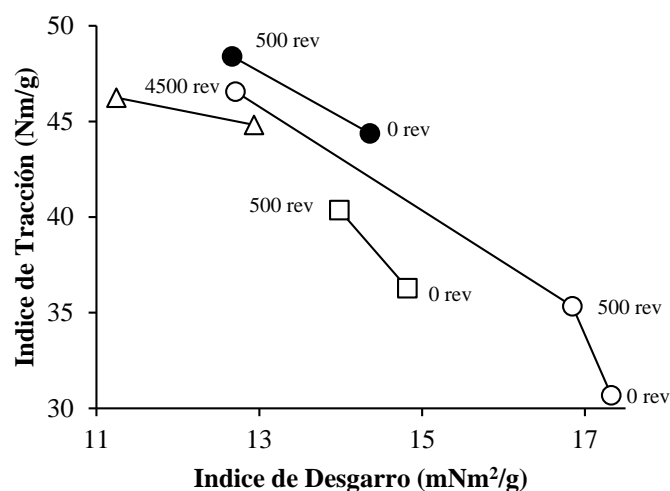


Figura 4.41. Índice de tracción en función al índice de desgarro. Control (○), Cel9B (□), Cel6D (●), Cel9B+Cel6D (Δ). La intensidad de refino aumenta de izquierda a derecha.

El análisis de la resistencia al estallido en función de la resistencia a la tracción se muestra en la Figura 4.42. El refinado convencional aumentó la resistencia al estallido de los papeles. El uso de Cel9B mejoró la resistencia al estallido, ya que se obtuvieron papeles de pastas sin refinar con resistencia al estallido similar a los fabricados con los

controles refinados a 500 rev PFI. Los papeles obtenidos de las pastas tratadas con Cel6D mostraron un incremento aún más notable a la resistencia al estallido. Las pastas tratadas con Cel6D y refinadas a 500 rev mostraron valores de resistencia al estallido superiores a los de los papeles control refinados a 4500 rev PFI. El tratamiento con las dos celulasas a la vez mejoró ligeramente el índice de estallido de los papeles obtenidos al comparar con los valores obtenidos con Cel6D. La notable mejora en los índices de tracción y estallido producidos por el tratamiento con Cel6D evidencia la eficiencia de esta enzima en el refinado.

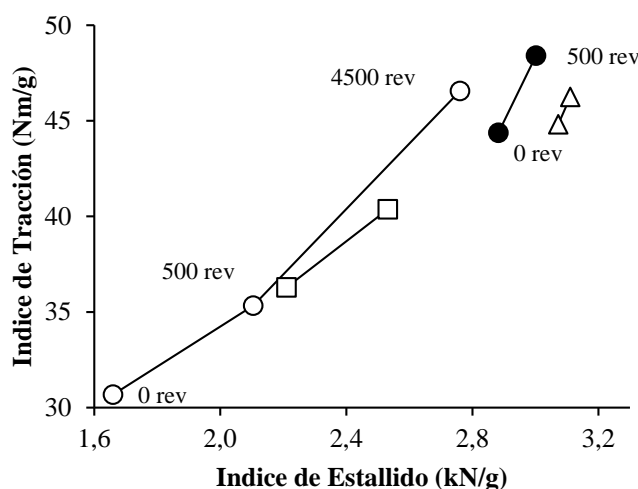


Figura 4.42 Índice de tracción en función al índice de estallido. Control (○), Cel9B (□), Cel6D (●); Cel9B+Cel6D (Δ). La intensidad de refinado aumenta de izquierda a derecha.

Se analizó también el WZSTS (wet zero-span tensile strength), de las diferentes hojas de papel obtenidas (Figura 4.43). El proceso de refinado del control no afectó a este parámetro. Sin embargo, el tratamiento enzimático, tanto con Cel9B como con Cel6D, provocó una disminución similar del WZSTS. Este hecho indica que la fuerza intrínseca de las fibras disminuyó en las pastas tratadas enzimáticamente.

El análisis de la resistencia al plegado con respecto al coeficiente light scattering, este último analizado previamente, se muestra en la Figura 4.44. El refinado convencional proporciona papeles con más resistencia a la rotura por plegado. Los papeles obtenidos del tratamiento con Cel9B tanto sin y con refinado mostraron una resistencia al plegado ligeramente inferior al control. Por el contrario, los tratamientos con Cel6D proporcionan papeles con resistencia al plegado notablemente incrementada.

Los resultados obtenidos con el tratamiento con Cel6D sin refinar son similares a los de los papeles control refinados a 4500 rev. El tratamiento con las dos celulasas mostró un efecto intermedio entre ellas, pero sorprendentemente tras el refinado a 500 rev PFI la resistencia a la rotura disminuyó en lugar de aumentar.

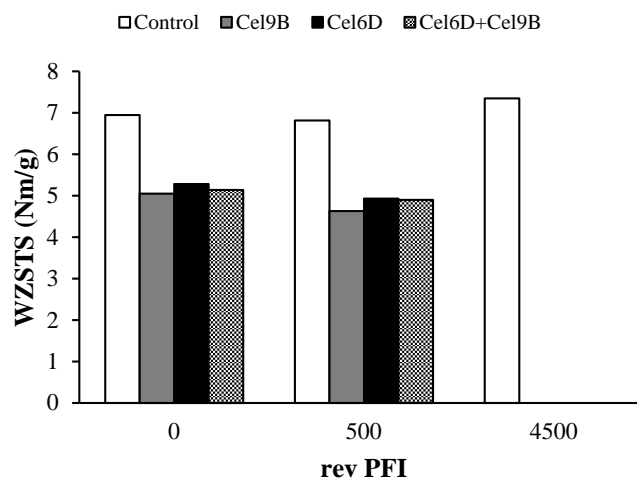


Figura 4.43. WZSTS de las muestras tratadas con celulasas.

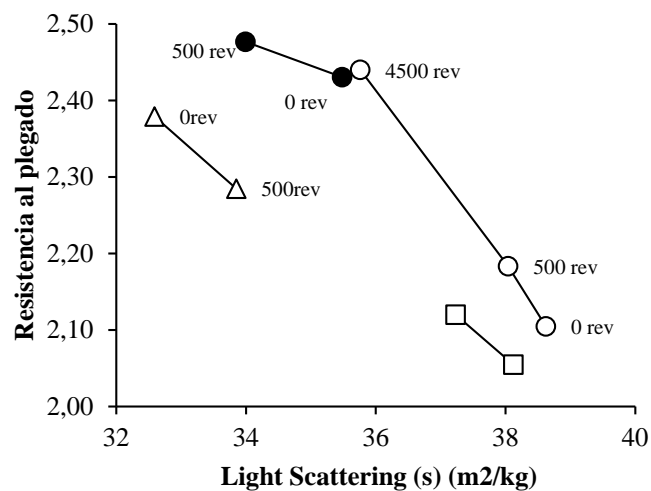


Figura 4.44. Resistencia al plegado en función de s. Control (○), Cel9B (□), Cel6D (●); Cel9B+Cel6D (Δ). La intensidad de refinado aumenta de derecha a izquierda.

La mejora en la resistencia al plegado producida por Cel6D concuerda con el notable efecto de la enzima en la mejora de las propiedades de resistencia a la tracción y estallido, y en la modificación del coeficiente light scattering.

4.5.3.2. Análisis de los efluentes residuales

Con el fin de conocer los productos de hidrólisis que liberaban las celulasas a partir de las pastas de lino, los efluentes de los tratamientos enzimáticos de las mismas se analizaron mediante cromatografía en capa fina (TLC) (Figura 4.45). La celulasa Cel9B liberó de la pasta de lino celooligosacáridos cortos como celotriosa y celobiosa. Los efluentes de los tratamientos con Cel6D, mostraron como único producto de degradación de la pasta de lino la celobiosa. Estos productos de hidrólisis son similares a los observados anteriormente. Se observó una mayor liberación de productos por la enzima Cel6D, indicando una mayor degradación de la superficie de las fibras. Los análisis de los efluentes provenientes del tratamiento con las dos celulasas, mostró un patrón similar al originado por las dos enzimas.

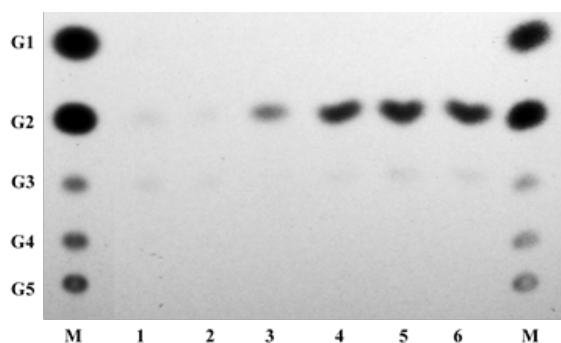


Figura 4.45. Análisis de los efluentes provenientes de los tratamientos enzimáticos sobre pasta de papel de lino mediante cromatografía en capa fina (TLC). Cel9B sin refinado (1), Cel9B refinada a 500rev (2), Cel6D sin refinado (3), Cel6D refinada a 500rev (4), Cel9B+Cel6D sin refinado (5), Cel9B+Cel6D refinada a 500rev (6). Estándar de azúcares (M): glucosa (G1), celobiosa (G2), celotriosa (G3), celotetraosa (G4) y celopentaosa (G5).

4.5.3.3. Análisis de la morfología de las fibras

Los resultados obtenidos previamente indican que la enzima Cel6D acelera los efectos del proceso de refinado. Con el fin de comprobar si el tratamiento con la enzima generaba cambios en la morfología de las fibras, se realizó un análisis superficial de las mismas por microscopía electrónica de barrido (SEM). En las fibras de la pasta inicial sin refinar se observó ausencia de fibrilación en la capa externa (Figura 4.46A). Las fibras control refinadas a 500 rev PFI mostraron una ligera fibrilación en las superficie de la fibra (Figura 4.46B). Sin embargo al refinar a 4500 rev se observó un cambio

notable en la morfología de las fibras, que mostraron mayor fibrilación superficial y una morfología tubular plana, lo que indicaba que la superficie específica de la fibra había incrementado y el contacto fibra a fibra era mayor (Figura 4.46C). Las fibras tratadas con Cel9B y refinadas a 500 rev mostraron fibrilación externa y morfología similares aproximadamente similar al control refinado a 500 rev (Figura 4.46D). El tratamiento con Cel6D y refinado a 500 rev causó una notable modificación superficial de las fibras. Se observó una fibrilación externa similar a las fibras del control refinadas a 4500 rev, evidenciando el notable efecto modificador de la enzima (Figura 4.46E). Estos cambios morfológicos en las fibras tratadas con Cel6D explican el incremento de las propiedades de resistencia del papel mostradas anteriormente. Dado que la superficie específica fibrilar era más amplia, se daba mayor oportunidad de generación de un número mayor de enlaces interfibrilares, permitiendo obtener papeles con mejores características en cuanto a resistencia.

La observación de la morfología de las fibras de los tratamientos con Cel6D muestra que la enzima produce un efecto de biorefinado de las fibras de lino. Interesantemente produce papeles con mejores propiedades de resistencia mecánica pero con densidades bajas. Siendo este un comportamiento totalmente diferente al obtenido con otras enzimas. Un indicativo del potencial de la celulasa Cel9B para obtener nuevos productos papeleros.

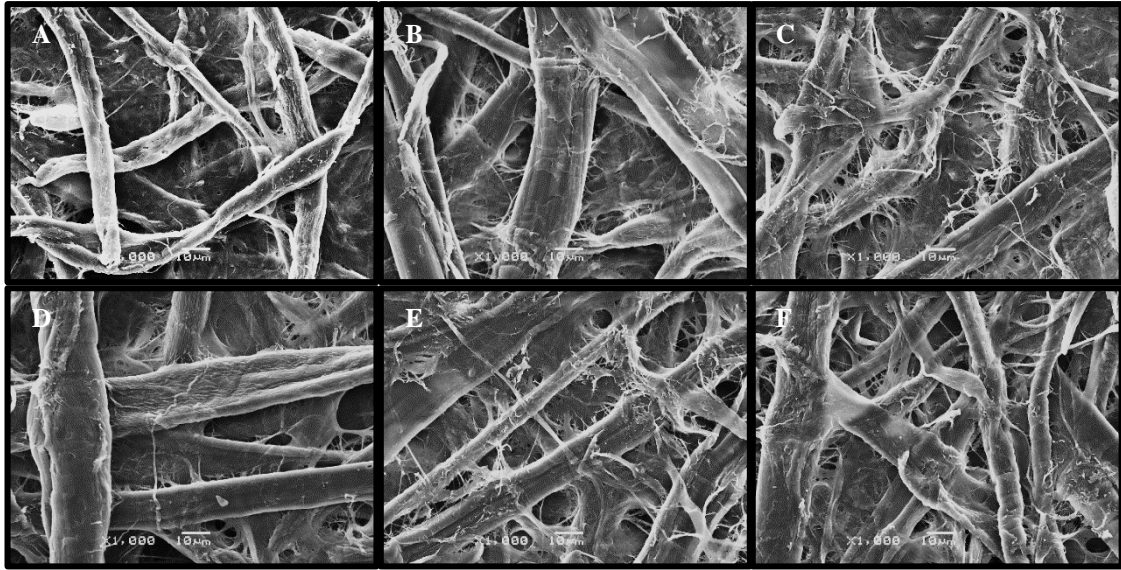


Figura 4.46. SEM de las fibras papel de lino tratado con celulasas. Tratamientos: **A:** Control sin refinar, **B:** Control refinado a 500 rev; **C:** Control refinado a 4500 rev, **D:** Cel9B refinado a 500 rev, **E:** Cel6D refinado a 500 rev, **F:** Cel9B+Cel6D refinado a 500 rev.

5. DISCUSSION

5.1. CARACTERIZACION DE Lic16A DE *Paenibacillus barcinonensis* BP-23

Se identificó y caracterizó la nueva β -glucanasa de *Paenibacillus barcinonensis* que pertenece a la familia 16 de las glicosil hidrolasas. La enzima tiene actividad exclusiva sobre β -glucanos mixtos (enlaces β -1,3-1,4), lo que indica que es una liquenasa (EC 3.2.1.73), que fue denominada Lic16A. La enzima es una proteína monodominio que muestra una alta homología con liquenasas GH16 de los géneros *Paenibacillus* y *Bacillus*. En la comparación de secuencias con las enzimas GH16 se identificó los residuos Glu129 y Glu133 de Lic16A como los posibles residuos ácido glutámico catalíticos, conservados en las enzimas de esta familia (Figura 5.1) (Planas 2000). El análisis de la estructura cristalina de una liquenasa híbrida de los géneros *Bacillus-Paenibacillus* reveló 10 residuos que se encuentran implicados en la unión del sustrato al sitio catalítico de la enzima (Gaiser *et al.* 2006). Estos residuos se encuentran en las posiciones correspondientes de Lic16A y al parecer se encuentran conservados en todas liquenasas bacterianas.

El análisis de estas enzimas mediante un dendrograma (Figura 5.2) mostró que existe una estrecha relación entre ellas, lo que indica que probablemente comparten un ancestro en común. Este análisis muestra que las liquenasas de *Paenibacillus* y *Bacillus* se agrupan en *clústeres* diferentes. Una comparación detallada las secuencias indica que un residuo de His del subsitio +3 del lugar de unión al sustrato (posición 99 en la liquenasa híbrida) (Gaiser *et al.* 2006), se encuentra conservado en todas las enzimas caracterizadas del género *Paenibacillus*, mientras que en las liquenasas del género *Bacillus* esta sustituido por un residuo Asp o Glu. Sin embargo la liquenasa putativa de *Paenibacillus sp.W-61* tiene en esta posición un residuo Asp. La diferencia de secuencia de aminoácidos en el subsitio +3 podría ser la causa de sutiles diferencias en la especificidad de sustrato y modo de acción de las liquenasas.

Aunque la mayoría de liquenasas caracterizadas hasta el momento son origen bacteriano, se han descrito muy pocos ejemplos de β -glucanasas fúngicas con actividad exclusiva sobre β -glucanos mixtos (Murray *et al.* 2001). Entre estas enzimas, la liquenasa de *Aspergillus niger* caracterizada recientemente (Elgharbi *et al.* 2013) presenta un comportamiento similar a Lic16A. Esta enzima se inhibe completamente por la presencia de Cu^{+2} , Fe^{+2} y Mn^{+2} , pero al contrario al de la enzima estudiada, la

liquenasa de *A. niger* se ve completamente inhibida por Mg^{+2} mientras que la actividad de Lic16A se estimuló con este ion metálico.

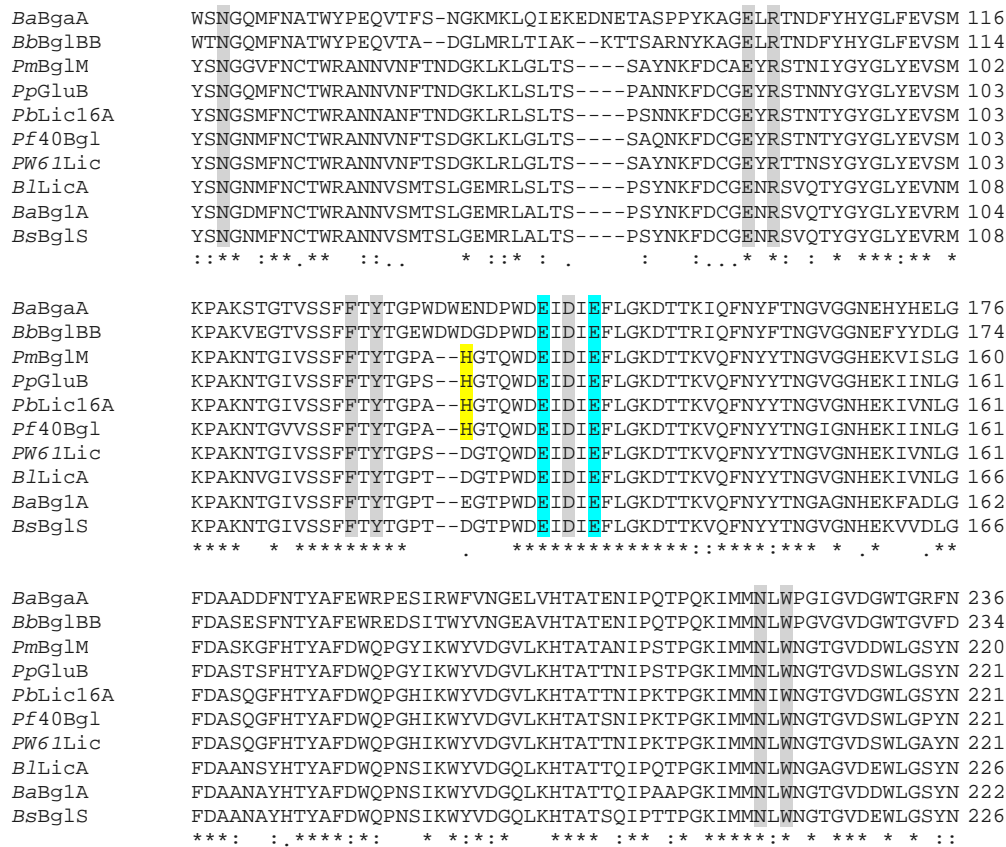


Figura 5.1. Alineamiento múltiple de secuencias de Liquenasas del género de *Bacillus* y *Paenibacillus*. *BaBgaA* de *Bacillus alkalophilic* (Tabernerero *et al.* 1994), *BbBglBB* de *Brevibacillus brevis* (Louw *et al.* 1993), *PmBglM* de *Paenibacillus macerans* (Borriss *et al.* 1990), *PpGluB* de *Paenibacillus polymyxa* (Gosalbes *et al.* 1991), *PbLic16A* de *Paenibacillus barcinonensis* (Cerdea *et al.* 2016), *Pf40Bgl* de *Paenibacillus sp.* F-40 (#acceso DQ437528), *PW6lLic* de *Paenibacillus sp.* W-61 (Fukuda *et al.* 2009), *BllLicA* de *Bacillus licheniformis* (Lloberas *et al.* 1991), *BaBglA* de *Bacillus amyloliquefaciens* (Hofemeister *et al.* 1986) y *BsBglS* de *Bacillus subtilis* (Wolf *et al.* 1995). Potenciales aminoácidos catalíticos (■), His subsitio +3 (■), residuos implicados en unión del sustrato en la hidrólisis (■). Las secuencias de enzimas se alinearon usando software ClustalW2 (EMBL-EBI).

En concordancia con la alta homología de Lic16A con liquenasas bacterianas, Lic16A tiene alta actividad sobre liquenano y glucano de cebada, y su perfil de pH y temperatura se encuentra dentro del intervalo que se describe para estas enzimas (Planas 2000). Sin embargo la escasa de información acerca del patrón de los productos de hidrólisis de liquenasas de *Paenibacillus* impide la comparación con el patrón mostrado por Lic16A. La liquenasa con la que presenta la mayor homología Lic16A, es la enzima

de *Paenibacillus sp.* W-61, pero al ser una enzima putativa no existe la posibilidad de comparar con las propiedades de Lic16A. Los resultados obtenidos muestran que la actividad catalítica de Lic16A sobre β -glucanos produce una diversidad de oligosacáridos de diferente longitud que contienen una mezcla de moléculas de glucosa unidas con enlaces β -1,3 y β -1,4. El potencial beneficio para la salud del consumo de β -glucanos presenta (Snart *et al.* 2006) y el creciente interés por el uso de oligómeros procedentes de polisacáridos no amiláceos como prebióticos (Gibson *et al.* 2004; Grootaert *et al.* 2009) incrementa el interés del estudio de Lic16A para la producción de oligómeros derivados de β -glucanos y la evaluación su potencial biotecnológico.

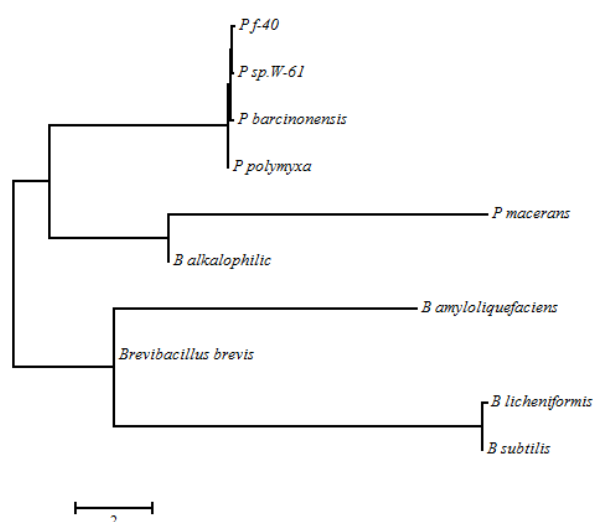


Figura 5.2. Dendrograma de liqenasas de los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus*. Las secuencias de proteína utilizadas fueron las mismas, que del alineamiento mencionado anteriormente. Las secuencias de las enzimas se alinearon y analizaron usando software Mega 7.0.

5.2. SECUENCIACION DEL GENOMA DE *Paenibacillus barcinonensis* BP-23

Paenibacillus barcinonensis BP-23 tiene la capacidad de producir numerosos metabolitos secundarios con actividad biológica sobre biomasa de origen lignocelulósico. Muchas de sus enzimas han sido caracterizadas y evaluadas en biotecnología papelera. Entre ellas, varias xilanasas han mostrado ser altamente eficientes en el blanqueo de pasta kraft de eucalipto (Blanco *et al.* 1995) y pasta de sisal (Valenzuela *et al.* 2014a), y en la obtención de pastas con alto contenido en celulosa (Valls *et al.* 2010; Valenzuela *et al.* 2014b). También sus celulasas han mostrado un importante efecto de biorefino en pastas de lino y eucalipto (Cadena *et al.* 2010; García-Ubasart *et al.* 2013).

El análisis zimográfico de la cepa muestra muchas enzimas con actividad sobre celulosa o xilano, muchos de los cuales no se han identificado. Por este motivo, y dado el interés biotecnológico de las enzimas de la especie, se procedió a la secuenciación de su genoma con el fin de conocer el sistema enzimático completo para despolimerización de polisacáridos y poder identificar nuevas enzimas desconocidas con potencial de aplicación en la transformación de la biomasa. Como primer resultado de la secuenciación, se identificó la nueva celulasa Cel6D que se estudió a continuación. El ensamblaje del genoma de *Paenibacillus barcinonensis* BP-23 puede ser la base de futuras investigaciones. Hasta el momento se han encontrado un grupo extenso de genes que putativamente codifican para otras enzimas de interés, que en el futuro pueden caracterizarse y llevar a cabo estudios adicionales para confirmar las funciones que realizan. Además se podrá buscar genes que estén involucrados en el metabolismo de la bacteria, así como realizar una anotación de la secuencia completa del genoma, que en el futuro revelará las características moleculares únicas de la cepa *Paenibacillus barcinonensis* BP-23.

5.3. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA, INGENIERÍA PROTEICA Y ESTUDIOS DE SINERGISMO DE Cel6D

5.3.1. Relación estructura-función y estabilidad enzimática de Cel6D

Se ha identificado y caracterizado una nueva celulasa de *Paenibacillus barcinonensis* BP-23, perteneciente a la familia 6 de las glicosil hidrolasas. La enzima tiene actividad preferente sobre celulosa cristalina (PASC) y no es activa sobre celulosa amorfa, hecho que indica que es una celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91), que fue nombrada como Cel6D.

La familia 6 de las glicosil hidrolasas (GH6) contiene celulasas que emplean un mecanismo *invertig* de hidrólisis del enlace glucosídico. La base de datos CAZy (<http://www.cazy.org/>) detalla que dentro de esta familia hay endoglucanasas (EC 3.2.1.4) y celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91). Las celobiohidrolasas de esta familia actúan procesivamente desde los extremos no reductores de las cadenas de celulosa (Lantz *et al.* 2010; Tamura *et al.* 2012).

La celulasa Cel6D es una proteína multidominio que presenta alta homología con celobiohidrolasas putativas GH6 del género *Paenibacillus*, ninguna de las cuales ha sido caracterizada hasta la fecha. Las celulasas más estudiadas de la familia GH6 son Cel6B de *Thermobifida fusca* (*TfCel6B*) y Cel6A de *Trichoderma reesei* (*TrCel6A*). El dominio catalítico de la enzima Cel6D de *P. barcinonensis* presenta una identidad del 48 y 34% respectivamente con los dominios catalíticos de las enzimas mencionadas. La estructura cristalina de las mismas consiste en un plegamiento α - β que conforma un centro activo en forma de túnel. El mecanismo catalítico de *TrCel6A* y por extensión de las enzimas de la familia GH6 no está totalmente dilucidado. Los estudios de Rouvinen *et al.* 1990 identificaron 2 residuos en *TrCel6A*, el Asp221 y Asp175, que serían los aminoácidos catalíticos, actuando el primero (Asp221) como ácido catalítico y el segundo (Asp175) como posicionador de la molécula de agua responsable del ataque nucleofílico al enlace a romper. Sin embargo, los estudios posteriores de Koivula *et al.* 2002, donde confirma el papel de Asp221 como ácido catalítico, indican que el ataque nucleofílico requiere de dos moléculas de agua que están coordinadas por el residuo Asp175 conjuntamente con un segundo residuo, Ser181. Adicionalmente en el centro activo de *TrCel6A* se encuentra un residuo Tyr169 en el subsitio -1 que cumple un rol dual, ya que probablemente juega un papel importante en la distorsión del sustrato y afecta a la protonación de los aminoácidos catalíticos Asp175 y Asp221 (Koivula *et al.* 1996).

Koivula *et al.* 1998 realizó una comparación estructural y de secuencias de celulasas pertenecientes a la familia 6. Este estudio reveló que *TrCel6A* posee un aminoácido Trp272, que se encuentra conservado en todas las celulasas de la familia 6. En las endoglucanasas de esta familia este residuo no es importante, ya que no interviene en la unión e hidrólisis de las cadenas de celulosa. Por el contrario en las celobiohidrolasas este residuo es importante, ya que está ligado directamente con la actividad enzimática, la unión a sustrato y la estabilidad de la proteína. Este residuo es requerido exclusivamente en la degradación de celulosa cristalina. Por esta razón se propone que la ubicación de este residuo de triptófano (Trp272) cerca de la entrada al túnel del centro activo es requerida para la hidrólisis de la celulosa cristalina, siendo un residuo necesario para el primer contacto con el extremo de la cadena superficial de la celulosa y para guiarla hacia el túnel catalítico.

El análisis de la estructura cristalina de *TrCel6A* también identificó 4 residuos de cisteína que forman 2 puentes disulfuro que proporcionan estabilidad al túnel del centro activo de la enzima, y están conservados en las celulasas de la familia GH6 (Rouvinen *et al.* 1990).

Tabla 5.1. Aminoácidos esenciales para la hidrólisis de celulosa.

<i>Cel6D</i>	<i>Subsitio</i>	<i>Rol propuesto</i>	<i>Residuo correspondiente en:</i>	
			<i>TfCel6B</i>	<i>TrCel6A</i>
<i>Try91</i>	-1	Distorsión Sustrato	Try220	Try169
<i>Asp97*</i>	-1	Incremento de pKa	Asp226	Asp175
<i>Ser103</i>	-1	Red de protones	Ser232	Ser181
<i>Asp146*</i>	+1	Ácido catalítico	Asp274	Asp221
<i>Trp200</i>	-	Estabilidad de la estructura	Trp332	Trp272

*Aminoácidos elegidos para la mutación. Tabla modificada de Vuong & Wilson 2009. Las secuencias de genes se alinearon y se analizaron usando ClustalW2 (EMBL-EBI).

La alineación de la secuencia de la enzima clonada con las celulasas *TfCel6B* y *TrCel6A* ha permitido identificar una serie de residuos conservados en *Cel6D* de *P. barcinonensis*. Entre ellos se encuentran los potenciales residuos catalíticos y el resto de residuos mencionados en los párrafos anteriores (Figura 4.12 y Tabla 5.1).

Se han obtenido mutantes de dos de los potenciales residuos catalíticos de *Cel6D*, en concreto *Asp97* y *Asp146*, equivalentes a *Asp175* y *Asp221* de *TrCel6A*, en los que se ha reemplazado el residuo de ácido aspártico correspondiente por un residuo alanina. Los mutantes obtenidos, *Cel6D-D97A* y *Cel6D-D146A*, no mostraron actividad enzimática, indicando claramente que están directamente implicados en el mecanismo catalítico de *Cel6D*. Respecto al mutante *Cel6D-D146A*, los resultados obtenidos coinciden con lo descrito para los mutantes equivalentes de las celulasas de *TrCel6A*, *Cel6A-D221A*, y *TfCel6B*, *Cel6B-D274A*. Similarmente a *Cel6D* las enzimas mutadas pierden por completo la actividad hidrolítica, confirmando el papel del residuo mutado como esencial para la actividad enzimática de las celulasas GH6. Por el contrario las mutaciones equivalentes a *Cel6D-D97A* de *P. barcinonensis* en los enzimas de *T. reesei* y *T. fusca* no producen el mismo efecto que en la enzima estudiada. Mientras en ésta

causa una pérdida total de la actividad las enzimas mutadas *TrCel6A-D175A* y *TfCel6B-D226A* mantienen la actividad aunque notablemente disminuida (Vuong & Wilson 2009b; Sandgren *et al.* 2013). En cuanto al diferente resultado de actividad en el mutante este segundo residuo, potencialmente involucrado en el ataque nucleofílico (mutante *Cel6D-D97A*), los trabajos publicados para identificar el aminoácido responsable de este ataque en celobiohidrolasas GH6 no son concluyentes. Estos trabajos postulan la posible existencia de un nuevo mecanismo de hidrólisis que requeriría una red compleja de transferencia de protones involucrando varios aminoácidos (Vuong & Wilson 2009b).

La mayoría de celobiohidrolasas de familia 6 caracterizadas hasta el momento son de bacterias y hongos que se encuentran filogenéticamente distantes a la cepa de estudio. Estas enzimas presentan distinta especificidad de sustrato. *TrCel6A* tiene máxima actividad sobre Avicel y celulosa bacteriana microcristalina pero tiene menor actividad sobre PASC (Tomme *et al.* 1988; Koivula *et al.* 1998; Poidevin *et al.* 2013); *TfCel6B* presenta máxima actividad sobre PASC y una actividad ligeramente inferior sobre CMC (Zhang *et al.* 1995; Watson *et al.* 2002); mientras que *Cel6D* presenta máxima actividad específica sobre PASC, mucha menor actividad sobre otros sustratos celulósicos cristalinos y es completamente inactiva sobre CMC. A pesar de presentar un limitado espectro de actividad sobre sustratos celulósicos, *Cel6D* tiene mayor actividad específica sobre PASC (0,66 U/mg), aproximadamente 10 veces superior, a las otras celobiohidrolasas GH6 caracterizadas como *TrCel6A* (Tomme *et al.* 1988), *TfCel6B* (Watson *et al.* 2002), *CcCel6A*, *CcCel6B* y *CcCel6C* de *Coprinopsis cinérea* (Liu *et al.* 2009) que presentan 0,052, 0,065, 0,0395, 0,084 y 0,0512 U/mg respectivamente. La actividad de *Cel6D* sobre Avicel (0,01 U/mg) es menor que sobre su sustrato preferido, pero aun así es mayor que la actividad de *TrCel6A* y *Cel6C* de *Podospora anserina*, que muestran 0,0076 y 0,0019 U/mg, respectivamente (Tomme *et al.* 1988; Poidevin *et al.* 2013).

Al incluir cationes metálicos y detergentes en las reacciones enzimáticas de *Cel6D*, la actividad de la enzima se vio afectada, reduciéndose aproximadamente en un 50% con la mayoría de los iones utilizados. En presencia de Hg^{2+} , Tween80, Tritón X-100 y DMSO, la inactivación enzimática fue completa. Por el contrario los iones Ca^{2+} y Li^+ a concentraciones bajas (1mM) produjeron un ligero incremento en la actividad

enzimática. Estos resultados no pueden compararse con otras enzimas, ya que no hay información acerca de la influencia de cationes en la actividad de las celobiohidrolasas GH6.

El análisis mediante cromatografía en capa fina de los productos de hidrólisis de Cel6D sobre PASC, mostró celobiosa como producto de hidrólisis mayoritario. Este patrón de hidrólisis es semejante al descrito para la mayoría de celobiohidrolasas de las familias 6 (extremo no reductor) y también en las celobiohidrolasas de la familia GH7 (extremo reductor) (Koivula *et al.* 1996; Tomme *et al.* 1996; Teeri *et al.* 1998; Liu *et al.* 2009). Adicionalmente en el caso de Cel6D se observó celotriosa y glucosa como productos minoritarios cuando el tiempo de incubación fue prolongando. La aparición de estos dos productos de hidrólisis, también observado en otras enzimas GH6, se ha atribuido a una falsa hidrólisis durante la acomodación inicial del sustrato (Poidevin *et al.* 2013). Cuando se evaluó la actividad de Cel6D sobre celooligosacáridos de distinta longitud de cadena (G2-G5), no se observó hidrólisis de la celobiosa, mientras que la celotriosa, celotetraosa y celopentaosa fueron hidrolizadas con liberación de celobiosa como producto mayoritario en todos los casos. El hecho de que el producto liberado de los distintos sustratos ensayados sea celobiosa indica que Cel6D actúa como celobiohidrolasa procesiva, ya que una vez la cadena de celulosa se encuentra dentro del túnel catalítico, es secuencialmente hidrolizada dando como producto una unidad de celobiosa cada vez (Boisset *et al.* 2001).

Los valores de pH y temperatura óptimos varían entre las celobiohidrolasas GH6. Los valores obtenidos de temperatura y pH óptimos de Cel6D (47°C y pH 3,9) son similares a los valores publicados para pPICBH6 de *Penicillium funiculosum*, que presenta condiciones óptimas 50°C y pH 4 (Chinnathambi *et al.* 2015) y TrCel6A 50°C y pH 5 (Tomme *et al.* 1988). Varias otras celobiohidrolasas caracterizadas de esta familia también presentan máxima actividad a 50°C, excepto las celulasas de *Coprinopsis cinérea*, que tienen temperatura óptima de 30°C. En cuanto al efecto del pH, en contraste a la enzima caracterizada, varias de las celobiohidrolasas GH6 presentan pH óptimo neutro, tales como TfCel6B (Zhang *et al.* 1995), CcCel6A y CcCel6C (Liu *et al.* 2009), PaCel6A y PaCel6C (Poidevin *et al.* 2013).

La estabilidad térmica y a pH extremos son características importantes en las enzimas de uso industrial, ya que incrementan la vida del biocatalizador y permiten

reacciones industriales a temperaturas más altas, tasas de catálisis rápidas y reducen el costo de la biocatálisis (Wu & Arnold 2013). Las celobiohidrolasas GH6 caracterizadas hasta el momento son relativamente termoestables y tolerantes en un amplio rango de pH. En concreto *TfCel6B* retiene el 100% de actividad después de 16h a 55°C a pH óptimo (pH 7) y mantienen el 90% de actividad en las mismas condiciones a pH 6 y 10 (Zhang *et al.* 1995) y *TrCel6A* es termoestable después de 2h a 50°C a pH 5 (Tomme *et al.* 1988). Cel6D presenta algunas limitaciones ya que pierde el 80% de actividad en 15 min a 55°C y únicamente es estable en el margen de pH entre 4 y 6. Estos hechos reducen la aplicabilidad de esta enzima en procesos industriales pero abren la puerta para estudios de mutagénesis para mejorar estas características.

5.3.2. Ingeniería proteica de Cel6D

La eliminación del CBM3b de la enzima wt provocó una pérdida importante de actividad, ya que la construcción Cel6D-GH6Fn3 presentó un 89% de reducción de la actividad sobre el sustrato preferido (PASC), mientras que sobre Avicel y RAC la actividad fue indetectable. La delección posterior del módulo duplicado Fn3 en la construcción Cel6D-GH6 causó la total pérdida de actividad sobre todos los sustratos, indicando la contribución de este módulo Fn3 en la actividad enzimática. Los resultados muestran la importancia de estos dos módulos para la actividad de la enzima Cel6D estudiada en el presente trabajo. La ingeniería proteica de la celobiohidrolasa *TfCel6B* mostró que al separar del módulo catalítico el módulo de unión a carbohidratos, en este caso de la familia 2 (CBM2), la enzima retenía el 77% de actividad sobre PASC o CMC y un 33% sobre papel filtro (Zhang *et al.* 1995). Este comportamiento también ha sido observado en *TrCel6A*, que retiene el 69% de la actividad enzimática sobre PASC y 37% de actividad sobre Avicel (Tomme *et al.* 1988) al separar el módulo de unión a carbohidratos, en este caso de la familia 1 (CBM1). La distinta contribución del dominio de unión a carbohidratos a la actividad de las tres enzimas mencionadas es difícil de interpretar, ya que son de familias distintas y en el caso de Cel6D se encuentra en el extremo C-terminal mientras que en las otras dos enzimas en el N-terminal. Son por lo tanto enzimas de arquitectura modular diferente. Cabe destacar que la familia CBM3 está subdividida en tres tipos. Los tipos CBM3a y CBM3b se unen fuertemente a celulosa cristalina, mientras que el tipo CBM3c no se puede unir sustratos celulósicos (Yaniv,

Halfon, *et al.* 2012). A este respecto es importante mencionar los estudios de ingeniería proteica realizados con la endoglucanasa modular Cel9B de *Paenibacillus barcinonensis*, que también contiene un módulo CBM3b (Chiriac 2010). La eliminación de dicho módulo causó una reducción a la mitad de la actividad de la enzima sobre celulosas cristalinas, mientras que no produjo efectos significativos en la actividad sobre celulosa amorfa. La importancia del módulo CBM3b para la actividad sobre celulosa cristalina está relacionada sin duda con su capacidad de unión de dicho sustrato. Esta se evaluó mediante ensayos de unión a Avicel del módulo CBM3b recombinante (Cel6D-CBM3b), que mostraron la fuerte unión de dicho módulo a celulosa cristalina. Los resultados indican que el dominio de unión a carbohidratos CBM3b de la celulasa Cel6D es de gran importancia para la actividad de la enzima sobre sustratos celulósicos cristalinos, corroborando estudios publicados sobre la contribución de dicho módulo a la actividad enzimática de las celulasas (Chiriac *et al.* 2010; Yaniv, Petkun, *et al.* 2012).

En cuanto a la influencia de los módulos Fn3 en la actividad de la enzima no se conocen datos publicados semejantes. Los módulos de Fn3 son comúnmente encontrados en las glicosil hidrolasas extracelulares bacterianas. La función de este dominio no es clara, pero se ha sugerido que su presencia puede ser importante para la hidrólisis de celulosa por la modificación de la superficie del polímero (Kataeva *et al.* 2002).

5.3.3. Estudios de sinergismo de Cel6D con endoglucanasas

El sinergismo entre celulasas facilita la hidrólisis eficiente de la celulosa, ya que al menos tres tipos de enzimas están implicadas en la biodegradación del polímero, las endoglucanasas que hidrolizan las cadenas de celulosa al azar, las celobiohidrolasas que hidrolizan las cadenas en unidades de celobiosa desde los extremos de las mismas y las β -glucosidasas que hidrolizan los celooligosacáridos cortos en glucosa.

En los estudios de sinergismo entre Cel9B y Cel6D de *Paenibacillus barcinonensis* se evidenció un efecto sinérgico en la degradación de celulosa cristalina (PASC). Este sinergismo se observó en las primeras horas de incubación y desapareció a partir de las 3h. Es posible que la acumulación de celobiosa cause en estas condiciones inhibición por producto, tal como se ha descrito para otras enzimas (Gruno *et al.* 2004). En los estudios de sinergismo se incluyeron otros tipos de sustratos celulósicos, tanto cristalinos como amorfos (Avicel, papel filtro y CMC). Interesantemente, sustratos

como Avicel y papel filtro, que no son hidrolizados o lo son de forma no detectable por las enzimas de forma individual, fueron despolimerizados por la acción conjunta de las 2 enzimas, indicando por lo tanto un importante sinergismo entre ellas. Los resultados obtenidos corroboran el efecto sinérgico entre Cel9B de *Paenibacillus barcinonensis* y TjCel6B descrito anteriormente sobre celulosa cristalina (Sánchez *et al.* 2004). El efecto sinérgico entre celulasas de familias 6 y 9 en la despolimerización de celulosa cristalina (BMCC y Avicel) también se ha descrito en otras investigaciones, donde muestran altas tasas de conversión del sustrato, hasta el 80% aproximadamente (Watson *et al.* 2002). Por otra parte, en cuanto a los ensayos sobre celulosa amorfa (CMC), la falta de sinergismo entre Cel6D y Cel9B podía esperarse debido a que Cel6D no es activa sobre este sustrato. Sin embargo se observó una disminución de la actividad respecto a la de la enzima Cel9B en solitario, indicando que la presencia de Cel6D dificultaba la actividad de la endoglucanasa Cel9B sobre su sustrato favorito. Comportamientos similares no se han encontrado en la bibliografía.

Los mecanismos de sinergismo endo-exo, se interpretan generalmente por un mecanismo de acción secuencial de las enzimas: las endoglucanasas en un ataque inicial en las regiones amorfas de la celulosa proporcionan nuevos extremos de cadena para las celobiohidrolasas (Nidetzky *et al.* 1994). También se ha descrito que el ataque de las endoglucanasas puede producir alrededor de un 50% de azúcares reductores insolubles a partir de sustratos parcialmente amorfos y las celobiohidrolasas hidrolizaran estos sustratos insolubles produciendo celobiosa (Irwin *et al.* 1993). Este mecanismo explicaría, el efecto sinérgico encontrado entre Cel9B y Cel6D sobre celulosa cristalina, ya que la endoglucanasa Cel9B produciría nuevos extremos no reductores, que serían reconocidos por Cel6D siempre que estuvieran en sustratos de al menos tres unidades. La disminución de la actividad conjunta de las 2 enzimas tras varias horas de incubación puede deberse a que las dos enzimas producen celobiosa soluble y ninguna es capaz de hidrolizarla. Por el contrario, la falta de acción sinérgica sobre celulosa amorfa entre Cel6D y Cel9B no está totalmente entendida, aunque podría deberse a que el CMC es un sustrato completamente amorfo y los nuevos extremos no reductores producidos no son reconocidos por Cel6D.

Respecto a la falta de sinergismo entre Cel6D y Cel5A de *Paenibacillus barcinonensis*, los resultados contrastan con los descritos en bibliografía entre Cel5A y

Cel6B, ambos de *Thermobifida fusca*, que muestran el efecto sinérgico de estas enzimas en la hidrólisis de celulosa cristalina (Watson *et al.* 2002; Vuong & Wilson 2009a).

5.4. ENZIMAS MODIFICADORAS DE CELULOSA SIN ACTIVIDAD HIDROLITICA EN PASTA DE PAPEL

El uso de enzimas modificadoras sin actividad hidrolítica podría facilitar la degradación de la celulosa, por modificación de la estructura del sustrato. Las expansinas son nuevas enzimas, descubiertas inicialmente en vegetales, que modifican la superficie de la celulosa mediante una extensión de las paredes celulares. Las expansinas bacterianas y vegetales son homólogas, tienen características estructurales y actividad similar.

Existen antecedentes de que el uso de expansinas debilitan mecánicamente las fibras de papel, porque rompen los enlaces de hidrogeno de las fibras de celulosa. Por este motivo se ensayó el efecto de la aplicación de BsEXLX1 a fibras de lino y eucalipto. Los efectos producidos no pudieron ser detectados mediante métodos colorímetros, ni por métodos cromatográficos (cromatografía de capa fina), comprobándose que efectivamente la enzima no libera azúcares solubles de la celulosa. Estudios similares de los productos de la acción enzimática de BsEXLX1 sobre celulosa cristalina (Avicel) analizados por HPLC no detectaron ningún producto de hidrólisis, en concordancia con los resultados obtenidos (Kerff *et al.* 2008).

El análisis de las fibras papeleras por SEM mostró que la expansina BsEXLX1 causó una modificación en la estructura de las fibras de lino, que presentaron una anchura incrementada. Modificaciones parecidas se han descrito por SWOI (Saloheimo *et al.* 2002), LOOS1 (Quiroz-Castañeda *et al.* 2011) y ScEx1x1 (Tovar-Herrera *et al.* 2015), expansinas o enzimas similares. Estos cambios observados en la morfología de sustratos celulósicos cristalinos se han considerado como un efecto burbuja en las fibras, efecto que puede ser útil para mejorar la hidrólisis de la celulosa, al mejorar la amorfogénesis que se produce durante la degradación de la lignocelulosa con enzimas hidrolíticas. Sin embargo la expansina BsEXLX1 no causó modificaciones aparentes en las fibras de eucalipto. La distinta composición de la pared de los dos vegetales puede ser la causa de las diferencias encontradas. La falta de actividad solubilizadora de la enzima a partir de las fibras papeleras, concuerda con los resultados obtenidos

anteriormente por el grupo de investigación. Estos mostraron que la aplicación de la expansina BsEXLX1 no liberó azúcares reductores ni mejoró la hidrólisis del papel filtro por celulasas comerciales (Padilha 2013).

Las LPMO's (Lytic Polysaccharide Monooxygenases) representan un mecanismo nuevo de degradación de polisacáridos insolubles, mediante un mecanismo oxidativo que provoca la escisión de la cadena. Desde el punto de vista científico generan gran expectativa ya que nuevas investigaciones revelan cada más vez los potenciales usos industriales de estas enzimas para acelerar la degradación de la biomasa (Forsberg *et al.* 2011; Horn *et al.* 2012; Li *et al.* 2012; Beeson *et al.* 2012; Eibinger *et al.* 2014; Borisova *et al.* 2015). El interés biotecnológico de estas enzimas incentivó su búsqueda en las cepas de colección del grupo de investigación. Se identificó la enzima CBP3 de *Paenibacillus illinoisensis* C37 con moderada identidad a la LPMO caracterizada Cels2 de *Streptomyces coelicolor* A3, que presenta actividad sobre celulosa (Forsberg *et al.* 2011). La enzima CBP3 fue ensayada sobre varios sustratos, en las distintas condiciones descritas en bibliografía pero no se logró detectar actividad en la enzima. Los resultados son sorprendentes por la identidad de CBP3 con Cels2 y otras LPMO's caracterizadas. Posiblemente la complejidad de la producción de la enzima y del ensayo enzimático, hayan sido factores que han impedido la obtención de resultados positivos, en cuanto a despolimerización de la celulosa. Sin embargo la aplicación de esta enzima sobre pastas de papel, reveló que CBP3 producía cambios morfológica de las fibras de pastas de lino, causando una disrupción parcial su estructura, tal como se observó por SEM.

Los resultados obtenidos con la LMPO CBP3 y la expansina BsEXLX1 indican el potencial de las mismas en la modificación de las fibras, en la fabricación de papel y en general el procesamiento industrial de la celulosa. Esto puede suponer un gran avance para el desarrollo de la biotecnología para la valorización de la biomasa

5.5. APLICACION DE CELULASAS EN PROCESOS DE REFINO CONVENCIONAL

La producción de papel es un proceso de alto consumo energético, por lo que la mejora de la eficiencia energética es primordial para la industria papelera. Actualmente los costos elevados de energía y las regulaciones ambientales han obligado a los

fabricantes de papel a reducir el consumo de energía asociado al proceso de refinado, ya que representa del 15 al 18% de la energía total requerida para producción de papel. El proceso de refino se aplica normalmente para mejorar la unión interfibrilar y desarrollar las propiedades de resistencia mecánica del papel (Cui *et al.* 2015). En general el propósito del refinado mecánico puede dividirse en dos categorías: la fibrilación superficial y deslaminación interna de la pared celular, ambos para mejorar las propiedades del papel. En el refinado convencional, las propiedades físicas de resistencia y ópticas del papel, evolucionan con el número de revoluciones del molino PFI. El incremento del refinado aumenta la resistencia al estallido, tracción y plegado, debido al incremento del área superficial de contacto, y por lo tanto de los enlaces fibra-fibra. Sin embargo, el refinado causa la reducción en la longitud de las fibras, que se traduce en una pérdida de la resistencia mecánica al desgarró. Como resultado de la mejora de las propiedades causadas por el refinado, se obtienen hojas con mayor densidad, lo que provoca una reducción de la porosidad, que está directamente relacionada con la disminución de la permeancia al aire de las hojas fabricadas (Park *et al.* 2015).

El refinado asistido por enzimas (biorefinado) puede ser un proceso amigable con el medio ambiente para mejorar las propiedades de resistencia del papel. Varios estudios describen que el pretratamiento de la pasta con celulasas posibilita reducir el gasto energético en procesos de refinado (García *et al.* 2002). Se ha publicado también que el tratamiento de la pasta con celulasas comerciales como etapa previa al refinado puede lograr más fibrilación superficial de las fibras, mejorar la unión entre fibras y aumentar las propiedades de resistencia de pasta kraft de maderas blandas (Liu *et al.* 2012). Sin embargo, otras publicaciones muestran que el tratamiento con determinadas celulasas comerciales provoca la pérdida de la fuerza intrínseca de las fibras, que afecta a la resistencia mecánica de una manera muy negativa (Gil *et al.* 2009). Dados los diferentes resultados obtenidos con distintas celulasas sobre diferentes pastas, es de gran interés identificar enzimas que modifiquen las pastas sin degradarlas y contribuyan positivamente al desarrollo de propiedades mecánicas. En este contexto las celobiohidrolasas podrían ser útiles para realizar modificaciones sutiles en propiedades de las fibras de papel, ya que este tipo de enzimas no realiza cortes dentro de las cadenas de celulosa, solo actúan en los extremos de las mismas (Teeri 1997).

La aplicación de la endoglucanasa Cel9B en procesos de refinado fue evaluada en trabajos anteriores por el grupo de investigación, tanto sobre pastas de eucalipto como sobre pastas de lino. La aplicación de la enzima mejoró las propiedades de resistencia de los papeles obtenidos de estos dos tipos de fibras (García *et al.* 2002; Garcia-Ubasart *et al.* 2013). En los estudios con pastas de lino, se comprobó que la aplicación de Cel9B a dosis controladas acelera los efectos del proceso de refinado, ya que mejoró las propiedades de resistencia como los índices de tracción y estallido. Como contrapartida el tratamiento con Cel9B causó una mayor disminución del índice de desgarró que los controles, relacionado con el acortamiento de las fibras y el aumento de los finos que provocó la enzima. Otro factor que influye en el descenso del índice de desgarró es el debilitamiento de la fuerza intrínseca de la fibra, que se evidenció en la medición del WZSTS, que presentó valores bajos con respecto a los controles. Estos estudios concluyeron que Cel9B es un coadyuvante en las operaciones de refinado de la pasta de lino. Sin embargo merece la pena destacar que los mismos estudios mostraron que dosis elevadas de la celulasa Cel9B causan un debilitamiento de las propiedades mecánicas del papel, que en su mayoría se ven afectadas negativamente.

La evaluación de la nueva celulasa Cel6D en el refinado de las pastas de lino mostró que la aplicación de la enzima causa un incremento importante en la mayoría de propiedades mecánicas, como resistencia a la tracción, estallido y plegado. Todas estas propiedades dependen directamente de la capacidad de unión interfibrilar que se desarrolla con la modificación de la morfología de las fibras. La enzima también produjo una mejora de las propiedades ópticas como el coeficiente light scattering, que está ligado directamente con la forma y tamaño de la fibra e indica la capacidad de unión fibra a fibra (Parsons 1942). Los resultados papeleros concuerdan con los datos obtenidos por SEM, que muestran una modificación superficial de las fibras, con una importante fibrilación externa. De acuerdo con los resultados obtenidos, el uso de Cel6D produce cambios en la estructura externa e interna de las fibras, lo que provoca que exista una mayor superficie de contacto y amplía la posibilidad de incrementar la unión secundaria celulosa-agua-celulosa.

El análisis de longitud de las fibras papeleras mostró que la celulasa Cel6D no modificó la longitud media de la fibras por lo que descenso de la resistencia al desgarró fue menor que en los controles. Este resultado es muy notable, ya que la disminución de

la resistencia al desgarro es inherente al refinado y existe mucho interés por desarrollar herramientas tecnológicas para evitar su disminución al refinar.

La densidad del papel es una propiedad importante, ya que nos proporciona información sobre la estructura de la hoja, que se encuentra relacionada con la mayoría de las propiedades papeleras como porosidad, resistencia mecánica y propiedades ópticas. Habitualmente una baja densidad sería un indicativo de que las propiedades de resistencia mecánica y ópticas del papel son deficientes (Biermann 1996b; Joutsimo & Asikainen 2013). Normalmente la densidad del papel está en el rango de 0,5-0,8 g/cm³. Sin embargo la aplicación de Cel6D origina papeles de densidad inferior (alrededor de 0,4 g/cm³) pero con una notable mejora en las propiedades de resistencia mecánica del papel y de las fibras. Este comportamiento es totalmente diferente al obtenido con otras celulasas y es un rasgo característico de la nueva celulasa Cel6D.

Los resultados obtenidos muestran que la aplicación de Cel6D en pastas de lino acelera los efectos del proceso de refinado de manera más eficiente que Cel9B, ya que el tratamiento con Cel6D, favorece directamente la formación del papel y confiere homogeneidad a la estructura. Los resultados indican que para obtener papeles con las propiedades de resistencia mecánica que aporta el uso de Cel6D, se necesita un 84% más de consumo energético en el proceso de refinado, hecho indicativo de la eficiencia de la enzima para disminuir el impacto medioambiental de la industria papelera.

Los resultados positivos obtenidos de las propiedades de resistencia mecánica y ahorro de energía con el uso de Cel6D en procesos de refinado, no son comparables con datos mostrados en la bibliografía. La aplicación de celobiohidrolasas en etapas previa al refinado en pastas de paja de trigo han sido descritos para la CBHI de *Trichoderma reesei*, donde se obtuvieron ahorros importantes de energía de hasta el 40%. Este ahorro se presentaba cuando la intensidad del refino era baja y el uso de CBHI únicamente dio lugar a una mayor resistencia a la tracción, mientras que las demás propiedades de resistencia mecánica se veían afectadas (Pere et al. 1996; Bhat 2000). CBHI es una celobiohidrolasa de extremo reductor de familia GH7, de origen fúngico (Fägerstam & Pettersson 1979). Los resultados obtenidos con Cel6D, no son totalmente claros, ya que la mejora de las propiedades de resistencia mecánica de los papeles, no se sabe claramente a que factor se podría atribuir estos incrementos, si al origen de la enzima, la familia de la que proviene la enzima o al mecanismo de acción de la misma.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

6.1. Se ha clonado, purificado y caracterizado la liquenasa Lic16A de *Paenibacillus barcinonensis* BP-23. La enzima pertenece a la familia 16 de las glicosil hidrolasas (GH16), presenta actividad sobre β -1,3-1,4 glucanos mixtos como β -glucano de cebada y liquenano, y no muestra actividad sobre β -1,4-glucanos ni sobre β -1,3-glucanos.

6.2. Los productos de reacción de Lic16A sobre β -glucano son oligosacáridos cortos que contienen moléculas de glucosa enlazadas por una mezcla de enlaces β -1,3 y β -1,4. La enzima presenta un alto potencial para la producción de oligómeros de posible aplicación como prebióticos.

6.3. El ensamblaje y análisis del genoma de *Paenibacillus barcinonensis* BP-23 identificó 12 nuevas glicosil hidrolasas putativas, entre las que se incluyen xilanasas, arabinofuranosidasas y una celulasa.

6.4. La nueva celulasa Cel6D de *Paenibacillus barcinonensis* BP-23 es una enzima modular constituida por un dominio catalítico de familia 6 de las glicosil hidrolasas (GH6), un módulo afín a fibronectina tipo 3 duplicado (Fn3) y un módulo de unión a carbohidratos de familia 3 tipo b (CBM3b).

6.5. Cel6D es una celobiohidrolasa de extremo no reductor que muestra máxima actividad sobre celulosa hinchada (PASC) y no es activa sobre carboximetilcelulosa (CMC). Cel6D libera celobiosa como único producto de hidrólisis y presenta máxima actividad a 47°C y pH 4.

6.6. Cel6D presenta actividad sinérgica sobre sustratos celulósicos cristalinos con la endoglucanasa Cel9B de *Paenibacillus barcinonensis* BP-23, mientras que no presenta sinergismo con la endoglucanasa Cel5A de la misma cepa.

6.7. La enzima recombinante Cel6D-GH6, conteniendo únicamente el dominio catalítico de Cel6D, no es activa sobre ningún sustrato celulósico. Este hecho indica que

la presencia de los dominios Fn3 y CBM3b es imprescindible para la actividad de la enzima.

6.8. El módulo de unión a carbohidratos CBM3b presenta capacidad de unión a sustratos celulósicos cristalinos. La enzima truncada Cel6D-GH6Fn3, desprovista del mismo, presenta una actividad enzimática reducida en casi el 90%, hecho que indica su importante contribución a la actividad enzimática de Cel6D.

6.9. Se ha identificado y clonado el gen *cbp3* de *Paenibacillus illinoisensis* C37, que codifica una proteína con elevada homología con la monooxigenasa lítica de polisacáridos CBP21 de *Serratia marcescens*. La proteína no presenta actividad enzimática sobre celulosas de laboratorio en las condiciones de ensayo realizadas.

6.10. La expansina BsEXLX1 de *Bacillus subtilis* 497 ha sido producida y ensayada sobre pastas de papel de lino y eucalipto. Muestra un efecto modificador de la superficie de las fibras de lino, que presentan adicionalmente una anchura incrementada en los análisis por SEM.

6.11. La aplicación de la nueva celulasa Cel6D como etapa previa al refinado de pastas de lino produce un aumento del grado de refinado (°SR) y del índice de retención de agua (%IRA), indicando que la enzima causa un efecto de biorefinado de las fibras de lino.

6.12. El tratamiento con Cel6D provoca un notable incremento en las propiedades mecánicas del papel como resistencia a la tracción, resistencia al estallido y resistencia al plegado. La enzima causa una menor disminución de la resistencia al desgarro que el refinado convencional.

6.13. La aplicación de la enzima sobre pastas de lino produce papeles de menor densidad. El efecto de mejora de propiedades mecánicas simultáneo a la disminución de la densidad del papel que causa la aplicación de la enzima es un hecho sin precedentes en tecnología papelera e indicativo del efecto diferencial y único de Cel6D en la modificación de fibras celulósicas

6.14. El incremento de las propiedades de resistencia mecánica del papel producido por Cel6D permite considerar a la enzima como un coadyuvante de refinado. Su acción se relaciona directamente con la modificación y fibrilación externa de las fibras de celulosa observada por análisis por SEM.

7. BIBLIOGRAFIA

- Arancibia, C., Bayarri, S., & Costell, E. (2015). Effect of hydrocolloid on rheology and microstructure of high-protein soy desserts. *Journal of Food Science and Technology*, 52(10), 6435–44.
- Avataneo, C., & Sablier, M. (2016). New criteria for the characterization of traditional East Asian papers. *Environmental Science and Pollution Research International*.
- Bajpai, P. K. (2010). Solving the problems of recycled fiber processing with enzymes. *BioResources*, 5, 1311–1325.
- Bansal, P., Hall, M., Realff, M. J., Lee, J. H., & Bommarius, A. S. (2009). Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. *Biotechnology Advances*, 27(6), 833–848.
- Bassegoda Puigdomènech, A. (2011). Prospection and evaluation of novel bacterial lipases for fine chemistry = Prospecció i avaluació de noves lipases bacterianes per a la química fina. *Tesis Doctoral del Departamento de Microbiología de la Universidad de Barcelona*.
- Beeson, W. T., Phillips, C. M., Cate, J. H. D., & Marletta, M. a. (2012). Oxidative cleavage of cellulose by fungal copper-dependent polysaccharide monooxygenases. *Journal of the American Chemical Society*, 134(2), 890–892.
- Beeson, W. T., Vu, V. V., Span, E. A., Phillips, C. M., & Marletta, M. A. (2015). Cellulose degradation by polysaccharide monooxygenases. *Annual Review of Biochemistry*, 84, 923–46.
- Bhat, M. K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18(5), 355–83.
- Bhat, M. K., & Bhat, S. (1997). Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*, 15(3-4), 583–620.
- Biedendieck, R., Borgmeier, C., Bunk, B., Stammen, S., Scherling, C., Meinhardt, F., Jahn, D. (2011). Systems biology of recombinant protein production using *Bacillus megaterium*. *Methods in Enzymology*, 500, 165–95.
- Bielecki, S., & Galas, E. (1991). Microbial beta-glucanases different from cellulases. *Critical Reviews in Biotechnology*, 10(4), 275–304.
- Biermann, C. J. (1996a). *Handbook of Pulping and Papermaking. Handbook of Pulping and Papermaking*. Elsevier.
- Biermann, C. J. (1996b). *Handbook of Pulping and Papermaking. Handbook of Pulping and Papermaking*. Elsevier.
- Blanco, A., Díaz, P., Martínez, J., Vidal, T., Torres, A. L., & Pastor, F. I. (1998). Cloning of a new endoglucanase gene from *Bacillus sp.* BP-23 and characterization of the enzyme. Performance in paper manufacture from cereal straw. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(1), 48–54.

- Blanco, A., & Pastor, F. I. J. (1993). Characterization of cellulase-free xylanases from the newly isolated *Bacillus sp.* strain BP-23. *Canadian Journal of Microbiology*.
- Blanco, A., Vidal, T., Colom, J. F., & Pastor, F. I. (1995). Purification and properties of xylanase A from alkali-tolerant *Bacillus sp.* strain BP-23. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(12), 4468–70.
- Boerjan, W., Ralph, J., & Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 519–46.
- Boisset, C., Pétrequin, C., Chanzy, H., Henrissat, B., & Schlein, M. (2001). Optimized mixtures of recombinant *Humicola insolens* cellulases for the biodegradation of crystalline cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, 72(3), 339–345.
- Borisova, A. S., Isaksen, T., Dimarogona, M., Kognole, A. A., Mathiesen, G., Várnai, A., Eijsink, V. G. H. (2015). Structural and Functional Characterization of a Lytic Polysaccharide Monooxygenase with Broad Substrate Specificity. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(38), 22955–69.
- Borriss, R., Buettner, K., & Maentsaelae, P. (1990). Structure of the beta-1,3-1,4-glucanase gene of *Bacillus macerans*: homologies to other beta-glucanases. *Molecular & General Genetics : MGG*, 222(2-3), 278–83.
- Box, G. E. P., Hunter, W. G., & Hunter, J. S. (1978). Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis, and model building. *Wiley*.
- Cadena, E. M. (2009). Estudio del refinado de pastas de papel utilizando métodos biotecnológicos (enzimas). *Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Textil Y Papelera. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial Y Aeronáutica de Tarrasa. Universidad Politécnica de Cataluña. Tarrasa, España*.
- Cadena, E. M., Chriac, A. I., Pastor, F. I. J., Diaz, P., Vidal, T., & Torres, A. L. (2010). Use of cellulases and recombinant cellulose binding domains for refining TCF kraft pulp. *Biotechnology Progress*, 26(4), 960–7.
- Cerda, L. A., Valenzuela, S. V., Diaz, P., & Pastor, F. I. J. (2016). New GH16 β -glucanase from *Paenibacillus barcinonensis* BP-23 releases a complex pattern of mixed-linkage oligomers from barley glucan. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 63(1), 51–6.
- Chen, C., Cui, Z., Song, X., Liu, Y.-J., Cui, Q., & Feng, Y. (2015). Integration of bacterial expansin-like proteins into cellulosome promotes the cellulose degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Chinnathambi, V., Balasubramaniam, M., Gurusamy, R., & Paramasamy, G. (2015). Molecular Cloning and Expression of a Family 6 Cellobiohydrolase Gene *cbhII* from *Penicillium funiculosum* NCL1. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 06(03), 213–222.
- Chriac, A. I. (2010). Ingeniería proteica de Cel9B de *Paenibacillus barcinonensis* para el

- diseño de nuevas celulasas y módulos de unión a carbohidratos con aplicación en las industrias de celulosa y papel. *Tesis Doctoral del Departamento de Microbiología de la Universidad de Barcelona*.
- Chiriac, A. I., Cadena, E. M., Vidal, T., Torres, A. L., Diaz, P., & Pastor, F. I. J. (2010). Engineering a family 9 processive endoglucanase from *Paenibacillus barcinonensis* displaying a novel architecture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(4), 1125–34.
- Chow, V., Nong, G., St John, F. J., Rice, J. D., Dickstein, E., Chertkov, O., ... Preston, J. F. (2012). Complete genome sequence of *Paenibacillus* sp. strain JDR-2. *Standards in Genomic Sciences*, 6(1), 1–10.
- Cohen, S. N., Chang, A. C., & Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(8), 2110–4.
- Collins, T., Gerday, C., & Feller, G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(1), 3–23.
- Corrêa, T. L. R., Dos Santos, L. V., & Pereira, G. A. G. (2015). AA9 and AA10: from enigmatic to essential enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Cosgrove, D. J. (1997). Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *The Plant Cell*, 9(7), 1031–41.
- Cosgrove, D. J. (2000). Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*, 407(6802), 321–6.
- Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6(11), 850–61.
- Cosgrove, D. J. (2015). Plant expansins: diversity and interactions with plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology*, 25, 162–72.
- Coughlan, M. P., & Hazlewood, G. P. (1993). beta-1,4-D-xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 17 (Pt3), 259–89.
- Cuervo, L., Folch, J., & Quiroz, R. (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *BioTecnología*, 13(3), 11–25.
- Cui, L., Meddeb-Mouelhi, F., Laframboise, F., & Beauregard, M. (2015). Effect of commercial cellulases and refining on kraft pulp properties: correlations between treatment impacts and enzymatic activity components. *Carbohydrate Polymers*, 115, 193–9.
- Davies, G., & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3(9), 853–859.

- Delmer, D. P., & Amor, Y. (1995). Cellulose biosynthesis. *The Plant Cell*, 7(7), 987–1000.
- Dimarogona, M., Topakas, E., & Christakopoulos, P. (2012). Cellulose degradation by oxidative enzymes. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2, 15.
- Doblin, M. S., Kurek, I., Jacob-Wilk, D., & Delmer, D. P. (2002). Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes. *Plant & Cell Physiology*, 43(12), 1407–20.
- Dodd, D., & Cann, I. K. O. (2009). Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *Global Change Biology. Bioenergy*, 1(1), 2–17.
- Eibinger, M., Ganner, T., Bubner, P., Rošker, S., Kracher, D., Haltrich, D., ... Nidetzky, B. (2014). Cellulose surface degradation by a lytic polysaccharide monooxygenase and its effect on cellulase hydrolytic efficiency. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(52), 35929–38.
- Eijsink, V. G. H., Vaaje-Kolstad, G., Vårum, K. M., & Horn, S. J. (2008). Towards new enzymes for biofuels: lessons from chitinase research. *Trends in Biotechnology*, 26(5), 228–35.
- Elgharbi, F., Hmida-Sayari, A., Sahnoun, M., Kammoun, R., Jlaeil, L., Hassairi, H., & Bejar, S. (2013). Purification and biochemical characterization of a novel thermostable lichenase from *Aspergillus niger* US368. *Carbohydrate Polymers*, 98(1), 967–75.
- Fägerstam, L. G., & Pettersson, L. G. (1980). The 1.4- β -glucan cellobiohydrolases of *Trichoderma reesei* QM 9414. *FEBS Letters*, 119(1), 97–100.
- Fardim, P., & Durán, N. (2003). Modification of fibre surfaces during pulping and refining as analysed by SEM, XPS and ToF-SIMS. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 223(1-3), 263–276.
- Fengel, D., & Wegener, G. (1984). Wood: chemistry, ultrastructure, reactions.
- Ferreira, P. J., Matos, S., & Figueiredo, M. M. (1999). Size characterization of fibres and fines in hardwood kraft pulps. *Particle and Particle Systems Characterization*, 16(1), 20–24.
- Forsberg, Z., Røhr, A. K., Mekasha, S., Andersson, K. K., Eijsink, V. G. H., Vaaje-Kolstad, G., & Sørli, M. (2014). Comparative study of two chitin-active and two cellulose-active AA10-type lytic polysaccharide monooxygenases. *Biochemistry*, 53(10), 1647–56.
- Forsberg, Z., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Bunæs, A. C., Stenstrøm, Y., MacKenzie, A., ... Eijsink, V. G. H. (2011). Cleavage of cellulose by a CBM33 protein. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 20(9), 1479–83.
- French, C. E. (2009). Synthetic biology and biomass conversion: a match made in heaven?. *Journal of the Royal Society, Interface/the Royal Society*, 6 Suppl

- 4(Suppl_4), S547–58.
- Fukuda, M., Watanabe, S., Kaneko, J., Itoh, Y., & Kamio, Y. (2009). The membrane lipoprotein LppX of *Paenibacillus* sp. strain W-61 serves as a molecular chaperone for xylanase of glycoside hydrolase family 11 during secretion across the cytoplasmic membrane. *Journal of Bacteriology*, 191(5), 1641–9.
- Furukawa, T., Bello, F. O., & Horsfall, L. (2014). Microbial enzyme systems for lignin degradation and their transcriptional regulation. *Frontiers in Biology*, 9(6), 448–471.
- Gaiser, O. J., Piotukh, K., Ponnuswamy, M. N., Planas, A., Borriss, R., & Heinemann, U. (2006). Structural basis for the substrate specificity of a *Bacillus* 1,3-1,4-beta-glucanase. *Journal of Molecular Biology*, 357(4), 1211–25.
- García, O., Torres, A. L., Colom, J. F., Pastor, F. I. J., Díaz, P., & Vidal, T. (2002). Effect of cellulase-assisted refining on the properties of dried and never-dried eucalyptus pulp. *Cellulose*, 9(2), 115–125.
- Garcia-Gonzalez, E., Poppinga, L., Fünfhaus, A., Hertlein, G., Hedtke, K., Jakubowska, A., & Genersch, E. (2014). *Paenibacillus larvae* chitin-degrading protein *PLCBP49* is a key virulence factor in American Foulbrood of honey bees. *PLoS Pathogens*, 10(7), e1004284.
- Garcia-Hortal, J. A. (1993). Constituyentes fibrosos de pastas y papeles: morfología, análisis microscópico.
- Garcia-Ubasart, J., Torres, A. L., Vila, C., Pastor, F. I. J., & Vidal, T. (2013). Biomodification of cellulose flax fibers by a new cellulase. *Industrial Crops and Products*, 44, 71–76.
- Georgelis, N., Nikolaidis, N., & Cosgrove, D. J. (2015). Bacterial expansins and related proteins from the world of microbes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(9), 3807–23.
- Gharehkhani, S., Sadeghinezhad, E., Kazi, S. N., Yarmand, H., Badarudin, A., Safaei, M. R., & Zubir, M. N. M. (2015). Basic effects of pulp refining on fiber properties--a review. *Carbohydrate Polymers*, 115, 785–803.
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Loo, J. Van, Rastall, R. A., & Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17(2), 259–75.
- Gil, N., Gil, C., Amaral, M. E., Costa, A. P., & Duarte, A. P. (2009). Use of enzymes to improve the refining of a bleached *Eucalyptus globulus* kraft pulp. *Biochemical Engineering Journal*, 46(2), 89–95.
- Gosalbes, M. J., Pérez-González, J. A., González, R., & Navarro, A. (1991). Two beta-glycanase genes are clustered in *Bacillus polymyxa*: molecular cloning, expression, and sequence analysis of genes encoding a xylanase and an endo-beta-(1,3)-(1,4)-glucanase. *Journal of Bacteriology*, 173(23), 7705–10.

- Grishutin, S. G., Gusakov, A. V., Dzedzyulya, E. I., & Sinitsyn, A. P. (2006). A lichenase-like family 12 endo-(1→4)-β-glucanase from *Aspergillus japonicus*: study of the substrate specificity and mode of action on β-glucans in comparison with other glycoside hydrolases. *Carbohydrate Research*, 341(2), 218–229.
- Grootaert, C., Van den Abbeele, P., Marzorati, M., Broekaert, W. F., Courtin, C. M., Delcour, J. A., ... Van de Wiele, T. (2009). Comparison of prebiotic effects of arabinoxylan oligosaccharides and inulin in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology*, 69(2), 231–42.
- Gruno, M., Våljamäe, P., Pettersson, G., & Johansson, G. (2004). Inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulases by cellobiose is strongly dependent on the nature of the substrate. *Biotechnology and Bioengineering*, 86(5), 503–511.
- Gündüz Ergün, B., & Çalık, P. (2015). Lignocellulose degrading extremozymes produced by *Pichia pastoris*: current status and future prospects. *Bioprocess and Biosystems Engineering*.
- Harrison, M. J., Nouwens, A. S., Jardine, D. R., Zachara, N. E., Gooley, A. A., Nevalainen, H., & Packer, N. H. (1998). Modified glycosylation of cellobiohydrolase I from a high cellulase-producing mutant strain of *Trichoderma reesei*. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 256(1), 119–27.
- Hemsworth, G. R., Davies, G. J., & Walton, P. H. (2013). Recent insights into copper-containing lytic polysaccharide mono-oxygenases. *Current Opinion in Structural Biology*, 23(5), 660–8.
- Hemsworth, G. R., Henrissat, B., Davies, G. J., & Walton, P. H. (2014). Discovery and characterization of a new family of lytic polysaccharide monooxygenases. *Nature Chemical Biology*, 10(2), 122–6.
- Hofemeister, J., Kurtz, A., Borriss, R., & Knowles, J. (1986). The beta-glucanase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* shows extensive homology with that of *Bacillus subtilis*. *Gene*, 49(2), 177–87.
- Horn, S., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., & Eijsink, V. G. (2012). Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for Biofuels*, 5(1), 45.
- Hubbe, M. a., Venditti, R. a., & Rojas, O. J. (2007). What happens to cellulosic fibers during papermaking and recycling? A review. *BioResources*, 2(4), 739–788.
- Irwin, D. C., Spezio, M., Walker, L. P., & Wilson, D. B. (1993). Activity studies of eight purified cellulases: Specificity, synergism, and binding domain effects. *Biotechnology and Bioengineering*, 42(8), 1002–1013.
- Isaksen, T., Westereng, B., Aachmann, F. L., Agger, J. W., Kracher, D., Kittl, R., ... Horn, S. J. (2014). A C4-oxidizing lytic polysaccharide monooxygenase cleaving both cellulose and cello-oligosaccharides. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(5), 2632–42.

- Izydorczyk, M. S., Macri, L. J., & MacGregor, A. W. (1998). Structure and physicochemical properties of barley non-starch polysaccharides — I. Water-extractable β -glucans and arabinoxylans. *Carbohydrate Polymers*, 35(3-4), 249–258.
- Joutsimo, O. P., & Asikainen, S. (2013). Effect of fiber wall pore structure on pulp sheet density of softwood kraft pulp fibers. *BioResources*, 8(2), 2719–2737.
- Kangarlou, S., Haririan, I., & Gholipour, Y. (2008). Physico-mechanical analysis of free ethyl cellulose films comprised with novel plasticizers of vitamin resources. *International Journal of Pharmaceutics*, 356(1-2), 153–66.
- Kataeva, I. A., Seidel, R. D., Shah, A., West, L. T., Li, X.-L., & Ljungdahl, L. G. (2002). The fibronectin type 3-like repeat from the *Clostridium thermocellum* cellobiohydrolase CbhA promotes hydrolysis of cellulose by modifying its surface. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4292–300.
- Kerff, F., Amoroso, A., Herman, R., Sauvage, E., Petrella, S., Filée, P., ... Cosgrove, D. J. (2008). Crystal structure and activity of *Bacillus subtilis* YoaJ (EXLX1), a bacterial expansin that promotes root colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(44), 16876–81.
- Kim, E. S., Lee, H. J., Bang, W.-G., Choi, I.-G., & Kim, K. H. (2009). Functional characterization of a bacterial expansin from *Bacillus subtilis* for enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(5), 1342–53.
- Kim, S., Ståhlberg, J., Sandgren, M., Paton, R. S., & Beckham, G. T. (2014). Quantum mechanical calculations suggest that lytic polysaccharide monooxygenases use a copper-oxy, oxygen-rebound mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(1), 149–54.
- Kimura, S., Laosinchai, W., Itoh, T., Cui, X., Linder, C., & Brown, R. (1999). Immunogold labeling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant *vigna angularis*. *The Plant Cell*, 11(11), 2075–86.
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.-P., & Bohn, A. (2005). Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 44(22), 3358–93.
- Koivula, A., Kinnari, T., Harjunpää, V., Ruohonen, L., Teleman, A., Drakenberg, T., ... Teeri, T. T. (1998). Tryptophan 272: an essential determinant of crystalline cellulose degradation by *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase Cel6A. *FEBS Letters*, 429(3), 341–6.
- Koivula, A., Reinikainen, T., Ruohonen, L., Valkeajärvi, A., Claeysens, M., Teleman, O., ... Teeri, T. T. (1996). The active site of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase II: the role of tyrosine 169. *Protein Engineering*, 9(8), 691–9.

- Koivula, A., Ruohonen, L., Wohlfahrt, G., Reinikainen, T., Teeri, T. T., Piens, K., ... Jones, T. A. (2002). The active site of cellobiohydrolase Cel6A from *Trichoderma reesei*: the roles of aspartic acids D221 and D175. *Journal of the American Chemical Society*, 124(34), 10015–24.
- Kothari, S. H., Kumar, V., & Banker, G. S. (2002). Comparative evaluations of powder and mechanical properties of low crystallinity celluloses, microcrystalline celluloses, and powdered celluloses. *International Journal of Pharmaceutics*, 232(1-2), 69–80.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Lantz, S. E., Goedegebuur, F., Hommes, R., Kaper, T., Kelemen, B. R., Mitchinson, C., ... Larenas, E. A. (2010). *Hypocrea jecorina* CEL6A protein engineering. *Biotechnology for Biofuels*, 3, 20.
- Lecourt, M., Sigoillot, J.-C., & Petit-Conil, M. (2010). Cellulase-assisted refining of chemical pulps: Impact of enzymatic charge and refining intensity on energy consumption and pulp quality. *Process Biochemistry*, 45(8), 1274–1278.
- Lerouxel, O., Cavalier, D. M., Liepman, A. H., & Keegstra, K. (2006). Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides - a complex process. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(6), 621–30.
- Li, X., Beeson, W. T., Phillips, C. M., Marletta, M. A., & Cate, J. H. D. (2012). Structural basis for substrate targeting and catalysis by fungal polysaccharide monooxygenases. *Structure* (London, England : 1993), 20(6), 1051–61.
- Li, Y., Jones, L., & McQueen-Mason, S. (2003). Expansins and cell growth. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(6), 603–10.
- Liu, N., Qin, M., Gao, Y., Li, Z., Fu, Y., & Xu, Q. (2012). Pulp properties and fiber characteristics of xylanase-treated aspen apmp. *BioResources*, 7(3), 3367–3377.
- Liu, Y., Igarashi, K., Kaneko, S., Tonozuka, T., Samejima, M., Fukuda, K., & Yoshida, M. (2009). Characterization of glycoside hydrolase family 6 enzymes from *Coprinopsis cinerea*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73(6), 1432–4.
- Lloberas, J., Perez-Pons, J. A., & Querol, E. (1991). Molecular cloning, expression and nucleotide sequence of the endo-beta-1,3-1,4-D-glucanase gene from *Bacillus licheniformis*. Predictive structural analyses of the encoded polypeptide. *European Journal of Biochemistry/FEBS*, 197(2), 337–43.
- Loqué, D., Scheller, H. V., & Pauly, M. (2015). Engineering of plant cell walls for enhanced biofuel production. *Current Opinion in Plant Biology*, 25, 151–161.
- Louw, M. E., Reid, S. J., & Watson, T. G. (1993). Characterization, cloning and sequencing of a thermostable endo-(1,3-1,4) beta-glucanase-encoding gene from an alkalophilic *Bacillus brevis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38(4), 507–

13.

- Maïté, H., Damien, H., Nicolas, L. F., & Dominique, L. (2015). Mechanistic modeling of enzymatic hydrolysis of cellulose integrating substrate morphology and cocktail composition. *Biotechnology and Bioengineering*.
- Marais, J. P., de Wit, J. L., & Quicke, G. V. (1966). A critical examination of the Nelson-Somogyi method for the determination of reducing sugars. *Analytical Biochemistry*, 15(3), 373–381.
- Martínez, A. T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., ... del Río, J. C. (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 8(3), 195–204.
- Mathews, S. L., Pawlak, J., & Grunden, A. M. (2015). Bacterial biodegradation and bioconversion of industrial lignocellulosic streams. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(7), 2939–54.
- McQueen-Mason, S., & Cosgrove, D. J. (1994). Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(14), 6574–8.
- Meinke, A., Gilkes, N. R., Kwan, E., Kilburn, D. G., Warren, R. A., & Miller, R. C. (1994). Cellobiohydrolase A (CbhA) from the cellulolytic bacterium *Cellulomonas fimi* is a beta-1,4-exocellobiohydrolase analogous to *Trichoderma reesei* CBH II. *Molecular Microbiology*, 12(3), 413–22.
- Milichovsky, M., & Adamkova, G. (1996). Kinetic evaluation of the hydration processes during pulp beating and refining. *Cellulose Chemistry and Technology*, 30(1-2), 151–160.
- Mou, H., Iamazaki, E., Zhan, H., Orblin, E., & Fardim, P. (2013). Advanced studies on the topochemistry of softwood fibres in low-consistency refining as analyzed by FE-SEM, XPS, and ToF-SIMS. *BioResources*, 8(2), 2325–2336.
- Murphy, N., McConnell, D. J., & Cantwell, B. A. (1984). The DNA sequence of the gene and genetic control sites for the excreted *B. subtilis* enzyme beta-glucanase. *Nucleic Acids Research*, 12(13), 5355–67.
- Murray, P. G., Grassick, A., Laffey, C. D., Cuffe, M. M., Higgins, T., Savage, A. V., ... Tuohy, M. G. (2001). Isolation and characterization of a thermostable endo-beta-glucanase active on 1,3-1,4-beta-D-glucans from the aerobic fungus *Talaromyces emersonii* CBS 814.70. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(1), 90–98.
- Nidetzky, B., Steiner, W., Hayn, M., & Claeysens, M. (1994). Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interaction. *The Biochemical Journal*, 298 Pt 3, 705–10.
- Nishiyama, Y., Langan, P., & Chanzy, H. (2002). Crystal structure and hydrogen-bonding

- system in cellulose I β from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *Journal of the American Chemical Society*, 124(31), 9074–82.
- Pang, Z., Chen, J., Dong, C., Yang, G., & Liu, Y. (2013). Improved refining properties of pulps pretreated with ionic liquids under mild conditions. *Bioresource Technology*, 128, 813–817.
- Park, C.-S., Kawaguchi, T., Sumitani, J.-I., Takada, G., Izumori, K., & Arai, M. (2005). Cloning and sequencing of an exoglucanase gene from *Streptomyces* sp. M 23, and its expression in *Streptomyces lividans* TK-24. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(4), 434–6.
- Park, J., Jones, B., Koo, B., Chen, X., Tucker, M., Yu, J.-H., ... Park, S. (2015). Use of mechanical refining to improve the production of low-cost sugars from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 199, 59–67.
- Parsons, S. (1942). Optical characteristics of paper as a function of fiber classification.
- Pastor, F. I. J., Gallardo, Ó., Sanz-Aparicio, J., & Díaz, P. (2007). *Industrial Enzymes*. (J. Polaina & A. P. MacCabe, Eds.). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Pauly, M., & Keegstra, K. (2008). Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 54(4), 559–68.
- Pere, J., Siika-aho, M., Buchert, J., & Viikari, L. (1995). Effects of purified *Trichoderma reesei* cellulases on the fiber properties of kraft pulp. *Tappi J*, 78(6), 71–78.
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T., & Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*, 5(2), 53–63.
- Planas, A. (2000). Bacterial 1,3-1,4-beta-glucanases: structure, function and protein engineering. *Biochemical et Biophysica Acta*, 1543(2), 361–382.
- Poidevin, L., Feliu, J., Doan, A., Berrin, J.-G., Bey, M., Coutinho, P. M., ... Heiss-Blanquet, S. (2013). Insights into exo- and endoglucanase activities of family 6 glycoside hydrolases from *Podospira anserina*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(14), 4220–9.
- Pollet, A., Delcour, J. A., & Courtin, C. M. (2010). Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(3), 176–91.
- Prade, R. A. (1996). Xylanases: from biology to biotechnology. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 13, 101–31.
- Quiroz-Castañeda, R. E., & Folch-Mallol, J. L. (2013). Hydrolysis of biomass mediated by cellulases for the production of sugars. *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization*, 119–

155.

- Quiroz-Castañeda, R. E., Martínez-Anaya, C., Cuervo-Soto, L. I., Segovia, L., & Folch-Mallol, J. L. (2011). Loosenin, a novel protein with cellulose-disrupting activity from *Bjerkandera adusta*. *Microbial Cell Factories*, 10, 8.
- Ragauskas, A. J., Beckham, G. T., Biddy, M. J., Chandra, R., Chen, F., Davis, M. F., ... Wyman, C. E. (2014). Lignin Valorization: Improving Lignin Processing in the Biorefinery. *Science*, 344(6185), 1246843–1246843.
- Ragauskas, A. J., Williams, C. K., Davison, B. H., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C. A., ... Tschaplinski, T. (2006). The Path Forward for Biofuels. *Science*, 311(January), 484–489.
- Ratanakhanokchai, K., Waeonukul, R., Pason, P., Tachaapaikoon, C., Kyu, K. L., Sakka, K., ... Mori, Y. (2013). *Biomass Now - Cultivation and Utilization*. (M. D. Matovic, Ed.). *InTech*.
- Rennie, E. A., & Scheller, H. V. (2014). Xylan biosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 100–7.
- Rogowski, A., Briggs, J. A., Mortimer, J. C., Tryfona, T., Terrapon, N., Lowe, E. C., ... Bolam, D. N. (2015). Glycan complexity dictates microbial resource allocation in the large intestine. *Nature Communications*, 6, 7481.
- Rouvinen, J., Bergfors, T., Teeri, T., Knowles, J. K., & Jones, T. A. (1990). Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science* (New York, N.Y.), 249(4967), 380–6.
- Saha, P., Mondal, A. K., Mayilraj, S., Krishnamurthi, S., Bhattacharya, A., & Chakrabarti, T. (2005). *Paenibacillus assamensis* sp. nov., a novel bacterium isolated from a warm spring in Assam, India. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(Pt 6), 2577–81.
- Saloheimo, M., Paloheimo, M., Hakola, S., Pere, J., Swanson, B., Nyysönen, E., ... Penttilä, M. (2002). Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *European Journal of Biochemistry*, 269(17), 4202–4211.
- Sambrook, J., & Russel, D. W. (1989). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual - Vol. 1, 2, 3*.
- Sánchez, M. M., Fritze, D., Blanco, A., Spröer, C., Tindall, B. J., Schumann, P., ... Pastor, F. I. J. (2005). *Paenibacillus barcinonensis* sp. nov., a xylanase-producing bacterium isolated from a rice field in the Ebro River delta. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(Pt 2), 935–9.
- Sánchez, M. M., Irwin, D. C., Pastor, F. I. J., Wilson, D. B., & Diaz, P. (2004). Synergistic activity of *Paenibacillus* sp. BP-23 cellobiohydrolase Cel48C in association with the contiguous endoglucanase Cel9B and with endo- or exo-acting glucanases from

- Thermobifida fusca*. *Biotechnology and Bioengineering*, 87(2), 161–9.
- Sandgren, M., Wu, M., Karkehabadi, S., Mitchinson, C., Kelemen, B. R., Larenas, E. A., ... Hansson, H. (2013). The structure of a bacterial cellobiohydrolase: the catalytic core of the *Thermobifida fusca* family GH6 cellobiohydrolase Cel6B. *Journal of Molecular Biology*, 425(3), 622–35.
- Sharma, A., Tewari, R., Rana, S. S., Soni, R., & Soni, S. K. (2016). Cellulases: Classification, Methods of Determination and Industrial Applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.
- Showalter, A. M. (1993). Structure and function of plant cell wall proteins. *The Plant Cell*, 5(1), 9–23.
- Smeder, B., & Liljedahl, S. (1996). Market oriented identification of important properties in developing flax fibres for technical uses. *Industrial Crops and Products*, 5(2), 149–162.
- Snart, J., Bibiloni, R., Grayson, T., Lay, C., Zhang, H., Allison, G. E., ... Tannock, G. W. (2006). Supplementation of the diet with high-viscosity beta-glucan results in enrichment for lactobacilli in the rat cecum. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 1925–31.
- Somerville, C. (2006). Cellulose Synthesis in Higher Plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22(1), 53–78.
- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., ... Youngs, H. (2004). Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science* (New York, N.Y.), 306(5705), 2206–11.
- Sørensen, A., Lübeck, M., Lübeck, P. S., & Ahring, B. K. (2013). Fungal Beta-glucosidases: a bottleneck in industrial use of lignocellulosic materials. *Biomolecules*, 3(3), 612–31.
- Spániková, S., & Biely, P. (2006). Glucuronoyl esterase--novel carbohydrate esterase produced by *Schizophyllum commune*. *FEBS Letters*, 580(19), 4597–601.
- Sukharnikov, L. O., Cantwell, B. J., Podar, M., & Zhulin, I. B. (2011). Cellulases: ambiguous nonhomologous enzymes in a genomic perspective. *Trends in Biotechnology*, 29(10), 473–9.
- Suzuki, K., Suzuki, M., Taiyoji, M., Nikaidou, N., & Watanabe, T. (1998). Chitin binding protein (CBP21) in the culture supernatant of *Serratia marcescens* 2170. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62(1), 128–35.
- Taberner, C., Coll, P. M., Fernández-Abalos, J. M., Pérez, P., & Santamaría, R. I. (1994). Cloning and DNA sequencing of bgaA, a gene encoding an endo-beta-1,3-1,4-glucanase, from an *alkalophilic Bacillus* strain (N137). *Applied and Environmental Microbiology*, 60(4), 1213–20.

- Tamura, M., Miyazaki, T., Tanaka, Y., Yoshida, M., Nishikawa, A., & Tonozuka, T. (2012). Comparison of the structural changes in two cellobiohydrolases, CcCel6A and CcCel6C, from *Coprinopsis cinerea*--a tweezer-like motion in the structure of CcCel6C. *The FEBS Journal*, 279(10), 1871–82.
- Teeri, T. T. (1997). Crystalline cellulose degradation: New insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends in Biotechnology*, 15(5), 160–167.
- Teeri, T. T., Koivula, A., Linder, M., Wohlfahrt, G., Divne, C., & Jones, T. A. (1998). *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose? *Biochemical Society Transactions*, 26(2), 173–8.
- Tomme, P., Kwan, E., Gilkes, N. R., Kilburn, D. G., & Warren, R. A. (1996). Characterization of CenC, an enzyme from *Cellulomonas fimi* with both endo- and exoglucanase activities. *Journal of Bacteriology*, 178(14), 4216–23.
- Tomme, P., Van Tilbeurgh, H., Pettersson, G., Van Damme, J., Vandekerckhove, J., Knowles, J., ... Claeysens, M. (1988). Studies of the cellulolytic system of *Trichoderma reesei* QM 9414. Analysis of domain function in two cellobiohydrolases by limited proteolysis. *European Journal of Biochemistry/FEBS*, 170(3), 575–81.
- Tomme, P., Warren, R. A., & Gilkes, N. R. (1995). Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Advances in Microbial Physiology*, 37, 1–81.
- Topakas, E., Moukouli, M., Dimarogona, M., Vafiadi, C., & Christakopoulos, P. (2010). Functional expression of a thermophilic glucuronyl esterase from *Sporotrichum thermophile*: identification of the nucleophilic serine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(5), 1765–72.
- Torraspapel. (2009). Formación Fabricación de papel. *Torraspapel*, 4–57.
- Torres, A. L., Roncero, M. B., Colom, J. F., Martínez, J. A., & Vidal, T. (2004). Application of an Experimental Design to Modeling of Ozone Bleaching Stage in TCF Processes. *Ozone: Science & Engineering*, 26(5), 443–451.
- Torres, C. E., Negro, C., Fuente, E., & Blanco, A. (2012). Enzymatic approaches in paper industry for pulp refining and biofilm control. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(2), 327–44.
- Tovar-Herrera, O. E., Batista-García, R. A., Sánchez-Carbente, M. del R., Iracheta-Cárdenas, M. M., Arévalo-Niño, K., & Folch-Mallol, J. L. (2015). A novel expansin protein from the white-rot fungus *Schizophyllum commune*. *PloS One*, 10(3), e0122296.
- Vaaje-kolstad, G. (2010). An Oxidative Enzyme Boosting the. *Science*, 330(October), 219–222.
- Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Horn, S. J., Liu, Z., Zhai, H., Sørli, M., & Eijsink, V. G. H. (2010). An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of

- recalcitrant polysaccharides. *Science*, 330(6001), 219–22.
- Valenzuela, S. V., Diaz, P., & Pastor, F. I. J. (2014). Xyn11E from *Paenibacillus barcinonensis* BP-23: a LppX-chaperone-dependent xylanase with potential for upgrading paper pulps. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(13), 5949–57.
- Valenzuela, S. V., Valls, C., Roncero, M. B., Vidal, T., Diaz, P., & Pastor, F. I. J. (2014). Effectiveness of novel xylanases belonging to different GH families on lignin and hexenuronic acids removal from specialty sisal fibres. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 89(3), 401–406.
- Valls, C., Gallardo, O., Vidal, T., Pastor, F. I. J., Díaz, P., & Roncero, M. B. (2010). New xylanases to obtain modified eucalypt fibres with high-cellulose content. *Bioresource Technology*, 101(19), 7439–45.
- Van Dyk, J. S., & Pletschke, B. I. (2012). A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1458–1480.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., & Boerjan, W. (2010). Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiology*, 153(3), 895–905.
- Vuong, T. V., & Wilson, D. B. (2009a). Processivity, synergism, and substrate specificity of *Thermobifida fusca* Cel6B. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(21), 6655–61.
- Vuong, T. V., & Wilson, D. B. (2009b). The absence of an identifiable single catalytic base residue in *Thermobifida fusca* exocellulase Cel6B. *The FEBS Journal*, 276(14), 3837–45.
- Watson, D. L., Wilson, D. B., & Walker, L. P. (2002). Synergism in binary mixtures of *Thermobifida fusca* cellulases Cel6B, Cel9A, and Cel5A on BMCC and Avicel. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 101(2), 97–111.
- Wilson, D. B. (2009). Cellulases and biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(3), 295–9.
- Wilson, D. B. (2011). Microbial diversity of cellulose hydrolysis. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3), 259–63.
- Wolf, M., Geczi, A., Simon, O., & Borriss, R. (1995). Genes encoding xylan and beta-glucan hydrolysing enzymes in *Bacillus subtilis*: characterization, mapping and construction of strains deficient in lichenase, cellulase and xylanase. *Microbiology (Reading, England)*, 141, Pt 2, 281–90.
- Wood, T. M. (1988). Biomass Part A: Cellulose and Hemicellulose. *Methods in Enzymology (Vol. 160)*. Elsevier.
- Wu, I., & Arnold, F. H. (2013). Engineered thermostable fungal Cel6A and Cel7A

- cellobiohydrolases hydrolyze cellulose efficiently at elevated temperatures. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(7), 1874–1883.
- Wu, M., Nerinckx, W., Piens, K., Ishida, T., Hansson, H., Sandgren, M., & Ståhlberg, J. (2013). Rational design, synthesis, evaluation and enzyme - Substrate structures of improved fluorogenic substrates for family 6 glycoside hydrolases. *FEBS Journal*, 280(1), 184–198.
- Yang, P., Shi, P., Wang, Y., Bai, Y., Meng, K., Luo, H., ... Yao, B. (2007). Cloning and overexpression of a *Paenibacillus* beta-glucanase in *Pichia pastoris*: purification and characterization of the recombinant enzyme. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(1), 58–66.
- Yang, Y., Biedendieck, R., Wang, W., Gamer, M., Malten, M., Jahn, D., & Deckwer, W.-D. (2006). High yield recombinant *Penicillin* g amidase production and export into the growth medium using *Bacillus megaterium*. *Microbial Cell Factories*, 5, 36.
- Yaniv, O., Halfon, Y., Shimon, L. J. W., Bayer, E. A., Lamed, R., & Frolov, F. (2012). Structure of CBM3b of the major cellosomal scaffoldin subunit ScaA from *Acetivibrio cellulolyticus*. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, 68(1), 8–13.
- Yaniv, O., Petkun, S., Shimon, L. J. W., Bayer, E. A., Lamed, R., & Frolov, F. (2012). A single mutation reforms the binding activity of an adhesion-deficient family 3 carbohydrate-binding module. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 68(7), 819–28.
- Zhang, S., Lao, G., & Wilson, D. B. (1995). Characterization of a *Thermomonospora fusca* exocellulase. *Biochemistry*, 34(10), 3386–95.
- Zhu, H., Fang, Z., Preston, C., Li, Y., & Hu, L. (2014). Transparent paper: fabrications, properties, and device applications. *Energy Environ. Sci.*, 7(1), 269–287.

8. PUBLICACIONES

New GH16 β -glucanase from *Paenibacillus barcinonensis* BP-23 releases a complex pattern of mixed-linkage oligomers from barley glucan

Liliana Alexandra Cerda
Susana Valeria Valenzuela
Pilar Diaz
Francisco I. Javier Pastor*

Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Abstract

The gene coding for a lichenase from *Paenibacillus barcinonensis* BP-23, a powerful carbohydrate-degrading strain, was obtained using a genome walking strategy and expressed in *Escherichia coli* for further characterization. The amino acid sequence deduced from *lic16A* revealed that the lichenase is a single-domain enzyme belonging to the GH16 family. Purified recombinant Lic16A showed exclusive activity on β -1,3-1,4-glucans, showing a K_m of 16.88 mg/mL and a V_{max} of 266.09 U/mg using lichenan as a substrate. Lic16A was stable at 55 °C for at least 3 H in moderate pH conditions. Thin-layer chromatography analysis showed that the enzyme

released a complex mixture of hydrolysis products, which consisted of different length oligosaccharides of intermediate mobility among cellooligomers. The health benefits of β -glucans's consumption and the increased interest for the use of their oligomers as prebiotics add interest to the study of Lic16A for the production of β -glucan-derived oligosaccharides and the evaluation of their biotechnological potential. This is the first report on β -1,3-1,4-glucanase produced by *P. barcinonensis*. © 2015 International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Volume 63, Number 1, Pages 51–56, 2016

Keywords: β -glucan, lichenase, oligomers, *Paenibacillus*, prebiotics, purification

1. Introduction

β -1,3-1,4-Glucans are linear polysaccharides found in the plant cell walls and particularly abundant in the endosperm of cereals as barley, rye, rice, and wheat. They are formed by chains of about 1,200 glucose units linked by β -1,3 and β -1,4 glycosidic bonds, with a variable ratio between these two linkages in the β -glucan molecule depending on the plant source [1]. These polymers are depolymerized by lichenases

(β -1,3-1,4-glucanases, EC 3.2.1.73) and endoglucanases (endo-1,4- β -glucanases, EC 3.2.1.4). They have been classified into several families of glycosyl hydrolases on the basis of amino acid sequence similarity and hydrophobic cluster analysis (carbohydrate-active enzymes database) [2]. Endoglucanases hydrolyze internal β -1,4-glycosidic linkages in glucans, showing a remarkable preference for β -1,4-glucans (cellulose), although several examples of GH7 and GH12 endoglucanases show high activity on β -1,3-1,4-glucans [3, 4]. Lichenases are specific for β -1,3-1,4-mixed glucans. They hydrolyze the β -1,4-glycosidic bonds adjacent to β -1,3-glycosidic bonds in mixed-linked glucans as β -glucan and lichenan, but cannot split the β -1,4-glycosidic bonds in cellulose [1, 5, 6]. They produce 3-*O*- β -cellotriosyl-D-glucose and 3-*O*- β -cellobiosyl-D-glucose as the major hydrolysis products from β -glucan and lichenan [7]. Lichenases are produced by a wide range of microorganisms including bacteria and fungi [7, 8], whereas most of the well-characterized lichenases are of bacterial origin and belong to family 16 of glycosyl hydrolases (GH16) [2].

Lichenases have biotechnological applications in the brewing industry to facilitate the filtration process, to reduce gels and haze formation in the finished products [9], and in animal foodstuffs to improve the β -glucan digestibility [10, 11].

Abbreviations: CMC, carboxymethyl cellulose; GH7, family 7 of glycosyl hydrolases; GH12, family 12 of glycosyl hydrolases; GH16, family 16 of glycosyl hydrolases; MALDI-TOF MS, matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; TLC, thin-layer chromatography.

*Address for correspondence: Professor F. I. Javier Pastor, Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 934034626; Fax: +34 934034629; e-mail: fpastor@ub.edu.

Received 4 September 2014; accepted 8 December 2014

DOI: 10.1002/bab.1348

Published online 28 April 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)



They have also been proposed in enzyme cocktails for the bioconversion of biomass into added value products and to improve lignocellulose saccharification to fermentable sugars for bioethanol production [12, 13].

Paenibacillus barcinonensis BP-23 is a powerful carbohydrate-degrading microorganism isolated from rice agricultural soils [14]. It shows a complex set of carbohydratases, including xylanases and cellulases [15, 16], which have been cloned and characterized. Several of these enzymes were evaluated for biotechnological applications, showing their efficiency for the lignin and hexenuronic acids removal from agricultural fibres [16], or for the biorefining of paper pulps [17]. We report here the identification of a β -1,3-1,4-glucan depolymerizing enzyme from *P. barcinonensis* BP-23, lichenase Lic16A. The enzyme has been purified and characterized. The high activity of Lic16A and its mode of action on mixed-linkage β -glucans make it a good candidate for the biotechnological transformation of lignocellulosic materials and agricultural wastes into products of industrial application.

2. Materials and Methods

2.1. Cloning, expression, and purification of Lic16A

A DNA fragment with sequence homology to β -1,3-1,4-glucanases was identified downstream the gene *xyn11E* from *P. barcinonensis* BP-23 [18]. Its complete sequence was obtained by genome walking from this DNA fragment using the GenomeWalker universal kit (Clontech, Dalian, People's Republic of China). To overexpress the lichenase Lic16A, the primers Lic-fw (5'-CACCATGATGAAGAGGAAAACAT-3') and Lic-bw (5'-CTGGGTGAAATATACGAGCAAC-3') were used to amplify the whole gene (Kapa-HiFi; KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA) containing its own signal peptide. The DNA was cloned in pET101/D-TOPO (Invitrogen, Waltham, MA, USA), forming the recombinant plasmid pET101lic16A, which produced the full-length enzyme linked to a C-terminal His₆ tag. For the expression assay, *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) was transformed with pET101lic16A and the induction of Lic16A was performed with 0.5 mM (isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside) for 18 h at 30 °C. The cells were collected by centrifugation at 8,000g for 10 min and disrupted with a French press. Recombinant Lic16A was purified from clarified cell extracts by immobilized metal affinity chromatography using HisTrap HP columns of 1 mL (GE Healthcare, Fairfield, CT, USA) on a fast protein liquid chromatography system (ÄKTA FPLC; GE Healthcare). Washing with 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM imidazole, and 500 mM NaCl was performed before an elution in a single step with 50 mM Tris-HCl buffer pH 8.0, 500 mM NaCl, and 300 mM imidazole.

2.2. Gel electrophoresis and zymograms

Protein analysis was performed by SDS-PAGE followed by zymogram, as previously described [18]. For the detection of lichenase activity, 0.2% barley β -glucan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was included in gels before polymerization.

2.3. Enzyme assays

Lichenase activity was assayed by measuring the amount of reducing sugar released using the Nelson and Somogyi method [18]. The standard assay (100 μ L) was performed at 55 °C in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5) for 15 min using 75 ng of Lic16A and 0.5% of barley β -glucan. Beechwood xylan, oat spelt xylan, birchwood xylan, 4-O-methyl glucuronoxylan, pectin, starch, polygalacturonic acid, carboxymethyl cellulose (CMC), and laminarin were purchased from Sigma-Aldrich. Wheat arabinoxylan and lichenan were purchased from Megazyme (Wicklow, Ireland). Avicel were purchased from Fluka (St. Louis, MO, USA). Enzyme kinetics parameters were calculated using lichenan (0–40 mg/mL) as a substrate at optimum pH and temperature. K_m and V_{max} were determined by fitting hyperbolic Michaelis–Menten curves with the program SigmaPlot, version 8.00 (Jandel Scientific). The Britton–Robinson buffer in a pH range between 3 and 10 was used to study the optimum pH. For inhibition studies, assays were performed on barley β -glucan in the presence of several metal ions, used at 1 or 10 mM concentrations. One unit of enzymatic activity was defined as the amount of enzyme that releases 1 μ mol of reducing sugar equivalent per minute under the assay conditions described. A standard curve of glucose was used to calculate activity units. All determinations of enzyme activity were made in triplicate.

2.4. Analysis of hydrolysis products

Products from lichenan and barley β -glucan hydrolysis were analyzed on silica gel plates (Merck, Darmstadt, Germany). Standard sugars were purchased from Megazyme. The solvent used was chloroform/acetic acid/water (3:6:1, v/v/v). Hydrolysis products were detected by spraying the plates with an ethanol/sulfuric acid mixture (95:5, v/v). For the analysis of β -glucan hydrolysis products by Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS), 1 μ L of hydrolysates was mixed with 1 μ L of matrix solution (10 mg/mL 2,5-dihydroxybenzoic acid dissolved in acetonitrile/water [1:1, v/v] and 0.1% [w/v] trifluoroacetic acid). One microliter of the mixture was spotted onto the MALDI-TOF MS plate and allowed to dry before the analysis. Positive mass spectra were collected with a 4800 Plus MALDI TOF/TOF (AB Sciex-2010) spectrometer with a Nd:YAG 200 Hz laser operated at 355 nm.

2.5. Nucleotide sequence accession number

The DNA sequence of *lic16A* gene was submitted to the GenBank database under accession number KM257864.

3. Results

3.1. Cloning of lichenase Lic16A

Previous analysis of the xylan degrading system of *P. barcinonensis* BP-23 identified an open reading frame with homology to β -1,3-1,4-glucanases in proximity to the characterized xylanase Xyn11E [18]. The complete sequence of the open reading frame was determined by gene walking from the xylanase

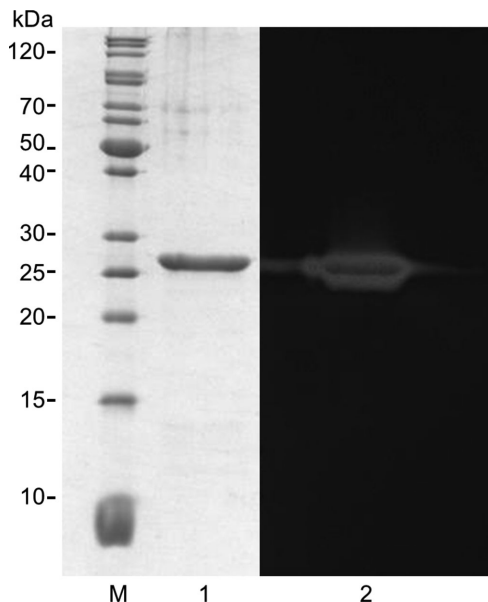


FIG. 1

Analysis by SDS-PAGE of Lic16A purified from *E. coli* BL21(DE3)/pET101lic16A. M, molecular weight marker; 1, purified Lic16A; 2, zymogram of purified Lic16A.

gene and named *lic16A*. The deduced amino acid sequence of *lic16A* was a protein of 239 amino acids showing an N-terminal region of 25 amino acids with the characteristics of a signal peptide. The theoretical molecular weight and isoelectric point of the mature protein were 25.83 kDa and 6.71, respectively. Comparison of the deduced amino acid sequence of *lic16A* with sequences contained in databases showed homology with lichenases from family GH16. The highest homology was found with putative lichenase from *Paenibacillus* sp. W-61 [19], which shares 92% of identity with the cloned enzyme. Endo- β -1,3-1,4-glucanases from *Paenibacillus* sp. F-40 [20], *Paenibacillus polymyxa* [21], and *Paenibacillus macerans* [22] show 89%, 89%, and 84% identity with Lic16A, whereas β -1,3-1,4-glucanases from *Bacillus subtilis* [23] and *Bacillus amyloliquefaciens* [24] show 72% and 73% identity to the cloned enzyme.

P. barcinonensis BP-23 *lic16A* was amplified and cloned in *E. coli* giving rise to the recombinant strain *E. coli* BL21(DE3)/pET101lic16A. This construction was designed to add a C-terminal histidine tail to the enzyme. Analysis by SDS-PAGE of cellular extracts from the recombinant clone showed a prominent band with an apparent molecular size of 27 kDa, in accordance with the molecular weight deduced from the nucleotide sequence. The enzyme was purified by chromatography on a His-trap column and it was analyzed by SDS-PAGE and zymography (Fig. 1). The results indicate the correct expression of *lic16A* in an active form.

3.2. Characterization of the recombinant enzyme

The hydrolytic activity of the purified enzyme was determined on various substrates. The enzyme showed high activity on

β -1,3-1,4 mixed glucans as barley β -glucan (197.86 U/mg) and lichenan (118.37 U/mg), whereas it did not show activity on β -1,4 glucans (CMC, Avicel), β -1,3 glucans (laminarin), or others polysaccharides tested such as xylans, starch, or pectin. The specific activity of the enzyme, showing exclusive activity on β -1,3-1,4 mixed glucans, indicates that it is a lichenase.

The effect of pH and temperature on the activity of the enzyme on barley β -glucan was determined. Optimal conditions for activity were 55 °C and pH 6.5 (Fig. 2). Stability assays showed that Lic16A remained stable after 3-h incubation at 55 °C and pH 6.5. Kinetic parameters of the enzyme on lichenan were determined. The enzyme showed V_{\max} of 266.09 U/mg and K_m of 16.88 mg/mL (Fig. 3).

The effect of different metal ions at 1 and 10 mM concentration on enzyme activity was analyzed (Fig. 4). Lic16A was strongly inhibited by Al^{3+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , and Fe^{2+} . By contrast, Mg^{2+} , Ba^{2+} , and Na^+ produced a stimulating effect (134%, 141%, and 142% of activity, respectively, at 1 mM concentration). The study of the effect of several chemical agents on enzyme activity showed that Triton X-100 and Tween 80 produced strong inhibition of Lic16A.

3.3. Analysis of hydrolysis products from β -1,3-1,4 glucans

The hydrolysis products from barley β -glucan and lichenan were analyzed by thin-layer chromatography (TLC) (Fig. 5). Major hydrolysis products from these substrates were oligosaccharides of different mobility than cellooligosaccharides, which are used as control. A complex hydrolysis pattern was obtained from barley β -glucan, which was hydrolyzed to an oligosaccharide that migrated ahead of cellotriose and to a product of intermediate mobility between cellotriose and cellotetraose as main products. These oligosaccharides can be considered to be 3-O- β -cellobiosyl-D-glucose and 3-O- β -cellotriosyl-D-glucose [4]. Several other oligomers of intermediate mobility between cellooligosaccharides were also found in barley β -glucan hydrolysates, suggesting they contained β -1,3 bonds. Lichenan gave a hydrolysis pattern with less products, although all of them showed the traits of β -1,3-1,4 glucooligosaccharides, as they migrated ahead of cellooligosaccharides, or showed an intermediate mobility. To better characterize the hydrolysis products from barley β -glucan and lichenan, they were analyzed by MALDI-TOF MS (Table 1). The mass spectrum confirmed that they are glucooligosaccharides of polymerization degree 3, 4, 5, 6, 7, and above. The difference in mobility with control cellooligosaccharides, observed by TLC analysis, indicates the presence of β -1,3 bonds linking the glucose moieties in these oligomers, which can contain a variable amount of β -1,3 bonds depending on the source. The different hydrolysis products pattern from the two β -glucans tested can reflect the differences in the rate and distribution of β -1,3 and β -1,4 bonds among them. Both β -glucans are composed mainly of cellotriose and cellotetraose units linked by β -1,3 bonds, but the proportion among β -1,3 and β -1,4 bonds is 1:2 in lichenan and 1:2.3-2.5 in barley β -glucan [5, 25]. The higher number of

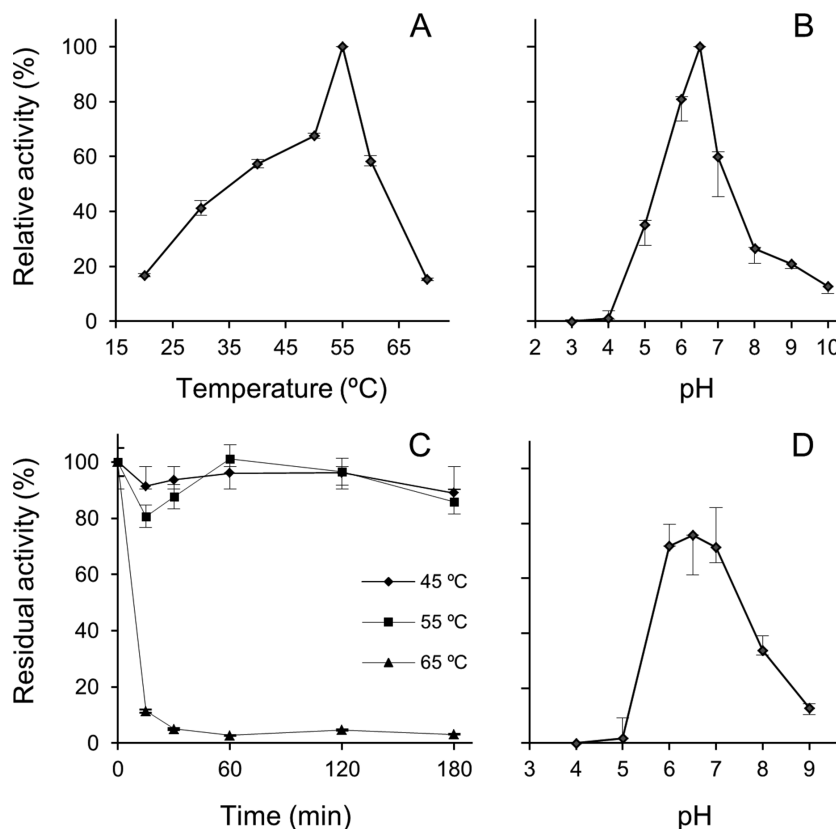


FIG. 2

Effect of temperature and pH on Lic16A activity. (A) Effect of temperature on Lic16A activity. (B) Effect of pH on Lic16A activity. (C) Thermostability of Lic16A at pH 6.5 and 45 °C (◆), 55 °C (■), or 65 °C (▲). Effect of pH on stability of Lic16A (D); the samples were incubated at 55 °C in buffers at different pH for 3 h, and residual activity was determined.

β -1,4 glycosidic bonds in barley β -glucan can also determine the higher activity of the cloned enzyme on this polymer, as described previously.

4. Discussion

We have identified and characterized a new bacterial β -glucanase belonging to family GH16. The enzyme shows exclusive activity on β -1,3-1,4 mixed glucans, indicating that it is a lichenase (EC 3.2.1.73), which we have named Lic16A. The enzyme is a monodomain protein that shows high homology to GH16 lichenases from *Paenibacillus* and *Bacillus* genera. Sequence comparison with GH16 enzymes has identified Glu129 and Glu133 residues of Lic16A as the putative catalytic glutamic acid residues, conserved in enzymes of this family [7]. Analysis of crystalline structure of a hybrid *Bacillus*-*Paenibacillus* lichenase has revealed ten residues involved in substrate binding to the catalytic cleft of the enzyme [26]. These residues have been found in the corresponding position of Lic16A and seem conserved among bacterial lichenases. A dendrogram analysis of these enzymes shows a close relationship among them, which probably share a common ancestor (data not shown). These analyses also show that *Paenibacillus* and *Bacillus* lichenases cluster in different groups. Detailed sequence comparison shows that a His residue that contributes to subsite III of the binding cleft (His99 in the hybrid lichenase) [26] is conserved in the enzymes characterized from *Paenibacillus*, but replaced by an acidic amino acid (Asp or Glu) in the *Bacillus* enzymes.

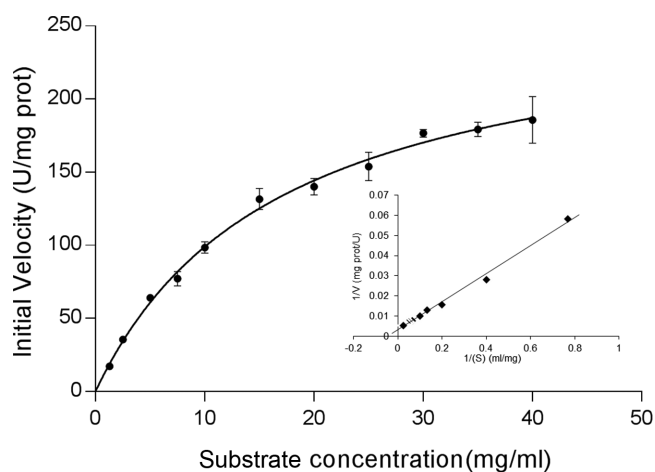


FIG. 3

Effect of substrate concentration on Lic16A activity. The insert shows the Lineweaver-Burk plot of reaction velocity versus substrate concentration.

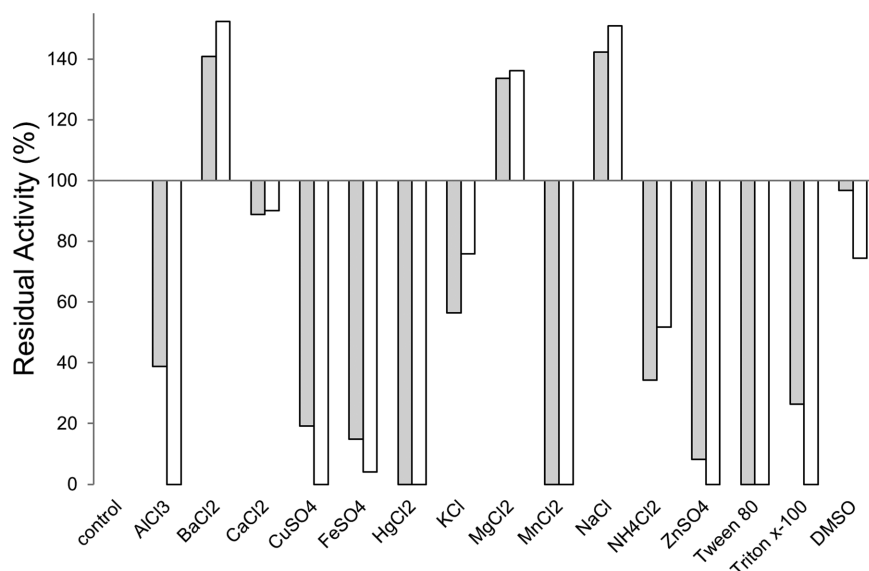


FIG. 4 Effect of heavy metal salts and chemical agents on Lic16A activity. Heavy metal salts and chemical agents were tested at 1 mM (gray bar) or at 10 mM (empty bar).

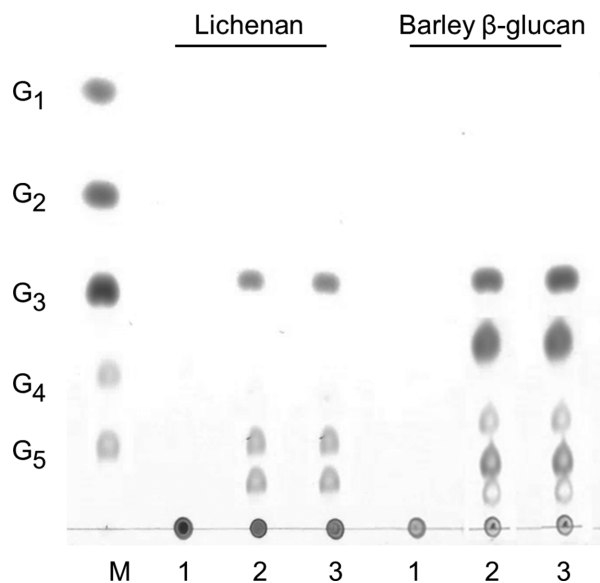


FIG. 5 Analysis by TLC of hydrolysis products released by Lic16A on lichenan and barley β -glucan. Purified Lic16A (75 ng) was incubated at 55 °C and pH 6.5 with β -glucan and 1.5% lichenan, and samples were analyzed at various incubation times: 0 Min (1), 15 Min (2), 60 Min (3). Standard sugars (M): glucose (G), cellobiose (G2), cellotriose (G3), cellotetraose (G4), and cellopentaose (G5).

However, the putative enzyme from *Paenibacillus* sp. W-61 shows an Asp residue in this position. The difference in amino acid sequence in subsite III could determine subtle differences in specificity and mode of action of lichenases.

TABLE 1 Oligosaccharides identified by MALDI-TOF MS after hydrolysis of Barley β -glucan and lichenan by Lic16A

Glucooligosaccharide	M_r^a	m/z	
		Na	
		Barley β -glucan	Lichenan
G3	504	527.1	527.1
G4	666	689.1	689.1
G5	828	851.2	851.2
G6	990	1,013.3	1,013.2
G7	1,152	1,175.3	–
G8	1,314	1,337.4	–
G9	1,476	1,499.4	–

^a M_r , molecular weight.

Although most well-characterized lichenases are bacterial enzymes, a few examples of fungal β -glucanases that show exclusive activity on β -1,3–1,4-mixed glucans have been reported [8]. Among these enzymes, a lichenase from *Aspergillus niger* has been recently characterized [27]. Similarly to Lic16A, the enzyme is completely inhibited by Cu^{2+} , Fe^{2+} , and Mn^{2+} , but contrary to the studied enzyme, the *A. niger* lichenase shows inhibition by Mg^{2+} , while this metal ion stimulates Lic16A activity.

In accordance to the high homology of Lic16A to bacterial lichenases, Lic16A shows high activity on lichenan and



barley glucan, and its pH and temperature profile are in the range shown by these enzymes [7]. However, few reports on the hydrolysis products pattern of *Paenibacillus* lichenases preclude comparison with the pattern shown by Lic16A. The *Paenibacillus* lichenase with highest homology to Lic16A, the enzyme from *Paenibacillus* sp. W-61, is a putative lichenase that has not been characterized, so we cannot compare the same with the properties of Lic16A. Our results show that catalytic activity of Lic16A on β -glucans gives rise to a diversity of different length oligosaccharides, which contain a mixture of β -1,3- and β -1,4-bound glucose moieties. The potential health benefits of consumption of β -glucans [28] and the increased interest for the use of oligomers from nonstarch polysaccharides as prebiotics [29, 30] add interest to the study of Lic16A for the production of β -glucan-derived oligomers and the evaluation of their biotechnological potential.

5. Acknowledgements

This work was partially supported by the Spanish Ministry of Science and Technology (CYCYT; project ref. CTQ2013-48995-C2-2-R and Xarxa de Referència en Biotecnologia, XRB). L.A.C. held a grant SENESCYT, convocatoria abierta 2012 segunda fase.

6. References

- [1] Parrish, F. W., Perlin, A. S., and Reese, E. T. (1960) *Can. J. Chem.* 38, 2094–2104.
- [2] Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho P. M., and Henrissat B. (2014) *Nucleic Acids Res.* 42, 490–495.
- [3] Wang, K., Luo, H., Shi, P., Huang, H., Bai, Y., and Yao, B. (2014) *Process Biochem.* 49, 1448–1456.
- [4] Grishutin, S. G., Gusakov, A. V., Dzedzulya, E. I., and Sinitsyn, A. P. (2006) *Carbohydr. Res.* 341, 218–229.
- [5] Bielecki, S., and Galas, E. (1991) *Crit. Rev. Biotechnol.* 10, 275–304.
- [6] Wolf, M., Geczi, A., Simon, O., and Borriss, R. (1995) *Microbiology* 141, 281–290.
- [7] Planas, A. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1543, 361–382.
- [8] Murray, P. G., Grassick, A., Laffey, C. D., Cuffe, M. M., Higgins, T., Savage, A. V., Planas, A., and Tuohy, M. G. (2001) *Enzyme Microb. Technol.* 29, 90–98.
- [9] Bamforth, C. W., and Martin, H. L. (1983) *J. Inst. Brew.* 89, 303–307.
- [10] Dierick, N. A. (1989) *Arch. Tierernahr.* 39, 241–261.
- [11] Bhat, M. K. (2000) *Biotechnol. Adv.* 18, 355–383.
- [12] Pauly, M., and Keegstra, K. (2008) *Plant J.* 54, 559–568.
- [13] Gilleran, C. T., Hennon, A. T., Murray, P. G., and Tuohy, M. G. (2010) *BioResources* 5, 634–649.
- [14] Sánchez, M. M., Fritze, D., Blanco, A., Spröer, C., Tindall, B. J., Schumann, P., Kroppenstedt, R. M., Diaz, P., and Pastor, F. I. J. (2005) *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 935–939.
- [15] Chiriac, A. I., Cadena, E. M., Vidal, T., Torres, A. L., Diaz, P., and Pastor, F. I. J. (2010) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 1125–1134.
- [16] Valenzuela, S. V., Valls, C., Roncero, M. B., Vidal, T., Diaz, P., and Pastor, F. I. J. (2014) *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 89, 401–406.
- [17] Cadena, E. M., Chriac, A. I., Pastor, F. I. J., Diaz, P., Vidal, T., and Torres, A. L. (2010) *Biotechnol. Prog.* 26, 960–967.
- [18] Valenzuela, S. V., Diaz, P., Pastor, F. I. J. (2014) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 5949–5957.
- [19] Fukuda, M., Watanabe, S., Kaneko, J., Itoh, Y., and Kamio, Y. (2009) *J. Bacteriol.* 191, 1641–1649.
- [20] Yang, P., Shi, P., Wang, Y., Bai, Y., Meng, K., Luo, H., Yuan, T., and Yao, B. (2007) *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 58–66.
- [21] Gosalbes, M. J., Pérez-González, J. A., González, R., and Navarro, A. (1991) *J. Bacteriol.* 173, 7705–7710.
- [22] Borriss, R., Buettner, K., and Maentsaelae, P. (1990) *Mol. Gen. Genet.* 222, 278–283.
- [23] Murphy, N., McConnell, D. J., and Cantwell, B. A. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 5355–5367.
- [24] Hofemeister, J., Kurtz, A., Borriss, R., and Knowles, J. (1986) *Gene* 49, 177–187.
- [25] Izydorczyk, M. S., Macri, L. J., and MacGregor, A. W. (1998) *Carbohydr. Polym.* 35, 249–258.
- [26] Gaiser, O. J., Piotukh, K., Ponnuswamy, M. N., Planas, A., Borriss, R., and Heinemann, U. (2006) *J. Mol. Biol.* 357, 1211–1225.
- [27] Elgharbi, F., Hmida-Sayari, A., Sahnoun, M., Kammoun, R., Jlaeil, L., Hassairi, H., and Bejar, S. (2013) *Carbohydr. Polym.* 98, 967–975.
- [28] Snart, J., Bibiloni, R., Grayson, T., Lay, C., Zhang, H., Allison, G. E., Laverdiere, J. K., Temelli, F., Vasanthan, T., Bell, R., and Tannock, G. W. (2006) *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1925–1931.
- [29] Grootaert, C., Van den Abbeele, P., Marzorati, M., Broekaert, W. F., Courtin, C. M., Delcour, J. A., Verstraete, W., and Vande Wiele, T. (2009) *FEMS Microbiol. Ecol.* 69, 231–242.
- [30] Gibson, G. R., Probert, H. M., Van Loo, J., Rastall, R. A., and Roberfroid, M. B. (2004) *Nutr. Res. Rev.* 17, 259–275.