



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Desarrollo de complejos enzimáticos bacterianos para la valorización de biomasa lignocelulósica

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

Biol. Juliana Topalian

Directora de tesis: Dra. Eleonora Campos

Co-director de tesis: Dr. Martín Blasco

Consejero de estudios: Dr. Oscar E. Pérez

Lugar de trabajo: Laboratorio de Enzimas Agroindustriales para Bioprocesos (EAB), Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO), CICVyA, INTA-CONICET.

Buenos Aires, 16 de diciembre de 2025

Agradecimientos

A mis directores de Tesis, Eleonora y Martín, por la confianza depositada en mí para desarrollar este proyecto y por el estímulo constante a lo largo de todo el proceso. Por brindarme valiosas herramientas para mi crecimiento profesional y compartir conmigo su amplio conocimiento. Ha sido un verdadero honor trabajar junto a dos profesionales de excelencia.

Gracias Eleo, además, por tu enorme calidez humana, por estar siempre presente y por ayudarme tanto dentro del laboratorio como fuera de él. Gracias por crear un espacio donde podemos charlar, discutir e intercambiar ideas, y donde el tema de trabajo se siente realmente como algo nuestro. Gracias también por tus consejos, por impulsarnos a seguir formándonos y por sostener siempre una mirada positiva, incluso en momentos no tan fáciles.

A toda mi familia. A mis hermanas, Delfi y Sofi, por estar siempre y por hacer que la vida sea más linda. Porque, más allá de ser hermanas, son mis mejores amigas y lo más importante que tengo. A mis papas, José y Fabiana, por darnos la libertad de elegir nuestro propio camino, por brindarnos herramientas y acompañarnos en cada etapa. Por enseñarnos que la vida se construye desde el amor y el respeto, y que los sueños se alcanzan con esfuerzo y dedicación. Gracias por alentarme siempre a seguir creciendo y por ser el pilar más importante que tengo en la vida. Mis logros son fruto de un esfuerzo compartido.

A mi prima María, por estar presente siempre y llevarme de paseo al campo a ver los caballos cada vez que volví a casa y lo necesité para renovar energías.

A Alicia y Sebastián, por su acompañamiento constante y por sus valiosos consejos en cada etapa del camino.

A mis amigas y amigos de toda la vida, Flor, Sol, Ale, Aldi, Wen, Cami y Giu, porque desde el colegio están en momentos importantes. A Camilamisch, por aparecer en mi camino un verano y quedarse para compartir anécdotas y aventuras. Gracias a todos por estar a pesar del tiempo y la distancia.

A mis amigas que me regaló la FCEfyN-UNC, por compartir la pasión de esta hermosa profesión y acompañarnos mutuamente en nuestros recorridos. A Cami, Latin, Jorgi, Vani y Cami V por ser mis compañeras de aventuras y darme el gusto de hacer trekking o ir a algún lugarcito de la naturaleza cada vez que vuelvo a Córdoba. A Key y Agus por estar siempre y mantener nuestra amistad intacta, aun cuando pasen días o meses sin hablar. A Vale y Pato, que si bien sus caminos migraron hacia otro lado la vida nos volvió a unir, gracias por escucharme y aconsejarme. Pato, gracias también por todas las aventuras compartidas en Buenos Aires, por tu escucha y tus consejos; hoy estás del otro lado del charco, pero sé que estás siempre que lo necesite. Gracias a todas por ser mis personas vitamina.

A los amigos que me dejó mi paso por INTA. A Majo, por todas las vueltas a casa, los podcasts y canciones que nos acompañaron en esos viajes, los cafecitos compartidos algunos cuantos fines de semana y por las risas conjuntas en las clases de elongación del gym. A la Tana, por contagiar siempre alegría y felicidad en los pasillos y por aliviar mis mil y un empachos; te recuerdo y recordaré siempre con una sonrisa gigante. A Bru, Cin, Valu y Fran, por los desayunos compartidos antes de arrancar el día, por sacarme una sonrisa más de una vez y por las charlas y consejos compartidos. A la Pompo y Juancito por los mates y almuerzos compartidos, pero por sobre todo por compartir la diversión los jueves de pádel junto a Dami y Fran (algún día aprenderé a hacer el famoso efecto que hacen con la paleta). Gracias por la buena onda, la paciencia y las risas dentro y fuera de la cancha. Gracias a todos

por su amistad y por hacer más lindos los días de trabajo.

A la peña de los jueves: Emi, Silvi, Dami, Xime, Mati, Orne, y ahora también Ciro, no solo por las comidas abundantes y muy ricas, sino por hacerme sentir en casa aun estando lejos de ella. Gracias Emi por las caminatas compartidas y por enseñarme todo lo que se sobre el transporte público de Buenos Aires. A Xime, por ser mi pierna de cafecitos y paseos los fines de semana; te extraño todos los días y estoy segura de que pronto nos reencontraremos por alguna calle de Madrid. A Dami, por escucharme y aconsejarme siempre, por estar presente cada vez que necesité ayuda y por bancarme en todo momento.

A mis compañeros de laboratorio, Orne, Lau, Vicky, Mechi y Eleo, gracias por enseñarme tanto, más allá de protocolos de laboratorio. Gracias por la buena energía y el compañerismo, por hacer siempre de nuestro lugar de trabajo un espacio agradable y en el que da gusto estar. A Mechi, por acompañarme en mis primeros pasos y siempre ahí para darme una mano en el laboratorio. A Orne, por tus consejos, por estar siempre al pie del cañón y por habernos dando una ayuda inmensa con las correcciones de este manuscrito. A Lau, por escucharme y aconsejarme, por los viajes a congresos, con diversión, comidas ricas y risas incluidas. A Vicky, por ayudarme más de una vez con el western blot, por tu buena compañía y amistad, por tus palabras de motivación y aliento.

A los chicos de otros grupos del laboratorio, Lauri, Cami y Luchis, gracias por las risas y matecitos compartidos entre experimento y experimento, la buena onda y el aguante.

A mis compañeros de oficina de estos últimos meses, Marisa, Kari, Eli, Paz, Orne, Martin y Mariano, por acompañar mi proceso de escritura y por las palabras de motivación. Gracias Naty y Dami, por prestarme el espacio para darle vida a este manuscrito.

A mi Comité de seguimiento de Tesis en INTA, la Dra. Karina Caimi y el Dr. Mariano Larzabal, y en FCEyN, las Doctoras Julia Pettinari y Sania Wirth, y al Dr. Oscar Pérez, quien además fue mi consejero de estudios, por su tiempo dedicado a escuchar mis avances y sus valiosas sugerencias.

A la asociación ASBMB, por otorgarme la beca PROLAB 2022 para realizar una estadía en CCRC, y al Dra. Breeanna Urbanowickz y a su grupo de laboratorio, por la invaluable experiencia y el aprendizaje brindados. En especial a Tommy y a su familia, por la hospitalidad; a Kristen y Deepack, por la ayuda constante en el laboratorio; y a Lubna, por una amistad que continúa intacta. Gracias a todos por hacer de mi experiencia en el exterior algo inolvidable y por seguir manteniendo el contacto.

A los Doctores Matías Asencion Diez, Leonardo Curatti y Eva Figuerola por aceptar ser jurados de esta Tesis.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires por darme la oportunidad de realizar una carrera de doctorado, y al CONICET por otorgarme la beca que lo hizo posible.

Finalmente, gracias a todas las personas que, a lo largo de este camino, aportaron su granito de arena para impulsarme a seguir avanzando y creciendo, tanto en lo profesional como en lo personal.

Índice General.....	I
Índice de Tablas y Figuras.....	V
Abreviaturas y unidades de medida.....	IX
Resumen.....	XV
<i>Abstract</i>.....	XVI
Publicaciones derivadas de este trabajo de Tesis.....	XVII

Índice General

Introducción.....	1
1. Estructura y composición de la pared celular vegetal.....	2
1. 1. Celulosa.....	3
1. 2. Hemicelulosa.....	5
1. 2. a. Xilano.....	6
1. 2. b. Xiloglucano.....	7
1. 2. c. Mananos y gluco-mananos.....	8
1.1.b.iv. β -glucanos mixtos.....	9
1. 3. Lignina.....	10
2. Metodologías de pre-tratamiento e hidrólisis de la biomasa lignocelulósica.....	11
3. Enzimas lignocelulolíticas.....	14
3. 1. Glicosil hidrolasas activas sobre celulosa.....	16
3. 2. Glicosil hidrolasas activas sobre hemicelulosa.....	18
3. 3. Monooxigenasa de Polisacárido Lítico.....	21
4. Microorganismos degradadores de la biomasa vegetal.....	22
4. 1. <i>Cellulomonas</i> sp. B6.....	23
4. 2. <i>Paenibacillus xylanivorans</i> A59.....	24
5. Metodologías para la obtención de enzimas lignocelulósicas.....	25
6. Aplicaciones industriales de enzimas lignocelulolíticas.....	27
6. 1. Industria de los biocombustibles.....	27
6. 2. Industria alimentaria humana y animal.....	28
6. 2. a. Oligosacáridos como aditivos alimentarios.....	28
6. 2. b. Enzimas lignocelulolíticas como aditivos en alimento animal.....	29
6. 3. Industria agrícola.....	30
6. 4. Industria textil y de detergentes.....	31
6. 5. Industria del papel y pulpado.....	32
Hipótesis y Objetivos.....	33
Materiales y Métodos	34
1. Soluciones y medios de cultivo.....	34
2. Sustratos comerciales y biomásas: pretratamiento y composición.....	36

3. Análisis bioinformático de las secuencias genómicas y de las secuencias proteicas de las bacterias utilizadas.....	39
3. 1. Identificación de enzimas activas sobre carbohidratos.....	39
3. 2. Predicción de la localización subcelular.....	40
4. Mutagénesis química del aislamiento <i>Cellulomonas</i> sp. B6.....	40
4. 1. Ensayo de letalidad.....	40
4. 2. Mutagénesis.....	41
4. 3. Ensayos de actividad enzimática de las mutantes.....	43
5. Producción de extractos enzimáticos extracelulares de <i>Paenibacillus xylanivorans</i>	44
5. 1. Producción de extractos enzimáticos en matraces.....	44
5. 2. Producción de extractos enzimáticos en biorreactores.....	44
5. 3. Estrategias de concentración y conservación de los extractos enzimáticos.....	46
5. 4. Espectrometría de masas de las proteínas secretadas.....	46
5. 5. Análisis de actividad enzimática de los sobrenadantes de cultivo.....	48
5. 5. a. Determinación de azúcares reductores por el método de reducción del ácido dinitrosalísílico (DNS).....	48
5. 5. b. Cálculo de unidades enzimáticas con azúcares reductores.....	48
5.6. Hidrólisis enzimática de xilanos comerciales y biomasa lignocelulósica.....	49
5.7. Métodos cromatográficos para el análisis y cuantificación de azúcares.....	49
5. 7. a. Análisis de azúcares por cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD).....	50
5. 7. b. Cromatografía en capa delgada (TLC).....	50
5. 7. c. Determinación colorimétrica de monosacáridos.....	51
5.8. Cálculo del porcentaje de conversión de glucanos o xilanos.....	51
6. Análisis <i>in silico</i> de secuencias de glicosil hidrolasas de la familia GH30 de <i>P. xylanivorans</i>	52
6. 1. Porcentaje de identidad de secuencias y agrupamiento en redes de subfamilias.....	52
6. 2. Alineamiento múltiple.....	53
7. Métodos para la amplificación y clonado de secuencias codificantes.....	53
7. 1. Condiciones de cultivo y extracción de ADN genómico de <i>P. xylanivorans</i>	53
7. 2. Amplificación de fragmentos de ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	54
7. 3. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.....	54
7. 4. Preparación de células quimio-competentes de <i>Escherichia coli</i> y transformación.....	55

7. 5. Clonado de secuencias nucleotídicas amplificadas por PCR en el vector pGEMT-Easy (Promega).....	55
7. 6. Purificación de ADN plasmídico (miniprep).....	56
7. 7. Digestión con enzimas de restricción y desfosforilación de extremos compatibles.....	56
7. 8. Clonado de insertos de interés con extremos en el vector pET28a (Novagen).....	57
7. 9. Selección de clones recombinantes de <i>E. coli</i>	57
8. Producción de proteínas recombinantes, purificación y cuantificación.....	58
9. Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	59
10. Ensayo de Western Blot.....	59
11. Cuantificación de proteínas totales en enzimas purificadas.....	60
12. Caracterización bioquímica y especificidad de sustrato de PxXyn30_8 y PxXyl30_2.....	60
12. 1. Actividad xilanasa.....	60
15. 2. Actividad β -xilosidasa.....	61
12. 3. Otras actividades enzimáticas.....	63
12. 4. Cinética enzimática.....	63
13. Hidrólisis de xilano y biomasa lignocelulósica utilizando PxXyn30_8.....	64
13. 1. Identificación de productos generados por PxXyn30_8 a partir de la hidrólisis del Xilano.....	64
13. 2. Análisis de PxXyn30_8 con otras xilanasas.....	65
14. Hidrólisis enzimática de alimento animal.....	65
15. Determinación de actividad antioxidante y compuestos fenólicos.....	66
15. 1. Ensayo de decoloración catiónica radical (ABTS ⁺).....	67
15. 2. Ensayo colorimétrico de Folin-Ciocalteu (FC).....	67
16. Tratamiento de plantas de tabaco con xilo-oligosacáridos (XOS).....	68
16. 1. Obtención de XOS.....	68
16. 2. Tratamiento de plantas con XOS.....	68
17. Métodos de análisis estadísticos.....	69
Resultados	70
Capítulo I: Mejoramiento de la actividad celulolítica y xilanolítica extracelular de <i>Cellulomonas</i> sp. B6	70
I. A. Caracterización del contexto genómico de CAZimas de <i>Cellulomonas</i> sp. B6.....	71
I. B. Mejoramiento de la actividad xilanolítica de <i>Cellulomonas</i> sp. B6 por mutagénesis química.....	76

Capítulo II: Producción de extractos enzimáticos extracelulares de <i>Paenibacillus xylanivorans</i> A59....	81
II. A. Producción de extractos enzimáticos de <i>P. xylanivorans</i> en matraces.....	81
II. B. Producción de extracto enzimático en biorreactores.....	83
II. C. Estudio del secretoma y análisis genómico.....	85
II. D. Hidrólisis de xilanos utilizando extractos enzimáticos extracelulares de <i>P. xylanivorans</i>	93
Capítulo III: Expresión recombinante de dos glicosil hidrolasas de la familia GH30 de <i>P. xylanivorans</i> A59.....	98
III. A. Análisis de la diversidad de la familia GH30 en <i>P. xylanivorans</i> A59.....	100
III. B. Clonado, expresión recombinante y purificación de <i>PxXyn30_8</i> y <i>PxXyl30_2</i>	106
III. C. Caracterización bioquímica de <i>PxXyn30_8</i> y <i>PxXyl30_2</i>	108
III. C. i. Condiciones óptimas de reacción y estabilidad térmica.....	108
III. C. ii. Cinética enzimática.....	111
III. C. iii. Especificidad de sustrato.....	113
III.D. Bioconversión del xilano por endo-xilansas de <i>P. xylanivorans</i> y modo de acción de <i>PxXyn30_8</i>	118
Capítulo IV: Aplicación de complejos enzimáticos en bioprocesos.....	122
IV. A. Aditivos enzimáticos para la alimentación de animales monogástricos.....	122
IV. B. Oligosacáridos con propiedades antioxidantes.....	132
IV. C. Oligosacáridos como estimuladores del sistema inmune vegetal.....	136
Discusión y Conclusiones.....	143
Bibliografía.....	160
Anexos.....	187

Índice de Tablas y Figuras

Introducción

Figura I1: Estructura y composición de la pared celular vegetal.....	3
Figura I2: Estructura molecular de la celulosa y formación de microfibrillas.....	4
Figura I3: Estructura del disacárido repetitivo de hemicelulosa.....	5
Figura I4: Estructura de diferentes tipos de xilanos.....	7
Figura I5: Estructura del xiloglucano.....	8
Figura I6: Estructura de distintos tipos de mananos y gluco-mananos.....	9
Figura I7: Estructura de β -glucanos de enlaces mixtos	10
Figura I8: Estructura macromolecular de la lignina y sus principales monolignoles.....	11
Figura I9: Procesamiento de la biomasa lignocelulósica en el marco de bio-refinerías.....	13
Figura I10: Enzimas con actividad sobre celulosa.....	17
Figura I11: Enzimas acyivas sobre arabino-xilano y glucurono-xilano.....	21

Materiales y Métodos

Tabla M1. Composición de los medios de cultivo.....	34
Tabla M2. Composición de los buffers y soluciones.....	35
Tabla M3. Composición de sustratos comerciales y biomasas lignocelulósicas	37
Figura M1: Esquema del ensayo de letalidad en <i>Cellulomonas</i> sp. B6.....	41
Figura M2: Esquema de mutagénesis química en <i>Cellulomonas</i> sp. B6.....	42
Figura M3: Esquema del análisis funcional de mutantes seleccionadas.....	44
Figura M4: Esquema de obtención de extractos enzimáticos extracelulares de <i>Paenibacillus xylanivorans</i>	45
Figura M5: Esquema de obtención de extractos enzimáticos extracelulares de <i>P. xylanivorans</i> para proteómica.....	47
Tabla M4: Oligonucleótidos cebadores utilizados para la amplificación de los genes <i>pxxyn30_8</i> y <i>pxxy130_2</i>	54
Figura M6: Esquema de los pasos de clonado en pGEM®-T Easy.....	56
Figura M7: Esquema de los pasos del clonado en el vector de expresión pET28a (+).....	57
Figura M8: Esquema de producción de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i>	59

Resultados-Capítulo I: Mejoramiento de la actividad celulolítica y xilanolítica extracelular de *Cellulomonas* sp. B6

Figura R1: Análisis bioinformático de los dominios CAZy predichos en el genoma de <i>Cellulomonas</i> sp. B6.....	72
Figura R2: Contexto genómico de glicosil hidrolasas activas sobre hemicelulosa codificadas por <i>Cellulomonas</i> sp. B6.....	74
Figura R3: Contexto genómico de glicosil hidrolasas activas sobre celulosa codificadas por <i>Cellulomonas</i> sp. B6.....	75
Tabla R1: Ensayo de letalidad sobre <i>Cellulomonas</i> sp. B6 utilizando etilmetanosulfonato (EMS).....	78
Figura R4: Selección de candidatos mutantes en medio sólido.....	78
Tabla R2: Mutantes seleccionadas en medio sólido.....	79
Tabla R3: Análisis funcional de las mutantes.....	80

Resultados-Capítulo II: Producción de extractos enzimáticos extracelulares de *Paenibacillus xylanivorans* A59

Figura R5: Actividad enzimática de <i>Paenibacillus xylanivorans</i>	83
Tabla R4: Escalado de la producción del extracto y concentración de la actividad xilanolítica.....	84
Figura R6: Análisis bioinformático de los dominios CAZy predichos en el genoma de <i>P. xylanivorans</i>	85
Tabla R5: Enzimas extracelulares activas sobre carbohidratos (CAZimas) detectadas en los sobrenadantes de cultivo.....	87
Figura R7: CAZimas identificadas en los secretomas de <i>P. xylanivorans</i>	88
Tabla R6: CAZimas intracelulares detectadas en los sobrenadantes de cultivos.....	90
Figura R8: Contexto genómico de glicosil hidrolasas activas sobre hemicelulosa codificadas por <i>P. xylanivorans</i>	92
Figura R9: Contexto genómico de glicosil hidrolasas activas sobre celulosa codificadas por <i>P. xylanivorans</i>	93
Tabla R7: Hidrólisis enzimática de xilanos provenientes de diferentes fuentes.....	94
Figura R10: Análisis HPAEC-PAD de los productos de hidrólisis de diferentes xilanos mediante el cóctel <i>in house</i> E-bPxST _L -10X y el cóctel comercial NS22244 (Novozyme).....	95
Figura R11: Perfil de los productos de hidrólisis de residuo de caña de azúcar extrusada (RACe).....	96
Tabla R8: Hidrólisis enzimática de RACe.....	97

Resultados-Capítulo III: Expresión recombinante de dos glicosil hidrolasas de la familia GH30 de *P. xylanivorans* A59

Tabla R9: CAZimas extracelulares detectadas en los sobrenadantes de cultivo sobre bagazo de ágave extrusado (BABe).....	99
Tabla R10: CAZimas intracelulares detectadas en los sobrenadantes de cultivo sobre BABe.....	100
Tabla R11: Clasificación de la familia GH30.....	101
Figura R12: Red de similitud de secuencias (SSN) de la familia GH30.....	103
Tabla R12: Identidad de secuencia de PxGH30_2 con enzimas de la misma subfamilia caracterizadas.....	103
Tabla R13: Identidad de secuencia de PxGH30_8 con enzimas de la misma subfamilia caracterizadas.....	104
Figura R13: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de enzimas de la familia GH30_8.....	105
Figura R14: Esquema de las proteínas PxXyn30_8 y PxXyl30_2.....	106
Figura R15: Esquema del clonado de PxXyn30_8 y PxXyl30_2 en el vector pET28a (+).....	107
Figura R16: Análisis de las proteínas recombinantes purificadas PxXyl30_8 y PxXyl30_2.....	108
Figura R17: Determinación de rango de linealidad de concentración de enzima y tiempo de reacción.....	109
Figura R18: Perfil de actividad enzimática de PxXyn30_8 y PxXyl30_2 en función del pH y la temperatura.....	111
Figura R19: Cinética enzimática de PxXyn30_8 y PxXyl30_2.....	112
Figura R20: Inhibición de la actividad enzimática de PxXyl30_2 por monosacáridos.....	113
Tabla R14: Especificidad de sustrato de PxXyn30_8.....	114
Figura R21: Actividad enzimática de PxXyn30_8 sobre xilano distintas fuentes de xilano.....	115
Tabla R15: Especificidad de sustrato de PxXyl30_2.....	116
Figura R22: Productos de hidrólisis de PxXyl30_2 sobre distintos sustratos visualizados por TLC.....	117
Figura R23: Complementación del extracto enzimático de <i>P. xylanivorans</i> con PxXyl30_2.....	118
Figura R24: Modo de acción de PxXyn30_8.....	119
Figura R25: Perfil de hidrólisis del xilano por endo-xilanasas de <i>P. xylanivorans</i>	120
Tabla R16: Degradación de xilano de madera de haya por xilanasas de <i>P. xylanivorans</i>	121
Resultados-Capítulo IV: Aplicación de complejos enzimáticos en bioprocesos	
Tabla R17: Composición alimento animal a base de soja-maíz, en formato de <i>pellets</i>	123
Figura R26: Determinación de rango de linealidad de concentración de E-PxST y tiempo de reacción.....	124

Figura R27: Perfil de actividad β -glucanasa y xilanasa de E-PxST.....	125
Tabla R18: Extracto enzimático de <i>P. xylanivorans</i> como fuente de enzimas.....	126
Figura R28: Perfil de productos de la hidrólisis de alimento animal por el cóctel E-PxST.....	127
Figura R29: Hidrólisis de alimento a base de soja-maíz por el cóctel E-PxST.....	129
Figura R30: Hidrólisis de alimento a base de soja-maíz por el cóctel peletizado E-PxSTp.....	131
Tabla R19: Fuente de enzimas para la valorización del xilano.....	132
Figura R31: Perfil de productos de la hidrólisis del BABe por endo-xilanasas de <i>P. xylanivorans</i>	133
Tabla R20: Producción de xilo-oligosacáridos (XOS) con potencial antioxidante.....	134
Figura R32: Perfil de XOS con potencial antioxidante obtenidos por hidrólisis enzimática del BABe liofilizados y purificados.....	134
Figura R33: Actividad antioxidante de (U)XOS obtenidos por hidrólisis enzimática del BABe.....	136
Tabla R21: Producción de XOS con potencial elicitor del sistema inmune vegetal.....	137
Figura R34: Perfil de XOS con potencial elicitor del sistema inmune vegetal visualizados por TLC.....	138
Tabla R22: Actividad xilanolítica residual de los hidrolizados obtenidos por la acción del extracto E-PxST sobre las biomasas RACe y BABe.....	139
Figura R35: Crecimiento bacteriano residual de los hidrolizados obtenidos por la acción del extracto E-PxST sobre las biomasas RACe y BABe.....	139
Figura R36: Inducción de la respuesta inmune vegetal.....	141

Abreviaturas y unidades de medida

% (p/p): porcentaje de peso en peso

% (p/v): porcentaje de peso en volumen

% (v/v): porcentaje de volumen en volumen

°C: grados centígrados

µg: microgramos

µm: micrómetros

1G: primera generación

2G: segunda generación

AAs: enzimas con actividades auxiliares

ABF: arabinofuranosidasa

ADN: ácido desoxirribonucleico

AGX: arabino-glucurono-xilano

Amp: ampicilina

AOS: arabino-oligosacáridos

AR: azúcares reductores

Ara o A1: arabinosa

AX: arabino-xilano

AXOS: arabino-xilo-oligosacáridos

BABe: bagazo de Ágave azul pre-tratado por extrusión alcalina

BAX: xilano de madera de abedul

BCMC: celulosa microcristalina bacteriana

BGL: β-D-glucosidasa

BLC: biomasa lignocelulósica

C1: átomo de carbono 1 de la molécula de glucosa o xilosa

C4: átomo de carbono 4 de la molécula de glucosa o xilosa

CA: carbón activado

CAZima: enzima activa sobre carbohidratos

CAZy: *Carbohydrate Active Enzymes Database*

CBH: celobiohidrolasa

CBM: dominio de unión a carbohidrato

CD: dominio catalítico

CE: control enzima o extracto enzimático

CEs: carbohidrato esterasas

CH: capacidad hidrolítica

Cm: cloranfenicol

CMC: carboximetilcelulosa

COS: celo-oligosacáridos

CS: control sustrato

CSOC: quito-oligosacáridos

DAMPs: patrones moleculares asociados al daño

dATP: deoxiadenosina trifosfato

dCTPs: deoxicitidina trifosfato

dGTPs: deoxiguanosina trifosfato

DNS: ácido 3,5-dinitrosalicílico

dNTPs: deoxinucleósido trifosfato

DO₆₀₀: densidad óptica a 600 nanómetros

DTT: ditioneitol

dTTPs: deoxitimidina trifosfato

DUF: módulo de función desconocida

E: sobrenadante de cultivo libre de células o extracto enzimático extracelular

EC: número de comisión de actividad enzimática

EDTA: ácido etilendiamino tetra acético

emPAI: índice de abundancia

EMS: etilmetanosulronato

Euca_M: madera de *Eucalyptus* molida con molino de borlas

Euca_S: madera de *Eucalyptus* pretratada por explosión de vapor

FOS: fructo-oligosacáridos

g: unidades de centrifugación

G1 o Glc: glucosa

G2: celobiosa

G3: celotriosa

G4: celotetraosa

G5: celopentaosa

G6: celohexahosa

Gal-Glc-MN: galacto-gluco-manano

Gal-MN: galacto-manano

GAX: glucurono-arabino-xilano

GHs: glicosil hidrolasas

GlcA: residuo de ácido D-glucurónico

Glc-MN: gluco-manano

Gm: gentamicina

GOS: galacto-oligosacáridos

GP: grado de polimerización

gr: gramos

GTs: glicosil transferasas

GX: glucurono-xilano

HPAEC-PAD: cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada

hs: horas

IMAC: cromatografía de afinidad por iones

IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

INX: xilano industrial

K_{cat}: número de recambio

kDa: kilo Dalton

K_i: constante de imbibición

K_M: constante de Michaelis- Menten

Km: kanamicina

L: litro

LB: medio de cultivo Luria Bertani

LC-MS/MS: Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas en Tándem

LPMO: monooxigenasa lítica de polisacáridos

M: concentración molar

MALDI-TOF: espectrometría de desorción/ionización láser asistida por matriz con detección de tiempo de vuelo

MAMPs: patrones moleculares asociados a microbios

MeGlcA: residuo de ácido 4-O-metil-D-glucurónico

MeGX: 4-O-metil-glucurono-xilano

mg: miligramos

min: minutos

mL: mililitros

mM: concentración milimolar

MM: medio de cultivo mínimo salino

MN: mananos

MOS: mano-oligosacáridos

NA: Naranja de Acridina

NCBI: *National Centre for Biotechnology Information*

NMR: Resonancia Magnética Nuclear

NOD: oligosacáridos no digeribles

NR: extremo no-reductor del polisacárido u oligo-sacárido

NTG: N-metil-N β -nitro-N-nitrosoguanidina

OAX: arabino-xilano de hojuela de avena

PASC: celulosa amorfa regenerada

pb: pares de bases

PBS: solución buffer salina con fosfato

PCP: pared celular primaria

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PCS: pared celular secundaria

PDB: *Protein Data Bank*

pl: punto isoeléctrico

PLs: polisacáridos liasas

PNAs: polisacáridos no amiláceos

pNP: *p*-nitrofenol

pNP-A: *p*-nitrofenil- α -L-arabinofuranosa

pNP-C: *p*-nitrofenil- β -D-celobiósido

pNP-G: *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido

pNP-X: *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranosido

PRR: receptores de reconocimiento de patrones

R: extremo reductor del polisacárido u oligosacárido

RAC: residuo agrícola de caña de azúcar

RACe: RAC pre-tratado por extrusión alcalina

rpm: revoluciones por minuto

SAC: sacarosa

SBM: dietas animales son a base de maíz y harina de soya

SDS: dodecilsulfato de sodio

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

Seg: segundos

SNFG: *Symbol Nomenclature for Glycans*

SSN: Red de Similitud de Secuencias

ST: salvado de trigo

STds: ST desalmidonado

TAE: buffer Tris-acetato-EDTA

TB: colorante Azul de Tripán

TBS: buffer Tris salino

TCA: ácido tricloroacético

TLC: cromatografía en capa delgada

TMV: *Tobacco mosaic virus*

UFC: unidades formadoras de colonia

UI: unidades internacionales de actividad enzimática

UXOS: glucurono-xilo-oligosacáridos o xilo-oligosacáridos ácidos

V: voltios

V_{max}: velocidad máxima de una reacción enzimática

WAX: arabino-xilano de trigo

X: veces de concentración

X1: xilosa

X2: xilobiosa

X3: xilotriosa

X4: xilotetraosa

X5: xilopentaosa

X6: xilohexaosa

XA²XX: 2,3- α -L-arabinofuranosil-xilotetraosa

XA³XX: 3,3- α -L-arabinofuranosil-xilotetraosa

XIN: xilano de madera de haya

XOS: xilo-oligosacáridos

XUXX: 2-(4-*O*-metil- α -D-glucuronil)-xilotetraosa

XyG: xiloglucano

Xylp: xilopiranososa o unidad de xilosa

α G: almidón de papa

α -L-Araf: α -L-arabinofuranosa o unidades de arabinosa

β GC: β -glucano de cebada

β G: β -glucanos de enlaces mixtos

Desarrollo de complejos enzimáticos bacterianos para la valorización de biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica, integrada principalmente por celulosa y hemicelulosa, constituye una fuente estratégica para la producción de biocombustibles y bioproductos. Su aprovechamiento eficiente requiere cócteles enzimáticos capaces de hidrolizar estos polímeros de manera específica, generando oligosacáridos bioactivos o monómeros fermentables. El objetivo central de esta tesis fue estudiar enzimas bacterianas activas sobre polisacáridos estructurales de la biomasa vegetal y desarrollar complejos enzimáticos aplicables en bioprocesos.

Se optimizaron las condiciones de cultivo de *Paenibacillus xylanivorans* A59 para obtener un extracto enzimático enriquecido en actividades dirigidas a la hemicelulosa, evaluando distintas fuentes de carbono y la producción en matraces y biorreactores. El salvado de trigo resultó ser el mejor inductor de actividad extracelular, y la producción en biorreactor permitió obtener cinco veces más actividad enzimática que la producción en matraces. El análisis proteómico reveló un repertorio diverso de enzimas activas sobre carbohidratos, identificándose a la xilanasa Pxxyn10A, de la familia GH10, como la más abundante. Asimismo, se identificaron dos enzimas de la familia GH30, una potencial glucurono-xilanasa (subfamilia 8) y una β -xilosidasa intracelular (subfamilia 2), que fueron expresadas de manera recombinante para su caracterización funcional: Pxxyn30_8 y Pxxyl30_2.

La enzima Pxxyl30_2 mostró actividad restringida a un sustrato modelo, sin evidencias de acción sobre xilo-oligosacáridos, por lo que su rol biológico permanece incierto. En cambio, la enzima Pxxyn30_8 presentó actividad glucurono-xilanasa específica, con capacidad inédita de tolerar decoraciones de ácido (metil)glucurónico en la posición +1 de la cadena de glucurono-xilano. La combinación de esta enzima con las endo-xilanasas extracelulares Pxxyn10A y Pxxyn11B mejoró la hidrólisis de glucurono-xilanos presentes en biomasa lignocelulósica, como el bagazo de agave.

Se exploró el desarrollo de formulaciones enzimáticas para aplicaciones concretas. El extracto extracelular mejoró la solubilización de glucanos en alimentos balanceados para aves, estableciendo bases para su empleo como aditivo multienzimático en nutrición animal. Asimismo, la suplementación del extracto con β -xilosidasas y α -L-arabinofuranosidasas permitió una conversión más eficiente del xilano contenido en residuos agrícolas ricos en arabino-xilano, evidenciando el potencial de estas formulaciones en esquemas de biorrefinería.

La hidrólisis del bagazo de agave, residuo rico en glucurono-xilano, permitió obtener xilo-oligosacáridos con propiedades bioactivas. La acción de Pxxyn30_8 generó xilo-oligosacáridos ácidos de mayor longitud con actividad antioxidante superior a la obtenida con las otras xilanasas estudiadas. Asimismo, los xilo-oligosacáridos generados por hidrólisis del bagazo de agave con el extracto enzimático de *P. xylanivorans*, promovieron la respuesta inmune en plantas de tabaco frente al virus del mosaico. Es de destacar que el sobrenadante de cultivo por sí mismo también efecto protector en plantas, abriendo nuevas líneas de investigación.

En conjunto, esta tesis doctoral permitió obtener y caracterizar extractos y cócteles enzimáticos bacterianos eficientes para la degradación de hemicelulosas, validando su aplicación en nutrición animal, biorrefinerías y generación de compuestos bioactivos. Estos resultados establecen bases sólidas para el diseño de formulaciones enzimáticas con alto valor agregado, orientadas al aprovechamiento sustentable de biomasa vegetal en el marco de la bioeconomía circular.

Palabras claves: BIOMASA LIGNOCELULÓSICA, COMPLEJOS ENZIMÁTICOS, CAZIMAS, XILANASA, GLUCURONOXILANASA, VALORIZACIÓN DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES, NUTRICIÓN ANIMAL, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, ESTIMULACIÓN INMUNE VEGETAL

Development of bacterial enzyme cocktails for the valorization of lignocellulosic biomass

Lignocellulosic biomass, mainly composed of cellulose and hemicellulose, represents a strategic feedstock to produce biofuels and bioproducts. Its efficient utilization requires tailored enzymatic cocktails capable of hydrolyzing these structural polymers into bioactive oligosaccharides or fermentable sugars. The aim of this doctoral thesis was to study bacterial enzymes active on plant cell wall polysaccharides and to develop enzyme cocktails applicable to bioprocesses.

Culture conditions of *Paenibacillus xylanivorans* A59 were optimized to obtain an extracellular enzymatic extract enriched in hemicellulose-degrading activities, testing different carbon sources and production in flasks and bioreactors. Wheat bran was identified as the most effective inducer, and bioreactor cultivation increased extracellular enzymatic activity fivefold compared to flask cultures. Proteomic analysis revealed a diverse repertoire of carbohydrate-active enzymes, with the GH10 xylanase *PxXyn10A* being the most abundant. Besides, two GH30 enzymes were identified, including a putative glucurono-xylanase (subfamily 8) and an intracellular β -xylosidase (subfamily 2), which were recombinantly expressed and functionally characterized: *PxXyn30_8* and *PxXyl30_2*.

PxXyl30_2 showed activity restricted to a model substrate, with no evidence of action on xylo-oligosaccharides, leaving its biological role unclear. Conversely, *PxXyn30_8* exhibited specific glucurono-xylanase activity and an unprecedented tolerance to (methyl)glucuronic acid substitutions at the +1 position of glucurono-xylan chains. Its combination with extracellular endo-xylanases *PxXyn10A* and *PxXyn11B* enhanced glucurono-xylan hydrolysis in lignocellulosic biomass such as agave bagasse.

Enzyme formulations were explored for practical applications. The extracellular extract improved glucan solubilization in poultry feed, establishing a basis for its use as a multienzyme additive in animal nutrition. Supplementation with β -xylosidases and α -L-arabinofuranosidases enhanced xylan conversion from agricultural residues rich in arabinoxylan, demonstrating potential for biorefinery applications.

Hydrolysis of agave bagasse, a residue rich in glucurono-xylan, generated xylo-oligosaccharides with bioactive properties. The action of *PxXyn30_8* generated longer acidic xylo-oligosaccharides with antioxidant activity superior to that obtained with the other xylanases studied. Furthermore, xylo-oligosaccharides generated by hydrolysis of agave bagasse using the *P. xylanivorans* enzymatic extract promoted immune responses in tobacco plants against tobacco mosaic virus. Notably, the culture supernatant itself also exhibited a protective effect in plants, opening new lines of investigation.

Overall, this work enabled the development and characterization of efficient bacterial enzyme extracts and cocktails for hemicellulose degradation, validating their application in animal nutrition, biorefineries, and the generation of bioactive compounds. These results provide a solid foundation for designing high-value enzymatic formulations for the sustainable utilization of plant biomass within the framework of the circular bioeconomy.

Keywords: LIGNOCELLULOSIC BIOMASS, ENZYME COMPLEXES, CAZYMES, XYLANASE, GLUCURONO-XYLANASE, AGRO-INDUSTRIAL WASTE VALORIZATION, ANIMAL NUTRITION, ANTIOXIDANT ACTIVITY, PLANT IMMUNE STIMULATION

Publicaciones derivadas de este trabajo de Tesis

- Topalian J, Navas L, Ontañón O, Valacco MP, Nosedá DG, Blasco M, Peña MJ, Urbanowicz BR, Campos, E (2024). Production of a bacterial secretome highly efficient for the deconstruction of xylans. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40(9): 266. <https://doi.org/10.1007/s11274-024-04075-y>
- Topalian J, Ontañón O, Navas L, Hracek V, Blasco M, Dionisi HB, Jana S, Urbanowicz BR, Campos, E (2025). Functional diversity of GH30 enzymes from *Paenibacillus xylanivorans* drives efficient glucuronoxylan deconstruction and UXOS production. En preparación.
- Topalian J, Ontañón O, Navas L, Hracek V, Blasco M, Campos, E (2025). A *Paenibacillus xylanivorans*-derived enzyme cocktail as a feed additive in monogastric diets for enhanced non-starch polysaccharide degradation. En preparación.

Introducción

Introducción

La biomasa lignocelulósica (BLC) se reconoce como el recurso biológico renovable más abundante a nivel global derivado principalmente de toda biomasa de origen vegetal que no se destina al uso alimentario, abarcando residuos y subproductos de la agroindustria, cultivos energéticos tales como pasturas y especies consideradas malezas, así como también desechos sólidos urbanos (Fatma y col., 2018). Es una materia prima de bajo costo y de fácil disponibilidad para la obtención de diferentes productos con propiedades biotecnológicas importantes (Abdeshahian y col., 2020; Ilić y col., 2023).

En América del Sur, los extensos sistemas agrícolas y forestales generan grandes volúmenes de residuos lignocelulósicos que representan una oportunidad estratégica para el desarrollo de biorrefinerías sostenibles. Según Sampaolesi y col. (2023), Brasil y Colombia aportan la mayor fracción de biomasa directa, principalmente de caña de azúcar, mientras que Argentina concentra cerca del 45% de la biomasa indirecta regional, derivada de las industrias forestal y alimentaria. Estos recursos, compuestos por bagazo, cáscaras, salvados y aserrín son sustratos prometedores para la producción de biocombustibles, biopolímeros y compuestos bioactivos.

De la necesidad de aprovechar estos recursos surge el concepto de biorrefinería que abarca los procesos integrados, tanto químicos como bioquímicos, para convertir la BLC (como principal insumo) en biocombustibles y energía, como así bioproductos de mayor agregado de valor (Trigo y col., 2012; Wang y col., 2023). A su vez, las biorrefinerías pueden utilizar dos tipos de biomasa como materia prima, según su disponibilidad. Por ejemplo, el uso directo de la biomasa para producir un producto determinado, como el maíz o la caña de azúcar para obtener bioetanol, o la utilización de biomasa residual generada como subproducto de la actividad agroindustrial (Sampaolesi y col., 2023). Las biorrefinerías están comenzando a desempeñar un rol muy importante en el mundo, ya que constituyen una interfase crítica para el desarrollo agroindustrial. Su implementación y desarrollo son sumamente atractivos en países como la Argentina, donde la valorización de los residuos de la producción agrícola es crucial para el desarrollo de la economía (Trigo y col., 2012). En todas las regiones del país existe BLC disponible asociada a los distintos sectores productivos. Las fuentes de oferta de biomasa, identificadas, localizadas y cuantificadas en función de su origen se clasifican en directas e indirectas. Según la última actualización de la FAO en el año 2020 en Argentina la oferta directa comprende cultivos que aportan aproximadamente 8,47 millones de toneladas anuales de biomasa, entre los cuales se destacan forestaciones (38%), caña de azúcar (23%), té (12%), vid (7%), banana (6%), arroz (5%), frutas de carozo (3%), cítricos (3%) y yerba mate (2%), además de aportes menores de arándano, olivo, kiwi y nuez pecán (1% en conjunto). Por su parte, la oferta indirecta se estimó en 10,13 millones de toneladas anuales, provenientes de ingenios (55%), industrias forestales

(31%), procesadoras de maní (3%) y, en menor proporción, desmotadoras, bodegas, molinos de arroz, hornos de carbón, poda urbana, procesadoras de jugo, semilleros, molinos de yerba, procesadoras de mandioca, frigoríficos, secaderos de fruta, acopiadores de tabaco y procesadoras de nuez pecán, que en conjunto representan el 11% restante (Denaday y col., 2020). Esta caracterización integral de la biomasa vegetal disponible constituye un insumo clave para el diseño de estrategias de aprovechamiento sostenible y el desarrollo de bioprocesos orientados a la producción de compuestos de valor agregado.

1. Estructura y composición de la pared celular vegetal

Una característica distintiva de las células vegetales es la presencia de una pared rica en polisacáridos. Esta pared desempeña diversas funciones esenciales, como otorgar rigidez y soporte estructural, contribuir a la morfología celular, participar en procesos metabólicos (formando la interfaz entre células adyacentes, participando en la comunicación intercelular) y actuar como barrera protectora, entre otras. Las paredes celulares vegetales se dividen en dos grandes categorías: pared celular primaria (PCP), las cuales se encuentran rodeando células con capacidad de crecimiento, y la pared celular secundaria (PCS), que rodean células especializadas como, por ejemplo, elementos del sistema vascular. Las PCS son estructuras engrosadas, cuya composición es diferente en las distintas células diferenciadas (Keegstra y col., 2010).

La PCP está compuesta mayoritariamente por polisacáridos estructurales, celulosa, hemicelulosa y pectina, y en menor proporción por enzimas y proteínas estructurales (Rose y Lee, 2010). La celulosa, homopolímero de D-glucopiranosas, es el componente más abundante y se encuentra formando cadenas que, a su vez, están empaquetadas en microfibrillas. Las microfibrillas de celulosa se encuentran estrechamente interconectadas a través de la hemicelulosa, heteropolímero compuesto por hexosas y pentosas, y la pectina, conformando una matriz de polisacáridos (Figura I1A) (Loix y col., 2017). Las pectinas están formadas principalmente por ácido galacturónico y proveen hidratación en la pared, indispensable para el crecimiento expansivo (Voragen y col., 2009).

Determinadas células diferenciadas detienen su crecimiento iniciando la formación de la PCS que se deposita entre la PCP y la membrana periplásmica. Durante este proceso, pectinas y glicoproteínas son reemplazadas por lignina, compuesto hidrofóbico e inerte que se adhiere a la matriz de polisacáridos estructurales aportando rigidez, soporte mecánico e hidrofobicidad. La composición de las PCS entre células adyacentes es variable y se encuentran conectadas por una laminilla media (Figura I1B) (Johnson y col., 2018).

La BLC está compuesta mayormente por PCS. La proporción de celulosa, hemicelulosa y lignina depende fuertemente de la especie vegetal y puede variar entre distintos tipos celulares dentro de una misma especie (Zhong y Zheng-Hua, 2015). Para una valorización adecuada de los componentes de la BLC, es necesario comprender la composición y estructura de sus polímeros estructurales principales.

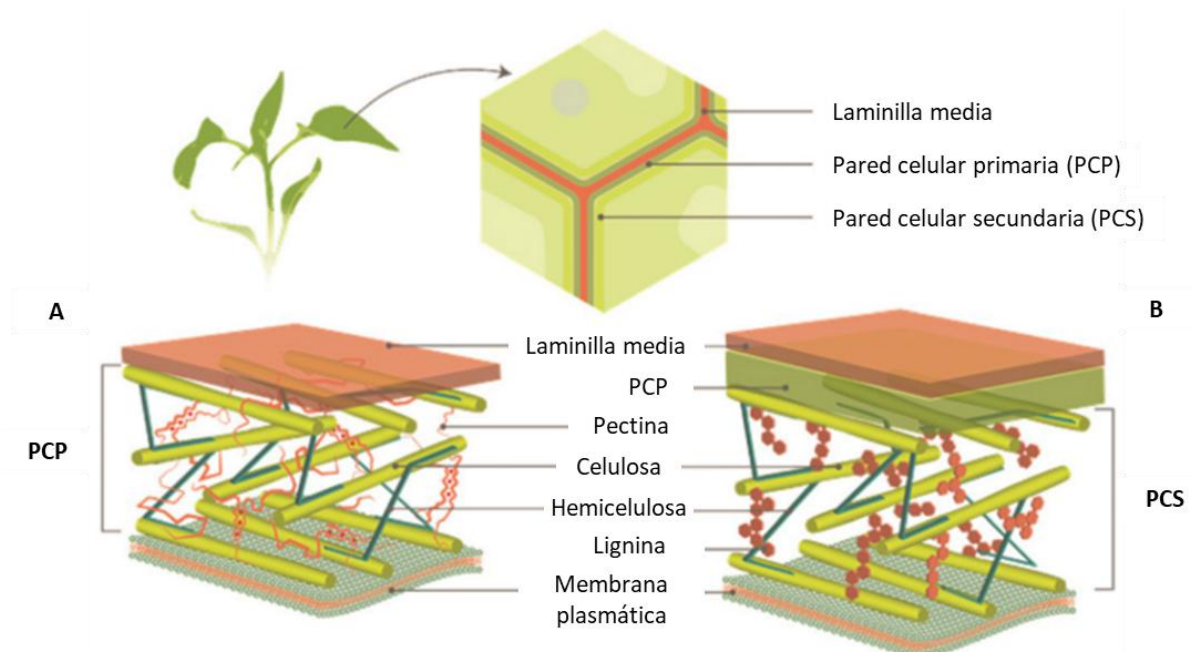


Figura I1: Esquema representativo de la estructura y composición de la pared celular vegetal. A) Esquema de pared celular primaria (PCP). **B)** Esquema de pared celular secundaria (PCS). Figura adaptada de Merino y col. (2022).

1. 1. Celulosa

La celulosa es el material de origen biológico más abundante sobre la tierra y el componente mayoritario de las paredes celulares de las plantas terrestres, constituyendo el 40-60% del peso seco de la biomasa (Payne y col., 2015; Putro y col., 2016). Es un homopolímero lineal conformado por 7.000 a 15.000 unidades de glucosa unidas por enlaces β -1,4, en el que cada residuo de glucosa tiene una rotación de 180° con respecto al siguiente, lo que resulta en un polímero cuya unidad repetitiva es el disacárido celobiosa (Figura I2) (Merino y col., 2022).

Las microfibrillas de celulosa se forman al ubicarse varias moléculas lineales de forma paralela entre sí, unidas inter- e intramolecularmente por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. Varias microfibrillas se unen formando las fibras de celulosa, las cuales contienen algunas zonas organizadas de modo más regular o cristalino, mientras que otras zonas débilmente ensambladas son más laxas o amorfas (McNamara y col., 2015). El ángulo y la dirección de estas fibras son variables entre la PCP y la PCS, e incluso dentro de las diferentes regiones de la PCP, siguiendo un orden más irregular en las capas externas (Rytioja y col., 2014).

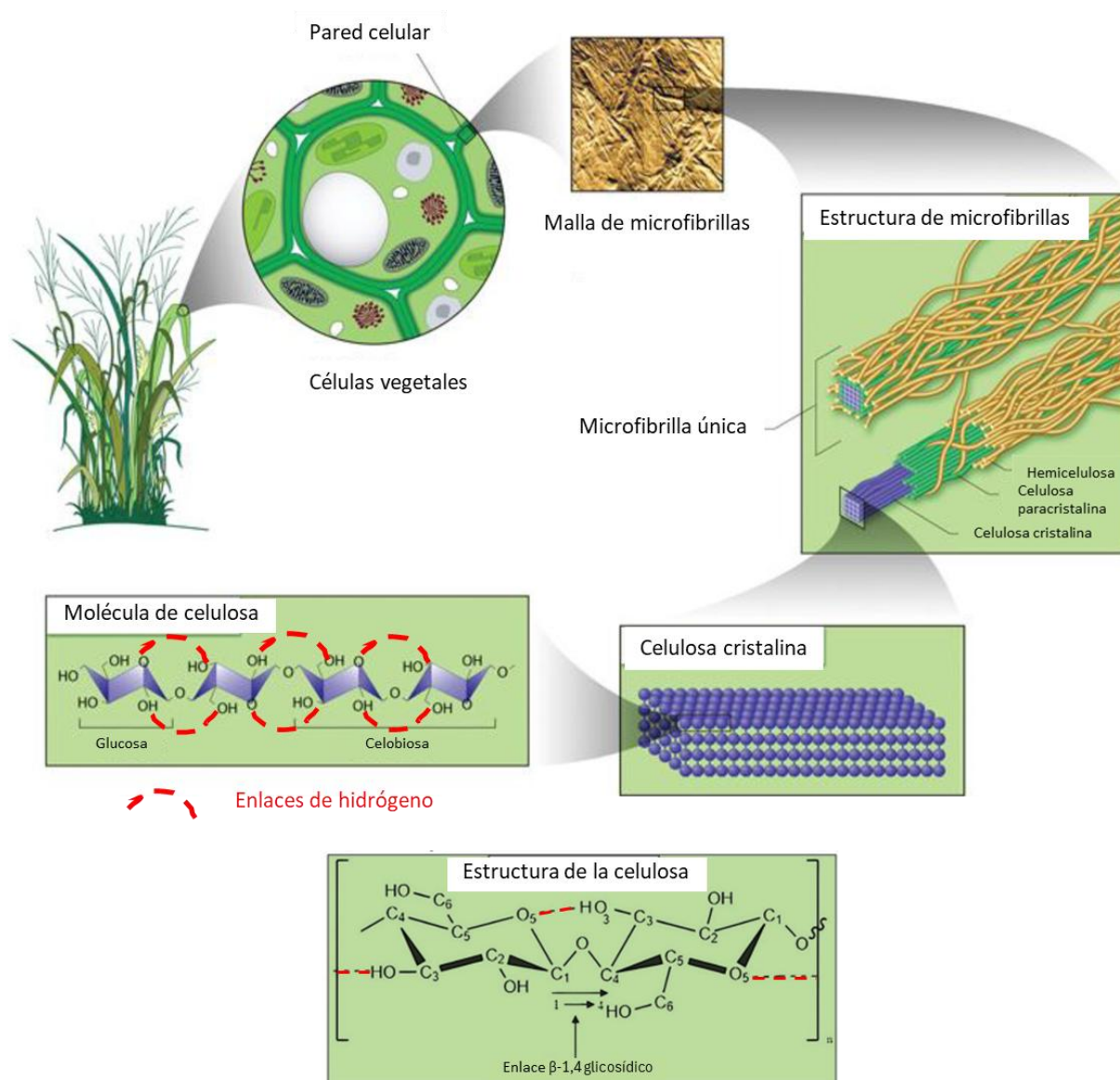


Figura 12: Celulosa. Conformación de microfibrillas inmersas en la pared celular vegetal y estructura molecular. Adaptado de Muddasar y col. (2022).

Si bien la celulosa se encuentra mayormente en plantas, también es producida por tunicados (urocordados) y por bacterias (Lynd y col., 2002; Gupta y col., 2019). Sin embargo, la organización de las uniones puente de hidrógeno que se generan entre las cadenas en una microfibrilla varían, generando la conformación $I\alpha$, predominantemente en bacterias y algas, y la conformación $I\beta$, predominante en plantas superiores (Rongpipi y col., 2019).

Existen productos comerciales que se preparan a partir de celulosa nativa para fines específicos. Por ejemplo, el Avicel es celulosa microcristalina preparada por hidrólisis ácida a partir de pulpa de madera, y se utiliza para numerosas aplicaciones. La celulosa microcristalina bacteriana (BCMC), es una forma altamente cristalina que se obtiene y purifica a partir de cepas bacterianas productoras de celulosa (*Acetobacter xylinum*) y es muy utilizada en la industria farmacéutica. La carboximetilcelulosa (CMC)

es otro tipo de celulosa microcristalina soluble en agua gracias a la adición de grupos carboximetilo ($-\text{CH}_2\text{-COOH}$) a algunos de los grupos hidroxilo de los monómeros de glucopiranososa de la cadena principal del polisacárido (Baghel y col., 2021). Posee numerosas aplicaciones en la industria alimenticia, ya que incrementa la viscosidad de las emulsiones y mejora la textura en el producto final (Krempel y col., 2019). Por otro lado, a partir de Avicel, se puede preparar celulosa amorfa, por tratamiento con ácido fosfórico (PASC, por sus siglas en inglés *Phosphoric Acid Swollen Cellulose*) (Payne y col., 2015).

1. 2. Hemicelulosa

La hemicelulosa es un conjunto de heteropolisacáridos con longitud de 50 a 200 unidades, altamente ramificados y cuyas cadenas principales están formadas por pentosas (xilosa) o hexosas (manosa y glucosa) con enlaces β -1,4, en configuración ecuatorial en C1 y C4, por lo que las cadenas principales presentan una similitud estructural significativa (Figura I3) (Saini y col., 2015). Este polisacárido corresponde al 20-40% del peso seco de la lignocelulosa y su composición es muy variable en las distintas especies vegetales (Putro y col., 2016). Por lo general, las hemicelulosas de las PCP comprenden xilanos, xiloglucanos, galacto-glucó-mananos y glucanos de enlaces mixtos β (1-3; 1-4). A su vez, las hemicelulosas de las PCS son principalmente xilanos, glucó-mananos y galacto-glucó-mananos (Scheller y Ulvskox, 2010; Joseleau y col., 2016).

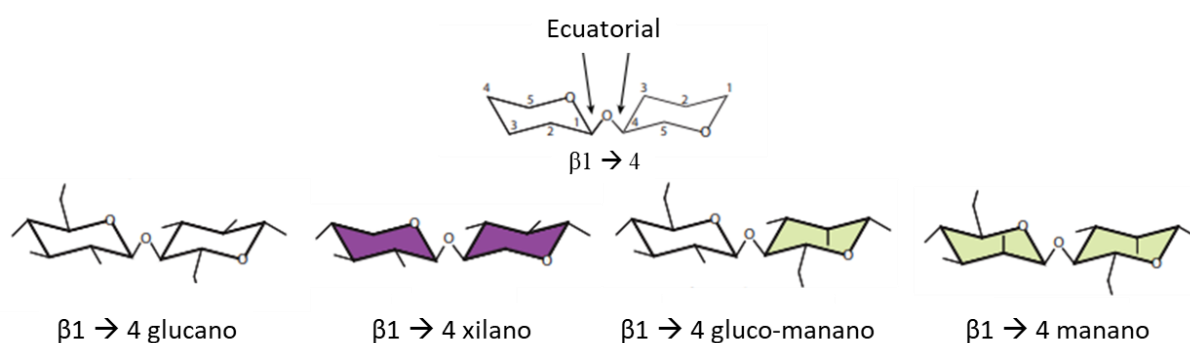


Figura I3: Disacárido repetitivo de hemicelulosa. Las hemicelulosas se caracterizan por una cadena principal unida por enlaces β -(1 $\rightarrow$ 4) con una configuración ecuatorial en C1 y C4. Blanco: glucosa. Violeta: xilosa. Verde claro: manosa. Figura adaptada de Scheller y Ulvskox, 2010.

La composición y la distribución de la hemicelulosa difieren notablemente en las distintas especies. Por ejemplo, en las maderas blandas (gimnospermas), predomina el galacto-glucó-manano (constituido por residuos de manosa, glucosa y galactosa en una proporción aproximada de 3:1:1), junto con glucó-manano (relación manosa: glucosa cercana a 3:1) y además contienen arabino-glucurono-xilanos, que representan alrededor del 7-8% del peso seco. En contraste, las maderas duras (angiospermas) se caracterizan por la presencia de acetil-glucurono-xilanos, que constituyen entre el 15% y el 30% del

peso seco, sustituidos por cantidades variables de galactosa, arabinosa, ramnosa, unidades de ácido metil-glucurónico y grupos acetilo (Moreira y Filho, 2008).

1. 2. a. Xilano

El tipo de hemicelulosa principal de las paredes celulares de las plantas terrestres es el xilano y representa el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa. En los tejidos leñosos, el xilano está presente principalmente en la PCS y junto con la lignina, constituye una matriz amorfa que rodea a las microfibrillas de celulosa (Abdeshahian y col., 2020), donde interactúa mediante enlaces covalentes y no covalentes, siendo estas interacciones importantes tanto para proteger las microfibrillas de celulosa contra la biodegradación como para mantener la integridad estructural de las paredes celulares (Javier y col., 2007).

El xilano es un polisacárido complejo compuesto por una cadena principal de residuos de xilosa unidos por enlaces β -1,4, que dependiendo de la fuente vegetal e incluso del tipo de tejido dentro de la misma planta su estructura es variable (Curry y col., 2023). La clasificación de los xilanos se basa en el tipo de grupos laterales unidos al esqueleto principal de la xilopiranososa (Xylp).

El glucurono-xilano (GX), predominante en las PCS de las plantas dicotiledóneas, tiene residuos individuales de ácido 4-*O*-metil- α -D-glucurónico (MeGlcA) y D-glucurónico (GlcA) unidos al esqueleto de β -1,4-Xylp por enlaces alfa en la posición 2 (α -1,2), y puede estar fuertemente acetilado (Figura I4). Los grupos acetilo están unidos en *O*-3 (α -1,3) a los residuos de xilosa y, en menor medida, en *O*-2 (α -1,2) (Scheller y Ulvskov, 2010; Curry y col., 2023).

En cambio, en el arabino-xilano (AX), abundante en gimnospermas (Scheller y Ulvskov, 2010), la cadena principal lineal está sustituida principalmente por residuos de α -L-arabinofuranosa (α -L-Araf) en las posiciones *O*-2 y/o *O*-3 (α -1,2 y/o α -1,3) de las unidades Xylp (Figura I4). El AX del endospermo de los cereales contiene muy poco ácido glucurónico, pero los heteroxilanos presentes en las partes vegetativas de las gramíneas suelen denominarse AX, aunque tienden a contener más ácido glucurónico y residuos de 4-*O*-metil glucuronosilo, lo que hace que glucurono-arabino-xilano (GAX) sea un nombre más apropiado. Además, el arabino-glucurono-xilano (AGX) está sustituido principalmente por residuos de MeGlcA individuales en las posiciones *O*-2 (α -1,2) y, en menor medida, por residuos de α -L-Araf en *O*-3 (α -1,3) (Figura I4) (Baker y col., 2021; Curry y col., 2023).

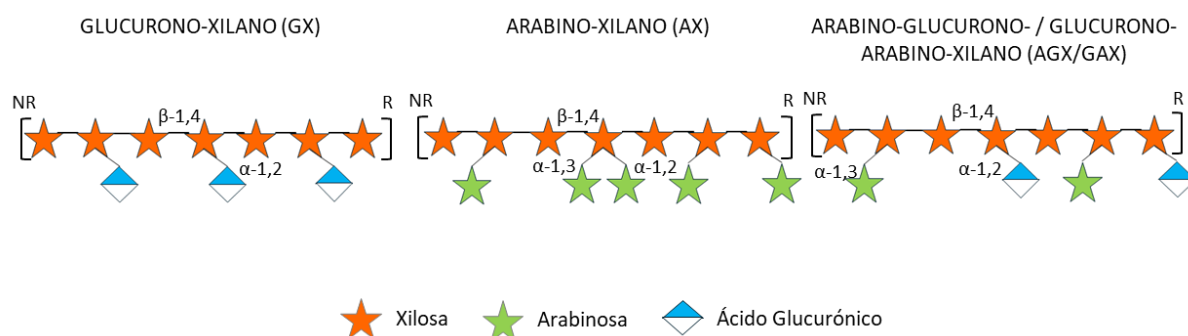


Figura I4: Esquemas representativos de diferentes tipos de xilanos presentes en la pared celular vegetal. NR: extremo no reductor. R: extremo reductor. Convención de representación de monosacáridos adaptada de *Symbol Nomenclature for Glycans* (SNFG).

1. 2. b. Xiloglucano

El xiloglucano (XyG) es la hemicelulosa más abundante de la PCP, es decir, las paredes de las células en elongación. Además, puede presentarse como polisacárido de almacenamiento en las semillas. En las PCP el XyG interactúa con las microfibrillas de celulosa formando una red XyG-celulosa fuerte pero extensible, actuando como una molécula espaciadora impidiendo la agregación de las microfibrillas de celulosa o como molécula mediadora permitiendo las interacciones entre las microfibrillas de celulosa y otros polímeros presentes en la matriz de la pared celular (Schultink y col., 2014).

El XyG es un polisacárido ramificado formado por una cadena principal lineal de unidades monoméricas de D-glucosa unidas mediante enlaces glucosídicos $\beta-1,4$, decorada por xilosa y/o xilosa-galactosa a través de enlaces $\alpha-1,6$. Normalmente, la longitud de esta cadena principal oscila entre 300 y 3000 unidades y consiste en unidades repetitivas de heptasacáridos, formados por 4 unidades de β -D-1,4-glucosa, seguidas de tres residuos de β -D-1,4-glucosa sustituidos en $\alpha-1,6$ con D-xilosa. Aproximadamente la mitad de estas sustituciones están a su vez sustituidas con β -D-galactosa en $\beta-1,2$ y en ocasiones se encuentran también sustituidas en $\alpha-1,2$ por fucosa (Figura I5) (Esquena-Moret, 2022; Hrmova y col., 2022). La composición de las cadenas laterales y el orden de alternancia son específicos de cada especie y pueden cambiar durante el crecimiento celular, lo que resulta en una variedad de tipos estructurales de XyG (Zavyalov y col., 2019; Esquena-Moret, 2022).

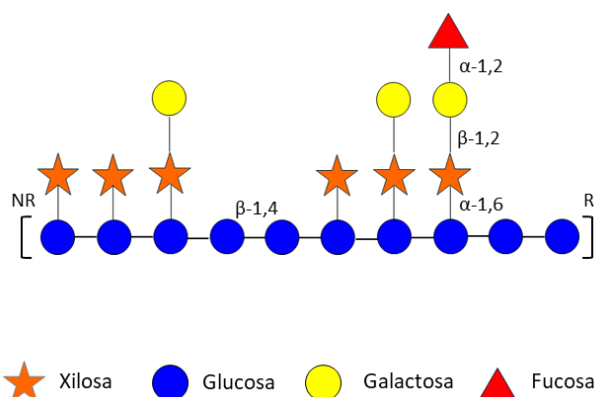


Figura I5: Esquema representativo del xiloglucano presente en la pared celular vegetal. NR: extremo no reductor. R: extremo reductor. Convención de representación de monosacáridos adaptada de *Symbol Nomenclature for Glycans* (SNFG).

1. 2. c. Mananos y gluco-mananos

Los mananos (MN) son los principales componentes de la fracción de hemicelulosa en las maderas blandas y muestran una amplia distribución en los tejidos vegetales. Según su composición, los MN se pueden clasificar en cuatro categorías de polisacáridos: homomanano o manano lineal (MN), gluco-manano (Glc-MN), galacto-manano (Gal-MN) y galacto-gluco-manano (Gal-Glc-MN). Cada uno de estos polisacáridos presenta una cadena principal con enlaces β -1,4 que contiene manosa o una combinación de residuos de glucosa y manosa. Además, la cadena principal de manano puede presentar cadenas laterales con residuos de galactosa en enlaces α -1,6 (Figura I6) (Moreira y Filho, 2008; Voiniciuc, 2022).

Los Gal-MN se encuentran principalmente en las semillas de leguminosas y se localizan en la parte endospermica de las semillas, mientras que los Glc-MN son polisacáridos presentes en grandes cantidades en la fracción de hemicelulosa de maderas blandas y los Gal-Glc-MN se encuentran en la hemicelulosa de la madera de gimnospermas (Moreira y Filho, 2008).

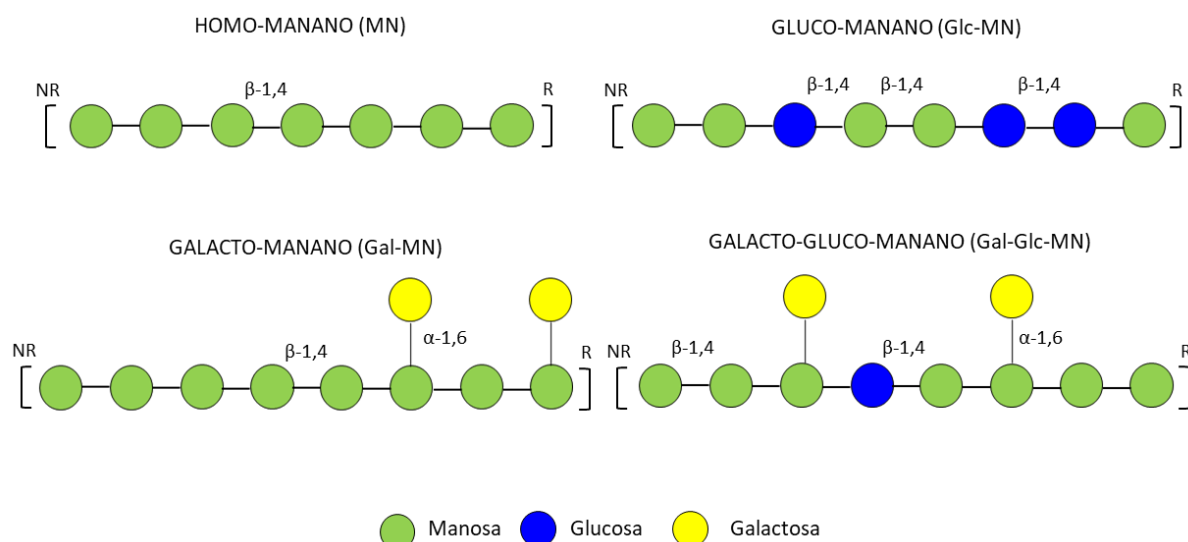


Figura I6: Esquemas representativos de los distintos tipos de mananos y gluco-mananos presentes en la pared celular vegetal. NR: extremo no reductor. R: extremo reductor. Convención de representación monosacáridos adaptada de *Symbol Nomenclature for Glycans* (SNFG).

1. 2. d. β -glucanos mixtos

Los β -glucanos (β G) son polisacáridos no amiláceos presentes de forma natural en las paredes celulares de diversos organismos, incluyendo plantas (cereales), bacterias, levaduras y hongos (Jan y col., 2021; Lante y col., 2023). En plantas el β G de las PCP juega un papel en la expansión celular y la cantidad depende en gran medida de la etapa de crecimiento. Este tipo de polisacárido no se ha encontrado en plantas dicotiledóneas, pero si se encuentra presente en todas las gramíneas (plantas monocotiledóneas) (Scheller y Ulvskov, 2010).

Los β G se componen principalmente de una cadena lineal formada por unidades de D-glucosa unidas por enlaces α -1,3. En los cereales los β G están formados por segmentos largos de unidades de glucosas consecutivas unidas por enlaces β -1,4 separadas por un único enlace glucosídico β -1,3 (Figura I7A). En el caso de las levaduras y los hongos la cadena principal del β G contiene ramificaciones laterales en β -1,6 (Figura I7B) (Caseiro y col., 2022; Lante y col., 2023). Además, el contenido total de β G en microorganismos (levaduras, bacterias y algas) es menor en comparación con los niveles encontrados en los cereales (Choi y Kim, 2023).

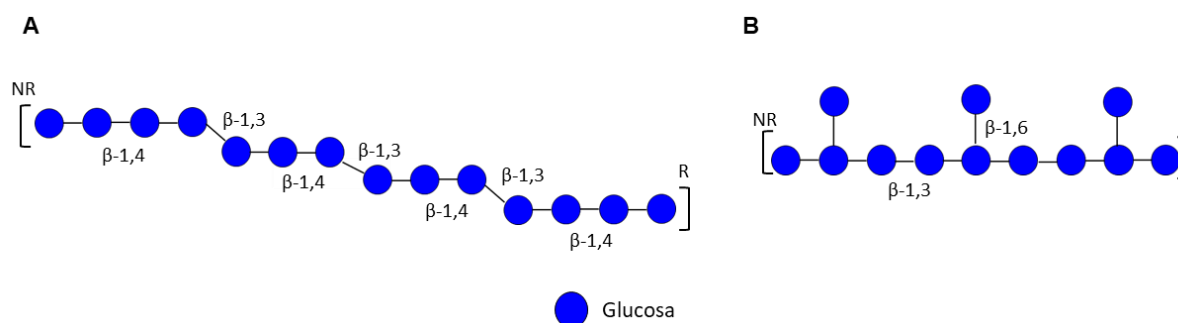


Figura 17: Esquemas representativos de β-glucanos de enlaces mixtos presentes en la pared celular vegetal. A) Estructura de β-glucano típico de cereales, enlaces mixtos β-1,3 y β-1,4. **B)** Estructura de β-glucano típico de hongos, enlaces mixtos β-1,3 y β-1,6. NR: extremo no reductor. R: extremo reductor. Convención de representación monosacáridos adaptada de *Symbol Nomenclature for Glycans* (SNFG).

1. 3. Lignina

La lignina es una de las mayores barreras para la degradación química y biológica de la biomasa vegetal. Se la encuentra principalmente en la lámina media y en la PCS (Martínez y col., 2005; Den y col., 2018). A diferencia de la celulosa y las hemicelulosas, no es un polisacárido, sino que es un polímero aromático heterogéneo, amorfo y reticulado que está unido de manera covalente a grupos laterales de diferentes hemicelulosas, formando una matriz compleja que rodea a las microfibrillas de celulosa. La existencia de fuertes enlaces carbono-carbono (C-C) y éter (C-O-C) en la lignina proporciona fuerza a la pared celular de la planta y la protege contra factores bióticos y abióticos (Saini y col., 2015).

La lignina constituye entre el 16-25% y el 23-35% del peso seco de las maderas duras y blandas, respectivamente. También se encuentra en gramíneas en menor proporción (Brebú y Vasile, 2010; Den y col., 2018). Su estructura se basa en la polimerización de tres alcoholes fenilpropílicos aromáticos: cumarílico, coniferílico y sinapílico (Figura 18) (Taiz y col., 2014; Putro y col., 2016).

Los cereales contienen los tres monómeros estructurales, mientras que las maderas blandas contienen principalmente coniferil alcohol y las duras tanto coniferil como sinapil alcohol (Upton y Kasko, 2016).

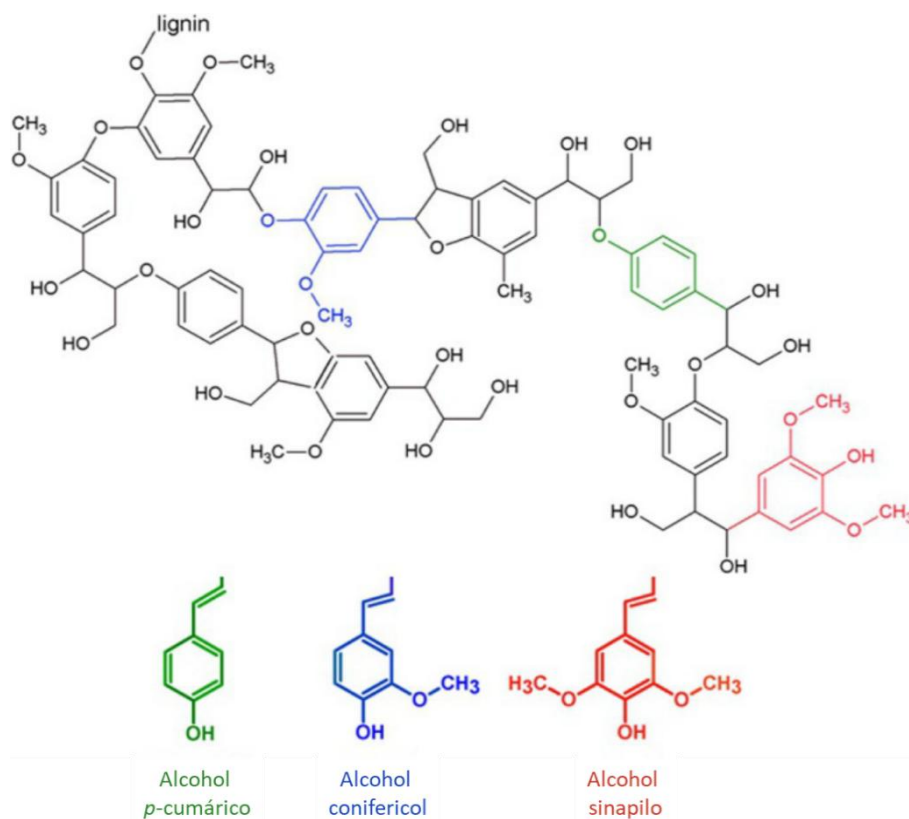


Figura 18: Representación esquemática de la estructura macromolecular de la lignina y sus principales monolignoles. Figura adaptada de Serrano y col. (2019).

2. Metodologías de pre-tratamiento e hidrólisis de biomasa lignocelulósica

A partir de los componentes de la BLC, se puede producir una gran diversidad de compuestos. Estos compuestos se pueden obtener a partir de los polisacáridos estructurales o de almacenamiento, como el almidón, de la biomasa vegetal, así como de la lignina (Figura 19). La conversión de los polisacáridos que conforman las paredes celulares vegetales, celulosa y hemicelulosa, en oligosacáridos cortos y azúcares monoméricos fermentables (glucosa y xilosa), es particularmente desafiante debido a la naturaleza recalcitrante de la BLC. Por ello, para la mayor parte de los procesos de biorrefinería, generalmente es necesario en primera instancia una adecuación física (molienda y tamizaje) y luego un pre-tratamiento para delignificar y abrir la fibra haciendo más disponible el acceso a los polisacáridos (Mankar y col., 2021). Los objetivos del pre-tratamiento incluyen (1) la producción de sólidos altamente digeribles que mejoren los rendimientos de sacarificación, (2) evitar la degradación de los azúcares simples (pentosas y hexosas) incluidos los derivados de la hemicelulosa, (3) minimizar la formación de inhibidores para las etapas de fermentación posteriores, (4) maximizar la recuperación de lignina para su conversión a coproductos valiosos y (5) mantener la rentabilidad operando en reactores de tamaño moderado y minimizando los requisitos de calor y energía (Brodeur y col., 2011).

Los métodos de pre-tratamiento se desarrollaron para la industria de los biocombustibles. Se clasifican en físicos, químicos, fisicoquímicos y biológicos, o una combinación de ellos. Los métodos físicos se emplean generalmente para reducir el tamaño de la partícula de la biomasa, empleando herramientas y técnicas mecánicas como molinos, trituradoras o tornillos. Uno de los pre-tratamientos físicos es la molienda con molinillo de borlas, entre sus principales ventajas están (1) la reducción de la cristalinidad de la celulosa, (2) el mejoramiento de la superficie disponible para la posterior hidrólisis enzimática, (3) la reducción del grado de polimerización de la celulosa y (4) el mejoramiento de la transferencia de masa debido a la reducción del tamaño de las partículas (Zakaria y col., 2014; Mankar y col., 2021). Las principales desventajas de las técnicas de molienda es el elevado consumo energético y la no eliminación de la lignina durante el proceso (Mankar y col., 2021). Otro pre-tratamiento de elección para biomasa no leñosas es la extrusión en el cual se emplean tornillos extrusores simples o múltiples dentro de un cilindro. Estos tornillos giran generando altas fuerzas de cizallamiento entre el tornillo, la biomasa y el cilindro generando alta presión y temperatura (Duque y col., 2017). La elevada presión y temperatura durante el proceso es lo que modifica la estructura física y química de la biomasa aumentando la superficie y, por lo tanto, mejorando la accesibilidad de las enzimas para facilitar la hidrólisis posterior (Kumar y col., 2020). La extrusión puede combinarse con otros métodos para aumentar la eficiencia (Zheng y col., 2014).

Los pre-tratamientos químicos consisten en tratar la BLC con soluciones alcalinas o ácidas a una temperatura específica durante un tiempo determinado. El pre-tratamiento alcalino consiste en el uso de bases, como hidróxido de sodio, potasio, calcio y amonio. El uso de un álcali provoca la degradación de las cadenas laterales éster y glicosídicas alterando la estructura de la lignina aumentando la accesibilidad e las enzimas a la celulosa y la hemicelulosa (Brodeur y col., 2011; Mankar y col., 2021). Antes de la hidrólisis enzimática, se requiere una etapa de neutralización para eliminar la lignina y los inhibidores (sales, ácidos fenólicos, furfural y aldehídos) (Kumar y col., 2020).

Por otro lado, el pre-tratamiento biológico es un proceso comparativamente más lento y difícil de controlar que implica el uso de microorganismos como bacterias y hongos para degradar parte de la lignocelulosa. Actualmente, los esfuerzos en pretratamientos biológicos se centran en combinar esta tecnología con otros pretratamientos y en desarrollar nuevos microorganismos para una hidrólisis rápida (Brodeur y col., 2011; Sharma y col., 2019).

La hidrólisis de los polisacáridos de la BLC pre-tratada se puede llevar a cabo mediante el uso de métodos fisicoquímicos exhaustivos (altas temperaturas, combinadas con pH extremos) o tratamientos enzimáticos. Esta etapa también constituye un cuello de botella debido a la complejidad estructural de las fibras vegetales y la elevada variabilidad de su composición, determinada por factores como la

especie vegetal, el órgano, la edad y el estadio de crecimiento de la planta (Bajpai, 2014), lo que hace necesario optimizar las condiciones del proceso de hidrólisis para cada tipo específico de biomasa. En este sentido, la hidrólisis enzimática presenta diversas ventajas sobre la fisicoquímica, ya que puede ser específica para los distintos polisacáridos y los enlaces que estos presentan, optimizando la obtención de los distintos bioproductos y utilizando, además, condiciones más amigables con el medio ambiente.

Finalmente, la eficiencia en la recuperación de los productos obtenidos depende en gran medida del rendimiento de conversión alcanzado en las etapas iniciales, determinando en última instancia el costo-efectividad del proceso. En este contexto, resulta esencial el desarrollo de estrategias que superen las barreras técnicas y económicas asociadas a la valorización de la BLC, priorizando la reducción de pasos de procesamiento, el aumento de los rendimientos de deconstrucción de los polisacáridos, la disminución del consumo energético y la reducción de costos, con el fin de promover procesos más sustentables (Sadula y col., 2017).

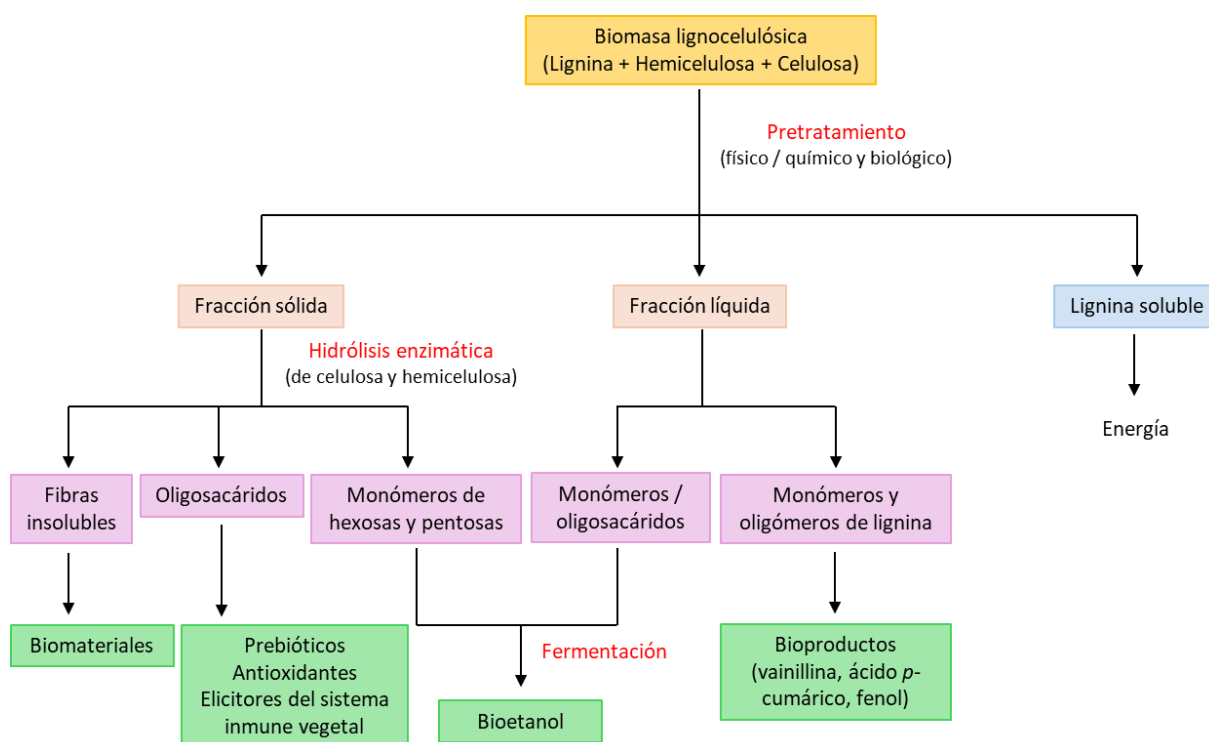


Figura I9: Procesamiento de la biomasa lignocelulósica en el marco de bio-refinerías. Principales etapas comprendidas en el proceso de obtención de bioproductos y bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica (BLC) (esquema adaptado de Soni y col., 2018).

Dentro de estas estrategias, la hidrólisis enzimática se presenta como una alternativa promisoriosa y ampliamente estudiada en la actualidad. En este contexto, el aprovechamiento integral de la BLC mediante procesos biotecnológicos requiere del desarrollo de formulaciones enzimáticas adaptadas a

las materias primas locales, lo cual resulta clave para consolidar una bioeconomía circular y sostenible en la región.

3. Enzimas lignocelulolíticas

Los estudios sobre enzimas lignocelulolíticas resultan fundamentales, ya que constituyen herramientas clave para llevar a cabo una hidrólisis sostenible que genere productos bien definidos y de valor agregado a partir de BLC. Entre los organismos biológicos productores de enzimas lignocelulolíticas con mayor potencial se encuentran bacterias y hongos, reconocidos por su capacidad para descomponer polímeros. Dentro del repertorio enzimático, las lacasas y peroxidasas destacan por su acción sobre la lignina, mientras que las celulasas y hemicelulasas, dirigidas a los polisacáridos, han sido las más investigadas. En particular, las enzimas de origen fúngico han recibido mayor atención, aunque las bacterianas están siendo exploradas con creciente interés en los últimos años debido a su versatilidad (Chukwuma y col., 2021).

La clasificación de las enzimas que actúan sobre hidratos de carbono se vio fuertemente facilitada desde su unificación en la base de datos CAZy (por sus siglas en inglés *Carbohydrate Active Enzymes*), que las agrupa en familias según su secuencia aminoacídica y estructura tridimensional, por lo cual se las conoce genéricamente como CAZimas.

Las CAZimas son clasificadas en glicosil hidrolasas (GHs), glicosil transferasas (GTs), polisacárido liasas (PLs), carbohidrato esterasas (CEs) y enzimas con actividades auxiliares (AAs), según su actividad (Lombard y col., 2014). Todos los miembros de una familia comparten la misma base de plegamiento y utilizan el mismo mecanismo catalítico, pero, sin embargo, su especificidad de sustrato o actividad enzimática puede diferir ya que muchas familias son "poliespecíficas", es decir, abarcan miembros con perfiles de actividad distintos. Por lo tanto, se ha demostrado que la división adicional en subfamilias es beneficiosa para clarificar funciones (Wilson y col., 2009; Grondin y col., 2017).

Estas enzimas pueden encontrarse como proteínas unimodulares, compuestas por un único dominio catalítico (CD, por *catalytic domain*), o como proteínas multimodulares, en las cuales el CD se encuentra unido a uno o más dominios de unión a carbohidratos (CBMs por *Carbohydrate Binding Module*) y/o a otro CD, o módulos de función desconocida (DUFs por *Domain of Unknown Function*). Los distintos dominios suelen encontrarse unidos por una secuencia conectora (*linker*) que no posee una estructura definida (Shoseyov y col., 2006). También hay proteínas que están formadas sólo por CBMs, en las cuales no se ha encontrado un módulo catalítico asociado.

La funcionalidad principal de los CBMs es facilitar la unión de las proteínas a los carbohidratos, promoviendo una interacción prolongada entre el CD de la enzima y sustratos recalcitrantes. Se ha descrito también que los CBMs pueden actuar desarmando la estructura del sustrato (Shoseyov y col., 2006). La presencia de un CBM en una proteína también puede influir en su estabilidad térmica, con efectos tanto positivos como negativos (Meng y col., 2015; Teo y col., 2019). Asimismo, aunque se ha demostrado que la incorporación de un CBM puede incrementar la eficiencia catalítica (Shoseyov y col., 2006; Cuskin y col., 2012), existen evidencias de que, en determinadas condiciones, puede reducirla debido al “anclaje” o retención de la proteína en sitios subóptimos de la superficie del sustrato (Nakamura y col., 2013).

La base de datos CAZy se actualiza constantemente y en la actualidad agrupa a 194 familias de GHs, 139 familias de GTs, 44 familias de PLs, 21 familias CEs, 18 familias AAs y 107 familias de CBMs no catalíticos asociados (último acceso 15 de diciembre del 2025). Sin embargo, los números de enzimas caracterizadas bioquímicamente y de actividad confirmada son mucho menores, con familias en las cuales incluso hay una sola enzima caracterizada.

Las enzimas caracterizadas a nivel bioquímico y funcional se clasifican a su vez de acuerdo con su mecanismo de reacción y la especificidad de sustrato en un sistema de nomenclatura universal asignado por la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB, <https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/>) (Wilkins y col., 2017), que se define como número EC (*Enzyme Commission*). Dado que esta nomenclatura se basa en las reacciones químicas que catalizan, dos enzimas distintas con la misma actividad reciben el mismo número EC. Asimismo, una misma enzima puede poseer múltiples números EC, si se ha demostrado que presenta diversas actividades bioquímicas (Webb, 1992).

El número EC consta de las letras “EC” seguidas de cuatro dígitos separados por puntos, por ejemplo, EC 1.1.1.1. El primer, segundo y tercer dígito se denominan clase, subclase y sub-subclase, respectivamente. El sistema de numeración cuenta con seis clases: oxidorreductasa (EC 1), transferasa (EC 2), hidrolasa (EC 3), liasa (EC 4), isomerasa (EC 5) y ligasa (EC 6). La subclase y la sub-subclase especifican el tipo de reacción enzimática y sus requerimientos de sustrato, respectivamente (Matsuta y col., 2013). En las hidrolasas, el segundo número indica la naturaleza del enlace hidrolizado, y el tercero normalmente especifica la naturaleza del sustrato. En particular, las GHs, que catalizan la hidrólisis de enlaces glicosídicos tanto entre dos o más carbohidratos como entre un carbohidrato y una molécula no carbohidratada, se clasifican en aquellas que hidrolizan compuestos *O*- y *S*-glicosilados (EC 3.2.1.-) y las *N*-glicosidasas (EC 3.2.2.-). El último número brinda información sobre la especificidad

de sustrato (McDonald y col., 2015; Li y col., 2021). Por ejemplo, las GHs que actúan hidrolizando el xilano se las conoce como endo-xilanasas EC 3.2.1.8 (Nargotra y col., 2022).

Las GHs catalizan la ruptura de enlaces glicosídicos mediante mecanismos que conllevan la retención o la inversión de la configuración del carbono anomérico. Ambos procesos requieren la participación de dos aminoácidos en el sitio catalítico: un residuo ácido, que actúa como donante de protones, y un residuo básico o nucleofílico, comúnmente un glutamato y un aspartato, respectivamente (Gutiérrez-Rojas y col., 2015). En el mecanismo de inversión, el residuo ácido protona el oxígeno glicosídico, mientras que una molécula de agua activada por el residuo básico ataca nucleofílicamente al carbono anomérico. En contraste, el mecanismo de retención ocurre en dos etapas: primero, el residuo ácido protona el oxígeno glicosídico mientras el residuo nucleofílico ataca al carbono anomérico, formando un intermediario covalente. Luego, el mismo residuo ácido actúa como base y activa una molécula de agua que hidroliza dicho intermediario (Lagaert y col., 2014). En algunos casos, también se ha identificado un tercer residuo catalítico, generalmente un aspartato, cuya función es estabilizar la conformación y el estado de protonación adecuado del residuo ácido implicado en la catálisis.

Es importante destacar también la convención de la denominación del sitio de corte en el carbohidrato y los subsitios en el sitio activo de las enzimas. En el sitio activo de las GHs cada unidad de azúcar se une a un subdominio. Según la nomenclatura los subdominios a cada lado del punto de escisión se denominan -1 y +1, hacia el extremo no reductor y reductor del carbohidrato respectivamente, y el número aumenta en una unidad por cada subdominio que se aleja del sitio de corte. Se denominadas con el signo positivo (+) seguido de números (+1, +2, +3), los residuos o subdominios hacia el extremo reductor del sustrato o aglicona, y con el símbolo negativo (-) seguido de números (-1, -2, -3) si se encuentran hacia el extremo no reductor o glicona (Aronsson y col., 2018).

3. 1. Glicosil hidrolasas activas sobre celulosa

Las celulasas son un grupo de enzimas que hidrolizan los enlaces glicosídicos β -1,4 en la celulosa para producir glucosa, celobiosa y celo-oligosacáridos (COS) como productos principales. Las celulasas se clasifican según su mecanismo de acción catalítica e incluyen endo-glucanasas, exo-glucanasas o celobiohidrolasas (CBH) y β -glucosidasas (Houfani y col., 2020). Estas enzimas trabajan en conjunto de forma simultánea y sinérgica para hidrolizar la celulosa en dos etapas. En un primer paso la celulosa es degradada por endo- y exo-glucanasas, liberando principalmente COS y celobiosa. Eso es seguido por una segunda etapa donde las β -glucosidasas escinden glucosa a partir de los productos obtenidos en la primera etapa (Nargotra y col., 2022). Además, existen enzimas con actividades “auxiliares”, como las monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMOs) (Figura I10).

Por un lado, las endo-glucanasas (EC 3.2.1.4), también conocidas como endo-1,4- β -D-glucano glucano-hidrolasas, inician la degradación enzimática de la celulosa para reducir su grado de polimerización. Actúan aleatoriamente sobre los enlaces glucosídicos β -1,4 en las áreas amorfas internas de las cadenas de celulosa para producir COS (Nargotra y col., 2022). Con la inversión y la retención del modo de acción catalítico en función de la distancia entre dos grupos carboxílicos, las endo-glucanasas se distribuyen entre 13 familias de GHs, incluyendo GH5, GH9, GH12, GH16, GH17, GH26, GH44, GH45, GH48, GH51, GH74, GH124 y GH148 (Gavande y Goyal, 2023).

Por otro lado, las exo-glucanasas o celobiohidrolasas (CBH) incluyen CBHI, EC 3.2.1.176, clasificadas únicamente en las familias GH7 y GH48, y CBHII, EC 3.2.1.91, pertenecientes a las familias GH6 y GH5, que actúan en los extremos reductor y no reductor de la cadena de celulosa, respectivamente, para producir principalmente celobiosa. Estas enzimas actúan sobre los extremos nuevos producidos por las endo-glucanasas y, a diferencia de estas últimas, las CBH también pueden actuar sobre regiones cristalinas de la celulosa (Jayasekara y Ratnayake, 2019; Nargotra y col., 2022).

Por último, las β -D-glucosidasa (BGL) (EC. 3.2.1.21) llevan a cabo la reacción final de la hidrólisis de la celulosa. Se encargan de hidrolizar la celobiosa y los COS liberados por la acción de las endo- y exo-glucanasas liberando monómeros de glucosa. Las BGL se han agrupado en las familias GH1, GH3, GH5, GH9 y GH30 (Yao y col., 2016; Nargotra y col., 2022).

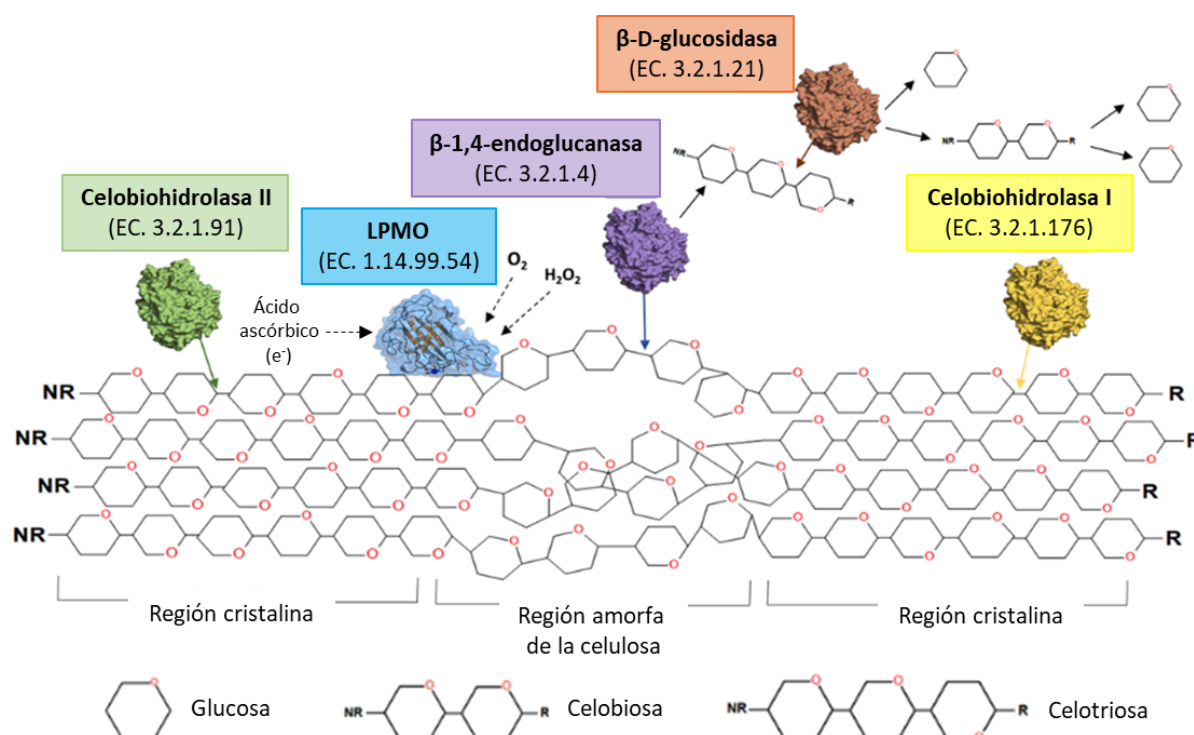


Figura I10: Enzimas con actividad sobre celulosa. NR: extremo no reductor. R: extremo reductor. Figura adaptada de Andlar y col. (2018).

3. 2. Glicosil hidrolasas activas sobre hemicelulosa

La hidrólisis de la hemicelulosa demanda la acción conjunta de diversos tipos de enzimas que actúan a distintos niveles de la matriz del polisacárido. Esta actividad sinérgica es necesaria no solo debido a la naturaleza heteropolimérica compleja de la hemicelulosa, sino también por su conexión con otros componentes de la pared celular vegetal (Andlar y col., 2018). Se suelen distinguir entre aquellas enzimas que actúan sobre la cadena principal y las que actúan removiendo las sustituciones y ramificaciones.

En el caso del xilano (Figura I11), las enzimas que actúan sobre la cadena principal son las β -1,4-endo-xilanasas (EC 3.2.1.8) rompiendo los enlaces glucosídicos β -1,4 entre las moléculas de xilosa generando xilobiosa, xilo-oligosacáridos (XOS) y, en algunos casos, xilosa (Nargotra y col., 2022). A su vez, las β -1,3-endo-xilanasas (EC 3.2.1.32) hidrolizan los xilanos que poseen enlaces β -1,3 y β -1,4, abundantes en algas pardas (Nargotra y col., 2022). Si bien actúan al azar sobre los enlaces internos del xilano, distintas xilanasas difieren en su especificidad hacia el polímero, ya que algunas actúan sobre la cadena en regiones sin sustituciones, mientras que otras pueden hacerlo en presencia de cadenas laterales próximas a los sitios de corte (Javier y col., 2007).

En la actualidad las xilanasas se encuentran clasificadas en varias familias de GHs, difiriendo tanto en su modo de acción como en su preferencia por ciertos tipos de xilanos según la naturaleza de las decoraciones laterales. La mayoría de las endo-xilanasas pertenecen a las familias GH10, GH11 y GH30, aunque también se han descripto en las familias GH5 (subfamilias 2, 4, 11, 20-22, 24, 25, 30, 32, 33, 35, 38, 42, 49-51, 54, 56), GH8, GH43 (subfamilias 7, 13, 15-17, 25, 28, 35, 36, 38-40), GH51 (subfamilias 3-14), GH98 y GH141 (Andlar y col., 2018; Houfani y col., 2020; Puchart y col., 2021; Mendonça y col., 2023).

Las familias GH10 y GH11 son las más estudiadas, con 424 y 312 enzimas caracterizadas hasta la fecha respectivamente, según la base de datos CAZy (último acceso 15 de diciembre del 2025). Las xilanasas de estas familias, en general, degradan todos los tipos de xilanos, si bien tienen diferente tolerancia a las sustituciones en regiones cercanas al sitio de corte (Labourel y col., 2016). La familia GH10 está compuesta mayoritariamente por β -1,4-endo-xilanasas, algunas de ellas con actividad sobre xilanos con enlaces β -1,3, o mixtos (β -1,3/ β -1,4) (Teune y col., 2025), o incluso sobre otros polisacáridos, como celulosa. Además, estas enzimas presentan actividad sobre XOS cortos (Pollet y col., 2010). Por el contrario, la familia GH11 está compuesta únicamente por β -1,4-endo-xilanasas y presentan menor versatilidad catalítica que la familia GH10 (Chakdar y col., 2016). A diferencia de la familia GH10, que son capaces de escindir la cadena principal del xilano si existen dos residuos de xilosa consecutivos sin

decorar, las endo-xilanasas de la familia GH11 requieren al menos tres xilosas consecutivas libres para actuar sobre el polisacárido (Briganti y col., 2021). En este sentido, las endo-xilanasas GH10 tendrán potencialmente mayor número de sitios de escisión disponibles y, por lo tanto, deberían ser capaces de generar productos de hidrólisis más cortos.

Las xilanasas de la familia GH30, descritas más recientemente, han despertado un notable interés. En un inicio se las identificó principalmente como glucurono-xilanasas específicas (EC 3.2.1.136), es decir, que requieren la sustitución de (Me)GlcA en la posición -2 para cortar la cadena de xilano. Por lo tanto, las xilanasas de esta familia producen XOS más largos que las GH10 o GH11, y los productos de hidrólisis tienen sustituciones de (Me)GlcA, por lo cual son considerados XOS ácidos o glucurono-xilo-oligosacáridos (UXOS) (Bhardwaj y col., 2019). Más recientemente se definieron subfamilias dentro de la familia GH30, lo cual está relacionado también a una mayor diversidad de actividades, incluyendo enzimas que pueden liberar xilosa del extremo reductor y otras que liberan xilobiosa del extremo no reductor (Puchart y col., 2021).

Las exo-xilanasas son enzimas que aún no han recibido mucha atención, también actúan sobre la cadena principal de xilano, pero desde el extremo reductor (modo exo) produciendo XOS cortos (EC no asignado) o hidrolizando XOS con un grado de polimerización $\geq 2-3$ para liberar xilosa (EC 3.2.1.156). Según la base de datos CAZy, las enzimas descritas con esta actividad hasta el momento pertenecen a la familia GH8 (Juturu y Wu, 2014; Mendonça y col., 2023). Además, se han descubierto recientemente xilobio-hidrolasas de la familia GH11 exo-activas que actúan desde el extremo no reductor de la cadena principal del xilano liberando xilobiosa como principal producto de hidrólisis (Mello y col., 2017; Kadowaki y col., 2021).

Por otro lado, β -D-xilosidasas (EC 3.2.1.37) actúan sobre la unión β -1,4 de la xilobiosa y los XOS producidos por la hidrólisis del xilano por las endo-xilanasas, generalmente desde el extremo no reductor, liberando xilosa completando así la degradación (Figura I11) (Couturier y Berrin, 2013). Son mayormente activas sobre xilobiosa, mientras que la actividad sobre los XOS está inversamente relacionada con el grado de polimerización (Nargotra y col., 2022). Esta actividad enzimática ha sido detectada en numerosas familias de GHs, incluyendo GH1, GH3, GH5, GH30, GH39, GH43, GH51, GH52, GH54, GH116 y GH120, siendo las GH43 las más estudiadas (Houfani y col., 2020; Li y col., 2023).

Las β -xilosidasas pueden ser extra o intracelulares dependiendo del microorganismo productor. Por ejemplo, casi todas las bacterias y levaduras producen β -xilosidasas intracelulares que se encuentran de forma soluble en el citosol. En estos microorganismos, los XOS deben ingresar a la célula antes de

ser hidrolizados a monosacáridos. Por el contrario, las enzimas fúngicas de este tipo permanecen asociadas al micelio en un inicio y luego son liberadas al medio extracelular (Knob y col., 2010).

Además, existen múltiples enzimas accesorias con actividades que actúan sobre las cadenas laterales, responsables de la remoción de sustituciones, lo cual es clave para la degradación completa, permitiendo un mejor acceso de las endo-xilanasas y β -xilosidasas al sustrato (Bajpai, 2014; Østby y col., 2020; Malgas y col., 2021). Dentro de las enzimas que actúan sobre las sustituciones, pueden encontrarse enzimas con actividad α -L-arabinofuranosidasa (EC. 3.2.1.55) y α -D-glucuronidasas (EC 3.2.1.131/EC 3.2.1.139), que remueven sustituciones de arabinosa y ácido glucurónico, respectivamente (Figura I11).

Las enzimas con actividad α -L-arabinofuranosidasa (Abfs) catalizan la ruptura del enlace glucosídico entre las sustituciones de arabinosa y los residuos de xilosa de la cadena principal. Estos enlaces pueden ser de tipo α -1,2 o α -1,3 y pueden ocurrir como sustituciones simples o dobles, es decir, con uno o dos residuos de arabinosa unidos a una misma molécula de xilosa, respectivamente. De acuerdo a la especificidad del sustrato, las Abfs han sido clasificadas en tres tipos: las Abfs de tipo A (AbfA) son solo activas en sustratos pequeños, por ejemplo, *p*-nitrofenil- α -L-arabinofuranosa (*p*NP-A) y arabinoxilo-oligosacáridos (AXOS), mientras que las Abfs de tipo B (AbfB) tienen actividades equivalentes tanto en sustratos pequeños como en sustratos poliméricos (por ejemplo, AX o arabinano sustituido), finalmente las Abfs de tipo C (AbfC) son específicas para AX y se conocen como AX- α -L-arabinofuranohidrolasas (AXHs) (Wilkens y col., 2017; Poria y col., 2020). En la base de datos CAZy, las Abfs se distribuyen en actualmente en siete familias de GHs, incluyendo GH2, GH3, GH43, GH51, GH54, GH62 y la recientemente incluida y menos estudiada, GH159 (Long y col., 2024).

Por su parte, las enzimas α -D-glucuronidasa catalizan la escisión del ácido 4-O-metil-D-glucurónico (MeGlcA) de las cadenas laterales del GX y/o de UXOS y se encuentran clasificadas dentro de las familias GH4, GH67 y GH115. Las enzimas pertenecientes a las familias GH4 y GH67 escinden principalmente los enlaces glucosídicos en los extremos no reductores de los UXOS (EC 3.2.1.139), mientras que las enzimas GH115 eliminan residuos de ácido glucurónico tanto de las regiones terminales como internas de UXOS y GX (EC 3.2.1.131) (Houfani y col., 2020; Ward, 2021). En ambos casos, la catálisis se lleva a cabo mediante un mecanismo de inversión de la configuración del carbono anomérico. Las enzimas que actúan preferentemente sobre los UXOS generalmente son intracelulares o están asociadas a la membrana celular, mientras que aquellas con actividad sobre el polímero GX son enzimas extracelulares (Nurizzo y col., 2002).

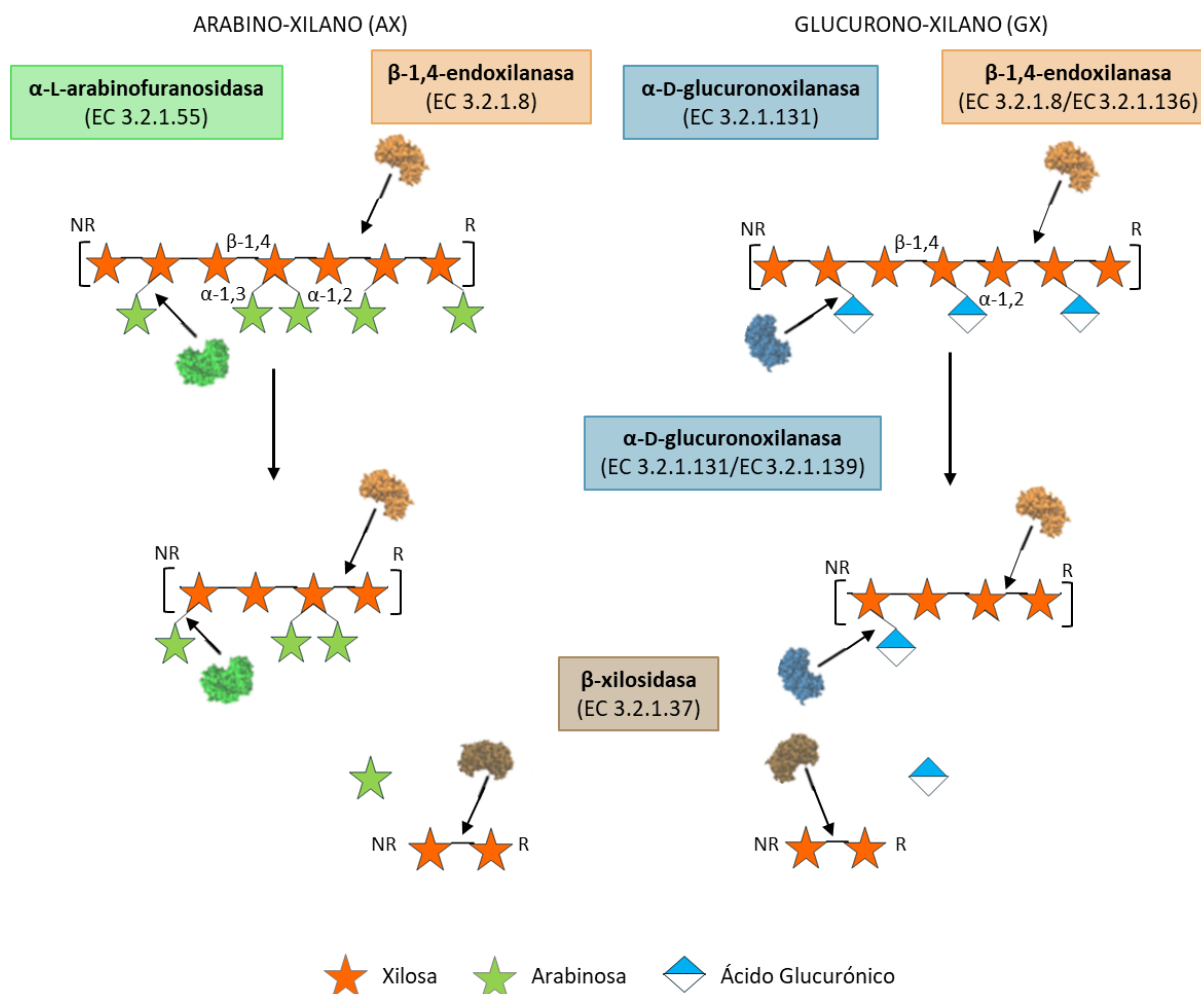


Figura I11: Esquema representativo de la degradación enzimática de arabino-xilano (izquierda) y glucurono-xilano (derecha). NR: extremo no reductor. R: extremo reductor.

3. 3. Monooxigenasas Líticas de Polisacáridos

Las monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMOs) son oxido-reductasas que contienen un átomo de cobre en su sitio activo y actúan de manera sinérgica con diversas GHs. A diferencia de las hidrolasas clásicas, las LPMOs actúan directamente sobre superficies cristalinas, facilitando la accesibilidad de los polisacáridos a otras enzimas degradativas. En la actualidad se clasifican como una familia de enzimas de actividad auxiliar (AA), que incluye enzimas fúngicas (AA9, AA11, AA13, AA14, AA16, AA17), enzimas bacterianas (AA10) y enzimas de artrópodos y oomicetos (AA15) (Sabbadin y col., 2018; Nargotra y col., 2022). En particular, las LPMOs de la familia AA9, predominantes en hongos, actúan principalmente sobre celulosa y otros β -glucanos. La familia AA10, presente en bacterias, muestran actividad sobre quitina (EC 1.14.99.53) y celulosa (EC 1.14.99.54 / EC 1.14.99.56), mientras que las AA11 se asocian a la degradación de quitina y las AA13 se dirigen a almidones (EC 1.14.99.55). Por su parte, las AA14 actúan sobre ensamblajes copoliméricos de celulosa y xilano y las más recientes AA15, halladas en

artrópodos y algas, se vinculan a funciones biológicas adicionales como la digestión o el desarrollo (Forsberg y col., 2019).

4. Microorganismos degradadores de la biomasa vegetal

Los microorganismos están dispersos en los hábitats más diversos y extremos de la tierra. En particular, los microorganismos capaces de adquirir nutrientes a partir de los polímeros que componen la pared celular vegetal han desarrollado mecanismos muy eficientes para hidrolizar esta estructura compleja y recalcitrante. La saprotrofia, es decir la dependencia de alimentarse de materia orgánica muerta o en decaimiento, es una de las formas de vida más comunes en microorganismos e involucra la capacidad de producir y secretar enzimas lignocelulolíticas, como celulasas y hemicelulasas. Existe una gran variedad de estas enzimas que presentan distintas actividades sobre la pared celular vegetal y que se complementan para liberar los oligosacáridos y monómeros de azúcares de los polímeros estructurales. Estos productos pueden ser luego internalizados y utilizados en las vías metabólicas de los microorganismos. Por esto se consideran fuentes de enzimas lignocelulolíticas excepcionalmente diversas y multifuncionales (Thapa y col., 2020).

La capacidad de degradar polisacáridos vegetales se distribuye principalmente entre hongos y bacterias y la maquinaria enzimática que utilizan difiere entre los distintos microorganismos, especialmente en cuanto a su organización macromolecular. En algunos casos, mayormente en organismos anaeróbicos, el aparato enzimático compuesto por celulasas/hemicelulasas se encuentra ensamblado en un complejo multienzimático (celulosomas y xilanosomas) que puede encontrarse anclado en la superficie celular o ser secretado al medio extracelular. En cambio, en la mayoría de los organismos aeróbicos, las enzimas individuales que actúan sobre los polisacáridos son secretadas hacia el espacio extracelular (Chukwuma y col., 2021).

Los hongos, en particular, han sido objeto de intensa investigación debido a su capacidad para liberar una amplia gama de enzimas en el medio extracelular, lo que facilita su aplicación industrial, algunos de los géneros más estudiados dentro de los mayores productores industriales de estas enzimas incluyen *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Rhizopus*. Por otro lado, debido a su capacidad para adaptarse a cambios de pH y temperatura, una mayor flexibilidad en la demanda de oxígeno y su potencial uso en ingeniería genética, las bacterias también son fuente importante para la producción de lignocelulasas. La gran mayoría de estas bacterias se reportan en géneros como *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Acinetobacter*, *Clostridium*, *Pseudomonas* y *Cellulomonas* (Chukwuma y col., 2021; Benatti y Polizeli, 2023).

En la siguiente sección se describen las características de las bacterias objeto de estudio en este trabajo de Tesis: *Cellulomonas* sp. B6 y *Paenibacillus xylanivorans* A59.

4. 1. *Cellulomonas* sp. B6

El género *Cellulomonas*, perteneciente al filo Actinobacteria, está compuesto por bacterias Gram positivas que desempeñan un papel crucial en la degradación de las paredes celulares de las plantas (Zverlov y Schwarz, 2008). Las especies de este género se encuentran comúnmente en ambientes enriquecidos en celulosa, tales como suelos y cortezas de árboles. Asimismo, la identificación de nuevos aislamientos en diversos hábitats celulolíticos, reportada por estudios metagenómicos y de prospección recientes, pone de manifiesto la relevancia de este género en la degradación de polisacáridos estructurales de la biomasa vegetal (Elberson y col., 2000; Rusznyak y col., 2011; Hatayama y col., 2013; Zhang y col., 2013). Entre las especies más estudiadas y consideradas de referencia dentro del género se destacan *Cellulomonas fimi* y *Cellulomonas flavigena* (Wakarchuk y col., 2016).

En investigaciones anteriores llevadas a cabo en el Laboratorio de Enzimas Agroindustriales (EAB), IABIMO, INTA-CONICET, se aisló la cepa *Cellulomonas* sp. B6, filogenéticamente relacionada con *C. flavigena*, a partir de un consorcio celulolítico proveniente de una muestra de suelo de bosque subtropical nativo de la provincia de Misiones (Argentina) (Campos y col., 2014). Esta cepa ha demostrado tener un papel significativo en la degradación de biomasa lignocelulósica lo que lo convierte en un candidato potencial como fuente de enzimas para la formulación de cócteles enzimáticos rentables (Piccinni y col., 2019; Ontañón y col., 2021). El genoma de este aislamiento fue secuenciado, identificándose 205 secuencias codificantes de posibles CAZimas, entre las cuales 75 forman parte del secretoma teórico de la bacteria (Piccinni y col., 2016). Entre las enzimas activas sobre xilanos, se identificaron 8 β -1,4-endo-xilanasas (7 pertenecientes a las familias GH10 y una GH11), dos GH43 con probable actividad β -xilosidasa, una α -L-arabinofuranosidasa de la familia GH62 y dos de la familia GH51, entre otras (Piccinni y col., 2019). Además, se desarrolló la optimización de la actividad xilanolítica en extractos enzimáticos extracelulares de *Cellulomonas* sp. B6 para su posterior aplicación en la hidrólisis de BLC mediante cultivo en diversos sustratos. El análisis proteómico confirmó la secreción de las 7 endo-xilanasas extracelulares, lo cual se correlaciona con la actividad xilanolítica del aislamiento (Ontañón y col., 2021).

Dentro del repertorio de enzimas xilanolíticas, 6 β -1,4-endo-xilanasas (cinco GH10 y la GH11), 2 α -L-arabinofuranosidasas (una GH62 y una GH51) y una α -glucuronidasa (GH67) han sido obtenidas por

expresión recombinante en el laboratorio y caracterizadas bioquímicamente (Garrido y col., 2022; Ontañón y col., 2025).

4. 2. *Paenibacillus xylanivorans* A59

El género *Paenibacillus* pertenece al *phylum Firmicutes* y orden *Bacillales*, fue recientemente reclasificado a partir del linaje monofilético de bacterias formadoras de endosporas, previamente llamado *Bacillus* Grupo III, siendo *Paenibacillus polymyxa* la especie tipo (Ash y col., 1993). Incluye especies que pueden ser anaerobias facultativas o aerobias estrictas y con temperaturas óptimas de crecimiento en el rango mesófilo (Logan y De Vos, 2009). Está presente en diversos hábitats, desde regiones polares hasta los trópicos, y desde ambientes acuáticos hasta los desiertos más áridos (Grady y col., 2016). Se sabe que las bacterias del género *Paenibacillus* secretan una variedad diversa de enzimas capaces de descomponer los polisacáridos de la pared celular de las plantas, con potencial para aplicaciones industriales y agrícolas (Gastelum-Arellanez y col., 2014; Mihajlovski y col., 2015; Grady y col., 2016; Orencio-Trejo y col., 2016).

En estudios previos del grupo de trabajo, se obtuvo un aislamiento bacteriano a partir de una muestra de suelo de bosque nativo de la región patagónica (Argentina) perteneciente al género *Paenibacillus* y fue clasificado como una nueva especie, denominada *Paenibacillus xylanivorans* A59 (Ghio y col., 2015, 2019). La cepa presenta actividad xilanolítica extracelular cuando se cultiva utilizando xilano o BLC como fuentes de carbono para el crecimiento (Ghio y col., 2016). El genoma de *P. xylanivorans* fue secuenciado y se identificaron un total de 426 secuencias que codifican para potenciales dominios CAZy, entre las cuales 44 GHs forman parte del secretoma teórico de la bacteria. Se identificaron enzimas con potencial actividad endo-glucanasa, β -glucosidasa, exo-glucanasa, endo-xilanas, β -xilosidasa, xiloglucanasa, arabinofuranosidasa, glucurono-xilanas, mananasa, α -amilasa y quitinasa. Mediante análisis proteómico se confirmó la secreción de 3 endo-xilanasas extracelulares (2 de familias GH10 y 1 GH11), 2 quitinasas (GH18), 1 celobiohidrolasa (GH6), 3 endo-glucanasas (β -1,3 GH16, β -1,4 GH8 y β -1,6 GH30) y 1 amilasa (GH13) (Ghio y col., 2018).

Del repertorio de GHs de *P. xylanivorans*, 2 β -1,4-endo-xilanasas (una GH10 y la GH11) (Ghio y col., 2018; de Mello Capetti y col., 2023a, b), una β -1,4-endo-glucanasa (GH8), una β -glucosidasa (GH1) (Ghio y col., 2020) y una celobiohidrolasa (GH6) (datos no publicados) se han expresado de manera recombinante en el laboratorio y caracterizado funcional y bioquímicamente.

5. Metodologías para la obtención de enzimas lignocelulósicas

La utilización de enzimas microbianas se ha consolidado como una estrategia biotecnológica emergente y ambientalmente sostenible, con un creciente potencial de aplicación en el bioprocesamiento de la BLC. Sin embargo, el alto costo de las enzimas lignocelulolíticas es un desafío importante para la comercialización de dichos bioprocesos. El sistema de enzimas libres, el mecanismo enzimático más común presente en microorganismos y ampliamente estudiado, tiene un gran potencial para producir cócteles enzimáticos con aplicabilidad industrial, combinando un bajo costo con la degradación completa de la biomasa (Lopes y col., 2018).

La selección de organismos eficientes y la optimización de las condiciones de cultivo constituyen estrategias clave para reducir los costos asociados a la producción de extractos enzimáticos, orientadas a obtener la máxima actividad enzimática y, en consecuencia, diseñar cócteles enzimáticos que favorezcan la liberación de azúcares reductores a partir de la biomasa vegetal (Yilmaz-Sercinoglu y Sayar, 2020; Dashora y col., 2022). En bacterias, la capacidad de producir enzimas depende de múltiples factores, siendo la naturaleza de la fuente de carbono y el nitrógeno presente en el medio de cultivo los más relevantes (Iram y col., 2020; Chantorn y col., 2021). Así, sustratos complejos como almidón, celulosa o hemicelulosa actúan como inductores en la síntesis de amilasas, celulasas y hemicelulasas, enzimas que se encargan de descomponer los polisacáridos en azúcares simples que son aprovechados por los microorganismos para su crecimiento (Iram y col., 2020). Entre las diversas materias primas lignocelulósicas, abundantes y de bajo costo, que se han explorado para la producción de cócteles enzimáticos eficientes destacan: el rastrojo de maíz, las cáscaras de arroz, el salvado de trigo y el residuo de caña de azúcar, siendo este último particularmente relevante por generar extractos con una amplia variedad de actividades enzimáticas que pueden ser caracterizadas (Iram y col., 2020; Ontañón y col., 2021; Topalian y col., 2024). En este contexto, la producción *in situ* de enzimas se considera una estrategia recomendable para garantizar la viabilidad técnica y económica de las biorrefinerías (Siqueira y col., 2020). Este enfoque no solo contribuye a la gestión sostenible de residuos, sino que también añade valor a subproductos agroindustriales mediante su integración en cadenas productivas circulares (Das y col., 2016; Astolfi y col., 2019).

El aislamiento de mutantes hiperproductoras es otra estrategia que permite reducir las limitaciones del proceso aumentando la viabilidad económica. La obtención de cepas mejoradas mediante el uso de agentes mutagénicos es de gran atracción debido a su eficiencia. Diversos estudios han demostrado el uso tanto de agentes físicos como la radiación ultravioleta (luz UV), los rayos X y la radiación gamma, y también químicos, como el etilmetanosulfonato (EMS) y el N-metil-N β -nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), para el mejoramiento de aislamientos lignocelulósicos (Rojas-Rejón y col., 2011; Xu y col., 2011;

Sangkharak y col., 2012). Las actividades celulasa y xilanasas de diversos microorganismos se han mejorado mediante la aplicación de estas estrategias de mutagénesis. Por ejemplo, *Cellulomonas flavigena* PR-22 obtenida mediante mutagénesis química presentó 2 y 1,5 veces más actividad xilanolítica y celolítica, respectivamente, en comparación a la cepa original (Rojas-Rejón y col., 2011). La mutante química M23 de *Cellulomonas* sp. TSU-03, obtenida utilizando NTG, presentó mayor crecimiento celular y aumento en diferentes actividades enzimáticas (FPasa, CMCasa y β -glucosidasa) respecto a la cepa parental (Sangkharak y col., 2012). Mutantes fisicoquímicos de *Bacillus* sp. HCB-21 mostraron un mayor potencial celolítico y tolerancia a la concentración de sustrato que la cepa silvestre (Bhatia y col., 2017).

Si bien se han logrado avances significativos en el uso de mutágenos físicos y químicos para aumentar la producción de enzimas lignocelulósicas, la tecnología del ADN recombinante y la ingeniería genética también se están utilizando (Kumar y col., 2008). Las estrategias de ingeniería genética permiten introducir genes de interés para una mayor expresión mediante la transformación con plásmidos o la integración genómica (*knock-in*), mientras que las vías divergentes se eliminan mediante la disrupción génica (*knock-out*) (Westbrook y col., 2016). Las aplicaciones de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR) y sus proteínas asociadas a CRISPR (Cas) han sido adoptadas para el mejoramiento de algunas cepas silvestres derivadas de entornos naturales (Westbrook y col., 2016; Liu y col., 2025). La delección del gen *ace1* (factor de transcripción) en el hongo filamentoso *Rasamsonia emersonii* mejoró la actividad endo-glucanasa, celobiohidrolasa (CBHI), β -glucosidasa y xilanasas extracelulares (Singh y col., 2023). En cuanto a las bacterias, si bien esta estrategia ha sido más ampliamente utilizada en bacterias Gram negativas, en el caso de las Gram positivas, por ejemplo, se obtuvo la cepa mejorada *Bacillus subtilis* AEA3 con actividades endo-glucanasa, exo-glucanasa, β -glucosidasa, xilanasas y celulasa incrementada respecto a lo observado en el aislamiento original gracias a la incorporación mediante CRISPR/Cas9 de tres genes endógenos *eglS* (endo-glucanasa), *bglS* (endo- β -1,3-1,4-glucanasa) y *cel48S* (exo-glucanasa) de *Clostridium thermocellum* (Liu y col., 2025).

Otro enfoque consiste en complementar extractos enzimáticos producidos por un cierto microorganismo bajo determinadas condiciones de cultivo con una o varias enzimas específicas necesarias para la hidrólisis, pero que faltan o están poco representadas en el extracto (Peciulyte y col., 2017; Lopes y col., 2018; Adsul y col., 2020). Por ejemplo, un cóctel enzimático de *Trichoderma reesei* suplementado con una endo-glucanasa de *B. subtilis* y una β -glucosidasa de *Aspergillus niger* convierte el 72% de la celulosa presente en el bagazo de caña de azúcar pretratado térmicamente (Bussamra y col., 2015). En la degradación del xilano, la complementación con enzimas desramificantes para la

degradación de AX, ha demostrado interacciones sinérgicas en la liberación de arabinosa y la actividad xilanolítica (Sørensen y col., 2007a, b; Garrido y col., 2022).

Estas enzimas pueden ser expresadas de manera recombinante en sistemas de expresión heteróloga. Diversos microorganismos, como *Escherichia coli* y *Pichia pastoris*, presentan características deseables para la producción de enzimas (Lambertz y col., 2014; Lopes y col., 2021). Cepas de *E. coli* son uno de los primeros sistemas de elección para la expresión de proteínas recombinantes bacterianas, por la diversidad de estrategias para su transformación, su estructura celular simple, su corto tiempo de proliferación, su método de inducción sencillo, su crecimiento y metabolismo activos y su alto nivel de expresión (Cantoia y col., 2021). En comparación con otros sistemas, el sistema de expresión de *E. coli* se caracteriza por su fácil operación y bajo costo de producción (Zhang y col., 2024).

6. Aplicaciones industriales de enzimas lignocelulolíticas

Las enzimas lignocelulolíticas han demostrado tener un gran potencial de aplicación en diversas industrias y, hoy en día, se aplican principalmente en los rubros textil, papel y pulpado, detergentes, agricultura, medicina, alimentos para el consumo humano y animal y biocombustibles.

A nivel global, el mercado de enzimas industriales está concentrado en pocas empresas, siendo Novozymes (<https://www.novozymes.com/en>) y DSM (<https://www.dsm-firmenich.com>) los principales actores. Esta dependencia de proveedores internacionales representa una limitación para el desarrollo de biorrefinerías lignocelulósicas en Argentina y la región, donde resulta estratégico desarrollar complejos enzimáticos adaptados a las biomásas locales, con el objetivo de mejorar la eficiencia del proceso y reducir costos logísticos. En este marco, empresas nacionales como Keclon (<https://keclon.com/>) y Laboratorios Nova (<https://laboratorios-nova.com/>), ambas radicadas en Santa Fe, han comenzado a posicionarse en el sector. Keclon, se dedica a la producción de enzimas para las industrias del biodiésel, aceites y alimentación, mientras que Laboratorios Nova ha incorporado recientemente una división de biotecnología orientada al desarrollo de enzimas aplicables en sectores como biocombustibles, alimentación, textil y farmacéutica.

6. 1. Industria de los biocombustibles

La producción de biocombustibles ha experimentado un notable crecimiento global como solución clave para reducir las emisiones de gases de efecto invernadero. En el caso del etanol, hoy en día se comercializa el denominado bioetanol de primera generación (1G), generado a partir del almidón y la sacarosa contenidos principalmente en el maíz y la caña de azúcar, respectivamente. La BLC ofrece una materia prima sostenible para la producción de biocombustibles de segunda generación (2G), evitando

la competencia con la industria agrícola-alimentaria. Sin embargo, los costos del procesamiento de biocombustibles de 2G superan en la actualidad los de 1G, mayoritariamente debido a la heterogeneidad y recalcitrancia de la BLC y la falta de procesos eficientes para sobrepasar esta dificultad (Kumar y col., 2016; Kordala y col., 2022).

La producción de biocombustibles 2G implica tres etapas: el pre-tratamiento de la BLC, la hidrólisis enzimática de la biomasa pre-tratada y la fermentación de los azúcares simples. Tras el pre-tratamiento, los polisacáridos son hidrolizados enzimáticamente a sus azúcares simples (especialmente glucosa y xilosa). Finalmente, los azúcares simples son fermentados y se convierten a bioetanol (Ballesteros, 2010; Chauhan y col., 2020). Los cócteles enzimáticos utilizados para la producción eficiente de biocombustibles contienen principalmente celulasas y hemicelulasas, además, ligninasas y enzimas accesorias (Pasin y col., 2020). Uno de los factores limitantes del proceso es la gran cantidad de estas enzimas que se requiere para obtener una conversión eficiente (mayor al 80%) de los polisacáridos a los azúcares fermentables. Hoy en día el principal proveedor de enzimas es Novonosis (www.novonosis.com). Como consecuencia, grandes esfuerzos en investigación se realizan en todo el mundo para optimizar este proceso.

6. 2. Industria alimentaria humana y animal

En la actualidad, existe una creciente preocupación por la salud y el bienestar personal lo que ha provocado un aumento significativo en la demanda de alimentos funcionales. Entre las sustancias bioactivas clave, incorporadas en los alimentos funcionales, se incluyen ácidos grasos poliinsaturados, antioxidantes, compuestos fenólicos, prebióticos y enzimas exógenas (Alongi y Anese, 2021; Ferreira y col., 2023).

6. 2. a. Oligosacáridos como aditivos alimentarios

Los oligosacáridos no digeribles (NDO) poseen diversas propiedades biológicas de interés para la industria alimentaria. Se los reconoce como prebióticos por su capacidad para estimular el crecimiento de la microbiota intestinal benéfica e inhibir microorganismos patógenos. Las bacterias beneficiosas del intestino, principalmente de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, fermentan estos compuestos produciendo ácidos grasos de cadena corta que desempeñan un papel en la regulación de procesos fisiológicos (Colantonio y col., 2020; Martín-Peláez y col., 2022). Además de sus efectos prebióticos, diversos estudios han evidenciado que los oligosacáridos poseen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, contribuyendo a mitigar procesos asociados con inflamación, infecciones bacterianas y estrés oxidativo (Sharma y col., 2021). A nivel tecnológico, los NDO también actúan como sustitutos de azúcares y grasas, mejoran el sabor, la textura y otros atributos sensoriales

de los alimentos (Cruz-Guerrero y col., 2022; Ferreira y col., 2023). Si bien se encuentran de forma natural en diversos alimentos, su concentración suele ser insuficiente para ejercer un efecto significativo, por lo que la producción biotecnológica y posterior incorporación en matrices alimentarias se han convertido en una estrategia clave para aumentar su disponibilidad y accesibilidad (Mollakhalili-Meybodi y col., 2021). Entre las materias primas más promisorias para su obtención se destaca la BCL. La producción de prebióticos a partir de la BCL puede llevarse a cabo mediante procesos de conversión enzimática o termoquímica, ya sea individualmente o en combinación, siendo la vía enzimática más ventajosa por su mayor rendimiento y menor generación de subproductos indeseados (Saini y col., 2022). Los principales oligosacáridos con propiedades prebióticas incluyen fructo-oligosacáridos (FOS), galacto-oligosacáridos (GOS), mano-oligosacáridos (MOS) y XOS, cuya producción a partir de biomasa requiere el empleo de enzimas específicas como xilanasas, β -fructofuranosidasas, β -galactosidasas, β -mananasas, β -glucosidasas y esterasas con distinta especificidad (Rodrigues Mano y col., 2018; Saini y col., 2022). Por ejemplo, la adición de XOS en bebidas a base de suero de leche generó un aumento de 100% la actividad antioxidante, 60% las propiedades antihipertensivas y 80% la actividad antidiabética (Souza y col., 2019).

La actividad antioxidante de los oligosacáridos depende de factores como el grado de polimerización, el método de despolimerización, la composición y solubilidad de los monosacáridos, el tipo de enlaces glucosídicos, el peso molecular, el contenido de azúcares reductores y la presencia de grupos fenólicos o ácidos urónicos (Vieira y col., 2020). Los antioxidantes en alimentos cumplen funciones tanto en la prevención de la oxidación lipídica y la formación de radicales libres durante almacenamiento o procesado, como en la reducción de radicales libres *in vivo* tras la ingesta (Wang y col., 2013). Numerosos estudios han propuesto a los XOS como alternativa natural a antioxidantes sintéticos, destacando aquellos derivados de la hidrólisis enzimática de GX (UXOS), que contienen ramificaciones de MeGlcA y presentan una actividad antioxidante superior a la de los derivados del AX (AXOS), compuestos por moléculas neutras decoradas con arabinosa. La presencia de MeGlcA y un mayor grado de polimerización parecen ser factores determinantes en el potencial antioxidante de estos compuestos (Jagtap y col., 2017; Valls y col., 2018; Bouiche y col., 2020).

6. 2. b. Enzimas lignocelulolíticas como aditivos en alimento animal

La alimentación animal desempeña un papel crucial en la industria alimentaria, ya que contribuye a la generación de fuentes de proteínas animales. Esto implica el suministro de alimento a animales monogástricos como cerdos y aves de corral que, a menudo contiene ingredientes ricos en lignocelulosa que no pueden ser digeridos por las enzimas endógenas de los animales (Rasool y Irfan, 2024). Generalmente, las dietas animales son a base de maíz y harina de soja (SBM) que contienen

niveles relativamente altos de polisacáridos no amiláceos (PNAs) y factores anti-nutricionales. En conjunto, estos componentes dificultan la digestión regular del alimento y provocan una menor producción de carne y huevos, una menor eficiencia alimenticia y trastornos digestivos (Sureshkumar y col., 2023; Plouhinec y col., 2023). Los PNAs se clasifican en dos categorías: los solubles, que forman geles viscosos ralentizando el tránsito intestinal y dificultando la difusión de los nutrientes promoviendo una proliferación microbiana intestinal indeseable, y los insolubles, que encapsulan los nutrientes restringiendo el acceso de las enzimas digestivas endógenas (como las α -amilasas) y exógenas (como las fitasas) (Fu y col., 2024). Dependiendo de los componentes del alimento, entre el 20-30% del pienso puede resultar no aprovechable (Sureshkumar y col., 2023). Todos los alimentos de origen vegetal contienen PNAs, siendo los más abundantes los AX contenidos en los cereales. Los AX constituyen más del 60% del contenido total de PNAs en trigo, centeno, cebada (ricos en AX solubles) y maíz (predominantemente AX insoluble) (Knudsen, 2014). La harina de soja y otras leguminosas también aportan altos niveles de AX insoluble y otros oligosacáridos, como α -galactanos, β -mananos y polímeros pécticos, que comprometen aún más la digestibilidad del alimento (Choct, 2015). En consecuencia, la inclusión de enzimas exógenas (glucanasas y xilanasas) a los formulados de alimentación de animales monogástricos mejora su valor nutricional, ya que pueden contribuir a mejorar la disponibilidad de nutrientes, como almidón, proteínas, aminoácidos y minerales, y favorece la digestibilidad de los PNAs (Lan y col., 2017; Balasubramaniam y col., 2020). Por ejemplo, la utilización de un cóctel enzimático (β -glucanasas, xilanasas y proteasas) mejoró la digestibilidad total de alimentos a base de cebada en cerdos (Jo y col., 2012). Resultados semejantes se obtuvieron al suplementar dietas a base de salvado de trigo o arroz con arabino-xilanasas y proteasas (Yin y col., 2004).

Las formulaciones enzimáticas comerciales destinadas a la alimentación animal suelen estar enriquecidas con xilanasas y β -glucanasas, e incorporan actividades complementarias como pectinasas, mananasas y arabinofuranosidasas, ajustadas a las características de materias primas específicas (Aftab y Bedford, 2018). Aunque estas enzimas han mostrado efectos beneficiosos en dietas SBM, así como en el aprovechamiento de ingredientes alternativos de menor valor nutricional, existe un interés creciente en la exploración de nuevas fuentes enzimáticas y en el desarrollo de cócteles multienzimáticos más robustos, con mayor especificidad hacia el sustrato y un rendimiento catalítico optimizado (Plouhinec y col., 2023).

6. 3. Industria agrícola

Los oligosacáridos no solo presentan un gran potencial para la nutrición y el cuidado de la salud humana, sino que también podrían utilizarse como bioestimulantes, para promover el crecimiento de los cultivos agrícolas mejorando los rendimientos y la resistencia al estrés, desarrollando a su vez

prácticas agrícolas innovadoras y ecológicas que minimicen el consumo de productos químicos. Estudios han demostrado que la aplicación de oligosacáridos podría mejorar el entorno del suelo y aumentar la eficiencia en la utilización del nitrógeno por las raíces de las plantas (Chen y col., 2012; Zhang y col., 2014). Además, desempeñan un papel activo como inductores de la respuesta inmune en plantas mejorando la resistencia a enfermedades virales como así también al estrés abiótico (He y col., 2022).

Las plantas detectan y responden a los ataques de patógenos detectando patrones moleculares asociados a microbios (MAMPs) y patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Durante la interacción planta-patógeno, tanto los polisacáridos de la pared celular de las plantas como los de los microbios sirven como fuentes extracelulares para la generación de las señales DAMPs y MAMPs, respectivamente (Zhou y Zhang, 2020; Kongala y Kondreddy, 2023). En este sentido, oligosacáridos suministrados exógenamente son percibidos por los PRR activando mecanismos de tolerancia al estrés (Meresa y col., 2024). En particular, los XOS son reconocidos con especificidad variable por el sistema inmune vegetal induciendo respuestas de defensa y modificaciones en la composición de la pared celular (Sun y col., 2025). Por ejemplo, el tratamiento con 3- α -L-arabinofuranosil-xilotetraosa (XA³XX), un AXOS que puede obtenerse enzimáticamente del AX, desencadena las respuestas inmunitarias en plantas de *Arabidopsis* y confiere resistencia frente a *Pseudomonas syringae* (bacteria patógena) y *Sclerotinia sclerotiorum* (hongo patógeno) en plantas de tomate y pimiento (Mélida y col., 2020). Se ha probado también en *Arabidopsis*, que la detección de UXOS, como la 2-(4-O-metil- α -D-glucuronil)-xilotetraosa (XUXX), actuó como estimulador de la respuesta al estrés (Fernández-Calvo y col., 2024). En plantas de tomate, la tolerancia a las bajas temperaturas mejoró al aplicar oligosacáridos exógenos, en particular XOS y QOS (quito-oligosacáridos) (He y col., 2020).

6. 4. Industria textil y de detergentes

En la industria textil, la biocatálisis es una alternativa a los tratamientos químicos, que tienen consecuencias medioambientales negativas. Las enzimas lignocelulolíticas están cobrando importancia como una posible alternativa. Las celulasas (endo- y exo-glucanasas y β -glucosidasas) se aplican en procesos como el desgastado de telas (*biostoning*) y el acabado de fibras de lino y algodón o similares (*biopolishing*). A su vez, se utilizan pectinasas para remover pectina y ceras de las telas de algodón y en lanas (*bioscouring*) (Ejaz y col., 2021; Korsá y col., 2023).

Además, las celulasas se agregan en los detergentes para el lavado de ropa, ya que modifican las fibras de celulosa, contribuyendo a la remoción de manchas y mejorando el aspecto y la suavidad de las telas

(Niyonzima, 2021). Actualmente, se utilizan endo- y exo-glucanasas de hongos de los géneros *Humicola*, *Trichoderma* y *Aspergillus* y de bacterias del género *Bacillus*, entre otros. Muchas de estas enzimas son activas en condiciones levemente alcalinas y/o a baja o alta temperatura (Sharma y col., 2016)

6. 5. Industria del papel y pulpado

En los últimos años, la industria papelera ha puesto cada vez más énfasis en la sostenibilidad, lo que ha llevado a una reducción significativa del uso de pulpa virgen para la producción de papel y reorientado su enfoque hacia el uso de residuos agrícolas y papel reciclado como materias primas alternativas (Gupta y col., 2022). Las enzimas lignocelulolíticas tienen un papel importante en el bioblanqueo de la pulpa y el destintado, siendo las celulasas y hemicelulasas las más utilizadas. Las celulasas son coaditivos en el bioblanqueo, ya que mejoran el drenaje, reducen el consumo de cloro en el proceso, mejoran el brillo de las fibras y pueden utilizarse en el destintado de la pulpa (Pathak y col., 2014; Kuhad y col., 2016). Las lacasas también contribuyen significativamente a la oxidación de la lignina, mejorando así el blanqueo de la pulpa y el brillo del producto final (Sharma y col., 2020). Sin embargo, el costo de las enzimas limita su aplicación.

Numerosas investigaciones se han centrado en la formulación de cócteles enzimáticos que incorporan lacasas, xilanasas y diversas enzimas provenientes de microorganismos como *Aspergillus* sp. (Colonia y col., 2019), *Bacillus halodurans* (Sharma y col., 2020), *Bacillus firmus* (Bhagat y col., 2016) y *Bacillus pumilus* (Sharma y col., 2017), con el objetivo de optimizar el desarrollo industrial de la pulpa y el papel reduciendo significativamente el uso de agentes nocivos.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

Las formulaciones de enzimas activas sobre carbohidratos de aislamientos bacterianos nativos permiten la deconstrucción controlada y eficiente de hemicelulosas en procesos de relevancia agroindustrial.

Objetivos

Objetivo general

Estudiar enzimas bacterianas activas sobre polisacáridos estructurales de la biomasa vegetal y desarrollar complejos enzimáticos para su aplicación en bioprocesos.

Objetivos particulares

OP1. Evaluar estrategias de mutagénesis química para aumentar la actividad celulolítica y xilanolítica extracelular de *Cellulomonas* sp. B6.

OP2. Identificar los sistemas de hidrólisis de polisacáridos de *Paenibacillus xylanivorans* A59 y optimizar la producción de extractos enzimáticos xilanolíticos.

OP3. Expresar en sistemas heterólogos secuencias codificantes para enzimas de *P. xylanivorans* activas sobre xilanos para formular complejos enzimáticos.

OP4. Evaluar la aplicación de los complejos enzimáticos desarrollados en bioprocesos.

Materiales y Métodos

1. Soluciones y medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados en este trabajo fueron Luria Bertani (LB) (MacWilliams y Liao, 2006) y un medio mínimo salino (MM) (Hankin y Anagnostakis, 1977 con modificaciones), cuya composición se detalla en la Tabla M1. En los MM que así lo requirieron, se agregó 1% (p/v) de biomasa vegetal o sustrato comercial como fuente de carbono, según se indica en cada ensayo. En el MM sólido, se agregó 0,01% (p/v) del colorante Azul Tripán (TB) (Sigma), para la visualización de halos de degradación de polisacáridos. Ambos medios fueron esterilizados mediante autoclave (121 °C, 20 min) y almacenados a 4 °C hasta su uso. En el MM, las microsales (molibdato de sodio, biotina, ácido nicotínico y pantoténico) así como los azúcares (sacarosa o glucosa) se esterilizaron mediante filtración con jeringa (filtros de nylon de 0,22 µm) y se agregaron al medio frío autoclavado, a la concentración indicada en cada caso.

Para el cultivo de las cepas recombinantes, en el medio LB, se añadieron los antibióticos indicados en cada caso en las siguientes concentraciones (concentración final): 100 µg/mL ampicilina (Amp), 50 µg/mL kanamicina (Km), 20 µg/mL gentamicina (Gm) y 34 µg/mL cloranfenicol (Cm).

Tabla M1. Composición de los medios de cultivo utilizados.

Medio	Reactivo	Concentración final
Luria Bertani (LB) pH= 7	Triptona	10,0 g/L
	NaCl	10,0 g/L
	Extracto de Levadura	5,0 g/L
	Agar (para medio sólido)	15 g/L
Medio mínimo salino (MM) pH= 6,8	K ₂ HPO ₄	1,67 g/L
	KH ₂ PO ₄	0,87 g/L
	NaCl	0,05 g/L
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g/L
	NH ₄ Cl	1 g/L
	CaCl ₂	0,04 g/L
	FeCl ₃	0,004 g/L
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,005 g/L
	Biotina	0,01 g/L
	Ácido nicotínico	0,02 g/L
	Ácido pantoténico	0,01 g/L
	Agar (para medio sólido)	15 g/L

Las soluciones empleadas en este trabajo de Tesis se detallan en la Tabla M2.

Tabla M2. Composición de los buffers y soluciones utilizadas.

Solución	Reactivo	Concentración final	Aplicación
EMS	Etilmetanosulfonato	3 – 0,25% (v/v). Preparado en PBS 1X	Mutagénesis química (sección 4, pp. 40)
PBS 1X pH 7,4	NaCl	136,89 mM	
	KCl	2,68 mM	
	KH ₂ PO ₄	1,47 mM	
TFB I pH 5,8	Na ₂ HPO ₄	7,49 mM	Preparación de células quimio-competentes (sección 7. 4, pp. 55)
	Acetato de Potasio	30 mM	
	KCl	100 mM	
	CaCl ₂	10 mM	
	MnCl ₂	50 mM	
TFB II pH 6,5	Glicerol	15% (v/v)	
	MOPS	10 mM	
	KCl	10 mM	
	CaCl ₂	75 mM	
TAE 1X	Glicerol	15% (v/v)	Electroforesis de geles de agarosa (sección 7. 2, pp. 54)
	Tris-HCl pH 8	40 mM	
Solución de resuspensión	EDTA disódico	2 mM	Purificación de ADN plasmídico o Miniprep (sección 7. 6, pp. 56)
	Tris-HCl pH 8	50 mM	
	EDTA	10 mM	
Solución de lisis	ARNasa	100 µg/mL	
	NaOH	200 mM	
Solución de neutralización	SDS	1% (v/v)	
	Acetato de potasio pH 5,5	3 M	Purificación de proteínas recombinantes IMAC (sección 8, pp. 58)
Buffer de equilibrio o lisis pH 8	NaCl	300 mM	
	NaH ₂ PO ₄ pH 8	50 mM	
	Imidazol	10 mM	
Buffer de lavado pH 8	NaCl	300 mM	
	NaH ₂ PO ₄ pH 8	50 mM	
	Imidazol	20 mM	
Buffer de elución pH 8	NaCl	300 mM	
	NaH ₂ PO ₄ pH 8	50 mM	
	Imidazol	250 mM	
Buffer Laemmli 1X	Tris-base	25 mM	Electroforesis de geles de poliacrilamida SDS-PAGE (sección 9, pp. 59)
	Glicina	192 mM	
	SDS	0,1% (v/v)	
Buffer cracking	Tris pH 6,8	50mM	
	Betamercaptoetanol	10mM	
	SDS	2% (v/v)	
Azul de Coomassie	Coomassie Blue R-250 (Thermo Fisher Scientific)	2,5 g/L	
	Etanol	45% (v/v)	

Solución Decolorante	Ácido acético glacial	10% (v/v)	
	Etanol	20% (v/v)	
	Ácido acético glacial	115% (v/v)	
TBS 1X	Tris-HCl pH 8	10 mM	Western Blot (sección 10, pp. 59)
	NaCl	150 mM	
Solución BREFA	Tris-HCl pH 9,5	10 mM	
	NaCl	2 mM	
	MgCl ₂	0,156 mM	
Solución de corrida (25 mL)	Agua bidestilada	6,25 mL	Cromatografía en capa delgada TLC (sección 5. 7. b, pp. 50)
	Ácido acético glacial	6,25 mL	
	Butanol	12,5 mL	
Solución reveladora (46,5 mL)	Ácido sulfúrico	1,5 mL	
	Etanol absoluto	35 mL	
	Agua bidestilada	10 mL	
	Orcinol	1% (p/v)	
DNS	Ácido 3,5- dinitrosalicílico	30 mM	Cuantificación de azúcares reductores (sección 4.3, pp. 43)
	NaOH	0,33 M	
	Tartrato de sodio y potasio	0,7 M	
	Fenol (50 °C)	0,005% (v/v)	
	Metabisulfito de sodio	30mM	

2. Sustratos comerciales y biomasas: pretratamiento y composición

Los sustratos comerciales utilizados en este trabajo de Tesis fueron: sacarosa (SAC) (Sigma), xilano de madera de haya (XIN) (Sigma o P-XYLNBE, Megazyme), xilano de madera de abedul (BAX) (Sigma), 4-O-metil-glucurono-xilano (MeGX) (Sigma), xilano industrial (INX) (proporcionado por Lenzing AG, Austria), arabino-xilano de hojuela de avena (OAX) (viscosidad media, Sigma), arabino-xilano de trigo (WAX) (viscosidad media, P-WAXYM, Megazyme), β -glucano de cebada (β GC) (viscosidad baja, Megazyme), almidón de papa (α G) (Mallinckrodt Baker), Avicel (Sigma-Aldrich), PASC (Sigma-Aldrich) y carboximetilcelulosa (CMC) (viscosidad media, Sigma). Su composición y estructura se detalla en la Tabla M3.

Las biomasas vegetales utilizadas fueron: residuo agrícola de caña de azúcar molido (RAC), RAC pre-tratado por extrusión alcalina (RACe), salvado de trigo (ST), salvado de trigo desalmidonado (STds), bagazo de Ágave azul pre-tratado por extrusión alcalina (BABe), madera de *Eucalyptus globulus* pre-tratado por explosión de vapor (Euca_s) y de *Eucalyptus saligna* molido (Euca_M).

El RAC fue provisto por el INTA EEA Famaillá (cosecha 2019. Tucumán, Argentina) y fue molido en a un tamaño de 0,3 mm. El mismo fue sometido a extrusión alcalina (70 °C, 6% NaOH/g de materia seca) en

la Unidad de Biocarburantes, CIEMAT, Madrid, España, en el marco del proyecto Babetreal5 (<https://www.babet-real5.eu/>).

El ST fue adquirido en una dietética local. Para la remoción de gran parte de la fracción de almidón y obtener ST desalmidonado (STds), se sometió a hidrólisis enzimática utilizando 100 mg de α -amilasas comerciales (Termamyl® α -amilasa, Novozymes), en una carga de sólidos 10% (p/v), a 85 °C y pH 5 por 3 hs, y luego lavado con agua hasta clarificar y secado a 50 °C, hasta peso seco constante (Ontañón y col., 2019).

El Eucas fue provisto por el CIEMAT, Madrid, España. El mismo fue sometido a explosión por vapor (188 °C por 16 min) en la Unidad de Biocarburantes del CIEMAT.

La composición relativa de las biomásas RAC, RACe, ST y Eucas fue determinada por el servicio analítico del CIEMAT, Madrid, España, siguiendo los protocolos NREL (Sluiter y col., 2012).

El Euca_M fue provisto por la Dra. Elba Pinto Da Silva Bon de la Universidad Federal de Rio de Janeiro, Brasil. La biomasa fue tratada con un molino de borlas bajo las condiciones de 400 rpm durante 120 min a temperatura ambiente en un recipiente de 45 mL con 7 esferas empleando un modo cíclico de molienda de 10 min, seguido de una pausa de 10 min y el análisis de su composición relativa fue realizado siguiendo los protocolos estandarizados (Da Silva y col., 2010).

El BABe fue provisto por el Dept. de Química, UNAM, México, en el marco del mismo proyecto (Babetreal5). Las condiciones de extrusión del BAB fueron 150 °C, 3,75% NaOH/g de materia seca y el análisis de su composición relativa fue realizado siguiendo los protocolos estandarizados (Montiel y col., 2016, 2024).

Tabla M3. Composición de los sustratos comerciales y las biomásas empleadas como fuente de carbono en el trabajo de Tesis.

Sustratos comerciales	
Xilano de madera de Haya (XIN)	Polisacárido compuesto por unidades de xilosa unidas por enlaces β -1,4 sustituida por ácido glucurónico en α -1,2 (GlcAOMe 13%)
Xilano de madera de Abedul (BAX)	Polisacárido compuesto por unidades de xilosa unidas por enlaces β -1,4. Presenta acetilaciones (24%) y sustituciones de ácido glucurónico en α -1,2 (GlcAOMe 10%)
4-O-metil-glucurono-xilano (MeGX)	Polisacárido compuesto por unidades de xilosa unidas por enlaces β -1,4 sustituida por ácido glucurónico en α -1,2 (GlcAOMe, porcentaje no determinado)
Arabino-xilano de hojuela de avena (OAX)	Polisacárido compuesto por unidades de xilosa unidas por enlaces β -1,4 con ~85% de pureza con sustituciones simples de arabinosa en α -1,3 y dobles en α -1,3 y α -1,2(Ara 15%)

Arabinoxilano de trigo (WAX)	Polisacárido compuesto por unidades de xilosa unidas por enlaces β -1,4 con sustituciones simples de arabinosa en α -1,3 y dobles en α -1,3 y α -1,2 (Ara 38%)	
Xilano Industrial (INX)	Polisacárido compuesto por unidades de xilosa unidas por enlaces β -1,4 con ~99% de pureza sin sustituciones	
β -glucano (β GC)	Polisacárido compuesto por unidades de glucosa unidas por enlaces mixtos β -1,4 y β -1,3	
Almidón de papa (α G)	Polisacárido compuesto por unidades de glucosa unidas por enlaces α -1,4 (amilosa, cadena lineal) y α -1,4 y α -1,6 (amilopectina, molécula ramificada)	
Sacarosa (SAC)	Disacárido cristalino no reductor compuesto de glucosa y fructosa	
Carboximetilcelulosa (CMC) (celulosa amorfa)	Polisacárido compuesto por unidades de glucosa unidas por enlaces β -1,4 sustituida por grupos carboximetil (CM 40%)	
Avicel (celulosa microcristalina)	Polisacárido compuesto por unidades de glucosa unidas por enlaces β -1,4	
Celulosa hinchada con ácido fosfórico (PASC) (celulosa amorfa)	Preparado según lo explicado por Ghio y col., (2019) a partir de Avicel	
Biomásas Vegetales		
	Componentes principales	% (peso seco)
Salvado de trigo (ST)	β -glucanos	11,4
	α -glucanos (almidón)	22,6
	Xilanos	18,0
	Arabinanos	9,5
Residuo de caña de azúcar (RAC)	Celulosa	29,2
	Xilanos	17,7
	Arabinanos	2,2
	Acetilos	2,8
	Galactanos	1,0
	Lignina insoluble	14,2
	Lignina soluble	3,9
Residuo de caña de azúcar pre-tratado por extrusión alcalina (RACe)	Celulosa	35,2
	Xilanos	19,1
	Arabinanos	2,7
	Acetilos	1,2
	Galactanos	0,9
	Lignina insoluble	17,6
	Lignina soluble	1,9
Bagazo de Ágave Azul pre-tratado por extrusión alcalina (BABe)	Celulosa	47,5
	Xilanos	21,2
	Arabinanos	4,3
	Acetilos	2,6
	Lignina insoluble	19,5
Eucaliptus molido (Euca _M)	Celulosa	45,8
	Hemicelulosa	10,7
	Acetilos	-
	Lignina insoluble	22,7
	Lignina soluble	5,2

Eucaliptus pre-tratado por explosión de vapor (Eucas)	Celulosa	62,9
	Hemicelulosa	4,7
	Acetilos	-
	Lignina insoluble	31,5
	Lignina soluble	-

3. Análisis bioinformático de las secuencias genómicas y de las secuencias proteicas de las bacterias utilizadas

Los genomas de las cepas *Cellulomonas* sp. B6 y *Paenibacillus xylanivorans* A59 se encuentran depositados en la base de datos del NCBI, bajo el número de acceso LNTD00000000.1 y LITU00000000.1, respectivamente (Ghio y col., 2015; Piccinni y col., 2016).

Se llevó a cabo una nueva secuenciación del genoma de *Cellulomonas* sp. B6 empleando la plataforma MinION disponible en la Unidad de Genómica de CICVyA-INTA. Para ello se extrajo el ADN genómico de la bacteria de un cultivo saturado de 3 mL, 16 hs en medio líquido LB, utilizando un kit de extracción comercial (Kit de extracción de ADN genómico Wizard, Promega). El resultado de la extracción fue ADN de 110 ng/μL (volumen final de 200 μL), con parámetros de A260/280 = 1,90. La calidad del ADN fue confirmada por la Unidad de Genómica. Las lecturas fueron analizadas y ensambladas por la Unidad de Bioinformática del Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA. La calidad de las lecturas obtenidas fue determinada en NANOPlot (disponible en <https://github.com/wdecoster/NanoPlot>, De Coster y Rademakers, 2023). Los datos de secuenciación fueron ensamblados utilizando la herramienta ONT: FLYE (disponible en <https://github.com/mikolmogorov/Flye>, Kolmogorov y col., 2019) y pulidos, en primera instancia, MEDAKA CONSENSUS (disponible en <https://github.com/nanoporetech/medaka>, © 2018- Oxford Nanopore Technologies Ltd.) y, en segunda instancia con las lecturas Illumina, en POLYPOLISH (disponible en <https://github.com/rrwick/Polypolish>, Bouras y col., 2014). El QA del ensamble se determinó en BUSCO (disponible en <https://busco.ezlab.org/>, Tegenfeldt y col., 2025) y las métricas en todos los pasos se analizaron en QUAST (disponible en <https://github.com/ablab/quast>, Gurevich y col., 2013). Finalmente, la predicción genética y el análisis funcional se llevaron a cabo utilizando el servidor de Anotaciones Rápidas mediante Tecnología de Subsistemas (RAST) (disponible en <https://rast.nmpdr.org/>, Overbeek y col., 2014). Esta nueva secuenciación será depositada en bases de datos públicas (NCBI) como actualización de la versión anterior.

3. 1. Identificación de enzimas activas sobre carbohidratos

Las enzimas activas sobre carbohidratos (CAZimas) codificadas por *Cellulomonas* sp. B6 y *P. xylanivorans* A59 se identificaron utilizando el programa bioinformático en línea dbCAN3 (disponible

en (<https://bcb.unl.edu/dbCAN2/>) (Zheng y col., 2023) a partir de las secuencias de proteínas predichas por anotación automática del genoma, empleando la información de la nueva secuenciación para el caso de *Cellulomonas* sp. B6 y el genoma depositado en NCBI para *P. xylanivorans*. El análisis de los dominios presentes en las secuencias de proteínas identificados mediante el servidor dbCAN2 / dbCAN3, se complementó utilizando la herramienta "Conserved Domain Database" (CDD) de NCBI disponible en www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml.

3. 2. Predicción de la localización subcelular

Las proteínas se clasificaron en intracelulares o extracelulares (secretadas) por presencia o ausencia, respectivamente de un péptido señal en su secuencia aminoacídica utilizando los programas CELLO versión 2.5 (disponible en <https://cello.life.nctu.edu.tw/>) (Yu y col., 2006) y SignalP versión 6.0 (disponible en <https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>) (Teufel y col., 2022). Adicionalmente, se identificaron qué proteínas podrían ser secretadas por vías independientes del péptido señal usando el servidor SecretomeP versión 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SecretomeP-2.0/>) (Bendtsen y col., 2005). Las proteínas sin péptido señal y con un puntaje $\geq 0,5$ en el análisis por SecretomeP (límite sugerido para bacterias Gram positivas por el servidor) fueron clasificadas como potencialmente secretadas por vías alternativas al péptido señal.

4. Mutagénesis química del aislamiento *Cellulomonas* sp. B6

En esta tesis se abordó el mejoramiento del potencial enzimático del aislamiento mediante la estrategia de mutagénesis química, utilizando el mutágeno etilmetanosulfonato (EMS) (Wakisaka y col., 1982; Anderson, 1995).

4. 1. Ensayo de letalidad

Cellulomonas sp. B6 fue cultivada en LB a 30 °C en un agitador orbital (Innova 42, New Brunswick) con agitación (200 rpm) por 24 hs. Para estandarizar los ensayos, se decidió ajustar la densidad óptica (Abs₆₀₀ nm) del cultivo a utilizar a DO₆₀₀ = 1. Para cada condición de mutágeno a evaluar, 200 µL del cultivo fueron lavados con 200 µL PBS 1X (tres lavados) para eliminar el medio de cultivo LB, mediante centrifugación a 4.000 g, 10 min y resuspensión suave con pipeta. Luego del tercer lavado, el *pellet* fue resuspendido en 200 µL de una solución de EMS de concentraciones 0,25, 0,5, 1, 2 o 3% (v/v), e incubados a 30 °C, 300 rpm por 1, 4 y 20 hs. Como control una alícuota de 200 µL de cultivo fue sometida al mismo procedimiento, pero sin mutágeno y el *pellet* fue resuspendido en PBS 1X e incubado bajo las mismas condiciones de temperatura y tiempo. A cada tiempo, para cada

concentración de EMS se centrifugaron las células 4.000 g, 10 min y se realizaron 3 lavados de lavados de los *pellets* con 200 µL de PBS 1X, resuspendiendo cada vez, para eliminar el mutágeno residual. Finalmente, se realizaron diluciones seriadas (de -1 a -8), en 200 µL de PBS 1X y 30 µL de la dilución adecuada, que permite el recuento de aproximadamente 50 colonias por placa (-1 y -2 para la condición con mutágeno y -6 y -7 para el control), fueron plaqueados en MM-1,5% agar-1%CMC-TB. Las placas fueron incubadas a 30 °C por 72 hs. Luego, se realizó el recuento de colonias para estimar el porcentaje de supervivencia, respecto de la condición sin mutágeno (Eq 1).

$$(\text{Eq 1}) \text{ Porcentaje de supervivencia (\%)} = (N^{\circ} \frac{UFC}{mL} \text{ Tratamiento} * 100) / N^{\circ} \frac{UFC}{mL} \text{ Control}$$

Se seleccionó aquella condición de concentración de mutágeno y tiempo, que permita la supervivencia del 0,05-0,01% de las células. Los pasos de la metodología empleada se encuentran representados en la Figura M1.

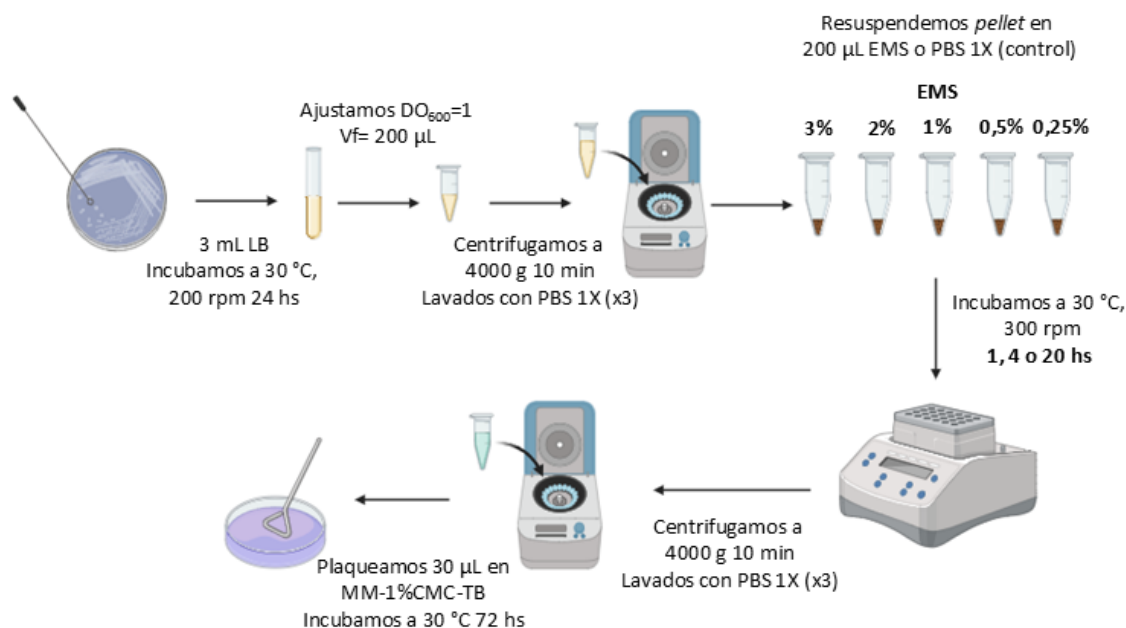


Figura M1: Esquema del ensayo de letalidad en *Cellulomonas* sp. B6. Cultivo iniciador del aislamiento en LB a partir de colonia aislada en placa (MM-1,5% agar-1%CMC-TB). EMS: Etilmetanosulfonato; MM: medio mínimo salino; CMC: carboximetilcelulosa; TB: Azul de Tripán. Figura realizada en plataforma Biorender (app.biorender.com).

4. 2. Mutagénesis

Una vez determinada la condición de mutagénesis, se repitió el ensayo. Un cultivo de 3 mL de *Cellulomonas* sp. B6 en LB (30 °C, 200 rpm, 24 hs), fue ajustado a $DO_{600} = 1$ ($Abs_{600\text{ nm}}$) con LB. Dosecientos microlitros de células fueron lavadas con 200 µL PBS 1X (tres lavados) para eliminar el medio de cultivo. El *pellet* obtenido luego del tercer lavado fue resuspendido en 200 µL 0,5% (v/v) de EMS. Las células fueron incubadas a 30 °C 300 rpm por 1 h. Se realizaron 3 lavados con 200 µL de PBS 1X

para eliminar el mutágeno residual y a partir de la suspensión se realizaron diluciones seriadas en 200 µl de PBS 1X. Treinta microlitros de las diluciones (-1 y -2 para la condición con mutágeno y -6 y -7 para el control) fueron plaqueadas en placas de MM-1,5% agar-1%CMC-TB, que fueron incubadas a 30 °C por 72 hs. Las placas obtenidas fueron fotografiadas a contraluz sobre un transiluminador de luz blanca (UVP TW-26 Transilluminator, Thermo Fisher scientific) utilizando una cámara Canon SX50, para determinar el diámetro del halo de degradación respecto del diámetro de las colonias, utilizando el programa de análisis de imágenes ImageJ (Abràmoff y col., 2004). La capacidad hidrolítica (CH) fue calculada a partir de los valores promedio obtenidos en pixeles mediante la Eq 2 (Gupta y col., 2012).

$$(Eq\ 2)\ CH = \frac{\text{Promedio diámetro halo de degradación (pixeles)}}{\text{Promedio diámetro colonia (pixeles)}}$$

Los pasos de la metodología empleada se encuentran representados en la Figura M2.

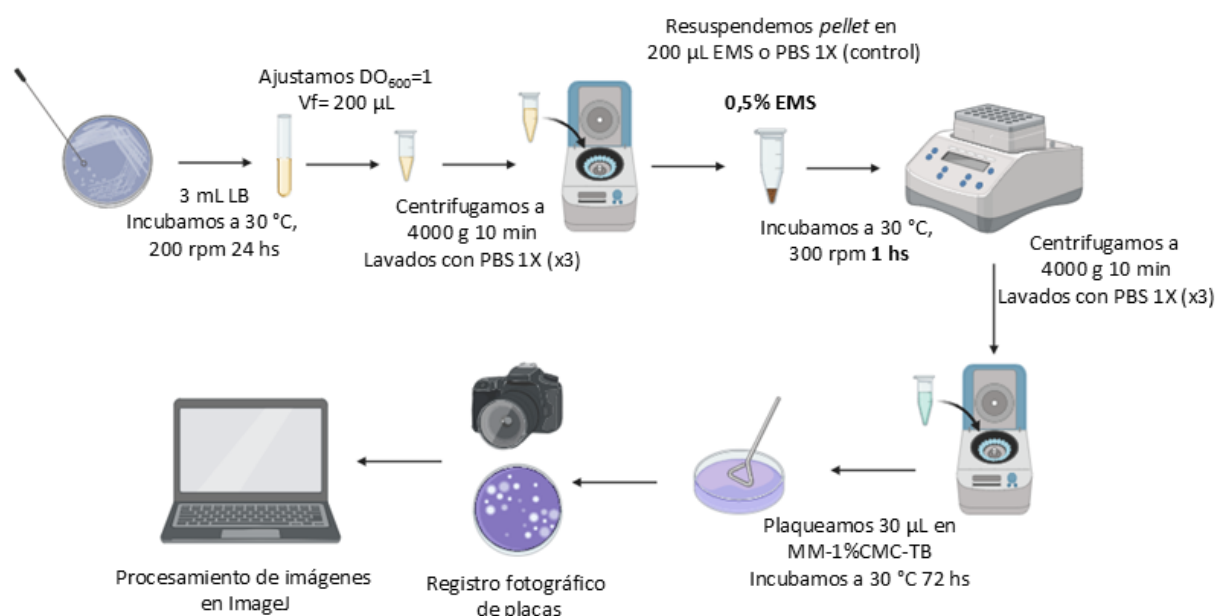


Figura M2: Esquema de mutagénesis química en *Cellulomonas* sp. B6. Cultivo iniciador del aislamiento en LB a partir de colonia aislada en placa (MM-1%CMC-TB) fresca. Condiciones de mutagénesis seleccionadas: 0,5% (v/v) EMS por 1 hs a 30 °C. EMS: Etilmetanosulfonato; MM: medio mínimo salino; CMC: carboximetilcelulosa; TB: Azul de Tripán. Figura realizada en plataforma Biorender (app.biorender.com).

Se seleccionaron aquellas colonias que presentaron una CH de 1,5 a 2 veces mayor que la cepa original. Las colonias seleccionadas a partir del *screening* en medio sólido fueron repicadas a una nueva placa (conservadas luego a 4 °C) y en 3 mL de LB líquido para obtener cultivos saturados (incubando a 30 °C por 24 hs) que fueron conservados a -80 °C con 25% (v/v) de glicerol.

4. 3. Ensayos de actividad enzimática de las mutantes

Para analizar la actividad CM Casa y xilanasa extracelular de las variantes mutagenizadas, se realizaron cultivos y se analizó la actividad en el sobrenadante de cultivo.

A partir de colonias aisladas en placas de las mutantes seleccionadas en el paso anterior, se inocularon 3 mL de LB y se incubaron a 30 °C y 200 rpm por 24 hs. La densidad óptica del cultivo inicial se ajustó a $DO_{600} = 1$ ($Abs_{600\text{ nm}}$) y se inocularon en una dilución 1/100, 3 mL de LB y MM suplementado con STDs o CMC como fuentes de carbono (1% p/v). Los cultivos se incubaron a 30 °C y 200 rpm por 48 hs en un agitador orbital. Como control, se incluyó la cepa original (sin mutagenizar) en las mismas condiciones. Todos los cultivos se realizaron por triplicado y con controles de sustrato (sin inoculación).

El crecimiento celular en cada cultivo fue evaluado a tiempo final (48 hs) midiendo la densidad óptica ($Abs_{600\text{ nm}}$) en las diluciones adecuadas ($Abs_{600\text{ nm}} \leq 1$) y utilizando los controles sin inocular como blanco. Estos valores fueron utilizados para normalizar los resultados de actividad enzimática. Los sobrenadantes de cultivo libres de células (E) se obtuvieron centrifugando los cultivos a 10.000 g, 4 °C por 20 min y conservados a 4 °C, hasta su uso para evaluar las actividades enzimáticas xilanasa y CM Casa, a partir de XIN (Sigma) o CMC (baja viscosidad, Sigma) como describió previamente Ghio y col. (2018). Brevemente, las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 100 μL con 0,5% (p/v) de XIN o 1% (p/v) de CMC (concentración saturante del sustrato) en buffer sodio-fosfato 50 mM pH 6, y 40 μL de E en diluciones adecuadas en agua destilada, incubando a 40 °C, 300 rpm durante 20 min (condiciones establecidas para el rango lineal de actividad).

La liberación de azúcares reductores fue determinada mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). Para ello, se incubaron 100 μL del producto de reacción de hidrólisis con 200 μL del reactivo ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (preparado según Miller, 1959), a 100 °C por 10 min y se colocaron en hielo durante 10 min. Luego se pasaron 200 μL de la reacción a una placa de 96 pocillos de fondo plano y se midió la absorbancia a 540 nm utilizando un equipo lector de microplacas (Multiskan Spectrum o Multiskan™ Sky Microplate Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific). Los azúcares reductores liberados se determinaron como equivalentes de glucosa (para la actividad CM Casa) o xilosa (para la actividad xilanasa) mediante el método utilizando curvas de referencia estándar de glucosa o xilosa (entre 0,05 y 1 mg/mL). A los valores de absorbancia obtenidos se les restaron los correspondientes a los controles y los equivalentes de azúcares reductores en mg/mL se estimaron utilizando la ecuación de la curva lineal obtenida a partir de los valores de la curva de referencia. Todos los ensayos enzimáticos se realizaron por triplicado y los controles incluyeron

reacciones realizadas con los extractos enzimáticos sin sustrato y sustrato sin enzima, así como medios no inoculados. Los pasos de la metodología empleada se encuentran representados en la Figura M3.



Figura M3: Esquema de obtención de sobrenadantes y evaluación de actividad enzimática CMCasa y xilanasa. Los sobrenadantes (E) se obtuvieron de cultivos de mutantes seleccionadas y de la cepa original en medio LB (E-CsLB), o en medio mínimo suplementado con 1% (p/v) de salvado de trigo desgrasado (E-CsSTds) o CMC (E-CsCMC). CMC: carboximetilcelulosa. XIN: xilano de madera de haya. Figura realizada en plataforma Biorender (app.biorender.com).

5. Producción de extractos enzimáticos extracelulares de *Paenibacillus xylanivorans*

5. 1. Producción de extractos enzimáticos en matraces

A partir del banco de *P. xylanivorans* en 25% glicerol a -80°C, se estiraron placas de LB-agar y a partir de colonias aisladas se inocularon cultivos iniciadores en 2 mL de medio LB, que se incubaron a 28 °C en un agitador orbital (Innova 42, New Brunswick) con agitación (200 rpm) por 24 hs, hasta alcanzar una Abs_{600 nm} de aproximadamente 1,3.

Para los cultivos en matraces, se inocularon 100 mL de MM sin fuente de carbono o suplementado con SAC, XIN, RAC, ST o BABe (en todos los casos 1% p/v o según se indica), en matraces de 500 mL con deflectores, con una dilución de los cultivos iniciadores correspondiente a una DO₆₀₀ inicial estimada de 0,01 (1 mL en 100 mL, aproximadamente). Los cultivos se incubaron a 28 °C y 200 rpm en un agitador orbital (Innova 42, New Brunswick) hasta alcanzar el tiempo final indicado en cada caso. Se tomaron muestras (0,5 mL) al inicio (T0, post- inóculo) y en los tiempos indicados en cada caso. Los extractos enzimáticos extracelulares (E) se obtuvieron mediante centrifugación (10.000 g, 20 min, 4 °C) y se conservaron con azida sódica al 0,04% (v/v) a 4 °C hasta su uso o a -80 °C para almacenamiento a largo plazo. Todos los cultivos se realizaron por triplicado (salvo indicación diferente), en paralelo con controles de sustrato no inoculados. Los pasos de la metodología empleada se encuentran representados en la Figura M4.

5. 2. Producción de extractos enzimáticos en biorreactores

Para la producción de extractos enzimáticos en biorreactores, se utilizaron dos fuentes de carbono en modo de cultivo discontinuo. Se empleó un biorreactor de mesada de 2 L (Bioflo 310, New Brunswick

Scientific; Edison, NJ, EE. UU.) utilizando MM-1%ST como sustrato, con un volumen de cultivo final de 1 L y un inóculo de 10 mL/L (cultivo iniciador en LB). La fermentación se llevó a cabo durante 24 hs a 28 °C, con una agitación de 600 rpm y 1 volumen de aire filtrado (0,22 µm) burbujeado por volumen de cultivo por minuto (VVM). Se tomaron muestras (10 mL) al inicio (T0, post-inoculo) y al final (T24 hs) del proceso (el extracto enzimático final correspondió al sobrenadante de cultivo de 24 hs y se denominó E-bPxST). Para el sustrato RAC, se utilizó un biorreactor de mesada de 7 L (Bioflo 110, New Brunswick Scientific), con un volumen de cultivo final de 2 L de MM-1%RAC. En este caso, la fermentación se realizó durante 72 hs utilizando las mismas condiciones descritas anteriormente: 28 °C, agitación de 600 rpm y 1 VVM de aire. Se tomaron muestras (10 mL) al inicio (T0, post inóculo) y cada 24 hs, correspondiendo el extracto enzimático final al sobrenadante de cultivo de 72 hs (E-bPxRAC). En ambas fermentaciones, el pH se midió utilizando electrodos de pH (Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Hessen, Alemania), el contenido de oxígeno disuelto (OD) se determinó utilizando sondas polarográficas (InPro6110/320, Mettler-Toledo GmbH) y la formación de espuma se evitó añadiendo un 3% (v/v) de agente antiespumante 204 (Sigma-Aldrich). El pH del cultivo se reguló mediante la adición automática de HCl 3N y NaOH 3N. Los extractos enzimáticos extracelulares (E-bPxST y E-bPxRAC) se obtuvieron mediante centrifugación (10.000 g, 20 min, 4 °C) y se conservaron con azida sódica al 0,04% (v/v) a 4 °C hasta su uso o a -80 °C para almacenamiento a largo plazo. Los pasos de la metodología empleada se encuentran representados en la Figura M4.

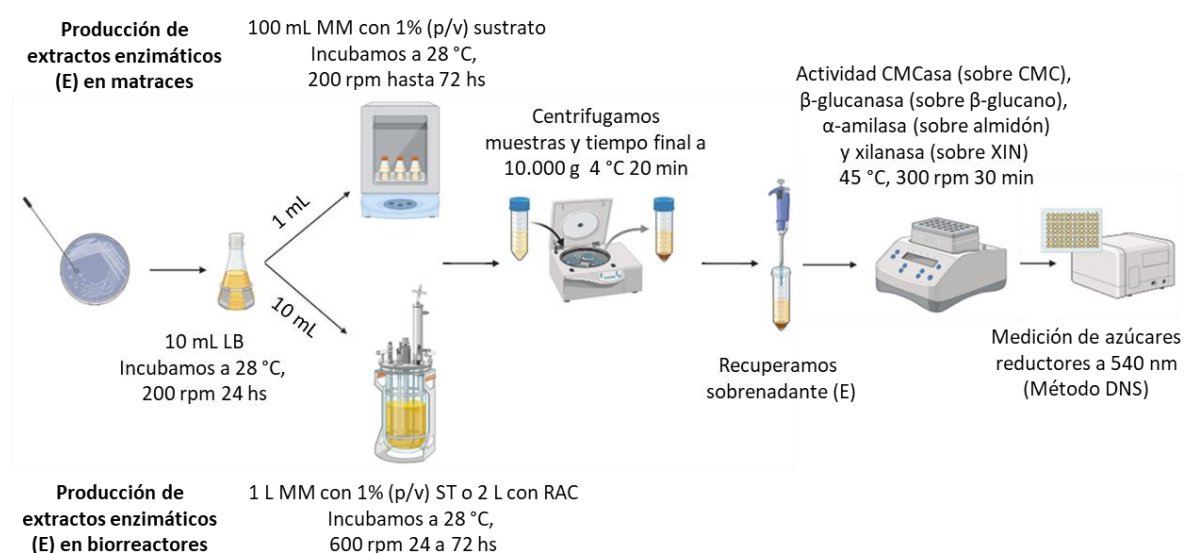


Figura M4: Esquema de obtención de extractos enzimáticos extracelulares de *Paenibacillus xylanivorans*. Producción en matraces con deflectores y en biorreactores de sobremesada. MM: medio mínimo. ST: salvado de trigo. RAC: residuo agrícola de caña de azúcar. CMC: carboximetilcelulosa. XIN: xilano de madera de haya. Figura realizada en plataforma Biorender (app.biorender.com).

5. 3. Estrategias de concentración y conservación de los extractos enzimáticos

Para la liofilización, se congelaron 650 mL del extracto E-bPxST a -80 °C y se colocaron en un liofilizador (EDWARDS Super Modulyo Freeze Dryer, Thermo Electron Corp.), a una presión de vacío de 1×10^{-1} mbar durante un máximo de 96 hs. Los extractos secos (E_L) obtenidos se pesaron para calcular el rendimiento y se almacenaron a -20 °C. Para los ensayos enzimáticos, se obtuvo una fracción enzimática de E_L diez veces concentrada en volumen (E_L -10X) disolviendo E_L en la cantidad adecuada de agua ultrapura. Alternativamente, se realizó una concentración por ultrafiltración utilizando Ultracel® 3K (Merck) y se obtuvo una fracción enzimática concentrada (E_U) después de varias rondas de centrifugación (4.000 g, 30 min, 20 °C) hasta alcanzar una concentración volumétrica de 8 veces.

5. 4. Espectrometría de masas de las proteínas secretadas

La identificación de las proteínas secretadas se realizó mediante espectrometría de masas en las tres réplicas biológicas de cada cultivo de 72 hs de incubación en matraz que contenía las diferentes fuentes de carbono (E-PxSAC, E-PxXIN, E-PxRAC, E-PxST y E-PxBABe), y en las muestras de 24 hs de fermentación del biorreactor (E-bPxST), con un enfoque similar al descrito previamente por Piccinni y col. (2019).

El contenido total de proteínas en cada muestra se cuantificó mediante el ensayo micro-BCA (kit micro-BCA, Thermo Fisher Scientific), utilizando el medio de sustrato sin inocular como control. La concentración de proteínas se estimó midiendo la absorbancia a 562 nm con un lector de microplacas (Multiskan Spectrum de Thermo Labsystems o Multiskan™ Sky Microplate Spectrophotometer). Las mediciones se realizaron por triplicado y la concentración de proteínas totales se determinó utilizando una curva lineal patrón de albúmina sérica bovina (BSA).

Las proteínas presentes en el sobrenadante (5 mL) se redujeron con ditioneitol (DTT) 10 mM durante 45 min a 56 °C en baño de agua. Luego se alquilaron con iodoacetamida (20 mM) durante 45 min en oscuridad, seguido de precipitación con ácido tricloroacético (TCA) (10 % p/p), 16 hs a 4 °C. Luego, se centrifugaron las muestras y el *pellet* se lavó dos veces con 1/10 volúmenes de acetona, y se dejó secar por evaporación bajo campana de solventes. Las muestras fueron enviadas al CEQUIBIEM (<http://cequibiem.qb.fcen.uba.ar/>) para el análisis por espectrometría de masas según sus protocolos estándar. Brevemente, las proteínas se digirieron con tripsina durante la noche a 37 °C y los digestos se analizaron mediante nano LC-MS/MS en un espectrómetro de masas Thermo Scientific QExactive acoplado a un nano HPLC EASY-nLC 1000 (Thermo Fisher Scientific). El equipo MS cuenta con una celda de disociación de alta colisión (HCD) para fragmentación y un analizador Orbitrap (Thermo Fisher Scientific; Q-Exactive). Los datos se adquirieron utilizando el software XCALIBUR 3.0.63 (Thermo Fisher

Scientific). Los datos brutos de Q-Exactive se procesaron con el software PROTEOME DISCOVERER (versión 2.1.1.21, Thermo Fisher Scientific) y se compararon con la base de datos de secuencias UniProt de *P. xylanivorans*, con especificidad para tripsina y un máximo de una escisión fallida por péptido. Los resultados de las proteínas se filtraron para obtener coincidencias de péptidos de alta confianza, con una tasa máxima de descubrimiento falso de proteínas y péptidos del 1%, calculada mediante una estrategia de base de datos inversa. La detección de al menos dos péptidos únicos se consideró segura para la identificación de la proteína.

Para la estimación de la abundancia relativa, se utilizó el índice de abundancia proteica emPAI, calculado por Sequest a partir de los datos de identificación de proteínas de toda la muestra. El contenido proteico expresado en porcentaje molar (emPAI%) se calculó utilizando la ecuación Eq 3 (Ishihama y col., 2005; Shinoda y col., 2010).

$$(Eq\ 3)\ emPAI\ (\%) = \frac{emPAI}{\sum(emPAI)} * 100$$

Los pasos de la metodología empleada se encuentran representados en la Figura M5.

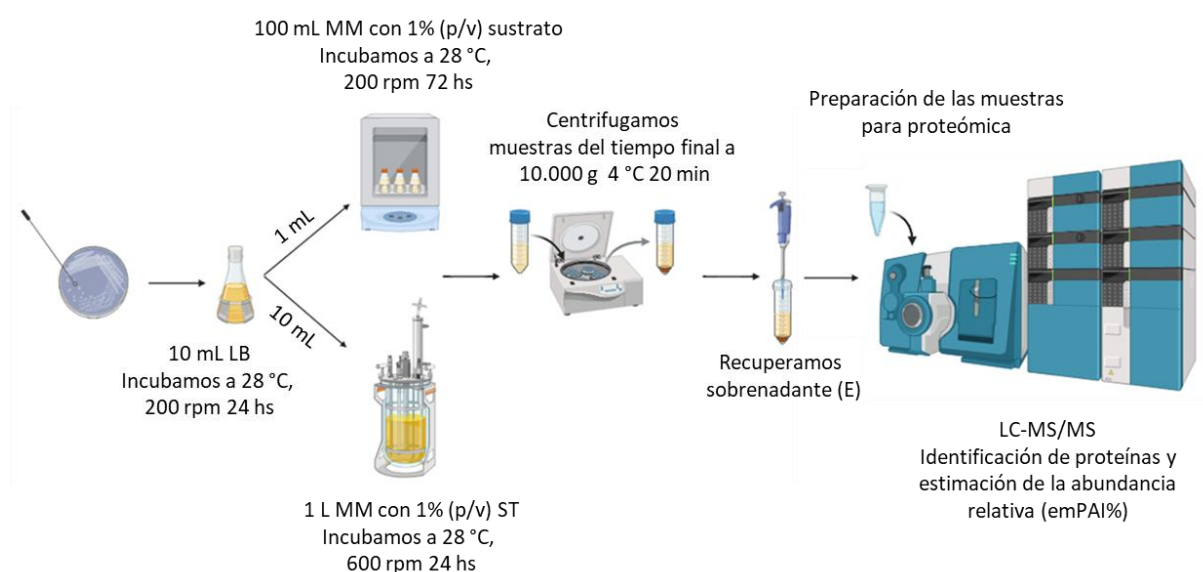


Figura M5: Esquema de obtención de extractos enzimáticos extracelulares de *Paenibacillus xylanivorans* para proteómica. Producción en matraces con deflectores (cultivos de 72 hs) y en biorreactor de sobremesada (cultivo de 24 hs). MM: medio mínimo. ST: salvado de trigo. Figura realizada en plataforma Biorender (app.biorender.com).

5. 5. Análisis de actividad enzimática de los sobrenadantes de cultivo

5. 5. a. Determinación de azúcares reductores por el método de reducción del ácido dinitrosalísílico (DNS)

Se determinaron las actividades xilanasa, CMCase, β -glucanasa y α -amilasa en los sobrenadantes de cultivo obtenidos. Los sustratos utilizados fueron XIN, CMC, β GC y/o α G mediante metodología previamente establecida en el grupo de trabajo (Ghio y col., 2018). Brevemente, las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 100 μ L con 0,5% (p/v) de XIN/ β G/ α G o 1% (p/v) de CMC en buffer sodio-fosfato 50 mM pH 6, y 40 μ L de extracto enzimático (E) en diluciones adecuadas en agua destilada, de manera de que la absorbancia obtenida esté comprendida en la curva lineal de referencia de glucosa (para glucanos y CMC) o xilosa (para XIN). Las reacciones se incubaron a 45 °C, 300 rpm durante 30 min. La liberación de azúcares reductores fue determinada mediante el método del DNS como se describió en la sección 4. 3 (pp. 43). Los azúcares reductores liberados se determinaron como equivalentes de glucosa para las actividades CMCase, β -glucanasa y α -amilasa o xilosa para la actividad xilanasa.

El efecto del pH sobre la actividad xilanasa y β -glucanasa se evaluó realizando las reacciones a 45 °C, 300 rpm por 30 min en buffer citrato-fosfato (pH 3-8) y buffer TRIS (pH 8-10) preparados según protocolo Sigma-Aldrich (detalle de los protocolos disponibles en [Centro de referencia de las disoluciones tampón](#)). El efecto de la temperatura se evaluó a un pH 5,5, 300 rpm por 30 min, en un rango de temperaturas de 30 °C a 75 °C. La estabilidad térmica del E se evaluó por pre-incubación de este en buffer a pH óptimo y a diferentes temperaturas (45 °C, 50 °C y 60 °C), con la toma periódica de muestras para la medición de la reacción enzimática correspondiente, en las condiciones indicadas previamente (45 °C, 300 rpm durante 30 min). Los resultados se expresaron como actividad enzimática residual en base a la inicial, es decir al porcentaje (%) de actividad respecto de la actividad máxima sin pre-incubar (100%).

Todos los ensayos enzimáticos se realizaron por triplicado y los controles incluyeron reacciones realizadas con enzima sin sustrato y sustrato sin enzima, así como extractos enzimáticos de medios no inoculados.

5. 5. b. Cálculo de unidades enzimáticas con azúcares reductores

Las unidades enzimáticas (UI/mL) se determinaron según la ecuación Eq 4 en las concentraciones de extracto enzimático y en el tiempo para los cuales la reacción es lineal. Se definen como la cantidad de extracto enzimático que libera 1 μ mol de azúcares reductores (equivalentes de xilosa o glucosa) en 1

min, a la temperatura y pH de la reacción. La actividad específica (UI/mg) se determinó en base a la concentración de proteínas totales, previamente establecidas por el método de micro-BCA descrito en la sección 5. 4 (pp. 46). Los pasos de la metodología empleada se encuentran representados en la Figura M4.

$$(Eq\ 4)\ Unidades\ enzimáticas\ (UI/mL) = \frac{azúcares\ reductores\ (mg/mL) * Vr\ (mL) * FD}{PM\ (mg/mL) * T\ (min) * Ve\ (mL)}$$

Abreviaturas: Vr: volumen de reacción; Ve: volumen de enzima, T= tiempo de reacción; PM: peso molecular de la glucosa (0,180 mg/μmol) o xilosa (0,150 mg/μmol); FD: factor de dilución del stock de enzima.

5. 6. Hidrólisis enzimática de xilanos comerciales y biomasa lignocelulósica

Los sustratos comerciales utilizados fueron XIN (P-XYLNBE, Megazyme), INX (proporcionado por Lenzing AG, Austria), OAX (viscosidad media, Sigma) y WAX (viscosidad media, P-WAXYM, Megazyme). Los ensayos de hidrólisis se llevaron a cabo en un volumen final de 1 mL con 5% (p/v) de sustrato en buffer sodio-fosfato 50 mM pH 6 y 500 UI_{xyn}/g_{biomasa} de E-bPxST_L -10x, incubando a 45 °C, 700 rpm durante 24 hs. Se utilizó el cóctel xilanolítico comercial NS22244 (Novozymes) como control a la misma dosis unitaria de actividad xilanasa (500 UI_{xyn}/g_{biomasa}). La biomasa lignocelulósica utilizada fue el residuo agrícola de caña de azúcar pretratado por extrusión alcalina (RACe). Brevemente, las reacciones se realizaron a 40 °C y 700 rpm durante 24 hs en un volumen final de 1 mL con 5% (p/v) RACe seco en buffer sodio-fosfato 50 mM y diferentes enzimas: 500 UI_{xyn}/g_{biomasa} de E-bPxST_L -10x (0,8 mg/mL); E-bPxST_L -10x suplementado con 0,125 mg/mL de CsAbf62A y/o EcXyl43 (que corresponden a 0,32 UI_{Abf}/g_{biomasa} y/o 1,3 UI_{Xyl}/g_{biomasa}, respectivamente). Las enzimas recombinantes CsAbf62A de *Cellulomonas* sp. B6 y EcXyl43 de *Enterobacter* sp., se produjeron como se describió previamente (Campos y col., 2014; Ontañón y col., 2018; Garrido y col., 2022). Se utilizó el cóctel xilanolítico comercial NS22002 (Novozymes) en una dosis equivalente en función de la actividad xilanasa (500 UI_{xyn}/g_{biomasa}). Todas las reacciones de hidrolisis se detuvieron mediante incubación a 100 °C durante 10 min y, a continuación, se centrifugaron a 10.000 g durante 20 min. El sobrenadante obtenido se conservó a -20 °C para el análisis posterior según se indica en cada caso y corresponde a los productos solubles de hidrólisis.

5. 7. Métodos cromatográficos para el análisis y cuantificación de azúcares

Los sobrenadantes correspondientes a la hidrólisis de los diferentes xilanos comerciales se analizaron mediante cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD), mientras que los sobrenadantes de las reacciones sobre RACe se utilizaron para

determinar xilosa (kit de ensayo de D-xilosa, Megazyme), glucosa (kit de glucemia, Wiener Lab) y L-arabinosa (kit de ensayo de L-arabinosa/D-galactosa, Megazyme) y los productos de hidrólisis fueron visualizados mediante cromatografía en capa fina (TLC).

5. 7. a. Análisis de azúcares por cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD)

Los productos de hidrólisis fueron filtrados (filtros de Nylon 45 μm) y se analizaron mediante HPAEC-PAD utilizando una columna Dionex CarboPac PA1 (Thermo Fisher Scientific) en un equipo Dionex ICS-3000 (Thermo Fisher Scientific). Tras equilibrar la columna con NaOH 50 mM durante 5 min, se inyectaron alícuotas de muestra de 20 μL y se separaron a un caudal de 0,4 mL/min a una temperatura constante de 30 °C. La elución comenzó con un flujo isocrático inicial de NaOH 100 mM, seguido de un gradiente de acetato de sodio de 0-200 mM en NaOH 100 mM, utilizando detección amperométrica pulsada. Los estándares de xilosa (X1), arabinosa y xilobiosa (X2) se procesaron en las mismas condiciones para permitir la detección y cuantificación mediante curvas estándar de 0,03 mg/mL a 1 mg/mL de cada azúcar (condiciones lineales). Se utilizó el software Chromeleon (Thermo Fisher Scientific) para el procesamiento y la adquisición de datos. Las áreas de los picos integrados se compararon con los estándares.

5. 7. b. Cromatografía en capa delgada (TLC)

El perfil de azúcares generado luego de las reacciones de hidrólisis se analizó cualitativamente por cromatografía en capa delgada en placas de silica gel (Merk). Las muestras y los azúcares estándares (0,25 mg/mL) se sembraron (2,5 μL) en un extremo de la placa a 1 cm del borde inferior y separadas entre sí por 1 cm, se dejaron secar durante 15 min a 30 °C. La placa sembrada se colocó en posición vertical dentro de una cuba de vidrio previamente saturada por incubación durante 2 hs con una solución solvente de butanol:ácido acético:agua (2:1:1). Cada placa se incubó permitiendo el ascenso del solvente por la misma, hasta alcanzar 1 cm por debajo del borde superior de la placa (2 hs aproximadamente), se retiró de la cuba y se dejó secar. Luego se repitió la corrida en las mismas condiciones y se secó la placa nuevamente. Por último, las placas se rociaron con una solución de agua:etanol:ácido sulfúrico (20:70:3) con orcinol al 1% (p/v) (Sigma-Aldrich). Se secaron nuevamente y se calentaron suavemente con una pistola de calor hasta que los azúcares se hicieron visibles. hexosas y pentosas). Todo el procedimiento se realizó dentro de una campana de extracción de vapores. Se realizó el registro fotográfico utilizando un sistema de documentación y análisis de geles G-Box Chemi HR16 (Syngene).

5. 7. c. Determinación colorimétrica de monosacáridos

Las concentraciones de glucosa, xilosa y arabinosa en los sobrenadantes correspondiente a la hidrólisis de RACe se determinaron empleando kits enzimáticos comerciales específicos para cada tipo de azúcar.

Para glucosa se empleó un kit de glucemia (Wiener Lab) siguiendo las indicaciones del fabricante adaptadas a una placa de 96 pocillos de fondo plano. Brevemente, 80 μ L del reactivo y 20 μ L de la muestra en la dilución adecuada y se incubó a 37 °C por 10 min. Luego se midió la absorbancia a 510 nm utilizando un equipo lector de microplacas (Multiskan Spectrum o Multiskan™ Sky Microplate Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific). Las mediciones se realizaron por triplicado y la concentración de glucosa se determinó utilizando una curva lineal referencia de entre 0,05 y 1 mg/mL de glucosa.

La xilosa y arabinosa se determinaron empleando los kits D-xilosa y L-arabinosa/D-galactosa de Megazyme, respectivamente, también adaptados a placa de 96 pocillos de fondo plano. Para xilosa, 5 μ L de sobrenadante se mezclaron con 141 μ L de la solución X1 y se incubaron a 25 °C por 5 min. Se midió la absorbancia a 340 nm (lectura 1) utilizando un equipo lector de microplacas (Multiskan Spectrum o Multiskan™ Sky Microplate Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific). Luego se añadieron 2,5 μ L del reactivo X2 y se incubó a 25 °C por 10 min. Se midió nuevamente la absorbancia a 340 nm (lectura 2). Para la determinación de arabinosa se mezclaron 115 μ L de la solución A1 con 5 μ L de sobrenadante y se incubó a 25 °C por 3 min. Se registró la absorbancia a 340 nm (lectura 1). Luego se adicionó 1 μ L del reactivo A2 y se incubó a 25 °C por 13 min. Se registró nuevamente la absorbancia a 340 nm (lectura 2). Todas las mediciones se realizaron por triplicado. Los valores de la lectura 1 obtenidos para cada caso fueron restados a los valores de la lectura 2, el valor final se empleó para calcular la concentración de xilosa o arabinosa utilizando una curva lineal de referencia de entre 0,05 y 1 mg/mL de xilosa o arabinosa, respectivamente.

5. 8. Cálculo del porcentaje de conversión de glucanos o xilanos

El porcentaje (%) de conversión corresponde al porcentaje de glucosa o xilosa que estaba formando parte del polímero y ahora se encuentra en estado libre. Se emplea un factor de corrección entre el monómero libre y cuando está formando parte del polímero, que corresponde a la molécula de agua. Para ello se aplica la ecuación Eq 5, siendo FC el factor de deshidratación (0,89 para xilosa o arabinosa, 0,94 para xilobiosa y 0,90 para glucosa).

$$(Eq\ 5) \ \% \ Conversion = \frac{([azúcar\ final\ (mg/mL)] * FC * 100)}{[azúcar\ inicial\ (mg/mL)]}$$

En el caso de biomasa o sustratos compuestos, se considera la composición porcentual de glucanos, xilanos o arabinanos que presentan para determinar la concentración inicial de azúcares.

6. Análisis *in silico* de secuencias de glicosil hidrolasas de la familia GH30 de *P. xylanivorans*

6. 1. Porcentaje de identidad de secuencias y agrupamiento en redes de subfamilias

Se analizó la homología de las secuencias A0A0M9BKV0 y A0A0M9BS59 con aquellas secuencias de enzimas caracterizadas y depositadas en la base de datos CAZy (<https://www.cazy.org/GH30.html>). Para ello se contrastaron las secuencias aminoacídicas completas utilizando la herramienta bioinformática BLASTp del NCBI (disponible en <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La secuencia A0A0M9BKV0 se comparó contra B1P195 de *Bifidobacterium breve* (Hyun y col., 2012) y E3TBJ4 de una bacteria del rumen no cultivable (Zhou y col., 2012); mientras que la secuencia A0A0M9BS59 se contrastó contra A3DJS9 de *Clostridium thermocellum* (Verma y Goyal, 2016), O24852 de *Aeromonas caviae* (Suzuki y col., 1997), H1ACZ7 de *Bacillus licheniformis* (Sakka y col., 2012), E1ACF9 de *Bacillus* sp. (Gallardo y col., 2010), Q45070 y H3K352 de *Bacillus subtilis* (Nishitani y Nevins, 1991; Park y col., 2012), A7M005 de *Bacteroides ovatus* (Rogowski y col., 2014), D2KFJ5 y A0A9E8BZS4 de *Cellulosilyticum ruminicola* (Cai y col., 2010; Liu y col., 2023), Q97TI2 de *Clostridium acetobutylicum* (Crooks y col., 2020), Q46961 de *Dickeya chrysanthemi* (Keen y Henrissat, 1996), I6Z823 de *Melioribacter roseus* (Rakitin y col., 2015), H6WCZ0 de *Paenibacillus barcinonensis* (Valenzuela y col., 2012), U6BPI6 de *Paenibacillus favisporus* (Padilha y col., 2014), P70733 *Paenibacillus* sp. (Dung y col., 1993), F1TBY8 de *Ruminiclostridium papyrosolvans* (St John y col., 2014), D4LE58 de *Ruminococcus champanellensis* (Morai y col., 2016), L7EXY1 de *Streptomyces turgidiscabies* (Maehara y col., 2018) y A0A1S5Y207 de una bacteria no cultivable (Ellilä y col., 2019).

Además, se construyó una Red de Similitud de Secuencias (SSN) utilizando la Herramienta de Similitud de Enzimas (EFI-EST, Zallot y col., 2019) y se visualizó con Cytoscape versión 3.9.1 (Kohl y col., 2011). Este análisis fue llevado a cabo por la Dra. Hebe Dionisi, quien colabora con el grupo de trabajo. Brevemente, el análisis incluyó secuencias de la familia GH30 de la base de datos CAZy (Drula y col., 2022), previa eliminación de secuencias redundantes mediante agrupamiento utilizando un punto de corte de identidad de secuencia del 100% en CD-HIT (Huang y col., 2010), y las seis secuencias proteicas de esta familia codificadas en el genoma de *P. xylanivorans* (A0A0M9BLT9, A0A0M9BMA0, A0A0N0C4N1, WP_053781470, A0A0M9BS59 y A0A0M9BKV0). Los alineamientos de secuencias se realizaron con Clustal ω (Larkin y col., 2007) en Jalview (Waterhouse y col., 2009). Los análisis filogenéticos se realizaron en MEGAX (Kumar y col., 2018), utilizando el método de máxima

verosimilitud con el mejor modelo identificado por el programa para cada grupo de secuencias, y un bootstrap de 100.

6. 2. Alineamiento múltiple

Se realizó un alineamiento múltiple de los módulos catalíticos utilizando la plataforma Clustal ω (Madeira y col., 2022), comparando la secuencia A0A0M9BKV0 (PxXyn30_8) con secuencias de GH30_8 caracterizadas y depositadas en la base de datos CAZy con las que presentó más del 75% de homología. Las secuencias empleadas fueron: H1ACZ7 de *Bacillus licheniformis* (Sakka y col., 2012), E1ACF9 de *Bacillus* sp. (Gallardo y col., 2010), Q45070 y H3K352 de *Bacillus subtilis* (Nishitani y Nevins, 1991; Park y col., 2012), H6WCZ0 de *Paenibacillus barcinonensis* (Valenzuela y col., 2012), U6BPI6 de *Paenibacillus favisporus* (Padilha y col., 2014) y P70733 *Paenibacillus* sp. (Dung y col., 1993). Las estructuras secundarias (láminas β y hélices α) fueron predichas empleando la información de la proteína cristalizada de *Paenibacillus barcinonensis* (PDB N° 4QAW, Sainz-Polo y col., 2014). El alineamiento se visualizó utilizando la plataforma Esprit 3.0 (Robert y Gouet, 2014).

7. Métodos para la amplificación y clonado de secuencias codificantes

7. 1. Condiciones de cultivo y extracción de ADN genómico de *P. xylanivorans*

Utilizando una colonia aislada del aislamiento *P. xylanivorans* A59 se inocularon 3 mL de medio LB líquido y se incubó a 28 °C y 200 rpm. Pasadas 16 hs se cosechó 1 mL del cultivo y se realizó una extracción de ADN genómico del *pellet* obtenido utilizando el kit comercial Genomic DNA Purification Kit (Promega), siguiendo las instrucciones especificadas para bacterias Gram positivas. Brevemente, las células se resuspendieron en 480 μ L de EDTA 50 mM y posteriormente se añadió 120 μ L de enzimas líticas (Cf= 5 mg/mL, 12 μ L de Lisozima 50 mg/ml + 108 μ L H₂O ultrapura estéril). La suspensión se incubó a 37 °C durante 30-60 min, se centrifugó a 13.000 g por 2 min y se descartó el sobrenadante. Luego, se añadieron 600 μ L de solución de lisis nuclear y se resuspendieron las células, incubando posteriormente a 80 °C durante 5 min para lograr la lisis, seguido de enfriamiento a temperatura ambiente. Se incorporaron 3 μ L de RNasa, mezclando por inversión, y se incubó la muestra a 37 °C durante 15-60 min, permitiendo luego el enfriamiento. El lisado tratado se combinó con 200 μ L de solución de precipitación de proteínas, se mezcló vigorosamente en vórtex durante 20 seg y se incubó en hielo por 5 min antes de centrifugar nuevamente a 13.000 g durante 3 min. El sobrenadante obtenido, que contenía el ADN, se transfirió cuidadosamente a un tubo limpio con 600 μ L de isopropanol, mezclando por inversión hasta visualizar la formación de filamentos; cuando se observaron, estos se recuperaron con varilla de vidrio y se transfirieron directamente a 600 μ L de etanol al 70%. Tras centrifugar 2 min a 13.000 g, se descartó el sobrenadante, se lavó el *pellet* con 600 μ L de

etanol al 70% mediante inversión suave y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones. El etanol se retiró con cuidado y el *pellet* de ADN genómico (ADNg) se dejó secar al aire durante 10-15 min. Luego, se añadieron 100 µl de solución de rehidratación para incubar a 55 °C durante 1 h (o alternativamente durante la noche a temperatura ambiente o 4 °C). Finalmente, el ADNg purificado se conservó entre 2 y 8 °C.

7. 2. Amplificación de fragmentos de ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se efectuaron en un termociclador MiniAmp Plus (Thermo Fisher Scientific) en un volumen final de 50 µL, conteniendo 60 ng de ADNg molde, buffer de reacción 1X (Promega), 0,2 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) (Promega), 0,4 µM de oligonucleótidos iniciadores específicos (Genbiotech) y 0,025 U/µL de enzima Go-Taq (Promega). Las muestras se amplificaron usando 30 ciclos de 30 seg a 95 °C, 30 seg ensayando tres temperaturas (50 °C, 52 °C y 55 °C) cercanas a las correspondientes a la de hibridación de los oligonucleótidos iniciadores determinados (Tabla M4, Anexo 1) y luego 1 min y 30 seg a 72 °C, dado el tamaño del amplicón (1 min cada 1000 pb). Se incluyó un paso inicial de desnaturalización de 2 min a 95 °C y un paso final de 10 min a 72 °C para completar la polimerización. El tamaño esperado de cada amplicón se especifica en la Tabla M4.

Tabla M4: Oligonucleótidos cebadores utilizados para la amplificación de los genes *pxxyn30_8* y *pxxyl30_2*.

Gen (oligonucleótido)	Secuencia 5'-3'*	Temperatura de hibridación (° C)	Tamaño del amplicón (pb)
<i>pxxyn30_8</i> (PxGH30_8 Fw)	AAAGGATCCGCGAATGATGTAACGATTAACCT	60,54	1272
<i>pxxyn30_8</i> (PxGH30_8 Rv)	AAACTCGAGTTATCAATTGCCTGCTATCTGG	60,40	
<i>pxxyl30_2</i> (PxGH30_2 Fw)	AAAGGATCCCTGACGTTACATGGCTATTCC	61,62	1353
<i>pxxyl30_2</i> (PxGH30_2 Rv)	AAACTCGAGTTACTAGCCTTCCGAGACAACA	61,73	

* los sitios de corte con enzimas de restricción se encuentran subrayados: GGATCC para *Bam*HI y CTCGAG para *Xho*I.

7. 3. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Los productos de PCR amplificados se separaron por electroforesis en geles de agarosa 0,8% (p/v) (en solución TAE 1X con 0,5 µg/mL de bromuro de etidio) y se identificaron de acuerdo con el tamaño esperado por comparación con un marcador de peso molecular conocido. Las muestras se prepararon para sembrar con buffer de siembra de ADN 5X y las corridas electroforéticas se realizaron a 100 V en buffer TAE 1X, a temperatura ambiente. Los geles se revelaron por exposición a luz UV y las bandas de

interés se cortaron del gel para purificar el ADN siguiendo las instrucciones de un kit comercial (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega) basado en la unión diferencial del ADN a una matriz de sílica. Los productos se eluyeron de dicha matriz con 30 μ L de H₂O libre de nucleasas.

7. 4. Preparación de células quimio-competentes de *Escherichia coli* y transformación

Las células de *E. coli* (DH5 α , BL21 o Rosetta) quimio-competentes se obtuvieron utilizando el método de Hanahan (1983). Para ello, se tomó una colonia aislada de una placa LB agar y se creció en 5 mL de medio LB líquido (suplementado con el antibiótico correspondiente en caso de que la cepa lo requiera) a 37 °C con agitación durante toda la noche y luego se re-inocularon 2 mL de este en 100 mL de medio LB líquido (inoculación 1/50). El cultivo se incubó a 200 rpm a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) de 0,4-0,6. Se enfrió en hielo durante 5 min y luego se centrifugó a 3.000 g durante 5 min a 4 °C. El precipitado de bacterias se resuspendió suavemente en 40 mL de solución TFB I fría, manteniendo siempre en hielo. Se volvió a centrifugar a 3.000 g durante 5 min a 4 °C y el precipitado se resuspendió en 4 mL de solución TFB II fría. Se incubó en hielo durante 5 min y se distribuyeron alícuotas de 100 μ L que se conservaron a -80 °C.

Para cada transformación, se incubaron 5 a 10 μ L de ADN plasmídico o de las reacciones de ligación (20-100 ng) con 100 μ L de células quimio-competentes durante 20 min en hielo. La transformación se realizó por shock térmico mediante el pasaje rápido de la mezcla de ADN y bacterias a 42 °C durante 2 min, seguido de una incubación en hielo durante 10 min. Las bacterias se recuperaron en 0,9 mL de medio LB líquido sin antibióticos durante 50 min a 37 °C. Se plaquearon 100 μ L del cultivo en placas con medio LB agar suplementado con el antibiótico correspondiente para la selección de los transformantes según la resistencia otorgada por cada plásmido utilizado (100 μ g/mL de Amp, 50 μ g/mL de Km). El resto del cultivo se centrifugó a 10 min a 5.000 g y las bacterias resuspendidas en 100 μ L del medio se plaquearon. Las placas se incubaron a 37 °C *over night* (16 hs).

7. 5. Clonado de secuencias nucleotídicas amplificadas por PCR en el vector pGEMT-Easy (Promega)

El vector pGEMT-Easy (Promega) permite la ligación de un producto de PCR amplificado utilizando polimerasas que dejan una adenina protruyente en el amplicón, como la enzima Taq Polimerasa. La ligación de los productos de PCR se realizó incubando 50 ng de plásmido con una relación molar vector: inserto de 1:5, en presencia de 3 U de T4 ADN Ligasa (Promega) en el respectivo buffer de ligación (Quick ligation buffer, Promega), *over night* (16 hs) a 4 °C y se utilizaron para transformar células quimio-competentes de la cepa DH5 α de *E. coli* (Thermo Fisher Scientific) (ver sección 7. 4, pp. 55). Los pasos de la metodología empleada se encuentran representados en la Figura M6.

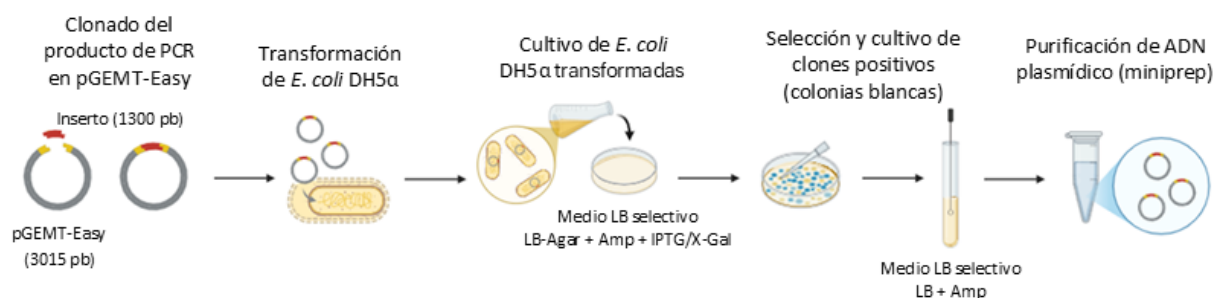


Figura M6: Esquema representativo de los pasos del proceso de clonado de insertos de interés en el pGEM®-T Easy. Amp: ampicilina. IPTG: isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido. X-Gal: 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β-D-Galactopyranoside. Figura realizada en plataforma Biorender (app.biorender.com).

7. 6. Purificación de ADN plasmídico (miniprep)

Para la extracción de ADN plasmídico se inoculó una colonia positiva aislada en 3 mL de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente y se incubó a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente, las bacterias se centrifugaron durante 2 min a 12.000 g. Para las preparaciones a utilizarse en reacciones de ligación o para secuenciación, el precipitado se trató utilizando el sistema de purificación Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) de acuerdo con el protocolo suministrado con el mismo. Para las preparaciones a utilizarse en *screening* de colonias, el precipitado se resuspendió en 300 µL de solución de resuspensión. Luego, se agregaron 300 µL de solución de lisis, se mezcló por inversión y se incubó en hielo 5 min. A continuación, se agregaron 300 µL de solución de neutralización, y se incubó en hielo durante 5 min. Se centrifugó por 10 min a 12.000 g a 4 °C. El sobrenadante se trasvasó a otro tubo y el ADN plasmídico se precipitó con 0,6 X volúmenes de isopropanol y se mezcló por inversión. Se centrifugó durante 10 min a 12.000 g a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. El precipitado se lavó dos veces con 500 µL de etanol 70% y se centrifugó nuevamente por 5 min a 12.000 g. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado, para luego resuspenderlo en 30 µL de H₂O libre de nucleasa con 1 µL de RNasa 4 mg/mL (Inbio Highway).

7. 7. Digestión con enzimas de restricción y desfosforilación de extremos compatibles

Las digestiones con endonucleasas de restricción se realizaron tratando 20 µg de plásmido con 5 U de enzima de restricción según corresponda (*Bam*HI/*Xho*I) utilizando los buffers y condiciones de reacción especificados por la empresa proveedora (Promega). Los productos de la digestión se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% (p/v), con bromuro de etidio. Los plásmidos linealizados y los fragmentos de interés (insertos) se cortaron del gel y purificaron utilizando el sistema comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

Los fragmentos de ADN digeridos se desfosforilaron previamente a la reacción de ligación utilizando la fosfatasa alcalina SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, Promega), en las condiciones indicadas por el fabricante.

7. 8. Clonado de insertos de interés con extremos en el vector pET28a (Novagen)

Se utilizaron 50 ng del vector pET28a (Novagen) y los ng de ADN (inserto) necesarios para lograr una relación molar de vector:inserto de 1:3, y se incubaron con 3 U la enzima T4 ADN ligasa (Promega), en las condiciones de reacción y buffer provistos por el proveedor. El producto de ligación se utilizó para transformar células quimio-competentes de la cepa DH5 α de *E. coli* (Thermo Fisher Scientific) (ver sección 7. 4, pp. 55). Los pasos de la metodología empleada se encuentran representados en la Figura M7.

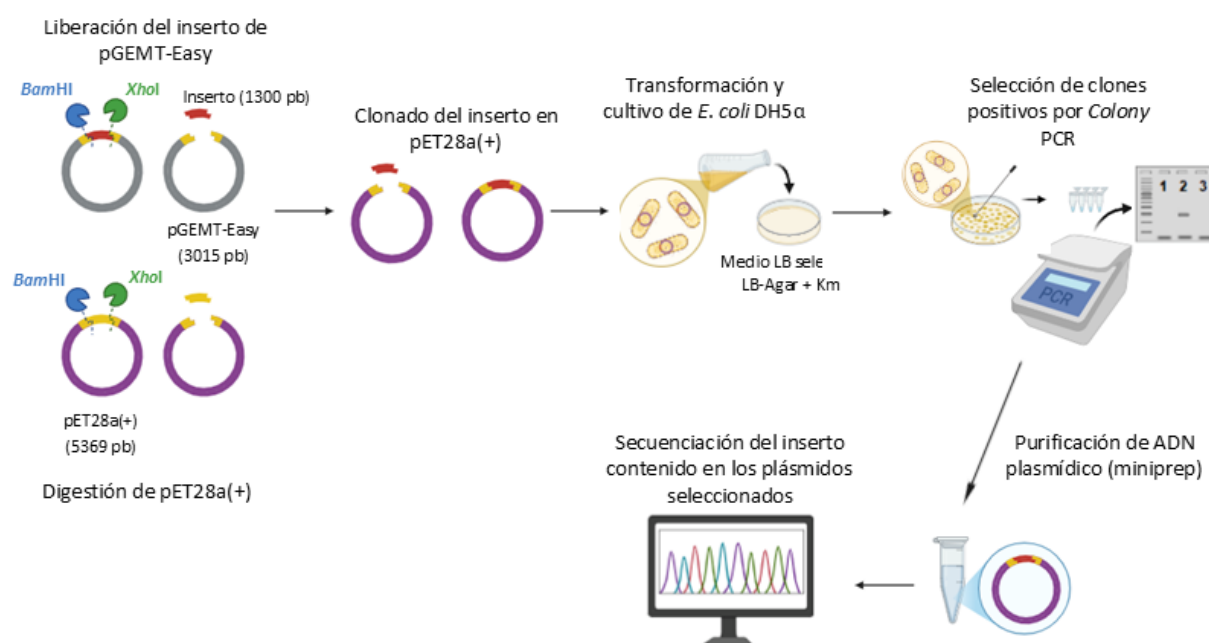


Figura M7: Esquema representativo de los pasos del proceso de clonado de insertos de interés en el vector de expresión pET28a (+). Km: Kanamicina. Figura realizada en plataforma Biorender (app.biorender.com).

7. 9. Selección de clones recombinantes de *E. coli*

En el caso de los clonados en el vector pGEMT-Easy, los clones positivos (colonias blancas) se seleccionaron mediante el crecimiento en placas de LB-agar suplementado con Amp, utilizando isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG)/5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β -D-Galactopyranoside (X-Gal). Para los clonados en el vector pET28a, los clones positivos fueron identificados por PCR de colonia (*colony* PCR). Para ello, entre 5 y 10 colonias fueron seleccionadas y con el objetivo de extraer su ADN se incubaron en 30 μ L de agua libre de nucleasas a 100 °C durante 5 min. Luego, se realizó una PCR en volumen final 10 μ L y temperatura de hibridación 55 °C conforme lo descrito en la sección 7. 2 (pp.

54). Los productos de amplificación se analizaron en gel de agarosa 0,8% (p/v), con bromuro de etidio. Se seleccionaron 2 clones positivos de cada construcción a partir de los cuales se realizó la extracción del ADN plasmídico utilizando el sistema de purificación Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) (ver sección 7. 6, pp. 56). La identidad y correcta inserción de los fragmentos de ADN en el sitio de clonado correspondiente se confirmó por secuenciación con los oligonucleótidos promotor T7 y terminador T7 para pET28a, utilizando los servicios de la empresa Macrogen (Corea).

Con los plásmidos resultantes, denominados pET28a:GH30_2.1 y pET28a:GH30_8.5, se transformaron bacterias quimio-competentes *E. coli* BL21 (DE3) y/o *E. coli* Rosetta (Novagen) y se plaquearon en LB-agar-Km y -Km/Cm, respectivamente (ver sección 7. 4, pp. 55).

8. Producción de proteínas recombinantes, purificación y cuantificación

Se inoculó una colonia transformada aislada (pET28a:GH30_2.1 o pET28a:GH30_8.5) en 5 mL de medio LB con Km 50 µg/mL (cepa BL21) o Km 50 µg/mL y Cm 34 µg/mL (cepa Rosetta) y se creció a 37 °C y 200 rpm durante toda la noche (16 hs). Al día siguiente, se realizó una dilución 1/50 de este cultivo en medio LB con Km 50 µg/mL y se incubó a 37 °C hasta una DO_{600} de 0,5-0,8. Para la inducción del gen recombinante se adicionó IPTG 1M, en distintas concentraciones finales (entre 0,5 y 1 mM) y distintas temperaturas de incubación (30 °C para BL21 y 20 °C para Rosetta) para determinar las condiciones óptimas de expresión soluble de la proteína recombinante (ver detalle de cepas en Anexo 2). Luego de aproximadamente 20 hs de incubación se cosecharon las células del cultivo por centrifugación a 4.000 g durante 30 min en frío y se descartó el sobrenadante. Las células cosechadas se resuspendieron en 0,1 volúmenes de buffer de lisis, con respecto al cultivo inducido, y se sometieron a dos rondas de congelado y descongelado, a -80 °C y 24 °C, respectivamente. La suspensión se sonicó en un total de 6 intervalos de 10 seg de pulso (30 amperes de intensidad) y con 10 seg de descanso entre ellos, durante 2 min. La fracción citoplasmática soluble se recuperó por centrifugación a 10.000 g por 30 min a 4 °C, conservándose a -20 °C para su análisis por SDS-PAGE (ver sección 9, pp. 59) o para la posterior purificación de la proteína recombinante por cromatografía de afinidad por iones (IMAC) con resina de agarosa Ni-NTA.

Las proteínas se purificaron mediante cromatografía de afinidad por iones (IMAC) con 0,5-1 mL de resina de agarosa Ni-NTA (Qiagen) en buffer de equilibrio pH 8, para lo cual se realizaron dos lavados con 4 mL de buffer de lavado y seis eluciones con 250-500 µL de buffer de elución (Tabla M2). Como soporte se utilizaron columnas de vidrio Econo-columns (Bio-Rad) que contienen, en la parte inferior, una cama de un polímero poroso que retiene partículas pequeñas y una llave de cierre. Los pasos de la metodología empleada se encuentran representados en la Figura M8.

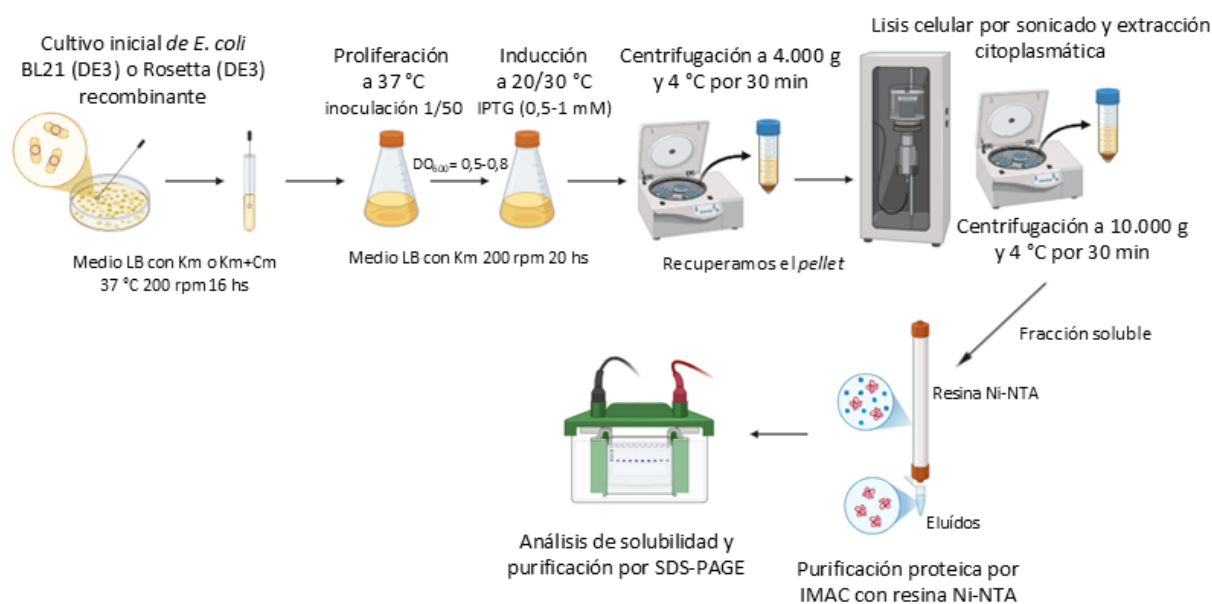


Figura M8: Esquema de producción de proteínas recombinantes en *E. coli*. IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido. Km: kanamicina. Cm: cloranfenicol. IMAC: cromatografía de afinidad por iones. Figura realizada en plataforma Biorender (app.biorender.com).

9. Electroforesis de proteínas en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las muestras proteicas se desnaturizaron en buffer de siembra de proteínas a 100 °C durante 5 min y se sembraron en geles desnaturizantes discontinuos de SDS-poliacrilamida 12% (v/v) (SDS-PAGE) conforme a la técnica descrita por Laemmli (Laemmli, 1970). Para la corrida electroforética se utilizó el sistema Mini Protean III System (Bio-Rad) en buffer Laemmli aplicando una corriente constante de 30 mA por el gel. Como marcador de peso molecular se utilizaron Precision Plus Protein Dual Color Standard (Bio-Rad) sembrando 3-6 μ L. Los geles de poliacrilamida se revelaron por tinción con una solución 0,2% (p/v) del colorante Azul de Coomassie R250 en 10% (v/v) ácido acético, 45% (v/v) etanol por 30 min, seguida de una destinción con 10% (v/v) ácido acético, 40% (v/v) etanol por 3-4 hs con al menos dos cambios de solvente hasta lograr una diferenciación nítida de las bandas de proteínas. Se realizó el registro fotográfico utilizando un sistema de documentación y análisis de geles G-Box Chemi HR16 (Syngene).

10. Ensayo de Western Blot

Las proteínas separadas por SDS-PAGE (ver sección 9., pp. 59) se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad), a 100 V constantes, durante 60 min en buffer de transferencia, utilizando el sistema de transferencia Mini Trans-Blot (Bio-Rad).

Las membranas con las proteínas transferidas se bloquearon en 5% (p/v) leche descremada en TBS 1X (TBS 1X - 5% LD) durante 16 hs a 4° C. Transcurrida la incubación, se reemplazó la solución de bloqueo por el anticuerpo anti-His tag policlonal (*His-tag Antibody, mAb, Mouse, Genscript*) diluido 1/5.000 en TBS 1X - 5% LD (2 µL en 10 mL de TBS 1X - 5% LD) y se incubó 1 h a temperatura ambiente con agitación suave. Luego se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con TBS 1X y se incubó la membrana con un segundo anticuerpo conjugado a fosfatasa alcalina (*Anti-Mouse IgG, AP, Sigma-Aldrich*) diluido 1/15.000 en TBS 1X - 5% LD (2 µL en 6 mL de TBS 1X - 5% LD) durante 1 h, seguido de 3 lavados de 10 min cada uno con TBS 1X. Luego del último lavado con TBS 1X se incubó la membrana durante 5 min en solución BREFA y se revelaron los anticuerpos conjugados a fosfatasa alcalina utilizando como sustrato cromogénico una mezcla de 33 µL de NBT (*Nitroblue Tetrazolium, 50 mg/mL, en dimetilformamida 70%, Promega*) y 16,5 µL de BCIP (5 bromo-4 cloro-3 indoil fosfato, 50 mg/mL en dimetilformamida 100%, Promega) en 5 mL de solución BREFA.

11. Cuantificación de proteínas totales en enzimas purificadas

Se cuantificó la concentración de proteínas de las fracciones de elución resultantes utilizando los datos de peso molecular y coeficiente de extinción molecular de cada proteína recombinante (Anexo 1) en un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). Otro método empleado fue el de Bradford adaptado a microplacas (Bradford, 1976) con el reactivo Protein Assay Dye Reagent Concentrated (Bio-Rad). Brevemente, 10 µL de muestra se mezclaron con 200 µL solución reactivo (dilución 1/5 en agua destilada). La concentración de proteínas se estimó midiendo con un lector de microplacas (Multiskan Spectrum de Thermo Labsystems o Multiskan™ Sky Microplate Spectrophotometer) la absorción del complejo colorante-enzima a 595 nm. Las mediciones se realizaron por triplicado y la concentración de proteína purificada se determinó utilizando una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA).

12. Caracterización bioquímica y especificidad de sustrato de PxXyn30_8 y PxXyl30_2

Todos los ensayos enzimáticos se realizaron por cuatriplicado y los controles incluyeron reacciones realizadas con enzima sin sustrato y sustrato sin enzima.

12.1. Actividad xilanasa

Las reacciones de prueba inicial para determinar actividad xilanolítica se llevaron a cabo en un volumen final de 100 µL con 0,5% (p/v) de XIN (Sigma) en buffer citrato-fosfato 50 mM pH 7, y 0,1 mg/mL de PxXyn30_8, incubando a 40 °C, 300 rpm durante 30 min.

El efecto del pH sobre la actividad enzimática se evaluó realizando las reacciones a 60 °C en buffer citrato-fosfato (pH 3-8) y buffer TRIS (pH 8-10). El efecto de la temperatura se evaluó a pH 6, en un rango de temperaturas entre 30 °C a 75 °C, determinando así las condiciones óptimas de reacción.

La estabilidad térmica se evaluó por pre-incubación de la enzima purificada a diferentes temperaturas (30-60 °C), con la toma periódica de muestras para la medición de la actividad xilanasa sobre XIN en las condiciones óptimas establecidas (60 °C y pH 6). Los resultados se expresaron en base a la actividad enzimática residual, es decir al porcentaje (%) de actividad respecto de la actividad máxima (100%).

Se ensayó también la actividad xilanasa sobre otros sustratos comerciales: 0,5% (p/v) XIN (Sigma), 0,5% (p/v) BAX (Megazyme), 0,5% (p/v) MeGX (Sigma), 0,5% (p/v) INX (Lenzing AG, Austria), 0,5% (p/v) WAX (baja viscosidad, Megazyme) o 2,5 mM *p*NP-X (Sigma). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 100 µL utilizando enzima 0,08 µM de *PxXyn30_8* (concentración final) y se incubaron a 60 °C y pH 6 durante 10 min.

Los azúcares reductores liberados se determinaron como equivalentes de xilosa mediante el método del DNS (ver sección 4. 3, pp. 43). Las unidades enzimáticas se calcularon utilizando los valores de azúcares reductores obtenidos y concentración de enzima purificada empleando la ecuación Eq 4, como se describió en la sección 5. 5. b. (pp. 48).

Finalmente, se valuó la actividad xilanasa sobre biomásas lignocelulósicas, incluyendo BABe, Eucam, Eucas y RACe. Para ello se llevaron a cabo reacciones de 200 µL en 50 mM buffer citrato-fosfato pH 6 utilizando 5% (p/v) de sustrato y 1 µM de *PxXyn30_8*, y se incubaron a 40 °C por 20 hs. Las reacciones se inactivaron a 100 °C durante 10 min y se centrifugaron para remover la biomasa residual (10.000 g por 15 min). Los sobrenadantes recuperados se emplearon para determinar el perfil de hidrolisis por TLC (ver sección 5. 7. b, pp. 50).

12. 2. Actividad β-xilosidasa

Las reacciones de prueba inicial para determinar actividad β-xilosidasa se llevaron a cabo en un volumen final de 100 µL con 2,5 mM de para-nitrofenil xilopiranosido (*p*NP-X) (Megazyme) en buffer citrato-fosfato 50 mM pH 7, y 0,1 mg/mL de *PxXyl30_2*, incubando a 40 °C, 300 rpm durante 30 min.

El efecto del pH sobre la actividad enzimática se evaluó realizando las reacciones en buffer citrato-fosfato (pH 4-8) a 40 °C. El efecto de la temperatura se evaluó a un pH 6,5, en un rango de temperaturas de 25 °C a 55 °C. La estabilidad térmica se evaluó por pre-incubación de la enzima purificada a diferentes temperaturas (30-40 °C), con la toma periódica de muestras para la medición de la reacción

enzimática correspondiente. Los resultados se expresaron en base a la actividad enzimática residual, es decir al porcentaje (%) de actividad respecto de la actividad máxima (100%).

Las reacciones se detuvieron con 200 µL de carbonato de sodio (2% p/v) y posteriormente 200 µL de cada reacción se sembraron en microplacas, para medir la absorbancia a 410 nm en espectrofotómetro (Multiskan™ Sky Microplate Spectrophotometer). Se utilizó como estándar una curva patrón de *p*-nitrofenol (*p*NP) (Sigma Aldrich), entre 0 y 1 mM, para determinar la concentración de *p*NP liberado en las reacciones como estimador de la actividad de la enzima. Finalmente, se calcularon las unidades enzimáticas utilizando los valores de *p*NP obtenidos.

Las unidades enzimáticas (UI/mL) se determinaron según la ecuación Eq 6 y se definen como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de *p*NP en 1 min a la temperatura y pH de la reacción.

$$(Eq\ 6)\ Unidades\ enzimáticas\ (UI/mL) = \frac{pNP\ (\mu mol/mL) * Vr\ (mL) * FD}{T\ (min) * Ve\ (mL)}$$

Abreviaturas: Vr: volumen de reacción; T= tiempo de reacción; FD: factor de dilución del stock de enzima; Ve: volumen de enzima.

La actividad específica de las enzimas purificadas (UI/mg) se determinó en base a la concentración de proteínas, previamente establecidas por el método de Bradford (ver sección 11, pp. 60).

La actividad β-xilosidasa/α-L-arabinofuranosidasa de *PxXyl30_2* se ensayó sobre 1 mg/mL XOS, con grados de polimerización (GP) de 2 a 6 (X2-X6, Megazyme), 1,5 mg/mL de arabino-xilo-oligosacáridos (AXOS), incluyendo 2,3-α-L-arabinofuranosil-xilotriosa (A²XX) o 3,3-α-L-arabinofuranosil-xilotetroosa (XA³XX) (Megazyme).

Además, se prepararon XOS y arabino-oligosacáridos (AOS) para ensayarlos como sustratos de *PxXyl30_2*. Brevemente, para la obtención de los XOS se incubó 0,5% (p/v) de XIN con 0,5 µM de *PxXyn10A* o 2 µM de *PxXyn11B* (Ghio y col., 2019) a 45 °C, 400 rpm por 10 min. Las reacciones se detuvieron a 100 °C 10 min. Para la preparación de AOS se incubaron 5 mg de AN con 1 mL ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 M a 80 °C por 60 min y se siguieron los pasos como se describe en Shi y col. (2020) y se ajustó el pH a neutro (pH 7).

Las reacciones sobre los XOS y AOS se realizaron en un volumen final de 100 µL a pH 6,5 utilizando 0,02 µM o 2 µM de *PxXyl30_2* y se incubaron a 40 °C y 300 rpm durante 60 min o a 30 °C y 300 rpm por 20 hs, según se indique en cada caso.

Asimismo, la adición de NAD⁺ (Solución 2 del kit de ensayo de L-arabinosa/D-galactosa, Megazyme) como cofactor de la actividad enzimática de *PxXyl30_2* se ensayó utilizando xilobiosa (X2) (Sigma) como sustrato. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μ L empleando 1 mg/mL de X2 en 50 mM buffer citrato-fosfato pH 6,5 y 0,1 mg/mL de enzima (concentración final), y se incubaron a 30 °C y 300 rpm por 20 hs.

La actividad de *PxXyl30_2* también fue ensayada sobre 5% (p/v) ST como suplemento del extracto E-*PxST*. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 200 μ L en 50 mM buffer citrato-fosfato pH 6 y 0,1 mg/mL de *PxXyl30_2* (concentración final) y 100 UI_{xyn}/g_{biomasa} de E-*PxST*, y se incubaron a 30 °C y 700 rpm por 20 hs.

Los productos de la hidrólisis de los distintos sustratos ensayados fueron analizados por TLC (ver sección 5. 7. b, pp 50).

12. 3. Otras actividades enzimáticas

Otros sustratos poliméricos para evaluar la especificidad enzimática: 1% (p/v) β G (Megazyme), CMC (baja viscosidad, Sigma), Avicel (Sigma), 0,75% (p/v) PASC (Sigma) y se midieron azúcares reductores totales, o 2,5 mM de *p*-nitrofenilarabinofuranósido (*pNP-A*), 2,5 mM de *p*-nitrofenilglucopiranosido (*pNP-G*) y 2,5 mM de *p*-nitrofenilcelobiósido (*pNP-C*) (Sigma) para analizar las actividades arabinofuranosidasa, β -glucosidasa y celobiosidasa, respectivamente.

Según se indique en cada ensayo enzimático, los azúcares reductores liberados se determinaron como equivalentes de xilosa o de glucosa mediante el método del DNS (ver sección 4. 3, pp. 43). Las reacciones sobre otros sustratos *pNP* se analizaron siguiendo el mismo procedimiento que para *pNP-X* (ver sección 12. 2, pp. 61). La actividad específica se calculó como se indica en las secciones 5. 5. b (pp. 48) y 12. 2 (pp. 61).

12. 4. Cinética enzimática

Para determinar el tipo de cinética enzimática de las enzimas purificadas se utilizaron concentraciones crecientes de XIN (0 a 30 mg/mL) (Sigma) para *PxXyn30_8* y de *pNP-X* (0 a 10 mM) (Sigma) para *PxXynl30_2* y se monitoreó la liberación de azúcares reductores (método DNS, ver sección 4. 3, pp. 43) y *pNP* (ver sección 12. 2, pp. 61), respectivamente. Las reacciones se llevaron a cabo en las condiciones óptimas pre-determinadas para cada enzima: 60 °C y pH 6 para *PxXyn30_8* y 40 °C y pH 6,5 para *PxXyl30_2*. Para cada concentración de sustrato utilizado se emplearon 4 réplicas y los controles incluyeron reacciones realizadas con enzima sin sustrato y sustrato sin enzima. Posteriormente, se

analizó el ajuste de los datos obtenidos para cada enzima al modelo de Michaelis-Menten utilizando el software GraphPad Prism versión 8.0 (GraphPad Inc.). A partir de este análisis, se determinaron los parámetros cinéticos K_M , V_{max} y K_{cat} . Además, se calculó la eficiencia catalítica (K_{cat}/K_M).

El efecto inhibitorio de monosacáridos se determinó añadiendo concentraciones crecientes de xilosa (X1), arabinosa (A1) o glucosa (G1) a la reacción en condiciones óptimas para *PxXyl30_2* (2,5 mM de *pNP-X*, pH 6,5 y 40 °C). El grado de inhibición de X1 se determinó añadiendo 15 mM de xilosa a la reacción estándar con concentraciones crecientes de *pNP-X* (0-10 mM). Los parámetros cinéticos se determinaron mediante el ajuste de los datos al modelo de Michaelis-Menten utilizando GraphPad Prism versión 8.0 (GraphPad Inc.). A partir de este análisis, se determinaron los parámetros cinéticos aparentes K_M (ap) y V_{max} (ap) y se calculó K_i empleando la ecuación Eq 7.

$$(Eq\ 7)\ K_i = I / (K_M(ap) / K_M - 1)$$

donde K_i (constante de inhibición) representa la concentración de azúcar a la que se observa una inhibición del 50%, I es la concentración de inhibidor utilizada (mM) y K_M (ap) y K_M son las constantes cinéticas obtenidas en presencia o ausencia de inhibidores competitivos o no competitivos, respectivamente.

13. Hidrólisis de xilano y biomasa lignocelulósica utilizando *PxXyn30_8*

13. 1. Identificación de productos generados por *PxXyn30_8* a partir de la hidrólisis del xilano

El patrón de corte de *PxXyn30_8* se analizó utilizando XIN (Sigma) al 0,5% (p/v) como sustrato. Se incluyó una α -glucuronidasa (GH67) *CsAgu67* (EC 3.2.1.139, Ontañón y col., en revisión), que requiere la unión del ácido urónico al residuo *Xylp* en el extremo no reductor para su hidrólisis, para determinar las decoraciones en el subsitio +1. Se incluyó *PxXyn10A*, una endo- β 1,4-xilanasa de la familia GH10 (EC 3.2.1.8, Ghio y col., 2018; de Mello Capetti y col., 2023a) como control positivo, ya que tolera las decoraciones de (Me)GlcA en -3, +1 y +3. La enzima *PxXyn11A*, endo- β 1,4-xilanasa de la familia GH11 (EC 3.2.1.8, Ghio y col., 2018; de Mello Capetti y col., 2023a) como control negativo, dado que tolera las decoraciones de (Me)GlcA en -3, +2 y +3. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo incubando a 30 °C durante 16 hs el sustrato con 0,1 μ M o 1 μ M (según se indique) de *PxXyn30_8* o *PxXyn10A*, individualmente o en combinación con 0,1 μ M o 1 μ M (según se indique) *CsAgu67* en 50 mM buffer citrato-fosfato pH 6. Las reacciones se detuvieron hirviéndolas a 100 °C durante 10 min y, a continuación, se centrifugaron a 10.000 g durante 20 min para remover posibles precipitados.

Los productos de reacción se visualizaron por TLC (sección 5. 7. b, pp. 50) y se analizaron mediante espectrometría de desorción/ionización láser asistida por matriz con detección de tiempo de vuelo (MALDI-TOF) y resonancia magnética nuclear (NMR) en el “Complex Carbohydrate Research Center” (CCRC) de la Universidad de Georgia (Athens, GA, USA).

13. 2. Análisis de PxXyn30_8 con otras xilanasas

La actividad xilanolítica simultánea de se analizó utilizando PxXyn30_8, PxXyn10A y PxXyn11B (Ghio y col., 2018). Las reacciones se llevaron a cabo utilizando 1 µM de cada enzima, individualmente o en combinación, sobre 0,5 % (p/v) XIN (Sigma) o 5% (p/v) BAbE en 50 mM buffer citrato-fosfato pH 6 y se incubaron a 40 °C durante 20 hs. Las reacciones se detuvieron hirviéndolas a 100 °C durante 10 min y, a continuación, se centrifugaron a 10.000 g durante 20 min.

Todos los ensayos enzimáticos se realizaron por triplicado y los controles incluyeron reacciones realizadas con enzima sin sustrato y sustrato sin enzima. Los azúcares reductores y la xilosa liberada se cuantificaron mediante el método DNS (ver sección 4. 3, pp. 43) y el kit de ensayo de D-xilosa (Megazyme), respectivamente (ver sección 5. 7. c, pp. 51). Todas las mediciones se realizaron por triplicado. Los productos de reacción se visualizaron mediante TLC (ver sección 5. 7. b, pp. 50).

Con los valores de xilosa obtenidos se calculó el índice de sinergismo (IS) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$(Eq\ 5)\ IS\ xilosa = \frac{X1\left(\frac{mg}{mL}\right)de\ la\ actividad\ conjunta}{X1\left(\frac{mg}{mL}\right)de\ E1 + X1\left(\frac{mg}{mL}\right)de\ E2}$$

Abreviaturas: X1: xilosa; E1: enzima 1; E2: enzima 2.

14. Hidrólisis enzimática de alimento animal

El extracto enzimático del cultivo de *P. xylanivorans* en ST (E-PxST) (ver sección 5. 2., pp.46) se liofilizó siguiendo los pasos descriptos en la sección 5. 3. (pp. 47) y se resolubilizó en agua ultrapura hasta alcanzar un factor de concentración volumétrica 25X. Se cuantificaron las proteínas totales por Bradford (ver sección 11, pp. 60) y la actividad xilanasas (como control interno) y β-glucanasa, utilizando 0,5% (p/v) XIN (Sigma) o βG (Megazyme), respectivamente (ver sección 5. 5. a, pp. 48).

El sustrato de reacción fue alimento para aves seco (*pellets* de soja-maíz) provisto por la empresa avícola CyB S.A. (Villa Elisa, Entre Ríos, Argentina), el detalle de la composición de los polisacáridos vegetales presentes en el alimento se detalla en la Tabla R17 (pp. 123).

Las reacciones de hidrólisis se llevaron a cabo en un volumen final de 1 mL a 37 °C y 250 rpm durante 24 hs utilizando 10% (p/v) alimento molido a polvo en buffer citrato-fosfato 50 mM pH 5,5 y diferentes concentraciones finales de E-PxST (determinadas como proteínas totales) según se indique en cada caso (0,15 mg/mL, 0,30 mg/mL y/o 0,60 mg/mL). Los ensayos enzimáticos se realizaron por cuatrimplicado y los controles incluyeron reacciones realizadas con enzima sin sustrato y sustrato sin enzima.

Las reacciones se procesaron según lo descrito por Plouhinec y col. (2024). Brevemente, luego de la hidrólisis, la fracción insoluble (*pellet*) se separó de la fracción soluble (sobrenadante) mediante centrifugación a 12.000 g y 4 °C por 15 min. Un volumen de NaOH 200 mM fue añadido a cada sobrenadante y se filtraron utilizando filtros de Nylon para jeringas de 0,45 µm. Los *pellets* obtenidos se lavaron dos veces con igual volumen de agua bidestilada y se secaron.

Las fracciones solubles se utilizaron para cuantificar el contenido total de proteínas por Bradford (ver sección 11, pp. 60), los azúcares reductores y la glucosa liberada mediante el método del DNS (ver sección 4. 3, pp. 43) y kit de glucemia (Wiener Lab) (ver sección 5. 7. c, pp. 51), respectivamente. Todas las mediciones se realizaron por duplicado.

Los *pellets* fueron utilizados para determinar peso seco. Para ello, se incubaron a 37 °C hasta peso constante y los valores obtenidos (mg) se utilizaron para calcular el porcentaje de materia seca residual utilizando la ecuación Eq 8.

$$(Eq\ 8)\ \text{Materia seca residual (\%)} = \frac{\text{masa de la materia seca residual luego de la hidrólisis (mg)}}{\text{masa de la materia antes de la hidrólisis (mg)}} * 100$$

15. Determinación de actividad antioxidante y compuestos fenólicos

Los productos de hidrólisis del BABE obtenidos en la sección 13. 2 (pp. 64) se concentraron por liofilización. Brevemente, los hidrolizados clarificados se congelaron a -80 °C y se colocaron en el liofilizador (EDWARDS Super Modulyo Freeze Dryer, Thermo 187 Electron Corp., Waltham, MA, EE. UU.), a un vacío de 1×10^{-1} mbar durante un máximo de 48 hs. Se produjeron productos de reacción concentrados quince veces en volumen (15X) disolviendo el polvo obtenido de los hidrolizados en la cantidad adecuada de agua ultrapura.

Los hidrolizados concentrados fueron purificados con carbón activado (CA) según lo descrito en Zhu y col. (2021). Brevemente, 300 µL de los hidrolizados se incubaron con 30 mg de CA (10% p/v) a temperatura ambiente y agitación suave (120 rpm) por 60 min. Luego se centrifugó a 10.000 g por 20 min y se recuperó el percolato (P1) y se lavó el CA con igual volumen de agua bidestilada. Se centrifugó

a 10.000 g por 10 min y se recuperó el percolado (P2). Las eluciones se llevaron a cabo añadiendo al CA igual volumen de etanol y centrifugando a 10.000 g 10 min, primero con etanol 50% (v/v) (E1) y luego con etanol 70% (v/v) (E2). Ambas eluciones (E1 y E2) se mezclaron y el etanol fue evaporado a 45 °C utilizando un *speed-vacuum* (Concentrator 5301, Eppendorf). Se cuantificaron los azúcares reductores totales por DNS (ver sección 4. 3, pp. 43). El perfil de los productos de reacción se visualizó mediante TLC (ver sección 5. 7. b, pp. 51).

15. 1. Ensayo de decoloración catiónica radical (ABTS⁺)

La actividad antioxidante se determinó mediante el ensayo de decoloración catiónica radical (ABTS⁺), descrito por Valls y col. (2018), adaptado a placas de 96 pocillos. En primer lugar, se preparó la solución ABTS⁺ añadiendo 44,5 µL de persulfato de potasio 140 mM (Sigma-Aldrich) a 2,5 mL de ABTS 7 mM (Sigma) y manteniéndola en oscuridad durante 16 hs. A continuación, el radical ABTS⁺ obtenido se disolvió en agua bidestilada hasta obtener una absorbancia a 730 nm (Abs730nm) de 0,70 ± 0,10. Se incubaron 20 µL de hidrolizados purificado a diferentes concentraciones de XOS (determinados como azúcares reductores) con 180 µL de solución ABTS⁺ en oscuridad durante 10 min a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 730 nm en espectrofotómetro Multiskan™ Sky Microplate Spectrophotometer. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

La actividad antioxidante se calculó como porcentaje de inhibición (ABTS⁺ In%) según la siguiente ecuación (Eq 9):

$$(Eq\ 9)\ ABTS^+ \text{ In } (\%) = 100 \left[\frac{(A_i - A_f)}{A_i} \right]$$

Donde A_i es el valor de ABTS⁺ Abs730nm del blanco (agua bidestilada) y A_f es el valor de ABTS⁺ Abs730nm tras el contacto con la muestra (hidrolizados purificados). El ABTS⁺ In (%) de las muestras se consideró como el porcentaje de su actividad antioxidante. Se utilizó ácido gálico (Biopack) como control positivo.

15. 2. Ensayo colorimétrico de Folin-Ciocalteu (FC)

El contenido fenólico total se determinó mediante el ensayo FC siguiendo el protocolo descrito en Munteanu y Aptrei (2021), con algunas modificaciones. Para el análisis, se incubaron 10 µL de los hidrolizados purificados, adecuadamente diluido, con 40 µL de reactivo FC (Biopack) y 160 µL de NaCO₃ 700 mM (Sigma) en oscuridad durante 30 min a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 740 nm en espectrofotómetro Multiskan™ Sky Microplate Spectrophotometer. Los resultados se

expresaron como equivalentes de ácido gálico (GAEq) utilizando una curva de calibración de 0-100 μM de ácido gálico (Biopack). Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

16. Tratamiento de plantas de tabaco con xilo-oligosacáridos (XOS)

16. 1. Obtención de XOS

Las reacciones de hidrólisis se llevaron a cabo en un volumen final de 25 mL a 40 °C y 200 rpm durante 24 hs utilizando 5% (p/v) BABe y RACe en buffer citrato-fosfato 50 mM pH 6 y 100 $\text{U}_{\text{Xyn}}/\text{g}_{\text{biomasa}}$ de E-PxST (ver sección 5. 1, pp. 44). Las reacciones se detuvieron hirviéndolas a 100 °C durante 10 min y, a continuación, se centrifugaron a 10.000 g durante 20 min. Todos los ensayos enzimáticos se realizaron por cuatuplicado y los controles incluyeron reacciones realizadas con enzima sin sustrato y sustrato sin enzima. Los productos de reacción se visualizaron mediante TLC (ver sección 5. 7. b, pp. 50). Los azúcares reductores y la glucosa liberada se cuantificaron mediante el método del DNS (ver sección 4. 3, pp. 43) y kit de glucemia (Wiener Lab), respectivamente. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

16. 2. Tratamiento de plantas con XOS

La capacidad de los XOS obtenidos (ver sección 18. 1., pp. 68) como promotores de la inmunidad antiviral fue ensayada en el modelo experimental *Nicotiana tabacum* (planta de tabaco) en colaboración con el grupo de trabajo del Dr. Sebastián Asurmendi, que cuentan con un modelo experimental puesto a punto para evaluar el impacto de diversas moléculas en la producción de inmunidad utilizando la infección viral TMV (*Tobacco mosaic virus*). El ensayo se realizó llevando a cabo el protocolo descrito por Caro y col. (2022).

Se prepararon soluciones de tratamiento al 10% (v/v) de los XOS, de los auto-hidrolizados de BABe y RACe y del extracto E-PxST inactivado por calor en 50 mM buffer fosfato pH 7,2. Estas soluciones fueron aplicadas por aspersión foliar, en condiciones controladas, aplicando solo buffer como control negativo y el bioinductor comercial Taisei® como control positivo (<https://summit-agro.com/ar/es/producto/taisei-bioinductor-vegetal-concentrado/>), el cual es obtenido a partir de proteínas solubles de *Acremonium strictum* SS71.

Las plantas de tabaco fueron preparadas en los invernáculos del IABIMO (INTA-Castelar). Se utilizaron 10 plantas por condición, con 1 planta por maceta, en invernáculo bajo temperaturas controladas entre 20 °C y 26 °C y ciclos luz/oscuridad de 16/8 hs.

Los tratamientos fueron aplicados en un esquema de dos dosis: la primera se llevó a cabo 7 días antes del desafío con el virus y la segunda (*boosting* o dosis refuerzo) se aplicó 2 días previos. Un día antes de aplicar el *boosting* se realizó el corte del ápice de las plantas para favorecer la expansión foliar. Luego de 48 hs post dosis refuerzo, las plantas se desafiaron con la aplicación de virus semi-purificado (TMV) por frotado generando lesiones superficiales en solo una hoja de cada planta. Trascurridas las 72 hs se verificó la actividad biológica por aparición de sintomatología de infección, mediante el recuento de lesiones necróticas por hoja infectada.

17. Métodos de análisis estadísticos

Se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) o la prueba t pareada a los conjuntos de datos, según se indica. En todos los casos, se verificó la normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilks modificada. La prueba a posteriori de Fisher y la prueba de Shapiro-Wilks se realizaron con InfoStat/L versión gratuita 2020 (Di Rienzo y col., 2020). La prueba t pareada se realizó con el software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EE. UU.). Los resultados se presentan como medias y desviaciones estándar de las réplicas, y el nivel de significancia fue del 5% ($p < 0,05$) para todas las pruebas.

Resultados

**Capítulo I: Mejoramiento de la actividad celulolítica y
xilanolítica extracelular de *Cellulomonas* sp. B6**

Bacterias pertenecientes al género *Cellulomonas* presentan la capacidad de degradar celulosa y hemicelulosa (Domingues y col., 2022; Benatti y Polizeli, 2023). En estudios previos del grupo de trabajo, se obtuvo un aislamiento bacteriano a partir de una muestra de suelo de bosque subtropical nativo preservado de Misiones (Argentina) con actividad xilanolítica y celulolítica extracelular. El aislamiento denominado *Cellulomonas* sp. B6 muestra una estrecha relación filogenética con *Cellulomonas flavigena* y *Cellulomonas persica*, según el análisis de la subunidad 16S del ARN ribosomal (Piccinni y col., 2016). No obstante, los valores de identidad promedio de aminoácidos (AAI) y nucleótidos (ANI), junto con los resultados de la hibridación ADN-ADN (DDH) realizada *in silico*, indican que *Cellulomonas* sp. B6 podría constituir una especie aún no descrita (Piccinni y col., 2019).

El cultivo de *Cellulomonas* sp. B6 utilizando distintas biomásas lignocelulósicas como única fuente de carbono resultó en la inducción de la expresión y secreción de un repertorio amplio y diverso de enzimas activas sobre carbohidratos (CAZimas), las cuales fueron identificadas mediante espectrometría de masas (Piccinni y col., 2019; Ontañón y col., 2021). Estos antecedentes indican que *Cellulomonas* sp. B6 constituye una fuente promisoría de enzimas degradadoras de lignocelulosa, con potencial aplicación en diversos bioprocesos. Considerando que la organización genómica de los genes involucrados en esas actividades puede incidir tanto en su regulación como en los niveles de secreción, resulta fundamental integrar el análisis fenotípico con la caracterización genómica. En este contexto, en el presente trabajo se completó el estudio genómico de la cepa mediante una nueva secuenciación genómica y ensamblado, lo que permitió obtener el genoma en un único *contig*, en contraste con los 280 *contigs* reportados previamente, y se examinó la localización genómica de las CAZimas previamente identificadas en los sobrenadantes de cultivo (Piccinni y col., 2019; Ontañón y col., 2021), así como los posibles reguladores implicados en su expresión.

En la actualidad, el costo asociado a la producción de enzimas representa un factor clave para la viabilidad de los procesos biocatalíticos; por lo tanto, la identificación de enzimas eficientes y de fácil producción resulta esencial para minimizar las limitaciones de su aplicación. En este sentido, la utilización de agentes mutagénicos para la mejora de cepas bacterianas y fúngicas productoras de CAZimas extracelulares ha sido utilizada exitosamente (Ponce-Noyola y de la Torre, 1995; Seidl y Seiboth, 2010; Sangkharak y col., 2012; Bhatia y col., 2017). En este marco, en esta tesis se evaluó la mutagénesis química como estrategia para incrementar la actividad extracelular celulolítica y xilanolítica de *Cellulomonas* sp. B6.

I. A. Análisis del contexto genómico de CAZimas de *Cellulomonas* sp. B6

El genoma de *Cellulomonas* sp. B6 fue obtenido previamente utilizando la plataforma Illumina MiSeq y se encuentra anotado en 280 *contigs* (Piccinni y col., 2016, numero de acceso NCBI: LNTD000000000.1). Una nueva secuenciación se llevó a cabo mediante la plataforma miniON. El complemento de la información obtenida mediante ambas metodologías de secuenciación permitió obtener un único *contig* con toda la información. El *contig* presentó una longitud total de 4.049.253 pb y un contenido de GC del 75,05%, estos valores son consistentes con los datos previos de secuenciación (Piccinni y col., 2016).

En primera instancia se analizó el genoma completo de la nueva secuenciación mediante la plataforma dbCAN3 (<https://bcb.unl.edu/dbCAN2/blast.php>). Se identificaron en total 170 dominios CAZy asociados con la deconstrucción de polímeros lignocelulósicos (celulosa, hemicelulosa y lignina), que incluyen glicosil hidrolasas (GHs), carbohidrato esterasas (CEs), glicosil transferasas (GTs), actividades auxiliares (AAs), polisacárido liasas (PLs) y módulos de unión a carbohidratos (CBMs) (Figura R1A).

El análisis detallado de las secuencias mostró que 65 de estas 170 CAZimas formarían parte del secretoma teórico de la bacteria. Se predijo que 42 de ellas presentan péptido señal compatible con la vía clásica de secreción, mientras que 23 proteínas adicionales se predicen como secretadas por vías no clásicas, independientes de la secuencia del péptido señal (Figura R1B, Anexo 3). Estos resultados difieren ligeramente de los obtenidos previamente a partir del genoma secuenciado por Illumina MiSeq (conformado por 279 *contigs*) y analizado con el servidor dbCAN2, donde se habían identificado 205 dominios CAZy, de los cuales 75 conformaban el secretoma teórico. Las discrepancias más marcadas se observaron en el número de CEs (34), GTs (57), AAs (10) y CBMs (12) predichos previamente (Piccinni y col., 2019).

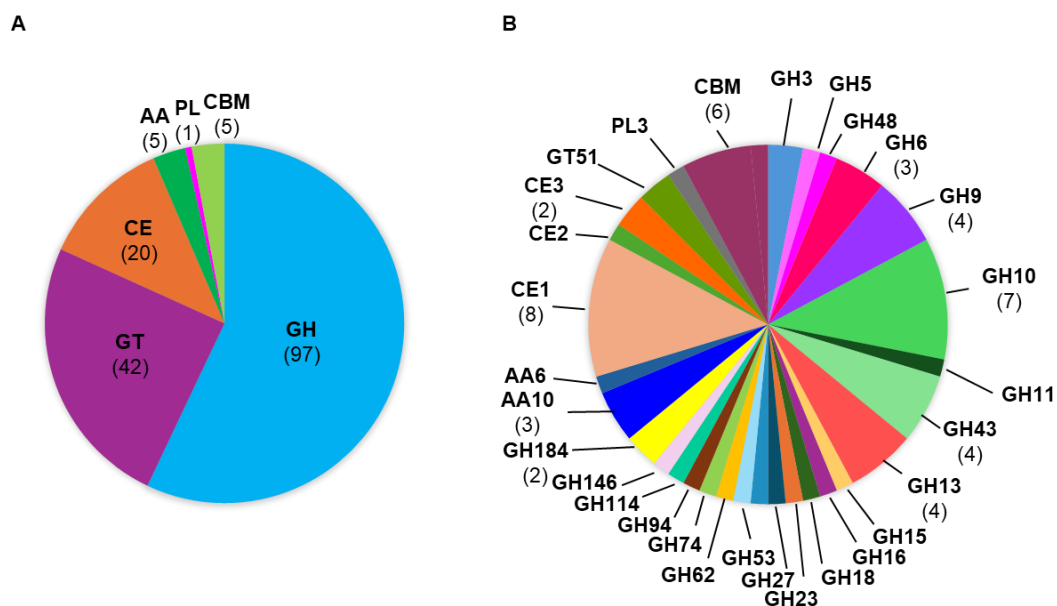


Figura R1: Análisis bioinformático de los dominios CAZy predichos en el genoma de *Cellulomonas* sp. B6. A) Distribución de los 170 dominios CAZy inferidos en dbCAN. **B)** CAZimas que conforman el secretoma teórico. El número de proteínas representantes de cada dominio y familia es indicado entre paréntesis.

Dependiendo de las condiciones de cultivo *Cellulomonas* sp. B6 secreta un repertorio de CAZimas activas sobre distintos polisacáridos, incluyendo xilanasas y β -xilosidasas de la familia GH10, GH11 y GH43, glucanasas de las familias GH9, GH6, GH48 y GH16, y algunas enzimas con actividades accesorias o desramificantes como α -L-arabinofuranosidasa (GH62) y α -galactosidasa (GH27). Estas enzimas están presentes en los sobrenadantes de cultivo en diferente abundancia relativa dependiendo de la fuente de carbono utilizada (Anexo 4) (Piccinni y col., 2019; Ontañón y col., 2021).

Para analizar si su expresión está relacionada con su localización y contexto genómico, se analizaron aquellas secuencias correspondientes a las CAZimas que se identificaron en los sobrenadantes de cultivo obtenidos y analizados previamente por el grupo de trabajo (Anexo 4) (Piccinni y col., 2019; Ontañón y col., 2021). Si bien en numerosos géneros bacterianos las enzimas involucradas en el uso de carbohidratos complejos se encuentran agrupadas en el genoma, conformando *loci* de utilización de polisacáridos (PULs) (Golan y col., 2004; Christopherson y col., 2013; Sawhney y col., 2016; Grondin y col., 2017; Christiansen y col., 2020), en *Cellulomonas* sp. B6 las secuencias analizadas se distribuyen en todo el genoma, sin evidenciar una agrupación en regiones específicas del cromosoma bacteriano. En muchos casos, las secuencias están flanqueadas por genes codificantes para componentes de la familia de transportadores ABC, involucrados en el transporte de azúcares, y por reguladores transcripcionales. Es destacable que en la gran mayoría de las secuencias analizadas se identificaron secuencias flanqueadas que codifican proteínas hipotéticas de función aún desconocida y por genes no relacionados con la utilización de polisacáridos (Figuras R2 y R3).

Al analizar las CAZimas activas sobre hemicelulosa, y en particular aquellas con actividad sobre xilano, se detectó una alta prevalencia de reguladores transcripcionales globales de las familias LacI (la más representada), LuxR, PadR y el regulador sensible a xilosa ROK (Figura R2). Por su parte, las CAZimas con actividad sobre celulosa (Figura R3) se asociaron a reguladores LacI y AcrR, entre los observados con mayor frecuencia, y GntR, relacionado con el metabolismo de la glucosa. Estos resultados indican una posible participación de múltiples rutas de señalización en la regulación de la expresión de estas enzimas.

Aunque las secuencias correspondientes a CAZimas se encuentran distribuidas a lo largo de todo el genoma de *Cellulomonas* sp. B6, en algunos casos se observó una disposición contigua o en la misma región genómica. Esta organización podría sugerir la existencia de regiones funcionales asociadas con la degradación coordinada de polisacáridos complejos. Por ejemplo, la secuencia codificante de la endo-xilanasa extracelular CsXyn10D se ubica inmediatamente aguas abajo de una secuencia que codifica una potencial β -xilosidasa/ α -L-arabinofuranosidasa extracelular de la familia GH43 (AOA0V8SMY7). Ambas enzimas fueron identificadas en los sobrenadantes obtenidos a partir de cultivo en residuo de caña de azúcar (E-CsRAC) y en salvado de trigo (E-CsST), lo que sugiere una co-expresión de ambas enzimas en estas condiciones de cultivo y que podrían estar formando una unidad génica. De manera similar, una enzima GH27 con potencial actividad α -galactosidasa (AOA0V8TC25), que remueve sustituciones de galactosa presentes en la cadena principal del xilano, se encuentra aguas arriba de otra secuencia codificante para una β -xilosidasa/ α -L-arabinofuranosidasa de la familia GH43 (AOA0V8TBM3), relacionada a la desramificación e hidrólisis de xilo-oligosacáridos, y ambas fueron detectadas en el sobrenadante E-CsST (Figura R2). Un patrón similar se observa para una endo-glucanasa de la familia GH9 (AOA0V8TA57), predicha como activa sobre celulosa, que se localiza aguas abajo de una potencial β -glucosidasa intracelular GH3 (AOA0V8T8K6). Ambas enzimas fueron identificadas en el sobrenadante E-CsST (Figura R3) (Ontañón y col., 2021).

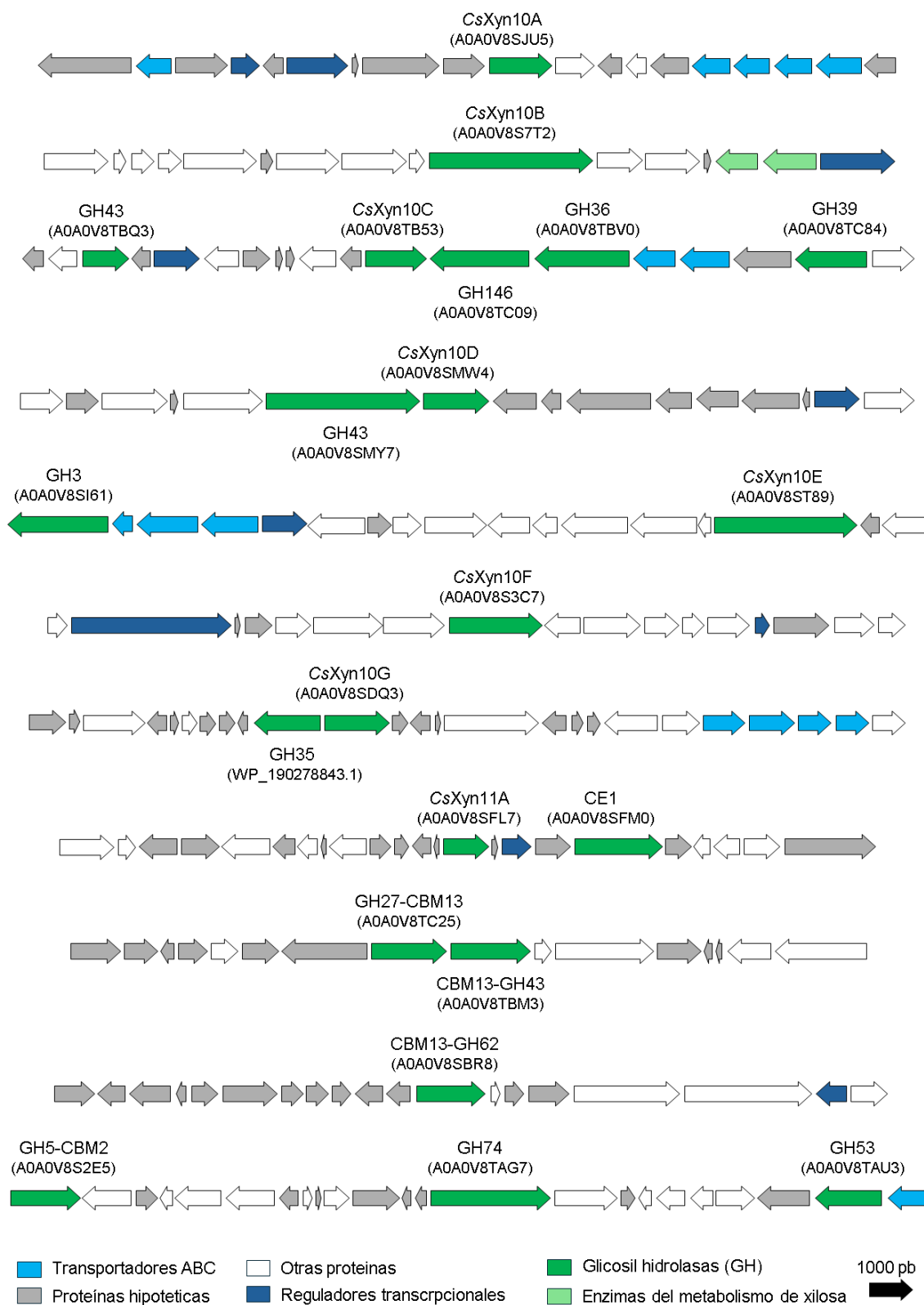


Figura R2: Contexto genómico de glicosil hidrolasas activas sobre hemicelulosa codificadas por *Cellulomonas* sp. B6. CsXyn xilanasas pertenecientes a la familia de Glicosil hidrolasas GH10 y GH11. Ente paréntesis se indica el número de acceso UniProt correspondiente a cada enzima.

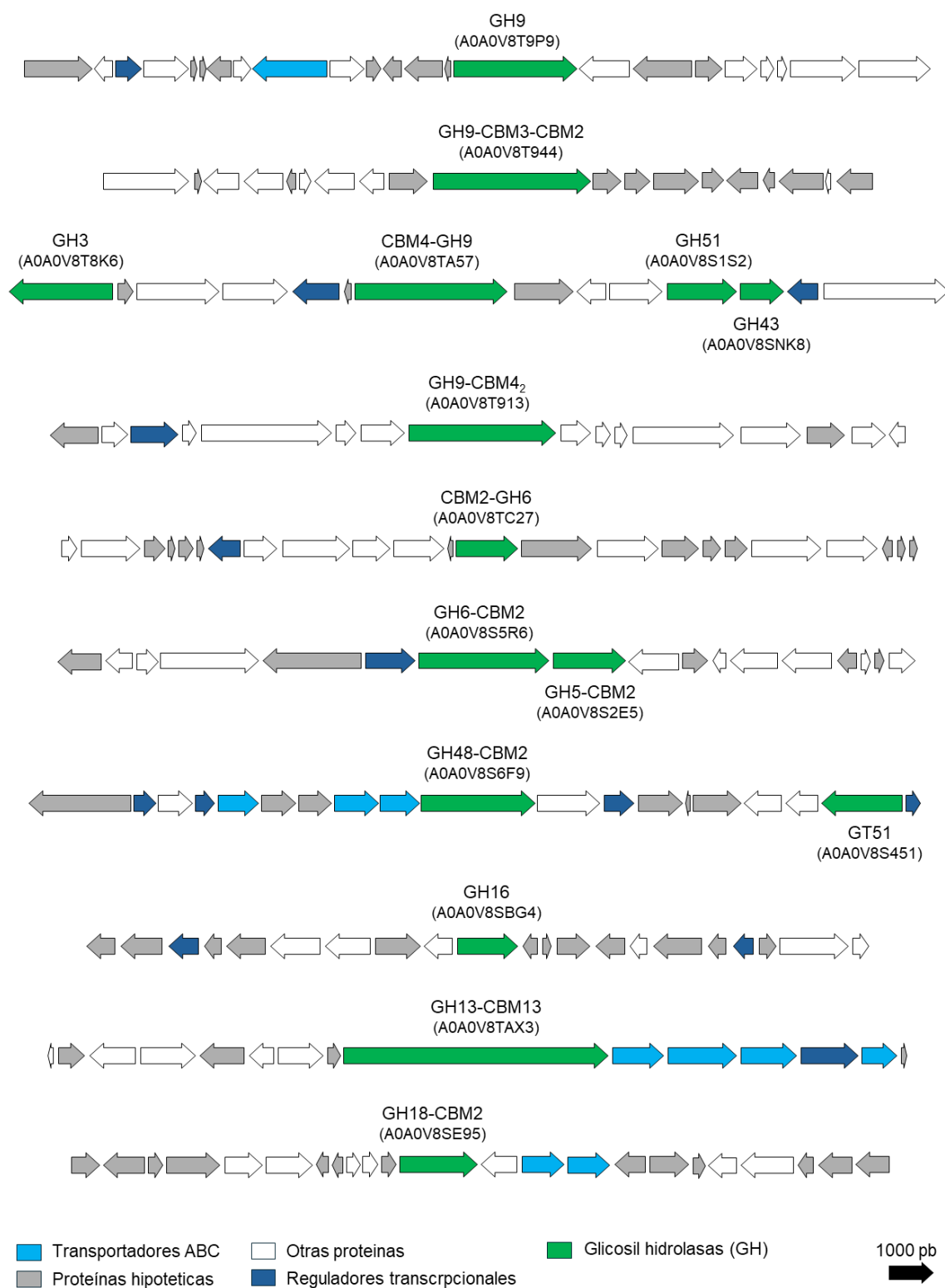


Figura R3: Contexto genómico de glicosil hidrolasas activas sobre celulosa codificadas por *Cellulomonas* sp. B6. Ente paréntesis se indica el número de acceso UniProt correspondiente a cada enzima.

Si bien en algunos casos hay asociación entre la distribución genómica y la expresión de ciertas CAZimas bajo condiciones específicas, lo cual sugiere una expresión concomitante y posiblemente coordinada de estas enzimas, en otros casos no se identificó asociación de la expresión. Por ejemplo, la secuencia

codificante de la endo-xilanasa extracelular CsXyn10C (A0A0V8TB53) se encuentra rodeada por otras secuencias de GHs con funciones predichas tanto en la desramificación del xilano como en la conversión final de xilo-oligosacáridos en xilosa. De estas solo una potencial α -L-arabinofuranosidasa GH43 (A0A0V8TBQ3) sería extracelular, pero no fue identificada en ninguno de los secretomas analizados (Anexo 4).

Finalmente, la endo-xilanasa CsXyn10B (A0A0V8S7T2) no se encuentra flanqueada por otras CAZimas, pero sí por genes relacionados con el metabolismo de la xilosa en la ruta de las pentosas-fosfato. Específicamente, se identificaron genes que codifican para una xilosa isomerasa (XylA, A0A0V8S7Q7) y una xilulosa quinasa (XylB, A0A0V8S7R6), ambos localizados en la hebra opuesta. Si bien estas enzimas son intracelulares, las mismas fueron identificadas en numerosos sobrenadantes de cultivo analizados posiblemente debido a lisis celular y sugieren una integración funcional entre la degradación del xilano y el metabolismo de sus azúcares derivados (xilosa) (Figura R2). Sin embargo, evidencias previas demostraron que CsXyn10B no es la xilanasa más abundante en los secretomas de *Cellulomonas* sp. B6 cuando la bacteria crece en presencia de xilano (Piccinni y col., 2019; Ontañón y col., 2021).

Estos resultados sugieren una regulación compleja de la expresión de la maquinaria enzimática relacionada a la degradación y aprovechamiento de los polisacáridos estructurales de la pared celular vegetal, y dificulta el diseño de estrategias de mutagénesis dirigidas para mejorar la actividad enzimática extracelular.

I. B. Mejoramiento de la actividad xilanolítica de *Cellulomonas* sp. B6 por mutagénesis química

La mayor eficiencia en la producción de extractos enzimáticos puede lograrse mediante el aislamiento de variantes mejoradas por estrategias de mutagénesis, así como la optimización de las condiciones de cultivo. En particular, el aislamiento de mutantes por mutagénesis química ha demostrado ser una estrategia eficaz para obtener cepas con mejoras productivas significativas (Jeyachandran y col., 2024). Estas herramientas son fundamentales para optimizar la producción de cócteles enzimáticos para aplicaciones industriales. Las técnicas tradicionales utilizan comúnmente mutágenos químicos, como etilmetanosulfonato (EMS), naranja de acridina (NA), o N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), y físicos, como la radiación UV. El EMS es un agente alquilante que agrega grupos etilo principalmente en guanina, alterando su estructura y produciendo un apareamiento erróneo en la replicación del ADN. En este trabajo de tesis seleccionamos a dicho mutágeno ya que produce una tasa de mutación más elevada y una menor frecuencia de reversión que otros mutágenos clásicos. Además, no requiere que la célula esté en división para su utilización (Wakisaka y col., 1982; Anderson, 1995).

Previo al ensayo de mutagénesis, es fundamental establecer la combinación adecuada entre la concentración del mutágeno y el tiempo de exposición frente al mismo, con el fin de alcanzar un nivel de letalidad inducida comprendido entre 99,90% y 99,99% (Myers y Yousten, 1978; Wakisaka y col., 1982). Una vez seleccionadas las condiciones a emplear, se realiza la primera ronda de mutagénesis, confirmando por recuento de células viables que el porcentaje de supervivencia celular y de letalidad se encuentran dentro de los umbrales preestablecidos. Luego, se emplean dos métodos consecutivos de selección de potenciales candidatos. El primer *screening* se realiza en placa con medio sólido selectivo: medio mínimo salino (MM) suplementado con 1% (p/v) de carboximetilcelulosa (CMC) como única fuente de carbono y 0,04% (p/v) de azul de tripán como colorante (MM-CMC-TB) (Ahmed y col., 2018). La selección de candidatos se lleva a cabo en función de su capacidad de hidrólisis (CH), determinada por la relación entre el diámetro del halo de degradación de CMC y el diámetro de la colonia (Gupta y col., 2012). Posteriormente, las variantes elegidas son sometidas a una segunda ronda de selección en medio líquido para obtener el extracto enzimático extracelular y evaluar actividad enzimática. Los resultados obtenidos en ambas instancias para las variantes analizadas son comparados con los que presenta la cepa original (Rojas-Rejón y col., 2011; Sangkharak y col., 2012).

Los datos del ensayo de letalidad se muestran en la Tabla R1. En primera instancia, se evaluaron concentraciones de EMS entre 0,5% y 3% (v/v), con tiempo fijo de exposición (20 hs) frente a una suspensión de *Cellulomonas* sp. B6 de $1,5 \pm 0,76 \times 10^9$ UFC/mL. En concentraciones mayores a 0,5% la letalidad fue total y en 0,5% la supervivencia fue solo de 0,0001%. Un segundo ensayo de letalidad fue realizado disminuyendo el tiempo de exposición a 4 hs, lo cual resultó en una supervivencia de 0,001% utilizando 0,5% EMS y 0,0001% para 1% EMS. Dado que los valores de supervivencia eran menores al buscado, se redujo el tiempo de exposición a 1 h, con dosis de 0,5% y 0,25% EMS y se obtuvo una supervivencia del 0,04% y 0,1%, respectivamente. En función a los resultados obtenidos, se seleccionó la condición de tratamiento 0,5% (v/v) de EMS, 30 °C, 300 rpm por 1 h para llevar a cabo la primera ronda de mutagénesis.

Tabla R1: Ensayo de letalidad sobre *Cellulomonas* sp. B6 utilizando etilmetanosulfonato (EMS).

Tratamiento		Crecimiento (UFC/mL)	Supervivencia (%)	Letalidad (%)
Concentración de EMS (%)	Tiempo de exposición (hs)			
3	20	n.d.	0	100
2		n.d.	0	100
1		n.d.	0	100
0,5		$5,33 \pm 1,89 \times 10^2$	0,0001	99,9999
3	4	n.d.	0	100
2		n.d.	0	100
1		$5,57 \pm 0,50 \times 10^3$	0,0001	99,9999
0,5		$2,91 \pm 0,30 \times 10^4$	0,001	99,999
0,5	1	$6,16 \pm 2,81 \times 10^5$	0,04	99,96
0,25		$3,13 \pm 0,42 \times 10^6$	0,13	99,87

La supervivencia en el ensayo de mutagénesis bajo las condiciones previamente seleccionadas fue del 0,03%, semejante al obtenido en el ensayo de letalidad. El primer paso de selección se realizó en placas de MM-CMC-TB, para la visualización de halos de degradación (Figura R4). Se ha visto en otras oportunidades que el CMC induce no solamente la producción de celulasas sino también de xilanasas (inducción cruzada), por lo cual la selección con este medio se utilizaría como indicativo de una mayor actividad celulolítica y/o xilanolítica (Piccinni y col., 2016).

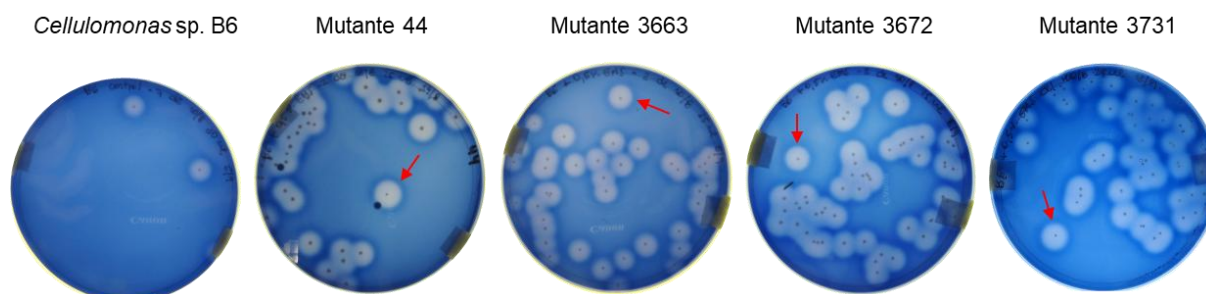


Figura R4: Selección de candidatos mutantes en medio sólido. Las flechas rojas indican las mutantes seleccionadas en función a su halo de degradación. El diámetro de la colonia y del halo de degradación en cada caso fueron determinados utilizando ImageJ. Los valores se expresan en píxeles (px) y se representan como medias y desviaciones estándar por duplicados técnicos.

Se relevaron un total de 4.200 colonias, de las cuales se seleccionaron 4 potenciales mutantes que presentaron un aumento en CH de entre 1,5 y 1,7 respecto de la cepa parental B6 (Figura R4, Tabla R2).

Tabla R2: Mutantes seleccionadas en la primera ronda de *screening* utilizando placas con medio sólido selectivo.

Muestra	Promedio diámetro colonia (px)	Promedio diámetro halo de degradación (px)	Capacidad hidrolítica (CH)	Diferencial de hidrólisis
B6 (67 colonias)	19,43 ± 5,00	196,82 ± 39,30	10,33 ± 1,37	-
Mut. 44	12,43 ± 0,31	218,79 ± 0,79	17,60	1,7
Mut.3663	13,07 ± 0,49	211,24 ± 6,76	16,16	1,6
Mut.3672	13,99 ± 0,81	226,54 ± 3,02	16,20	1,6
Mut. 3731	15,93 ± 3,55	262,71 ± 5,95	16,49	1,6

Valores de diámetros expresados en píxeles (px). La capacidad hidrolítica es el cociente entre el valor promedio del diámetro del halo de degradación y del diámetro de la colonia. El diferencial de hidrólisis es el cociente entre la CH de la mutante analizada y del promedio de colonias de *Cellulomonas* sp. B6. Los resultados se representan como medias y desviaciones estándar de las medidas tomadas.

Las cuatro mutantes seleccionadas se sometieron a una segunda ronda de *screening* utilizando medio líquido. Para ello, se realizó el cultivo *Cellulomonas* sp. B6 y de las 4 colonias en 3 mL medio rico (LB) y de MM-CMC y salvado de trigo desalmidonado (MM-STds). Luego de 48 hs se evaluó el crecimiento celular final (densidad óptica a 600 nm) y la actividad enzimática (CMCasa y xilanasa) de los sobrenadantes de cultivo libre de células obtenidos en cada caso. Los valores de crecimiento a 48 hs de las cuatro mutantes se normalizaron respecto a los obtenidos para la cepa salvaje para cada tipo de cultivo, y estos valores ponderados se usaron para relativizar sus actividades enzimáticas. Los resultados obtenidos para las cepas mutantes fueron comparados con los que presentó la cepa salvaje (B6) (Tabla R3).

En medio LB, los sobrenadantes de las mutantes mostraron una actividad CMCasa similar o ligeramente menor que la de la cepa salvaje, mientras que la actividad xilanasa estuvo notablemente reducida, excepto en la mutante 3663, que no presentó diferencias con la cepa original. En cambio, los sobrenadantes obtenidos en medios mínimos suplementados con CMC (E-CMC) o STds (E-STds) exhibieron un aumento de la actividad CMCasa, más marcado en E-CMC, donde la mutante 3731 alcanzó un nivel casi tres veces superior al de la cepa salvaje. En ambas condiciones, la actividad xilanasa fue en general levemente menor o comparable a la observada en la cepa original.

Tabla R3: Análisis funcional de mutantes seleccionados. El diferencial de hidrólisis se expresa como el cociente entre la actividad enzimática de la cepa mutante y la de *Cellulomonas* sp. B6 salvaje. Los resultados se presentan como media $\pm$ desviación estándar de cuatuplicados.

Muestra	Medio de cultivo	Actividad CMCasa		Actividad Xilanasas	
		UI _{CMC} /mL	Diferencial de hidrólisis	UI _{xyn} /mL	Diferencial de hidrólisis
B6	LB	0,15 $\pm$ 0,05	-	0,42 $\pm$ 0,04	-
Mut. 44		0,14 $\pm$ 0,09	1	0,00 $\pm$ 0,00	n.c.
Mut. 3663		0,17 $\pm$ 0,04	1,1	0,40 $\pm$ 0,05	1
Mut. 3672		0,19 $\pm$ 0,07	1,2	0,00 $\pm$ 0,00	n.c.
Mut. 3731		0,12 $\pm$ 0,06	0,8	0,00 $\pm$ 0,00	n.c.
B6	MM-CMC	0,15 $\pm$ 0,01	-	0,23 $\pm$ 0,01	-
Mut. 44		0,27 $\pm$ 0,04	1,8	0,13 $\pm$ 0,04	0,6
Mut. 3663		0,20 $\pm$ 0,05	1,3	0,27 $\pm$ 0,03	1,2
Mut. 3672		0,27 $\pm$ 0,05	1,8	0,22 $\pm$ 0,03	0,9
Mut. 3731		0,40 $\pm$ 0,07	2,7	0,21 $\pm$ 0,04	0,9
B6	MM-STds	0,17 $\pm$ 0,02	-	0,30 $\pm$ 0,03	-
Mut. 44		0,20 $\pm$ 0,05	1,2	0,35 $\pm$ 0,10	1,2
Mut. 3663		0,19 $\pm$ 0,04	1,1	0,31 $\pm$ 0,02	1,2
Mut. 3672		0,18 $\pm$ 0,05	1	0,28 $\pm$ 0,20	0,9
Mut. 3731		0,17 $\pm$ 0,05	1	0,27 $\pm$ 0,03	0,9

Abreviaciones: LB = medio Luria-Bertani; MM = medio mínimo; CMC = carboximetilcelulosa; STds = salvado de trigo desalmidonado; n.c. = no cuantificado.

En este capítulo se estableció una condición de mutagénesis química mediante el uso de EMS, que permitió obtener una colección de mutantes con una tasa de supervivencia dentro del rango deseado, a través de un esquema de selección en dos etapas, que incluyó una selección en medio sólido y luego evaluación de actividad en medio líquido. Las cuatro variantes seleccionadas en el medio sólido presentaron en general una actividad CMCasa extracelular levemente mayor respecto a la cepa original, excepto la mutante 3731 cuya actividad CMCasa incrementó casi tres veces por cultivo en CMC, mientras que la actividad xilanolítica extracelular fue menor o presentó un comportamiento similar a la de la cepa salvaje. Si bien se establecieron las bases metodológicas para futuros trabajos orientados a la obtención de variantes por mutagénesis química, los resultados obtenidos dejaron en evidencia la necesidad de contar con técnicas de alto rendimiento (*high-throughput*) para el relevamiento de un número mayor de colonias. Las cuatro mutantes son conservadas como banco de cepas a -80 °C para ser sometidas a rondas adicionales de mutagénesis en el futuro, en caso de poder contar con las metodologías para alto rendimiento.

**Capítulo II: Producción de extractos enzimáticos
extracelulares de *Paenibacillus xylanivorans* A59**

La deconstrucción enzimática eficiente de la biomasa lignocelulósica para la obtención de productos de valor agregado y monosacáridos fermentables requiere la acción conjunta de múltiples enzimas que presentan distintas actividades específicas. En este sentido, la bioprospección constante de nuevas enzimas, la optimización y la producción rentable de cócteles enzimáticos ha cobrado interés en los últimos años (Yilmaz-Sercinoglu y Sayar, 2020; Dashora y col., 2022). Una estrategia común es la utilización de microorganismos como fuentes de enzimas diversas. Conocer el perfil proteómico de extractos enzimáticos extracelulares obtenidos contribuye a comprender qué enzimas son producidas por los microorganismos en diferentes condiciones de cultivo, así como qué actividades enzimáticas adicionales pueden ser necesarias, dependiendo del bioproceso elegido.

Las bacterias del género *Paenibacillus* secretan múltiples enzimas capaces de degradar los polisacáridos que conforman la pared celular vegetal (Grady y col., 2016; Ghio y col., 2018; Ticona y col., 2021; Thakur y col., 2022; Topalian y col., 2024). En estudios previos del grupo de trabajo, se obtuvo un aislamiento bacteriano con actividad xilanolítica predominante a partir de una muestra de suelo de bosque nativo de la región patagónica (Argentina). El aislamiento fue identificado como una nueva especie, perteneciente al género *Paenibacillus* y fue denominado *Paenibacillus xylanivorans* A59 (Ghio y col., 2019).

En esta tesis, estudiamos la actividad xilanolítica extracelular y el perfil completo de proteínas secretadas de *P. xylanivorans* A59 utilizando diversas fuentes de carbono en cultivo y evaluamos el escalado de la producción del extracto enzimático de matraces a biorreactor de mesada. Finalmente, evaluamos la eficiencia en la actividad del extracto enzimático obtenido para la deconstrucción de distintos xilanos así como su actividad sobre biomasa lignocelulósica, utilizando como modelo el residuo de caña de azúcar pre-tratada por extrusión alcalina (RACe).

II. A. Producción de extractos enzimáticos extracelulares de *P. xylanivorans* en matraces

Para optimizar la producción de un cóctel xilanolítico rentable, *P. xylanivorans* se cultivó en medio mínimo salino (MM) utilizando xilano de madera de haya (XIN), salvado de trigo (ST) o residuo de caña de azúcar (RAC) como fuentes de carbono, seleccionadas en base a estudios preliminares (Ghio y col., 2016; Mäkelä y col., 2016; Piccinni y col., 2019; Ontañón y col., 2021). A su vez, se utilizó sacarosa (SAC) como control, ya que es un disacárido no reductor que puede ser utilizado como fuente de carbono y no interfiere con los ensayos de actividad en el sobrenadante. La actividad xilanasa de los extractos enzimáticos extracelulares (E-Px) fue analizada cada 24 hs durante 72 hs, y se determinó como azúcares reductores liberados (equivalentes de xilosa) mediante el método del ácido dinitrosalicílico (DNS).

E-PxRAC y E-PxST presentaron la mayor actividad xilanolítica en todos los tiempos ensayados. La actividad xilanolítica máxima se alcanzó a las 48 hs de cultivo para el E-PxST ($6,15 \pm 0,55 \text{ UI}_{\text{xyn}}/\text{mL}$) y a las 72 hs para el E-PxRAC ($11,06 \pm 0,67 \text{ UI}_{\text{xyn}}/\text{mL}$), así como para el E-PxXIN ($1,62 \pm 0,07 \text{ UI}_{\text{xyn}}/\text{mL}$) (Figura R5A). Sin embargo, la productividad más alta, considerada como actividad xilanasa por unidad de tiempo, se logró en ST a las 24 hs de cultivo ($0,25 [\text{UI}_{\text{xyn}}/\text{mL}]/\text{hs}$), seguido de 72 hs de cultivo en RAC ($0,15 [\text{UI}_{\text{xyn}}/\text{mL}]/\text{hs}$). Extender el tiempo de cultivo en esos sustratos más allá de las 72 hs, hasta 144 hs, no produjo un incremento en la actividad xilanolítica de la cepa. Como se esperaba, la actividad xilanolítica que se obtuvo al utilizar SAC como fuente de carbono fue muy baja (aproximadamente $0,1 \text{ UI}_{\text{xyn}}/\text{mL}$). La actividad CMCasa fue inferior a $0,1 \text{ UI}_{\text{CMC}}/\text{mL}$ en todas las condiciones (Figura R5B).

Si bien la concentración de proteínas totales fue similar a E-PxSAC, E-PxRAC presentó la actividad xilanolítica más elevada. Asimismo, aun conteniendo concentración de proteínas equivalente, E-PxST presentó mucha mayor actividad xilanasa que E-PxXIN (Figura R5C). Esto indicaría un enriquecimiento en el contenido de proteínas específicamente asociadas con la degradación de xilano en esos extractos.

Con el objetivo de determinar la vida útil y las mejores condiciones para preservar la actividad xilanolítica de los extractos enzimáticos, se ensayó la actividad xilanasa residual de E-PxST en el tiempo, mediante conservación sin aditivos a 4°C , -20°C y -80°C , así como también a temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$) y 37°C . Durante 4 semanas, no se registró pérdida significativa de actividad en los extractos conservados a -80°C y se mantuvo por encima del 80% en los extractos almacenados a 4°C o -20°C . En condiciones de temperatura ambiente o 37°C , se mantuvo 80% y 50% de actividad xilanasa después de una semana, respectivamente, y luego disminuyó progresivamente, manteniendo aproximadamente un 30% de actividad después de 4 semanas en ambas condiciones (Figura R5D). Estos resultados indican que los extractos de *P. xylanivorans* pueden almacenarse fácilmente en condiciones de refrigeración estándar, conservando la mayor parte de su actividad xilanolítica.

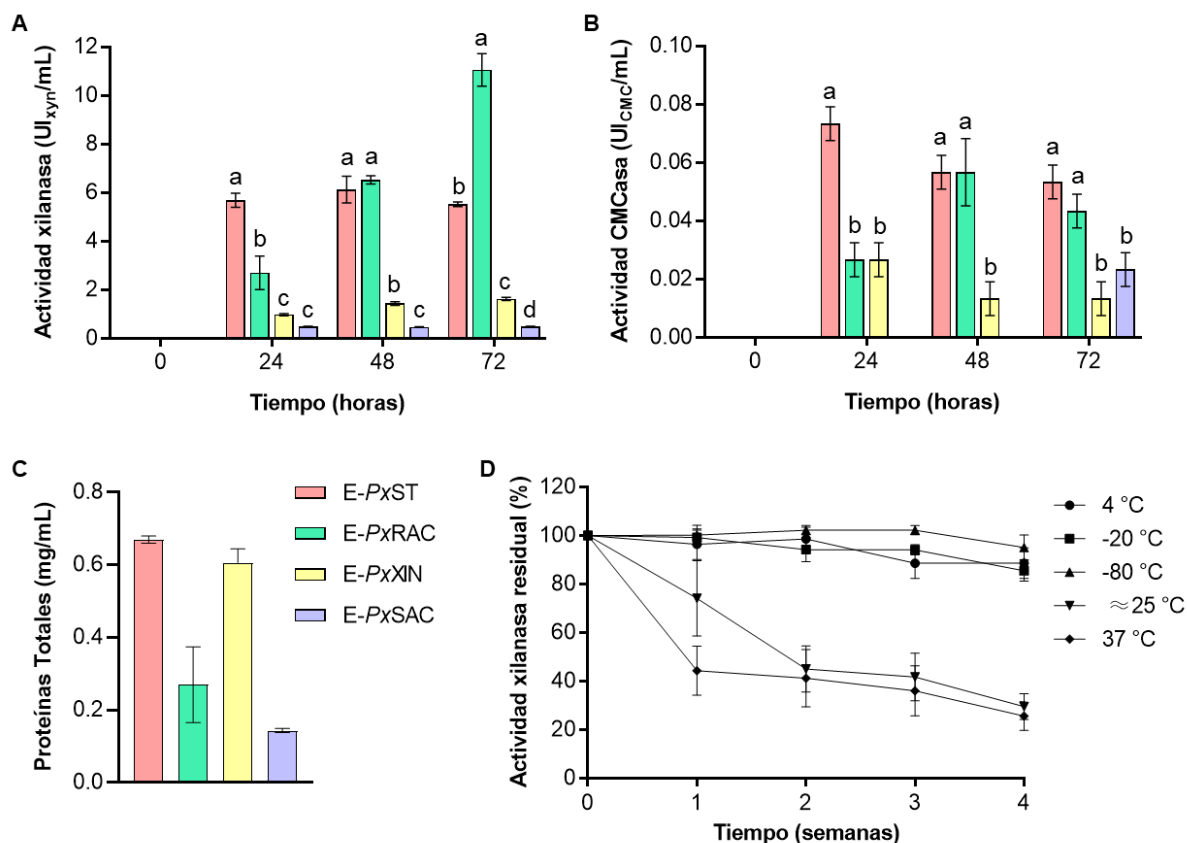


Figura R5: Actividad enzimática de *Paenibacillus xylanivorans*. Efecto de diferentes fuentes de carbono y tiempos de cultivo sobre la actividad xilanasa (**A**) y celulasa (**B**) extracelular. E: extracto enzimático extracelular, ST: salvado de trigo, RAC: residuo de caña de azúcar, XIN: xilano de madera de haya, SAC: sacarosa. Las diferencias estadísticas entre los sustratos de cultivo para cada tiempo se indican con letras diferentes (a, b, c o d), determinadas mediante la prueba a posteriori de Fisher ($p < 0,05$). **C**) Proteínas totales de cultivos en matraces a las 72 hs (E-PxST, E-PxRAC, E-PxXIN y E-PxSAC). **D**) Estabilidad térmica del extracto enzimático extracelular de ST (E-PxST). Actividad inicial (T_0 , 100%): 4,62 U_{xyn}/mL . Los resultados indican medias y desviaciones estándar de ensayos por triplicado.

II. B. Producción de extracto enzimático en biorreactores

En función de los resultados anteriores, ST y RAC se seleccionaron como las fuentes de carbono más promisorias para estandarizar la producción de los extractos enzimáticos de *P. xylanivorans* en biorreactores a escala de laboratorio. Los extractos enzimáticos extracelulares obtenidos se denominaron E-bPxST y E-bPxRAC. La actividad xilanasa de E-bPxST después de 24 hs de fermentación fue aproximadamente 5 veces mayor a la obtenida en matraces, alcanzando un valor de $27,64 \pm 1,78 U_{xyn}/mL$ (Tabla R4) y una productividad de $1,15 U_{xyn}/mL/hs$. Cabe destacar que el incremento en la actividad no se debería a un acompañamiento en el aumento de proteínas totales secretadas, siendo los valores similares a los obtenidos previamente (Tabla R4). En E-bPxRAC, la actividad fue inferior a la observada previamente en matraces, alcanzando $3,99 \pm 0,48 U_{xyn}/mL$ a las 48 hs. Esto podría deberse a una distribución no homogénea del sustrato en el biorreactor o incluso a variaciones del RACe entre

lotes (campaña de cosecha) utilizado. Si bien la composición de los polisacáridos vegetales en RACe suele ser similar entre cosechas, el paso del tiempo podría generar una degradación parcial de la biomasa favoreciendo el acceso a sus componentes.

Con el objetivo de maximizar la actividad específica del extracto extracelular obtenido se evaluó su concentración mediante las técnicas de ultrafiltración y liofilización (Tabla R4). La ultrafiltración permitió concentrar volumétricamente el extracto (E-bPxST) como máximo 8 veces (el extracto concentrado se denominó E-bPxST_U) debido a limitaciones técnicas, dado que en este punto la membrana de los amicones utilizados (corte de 3 kDa) comenzó a taparse y la recuperación del E-bPxST_U se dificultó. Mediante esta técnica se obtuvo el extracto en forma líquida (E-bPxST_U) el cual se conservó a - 80 °C. A diferencia de la ultrafiltración, mediante liofilización se obtuvo un extracto seco en polvo (denominado E-bPxST_L) con 3,13 UI_{xyn}/mg (masa de extracto seco), con una recuperación total de 4,3 g (extracto seco) por L de sobrenadante de cultivo. Al resuspender en una concentración volumétrica de 10 veces (E-bPxST_L-10X), la actividad xilanasa se concentró aproximadamente 5 veces con respecto a la fracción E-bPxST original (Tabla R4). Si bien ambas técnicas permitieron con éxito concentrar la actividad xilanólítica presente en E-bPxST, la liofilización fue más eficiente permitiendo recuperar el 50% de la actividad enzimática evaluada. Además, en la práctica, disponer del extracto en formato polvo permite un uso y conservación más controlada del mismo ya que se resuspende y utiliza la cantidad necesaria en cada caso, disminuyendo la posibilidad de pérdida de actividad enzimática por precipitación de las proteínas producida por descongelamiento/congelamiento.

Tabla R4: Escalado de la producción de extracto enzimático en salvado de trigo y estrategias para la concentración de la actividad xilanólítica.

Muestra	Proteínas Totales (mg/mL)	Actividad xilanasa (UI _{xyn} /mL)	Concentración volumétrica	Concentración de actividad xilanasa	Recuperación de la actividad xilanasa total (%)
E-PxST	0,32 ± 0,02	5,69 ± 0,29	-	-	-
E-bPxST	0,29 ± 0,03	27,64 ± 1,78	-	-	100
E-bPxST _U	0,83 ± 0,30	97,69 ± 6,56	8	3,5	42
E-bPxST _L -10X	3,77 ± 1,04	136,44 ± 6,16	10	4,9	49

Referencias: E: extracto enzimático extracelular, ST: salvado de trigo, b: biorreactor, U: ultrafiltración, L: liofilización y 10X: factor de concentración volumétrica final. Los resultados indican medias y desviaciones estándar de ensayos por triplicado.

II. C. Estudio del secretoma y análisis genómico

El genoma de *P. xylanivorans* fue analizado mediante la plataforma dbCAN3 (<https://bcb.unl.edu/dbCAN2/blast.php>). Se identificaron un total de 296 dominios CAZy involucrados en la deconstrucción de polímeros lignocelulósicos (celulosa, hemicelulosa y lignina), incluyendo glicosil hidrolasas (GHs), carbohidrato esterasas (CEs), glicosil transferasas (GTs), actividades auxiliares (AAs), polisacárido liasas (PLs) y módulos de unión a carbohidratos (CBMs) (Figura R6A). Luego de un detallado análisis manual, 73 de las 296 CAZimas fueron identificadas como parte del secretoma teórico de la bacteria (Anexo 5). Se predijo que 64 presentan péptido señal (vía clásica de secreción) y sólo 9 proteínas serían secretadas mediante vías no clásicas e independientes del péptido señal (Figura R6B).

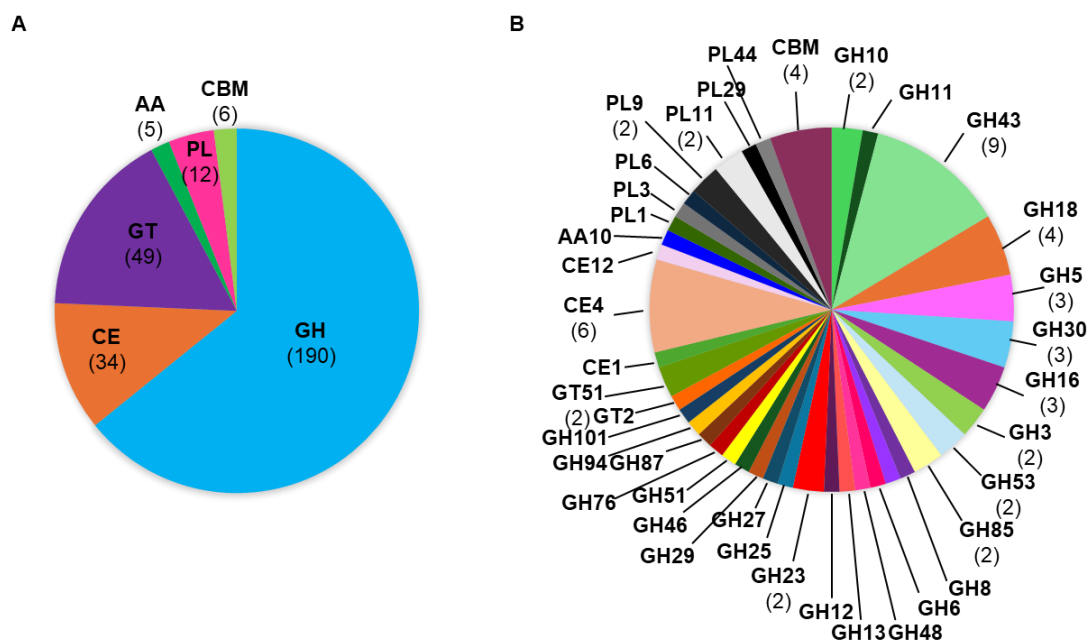


Figura R6: Análisis bioinformático de los dominios CAZy predichos en el genoma de *P. xylanivorans*. A) Distribución de los 296 dominios CAZy inferidos en dbCAN3 (Zheng y col., 2023). B) CAZimas que conforman el secretoma teórico. El número de proteínas representantes de cada dominio y familia es indicado entre paréntesis.

Con el fin de explorar la contribución de diferentes proteínas a la actividad xilanolítica observada en los extractos enzimáticos, se procedió a la identificación de las mismas por espectrometría de masas a partir de los sobrenadantes de cultivo de 72 hs de xilano de madera de haya (E-PxXIN), salvado de trigo (E-PxST), residuo de caña de azúcar (E-PxRAC) o sacarosa (E-PxSAC) y de 24 hs en biorreactor (E-bPxST).

Para cada condición, las proteínas totales de tres cultivos independientes fueron precipitadas y analizadas por espectrometría de masas Orbitrap. Para su identificación se emplearon las secuencias proteicas de *P. xylanivorans* depositadas en la base de datos UniProt (Anexo 6). Para el análisis, nos centramos en las proteínas que se predijo que serían extracelulares (exo-proteoma) y se tuvieron en

cuenta todas las proteínas con dominios CAZy identificadas por, al menos, dos péptidos de alta confianza en una de las réplicas (Tabla R5, Anexo 6). Todas las proteínas con dominios CAZy identificadas y que conforman el exo-proteoma presentaron péptido señal en su secuencia aminoacídica, indicando que serían secretadas por la bacteria al medio extracelular mediante la vía clásica de secreción de proteínas.

Paenibacillus xylanivorans secretó un número similar de proteínas totales cuando se cultivó en fuentes de carbono complejas, identificándose 82 en XIN, 97 en RAC y 82 en ST. Una proporción considerable de estas proteínas correspondió a enzimas con dominios CAZy, principalmente GHs de diferentes familias. Aproximadamente un 25% de las GHs predichas en el secretoma teórico de la bacteria (Figura 6B) fueron efectivamente inducidas y secretadas al medio extracelular (exo-proteoma) bajo las condiciones ensayadas.

Si bien numerosas proteínas fueron identificadas en todas las condiciones de cultivo, su abundancia relativa varió en función de la fuente de carbono utilizada (Tabla R5). Además, en los sobrenadantes de cultivo analizados se identificaron proteínas sin función asignada y proteínas de unión a sustrato pertenecientes a transportadores de azúcares de la familia ABC, entre ellas dos presentes en todas las condiciones de cultivo analizadas (A0A0N0UHQ7 y A0A0M9BMC5) (Anexo 6). Estas proteínas podrían desempeñar un papel relevante en la captación de oligo- y monosacáridos resultantes de la hidrólisis (Anderson y col., 2012).

Tabla R5: Enzimas extracelulares activas sobre carbohidratos (CAZimas) detectadas en los sobrenadantes de cultivo de *P. xylanivorans* cultivadas en SAC (E-PxSAC), XIN (E-PxXIN), RAC (E-PxRAC) y ST (en matraces, E-PxST, y en biorreactor, E-bPxST). EmPAI representa la abundancia relativa de todas las proteínas presentes en las tres réplicas, expresada como porcentaje (emPAI %). Solo se incluyeron las proteínas detectadas en al menos una muestra de sobrenadantes de matraces. n.d.: no detectado.

N° Acceso (UniProt)	Actividad predicha ¹	Dominios CAZy ²	emPAI (%)				
			E-PxSAC	E-PxXIN	E-PxRAC	E-PxST	E-bPxST
A0A0N0UH88	β -xilanasa	GH10	0,51	0,24	7,06	1,75	22,95
A0A0M9BSS7		CBM22 ₃ -GH10-CBM9	0,01	0,01	0,04	0,01	0,14
A0A0M9BNX9		GH11	n.d.	0,49	n.d.	n.d.	2,08
A0A0M9BKU4	β -xilosidasa/ α -L-arabinofuranosidasa	GH43	0,03	n.d.	n.d.	n.d.	0,01
A0A0M9BMQ2		GH43-CBM6	0,01	n.d.	0,01	n.d.	n.d.
A0A0N0UH60	Arabinogalactano endo- β -1,4-galactanasa	GH53	n.d.	0,01	0,03	0,02	0,05
A0A0M9BJY6	Endoglucanasa	GH9-CBM3 ₃	n.d.	n.d.	0,02	0,01	0,06
A0A0M9BNM4		GH5	n.d.	n.d.	0,021	n.d.	n.d.
A0A0M9BLE1		GH5	0,02	0,01	0,01	0,01	n.d.
A0A0N0C312	Celulosa 1,4- β -celobiosidasa	GH48-CBM3	n.d.	n.d.	0,06	0,01	0,01
A0A0N0UHK4	1,3- β -D- glucanasa	GH16	0,05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
A0A0M9BND1		GH16-CBM13	0,03	0,04	0,01	n.d.	0,01
A0A0N0UHX7		GH16	0,02	n.d.	0,04	n.d.	0,05
A0A0M9BMA0	β -1,6-glucanasa	GH30_3	0,01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
A0A0N0C3V2	α -1,3-glucanasa	GH87	n.d.	n.d.	0,01	n.d.	n.d.
A0A0M9BS59	Glucuronoxilanasa	GH30_8	n.d.	n.d.	0,02	n.d.	0,03
A0A0M9BIU5	α -amilasa	GH13-CBM20	0,07	0,13	0,30	2,22	1,73
A0A0M9BML6	Quitinasa	GH18-CBM12	n.d.	0,01	0,05	0,01	0,04
A0A0N0UHA1		GH18	n.d.	n.d.	0,036	0,01	0,01
A0A0N0C4J8	Endo- β -N-acetilglucosaminidasa	GH85-CBM32	n.d.	n.d.	n.d.	0,01	n.d.
A0A0M9BTW6	LPMO	AA10	n.d.	n.d.	0,01	0,01	0,03
A0A0N0UGQ3	Pectato Liasa	PL9_1	n.d.	0,01	0,06	0,01	n.d.
A0A0N0C2M9		PL3_1	n.d.	0,01	n.d.	n.d.	n.d.
A0A0M9BRL2		PL11	n.d.	0,01	n.d.	n.d.	n.d.
A0A0M9BL17		PL1	n.d.	n.d.	n.d.	0,02	0,16

¹ Actividad predicha por CAZy y BLASTp (análisis de homología del NCBI); ² Predicción de los dominios de Enzimas Activas sobre Carbohidratos por dbCAN2/dbCAN3 (Zheng y col., 2018, 2023).

En base a este análisis, las enzimas principales implicadas en la deconstrucción de polisacáridos estructurales, identificadas en todas las condiciones de cultivo (E-PxRAC, E-PxST y E-PxXIN), incluyeron

dos β -xilanasas GH10, una α -amilasa GH13, una quitinasa GH18, una endo-galactanasa GH53 y una pectato-liasa PL9. Se detectó también una GH5, identificada como posible endo-glucanasa, aunque la función predicha es incierta ya que la familia GH5 es muy diversa, con 57 subfamilias y 34 actividades enzimáticas posibles descritas hasta la fecha (<https://www.cazy.org/GH5.html>, último acceso septiembre 2025) (Figura R7).

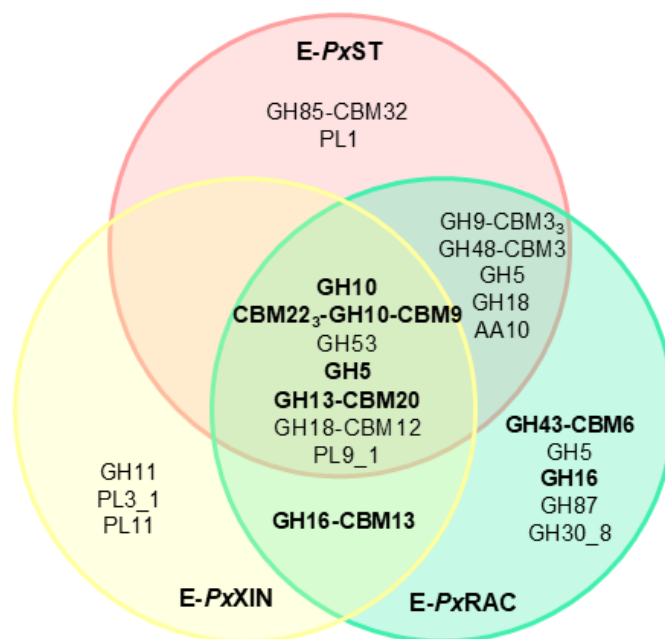


Figura R7: Enzimas activas sobre carbohidratos extracelulares (CAZymas) identificadas en los secretomas de *P. xylanivorans*. Las enzimas también detectadas en sobrenadantes de cultivos de sacarosa se indican en negrita. E: extracto enzimático extracelular, XIN: xilano de madera de haya, ST: salvado de trigo, RAC: residuo de caña de azúcar, GH: glicosil hidrolasa, CBM: módulo de unión a carbohidratos, PL: polisacárido liasa.

Entre las xilanasas identificadas, una GH10 (*PxXyn10A*, Uniprot: A0A0N0UH88, anteriormente denominada *XynA*) mostró una alta representación en todas las condiciones de cultivo analizadas. La proteína más abundante en E-PxXIN fue la xilanasas GH11 (*PxXyn11B*, Uniprot A0A0M9BNX9), seguida de *PxXyn10A*. En trabajos previos del grupo con *P. xylanivorans*, *PxXyn10A* y *PxXyn11B* fueron identificadas en XIN en cultivos de 96 hs y expresadas como recombinantes, lo que permitió demostrar su actividad endo- β -1,4-xilanasas (EC 3.2.1.8) y establecer su mecanismo de acción (Ghio y col., 2018; de Mello Capetti y col., 2023a). Sin embargo, hasta la fecha, no se había determinado la contribución relativa de cada enzima a la actividad xilanolítica. Cabe destacar que, en el sobrenadante de cultivo en sacarosa (E-PxSAC) se detectaron algunas CAZimas, lo cual sugiere una expresión basal de las mismas, aunque su abundancia relativa respecto de otras proteínas fue muy baja. Entre ellas, *PxXyn10A* fue la CAZima más abundante.

Los secretomas correspondientes a cultivos en biomásas complejas, E-PxRAC y E-PxST, presentaron un mayor número de CAZimas, de las cuales 12 estaban presentes en ambas condiciones, incluyendo

enzimas que actúan sobre xilanos y glucanos. En E-PxRAC, PxXyn10A fue la proteína más abundante (7,06%), mientras que en E-PxST, una GH13 fue ligeramente más abundante que PxXyn10A (2,22% y 1,75%, respectivamente), esto podría estar relacionado con la presencia de α -glucanos en ST (que en el análisis porcentual de esta biomasa fueron aproximadamente 22%). Cabe destacar que, aunque PxXyn11B no fue detectada en los sobrenadantes de cultivo de 72 hs en RAC y ST, la enzima sí fue identificada en el análisis proteómico de la muestra del sobrenadante correspondiente al cultivo de 24 hs en biorreactor (E-bPxST) como una de las proteínas más abundantes, después de PxXyn10A. Estos resultados podrían indicar un papel temprano de PxXyn11B en la degradación de xilanos, o bien reflejar diferencias propias del cultivo en biorreactor respecto de los matraces, especialmente aquellas vinculadas con la agitación y su impacto en la disponibilidad del sustrato. En el sobrenadante E-bPxST, también se detectaron una β -xilosidasa GH43, dos β -glucanasas GH16 y una xilanasa GH30_8 con baja abundancia relativa. Las dos GH16 y la GH30_8 también fueron identificadas en baja proporción el sobrenadante E-PxRAC (Tabla R5).

Además, se detectaron algunas proteínas intracelulares, posiblemente debido a la lisis celular durante el procesamiento de la muestra (Tabla R6).

Tabla R6: Enzimas intracelulares activas sobre carbohidratos (CAZimas) detectadas en los sobrenadantes de cultivos de 72 hs en SAC (E-PxSAC), XIN (E-PxXIN), RAC (E-PxRAC), ST (E-PxST) y en el sobrenadante del cultivo de 24 hs en biorreactor (E-bPxST). EmPAI representa la abundancia relativa de todas las proteínas presentes en las réplicas analizadas, expresada en porcentaje (emPAI %). Solo se incluyeron las proteínas detectadas en al menos una muestra de sobrenadantes de matraz. n.d.: no detectado.

N° Acceso (UniProt)	Actividad predicha ¹	Dominio CAZy ²	emPAI (%)				
			E-PxSAC	E-PxXIN	E-PxRAC	E-PxST	E-bPxST
A0A0M9BPS9	β -xilosidasa	GH52	0,052	0,222	0,032	0,101	0,009
A0A0M9BKV0		GH30_2	n.d.	0,019	0,016	0,010	0,003
A0A0M9BJW2	α -N-arabinofuranosidasa	GH51	0,017	0,023	0,028	0,071	n.d.
A0A0N0C680		GH51	n.d.	n.d.	0,071	0,043	0,023
A0A0N0C535	α -1,2-glucuronidasa	GH67	n.d.	0,027	n.d.	n.d.	n.d.
A0A0M9BT21	Alpha/beta hidrolasa	n.d.	0,260	1,39	0,032	0,159	0,041
A0A0M9BJV4	Quitinasa	GH18	n.d.	0,008	0,008	0,019	0,023
A0A0M9BN42	β -galactosidasa	GH2	n.d.	n.d.	0,037	n.d.	n.d.
A0A0M9BJ88		GH2	n.d.	0,003	n.d.	n.d.	n.d.
A0A0M9BLX4		GH42	n.d.	0,002	n.d.	n.d.	n.d.
A0A0N0C3J8	β -1,4-mano-oligosacarido fosforilasa	GH130	n.d.	n.d.	n.d.	0,022	n.d.
A0A0N0UHN7	α -galactosidasa	GH36	n.d.	0,005	n.d.	n.d.	n.d.
A0A0N0C5J2	1,4- α -galacturonidasa	GH28	n.d.	0,004	n.d.	n.d.	n.d.
A0A0M9BLY5	6-fosfo- β -glucosidasa	GH1	n.d.	0,003	n.d.	n.d.	n.d.
A0A0M9BRS1	β -glucosidasa	GH3	n.d.	n.d.	0,005	0,004	n.d.
A0A0M9BMC6	α -L-fucosidasa	GH29	n.d.	0,002	n.d.	n.d.	n.d.
A0A0N0C5Z8		GH95	n.d.	n.d.	0,005	n.d.	n.d.
A0A0N0UHQ4	α -manosidasa	GH38	n.d.	n.d.	0,005	0,001	n.d.
A0A0N0UHT9		GH38	n.d.	n.d.	n.d.	0,018	0,003
A0A0N0UH27	Glicosil transferasa	GT1	n.d.	0,012	n.d.	n.d.	n.d.
A0A0N0C5I2		GT35	n.d.	0,003	n.d.	n.d.	n.d.

¹ Actividad predicha por CAZy y BLASTp (análisis de homología del NCBI); ² Predicción de los dominios de Enzimas Activas sobre Carbohidratos por dbCAN2/dbCAN3 (Zheng y col., 2018, 2023).

La expresión coordinada y abundancia diferencial de CAZimas en los secretomas provenientes de cultivos con diferentes fuentes de carbono, nos llevó a preguntarnos si los genes codificantes para las mismas se encuentran agrupados en el genoma. Mediante la exploración del contexto genómico de los genes codificantes para a las enzimas identificadas, encontramos que en su amplia mayoría estos se encuentran dispersos a lo largo de todo el genoma y no agrupados en ciertas regiones cromosómicas. La mayoría de estas secuencias están flanqueadas por secuencias que codifican proteínas de función aún desconocida como así también, secuencias codificantes para distintos componentes de la familia de transportadores ABC (involucrados en el transporte de azúcares) y reguladores transcripcionales (Anexo 6). Las secuencias reguladoras de la transcripción más prevalentes en las regiones cercanas a

los genes de CAZimas analizadas, pertenecen a las familias AraC y LacI. Ninguno de los componentes de transportadores ABC localizados en las regiones flanqueantes a las CAZimas se identificó en los sobrenadantes estudiados.

Si bien las secuencias correspondientes a CAZimas se distribuyen a lo largo de todo el genoma, algunas se agrupan en regiones específicas e incluso, en ciertos casos, aparecen adyacentes. No obstante, aún no se ha evaluado si las mismas conforman unidades transcripcionales (Figura R8 y R9, Anexo 6). *PxXyn10A* (A0A0N0UH88) se encuentra adyacente, aunque en sentido inverso, de una secuencia que codifica para una potencial β -xilosidasa intracelular de la familia GH30_2 (A0A0M9BKV0) (Figura R8). Esta enzima fue identificada en todos los extractos enzimáticos de *P. xylanivorans* (excepto en E-PxSAC) (Tabla R6), probablemente por lisis celular en el procesamiento de los cultivos, pero demostrando que es expresada en las condiciones analizadas. Esto también se observó en otros casos, por ejemplo, dos GHs activas sobre celulosa: una GH9 (endo-glucanasa, A0A0M9BJY6) y la única GH48 (celobiohidrolasa desde el extremo reductor, A0A0N0C312) se disponen de manera adyacente en el genoma y aguas arriba de una secuencia codificante para una potencial α -L-arabinofuranosidasa (enzima desramificante) intracelular perteneciente a la familia GH51_1 (A0A0M9BJW2) (Figura R9). Las tres enzimas fueron detectas en E-PxST y E-PxRAC (Tabla R5 y R6). El mismo patrón se observa para las dos quitinasas de la familia GH18 identificadas en los secretomas analizados, las cuales se localizan consecutivamente (Figura R9). En conjunto, estos resultados sugieren una posible expresión concomitante de las enzimas mencionadas.

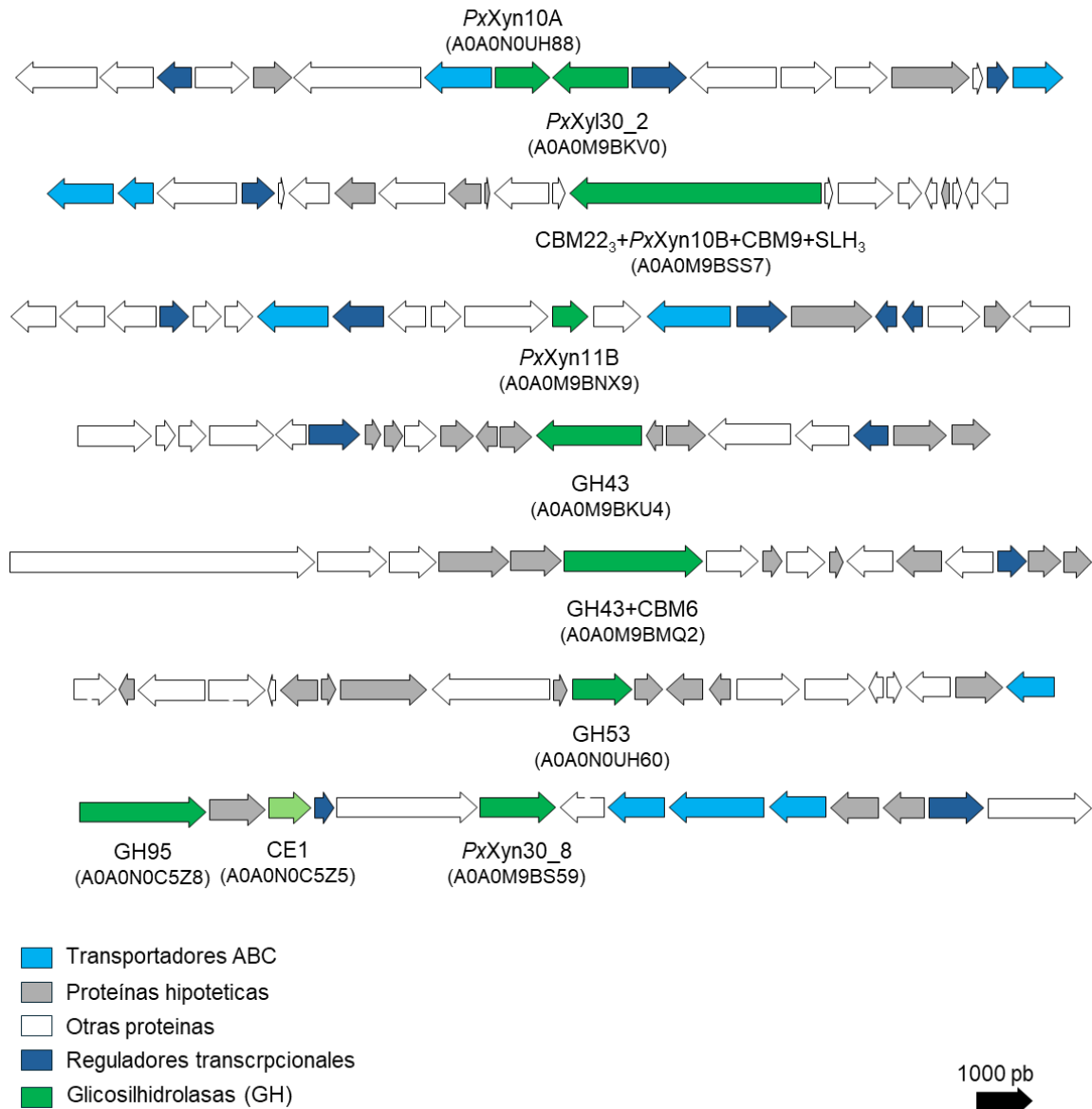


Figura R8: Contexto genómico de glicosil hidrolasas activas sobre hemicelulosa codificadas por *Paenibacillus xylanivorans*. Glicosil hidrolasas identificación en exo-proteomas analizados. *PxXyn* xilanasas pertenecientes a las familias GH10, GH11 y GH30. *PxXyl* β -xilosidasa perteneciente a la familia GH30. Entre paréntesis se indica el número de acceso UniProt correspondiente a casa enzima.

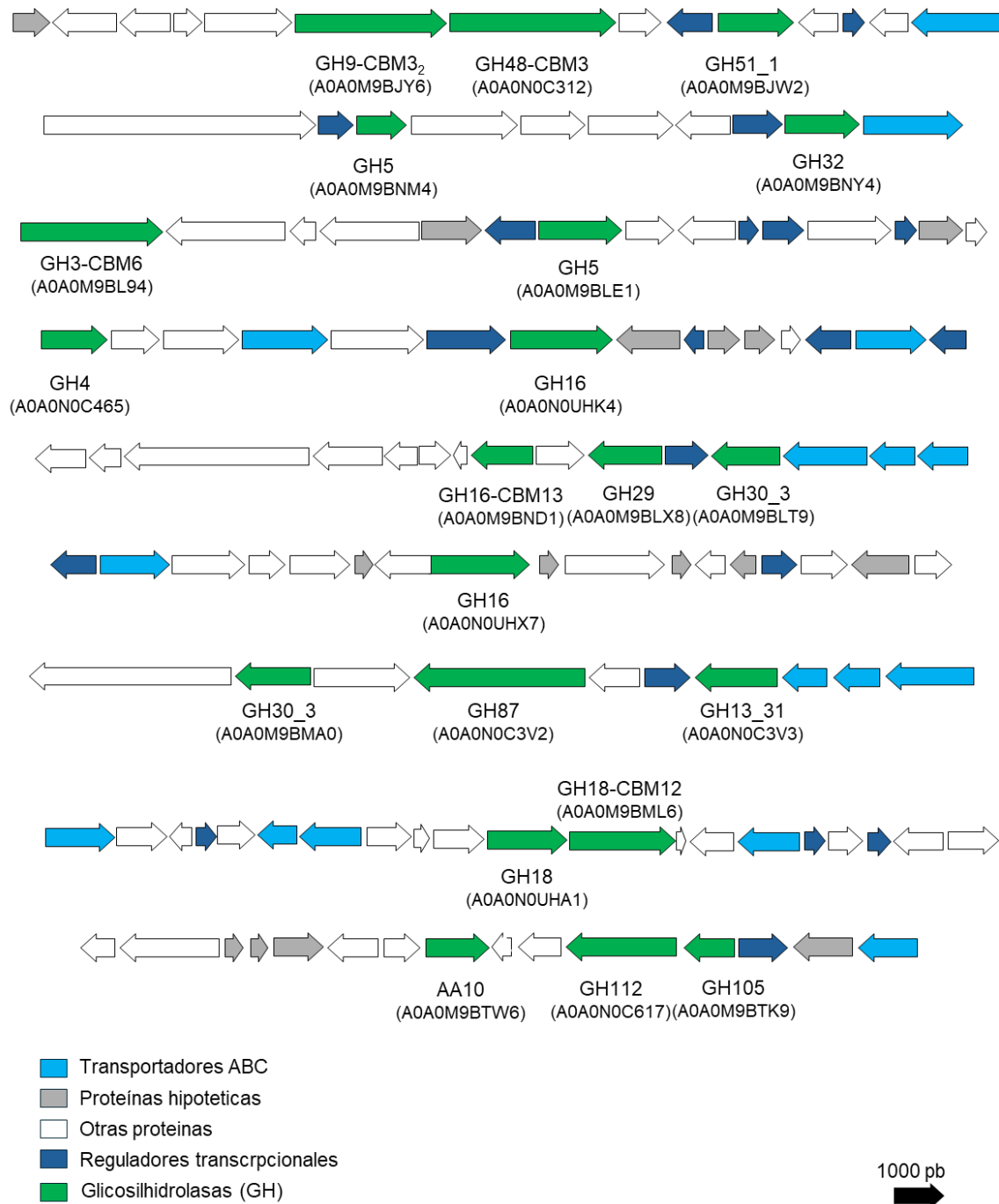


Figura R9: Contexto genómico de glicosil hidrolasas activas sobre celulosa codificadas por *Paenibacillus xylanivorans*. Entre paréntesis se indica el número de acceso UniProt correspondiente a cada enzima.

II. D. Hidrólisis de xitanos utilizando extractos enzimáticos extracelulares de *P. xylanivorans*

Dado que el extracto enzimático (sobrenadante de cultivo en ST en biorreactor), liofilizado y concentrado (E-bPxST_L-10X) fue el de mayor actividad xitanolítica, evaluamos su actividad sobre xitanos estructuralmente distintos (provenientes de diferentes fuentes tanto comerciales como industriales), incluyendo: glucurono-xitano de madera de haya (XIN), xitano industrial insoluble no sustituido (INX), arabino-xitano de hojuela de avena (OAX) y arabino-xitano de trigo (viscosidad media) (WAX) (Curry y

col., 2023). Los detalles de su estructura y composición se encuentran descritos en la Tabla M3 de la sección 2 de materiales y métodos. En el ensayo se incluyó un cóctel xilanolítico comercial multienzimático, NS22244, (Novozyme) como control positivo.

El rendimiento de conversión a azúcares simples alcanzado por ambos cócteles varió de manera marcada para las distintas fuentes de xilano, probablemente debido a las diferencias en el tipo, la cantidad y el patrón de los sustituyentes presentes en cada sustrato ensayado (Tabla R7). En este sentido, la mayor conversión total, rondando el 60%, se observó al utilizar INX como sustrato, mientras que la menor eficiencia hidrolítica fue sobre el WAX (4,14% para E-bPxST_L-10X y 14,35% para NS22244), posiblemente debido a su alto grado de sustituciones (~38% de residuos de arabinosa) y su viscosidad (Tabla R7). Este resultado subraya la dificultad intrínseca de este sustrato para ser degradado.

En cuanto a los productos de reacción, E-bPxST_L-10X liberó xilobiosa (X2) y xilosa (X1), mientras que NS22244 produjo principalmente X1 (Tabla R7, Figura R10), un resultado esperable dado que el cóctel comercial presenta enzimas desramificantes y β -xilosidasas que remueven las sustituciones y degradan XOS para generar X1. Estas enzimas complementarias se encuentran subrepresentadas o ausentes en el extracto E-bPxST_L-10X.

Tabla R7: Hírlisis enzimática de xilanos provenientes de diferentes fuentes. El ensayo se estandarizó a 500 U_{lyn}/g_{xilano} de actividad enzimática, utilizando un cóctel *in house* (E-bPxST_L-10X) y uno comercial (NS22244). Los azúcares xilobiosa (X2) y la xilosa (X1) se cuantificaron mediante HPAEC-PAD. El rendimiento de conversión es la proporción del azúcar liberado respecto al azúcar total contenido en el polímero, expresada como porcentaje (%). n.d.: no detectado; n.c.: no cuantificado (<0,03 mg/mL). Los resultados indican medias y desviaciones estándar de ensayos por triplicado. Las diferencias estadísticas entre los tratamientos para cada sustrato se indican con un asterisco (*), determinadas mediante la prueba T pareada ($p < 0,05$).

Sustrato	Cóctel enzimático	Azúcar liberado (mg/mL)		Rendimiento de conversión (%)		
		X1	X2	X1	X2	TOTAL
XIN	E-bPxST _L -10X	7,71 ± 1,05	9,25 ± 1,29	13,73 ± 1,87	17,39 ± 2,42	31,12 ± 4,29
	NS22244	21,88 ± 0,38	n.q.	38,94 ± 1,47	-	38,94 ± 1,47
INX	E-bPxST _L -10X	12,37 ± 0,39	20,79 ± 0,40	23,27 ± 0,72	39,09 ± 0,76	62,34 ± 0,99
	NS22244	31,01 ± 1,48	1,70 ± 0,18	58,31 ± 2,278	3,20 ± 0,34	61,50 ± 3,25
OAX	E-bPxST _L -10X	5,54 ± 0,17	6,53 ± 0,06	9,86 ± 0,30	12,27 ± 0,11	22,13 ± 0,40
	NS22244	21,64 ± 0,97	0,86 ± 0,29	39,34 ± 1,52	1,61 ± 0,54	40,96 ± 0,98 (*)
WAX	E-bPxST _L -10X	1,91 ± 0,22	0,39 ± 0,04	3,41 ± 0,40	0,73 ± 0,07	4,14 ± 0,33
	NS22244	8,06 ± 0,34	n.d	14,35 ± 0,61	-	14,35 ± 0,61 (*)

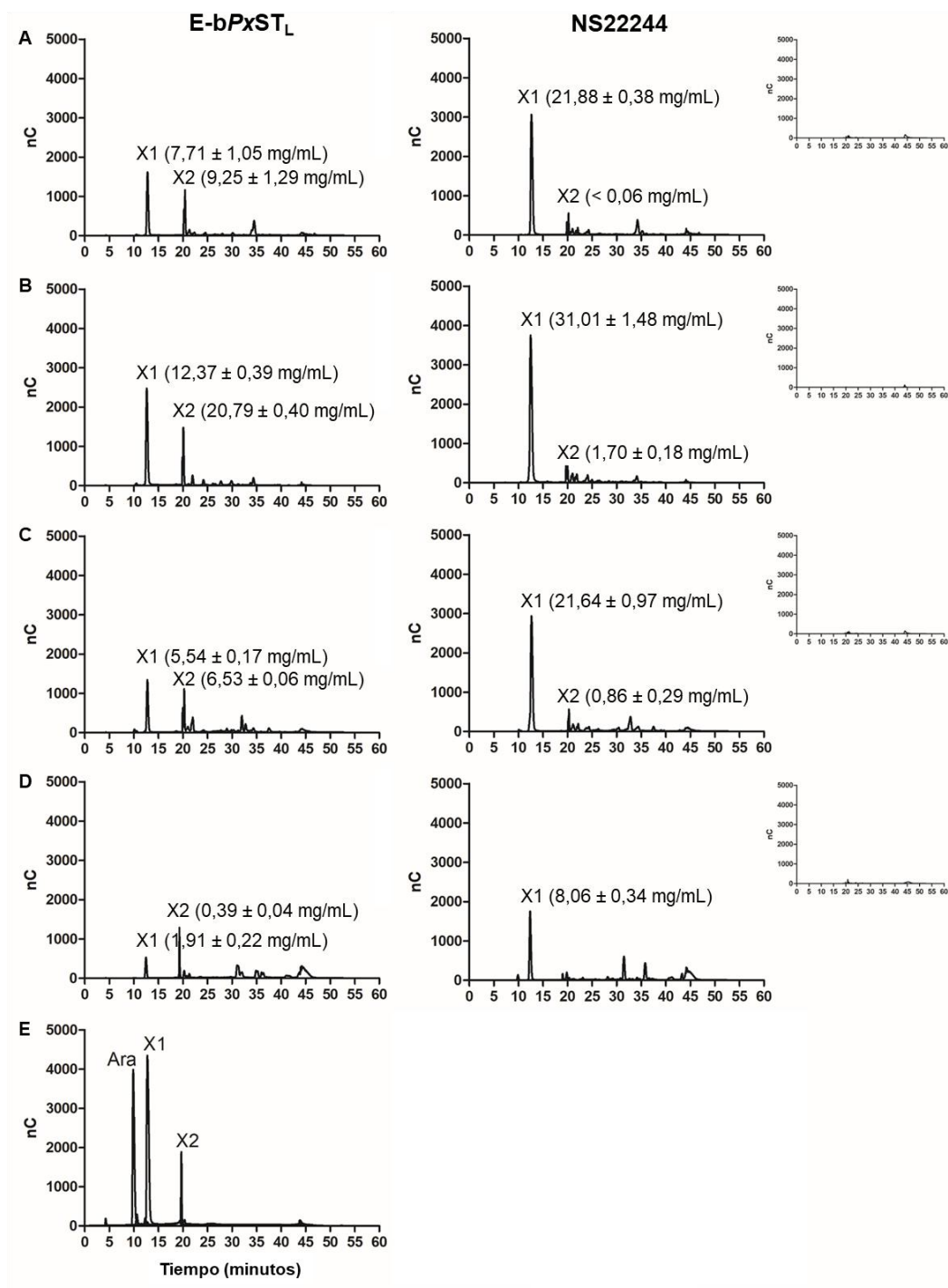


Figura R10: Análisis HPAEC-PAD de los productos de hidrólisis de diferentes sustratos de xilano mediante el cóctel *in house* E-bPxST_L-10X y el cóctel comercial NS22244 (Novozyme). **A)** Xilano de madera de haya; **B)** Xilano industrial; **C)** Xilano de hojuela de avena; **D)** Arabino-xilano de trigo de viscosidad media; **E)** Azúcares estándar: Ara (arabinosa 5 mM), X1 (xilosa 5 mM) y X2 (xilobiosa 1 mM). Los cromatogramas pequeños de la derecha corresponden a cada control de sustrato (sin enzimas). La cantidad de cada azúcar liberado se indica entre paréntesis como media y desviación estándar por triplicado (mg/mL). nC: Respuesta PAD. El tiempo de retención (min) se indica en el eje X.

En función de estos resultados, probablemente la complementación selectiva del extracto E-bPxSTL-10X con actividades desramificantes y β -xilosidasas podría aumentar su productividad general de manera de equiparar el rendimiento total del cóctel comercial en arabino-xilanos complejos.

Finalmente, se evaluó el potencial de este extracto enzimático para la valorización de biomasa lignocelulósica residual. Para ello se ensayó la capacidad de hidrólisis de E-bPxSTL-10X sobre residuo de caña de azúcar pretratada mediante extrusión alcalina (procedimiento químico-térmico que permite abrir la fibra y eliminar parte de la lignina) (RACe). La composición de esta biomasa es de $29,2 \pm 0,4\%$ de celulosa/ β -glucanos; $21,1 \pm 0,1\%$ de hemicelulosa (de la cual $17,7 \pm 0,1\%$ xilano, $1,0 \pm 0,06\%$ galactano, $2,70 \pm 0,06\%$ arabinano); $18,1 \pm 0,6\%$ de lignina. Dada la proporción de sustituciones de arabinosa (aproximadamente 3% del peso seco total) y en función de los resultados previos sobre arabino-xilanos comerciales, evaluamos la suplementación de E-bPxSTL-10X con una α -L-arabinofuranosidasa recombinante (CsAbf62A) (Garrido y col., 2022), así como con una β -xilosidasa GH43 (*EcXyl43*) (Campos y col., 2014; Ontañón y col., 2018) para completar la degradación del xilano presente en la biomasa a X1. Los principales productos de la hidrólisis obtenidos con E-bPxSTL-10X fueron XOS cortos y X1 (Figura R11).

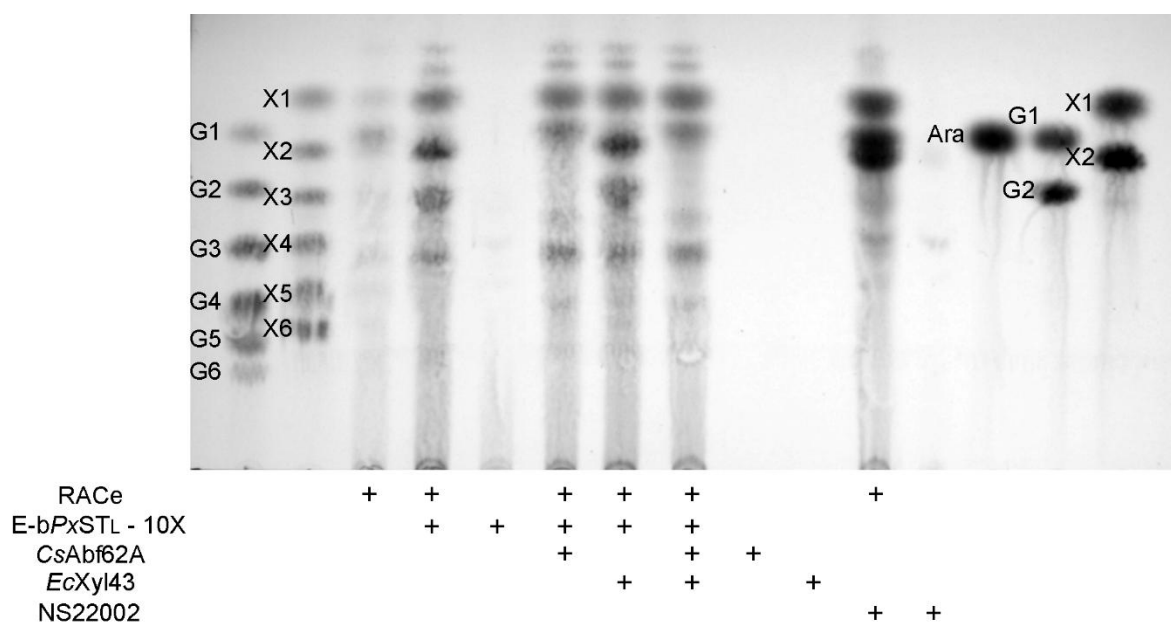


Figura R11: Análisis en cromatografía en capa delgada (TLC) de los productos de hidrólisis de residuo de caña de azúcar pretratada mediante extrusión alcalina (RACe). Las reacciones se realizaron utilizando E-bPxSTL-10X, suplementado con CsAbf62A y/o *EcXyl43*, o NS22002, según se indica (+). Azúcares estándares: G1 (glucosa), G2 (celobiosa), G3 (celotriosa), G4 (celotetraosa), G5 (celopentosa), G6 (celohexosa), X1 (xilosa), X2 (xilobiosa), X3 (xilotriosa), X4 (xilotetraosa), X5 (xilopentosa), X6 (xilohexosa) y Ara (arabinosa).

Como era de esperarse, el rendimiento de glucosa fue bajo (inferior a 0,03 mg/mL), lo que refuerza la naturaleza xilanólítica del extracto. La suplementación con CsAbf62A resultó en la liberación de arabinosa y un aumento en el rendimiento de conversión a X1, acompañado por una reducción de la

fracción de XOS. Asimismo, la adición de *EcXyl43* aumentó la conversión a X1 (Figura R11, Tabla R8). Por lo tanto, la suplementación de E-bPxST_L-10X con *CsAbf62A* y *EcXyl43* permitió no solo la liberación selectiva de arabinosa, sino que también mejoró de manera significativa la conversión total a X1. En este caso se incluyó un cóctel xilanolítico comercial con alta actividad arabinofuranosidasa, NS22002, (Novozyme) como control positivo. Si bien ambos cócteles enzimáticos se aplicaron en las mismas unidades xilanasas relativas (500 UI_{xyn}/g_{biomasa}), la actividad de NS22002 sobre RACe resultó en una mayor conversión a X1 (16,22%) y arabinosa (34,20%) en comparación con la obtenida utilizando E-bPxST_L-10X suplementado con *CsAbf62A* y *EcXyl43* (7,76 % y 17,51%, respetivamente) (Tabla R8). Estos resultados sugieren que puede ser necesario suplementar con mayor actividad de estas enzimas o que existen actividades adicionales en el cóctel comercial que contribuyen a la degradación del sustrato. Es destacable que NS22002 resultó también en la liberación de glucosa (0,76 mg/mL, conversión total de aproximadamente 4%), lo cual puede ser una característica no deseada cuando el objetivo es valorizar de manera específica la fracción de xilano que forma parte de la biomasa.

Tabla R8: Hidrólisis enzimática de residuo de caña de azúcar pretratada (RACe). E-bPxST_L-10x: extracto enzimático extracelular de ST liofilizado; NS22002: cóctel enzimático comercial (Novozymes). Las reacciones se llevaron a cabo en 1 mL con 5 % (p/v) de RACe, 25 UI de E-bPxST_L-10X o NS22002 y 50 µg/mL de *CsAbf62A* y/o *EcXyl43*, según se indica. Las concentraciones de xilosa, arabinosa y glucosa se determinaron enzimáticamente utilizando kits comerciales. El rendimiento de conversión es la proporción (%) del azúcar liberado respecto al azúcar total contenido en SCRe. n.q.: no cuantificado (<0,05 mg/mL). Los resultados indican medias y desviaciones estándar de ensayos por triplicado. Para cada producto ensayado (xilosa o arabinosa) diferentes letras (a, b, c o d) indican diferencias estadísticas entre tratamientos, determinadas mediante la prueba a posteriori de Fisher ($p < 0,05$).

Cóctel enzimático	Azúcar liberado (mg/mL)		Rendimiento de conversión (%)	
	Xilosa	Arabinosa	Xilosa	Arabinosa
E-bPxST_L-10X	0,50 ± 0,01	0,02 ± 0,01	4,67 ± 0,12 (a)	0,79 ± 0,07 (a)
E-bPxST_L-10X + <i>CsAbf62A</i>	0,66 ± 0,02	0,28 ± 0,01	6,17 ± 0,18 (b)	18,72 ± 0,94 (b)
E-bPxST_L-10X + <i>EcXyl43</i>	0,68 ± 0,03	0,06 ± 0,02	6,32 ± 0,31 (b)	4,03 ± 1,03 (c)
E-bPxST_L-10X + <i>CsAbf62A</i> + <i>EcXyl43</i>	0,83 ± 0,02	0,27 ± 0,02	7,76 ± 0,19 (c)	17,51 ± 1,11 (b)
NS22002	1,72 ± 0,00	0,52 ± 0,06	16,22 ± 0,04 (d)	34,20 ± 3,85 (d)

En la actualidad, el desarrollo de procesos sostenibles y eficientes que integren el pretratamiento y la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica continúa siendo un desafío significativo para las biorrefinerías. En este sentido, la búsqueda de nuevas actividades enzimáticas, así como la formulación de cócteles enzimáticos específicos y económicamente viables, representa un área de investigación activa. En general, se demostró que el extracto enzimático extracelular de *P. xylanivorans*, suplementado con actividades enzimáticas específicas, es promisorio para la degradación específica del xilano, uno de los principales componentes hemicelulósicos de la biomasa lignocelulósica.

**Capítulo III: Expresión recombinante de dos glicosil
hidrolasas de la familia GH30 de *P. xylanivorans* A59**

La degradación eficiente del xilano, un polisacárido estructural complejo de la hemicelulosa requiere la acción concertada de diversas enzimas, entre las que destacan las xilanasas, β -xilosidasas y enzimas accesorias. Las xilanasas, especialmente las pertenecientes a las familias GH10, GH11 y GH30, actúan sobre los enlaces β -(1 $\rightarrow$ 4) de la cadena principal del xilano, generando XOS y, eventualmente, xilosa. Las β -xilosidasas, por su parte, catalizan la liberación secuencial de xilosa desde los extremos no reductores de los XOS, completando la hidrólisis del polímero. Complementariamente, enzimas accesorias remueven los grupos decorativos de las cadenas laterales, facilitando el acceso de las enzimas principales al sustrato. En este contexto, las xilanasas de la familia GH30 se destacan por sus patrones de hidrólisis específicos y su potencial para generar nuevos XOS, lo que las convierte en candidatas prometedoras para cócteles enzimáticos de próxima generación.

Mediante el análisis proteómico de los extractos extracelulares de *P. xylanivorans* se detectó una GH30 con posible actividad glucurono-xilanasas, en el sobrenadante de cultivo en RAC, en baja abundancia relativa (<0,05%) (Tabla R5). Esto resultó en contraste respecto de la abundancia de las otras xilanasas identificadas.

Por lo tanto, se estudió si la abundancia relativa de la enzima podría aumentar en caso de utilizar una fuente de biomasa rica en GX. Para ello, se repitieron los ensayos de cultivo y análisis del extracto extracelular de la bacteria, utilizando como fuente de carbono el BABe, pre-tratado por extrusión alcalina para abrir la fibra.

En estas condiciones, la abundancia relativa de esta enzima aumentó (de 0,02% en E-PxRAC a 0,28% en E-PxBABe), aunque fue mucho menor a las que presentaron las dos xilanasas principales: PxXyn10A (7,24%) y PxXyn11B (5,81%) (Tabla R9).

Tabla R9: Enzimas extracelulares activas sobre carbohidratos (CAZimas) detectadas en los sobrenadantes de cultivo de *P. xylanivorans* sobre BABe (E-PxBABe). EmpAI representa la abundancia relativa de todas las proteínas presentes en las tres réplicas, expresada como porcentaje (empAI %). Solo se incluyeron las proteínas detectadas en al menos una muestra de los sobrenadantes.

N° Acceso (UniProt)	Actividad predicha ¹	Dominio CAZy ²	Péptido señal ³	empAI (%)
A0A0N0UH88	β -xilanasa	PxXyn10A	1-33	7,236
A0A0M9BSS7		CBM22 ₃ -GH10-CBM9	1-30	0,210
A0A0M9BNX9		PxXyn11B	1-28	5,81 2
A0A0M9BS59	Glucurono-xilanasa	GH30_8	1-33	0,283
A0A0M9BKU4	β -xilosidasa/ α -L-arabinofuranosidasa	GH43	1-28	0,149
A0A0M9BMQ2		GH43-CBM6	1-20	0,001
A0A0N0C2U9	α -xilosidasa	GH31	Vía independiente	0,044
A0A0N0UH60	Arabinogalactano endo- β -1,4-galactanasa	GH53	1-33	0,101
A0A0M9BJY6	Endoglucanasa	GH9-CBM3 ₃	1-27	0,162
A0A0M9BNM4		GH5	1-30	0,128
A0A0M9BLE1		GH5	1-30	0,002
A0A0N0C418		GH5-CBM46	1-31	0,011
A0A0N0C312	Celulosa 1,4- β -celobiosidasa	GH48-CBM3	1-35	0,177
A0A0N0UGS5		GH6-CBM3	1-36	0,005
A0A0N0UHK4	1,3- β -D- glucanasa	GH16	1-38	0,031
A0A0M9BND1		GH16-CBM13	1-19	0,299
A0A0N0UHX7		GH16	1-25	0,006
A0A0M9BMA0	β -1,6-glucanasa	GH30_3	1-29	0,059
A0A0N0C3V2	α -1,3-glucanasa	GH87	1-31	0,002
A0A0M9BIU5	α -amilasa	GH13-CBM20	1-18	0,725
A0A0M9BML6	Quitinasa	GH18-CBM12	1-40	0,004
A0A0M9BTW6	LPMO	AA10	1-37	0,091
A0A0N0UGQ3	Pectato Liasas	PL9_1	1-22	0,506
A0A0N0C2M9		PL3_1	1-25	0,018
A0A0M9BRL2		PL11	1-38	0,046

¹ Actividad predicha por CAZy y BLASTp (análisis de homología del NCBI); ² Predicción de los dominios de Enzimas Activas sobre Carbohidratos por dbCAN2/dbCAN3 (Zheng y col., 2023); ³ Predicción de péptido señal por SignalP versión 6.0 (Teufel y col., 2022) y SecretomeP versión 2.0 (Bendtsen y col., 2005).

Además, los análisis proteómicos en todas las condiciones ensayadas revelaron la presencia de una GH30, con actividad predicha β -xilosidasa (GH30_2). Esta enzima es predicha como intracelular, pero su presencia en los secretomas puede deberse a lisis celular durante la manipulación de la muestra (Tabla R6 y R10), como se mencionó en el capítulo II.

Tabla R10: Enzimas intracelulares activas sobre carbohidratos (CAZimas) detectadas en los sobrenadantes de cultivo de *P. xylanivorans* sobre BABe (E-PxBABe). EmPAI representa la abundancia relativa de todas las proteínas presentes en las tres réplicas, expresada como porcentaje (emPAI %). Solo se incluyeron las proteínas detectadas en al menos una muestra de los sobrenadantes.

N° Acceso (UniProt)	Descripción ¹	Dominio CAZy ²	emPAI (%)
AOA0M9BKV0	β -xilosidasa/ α -L-arabinofuranosidasa	GH30_2	0,019
AOA0M9BPS9		GH52	0,339
AOA0M9BJW2		GH51	0,090
AOA0N0C680		GH51	0,042
AOA0M9BJV4		GH18	0,005
AOA0N0C3P2	β -galactosidasa	GH42	0,007
AOA0N0C2U7		GH42	0,006
AOA0N0C3J8	β -1,4-mannooligosaccharide phosphorylase	GH130	0,009
AOA0N0UHT9	α -mannosidase	GH38	0,013
AOA0N0C5Z8	α -L-fucosidase	GH95	0,006
AOA0N0C316	Módulo de unión a carbohidratos	CBM9	0,007

¹ Actividad predicha por CAZy y BLASTp (análisis de homología del NCBI); ² Predicción de los dominios de Enzimas Activas sobre Carbohidratos por dbCAN2/dbCAN3 (Zheng y col., 2023).

III. A. Análisis de la diversidad de la familia GH30 en *P. xylanivorans* A59

La familia GH30 forma parte de la base de datos CAZy desde hace más de 30 años, sin embargo, ha sido poco estudiada. En el año 2010 xilansas que formaban parte de la familia GH5 fueron transferidas a la familia GH30 luego de un análisis bioinformático y estructural exhaustivo de los dominios catalíticos, siendo el primer reporte de esta actividad enzimática dentro de la familia (St John y col., 2010; Puchart y col., 2021). Dada su diversidad (17 actividades enzimáticas asignadas), la familia GH30, se encuentra clasificada en la actualidad en 12 subfamilias. Si bien en algunos casos existen varias secuencias depositadas y clasificadas en las distintas subfamilias en la base de datos CAZy, en la mayoría presenta muy pocos miembros caracterizados (Tabla R11) (<https://www.cazy.org/GH30.html>).

Tabla R11: Clasificación de la familia GH30. Adaptado de Puchart y col., 2021. Se incluyen los números de secuencias depositadas y de enzimas caracterizadas en la base de datos CAZy (último acceso 15 de diciembre del 2025).

Subfamilia	Actividad Específica	Depositadas (Caracterizadas)	Organismo
GH30_1	Glucocerebrosidasas (EC 3.2.1.45), β -glucosidasas/ β -xilosidasas (EC 3.2.1.21/ 3.2.1.37) (no hemicelulolíticas)	1769 (5)	Bacteria y Humano
GH30_2	α -L-Arabinofuranosidasas/ β -xilosidasas (EC 3.2.1.55/ 3.2.1.37) (hemicelulolíticas y no hemicelulolíticas)	615 (2)	Bacteria
GH30_3	Endo- β -1,6-glucanasas (EC 3.2.1.75)	3210 (15)	Bacteria y Hongo
GH30_4	β -D-fucosidasas (EC 3.2.1.38)	595 (2)	Bacteria
GH30_5	Exo-/Endo- β -1,6-galactanasas (EC 3.2.1.213/3.2.1.164)	1321 (5)	Bacteria y Hongo
GH30_6	β -glucosidasas (EC 3.2.1.21)	98 (1)	Bacteria
GH30_7	Xilanasas eucariotas, generalmente no específicas, β -xilosidasas y β -xilosidasas del extremo reductor (EC 3.2.1.8, 3.2.1.37 y 3.2.1.156)	1018 (13)	Hongo
GH30_8	Xilanasas procariotas, principalmente glucurono-xilanasas específicas (EC 3.2.1.136, 3.2.1.8)	1604 (21)	Bacteria
GH30_9	β -glucuronidasas (EC 3.2.1.31, 3.2.1.167)	146 (1)	Bacteria
GH30_10	Glucurono-xilano exo- β -1,4-xilobiosidasa (EC 3.2.1.-)	8 (3)	Bacteria
GH30_11	Arabinogalactano exo- β -1,6-galactobiosidasa (EC 3.2.1.-)	285 (3)	Hongo
GH30_12	Xilano endo- β -1,4-xilosidasa, glucurono-arabino-xilano endo- β -1,4-xilosidasa (EC 3.2.1.8, 3.2.1.136)	22 (1)	Bacteria

El genoma de *P. xylanivorans* codifica para seis enzimas de la familia GH30: tres de ellas son intracelulares y las otras tres presentan péptido señal y forman parte del secretoma teórico de la bacteria (Figura R6B).

Con el fin de analizar la distribución de las GH30 de *P. xylanivorans* en subfamilias para establecer posibles actividades enzimáticas de las mismas, se construyeron redes de similitud de secuencias (SSN-Sequence Similarity Network) utilizando todas las secuencias disponibles de la familia GH30 de la base de datos CAZy (enero de 2025), discriminadas en subfamilias, utilizando la herramienta EFI-ENZYME SIMILARITY TOOL (Zallot y col., 2019). En la visualización de un SSN, cada secuencia de proteína está representada por un nodo (círculo). Cada nodo se encuentra conectado mediante líneas con todos los nodos con los que comparten una similitud de secuencia mayor a un valor umbral establecido. Las

secuencias de la red unidas por líneas se agrupan en *clusters*, cuyo tamaño depende del valor umbral de similitud de secuencia establecido para el análisis. Los resultados obtenidos utilizando un umbral de alineamiento de 75 (valor o score del alineamiento) se ilustran en la Figura R12. Se seleccionó este valor umbral dado que en este punto de corte todos los *clusters* generados contienen secuencias de una única subfamilia. Algunas secuencias clasificadas dentro de una subfamilia formaron *clusters* menores o se ubicaron como secuencias únicas (*singletons*), que no se conectaron con el *cluster* principal correspondiente. Este patrón se observa principalmente en secuencias clasificadas dentro de las subfamilias 3, 5 y 8. Los nodos marcados en celeste indican las seis secuencias pertenecientes a *P. xylanivorans*.

La secuencia A0A0M9BKV0 se agrupó dentro del *cluster* correspondiente a la subfamilia 2 (Figura R12), que comprende α -L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55) y β -xilosidasas (EC 3.2.1.37), descritas como enzimas con actividad tanto sobre sustratos hemicelulósicos como no hemicelulósicos (Tabla R11). Como fue mencionado, esta enzima es intracelular, aunque fue detectada consistentemente en todos los extractos enzimáticos analizados, sugiriendo un rol relevante en el metabolismo de la bacteria (Tabla R6 y R10).

Otras dos secuencias (A0A0M9BLT9 y A0A0M9BMA0) se agruparon en la subfamilia 3 (Figura R12), que incluye endo- β -1,6-glucanasas (EC 3.2.1.75); de ellas, la secuencia A0A0M9BMA0 fue identificada en baja abundancia en los secretomas E-PxSAC y E-PxBABe (Tabla R5 y R9). Asimismo, dos secuencias adicionales (A0A0N0C4N1 y WP_053781470.1) se ubicaron dentro de la subfamilia 5 (Figura R12), correspondiente a posibles endo- β -1,6-galactanasas (EC 3.2.1.164); sin embargo, ninguna de estas fue detectada en los sobrenadantes de cultivo analizados.

Finalmente, una secuencia (A0A0M9BS59) fue clasificada en la subfamilia 8 (Figura R12), la cual agrupa endo- β -1,4-xilanasas mayormente específicas de GX (EC 3.2.1.8 y 3.2.1.136). Como se mencionó previamente, esta proteína fue identificada en los sobrenadantes E-PxRAC, E-bPxST y E-PxBABe, lo cual sugiere un rol en la deconstrucción de biomasas complejas (Tabla R5 y R9).

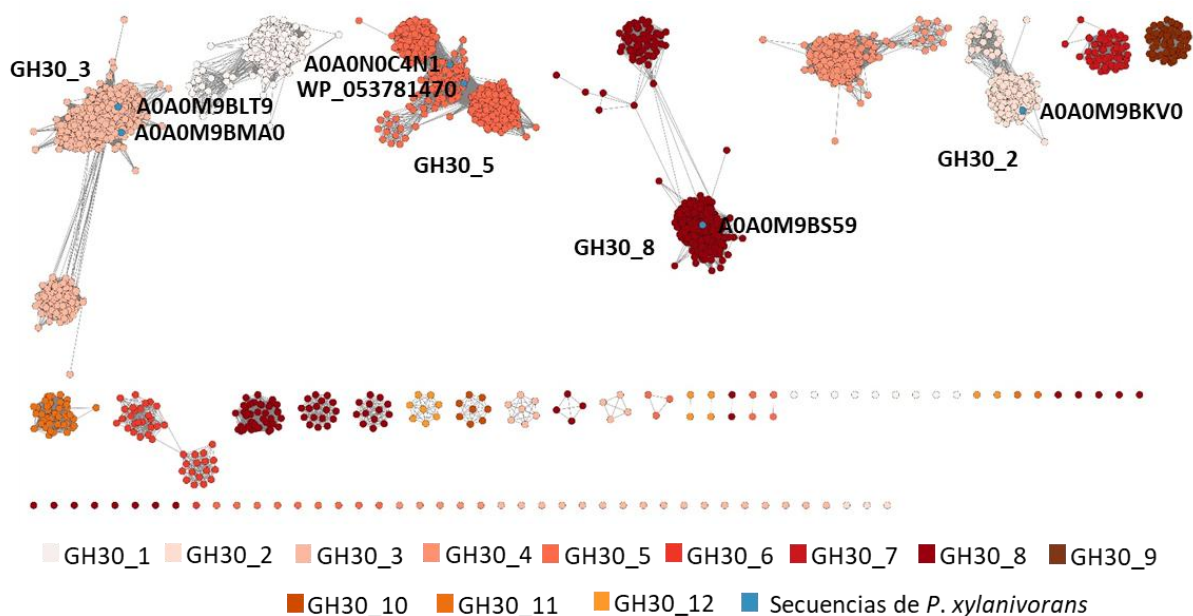


Figura R12: Red de similitud de secuencias (SSN) de la familia GH30. La SSN incluye secuencias de GH30 de la base de datos CAZy, clasificadas por subfamilias, y las secuencias de seis enzimas GH30 codificadas en el genoma de *P. xylanivorans*. Para construir la red se utilizó la EFI-ENZYME SIMILARITY TOOL (Zallot y col., 2019) de la Iniciativa de Función Enzimática (EFI). La SSN se finalizó con una puntuación de alineamiento de 75 y se visualizó en Cytoscape v. 3.9.1.

Las estructuras primarias de las enzimas pertenecientes a la familia GH30_2 (AOA0M9BKV0) y GH30_8 (AOA0M9BS59) de *P. xylanivorans* fueron contrastadas con las correspondientes a proteínas caracterizadas y depositadas en la base de datos CAZy, utilizando la herramienta bioinformática BLASTp. La secuencia AOA0M9BKV0 (*PxGH30_2*) presentó 50,57% y 40,52% de homología con la enzima XlyBK-110 y RuXyn2, respectivamente (Tabla R12).

Tabla R12: Identidad de secuencia de *PxGH30_2* con enzimas de la misma subfamilia caracterizadas. Las secuencias proteicas completas fueron contratadas en BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Enzima	Organismo	Identidad (%)	Cobertura (%)	Referencia
XlyBK- 110	<i>Bifidobacterium breve</i>	50,57	96	Hyun y col., 2012
RuXyn2	Bacteria del rumen no cultivable	40,52	91	Zhou y col., 2012

Por su parte la secuencia AOA0M9BS59 (*PxGH30_8*) mostró más del 75% de homología con enzimas pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Bacillus* y *Paenibacillus* (Tabla R13). Entre ellas, la enzima Xyn30D de *Paenibacillus barcinonensis* (83,86% de identidad) es la más estudiada hasta el momento, incluyendo caracterización bioquímica y funcional, modelado estructural y cristalización y producción de XOS con potencial antioxidante (Valenzuela y col., 2012; Sainz-Polo y col., 2014; Valls y col., 2018; Bouiche y col., 2020). Una diferencia entre la secuencia aminoacídica de la GH30_8 de *P. xylanivorans* y la enzima Xyn30D de *P. barcinonensis* es que esta última presenta 113 aminoácidos adicionales que

se corresponden con un módulo de unión a carbohidratos de la familia 35 (CBM35) ubicado en el extremo carboxílico.

Tabla R13: Identidad de secuencia de PxGH30_8 con enzimas de la misma subfamilia caracterizadas. Las secuencias proteicas completas fueron contratadas en BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Enzima	Organismo	Identidad (%)	Cobertura (%)	Referencia
CtXynGH30	<i>Clostridium thermocellum</i>	67,95	92	Verma y Goyal, 2016
XynD	<i>Aeromonas caviae</i>	85,37	93	Zuzuki y col., 1997
Xyn30A	<i>Bacillus licheniformis</i>	77,86	94	Sakka y col., 2012
Xyn5B	<i>Bacillus</i> sp.	78,71	93	Gallardo y col., 2010
Xyl	<i>Bacillus subtilis</i>	77,91	94	Park y col., 2012
XynC	<i>B. subtilis</i>	77,67	94	Nishitani y Nevins, 1991
BoGH30	<i>Bacteroides ovatus</i>	31,95	90	Rogowski y col., 2014
Xyn30A	<i>Cellulosilyticum ruminicola</i>	67,06	93	Cai y col., 2010
CrXyl30	<i>C. ruminicola</i>	61,05	97	Liu y col., 2023
CaXyn30B	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	41,32	94	Crooks y col., 2020
XyynA	<i>Dickeya chrysanthemi</i>	40,05	91	Keen y Henrissat, 1996
Xyl2090	<i>Melioribacter roseus</i>	41,49	87	Rakitin y col., 2015
Xyn30D	<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	83,86	99	Valenzuela y col., 2012
Xyn30A	<i>Paenibacillus favisporus</i>	78,86	94	Padilha y col., 2014
Xyn3	<i>Paenibacillus</i> sp.	83,90	98	Dung y col., 1993
Xyn30A	<i>Ruminiclostridium papyrosolvens</i>	53,36	94	St John y col., 2014
Xyn30A	<i>Ruminococcus champanellensis</i>	49,45	97	Moraí y col., 2016
StXyn30A	<i>Streptomyces turgidiscabies</i>	62,23	91	Maehara y col., 2018
XYL13A	Bacteria no cultivable	58,06	94	Ellilä y col., 2019

Además, se realizó el alineamiento múltiple (Clustal W) de PxGH30_8 con aquellas secuencias con las que presentó más del 75% de homología. Mediante el alineamiento estructural se observó un alto grado de conservación a lo largo de toda la extensión de las secuencias (Figura R13). Se emplearon los datos de estructura de la enzima Xyn30D de *P. barcinonensis* (N° PDB: 4QAW) para predecir las estructuras secundarias (láminas β y hélices α) a lo largo de las secuencias. Asimismo, este análisis permitió predecir la posición de los sitios catalíticos E152 (ácido/base) y E278 (nucleofílico), y otros aminoácidos importantes para la unión al sustrato (Y203 y W267) y la interacción con las decoraciones de ácido glucurónico (MeGlcA) relacionados con la especificidad de sustrato (R271 y Y273).

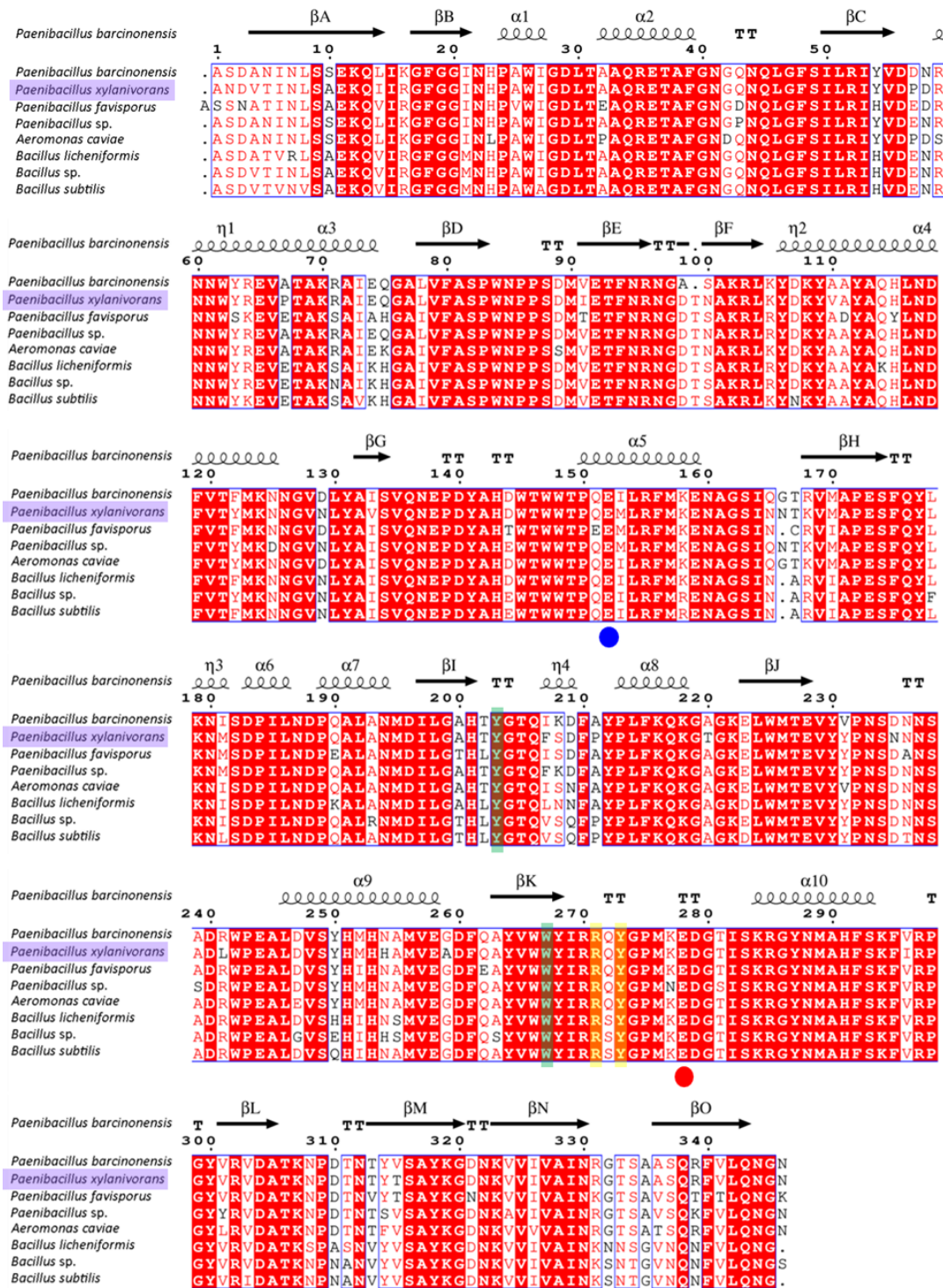


Figura R13: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de enzimas de la familia GH30_8 junto con la correspondiente a *P. xylanivorans* (resaltada en lila). Los residuos totalmente conservados se resaltan en fondo rojo y letras blancas y aquellos con al menos un 60% de conservación entre todas las secuencias se representan en letras rojas. Los residuos catalíticos se encuentran señalados con punto azul para el ácido/base (E152) y rojo para el nucleofílico (E278). En verde se resaltan los aminoácidos responsables de la unión al sustrato y en amarillo los que interactúan con el ácido glucurónico. Las filas corresponden a las GH30_8 de *Paenibacillus barcinonensis* (H6WCZ0), *Paenibacillus favisporus* (U6BPI6), *Paenibacillus sp.* (P70733), *Aeromonas caviae* (O24852), *Bacillus licheniformis* (H1ACZ7), *Bacillus sp.* (E1ACF9) y *Bacillus subtilis* (Q45070). La numeración del alineamiento corresponde al módulo catalítico. Alineamiento realizado con Clustal ω (Madeira et al., 2022), Figura realizada con Esprit 3.0 (Robert y Gouet 2014).

Con el objetivo de estudiar la contribución de estas enzimas a la actividad xilanolítica de *P. xylanivorans* y su aplicabilidad en la conversión de biomasa lignocelulósica, las enzimas *PxXyn30_8* (GH30_8) y *PxXyl30_2* (GH30_2) fueron seleccionadas para su expresión heteróloga y posterior caracterización bioquímica y funcional.

III. B. Clonado, expresión recombinante y purificación de *PxXyn30_8* y *PxXyl30_2*

La secuencia nucleotídica *pxxyn30_8* codifica para un péptido señal de secreción amino terminal de 33 aminoácidos y un módulo catalítico de la familia GH30_8 (aminoácidos 34 a 449). El análisis de la secuencia codificante *pxxyl30_2* mostró ausencia de una señal de secreción, indicando una localización intracelular, y sólo contiene un módulo catalítico de la familia GH30_2 (aminoácidos 1 a 445) (Figura R14A). Los detalles de las secuencias nucleotídicas y aminoácidas de ambos casos se encuentran detallados en el Anexo 1.

La secuencia nucleotídica de *PxXyn30_8* (sin incluir la secuencia del péptido señal nativo) y la secuencia completa de *PxXyl30_2*, se amplificaron por PCR a partir del ADN genómico de *P. xylanivorans* A59 utilizando *primers* específicos, resultando en productos de amplificación de 1272 pb y 1353 pb, respectivamente (Figura R14B).

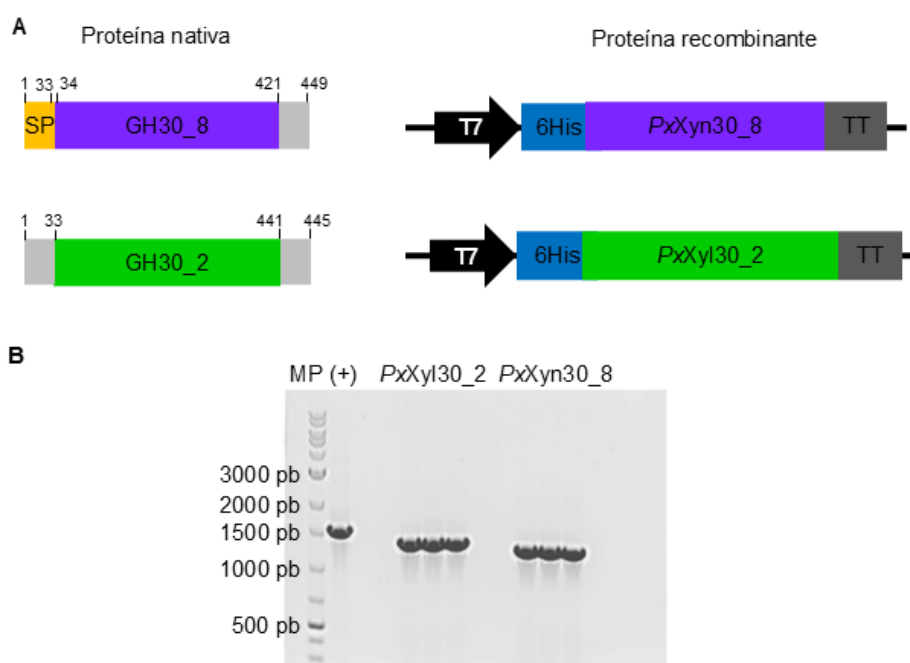


Figura R14: Esquema representativo de las proteínas *PxXyn30_8* y *PxXyl30_2* codificadas en el genoma de *P. xylanivorans*. **A)** Estructura de dominios de las enzimas nativas (izquierda) y su forma recombinante (derecha). SP: péptido señal. T7: secuencia promotora transcripcional del fago T7. 6His: secuencia de etiqueta de histidina, TT: secuencia de *stop* de la transcripción. **B)** Amplificación por PCR de secuencias codificantes en tres condiciones de temperatura (50 °C, 52 °C y 55°C). MP: marcador de peso molecular de ADN. (+): control positivo.

Las secuencias amplificadas fueron clonadas en el vector de expresión pET28a (+) de forma tal que ambas proteínas son expresadas como una fusión a un tracto 34 aminoácidos amino-terminales, que incluyen un *tag* de seis histidinas (His-tag), este último utilizado para la purificación e inmunodetección y de las proteínas recombinantes (Figura R15). La integridad de las construcciones obtenidas se confirmó por secuenciación.

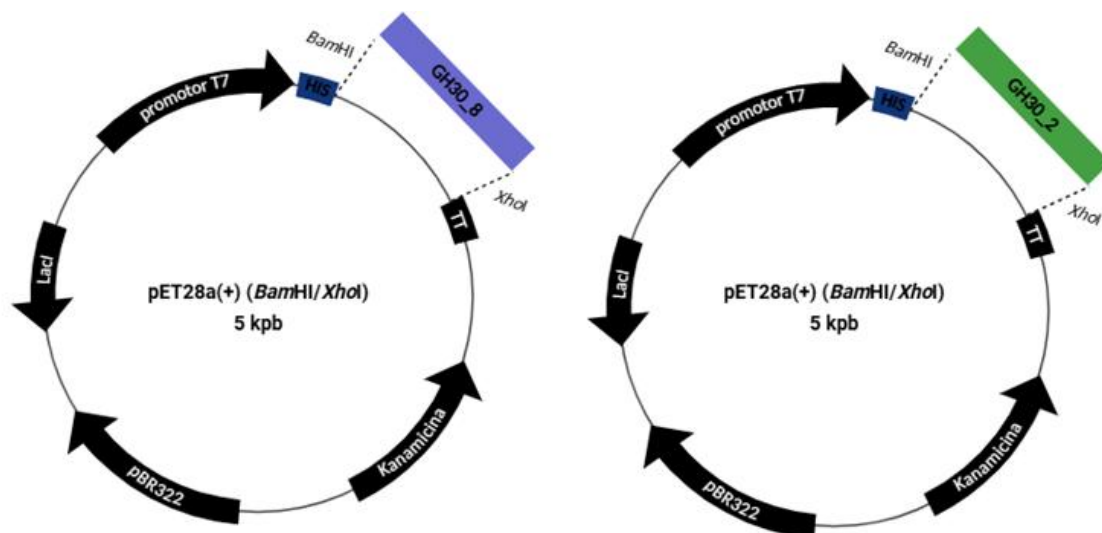


Figura R15: Esquema representativo del clonado de las secuencias codificantes de *PxXyn30_8* y *PxXyl30_2* en los sitios *Bam*HI y *Xho*I del vector pET28a (+). Promotor T7: secuencia promotora de la transcripción del fago T7; HIS: secuencia codificante para un tracto de seis histidinas; TT: secuencia de terminación de la transcripción; Kanamicina: gen de resistencia a kanamicina; pBR322: origen de replicación del plásmido en *E. coli*; LacI: gen del represor lac.

La expresión de las enzimas recombinantes se ensayó en diversas cepas comerciales de *Escherichia coli*, adaptadas para el sistema del vector pET (promotor T7), optimizando las condiciones de inducción y purificación, para obtener las proteínas en forma soluble (Figura R16). Ambas proteínas fueron obtenidas en el sistema pET28a-*E. coli* BL21 (DE3), por inducción a 30 °C, con 1 mM IPTG por 20 hs (Figura R16A y B). Si bien en estas condiciones de inducción *PxXyn30_8* se obtuvo de manera soluble, el mejor rendimiento de expresión se produjo en el sistema pET28a-*E. coli* Rosetta (DE3) a 20 °C, con 0,5 mM IPTG por 20 hs (Figura R16C). Las proteínas presentes en las fracciones solubles se purificaron por cromatografía de afinidad, resultando la mayor elución (con 250 mM imidazol) en la fracción E2 para ambas proteínas. El rendimiento de producción obtenido fue 65 mg/L y 18 mg/L de cultivo inducido para *PxXyn30_8* y *PxXyl30_2*, respectivamente. La purificación fue confirmada por electroforesis geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), revelados por tinción con Azul de Coomassie. Las proteínas recombinantes purificadas mostraron un peso molecular aparente similar a los esperados, 50,7 kDa para *PxXyn30_8* y 55 kDa para *PxXyl30_2*.

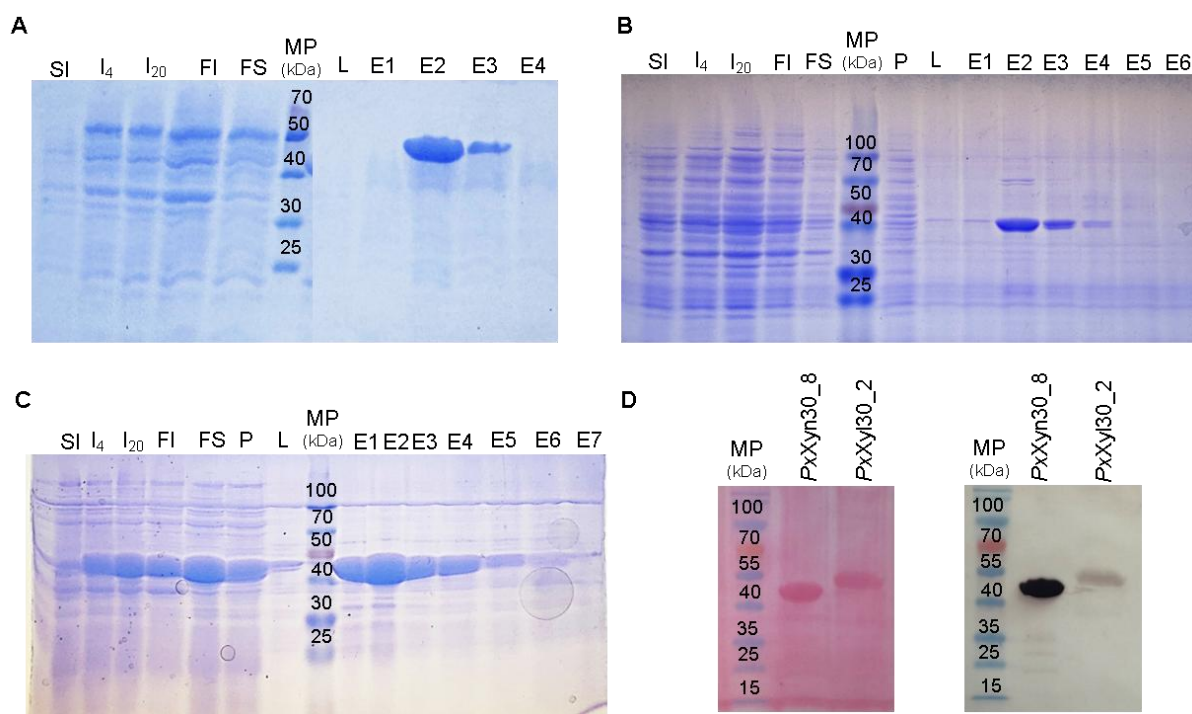


Figura R16: Análisis de las proteínas recombinantes purificadas PxXyl30_8 y PxXyn30_2. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE 12%), teñidos con Azul de Coomassie. **A)** Producción de PxXyl30_2 en *E. coli* BL21 (DE3) (1 mM IPTG y 30 °C). **B)** Producción de PxXyn30_8 en *E. coli* BL21 (DE3) (1 mM IPTG y 30 °C). **C)** Producción de PxXyn30_8 en *E. coli* Rosetta (DE3) (0,5 mM IPTG y 20 °C). **D)** Una elución de PxXyn30_8 y PxXyl30_2 se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se revelaron con rojo Ponceau (izquierda) o se inmunodetectaron con anticuerpos anti-His (derecha). MP: Marcador Blue Plus® Protein Marker (14 -120 kDa) o PageRuler Protein Ladder (10-180 kDa), SI: sin inducir, I₄: inducido por 4 hs, I₂₀: inducido por 20 hs, FI: fracción insoluble, FS: fracción soluble, P: percolado, L: lavado, E: eluciones.

III. C. Caracterización bioquímica de PxXyn30_8 y PxXyl30_2

III. C. i. Condiciones óptimas de reacción y estabilidad térmica

La actividad xilanasa de PxXyn30_8 fue evaluada sobre XIN midiendo azúcares reductores por el método de DNS, mientras que la actividad β -xilosidasa de PxXyl30_2 se ensayó sobre para-nitrofenil-xilopirínosido (*p*NP-X) cuantificando la liberación de para-nitrofenol (*p*-NP). Las reacciones se llevaron a cabo en buffer citrato-fosfato 50 mM pH 7, y 0,1 mg/mL de enzima, incubando a 40 °C, 300 rpm durante 30 min. Ambas enzimas presentaron actividad enzimática sobre sus respectivos sustratos.

Luego, se determinó el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática de PxXyn30_8 y PxXyl30_2. Para ello, primero se pusieron a punto las condiciones de concentración de ambas enzimas y tiempo de reacción en las que se mantiene la linealidad de liberación de producto para cada una de ellas, siendo éstas entre 1 a 8 y 0,25 a 2 μ g/mL de enzima y 5 a 15 y 5 a 50 min de incubación para PxXyn30_8 y PxXyl30_2, respectivamente (Figura R17).

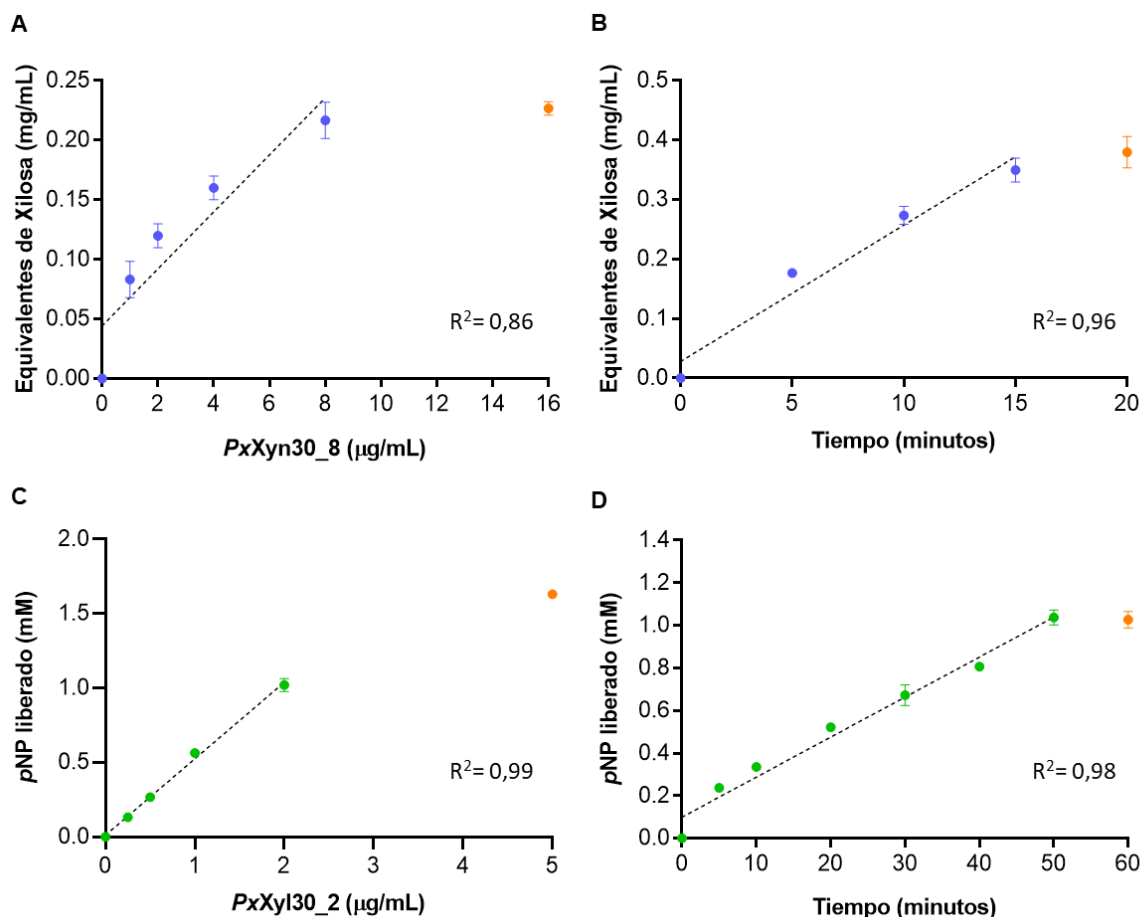


Figura R17: Determinación de rango de linealidad de concentración de enzima y tiempo de reacción. Condiciones para PxXyn30_8 (**A** y **B**). Condiciones para PxXyl30_2 (**C** y **D**). Los resultados indican medias y desviaciones estándar de ensayos por cuatuplicado. En naranja se indican los puntos de las mediciones que no se ajustan a la regresión lineal.

Utilizando las siguientes condiciones: 4 μg/mL y 10 min sobre XIN para PxXyn30_8 y 1 μg/mL y 30 min sobre pNP-X para PxXyl30_2 se realizaron los ensayos de perfil de actividad frente a un amplio rango de pH y temperatura.

PxXyn30_8 presentó mayor actividad xilanasa a pH6 y mantuvo más del 60% de la eficiencia en un rango de pH de 4,5 a 8 y al menos 40% a pH 4 y 10 (Figura R18A). En función a estos resultados, esta enzima podría clasificarse adecuadamente como una xilanasa neutra activa en un amplio rango de pH. La actividad máxima de PxXyl30_2 se observó a pH 6,6 y mantuvo más del 60% de actividad en un rango de pH de 5 a 7. Sin embargo, la actividad disminuyó drásticamente por debajo del 20% a pH 4 y 8 (Figura R18B). Las condiciones óptimas de pH obtenidas en cada caso se utilizaron para determinar el comportamiento de las enzimas en función de la temperatura. Las curvas mostraron un óptimo a 60 °C para PxXyn30_8 y a 40 °C para PxXyl30_2. Ambas enzimas mantuvieron una actividad superior al 60% de la óptima en un rango de temperatura de 30 a 75 °C para PxXyn30_8 y de 30 a 50 °C para PxXyl30_2. La actividad de PxXyl30_2 disminuyó a 30% a 25 °C y a 15% a 55 °C (Figura R18C-D).

Para determinar su estabilidad térmica, las enzimas se pre-incubaron a diferentes temperaturas y a distintos tiempos, y luego se ensayó la actividad enzimática residual de cada una bajo sus condiciones óptimas de reacción (pH 6 y 60 °C para *PxXyn30_8* y pH 6,5 y 40 °C para *PxXyl30_2*). *PxXyn30_8* fue marcadamente más estable que *PxXyl30_2*, dado que retuvo más del 80% de su actividad cuando se pre-incubó hasta 20 hs a 40 °C o menos y mantuvo ~40% luego de 2 hs de pre-incubación a 50 °C y 55 °C. A su temperatura óptima, 60 °C, la enzima mantuvo hasta un 20% de actividad durante 30 min (Figura R18E). *PxXyl30_2* retuvo ~90% de su actividad a 30°C durante 120 min de pre-incubación y ~60% mientras a 35 °C y a 40 °C por hasta 60 min. Cuando se extendió el tiempo de pre-incubación de *PxXyl30_2* a 30 °C, la enzima perdió el 90% de su actividad en 20 hs (Figura R18F).

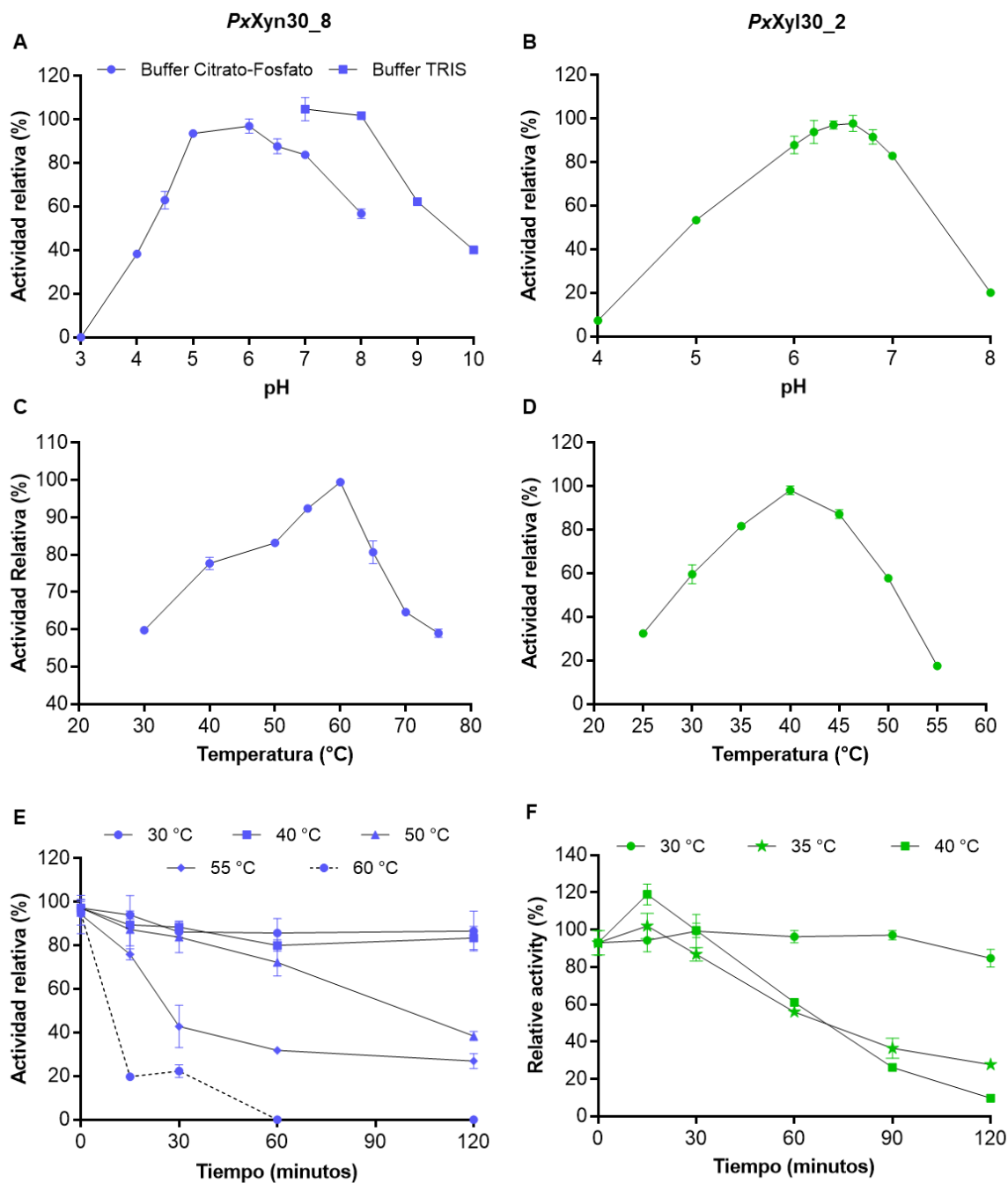


Figura R18: Perfil de actividad enzimática de *PxXyn30_8* (celeste) y *PxXyl30_2* (verde) sobre xilano de madera de haya y *pNP-X*, respectivamente. Condición de pH óptimo (**A y B**). Condición de temperatura óptima (**C y D**). Estabilidad térmica (**E y F**). El pH óptimo se determinó a 60 °C para *PxXyn30_8* y 40 °C para *PxXyl30_2*. La temperatura óptima se evaluó a pH 6 para *PxXyn30_8* y pH 6,5 para *PxXyl30_2*. Los resultados indican medias y desviaciones estándar de ensayos por cuatuplicado.

III. C. ii. Cinética enzimática

Los parámetros cinéticos de *PxXyn30_8* se calcularon mediante el monitoreo de la liberación de azúcares reductores totales, expresados como equivalentes de xilosa, a partir de concentraciones crecientes de XIN por el método DNS; mientras que los de *PxXyl30_2* se obtuvieron midiendo su

actividad (liberación de *p*NP) sobre concentraciones crecientes de *p*NP-X. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo en las condiciones de pH y temperatura óptimos determinados para cada enzima. Para ambos casos, los datos obtenidos se ajustaron mediante regresión no lineal al modelo de Michaelis-Menten (Figura R19), lo que sugiere un sitio catalítico único sin sitios secundarios de unión. Para *PxXyn30_8*, los valores de K_M y V_{max} fueron $7,07 \pm 1,21$ mg/mL y $66,12$ μ mol/min/mg, respectivamente. Además, la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M) de $14,17$ mL/min/mg se calculó en base al número de recambio para esta enzima (k_{cat}) $100,18$ /min. En el caso de *PxXyl30_2*, los valores de K_M y V_{max} fueron $1,35 \pm 0,09$ mM y $48,33$ mM/min, respectivamente. Su K_{cat} fue de $48,82$ mM/min, por lo que la eficiencia catalítica resultó en $36,16$ mM/min.

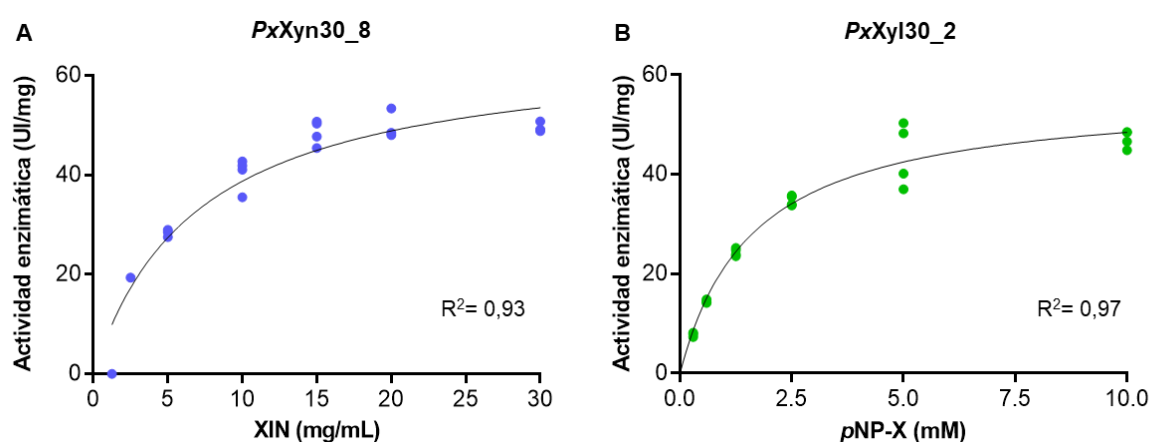


Figura R19: Cinética enzimática de *PxXyn30_8* (A) y *PxXyl30_2* (B). Las curvas se obtuvieron a 60°C y pH 6 para *PxXyn30_8* y a 40°C y pH 6,5 para *PxXyl30_2*. Los resultados indican medias y desviaciones estándar de ensayos por cuatriplicado.

Para evaluar la sensibilidad a los posibles productos de *PxXyl30_2*, se ensayó tanto la adición de xilosa (X1), en función a su actividad β -xilosidasa predicha, como así también arabinosa (A1, pentosa con estructura semejante a X1) y glucosa (G1, hexosa). Se observó que X1 y A1 son inhibidores de la actividad de *PxXyl30_2* en mayor medida que G1 (Figura R20A). X1 resultó ser inhibidor competitivo de la enzima (K_i de $8,24$ mM) causando modificaciones en la cinética de hidrólisis como se observa en la Figura R20B. Los valores de K_M (ap) y V_{max} (ap) en presencia de 15 mM de X1 fueron $3,81 \pm 0,23$ mM y $44,08$ mM/min, respectivamente.

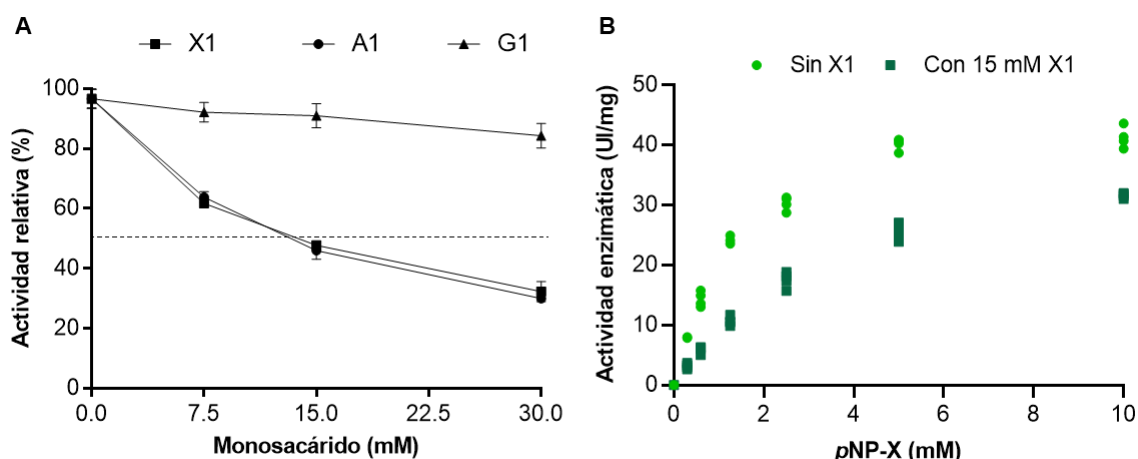


Figura R20: Inhibición de la actividad enzimática de *PxXyl30_2* por monosacáridos. **A)** Actividad relativa en condiciones enzimáticas óptimas con concentraciones crecientes de xilosa (X1), arabinosa (A1) y glucosa (G1). La línea punteada indica una actividad relativa del 50%. **B)** Curvas cinéticas en ausencia de X1 (círculo verde claro, control) y en presencia de 15 mM X1 (cuadrado verde oscuro) sobre pNP-X. Los valores de R^2 fueron 0,98 y 0,99 para el ajuste de la curva control y la curva con X1, respectivamente. El 100% de actividad relativa (34 UI/ml) representa la actividad enzimática sobre pNP-X en condiciones óptimas de pH y temperatura y en ausencia de monosacáridos. Los resultados indican medias y desviaciones estándar de ensayos por cuatuplicado.

III. C. iii. Especificidad de sustrato

La actividad hidrolítica de *PxXyn30_8* fue evaluada en varios sustratos, bajo sus condiciones óptimas de pH y temperatura, para caracterizar su especificidad enzimática. La enzima mostró actividad sobre enlaces β -1,4 de xilano decorado con ácido glucurónico (MeGlcA), como xilano de madera de haya (XIN $30,23 \pm 0,59$ UI/mg) (Figura R21A), xilano de madera de abedul (BAX $24,22 \pm 0,69$ UI/mg) y 4-*O*-metil-glucuronoxilano (MeGX $22,51 \pm 0,80$ UI/mg) (actividad enzimática determinada mediante el método DNS, a 60 °C y pH 6) (Tabla R14). No se detectó actividad sobre otros tipos de xilanos, como xilano no ramificado (INX), o con sustituciones de arabinosa (WAX), sustratos de para-nitrofenilo (para-nitrofenil xilopiranosido, pNP-X; para-nitrofenil arabinofuranósido, pNP-A; para-nitrofenil glucopitanósido, pNP-G; para-nitrofenil celobiósido, pNP-C) ni en sustratos celulósicos, como Avicel (celulosa cristalina), celulosa hinchada con ácido fosfórico (PASC) y carboximetilcelulosa (CMC) (Tabla R14). Los resultados obtenidos confirman su actividad glucurono-xilanasa específica (EC 3.2.1.136), que requiere sustituciones (Me)GlcA (U) para actuar sobre el polímero de xilano.

Tabla R14: Especificidad de sustrato de Pxxyn30_8. Los resultados indican medias y desviaciones estándar de ensayos por triplicado.

Sustrato	Enlace principal	Sustitución	Actividad específica (UI/mg)	Metodología de detección
Xilano de madera de haya	Xyl β -1,4	α -1,2 MeGlcA (13%)	30,23 $\pm$ 0,59	DNS, TLC
Xilano de madera de abedul	Xyl β -1,4	OAc (24%)	24,22 $\pm$ 0,69	DNS
4-O-metil-glucuronoxilano	Xyl β -1,4	MeGlcA (%n.d.)	22,51 $\pm$ 0,80	DNS
Xilano industrial	Xyl β -1,4	-	-	DNS
Arabinoxilano de trigo	Xyl β -1,4	Ara α -1,3/Ara α -1,2 (38%)	-	DNS
Carboximetilcelulosa	Glc β -1,4	40% CM	-	DNS
Avicel PH-101	Glc β -1,4	-	-	DNS
Celulosa hinchada con ácido fosfórico	Glc β -1,4	-	-	DNS
pNP- β -D-xilopiranosido	Xyl β -1,4-pN	-	-	pNP
pNP- α -L-arabinofuranosido	Ara α -1,4-pN	-	-	pNP
pNP- β -D-glucopiranosido	Glc β -1,4-pN	-	-	pNP
pNP-D-celobiosido	Glc β -1,4-Glc β -1,4-pN	-	-	pNP

(-) ausencia de productos de reacción. pNP: *p*-nitrofenil-; CM, sustituyentes de carboximetilo; Ara, arabinosa; Glc, glucosa; Xyl, xilosa; MeGlcA, ácido glucurónico metilado; OAc: acetilación.

En función a estos resultados, se evaluó la actividad de la enzima sobre biomásas lignocelulósicas enriquecidas en glucurono-xilanos (GX), como bagazo de agave pretratado por extrusión alcalina (BABe), eucaliptus molido (Eucam) y eucaliptus pretratado por explosión de vapor (Eucas), y en arabinoglucurono-xilanos (AGX), empleando como representantes el residuo de caña de azúcar pretratado por extrusión alcalina (RACe). Mediante cromatografía en capa delgada (TLC) observamos actividad enzimática sobre todas las biomásas ensayadas, excepto sobre Eucas (Figura R21B). La ausencia de hidrólisis sobre Eucas podría deberse al pretratamiento que presenta la biomasa, explosión de vapor, que solubiliza, fragmenta y remueve la mayor parte de la hemicelulosa disminuyendo el contenido de xilano en la fracción sólida recuperada (Martín-Sampedro y col., 2012). La hidrólisis con Pxxyn30_8 fue más eficiente sobre BABe, seguida de Eucam y finalmente RACe donde se observó una leve degradación (Figura R21B). La capacidad diferencial de hidrólisis observada estaría dada por las sustituciones presentes en el xilano y por el pre-tratamiento utilizado. En este sentido, la extrusión alcalina permite que las fibras presentes en la biomasa se abran favoreciendo el acceso de las enzimas para la hidrólisis; mientras que la molienda es un tratamiento mecánico que disminuye el tamaño de las partículas. El acceso facilitado al GX que compone al BABe podría promover su degradación por Pxxyn30, incluso obteniendo un perfil de productos similar al observado cuando se utiliza XIN. Si bien tanto BABe como

RACe son biomásas sometidas al mismo tipo de pre-tratamiento, la diferencia está en el tipo de xilano que posee cada una, GX y AGX, respectivamente. La presencia de sustituciones de arabinosa, además de las decoraciones de MeGlcA (Sporck y col., 2017), podrían estar impidiendo la acción eficiente de la enzima sobre RACe.

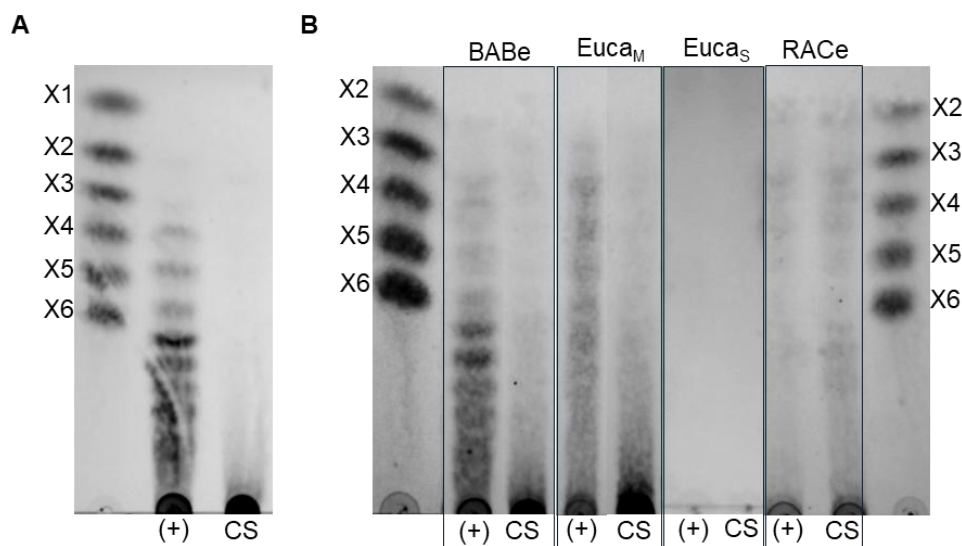


Figura R21: Actividad enzimática de *PxXyn30_8* sobre diferentes fuentes de xilano. Productos de hidrólisis de xilano de madera de haya (XIN) (A) y de biomásas lignocelulósicas (B) visualizados por TLC. BABe: bagaso de agave extrusado; Eucam: eucalipto molido; Eucas: eucalipto pretratado por explosión de vapor; RACe: residuo de caña de azúcar extrusado; (+): presencia de *PxXyn30_8*; CS: control sustrato. Estándares de XOS: xilosa (X1), xilobiosa (X2), xilotriosa (X3), xilotetraosa (X4), xilopentosa (X5) y xilohexosa (X6).

En cuanto a *PxXyl30_2*, la enzima presentó una elevada actividad sobre *pNP-X* ($31,27 \pm 1,63$ UI/mg), mientras que no mostró actividad detectable frente a otros sustratos cromogénicos, como *pNP-A* (actividad α -arabinofuranosidasa), *pNP-G* (actividad β -galactosidasa) y *pNP-C* (actividad celobiosidasa). Estos resultados confirman que se trataría de una β -xilosidasa (EC 3.2.1.37) (Tabla R15). Con el fin de contrastar las actividades predichas para la subfamilia (α -arabinofuranosidasa y β -xilosidasa), se ensayó la acción de la enzima sobre los sustratos naturales disponibles comercialmente: xilobiosa (X2), xilo-oligosacáridos (XOS) de diferente grado de polimerización (hasta X6) y arabino-xilo-oligosacáridos (AXOS), incluyendo 3^3 - α -L- arabinofuranosil-xilotetraosa (XA^3XX) y 2^3 - α -L-arabinofuranosil-xilotriosa (A^2XX). En ninguno de los casos se detectó actividad (Figura R22A y B, Tabla R15). Dado que algunas glicosil hidrolasas, requieren del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD^+) como cofactor para su actuar sobre el sustrato (Vuong y Wilson, 2010; Chakladar y col., 2014; Mohapatra y Manoj, 2023), se evaluó la actividad de *PxXyl30_2* sobre X2 en presencia de NAD^+ , sin observarse actividad enzimática (Figura R22C).

Para complementar el análisis, se analizó la actividad de *PxXyl30_2* sobre los XOS generados a partir de la hidrólisis de XIN por *PxXyn10A* y *PxXyn11B*, las dos endo-xilanasas de *P. xylanivorans* ya

caracterizadas en nuestro laboratorio. Dado que el xilano empleado es rico en sustituciones MeGlcA, las enzimas generaron una mezcla de XOS y glucurono-xilo-oligosacáridos (UXOS). En particular, *PxXyn10A* produjo, como era esperado, mayormente X2, X1 y diversos XOS/UXOS con un grado de polimerización (GP) entre 2-5; mientras que *PxXyn11B* generó productos de GP 2 a 6, con escasa o nula liberación de X1. No se detectó actividad por parte de *PxXyl30_2* sobre estos productos (Figura R22D), lo que indica que la enzima no actúa sobre los XOS ni UXOS generados por estas endo-xilanasas. Asimismo, se descartó actividad endo-xilanasas de *PxXyl30_2*, ya que no se observó liberación de azúcares reductores a partir de XIN ni de arabino-xilano de trigo (Tabla R15).

Estudios previos (Zhou y col., 2012) reportaron que *RuXyn2* perteneciente a una bacteria no cultivable del rumen (39,52% de identidad con *PxXyl30_2*), una de las dos enzimas caracterizadas y depositadas en la base de datos CAZy para la subfamilia 2 (GH30_2) hasta la fecha, presentó actividad sobre el disacárido 1,5- α -L-arabinobiosa. Por lo tanto, se ensayó la actividad de *PxXyl30_2* sobre arabino-oligosacáridos (AOS) obtenidos por hidrólisis ácida de arabinano de remolacha azucarera, así como sobre el polímero, aunque no se detectó actividad sobre ninguno de ellos (Figura R22E, Tabla R15).

Tabla R15: Especificidad de sustrato de *PxXyl30_2*. Los resultados indican medias y desviaciones estándar de ensayos por triplicado.

Sustrato	Enlace principal	Sustitución	Actividad específica (UI/mg)	Metodología de detección
<i>p</i> NP- β -D-xilopiranosido	Xyl β -1,4- <i>p</i> N	-	31,27 $\pm$ 1,63	<i>p</i> NP
<i>p</i> NP- α -L-arabinofuranosido	Ara α -1,4- <i>p</i> N	-	-	<i>p</i> NP
<i>p</i> NP- β -D-glucopiranosido	Glc β -1,4- <i>p</i> N	-	-	<i>p</i> NP
<i>p</i> NP-D-celobiosido	Glc β -1,4- Glc β -1,4- <i>p</i> N	-	-	<i>p</i> NP
XOS (X2, X3, X4, X5 y X6)	Xyl β -1,4	-	-	TLC
A ² XX	Xyl β -1,4	Ara α -1,2 (25%)	-	TLC
XA ³ XX	Xyl β -1,4	Ara α -1,3 (20%)	-	TLC
Xilano de madera de haya	Xyl β -1,4	α -1,2 MeGlcA (13%)	-	DNS
Arabinoxilano de trigo	Xyl β -1,4	Ara α -1,3/Ara α -1,2 (38%)	-	DNS
AOS	Ara α -1,5	n.d.	-	TLC

(-) ausencia de productos de reacción. XOS: xilo-oligosacáridos; A²XX: 2³- α -L-arabinofuranosil-xylotriosa (extremo no reductor); XA³XX: 3³- α -L-arabinofuranosil-xilotetraosa; AOS: arabino-oligosacáridos; *p*NP: *p*-nitrofenil-. CM, sustituyentes de carboximetilo; Ara, arabinosa; Glc, glucosa; Xyl, xilosa; MeGlcA, ácido glucurónico metilado.

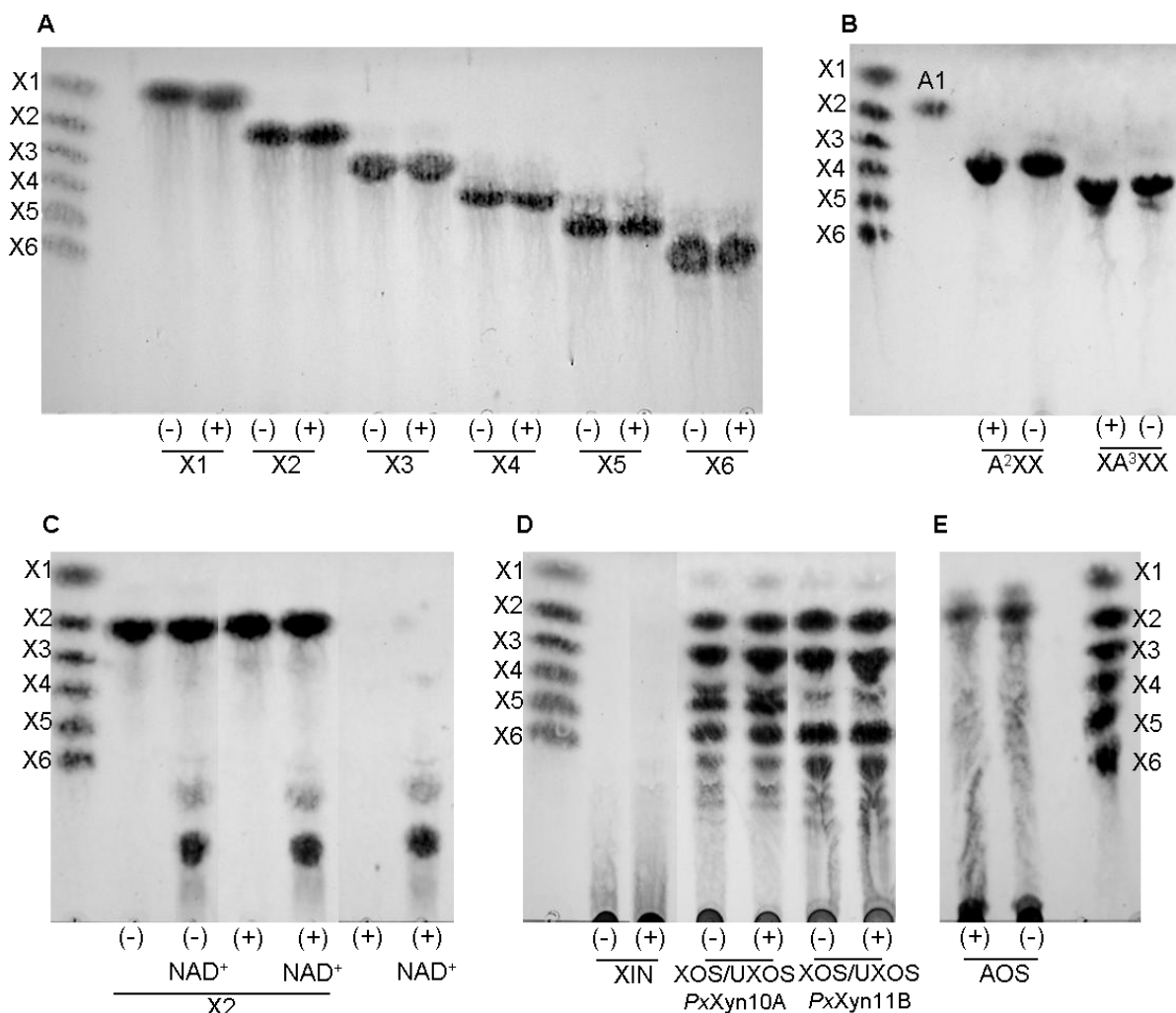


Figura R22: Productos de hidrólisis de *PxXyl30_2* sobre distintos sustratos visualizados por TLC. A) Hidrólisis xilosa (X1) y xilo-oligosacáridos (XOS) a 40 °C por 1 hs. **B)** Hidrólisis de arabino-xilo-oligosacáridos (AXOS): xilotriosa con arabinosa unida por α -1,2: (A²XX) y xilotetraosa con arabinosa unida por α -1,3 (XA³XX) a 40 °C por 1 hs. **C)** Hidrólisis de xilobiosa (X2) con o sin la adición de NAD⁺ a 30 °C por 20 hs. **D)** Hidrólisis de XOS y glucurono-xilo-oligosacáridos (UXOS), generados enzimáticamente mediante tratamiento de xilano de madera de haya (0,5% p/v) con 0,5 μ M *PxXyn10A* o 2 μ M *PxXyn11B*, a 30 °C por 20 hs. **E)** Hidrólisis arabino-oligosacáridos (AOS), obtenidos por hidrólisis química con 0,05 M TFA, a 30 °C por 20 hs. Se indican los controles sin enzima (-) y con 0,1 mg/mL de *PxXyl30_2* (+). Estándares de XOS: xilosa (X1), xilobiosa (X2), xilotriosa (X3), xilotetraosa (X4), xilopentosa (X5) y xilohexosa (X6).

Dado que *PxXyl30_2* fue detectada en todas las condiciones de cultivo evaluadas en esta tesis, en última instancia se evaluó su actividad tanto por sí misma como en complemento del sobrenadante de cultivo E-*PxST* (caracterizado en el capítulo II), para la hidrólisis de una biomasa compleja, en este caso, salvado de trigo (ST). Sin embargo, no se detectó un incremento en la liberación de azúcares reductores (determinados como equivalentes de xilosa mediante el método DNS) ni cambios en el perfil de productos de hidrólisis (analizado por TLC) en presencia de *PxXyl30_2*, por lo cual no es posible asignarle una actividad enzimática definida (Figura R23).

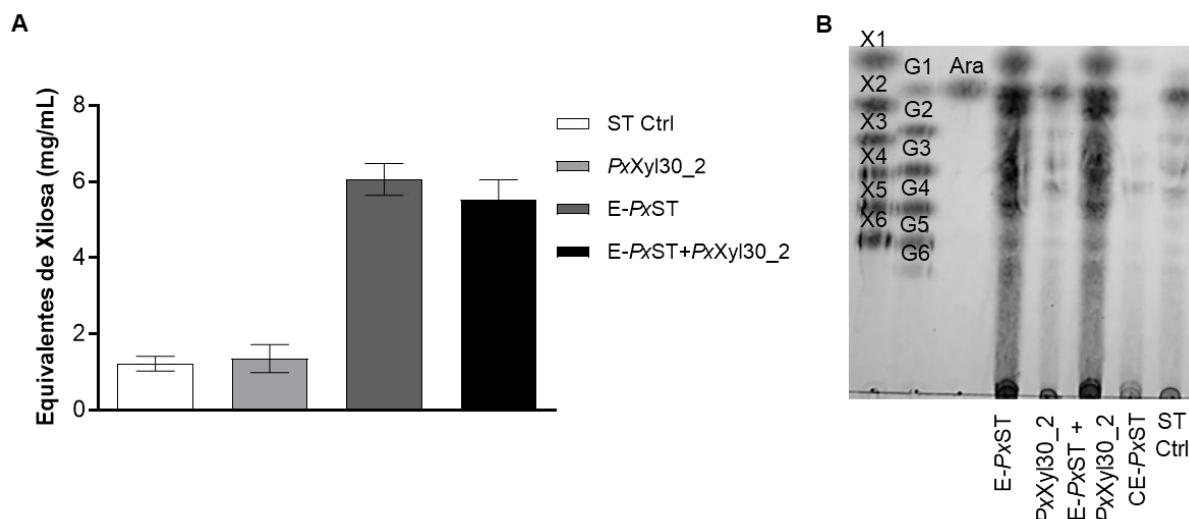


Figura R23: Complementación del extracto enzimático de *P. xylanivorans* con *PxXyl30_2*. Hidrólisis enzimática del salvado de trigo (ST) utilizando el sobrenadante de cultivo de *P. xylanivorans* en ST (E-PxST) suplementado o no con 0,1 mg/mL de *PxXyl30_2*. **A)** Medición de azúcares reductores totales obtenidos expresados como equivalentes de xilosa, mediante DNS. Los resultados indican medias y desviaciones estándar de ensayos por triplicado. **B)** Perfil de productos de hidrólisis obtenidos analizados por TLC. CE-PxST: control sobrenadante. ST Ctrl: control sustrato. Estándares de azúcares: xilosa (X1), xilobiosa (X2), xilotriosa (X3), xilotetraosa (X4), xilopentosa (X5), xilohexosa (X6), glucosa (G1), celobiosa (G2), celotriosa (G3), celotetraosa (G4), celopentosa (G5), celohexosa (G6) y arabinosa (Ara).

En esta instancia de la tesis se decidió continuar caracterizando en detalle la glucurono-xilanas *PxXyn30_8*, incluyendo su modo de acción sobre el xilano y su interacción sinérgica con otras xilanasas de *P. xylanivorans* para el desarrollo de formulaciones enzimáticas específicas.

III. D. Bioconversión del xilano por endo-xilanasas de *P. xylanivorans* y modo de acción de *PxXyn30_8*

La actividad de las xilanasas procariotas pertenecientes a la subfamilia GH30_8 se ve afectada tanto por la presencia como por la cantidad de residuos laterales de GlcA/MeGlcA en la cadena principal de xilano. En las enzimas caracterizadas hasta el momento, se determinó que es necesaria la sustitución de (Me)GlcA en el subsitio -2 para que ocurra la hidrólisis (Puchart y col., 2021; Vacilotto y col., 2024).

Para estudiar el mecanismo de acción *PxXyn30_8*, se ensayó su actividad sobre XIN, que tiene aproximadamente 13% de sustituciones α -1,2 MeGlcA, en combinación con una α -glucuronidasa GH67 (CsAgu67) (EC 3.2.1.139), que remueve sustituciones de (Me)GlcA, del extremo no-reductor de glucurono-xilo-oligosacáridos (UXOS) (Ontañón y col, en revisión). La endo-xilansa *PxXyn10A* que acepta sustituciones de α -1,2 (Me)GlcA en el sitio +1 fue incluida como control positivo, mientras que *PxXyn11B* se empleó como control negativo dado que no admite estas decoraciones en dicha posición (de Mello Capetti y col., 2023a). Los productos de la hidrólisis de las xilanasas solas y en combinación

con CsAgu67 fueron analizados por TLC (Figura R24). Los productos de hidrólisis de XIN con PxXyn30_8 fueron (U)XOS largos, predominando aquellos mayores a X6. La combinación de PxXyn30_8 con CsAgu67 resultó en un cambio en el perfil de productos, lo cual indicaría que PxXyn30_8 genera UXOS con sustituciones terminales en el extremo no-reductor, que sirven de sustrato para CsAgu67 (Figura R24A). Dicho patrón fue más evidente al aumentar la concentración de sustrato en la reacción de 0,5% (p/v) a 1,5% (p/v) (Figura R24A). Un perfil de hidrólisis similar fue observado para el control PxXyn10A - PxXyn10A+CsAgu67 (Figura R25A y B). En función a estos resultados, es probable que PxXyn30_8 acepte sustituciones α -1,2 (Me)GlcA en el sitio +1, lo cual no había sido descrito hasta el momento para glucurono-xilanasas de la familia GH30.

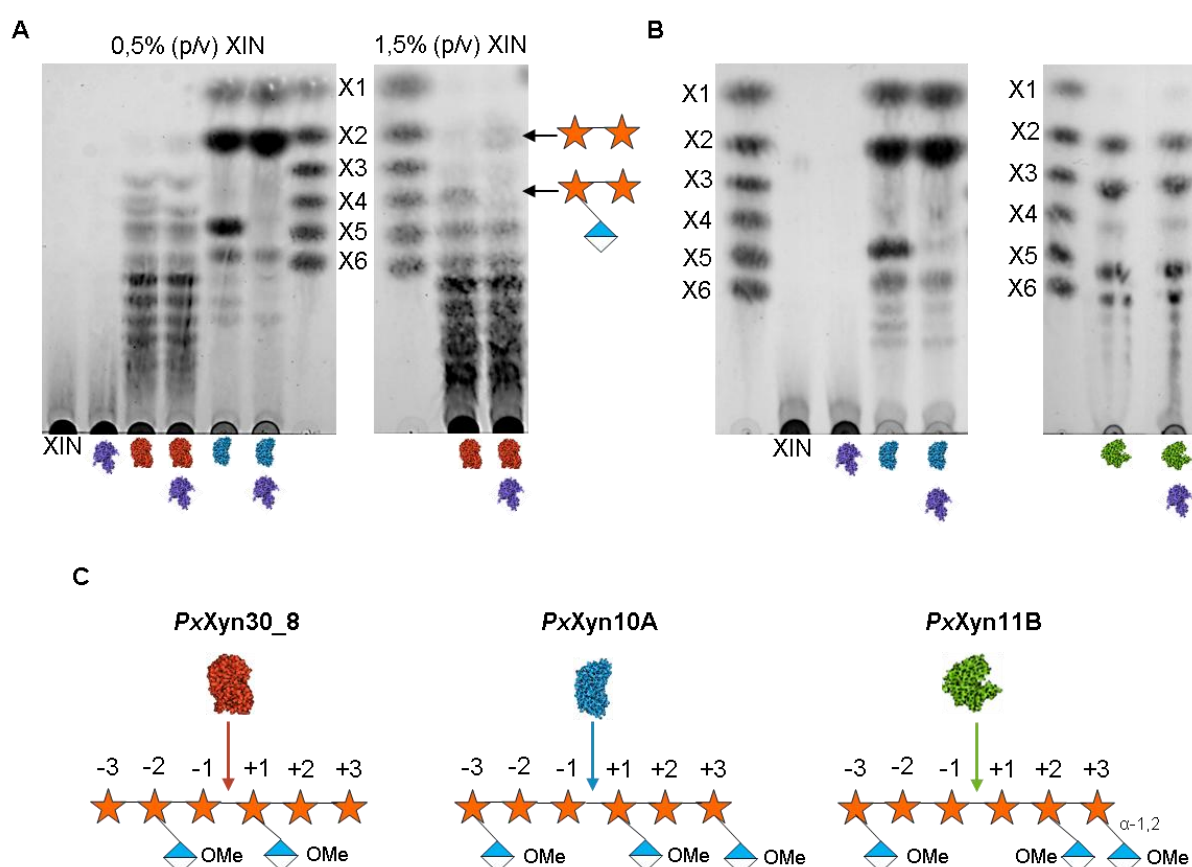


Figura R24: Modo de acción de PxXyn30_8. A) Perfil de productos liberados tras la hidrólisis del xilano de madera de haya (XIN) por PxXyn30_8 (rojo) y PxXyn10A (azul claro, control positivo) solas o en combinación con CsAgu67 (lila), visualizaron por TLC. B) Modo de acción de PxXyn10A y PxXyn11B (verde, control negativo) en combinación con CsAgu67. Hidrolizados analizados mediante TLC. C) Esquema de tolerancia a decoraciones de ácido 4-O-metilglucurónico (diamantes) en los subsitos de unión. La cadena principal de xilano se indica con estrellas. Modelo de corte de PxXyn10A y PxXyn11A adaptados de de Mello Capetti y col., 2023a. Las reacciones se llevaron a cabo a 30 °C por 20 hs utilizando 1 μ M o 0,1 μ M de cada enzima en A y B, respectivamente. Estándares de XOS: X1 (xilosa), X2 (xilobiosa), X3 (xilotriosa), X4 (xilotetraosa), X5 (xilopentosa) y X6 (xilohexosa).

Finalmente, PxXyn30_8 también fue capaz de hidrolizar UXOS generados por las endo-xilanasas PxXyn10A y PxXyn11B (Ghio y col., 2018), generando un perfil de XOS/UXOS más cortos y liberando X1

(Figura R25). Este efecto resulta relevante ya que contribuye a disminuir la recalcitrancia de biomasas lignocelulósicas ricas en GX, favoreciendo su valorización.

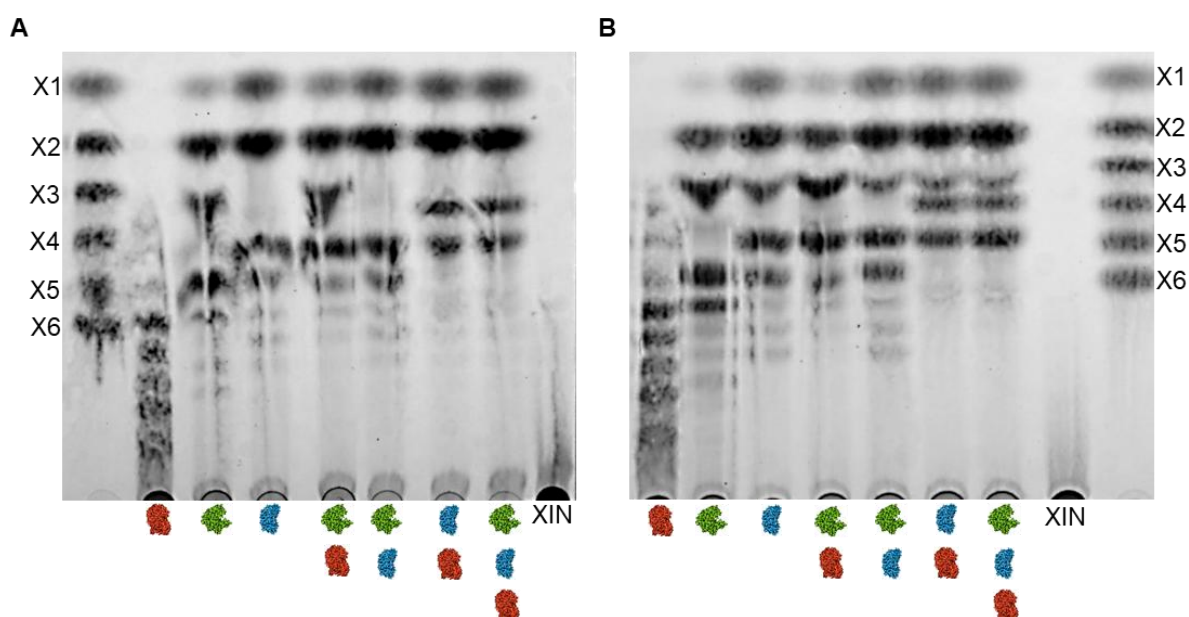


Figura R25: Perfil de hidrólisis del xilano de madera de haya por endo-xilanasas de *P. xylanivorans*. Los productos de reacción solubles generados por *Pxxyn30_8* (rojo), *Pxxyn10A* (azul claro) y *Pxxyn11B* (verde) tras la incubación con xilano de madera de haya (XIN), utilizando 1 µM (A) o 0,1 µM (B) de enzima se visualizaron mediante TLC. Las reacciones se llevaron a cabo a 40 °C por 20 hs utilizando las enzimas individualmente o en combinación, según se indica. Estándares de XOS: X1 (xilosa), X2 (xilobiosa), X3 (xilotriosa), X4 (xilotetraosa), X5 (xilopentosa) y X6 (xilohexosa).

La adición de *Pxxyn30_8* a *Pxxyn10A* o *Pxxyn11B* incrementó la liberación de X1 (Tabla R16), y este efecto potenciador fue aún más marcado al emplear concentraciones diez veces menores (0,1 µM) de cada enzima (Tabla R16, Figura R25B).

El análisis del perfil de productos obtenidos mostró que la combinación de las tres endo-xilanasas generó un patrón idéntico al obtenido con *Pxxyn10A*+*Pxxyn30_8*. De manera similar, la combinación de *Pxxyn10A* y *Pxxyn11B* resultó en el mismo perfil de hidrólisis que *Pxxyn10A* en forma individual (Figura R25). Estos resultados refuerzan la hipótesis que *Pxxyn10A* es la xilanasa principal de *P. xylanivorans* y demuestran que su rendimiento de hidrólisis sobre GX mejora al ser suplementada con *Pxxyn30_8*.

Tabla R16: Degradación de xilano de madera de haya por xilanasas. Las concentraciones de azúcares reductores y xilosa se determinaron mediante el método DNS y enzimáticamente con un kit comercial, respectivamente. Las reacciones se llevaron a cabo sobre 0,5% (p/v) XIN a 40 °C por 20 hs utilizando 1 μ M o 0,1 μ M de las enzimas individualmente o en combinación, según se indique. IS: índice de sinergismo. Los resultados se expresan como medias y desviaciones estándar por triplicado. n.c.: no cuantificado (< 0,1 mg/mL); n.d.: no determinado.

Enzimas	Azúcares reductores totales (mg/mL)	Xilosa (mg/mL)	IS (xilosa)
1 μM de cada enzima			
<i>PxXyn30_8</i>	0,18 $\pm$ 0,02	n.c.	n.d.
<i>PxXyn11B</i>	1,29 $\pm$ 0,05	0,13 $\pm$ 0,01	n.d.
<i>PxXyn10A</i>	1,66 $\pm$ 0,11	0,61 $\pm$ 0,02	n.d.
<i>PxXyn11B + PxXyn30_8</i>	1,35 $\pm$ 0,08	0,19 $\pm$ 0,04	1,32
<i>PxXyn11B + PxXyn10A</i>	1,69 $\pm$ 0,02	0,66 $\pm$ 0,06	0,90
<i>PxXyn10A + PxXyn30_8</i>	1,73 $\pm$ 0,06	0,70 $\pm$ 0,05	1,12
<i>PxXyn11B + PxXyn10A + PxXyn30_8</i>	1,75 $\pm$ 0,03	0,73 $\pm$ 0,05	0,97
0,1 μM de cada enzima			
<i>PxXyn30_8</i>	0,19 $\pm$ 0,01	n.c.	n.d.
<i>PxXyn11B</i>	1,16 $\pm$ 0,13	n.c.	n.d.
<i>PxXyn10A</i>	1,52 $\pm$ 0,03	0,47 $\pm$ 0,03	n.d.
<i>PxXyn11B + PxXyn30_8</i>	1,26 $\pm$ 0,02	0,18 $\pm$ 0,01	3,70
<i>PxXyn11B + PxXyn10A</i>	1,41 $\pm$ 0,02	0,70 $\pm$ 0,06	1,35
<i>PxXyn10A + PxXyn30_8</i>	1,57 $\pm$ 0,09	0,84 $\pm$ 0,16	1,81
<i>PxXyn11B + PxXyn10A + PxXyn30_8</i>	1,68 $\pm$ 0,07	0,88 $\pm$ 0,14	1,72

Para una caracterización más exhaustiva, los productos de hidrólisis (Figura 24A) fueron analizados mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) y resonancia magnética nuclear (RMN) por el Dr. Santanu Jana en el *Complex Carbohydrate Research Center (CCRC), University of Georgia* (Estados Unidos). El análisis de los datos mostró que los productos de *PxXyn30_8* son UXOS de GP entre 2 y 8, todos con una única sustitución de MeGlcA. Todos los productos, excepto uno detectado en menor cantidad, presentan las sustituciones MeGlcA en el penúltimo sitio antes del extremo reductor (posición -2), dado el requerimiento para la actividad específica de *PxXyn30_8*. Al analizar en detalle el producto que cambia al combinar *PxXyn30_8* con CsAgu67 por RMN, se identificó como una xilobiosa monosustituida con MeGlcA en el extremo no reductor (X2MNa), coincidiendo con los resultados observados en el TLC (Figura R24A).

Todos estos resultados demuestran que *PxXyn30_8* es una glucuruno-xilanasas obligada (EC 3.2.1.136), realizando la hidrólisis en la cadena principal de GX, en el enlace adyacente al residuo xilosídico sustituido con MeGlcA hacia el extremo reductor (subsitio -2) y que puede tolerar decoraciones de ácido glucurónico en el subsitio +1 (Figura 24C), característica que no estaba aún descripta para las enzimas de esta familia.

Capítulo IV: Aplicación de complejos enzimáticos en bioprocesos

La biomasa lignocelulósica, compuesta principalmente por los polisacáridos estructurales celulosa y hemicelulosa, constituye una materia prima renovable de alto potencial para el desarrollo de procesos sustentables orientados a la obtención de biocombustibles y bioproductos. No obstante, la viabilidad económica de estos procesos depende en gran medida de la eficiencia con la que los polisacáridos pueden ser convertidos en oligosacáridos de bajo peso molecular y azúcares monoméricos fermentables, como la glucosa y la xilosa. Para alcanzar este objetivo, se requieren formulaciones enzimáticas complejas, compuestas por múltiples glicosil hidrolasas con funciones complementarias que permitan una degradación eficiente de los componentes lignocelulósicos. Estas enzimas pueden ser producidas por un único microorganismo lignocelulolítico, como ciertas bacterias u hongos, o bien seleccionadas estratégicamente, producidas de manera recombinante y combinadas en proporciones óptimas. En esta tesis se desarrolló un cóctel enzimático a partir de *Paenibacillus xylanivorans* por cultivo en fuentes de carbono de bajo costo para su producción, con el objetivo de obtener una formulación activa y específica para la hidrólisis del xilano presente en diferentes tipos de biomasa lignocelulósica (Capítulo II). Por otro lado, se llevó a cabo la caracterización funcional de una glucurono-xilanasas, Pxxyn30_8, y se evaluó su interacción con otras dos endo-xilanasas del mismo organismo, Pxxyn10A y Pxxyn11B. Los resultados obtenidos indicaron una acción cooperativa entre estas enzimas sobre el glucurono-xilano (GX) potenciando su eficiencia hidrolítica (Capítulo III). En conjunto, estos resultados aportan información relevante para el diseño de cócteles enzimáticos sustentables y optimizados capaces de mejorar la conversión de xilanos presentes en múltiples tipos de biomasa a xilosa y xilo-oligosacáridos. En este apartado de la tesis buscamos evaluar la utilización de formulaciones enzimáticas desarrolladas en el laboratorio para su aplicación en distintos bioprocesos.

IV. A. Aditivos enzimáticos para la alimentación de animales monogástricos

En animales monogástricos como aves, cerdos y peces, entre el 20% y 30% del alimento no es aprovechado debido a la falta de enzimas endógenas y estructura intestinal necesarias para degradar dos factores antinutricionales: los fitatos y los polisacáridos no amiláceos (PNAs). Mientras que el fitato puede ser eficientemente degradado por fitasas microbianas, enzimas ya ampliamente disponibles y utilizadas como aditivos en la industria, la digestión de PNAs representa un desafío mayor debido a su complejidad estructural y variabilidad entre especies vegetales. Los PNAs solubles forman geles viscosos que retardan el tránsito intestinal, dificultando la difusión de los nutrientes y promoviendo la proliferación de la microbiota indeseable, mientras que los PNAs insolubles atrapan nutrientes limitando la accesibilidad de enzimas endógenas (Fu y col., 2024). La adecuada degradación de los PNAs requiere múltiples glicosil hidrolasas capaces de complementar las limitaciones enzimáticas del sistema digestivo de estos animales. En este contexto, una nutrición animal sostenible demanda

cócteles enzimáticos específicos, adaptados a la composición de cada dieta. Sin embargo, este tipo de formulaciones aún no se encuentra disponible en el mercado regional. En Argentina, las dietas más utilizadas están basadas en mezclas de maíz y soja, cuya composición se presenta en la Tabla R17.

Tabla R17: Composición alimento animal a base de soja-maíz, en formato de pellets. El alimento proviene de la Empresa avícola CyB SA, Entre Ríos. Caracterización llevada a cabo por Vanessa Arnoldi (USC, Sao Carlos-SP) siguiendo protocolos del NREL. n.d.: no detectado.

Componente	Proporción (%)
Lignina ácido insoluble	2,11
Lignina ácido soluble	5,53
Glucanos (α - y β -)	45,24
Xilanos	1,36
Mananos	2,43
Arabinosa	1,54
Galactosa	2,52
Grupos acetilo	1,04
Cenizas	4,77
Extractivos (acuosos y orgánicos)	n.d.

El cóctel enzimático de *P. xylanivorans* desarrollado en esta tesis, utilizando salvado de trigo (ST) como fuente de carbono para su producción (E-PxST), demostró ser una formulación efectiva para la hidrólisis del xilano (Capítulo II). Sin embargo, casi un 50% del alimento de aves a estudiar está compuesto por α - y β -glucanos y la proporción de xilanos en el mismo es muy baja (1,36%). Teniendo en cuenta además que numerosas β -glucanasas (GH9, GH5, GH48 y GH16) y una α -amilasa (GH13) fueron identificadas por espectrometría de masas en E-PxST (Tabla R5) se realizó la caracterización complementaria de la actividad β -glucanasa y α -amilasa del extracto con el objetivo de ensayar posteriormente su actividad sobre el alimento para aves de base maíz-soja.

La actividad β -glucanasa y α -amilasa fueron evaluadas sobre β -glucano de enlaces mixtos (β -1,3/ β -1,4) de cebada (β GC) (Megazyme) y almidón de papa (α G) (Mallinckrodt Baker), respectivamente. Las reacciones se llevaron a cabo en 50 mM buffer citrato-fosfato pH 6, 0,5% (p/v) de sustrato a 45 °C por 30 min. El cóctel enzimático E-PxST presentó actividad β -glucanasa ($34,31 \pm 3,70 \text{ UI}_{\beta\text{Glu}}/\text{mL}$), además de la actividad xilanolítica previamente reportada. Sin embargo, no se detectó actividad α -amilasa, sobre el sustrato seleccionado.

Para determinar las condiciones óptimas de reacción y estabilidad térmica de la actividad β -glucanasa utilizando β GC como sustrato, en primer lugar, se pusieron a punto las condiciones de concentración de extracto enzimático, referida al valor de proteínas totales presentes en el sobrenadante (determinada por Bradford), y tiempo de reacción en las que se mantiene la linealidad de liberación de producto. Comparativamente se repitieron los ensayos de actividad xilanasa sobre XIN, como control.

La linealidad se mantuvo entre 0,5 y 8 $\mu\text{g/mL}$ y 0,5 y 4 $\mu\text{g/mL}$ de E-PxST para la actividad β -glucanasa y xilanasa, respectivamente, y de 10 a 60 min de incubación en ambos casos (Figura R26). Utilizando las siguientes condiciones: 4 $\mu\text{g/mL}$ y 30 min sobre βGC y XIN se realizaron los ensayos de perfil de actividad β -glucanasa y xilanasa, respectivamente, frente a un amplio rango de pH (de 3,0 a 10,0) y temperatura (30 a 70 $^{\circ}\text{C}$).

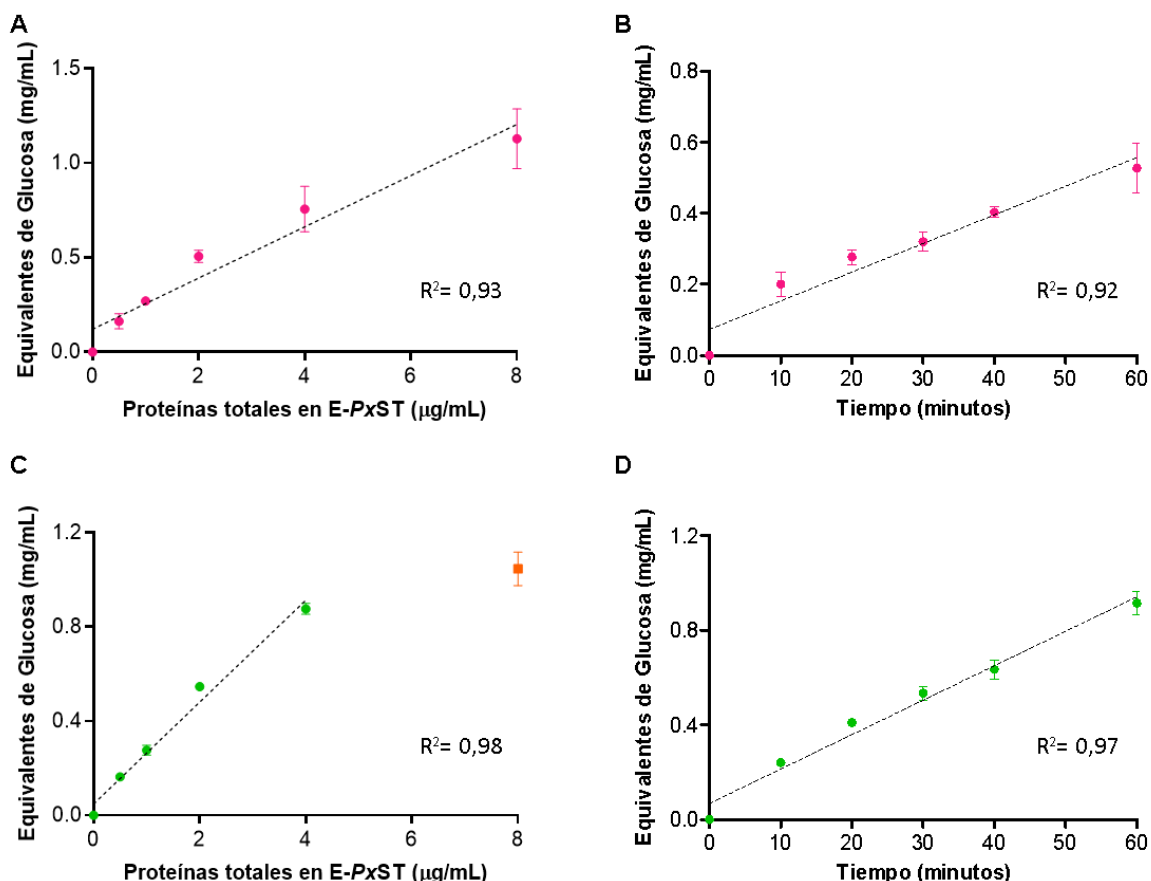


Figura R26: Determinación de rango de linealidad de concentración del extracto E-PxST y tiempo de reacción. Condiciones para actividad β -glucanasa (A y B). Condiciones para actividad xilanasa (C y D). Los resultados indican medias y desviaciones estándar de ensayos por triplicado. En naranja se indican los puntos de las mediciones que no se ajustan a la regresión lineal.

El perfil de actividad β -glucanasa mostró el máximo a pH 5,5, manteniendo más del 60% de la actividad óptima en un rango de pH de 5 a 6,5 y al menos el 40% a pH 4 y 7. Por otro lado, la actividad xilanolítica máxima se observó también a pH 5,5. Más del 60% de la actividad óptima se mantuvo en un rango de pH de 4 a 8, pero disminuyó drásticamente por debajo del 20% a pH 4 y 9 (Figura R27A). Para ambas actividades se estableció como condición óptima de reacción pH 5,5, el cual se utilizó para determinar la temperatura de reacción óptima para cada actividad enzimática. Las curvas mostraron un óptimo a 45 $^{\circ}\text{C}$ para la actividad β -glucanasa y a 60 $^{\circ}\text{C}$, la actividad xilanasa. Se mantuvo una actividad relativa superior al 60% en un rango de temperatura de 40 a 55 $^{\circ}\text{C}$ y de 40 a 65 $^{\circ}\text{C}$ para la actividad β -glucanasa y xilanasa, respectivamente. En ambos casos se mantuvo un 40% de la actividad a 30 $^{\circ}\text{C}$, y disminuyó a

60 °C y 75 °C, manteniendo el 25% y el 10% de la actividad β -glucanasa, respectivamente, y a 75 °C reteniendo el 20% de la actividad xilanasa (Figura R27B).

Para determinar las condiciones en las que el cóctel E-PxST podría usarse en bioporicesos, se realizó un ensayo de termo-estabilidad. El extracto perdió actividad β -glucanasa y xilanasa drásticamente a 60 °C, manteniendo solo el 35% luego de 60 min. Mantuvo el 60% de ambas actividades luego de 120 min a 50 °C y más del 80% a 45 °C por hasta 240 min. La actividad β -glucanasa fue menos termoestable que la xilanasa, a todas las temperaturas ensayadas, perdiendo completamente la actividad luego de 120 min a 60 °C y casi por completo a 50 °C durante 240 min. Alrededor del 40% y 20% de la actividad xilanasa se mantuvo luego de 240 min de pre-incubación a 50 °C y 60 °C, respectivamente (Figura R27C). La máxima termo-estabilidad se registró a 40 °C, condición en la que E-PxST retuvo más del 70% de actividad β -glucanasa y xilanasa luego de 20 hs de pre-incubación. Por lo tanto, esta última sería la condición óptima para ensayos de hidrólisis enzimática de larga duración.

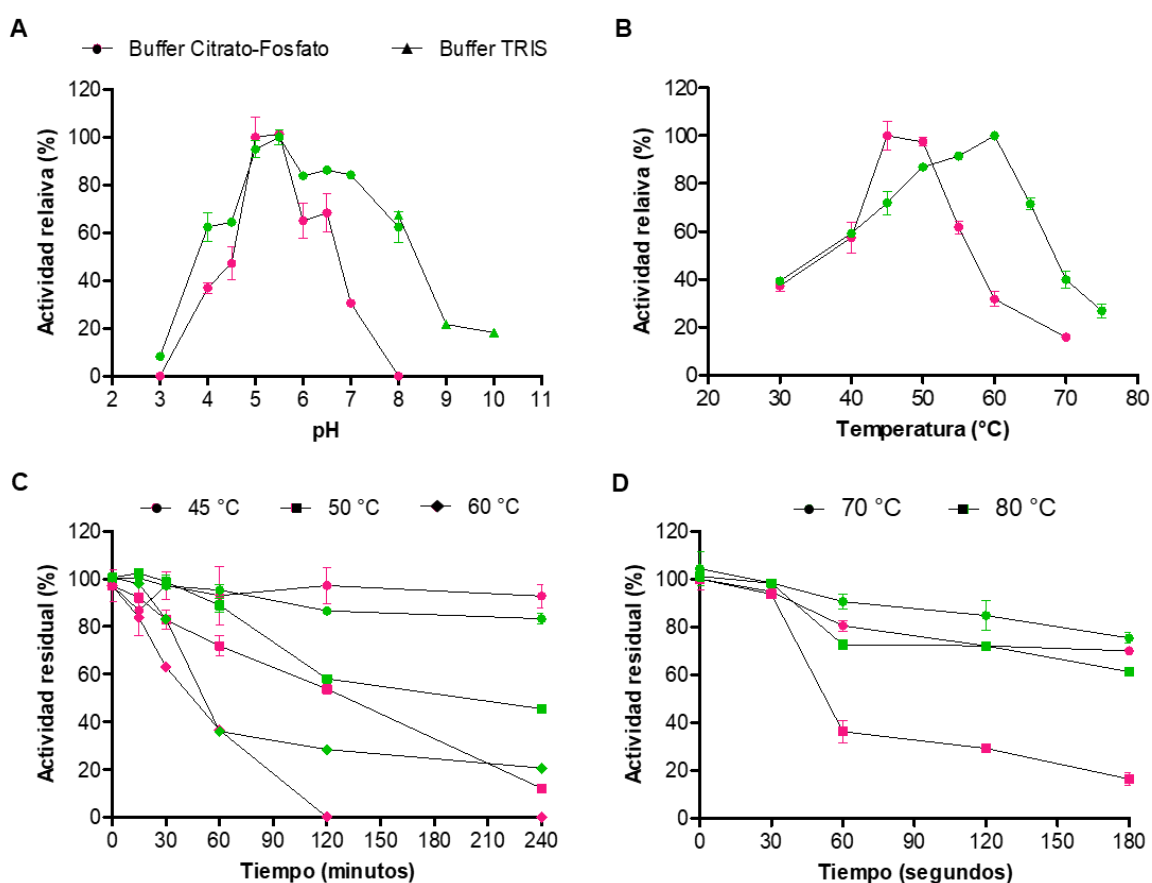


Figura R27: Perfil de actividad β -glucanasa (rosa) y xilanasa (verde) de E-PxST. A) Condición de pH óptimo. **B)** Condición de temperatura óptima. **C)** Estabilidad térmica. **D)** Termotolerancia frente a condiciones de peletización. El pH óptimo se determinó a 45 °C por 30 min para ambas actividades enzimáticas. La temperatura óptima se evaluó a pH óptimo, para ambos casos pH 5,5. Los resultados indican medias y desviaciones estándar de ensayos por triplicado.

El extracto E-PxST podría aplicarse entonces en formulaciones específicas para la hidrólisis tanto de xilanos como de β -glucanos (Tabla R18).

Tabla R18: Extracto enzimático de *P. xylanivorans* como fuente de enzimas para la formulación de cócteles enzimáticos. Parámetros óptimos, entre paréntesis se indica la temperatura seleccionada para reacciones *overnight* (> 16hs). E-PxST: extracto enzimático extracelular de *P. xylanivorans* obtenido por cultivo en salvado de trigo (ST). n.d.: no determinado.

Fuente de enzimas	Actividad	Actividad enzimática (UI/mL)	Parámetros óptimos	Actividad ensayada sobre
E-PxST	β -1,4-endo-xilanasa (EC 3.2.1.8)	78,61 $\pm$ 15,10	60 °C (40 °C) y pH 5,5	Xilano lineal, glucurono- y arabino-xilanos
	β -glucanasa (EC 3.2.1.4)	34,31 $\pm$ 3,70	45 °C (40 °C) y pH 5-5,5	β -glucano de cebada (enlaces β -1,4 y β -1,3)
	α -amilasa (EC 3.2.1.1)	No detectable	n.d.	Almidón de papa
	CMCasa (EC 3.2.1.4)	< 0,1	n.d.	CMC

En avicultura el alimento sufre un proceso de peletización que aglomera partículas de alimento más pequeñas mediante presión mecánica, humedad y calor. Un paso fundamental previo al procesamiento térmico es el acondicionamiento del alimento en polvo. La transformación del alimento en polvo a *pellets* densos y uniformes mejora su manejo, almacenamiento y digestibilidad en animales. Las condiciones de peletización más utilizados son temperaturas comprendidas entre 65-85 °C y un tiempo de retención medio de 30-120 segundos (Abdollahi y col., 2013). Se evaluó la capacidad del extracto E-PxST para retener actividad enzimática luego de ser sometido a condiciones que simulan las de peletización (Figura R27D). Para ello, se utilizó el extracto E-PxST en polvo obtenido mediante liofilización. Se ensayaron dos condiciones de temperatura 70 °C y 80 °C y varios tiempos de retención de 30 a 180 segundos. Luego, la actividad β -glucanasa y xilanasa remanente fue evaluada. El extracto E-PxST mantuvo más del 80% de ambas actividades enzimáticas a 70 °C por hasta 180 segundos de incubación. A 80 °C el extracto retuvo más del 60% de la actividad xilanolítica por hasta 180 segundos, mientras que a esta temperatura la actividad β -glucanasa se mantuvo por encima del 80% por 30 segundos, disminuyendo a 40% y 20% luego de 60 y 180 segundos de incubación, respectivamente (Figura R27D).

Finalmente, se evaluó si E-PxST presentaba actividad enzimática sobre los componentes del alimento a base de soja-maíz. Se realizaron reacciones de hidrólisis sobre 5% (p/v) de alimento molido en 50 mM de buffer citrato-fosfato pH 6 a 40 °C por 20 hs utilizando 2,5 UI_{xyn} y 1,3 UI _{β Glu}. En esos ensayos, el principal producto liberado fue glucosa, obteniéndose una conversión del 25,19 $\pm$ 6,38% (Figura R28).

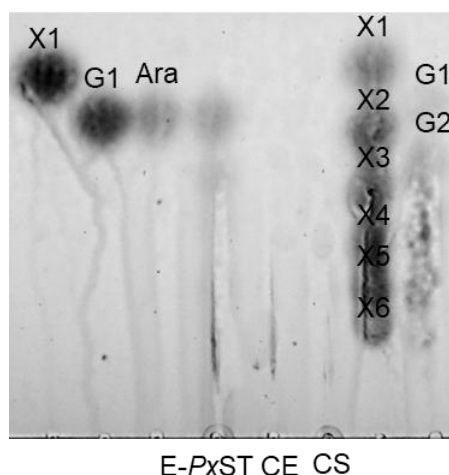


Figura R28: Hidrólisis de alimento animal por el cóctel E-PxST. Los productos de reacción solubles generados se visualizaron mediante TLC. Estándares de XOS: X1 (xilosa), X2 (xilobiosa), X3 (xilotriosa), X4 (xilotetraosa), X5 (xilopentosa), X6 (xilohexosa), G1 (glucosa), G2 (celobiosa) y Ara (arabinosa).

En conjunto, estos resultados sugieren que E-PxST mantiene actividad frente a condiciones semejantes a las de peletización y tiene la capacidad de hidrolizar los glucanos del alimento de base soja-maíz, siendo un candidato promisorio para ser aplicado como aditivo alimentario.

Se determinó entonces la concentración de E-PxST que permitiera una hidrólisis de los glucanos presentes en el alimento animal manteniendo la integridad de la fracción proteica, de modo de asegurar su calidad nutricional. Para ello se realizaron reacciones enzimáticas utilizando tres concentraciones crecientes del extracto E-PxST expresadas en proteínas totales: 0,15 mg/mL (E-PxST_{0,15}), 0,30 mg/mL (E-PxST_{0,30}) y 0,60 mg/mL (E-PxST_{0,60}). Luego, se analizaron distintos indicadores de solubilidad del alimento tanto en la fracción soluble como en la insoluble (*pellet*) de la reacción de hidrólisis. En la fracción soluble se analizaron las proteínas totales (método de Bradford), los azúcares reductores totales liberados (por DNS) y la glucosa total (Kit enzimático).

Se observó que los tres tratamientos solubilizaron el alimento animal, presentando diferencias significativas respecto del control sustrato, es decir en ausencia de E-PxST. E-PxST_{0,60} degradó mayor cantidad de proteínas totales propias del alimento, solubilizando $0,52 \pm 0,04$ mg/mL; mientras que E-PxST_{0,30} y E-PxST_{0,15} hidrolizaron aproximadamente tres veces menos dichas proteínas, solubilizando $0,20 \pm 0,01$ mg/mL y $0,16 \pm 0,01$ mg/mL, respectivamente. El control sustrato presentó una hidrólisis proteica basal de $0,09 \pm 0,02$ mg/mL, generada por el tratamiento de la muestra (Figura R29A).

Para el caso de los azúcares reductores totales y la glucosa total, los tres tratamientos presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto del control sustrato. En este caso, las tres concentraciones del extracto se comportaron de manera similar liberando aproximadamente 5 mg/mL

de azúcares reductores totales. Sin embargo, E-PxST_{0,60} y E-PxST_{0,30} liberaron mayor glucosa total, $3,90 \pm 0,37$ mg/mL en ambos casos, respecto de la condición E-PxST_{0,15} que liberó $2,75 \pm 0,10$ mg/mL. El control sustrato también presentó una hidrólisis de glucanos basal, liberando $1,38 \pm 0,04$ mg/mL de azúcares reductores y $0,55 \pm 0,03$ mg/mL de glucosa (Figura R29B). El porcentaje de conversión a glucosa fue calculado teniendo en cuenta los valores de glucosa total liberada en cada caso y la proporción de glucanos presentes en el alimento (45,24%), sin discriminar entre β - y α - glucanos. Los resultados obtenidos siguieron la misma tendencia observada para los valores de glucosa total liberada (Figura R29C).

Finalmente, se determinó el porcentaje de materia seca residual presente la fracción insoluble. Esto se llevó a cabo comparando el peso del *pellet* seco antes y después del tratamiento. Los tres tratamientos de E-PxST presentaron diferencias significativas respecto del control sustrato, solubilizando al menos el 50% del alimento animal, mientras que el control sustrato presentó una auto-solubilización del 30% dejando 70% de alimento residual (Figura R29D).

Los resultados obtenidos fueron consistentes en dos ensayos de hidrólisis independientes, empleando dos lotes independientes del cóctel E-PxST en cada caso. Esto respalda la reproducibilidad del comportamiento enzimático observado para cada condición de tratamiento y su potencial aplicación en procesos de la industria de alimento animal.

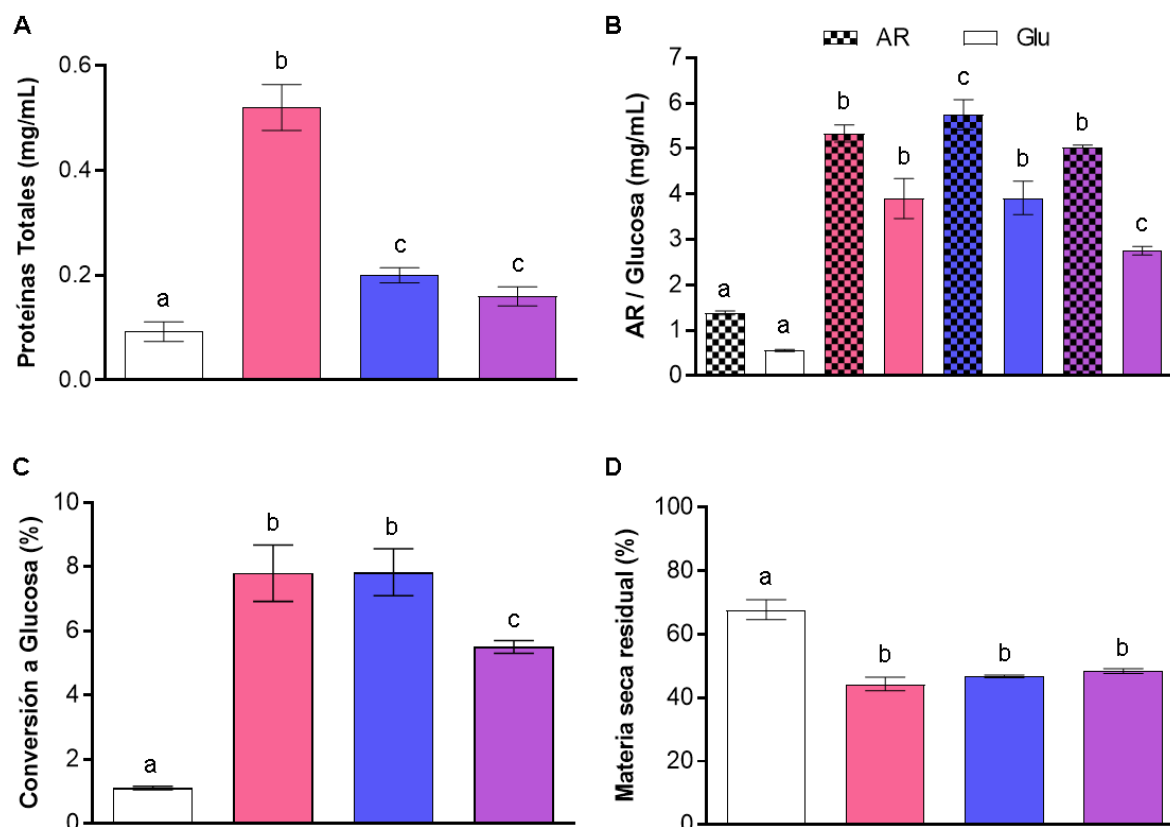


Figura R29: Hidrólisis de alimento a base de soja-maíz por el cóctel E-PxST. **A)** Proteínas totales del alimento solubilizadas. **B)** Azúcares reductores (AR, barras cuadrículadas) y Glucosa (Glu, barras sólidas) liberados por hidrólisis de los glucanos del alimento. **C)** Conversión de glucanos totales a glucosa, expresado en porcentaje. **D)** Materia seca residual, expresado en porcentaje. Control sustrato (blanco). E-PxST_{0,60} (rosa); E-PxST_{0,30} (azul); E-PxST_{0,15} (lila). Las reacciones se llevaron a cabo sobre 10% (p/v) alimento molido en 50 mM buffer citrato-fosfato pH 5,5 a 37 °C por 24 hs. Los resultados indican medias y desviaciones estándar de ensayos por cuatuplicado. Las diferencias estadísticas entre los tratamientos se indican con letras diferentes (a, b, c o d), determinadas mediante la prueba a posteriori de Fisher ($p < 0,05$).

Estos resultados sugieren que la incorporación del cóctel E-PxST mejoraría al menos en un 20% la solubilización del alimento, lo que podría favorecer la ingesta de este. La utilización del extracto en una concentración de 0,30 mg/mL de proteínas totales (E-PxST_{0,30}) sería la adecuada a aplicar ya que mantiene mejor la integridad de las proteínas propias del alimento sin disminuir su eficiencia hidrolítica sobre los polisacáridos.

Los mismos ensayos se repitieron empleando E-PxST luego de ser sometido a un proceso que simula las condiciones de peletización, 70°C-180 segundos (E-PxSTp). El extracto E-PxSTp retuvo más del 80% ($1,82 \pm 0,19$ mg/mL) de las proteínas totales luego de la exposición a altas temperaturas. E-PxST_{0,30} presentó $2,20 \pm 0,10$ mg/mL de proteínas totales, este valor se utilizó para determinar la cantidad de volumen a utilizar en las reacciones para una concentración final de 0,30 mg/mL y así poder comparar la actividad del extracto sobre alimento para aves antes y después de ser peletizado.

Ambas condiciones de tratamiento solubilizaron aproximadamente 0,4 mg/mL de las proteínas presentes en el alimento. Aunque estos valores fueron mayores que en ensayos previos, en el control sustrato también se cuantificó una mayor concentración de proteínas solubles ($0,22 \pm 0,06$ mg/mL) (Figura R30A). Aun así, el diferencial tratamiento-control se mantuvo constante entre ensayos: ambos extractos solubilizaron aproximadamente el doble de proteínas que el control.

En cuanto a la liberación de azúcares reductores totales y la glucosa total, el control mostró valores basales de liberación ($1,50 \pm 0,02$ mg/mL de azúcares reductores y $0,29 \pm 0,02$ mg/mL de glucosa), probablemente asociados a componentes solubles preexistentes del propio alimento, pero ambos tratamientos liberaron concentraciones significativamente superiores a estos valores (Figura R30B). E-PxSTp presentó una reducción en su capacidad de degradar β -glucanos con respecto al extracto sin pre-tratamiento (E-PxST_{0,30}), liberando un 15% menos de azúcares reductores y un 21% menos de glucosa. Esta disminución también se reflejó en el porcentaje de conversión a glucosa, que cayó un 21% en el tratamiento E-PxSTp (Figura R30C).

Por último, al evaluar la materia seca residual (fracción insoluble), no se observó una diferencia significativa entre ambos tratamientos: aunque E-PxSTp mostró un leve descenso en la hidrólisis de polisacáridos, su eficiencia global de solubilización del alimento fue comparable a la de E-PxST_{0,30}. En ambos casos se solubilizó 50% del alimento, mientras que en el control permaneció ~70% de materia no solubilizada (Figura R30D).

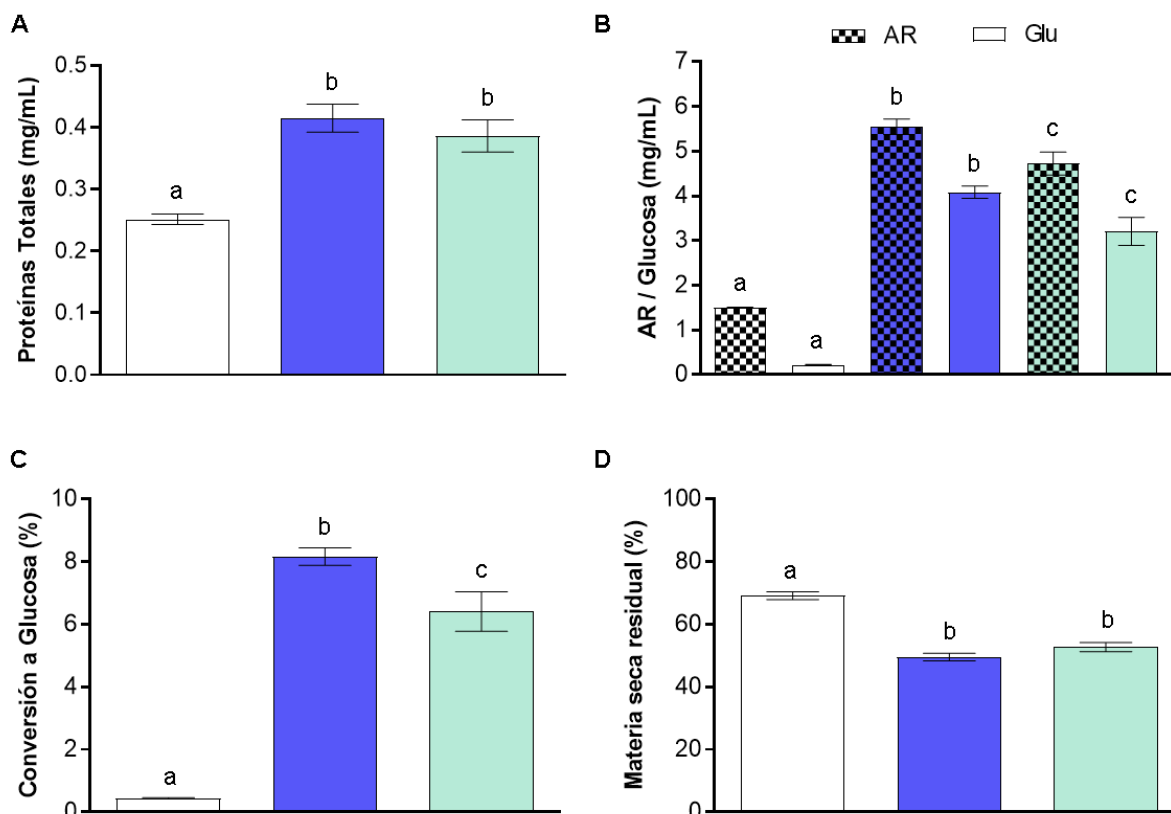


Figura R30: Hidrólisis de alimento a base de soja-maíz por el cóctel peletizado E-PxSTp. **A)** Proteínas totales del alimento solubilizadas. **B)** Azúcares reductores (AR, barras cuadrículadas) y Glucosa (Glu, barras sólidas) liberados por hidrólisis de los glucanos del alimento. **C)** Conversión de glucanos totales a glucosa, expresado en porcentaje. **D)** Materia seca residual, expresado en porcentaje. Control sustrato (blanco). E-PxST_{0,30} (azul), como control positivo; E-PxSTp en igual volumen que E-PxST_{0,30} (celeste). Las reacciones se llevaron a cabo sobre 10% (p/v) alimento molido en 50 mM buffer citrato-fosfato pH 5,5 a 37 °C por 24 hs. Los resultados indican medias y desviaciones estándar de ensayos por cuatuplicado. Las diferencias estadísticas entre los tratamientos se indican con letras diferentes (a, b, c o d), determinadas mediante la prueba a posteriori de Fisher ($p < 0,05$).

Este apartado de la tesis se encuentra enmarcado en un proyecto PICT Start up (2020-0022) que busca el desarrollo y producción de aditivos multienzimáticos en formulados para la degradación de polisacáridos no amiláceos presentes en los ingredientes de los piensos utilizados en la alimentación de aves de corral y peces. La etapa desarrollada hasta el momento en el laboratorio incluye la simulación del proceso de peletización sobre el cóctel E-PxST y posterior hidrólisis del alimento evaluando la actividad enzimática remanente. En general, los resultados sugieren una mejora en la solubilización del alimento animal del 20% bajo las condiciones de concentración de E-PxST (22 mg del extracto en polvo) y peletización (70 °C por 180 seg) ensayadas. Quedaría a evaluar en un futuro el ensayo de peletización propiamente dicho, incluyendo al alimento animal la dosis de E-PxST, y la evaluación de la actividad residual en el formulado, para luego determinar si la incorporación del extracto mejora la conversión energética en aves de corral. Esto se realizará en colaboración con la Empresa avícola CyB SA, Entre Ríos.

IV. B. Oligosacáridos con propiedades antioxidantes

Los xilo-oligosacáridos (XOS) poseen numerosas propiedades biológicas de interés en la industria alimenticia y cosmética. Entre ellas, su potencial antioxidante emerge como alternativa a los compuestos sintéticos tradicionales utilizados (Bouiche y col., 2020). La hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica utilizando xilanasas genera XOS de menor GP, entre X2 y X6, comparado con otras estrategias como la hidrólisis química y la auto-hidrólisis (GP>6), deseados en la industria alimenticia y farmacéutica (Gauterio y col., 2022). Enzimas endo-xilanasas de las familias GH10, GH11 (EC 3.2.1.8) y GH30 (EC 3.2.1.136) hidrolizan la cadena principal del xilano generando una mezcla de XOS de diferente GP y número de sustituciones, dependiendo de la fuente de xilano (glucurono- o arabino-xilano) y de la actividad de la xilanasas utilizada. Los arabino-xilo-oligosacáridos (AXOS) derivados del salvado de trigo han sido estudiados como prebióticos y antioxidantes. En particular, la actividad antioxidante estaría asociada al ácido ferúlico presente en los AXOS (Bilal y col., 2024).

En esta sección, se evaluó el efecto antioxidante de distintos perfiles de XOS ácidos, decorados con ácido metilglucurónico -MeGlcA- (UXOS). Para obtener estos perfiles de UXOS se utilizaron las xilanasas *PxXyn10A*, *PxXyn11B* y *PxXyn30_8* sobre bagazo de ágave pre-tratado por extrusión alcalina (BABe). Las características de las enzimas recombinantes se encuentran detalladas en la Tabla R19.

Tabla R19: Fuente de enzimas para la valorización de xilanos. Tipo de producción, entre paréntesis se indica la cepa de *E. coli* utilizada para la expresión recombinante de la proteína. Parámetros óptimos, entre paréntesis se indica la temperatura seleccionada para reacciones de 16hs.

Enzima	Tipo de producción	Actividad enzimática	Parámetros óptimos	Actividad confirmada sobre	Referencia
<i>PxXyn10A</i>	Recombinante (Rosetta)	β -1,4-endo-xilanasas (EC 3.2.1.8)	60 °C (45 °C) y pH 6	Glucurono- y arabino-xilanos	Ghio y col., 2019
<i>PxXyn11B</i>	Recombinante (XL1-Blue)		45 °C (40 °C) y pH 9	Glucurono- y arabino-xilanos	Ghio y col., 2019
<i>PxXyn30_8</i>	Recombinante (Rosetta)	Glucurono-xilanasas (EC 3.2.1.136)	50-60 °C (40 °C) y pH 5-6	Glucurono-xilanos	Esta tesis

El bagazo de Agave azul (BAB) es una importante fuente de glucurono-xilanos (GX) de bajo costo, dado que constituye el principal residuo sólido de la industria del tequila en México, generando 400 kg de bagazo por tonelada de agave procesado (Montiel y col., 2024).

Al aplicar las enzimas sobre BABe se evidenció el mismo comportamiento que sobre XIN. Las tres endo-xilanasas producen combinaciones de XOS neutros y UXOS de diferente GP a partir de BABe: *PxXyn30_8* genera UXOS de mayor longitud (GP > 4), seguida de *PxXyn11A* que genera (U)XOS de GP 2 a 6 y *PxXyn10A* que libera X1 y (U)XOS hasta GP 5. La acción combinada de *PxXyn30_8* con *PxXyn10A* o

PxXyn11B, también, dio lugar a un cambio en el perfil de (U)XOS con una reducción en el GP y un aumento en la liberación de X1 (Figura R31).

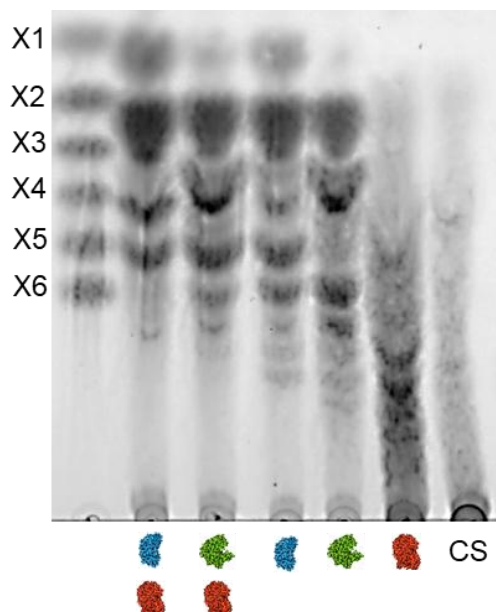


Figura R31: Hidrólisis de bagazo de ágave extrusado por endo-xilanasas de *P. xylanivorans*. Los productos de reacción solubles generados por *PxXyn30_8* (rojo), *PxXyn10A* (azul claro) y *PxXyn11B* (verde) sobre BABe se visualizaron mediante TLC. Las reacciones se llevaron a cabo a 40 °C por 20 hs utilizando las enzimas individualmente o en combinación, según se indica. CS: control sustrato (BABe sin enzimas). Estándares de XOS: X1 (xilosa), X2 (xilobiosa), X3 (xilotriosa), X4 (xilotetraosa), X5 (xilopentosa) y X6 (xilohexosa).

Previo al ensayo de bioactividad de los distintos perfiles de (U)XOS generados, los hidrolizados obtenidos fueron liofilizados y concentrados volumétricamente 15 veces (15X). Posteriormente, los los hidrolizados liofilizados y concentrados fueron tratados con carbón activado (Zhu y col., 2021) para remover parte de la xilosa y la lignina soluble residual.

Los azúcares reductores totales fueron determinados por el método de DNS y el perfil de (U)XOS por TLC, para evaluar que su integridad no haya sido modificada durante el proceso de liofilización y tratamiento con carbón activado (Tabla R20 y Figura R32). El tratamiento permitió una concentración global de azúcares de aproximadamente 12 veces. En algunos casos, la purificación de los XOS con carbón activado incremento levemente la concentración final de azúcares reductores (Tabla R20).

Tabla R20: Producción de xilo-oligosacáridos con potencial antioxidante. Hidrolizado: sobrenadante de la reacción enzimática. Liofilizado 15X: hidrolizado liofilizado y concentrado volumétricamente 15 veces. Purificado: liofilizado 15X purificado con carbón activado (CA). Los resultados indican medias y desviaciones estándar de ensayos por triplicado.

Tratamiento enzimático	Azúcares reductores totales (mg/mL)		
	Hidrolizado	Liofilizado 15X	Purificado con CA
<i>PxXyn10A</i>	2,03 ± 0,15	25,28 ± 1,34	26,94 ± 3,09
<i>PxXyn11B</i>	1,94 ± 0,08	24,87 ± 0,57	26,35 ± 3,69
<i>PxXyn30_8</i>	0,32 ± 0,03	3,79 ± 0,00	5,29 ± 0,06
<i>PxXyn10A+PxXyn30_8</i>	2,32 ± 0,11	30,66 ± 1,15	27,60 ± 3,27
<i>PxXyn11B+PxXyn30_8</i>	1,98 ± 0,12	26,61 ± 0,76	26,93 ± 3,59

La integridad de los XOS presentes en cada hidrolizado se mantuvo luego de ambos procedimientos: liofilización y concentración volumétrica (Figura R32A) y purificación con carbón activado (Figura 33B). Como era esperado, en esta última instancia se observó una disminución de xilosa (Figura 32B).

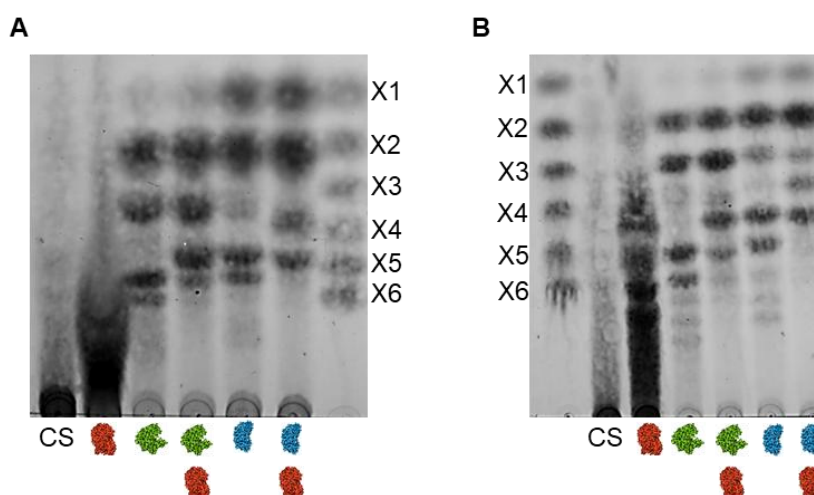


Figura R32: Perfil de xilo-oligosacáridos con potencial antioxidante obtenidos por hidrólisis enzimática del bagazo de ágave extrusado (BAbE). A) (U)XOS presentes en hidrolizado liofilizado y concentrado volumétricamente 15 veces (15X). B) (U)XOS presentes en hidrolizados liofilizado 15X purificado con carbón activado. Los productos presentes en los hidrolizados se visualizaron por TLC. *PxXyn30_8* (rojo), *PxXyn10A* (azul claro) y *PxXyn11B* (verde). CS: BAbE sin enzimas. Estándares de XOS: X1 (xilosa), X2 (xilobiosa), X3 (xilotriosa), X4 (xilotetraosa), X5 (xilopentosa) y X6 (xilohexosa).

La capacidad antioxidante de los (U)XOS purificados (Figura R32B) se determinó mediante el ensayo del radical ABTS⁺. Los valores obtenidos se compararon con la actividad antioxidante del ácido gálico (GA) obteniendo el valor GAEq (actividad antioxidante equivalente de GA) (Hwang y Lee, 2023; Molski, 2023). Sin embargo, como ocurre con otros estándares utilizados en este tipo de ensayo, como el Trolox, este valor se determina en función a la concentración molar del compuesto. Dado que los (U)XOS evaluados incluyen oligómeros de diferente longitud y peso molecular, no es posible medir la concentración molar. Para estandarizar, se estudió la actividad antioxidante de los (U)XOS en un rango

de concentración creciente de azúcares reductores y se refirió este valor a la concentración de GA necesaria para obtener la misma actividad antioxidante, como se describe en otros trabajos (Valls y col., 2018; Bouiche y col., 2020). En el caso de los productos de hidrólisis de *PxXyn30_8*, las concentraciones de azúcares reductores se corresponden a un menor factor de dilución, por tratarse de productos más largos. Como control se utilizó el BABe sometido a los mismos tratamientos, aunque sin enzimas, y el volumen empleado se estableció con las mismas diluciones que para los (U)XOS de *PxXyn30_8*.

En general, se observó mayor actividad antioxidante al aumentar la concentración de (U)XOS utilizada (Figura R33A). El hidrolizado de *PxXyn30_8* fue más eficaz en la reducción del radical ABTS⁺, lo que indica una potente capacidad antioxidante en comparación con los hidrolizados producidos por *PxXyn11B* y *PxXyn10A*. Los compuestos generados por *PxXyn11B* o *PxXyn10A* combinados con *PxXyn30_8* no presentaron diferencias en su actividad bioactiva con respecto a los valores obtenidos por *PxXyn11B* y *PxXyn10A* individualmente. Además, los hidrolizados correspondientes a la auto-hidrólisis del BABe (sin enzimas) presentaron valores cercanos a los obtenidos con los hidrolizados de *PxXyn30_8* (Figura R33A).

A una concentración de 100 µg/mL de azúcares reductores, se observó un 43% de actividad antioxidante en los UXOS de *PxXyn30_8* y menos del 10% al utilizar igual concentración de (U)XOS de *PxXyn11B* o *PxXyn10A*. Al aumentar la concentración de los UXOS producidos por *PxXyn30_8* a 250 µg/mL la actividad antioxidante superó el 80%, mientras que los demás hidrolizados alcanzaron casi el 20% a igual concentración (Figura R33A).

Sin embargo, el contenido fenólico total en los hidrolizados purificados, estimados por la técnica de Folin-Ciocalteu, también presentó una correlación positiva con la concentración de (U)XOS empleada (Figura R33B). Tanto los hidrolizados de *PxXyn30_8* como los del control BABe mostraron la mayor concentración de fenoles. Si bien el contenido fenólico en ambas muestras fue similar, la actividad antioxidante fue más elevada en los hidrolizados de *PxXyn30_8*, de manera estadísticamente significativa (Figura R33A), lo cual se debería a los UXOS.

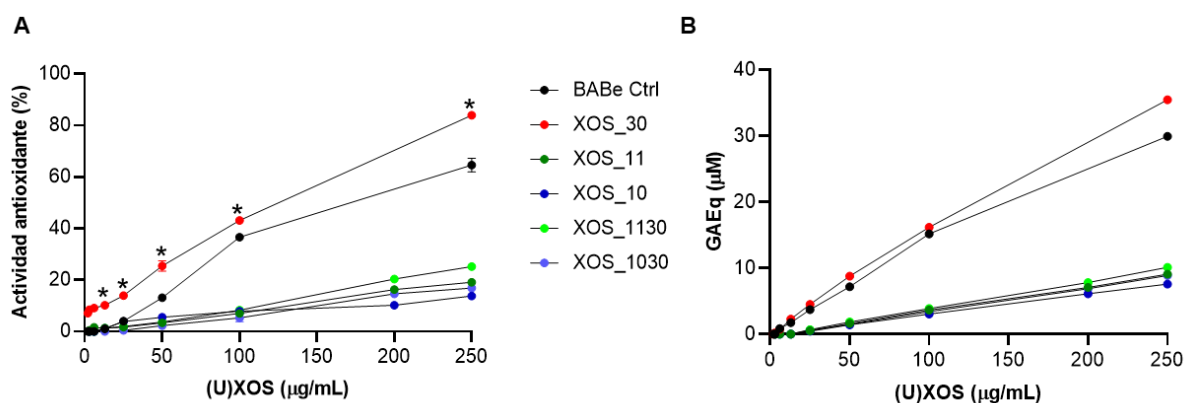


Figura R33: Actividad antioxidante de (U)XOS obtenidos por hidrólisis enzimática de bagazo de agave extruido (BABe). La actividad antioxidante se determinó mediante el ensayo de radicales ABTS⁺ (A) y el contenido fenólico total se expresó en equivalentes de ácido gálico (GAEq) y se determinó mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu (B). XOS_30: hidrolizados de *PxXyn30_8*. XOS_11 y XOS_1130: hidrolizados de *PxXyn11B* individual y con *PxXyn30_8*, respectivamente. XOS_10 y XOS_1030: hidrolizados de *PxXyn10A* individual y con *PxXyn30_8*, respectivamente. Las barras de error indican la desviación estándar de los triplicados técnicos. Las diferencias estadísticas entre los tratamientos XOS_30 y BAB Ctrl se indican con asteriscos, determinadas mediante la prueba a posteriori de Fisher ($p < 0,05$).

En conjunto, los resultados obtenidos evidencian que los (U)XOS generados por hidrólisis enzimática de BABe poseen un potencial antioxidante significativo. En particular, los UXOS producidos por la enzima *PxXyn30_8*, compuestos exclusivamente por oligómeros ácidos, exhibieron una mayor actividad antioxidante en comparación con los XOS generados por las xilanasas *PxXyn11B* y *PxXyn10A*, que consisten en mezclas de oligómeros neutros y ácidos de menor longitud. Estos hallazgos sugieren que tanto la presencia de MeGlcA en la estructura de los UXOS como su grado de polimerización constituyen factores clave que contribuyen a su capacidad antioxidante, aunque no se puede descartar la presencia de derivados de lignina en las muestras que podrían aportar a esta bioactividad.

VI. C. Oligosacáridos como estimuladores del sistema inmune vegetal

Los oligosacáridos no solo presentan un gran potencial para la nutrición y cuidado de la salud humana y animal, sino que también podrían utilizarse como promotores del sistema inmune vegetal mejorando los rendimientos de cultivos agrícolas disminuyendo el consumo de productos químicos (He y col., 2021). La inducción de esta respuesta inmune podría determinarse por la naturaleza, la concentración y el tipo de oligosacárido. En particular, XOS son reconocidos con especificidad variable por el sistema inmune vegetal induciendo respuestas de defensa y modificaciones en la composición de la pared celular (Sun y col., 2025). Estos XOS pueden ser generados por la hidrólisis enzimática de la biomasa vegetal. En esta sección de la tesis, se valuó el efecto promotor del sistema inmune vegetal, sobre plantas de tabaco, de XOS de diferente naturaleza obtenidos enzimáticamente utilizando el extracto enzimático E-*PxST*.

Se llevó a cabo la hidrólisis enzimática de residuo de caña de azúcar y bagazo de ágave, ambos pre-tratados por extrusión alcalina (RACe y BABe, respetivamente) con E-PxST. Dada la naturaleza de las biomásas empleadas se obtuvo un perfil de AXOS y UXOS a partir de la hidrólisis de RACe y BABe, respetivamente. Las reacciones de 100 mL se realizaron en 50 mM buffer citrato-fosfato pH 6, utilizando 5% (p/v) RACe o BABe y 100 UI_{xyn}/g_{biomasa} de E-PxST y se incubaron a 40 °C por 20 hs. Como controles se incluyeron: control enzima (E-PxST en ausencia de biomasa) y control sustrato (RACe y BABe en ausencia de E-PxST). A partir de los hidrolizados obtenidos se determinó la concentración de azúcares reductores totales mediante el método de DNS y el perfil de XOS obtenidos en cada caso por TLC (Tabla R21, Figura R34).

La mayor concentración de XOS se obtuvo por hidrólisis del BABe, siendo X2 el producto mayoritario visible en el TLC (Tabla R21 y Figura R34). La hidrólisis del RACe no solo resultó en una menor eficiencia de conversión a XOS, sino que el perfil de productos fue ligeramente diferente respecto al obtenido a partir del BABe. En ambos casos se observa la producción de xilosa X1, X2 y algunos XOS entre GP 4 y 5, sin embargo, sólo en el hidrolizado de RACe se visualiza la producción X3 (Figura R34). Estos resultados podrían deberse tanto a la cantidad como al tipo de sustituciones que presenta cada biomasa y la capacidad del extracto enzimático E-PxST para aceptar estas decoraciones, el cual se encuentra enriquecido por la endo-xilanasa PxXyn10A.

Tabla R21: Producción de xilo-oligosacáridos con potencial elicitor del sistema inmune vegetal. Concentración de xilo-oligosacáridos (XOS) determinados como equivalentes de xilosa por el método DNS. n.d.: no determinado.

Muestra	Concentración de XOS (mg/mL)
RACe + E-PxST	1,41 ± 0,10
RACe Control	0,52 ± 0,02
BABe + E-PxST	3,08 ± 0,14
BABe Control	0,53 ± 0,04
E-PxST inactivado	n.d.

Referencias: RACe: residuo de caña de azúcar pre-tratado por extrusión alcalina. BABe: bagazo de ágave pre-tratado por extrusión alcalina. E-PxST: extracto extracelular de *P. xynalivorans* en salvado de trigo (ST).

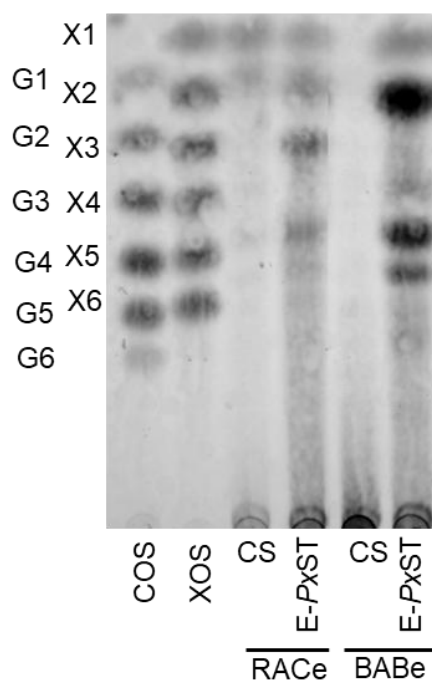


Figura R34: Perfil de xilo-oligosacáridos con potencial elicitor del sistema inmune vegetal. Los productos de reacción solubles generados por el extracto E-PxST tras la incubación con residuo de caña de azúcar (RACe) o bagazo de agave azul extruido (BABe) se visualizaron mediante TLC. Estándares de XOS: X1 (xilosa), X2 (xilobiosa), X3 (xilotriosa), X4 (xilotetraosa), X5 (xilopentosa) y X6 (xilohexosa). Estándares de COS: G1 (glucosa), G2 (celobiosa), G3 (celotriosa), G4 (celotetraosa), G5 (celopentosa) y G6 (celohexosa).

Si bien, el cóctel enzimático E-PxST es principalmente xilanolítico, como se reportó anteriormente también presenta actividad β -glucanasa. En este sentido, para determinar si los hidrolizados obtenidos presentaban exclusivamente XOS, se evaluó la presencia de glucosa en los mismos mediante Kit enzimático comercial. En ninguno de los casos se detectó la presencia de dicho monosacárido.

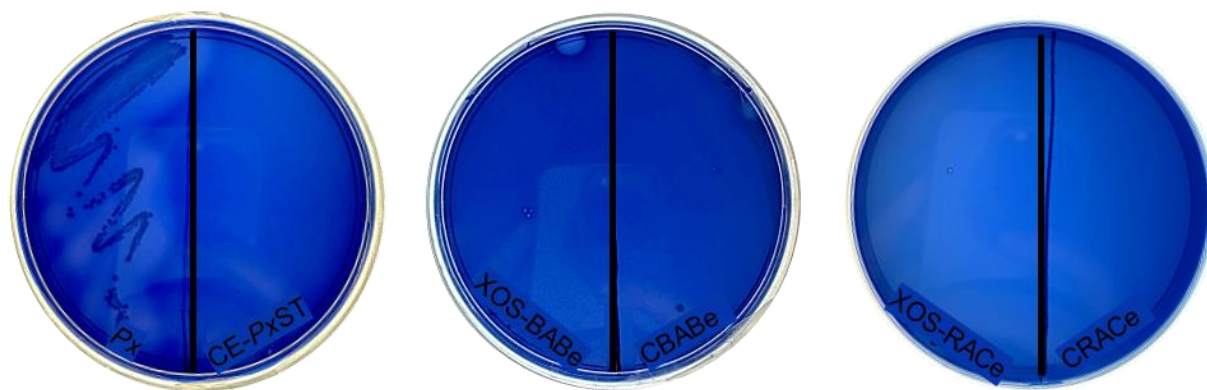
Además, se evaluó tanto la actividad xilanasa residual como la presencia de *P. xylanivorans* en los hidrolizados con el fin de dilucidar si el potencial elicitor se debe exclusivamente a los XOS obtenidos o si es acompañado de una actividad enzimática residual o de bacteria que puede generar daños adicionales sobre las hojas de las plantas a tratar promoviendo la activación del sistema inmune. Para ello se llevaron a cabo reacciones de 50 μ L en 50 mM de buffer citrato-fosfato pH 6 con 0,5% (p/v) de XIN y 5 μ L de los hidrolizados como fuente enzimática. Las reacciones se incubaron a 60 °C por 30 min (condiciones óptimas determinadas para la actividad xilanasa del extracto E-PxST). Tanto los hidrolizados obtenidos por la acción enzimática de E-PxST sobre las biomásas como el control enzima (E-PxST en buffer sin biomásas) presentaron una actividad residual de aproximadamente $3,99 \pm 0,89$ UI_{xyn}/mL, representando el 3,52% de la actividad original del extracto (Tabla R22).

Tabla R22: Actividad xilanólica residual de los hidrolizados obtenidos por la acción del extracto E-PxST sobre las biomásas RACe y BABe.

Fuente enzimática	Actividad xilanasa (UI_{xyn}/mL)	Actividad xilanasa relativa (%)
E-PxST	$95,00 \pm 2,98$	100
RACe + E-PxST	$3,54 \pm 0,08$	3,36
BABe + E-PxST	$4,50 \pm 0,31$	4,28
E-PxST inactivado	$3,06 \pm 0,66$	2,91

Asimismo, los hidrolizados se estiraron en placas con medio mínimo salino suplementado con 1% (p/v) de carboximetilcelulosa y azul de tripán (MM-1%CMC-TB) para verificar que no queden bacterias con actividad hidrolítica, particularmente *P. xylanivorans*. No se detectó crecimiento bacteriano en ninguno de los casos (Figura R35).

Figura R35: Crecimiento bacteriano residual de los hidrolizados obtenidos por la acción del extracto E-PxST sobre las biomásas RACe y BABe. Como control positivo se estiró el aislamiento *P. xylanivorans* (Px). Hidrolizados correspondientes a: extracto E-PxST inactivado por calor, XOS producidos a partir de BABe (XOS-BABe), control sustrato BABe (CBABe), XOS producidos a partir de RACe (XOS-RACe) y control sustrato RACe (CRACe).



Finalmente, se ensayó el potencial bioactivo como estimuladores del sistema inmune vegetal de los XOS obtenidos (Figura R34). Este ensayo se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Sebastián Asurmendi, que desarrolló un modelo experimental con el cual evaluar el impacto de diversas moléculas en la producción de inmunidad de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) utilizando la infección viral *Tabacco Mosaic virus* (TMV). Para ello, se prepararon soluciones de tratamiento de 50 mL al 10% (v/v), incluyendo los XOS generados enzimáticamente, los auto-hidrolizados de BABe y RACe, y el extracto E-PxST inactivado por calor. La concentración final de los XOS en las soluciones tratamiento a utilizar fueron de 0,141 mg/mL y 0,308 mg/mL para los hidrolizados de RACe y BABe, respectivamente.

Las plantas de tabaco fueron tratadas (10 plantas por tratamiento) aplicando los hidrolizados por aspersión foliar en dos instancias, la primera 7 días previos a la infección con TMV y la segunda (dosis de refuerzo) dos días antes del desafío. Además, como control negativo se utilizó el *buffer* empleado para preparar las soluciones tratamiento y como control positivo el bioinductor comercial Taisei®. Sólo

se infectó con TMV una hoja por planta, seleccionando para ello la más reciente desarrollada por la planta. Transcurridos tres días post-infección se realizó el recuento de lesiones necróticas presentes en cada una de las hojas desafiadas.

Si bien no se observaron diferencias estadísticamente significativas, todos los tratamientos empleados, incluyendo el extracto E-PxST inactivado por calor, disminuyeron el número de lesiones necróticas en las hojas de las plantas de tabaco respecto al control negativo (plantas tratadas sólo con *buffer*) (Figura R36). Estos resultados sugerirían algún tipo de efecto potenciador de la respuesta inmunológica en plantas de tabaco frente a TMV por los tratamientos realizados. Un segundo ensayo complementario fue llevado a cabo obteniéndose resultados similares.

Curiosamente, las plantas tratadas con E-PxST inactivado y con XOS derivados de BABe mostraron una mejor respuesta protectora, dado que presentaron el menor número de lesiones. Estos efectos positivos sobre la inmunidad superaron a los valores observados para el control positivo del ensayo (Figura R36). El tratamiento con BABe (auto-hidrolizado de la biomasa) mejoró ligeramente la respuesta de las plantas frente a la infección viral, sin embargo, los valores no alcanzaron la efectividad del tratamiento con XOS-BABe. Por su parte, los XOS obtenidos a partir de la hidrólisis de RACe (XOS-RACe) mostraron una respuesta similar a la observada con BABe y el bioinductor comercial Taisei®. El empleo del auto-hidrolizado de RACe (RACe) como tratamiento resultó ligeramente más eficiente, disminuyendo levemente el número de lesiones necróticas, comparado con el tratamiento con XOS-RACe (Figura R36). Esto podría deberse a la presencia de productos cortos obtenidos por la propia auto-hidrólisis del RACe. En la Figura R34 se observa la presencia de X1 y un segundo producto que en el TLC parecería coincidir con glucosa (G1), sin embargo, como se mencionó previamente los hidrolizados carecen de G1 en su composición. Más ensayos son requeridos para dilucidar la identidad de dicho producto.

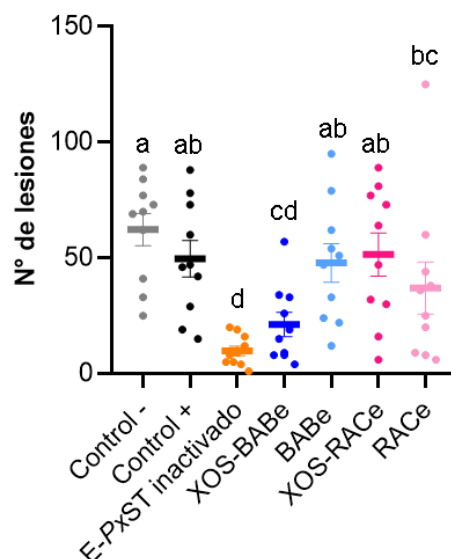


Figura R36: Inducción de la respuesta inmune vegetal. Recuento del número de lesiones por hoja infectada viralmente (eje Y). Los puntos indican el número de lesiones en cada hoja de cada tratamiento y se indica la media y el error en cada caso (n=10). En el eje X se indican los tratamientos: control - (*buffer* de dilución), control + (bioinductor comercial Taisei®), extracto E-PxST inactivado por calor, XOS-BABe (XOS producidos a partir de BABe), BABe (auto-hidrolizado BABe), XOS-RACe (XOS producidos a partir de RACe) y RACe (auto-hidrolizado RACe). Las diferencias estadísticas entre los tratamientos se indican con letras diferentes (a, b, c o d), determinadas mediante la prueba a posteriori de Fisher ($p < 0,05$).

El efecto bioestimulante del extracto E-PxST inactivado podría estar relacionado con la presencia de proteínas de membrana bacteriana que podrían ser reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) localizados en la superficie de las células vegetales como patrones moleculares asociados a microbios (MAMPs) (Pršić y Ongena, 2020). La purificación de los hidrolizados empleados como tratamiento con carbón activado podría resultar útil para eliminar potenciales proteínas bacterianas o impureza permitiendo recuperar los XOS para dilucidar correctamente su efecto biológico.

En conjunto, los resultados obtenidos evidenciaron que la aplicación de distintos hidrolizados en plantas de tabaco, previo a la infección viral con TMV, indujo en la mayoría de los casos una reducción en el número de lesiones necróticas respecto al control negativo, sugiriendo un efecto promotor de la respuesta inmunológica. En particular, tanto el tratamiento con el extracto E-PxST inactivado como el tratamiento con los XOS-BABe resultaron ser los más efectivos, mostrando una actividad incluso más elevada que el control positivo, mientras que los tratamientos con hidrolizados derivados de RACe y el auto-hidrolizado de BABe presentaron respuesta más moderadas. Si bien estos resultados son promisorios y respaldan el potencial de los XOS como inductores de la resistencia en plantas, también abre las puertas a continuar estudiando la aplicación del extracto enzimático inactivado e inocuo como alternativa viable. Una caracterización exhaustiva para identificar los compuestos constituyentes de los tratamientos más efectivos mediante técnicas como HPLC, GC-MS, LC-MS/MS y/o NMR sería

requerida en pasos futuros con el fin de dilucidar específicamente qué moléculas serían las responsables de la propiedad bioestimulante.

Discusión y Conclusiones

Discusión

La biomasa lignocelulósica (BLC) constituye una fuente de energía renovable y compuestos derivados de alto valor agregado. Sin embargo, su aprovechamiento de manera eficiente continúa siendo un desafío debido a la complejidad estructural de los polisacáridos que la constituyen, a su naturaleza recalcitrante y a la necesidad de obtener una plataforma de productos a partir de la misma, incluidos los monosacáridos fermentables más abundantes, glucosa y xilosa (Himmel, 2008; Lisy y col., 2020; Ilić y col., 2023). En este contexto, la hidrólisis mediante cócteles enzimáticos se ha consolidado como una de las estrategias más promisorias para lograr estos objetivos. No obstante, el mercado de los formulados enzimáticos comerciales continúa siendo limitado y altamente concentrado en un pequeño número de empresas, como Novonesis y DuPont. Estas compañías han orientado el desarrollo de sus productos hacia la industria de los biocombustibles de primera generación (a partir de caña de azúcar y de almidón de maíz) y de segunda generación, a partir de BLC ampliamente disponibles, como el bagazo de caña de azúcar (DuPont, 2017; Novozymes, 2022a, b). Esta centralización y el enfoque restringido de los formulados disponibles constituye un problema relevante, ya que restringen el acceso a cócteles enzimáticos específicos para procesar biomásas residuales regionales o de menor escala, o con otros productos finales como objetivo. Como consecuencia, se incrementan los costos y se dificulta la implementación eficiente de procesos de valorización a escala industrial. A ello se suma que los formulados comerciales no siempre brindan información completa sobre su composición enzimática. Esta falta de detalle representa otra limitación importante, porque impide diseñar procesos de hidrólisis específicos y optimizados para cada sustrato. Sin conocer con precisión qué actividades enzimáticas están presentes y en qué proporciones, resulta difícil ajustar las condiciones de reacción, maximizar la liberación de azúcares y evitar la formación de compuestos no deseados.

En conjunto, estas limitaciones ponen de manifiesto que los formulados comerciales actuales no siempre responden a las demandas reales de la diversidad de biomásas disponibles ni permiten un control preciso sobre los procesos de hidrólisis. Esta situación resalta la necesidad de diseñar cócteles enzimáticos específicos y adaptados a cada tipo de biomasa y bioproceso, priorizando la reducción de costos y el aumento de la eficiencia en la deconstrucción del material lignocelulósico. Por lo tanto, la combinación racional de enzimas provenientes de diferentes fuentes se presenta como una alternativa clave (Lopes y col., 2018).

En la naturaleza existen distintas fuentes de enzimas. Entre ellas las bacterias son atractivas debido a su capacidad para adaptarse a cambios de pH y temperatura, una mayor flexibilidad en la demanda de oxígeno y su potencial mejoramiento genético (Chukwuma y col., 2021). El mecanismo enzimático más común presente en bacterias aeróbicas de ambientes celulolíticos es la secreción de enzimas que

actúan sobre los polisacáridos vegetales al medio extracelular. En el caso de bacterias cultivables, esto genera la oportunidad potencial para producir cócteles enzimáticos con relativamente bajo costo de producción, los cuales podrían ser aplicables a bioprocesos que requieran la degradación de la biomasa vegetal (Lopes y col., 2018).

El presente trabajo de tesis se basó en la hipótesis de que las formulaciones de enzimas activas sobre carbohidratos de aislamientos bacterianos nativos provenientes de suelo, permiten la deconstrucción controlada y eficiente de hemicelulosas al ser aplicados en procesos de relevancia agroindustrial. En este marco, se seleccionaron las cepas *Cellulomonas* sp. B6 y *Paenibacillus xylanivorans* A59, ambas aisladas de suelos nativos argentinos y previamente caracterizadas por el grupo de trabajo. Estos aislamientos han demostrado ser fuentes valiosas de enzimas lignocelulolíticas con aplicaciones potenciales en el diseño de cócteles enzimáticos eficientes (Ghio y col., 2018; Piccinni y col., 2019; Ontañón y col., 2021).

Entre las biomásas empleadas en esta tesis se incluyen el residuo de caña de azúcar (RAC) y el subproducto agroindustrial salvado de trigo (ST), utilizados como representantes para la valorización de arabino-glucurono-xilanos (AGX) y arabino-xilanos (AX), respectivamente. Asimismo, se evaluaron el Eucalyptus (EUCA) y el bagazo de ágave azul (BAB), ambos seleccionados como modelos para la valorización de glucurono-xilanos (GX). En Argentina, la disponibilidad y el tipo de BLC están estrechamente vinculados con la dinámica de los distintos sectores productivos. Durante el año 2020, el país generó aproximadamente 8,5 millones de toneladas de biomasa, de las cuales el 38% provino de la industria forestal, principalmente residuos de especies de los géneros *Pinus* y *Eucalyptus*, seguida por el procesamiento de caña de azúcar, que aportó un 23 % de la biomasa residual total (Denaday y col., 2020). En cuanto al sector cerealero, Argentina se posiciona como el mayor productor de trigo del hemisferio sur, con una producción estimada de 18,1 millones de toneladas para la campaña 2024/2025. Durante el proceso de molienda, cerca del 24% del grano se transforma en subproductos o residuos, entre ellos el ST, que usualmente se comercializa a granel para la industria de alimentos balanceados o se peletiza y se utiliza directamente como forraje, sin generar un valor agregado significativo (Zschocke, 2019). Por su parte, en México, el bagazo de agave azul constituye el principal residuo sólido derivado de la industria tequilera, con una generación promedio de 400 kg de bagazo por cada tonelada de agave procesado (Montiel y col., 2024).

El objetivo central de este trabajo de tesis fue estudiar las enzimas secretadas por las bacterias aeróbicas para degradar los polisacáridos estructurales de la biomasa vegetal y desarrollar complejos enzimáticos para su aplicación en bioprocesos. Para este fin, se evaluaron estrategias de mutagénesis química para aumentar la actividad enzimática extracelular de *Cellulomonas* sp. B6. Mientras que, para

P. xylanivorans se optimizó la producción de extractos enzimáticos extracelulares y se caracterizó la actividad enzimática de los sobrenadantes obtenidos sobre sustratos (hemi)celulósicos. Además, se estudió el sistema de enzimas de degradación de polisacáridos estructurales mediante el análisis genómico y proteómico con el fin de contribuir a la comprensión del sistema (hemi)celulolítico de ambas bacterias. Complementariamente, la expresión heteróloga de xilanasas de *P. xylanivorans* seleccionadas nos permitió identificar los mecanismos de acción y explicar la contribución de estas a la deconstrucción de xilanos de diferente composición. Finalmente, se formularon mezclas enzimáticas y se evaluó su aplicación en bioprocesos.

La optimización de la producción de enzimas lignocelulolíticas microbianas es un factor determinante para el desarrollo de bioprocesos orientados al aprovechamiento eficiente de la biomasa vegetal y su conversión en bioproductos de valor agregado. Entre las estrategias más utilizadas se destacan la generación de cepas bacterianas y fúngicas mejoradas mediante el uso de agentes mutagénicos o ingeniería genética (Yadav y col., 2025).

El género *Cellulomonas* resulta particularmente interesante como fuente de enzimas activas sobre carbohidratos, por su capacidad de descomponer biomasa vegetal (Lv y col., 2022). En especial, el aislamiento *Cellulomonas* sp. B6 previamente caracterizado, se destaca por presentar una mayor actividad xilanolítica que celulolítica, siendo las biomasas lignocelulósicas complejas las fuentes de carbono más efectivas para inducir la síntesis de enzimas extracelulares en esta bacteria (Piccinni y col., 2019; Ontañón y col., 2021).

Con el objetivo de incrementar la actividad celulolítica y xilanolítica de la cepa, *Cellulomonas* sp. B6 fue sometida a un proceso de mutagénesis química empleando etilmetanosulfonato (EMS), un agente químico conocido por inducir mutaciones puntuales mediante la transición, por ejemplo, del par de bases GT a AT (Wong y col., 2006), seguido de la evaluación de la capacidad hidrolítica en medio sólido con carboximetilcelulosa (CMC) como fuente de carbono. Este enfoque, basado en la relación entre el diámetro de la zona de alcaramiento o halo de degradación y el de la colonia, ha sido utilizado para la selección de mutantes con mayor actividad hidrolítica en distintos microorganismos (Zaldivar y col., 2001). Se ha reportado un incremento en la actividad celulolítica de hasta 10 veces en bacterias Gram-positivas mutagenizadas con EMS (Bhatia y col., 2017).

De las colonias analizadas, solo cuatro mostraron un índice de capacidad hidrolítica mayores a 1,5 veces con respecto a la cepa original, y esto se correlacionó con una mayor actividad endo-glucanasa extracelular (CMCasa), de entre 1,3 y 2,7 veces respecto de la cepa original. Sin embargo, no se observó

aumento de la actividad xilanasa, la cual resultó incluso menor en el caso de algunas de las mutantes obtenidas.

La mutagénesis química de *Cellulomonas flavigena* fue descrita previamente por el grupo de Ponce-Noyola y de la Torre (1995), quienes desarrollaron la mutante PR-22, que presenta un incremento en la actividad xilanolítica extracelular del doble en comparación con su cepa parental. Del mismo modo, ensayos de mutagénesis sobre la cepa *Cellulomonas* sp. TSU-03, empleando irradiación UV y N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), resultó en 25 mutantes con aumento en los índices hidrolíticos. Sin embargo, solo una de las variantes exhibió un leve aumento de la actividad CMCasa extracelular (1,3 veces) respecto de la cepa parental (Sangkharak y col., 2012). Estos resultados indican que los índices hidrolíticos siempre requieren de la verificación de la actividad enzimática extracelular en cultivo.

La mutante 3731, que presentó la mayor actividad CMCasa, podría emplearse para complementar la actividad endo-glucanasa subrepresentada en *Cellulomonas* sp. B6. Asimismo, nuevas rondas de mutagénesis podrían realizarse sobre esta variante con el objetivo de incrementar su actividad enzimática xilanolítica, que de momento es similar a la de la cepa original.

Otro abordaje para mejorar la producción enzimática es la optimización de las condiciones de cultivo en la etapa de fermentación, lo que permite aumentar significativamente la eficiencia y escalabilidad de la producción enzimática (Yadav y col., 2025). En bacterias, la síntesis y secreción de enzimas está fuertemente influenciada por la fuente de carbono presente en el medio de cultivo, siendo los sustratos complejos como la biomasa vegetal buenos inductores para la producción de enzimas con diversas actividades (Iram y col., 2020; Chantorn y col., 2021).

El género *Paenibacillus* incluye especies que secretan enzimas con aplicaciones agroindustriales, incluyendo enzimas capaces de degradar la biomasa lignocelulósica (Subramaniyan y Prema, 2000; Gastelum-Arellanez y col., 2014; Grady y col., 2016; Bohra y col., 2019). Numerosos trabajos reportan la utilización de biomasa lignocelulósica en varios miembros de los géneros *Paenibacillus* y *Bacillus* para producir mezclas enzimáticas adecuadas para la conversión de la (hemi)celulosa en productor de interés (Di Marco y col., 2017; Ticona y col., 2020; Hero y col., 2021). En particular, nuestro grupo de trabajo ha aislado y estudiado previamente la cepa *Paenibacillus xylanivorans* A59, un microorganismo mesófilo y halotolerante, principalmente xilanolítico (Ghio y col., 2015, 2016, 2018, 2019, 2020).

Durante el desarrollo de esta tesis, se estableció un método para la producción de extractos enzimáticos destinados a la hidrólisis de BLC, dirigida principalmente al xilano, utilizando distintas fuentes de carbono para el cultivo de *P. xylanivorans*. La producción de enzimas extracelulares, y consecuentemente la actividad enzimática observada, fue mayor cuando se emplearon BLC complejas

como sustratos de cultivo (ST y RAC) en comparación con el uso de fuentes de carbono comerciales y simples como el xilano de madera de haya (XIN). Este comportamiento se ha observado en otros aislamientos del mismo género (Di Marco y col., 2017), así como en otras bacterias (Ontañón y col., 2021) e incluso en hongos (Daly y col., 2017; Van Munster y col., 2020).

Si bien el cultivo de *P. xylanivorans* en RAC generó un extracto enzimático con mayor actividad volumétrica (UI/mL) que en ST, dicha actividad máxima se alcanzó recién a las 72 hs (frente a 48 hs en ST) y con una menor recuperación de volumen total, lo que redujo la productividad global. En conjunto, estos factores llevaron a determinar que el ST fue el sustrato de cultivo más adecuado. En esta tesis se llevó a cabo el escalado de la producción con el objetivo de obtener mayores volúmenes de extracto enzimático, lográndose con éxito la incrementación volumétrica. En el caso de RAC, se mantuvo la eficiencia enzimática respecto de la producción en matraces, mientras que con ST se alcanzó incluso un aumento en la actividad de hasta cinco veces. Estos resultados adquieren particular relevancia si se considera que la fermentación agitada con sustratos sólidos insolubles representa un desafío, dado que la agitación puede afectar su disponibilidad efectiva, entre otros inconvenientes (Garai y Kumar, 2013; Yegin y col., 2017), y que durante el escalado se han reportado disminuciones significativas en el rendimiento enzimático (Kumar y col., 2009; Garai y Kumar, 2013). En este contexto, los antecedentes de nuestro grupo con *Cellulomonas* sp. B6 habían demostrado la posibilidad de mantener la eficiencia al emplear ST como sustrato (Ontañón y col., 2021), lo que coincide con lo observado en este trabajo al utilizar RAC y se ve ampliamente superado en el caso del ST, reforzando la robustez del proceso y su capacidad para sostener o incluso mejorar la actividad enzimática durante el escalado.

Una vez obtenido el sobrenadante de cultivo, resulta fundamental conservarlo adecuadamente y, en muchos casos, concentrar la actividad de interés. Para ello existen diversas metodologías posibles. En este trabajo se evaluaron la ultrafiltración y la liofilización, ambas consideradas estrategias efectivas para la concentración de enzimas (Rodríguez-Fernández y col., 2013; Postemsky y col., 2017). Aproximadamente el 40% y el 50% de la actividad xilanolítica se retuvo en los extractos luego de los procesos de ultrafiltración y liofilización, respectivamente, sin necesidad de incorporar aditivos estabilizantes. Este es un resultado promisorio, dado que, si bien la liofilización es un método simple y ampliamente utilizado para la conservación de enzimas, puede provocar desnaturalización y pérdida de actividad en ciertas proteínas, ya que su tolerancia al estrés de congelación y/o secado es variable (Soares y col., 2012; Berghout y col., 2015). En este sentido, sería pertinente evaluar el empleo de crioprotectores que permitan mejorar la actividad enzimática recuperada.

Asimismo, aunque ambas metodologías permiten concentrar proteínas de manera eficiente, difieren en las características del producto final. En la ultrafiltración se genera un extracto líquido, mientras que

la liofilización produce un extracto en polvo. En la práctica, disponer del extracto en formato sólido ofrece ventajas para su almacenamiento y uso, ya que puede resuspenderse únicamente la cantidad necesaria en cada aplicación, reduciendo así la pérdida de actividad enzimática asociada a ciclos repetidos de congelamiento y descongelamiento.

Además de la concentración y conservación de los extractos, resulta relevante la identificación de enzimas y proteínas que los componen, ya que este aspecto complementa y amplía su potencial aplicación en bioprocesos. En este sentido, comprender qué enzimas se producen y secretan bajo condiciones de cultivo específicas proporciona información clave sobre el metabolismo bacteriano y sobre la participación de enzimas individuales en la degradación los sustratos de cultivo utilizados. Por lo tanto, el análisis proteómico de secretomas se presenta como una herramienta esencial para caracterizar los extractos enzimáticos y así poder ajustarlos para aplicaciones prácticas (Cattaneo y col., 2014).

Con el fin de estudiar qué enzimas son efectivamente secretadas por *P. xylanivorans* durante el crecimiento en distintos sustratos (hemi)celulósicos y, por lo tanto, responsables de las actividades hidrolíticas detectadas, se realizaron ensayos de espectrometría de masas LS-MS/MS a partir de los sobrenadantes completos obtenidos. El análisis proteómico reveló que el uso de sustratos complejos como ST y RAC como fuentes de carbono condujo a un repertorio más diverso de enzimas activas sobre carbohidratos (CAZimas) en comparación con el empleo de sustratos más homogéneos, como XIN, o azúcares cortos solubles, como la sacarosa. Resultados similares fueron reportados en la bibliografía para otros géneros bacterianos (Piccini y col., 2019; Takenaka y col., 2019; Leadbeater y col., 2021; Ontañón y col., 2021). Estos resultados confirman que los sustratos complejos, incluyendo derivados agrícolas y residuos agroindustriales, son particularmente adecuados para la producción de extractos enzimáticos bacterianos enriquecidos en CAZimas.

El repertorio de β -1,4-endoxilanasas (EC 3.2.1.8) extracelulares codificado en el genoma de *P. xylanivorans* (dos GH10 y una GH11) fue detectado en los secretomas de forma variable. En particular, una de las GH10, PxXyn10A, se expresó en todas las condiciones de cultivo, incluso en sacarosa, siendo la proteína más abundante en prácticamente todos los sobrenadantes de cultivo analizados. Estos resultados indicaron que esta enzima probablemente es la principal responsable de la actividad xilanolítica de *P. xylanivorans*. Asimismo, la otra GH10 también se identificó en todos los secretomas, coincidiendo con lo observado en análisis previos (Ghio y col., 2016, 2018). A diferencia de PxXyn10A, que es una enzima unimodular, esta GH10 presenta múltiples módulos de unión a carbohidratos (CBMs) y se encuentra unida a la membrana mediante dominios de homología a capa S (SLHs). Debido a este anclaje, su representación en los extractos extracelulares fue baja, como era esperable. Una

xilanasa GH10 multimodular muy similar ha sido descrita en *Paenibacillus* JDR-2, asociada a la hidrólisis de glucurono-xilanos (GX) y a la asimilación de xilo-oligosacáridos (XOS) por la bacteria (St John y col., 2006). Por lo tanto, la contribución de esta GH10 de gran tamaño al metabolismo del xilano en *P. xylanivorans* probablemente sea análoga, aunque su función específica aún debe determinarse.

Curiosamente, la única GH11 (*PxXyn11B*) fue identificada como la enzima más abundante en el sobrenadante de XIN, aunque este secretoma presentó significativamente menos actividad xilanólítica que los sobrenadantes de cultivos que utilizan sustratos lignocelulósicos ricos en arabino-xilano (RAC o ST). Sin embargo, la enzima sí fue detectada en el sobrenadante de bagazo de ágave extrusado (BABe), biomasa enriquecida en GX, presentando incluso una abundancia relativa semejante a *PxXyn10A*. Estas diferencias observadas en la inducción y secreción de *PxXyn11B* en función de la naturaleza del sustrato empleado podrían estar relacionadas con la menor capacidad que presenta la enzima para tolerar sustituciones de arabinosa en el polímero de xilano (de Mello Capetti y col., 2024). *PxXyn11B* también se detectó en el sobrenadante de ST de 24 h, lo que sugiere que podría desempeñar un papel relevante en las etapas iniciales de la degradación de xilano. No obstante, en base a nuestros resultados, la actividad de *PxXyn10A* parece ser la más importante para la actividad xilanólítica de los extractos enzimáticos obtenidos. Previamente ambas enzimas, *PxXyn10A* y *PxXyn11B*, fueron expresadas en *Escherichia coli* y caracterizadas, demostrando que difieren en su modo de acción, condiciones óptimas de reacción y producen patrones distintos de XOS (Ghio y col., 2016, 2018; de Mello Capetti y col., 2023a, b).

Se ha establecido que otras enzimas pueden potenciar la eficiencia de la deconstrucción de xilanos (Malgas y col., 2019). En este sentido, se identificaron en los secretomas provenientes de ST, RAC y BABe varias enzimas adicionales que actúan sobre polisacáridos de la pared celular vegetal, entre ellas una celobiohidrolasa GH48, una endo-glucanasa GH9, una LPMO AA10, una quitinasa GH18 y una pectinasa PL1. Sin embargo, estas enzimas se encontraron en muy baja abundancia, y su contribución a la hidrólisis de la biomasa analizada (RACe) no es clara, ya que los extractos muestran actividad celulolítica prácticamente nula. Cabe destacar que se identificó una GH13 (posiblemente una α -amilasa) en todos los secretomas (incluido SAC), lo que sugiere un patrón de expresión constitutiva, al igual que las dos GH10. Por otro lado, las enzimas desramificantes que actúan sobre las sustituciones de xilanos también estuvieron poco representadas en todos los secretomas.

La expresión coordinada y abundancia diferencial de CAZimas en los secretomas provenientes de cultivos con diferentes fuentes de carbono nos llevó a plantear si dicha respuesta podría estar asociada a una organización génica particular, es decir, si los genes codificantes para estas enzimas se encuentran efectivamente agrupados en el genoma. Mediante la exploración del contexto genómico de los genes

codificantes para las enzimas identificadas, encontramos que, en su amplia mayoría, estos se distribuyen de manera dispersa a lo largo de todo el genoma y no agrupados en regiones cromosómicas específicas.

A pesar de expresarse y secretarse en las mismas condiciones de cultivo, estas enzimas no forman unidades transcripcionales, estando codificadas en regiones distintas del genoma. Si bien la presencia de loci de utilización de polisacáridos (PULs) ha sido descrita como una característica distintiva de los genomas de *Bacteroidetes*, también se ha reportado que cepas pertenecientes a otros géneros presentan genes involucrados en el metabolismo de oligosacáridos o polisacáridos colocados y coregulados (Golan y col., 2004; Grondin y col., 2017; Christiansen y col., 2020). Por ejemplo, el PUL de arabinano de una bacteria intestinal de terminas (Arnal y col., 2015) o el PUL de xiloglucano de la bacteria ambiental del suelo *Cellvibrio japonicus* (Larsbrink y col., 2014).

En contraste, los resultados obtenidos para *Cellulomonas* sp. B6 y *P. xylanivorans* podrían reflejar una estrategia evolutiva distinta, caracterizada por una organización génica más dispersa vinculada con la utilización de sustratos (hemi)celulósicos. En la mayoría de las regiones genómicas cercanas a los genes que codifican a CAZimas se identificaron tanto reguladores transcripcionales comúnmente asociados a la utilización de carbohidratos, como LacI, AraC y ROK, así como transportadores ABC (Sawhney y col., 2016; Rodionov y col., 2021). Esto sugiere que la expresión de estas enzimas en estos géneros respondería a reguladores globales. Si bien, en general, los genes de CAZimas se distribuyen a lo largo de todo el genoma, algunos se agrupan en regiones específicas. Por ejemplo, las secuencias codificantes para *PxXyn10A* y *PxXyl30_2* se encuentran adyacentes, aunque en sentido contrario y ambas proteínas fueron identificadas en todas las condiciones de expresión estudiadas en este trabajo de tesis. Sin embargo, resta establecer si la expresión de ambas enzimas está co-regulada, lo cual podría ayudar a establecer la función de *PxXyl30_2* en el metabolismo de las pentosas. En *Paenibacillus* sp. JDR-2, por el contrario, se ha observado que genes implicados en la utilización del xilano y del β -glucano se encuentran agrupados en el genoma y flanqueados por secuencias codificantes para proteínas reguladoras, como AraC, y transportadores ABC (Sawhney y col., 2016).

En función de nuestros resultados, aun observándose expresión de numerosas CAZimas en presencia de sustratos complejos, no necesariamente ocurre una co-expresión, siendo que los mecanismos moleculares que rigen este comportamiento aún permanecen escasamente caracterizados (Wakarchuk y col., 2016; Spertino y col., 2018; Piccinni y col., 2019; Ontañón y col., 2021). Por lo tanto, la comprensión y dilucidación de los circuitos regulatorios que controlan la expresión de las CAZimas constituye un desafío pendiente, cuya resolución requerirá estudios adicionales que integren análisis transcriptómicos, proteómicos y funcionales.

La hidrólisis eficiente de los polisacáridos que conforman la BLC requiere de la acción concertada de múltiples CAZimas que exhiben actividades específicas distintas (Bhalla y col., 2013; Malgas y col., 2019, 2021). El xilano es la hemicelulosa más abundante y el segundo polisacárido más común en la naturaleza, después de la celulosa. Presenta una notable diversidad estructural según la planta de origen y el tejido en el que se encuentra, lo que influye tanto en la solubilidad y la conformación del polímero como en sus interacciones con otros componentes de la pared celular. Los arabino-xilanos (AX) poseen residuos de α -L-arabinofuranosa (α -L-Araf) y se encuentran en gramíneas y cereales; los GX presentan sustituciones de ácido 4-O-metil- α -D-glucurónico (MeGlcA) y se encuentran predominantemente en maderas duras y dicotiledóneas, mientras en los glucurono-arabino-xilanos (GAX) y los arabino-glucurono-xilanos (AGX) presentan grupos laterales MeGlcA y α -L-Araf y se encuentran comúnmente en gimnospermas como las coníferas (Baker y col., 2020). Para alcanzar una hidrólisis completa del xilano, es necesaria la acción coordinada de xilanasas, β -xilosidasas y enzimas desramificantes específicas dependiendo de la naturaleza del xilano a degradar (Lu y col., 2023).

El extracto de *P. xylanivorans* fue (E-PxST) fue eficaz en la hidrólisis tanto de xilano sin decoraciones (xilano industrial) como de AX y GX puros, logrando una alta tasa de conversión a xilosa y xilobiosa, en el caso del xilano no sustituido. Sin embargo, la eficiencia de hidrólisis fue menor en el caso de AX y GX, enfatizando la necesidad de complementar el coctel con enzimas desramificantes que actúen sobre las sustituciones, para lograr mejores tasas de conversión, dado que estas enzimas están poco representadas en el extracto enzimático utilizado.

Las principales enzimas desramificantes del xilano son α -L-arabinofuranosidasas, generalmente clasificadas en las familias GH43, GH51 y GH62, que remueven las sustituciones de arabinosa presentes en el AX y arabino-xilo-oligosacáridos (AXOS) y las α -D-glucuronidasas (familias GH67 y GH115), encargadas de eliminar decoraciones de ácido glucurónico de GX y glucurono-xilo-oligosacáridos (UXOS) (Garrido y col., 2022; Mohapatra y Manoj, 2023; Leontakianakou y col., 2024; Long y col., 2024).

Con el fin de diseñar un cóctel enzimático capaz de mejorar la conversión de xilano sustituido a xilosa fermentable, y de este modo valorizar BLC, el extracto E-PxST se suplementó con una α -L-arabinofuranosidasa GH62 y una β -xilosidasa GH43, previamente caracterizadas. Tanto E-PxST solo como combinado con dichas enzimas accesorias se testeó sobre RACe, una biomasa rica en arabino-glucurono-xilanos (AGX). La combinación de enzimas resultó en un incremento en la liberación de X1 y A1, respecto al extracto sin suplementar. Es interesante destacar que, en estudios recientes, se observó interacción sinérgica de xilanasas (GH10 y GH11), con α -L-arabinofuranosidasas (Abfs) (GH51 y GH43), junto con una β -xilosidasa GH43 en la deconstrucción de AX de trigo (Malgas y col., 2021). El mecanismo propuesto es que las Abfs actuarían principalmente sobre los AXOS liberados, generando

XOS sin sustituciones y permitiendo la mayor actividad de la β -xilosidasa para la conversión a xilosa (Mafa y col., 2021, Malgas y col., 2021). En nuestro caso, la enzima Abf utilizada, CsAbf62 (GH62), tiene actividad también sobre el polisacárido (Garrido y col., 2022), por lo cual la mayor degradación se podría ver también incrementada por mejor acceso de PxXyn10A a regiones altamente sustituidas del polisacárido (de Mello Capetti y col, 2023a). De esta manera, la desramificación del xilano resultó clave para lograr mayores tasas de hidrólisis.

Es importante destacar que, además de azúcares monoméricos fermentables, la deconstrucción controlada del xilano puede generar XOS con propiedades bioactivas dependiendo de su composición. En este sentido, la posibilidad de modular la obtención de diferentes productos mediante la suplementación -o no- del extracto con enzimas específicas resulta ventajosa, ya que permite adaptar el perfil de hidrólisis tanto a la naturaleza de la biomasa como a la aplicación final deseada.

Los XOS y los AXOS cortos (GP 2-4), se consideran prebióticos de nueva generación. Su potencial prebiótico está relacionado no solo a su grado de polimerización, sino también al patrón de sustituciones de arabinosa (Rudjito y col., 2023). Por lo tanto, la alta especificidad del cóctel enzimático de *P. xylanivorans* hacia el xilano constituye una ventaja, ya que favorece la generación de XOS lineales y sustituidos con una baja proporción de X1 y con una mínima formación de productos no deseados, como glucosa derivada de la celulosa y los glucanos de la biomasa. La presencia limitada o ausencia de estos monosacáridos fermentables es deseable, dado que mejora las propiedades prebióticas de los XOS/AXOS (Valladares-Diestra y col., 2023). Este extracto constituye una vía eficiente y económica para obtener un cóctel enriquecido en PxXyn10A, la enzima más abundante en el sobrenadante, donde representa hasta un 22,95% de las proteínas totales detectadas. Esta enzima ha sido previamente caracterizada en nuestro grupo demostrándose su elevada eficiencia sobre AX, lo cual puede estar relacionado con su tolerancia a las sustituciones cercanas al sitio de corte en la cadena del xilano (Ghio y col., 2018; Briganti y col., 2021; de Mello Capetti y col, 2023a)

Además de las xilanasas PxXyn10A y PxXyn11B, en el sobrenadante de cultivo de *P. xylanivorans* se identificaron en baja proporción dos enzimas de la familia GH30 que podrían participar en la degradación del xilano: una β -xilosidasa intracelular GH30_2 (PxXyl30_2) y una glucurono-xilanasas específica extracelular GH30_8 (PxXyn30_8). Las enzimas de la familia GH30 se destacan por sus patrones de hidrólisis específicos, dado que requieren de manera estricta sustituciones de (Me)GlcA, por lo cual generan productos ácidos (UXOS), lo que las convierte en candidatas prometedoras para cócteles enzimáticos para la valorización de biomasa rica en GX (Puchart y col., 2021; Mendonça y col., 2023).

Con el fin de caracterizar en mayor profundidad el sistema xilanolítico de *P. xylanivorans* para luego diseñar formulados enzimáticos que permitan la valorización del xilano presente en distintas fuentes de biomasa lignocelulósicas, se estudió la actividad de ambas GH30 identificadas en los secretomas, mediante expresión heteróloga y caracterización bioquímica.

La enzima *PxXyl30_2* mostró buena actividad β -xilosidasa sobre el sustrato modelo *pNP-X*, aunque sin evidencia de acción sobre los sustratos naturales predichos (X2 y XOS), ni sobre ningún otro sustrato ensayado, tanto sola o en combinación con endo-xilanasas. Hasta el momento, sólo se han caracterizado y depositado en la base de datos CAZy dos enzimas pertenecientes a esta subfamilia GH30_2 (https://www.cazy.org/GH30_2.html). Ambas presentan actividad sobre el sustrato artificial *pNP-X*, aunque, también carecen actividad sobre X2 y XOS. De estas, la enzima XylBK-110 de *Bifidobacterium breve* (B1P195, Hyun y col., 2012) ha mostrado actividad adicional sobre un compuesto flavonoide (Kakkalide) y una saponina (Ginsenosido Ra₁), mientras que *RuXyn2* proveniente de una bacteria no cultivable de rumen (E3TBJ4, Zhou y col., 2012) presentó actividad sólo sobre el disacárido 1,5- α -L-arabinobiosa (A2).

En base a los resultados obtenidos y los antecedentes disponibles se sugiere que *PxXyl30_2* podría actuar sobre algún compuesto pequeño, probablemente internalizado por la bacteria como producto de la hidrólisis de la biomasa vegetal aún no identificado. Giummarella y col. (2019) sugieren que las enzimas GH30_2 podría actuar sobre compuestos pequeños, como un xilósido constituido por una xilosa unida a un compuesto aromático derivado de la lignina, dado a la relación estrecha entre el xilano y la lignina en la pared celular vegetal. De momento, si bien *PxXyl30_2* fue detectada en todos los extractos enzimáticos analizados a lo largo del trabajo, su rol biológico permanece incierto.

Por otra parte, *PxXyn30_8* presentó actividad glucurono-xilanasas específica de alrededor de 30 UI/mg, lo cual coincide con lo reportado en GH30_8 de otras especies de *Paenibacillus* y *Bacillus* (Valenzuela y col., 2012; Guo y col., 2018), aunque también existen otras con niveles muy altos de actividad como *Xyn30A* de *Paenibacillus favisporus* (244 UI/mg) (Padilha y col., 2014). *PxXyn30_8* mostró mayor actividad a pH 6,0 y una temperatura de 60 °C, lo cual es interesante para esta enzima, dado que según la base de datos BRENDA (<https://www.brenda-enzymes.org/index.php>) (Schomburg y col., 2017), las enzimas GH30_8 procariotas suelen presentar un amplio rango de condiciones de reacción, pero la mayoría de ellas funcionan en condiciones moderadas, como pH 6-7 y 40-50 °C. La mayoría de las GH30_8 son degradadoras específicas del GX, es decir, requieren de la sustitución con MeGlcA para actuar, por lo cual se caracterizan por producir XOS ácidos sustituidos (UXOS). En este trabajo de tesis, confirmamos que *PxXyn30_8* produce UXOS mono-sustituidos con MeGlcA de un GP entre X2-X8. Estos resultados coinciden con los reportados para *Xyn30A* de *P. favisporus* (Padilha y col., 2014) y *Xyn30D*

de *Paenibacillus barcinonensis* (Valenzuela y col., 2012). Entre el perfil de UXOS producidos por *PxXyn30_8* a partir de XIN identificamos un producto minoritario sustituido con MeGlcA en el extremo no-reductor, MeGlcA¹X2. La identidad del producto y la posición de la decoración fueron confirmadas por resonancia magnética nuclear (NMR) y experimentalmente empleando una α -glucuronidasa GH67 (CsAgu67, Ontañón y col., en revisión). Numerosos análisis estructurales han demostrado que las enzimas GH30_8 acomodan un residuo de xilosa sustituido con MeGlcA en el subsitio -2 de la hendidura catalítica determinando así su especificidad de sustrato (St John y col., 2011; Urbániková y col., 2011; o Mendonça y col., 2023). Vacilotto y col. (2024) dilucidaron de manera bioinformática que otras posiciones del sitio activo podían aceptar decoraciones de (Me)GlcA, además del requerimiento en la posición -2, en *RcXyn30A* de *Ruminococcus champanellensis*. La inserción manual de la decoración los llevó a concluir que los subsitios +2 y -3 pueden admitir también decoraciones de (Me)GlcA, mientras que la presencia de dicha decoración en el subsitio +1 resultaría en un impedimento estérico con el apéndice del subsitio -2. Sin embargo, nuestros resultados sugerirían que *PxXyn30_8* tendría la capacidad de aceptar decoraciones de MeGlcA en la posición +1, lo cual es novedoso para la familia.

El perfil de productos generados por *PxXyn30_8* a partir de XIN y BABe difiere estructuralmente de los perfiles de *PxXyn10A* y *PxXyn11B*. La enzima *PxXyn30_8* produce exclusivamente UXOS y de mayor longitud (GP 2 y 8), *PxXyn11B* produce una mezcla de XOS neutros y UXOS -(U)XOS- de GP entre 2 y 6, y *PxXyn10A* X1 y (U)XOS de GP entre 2 y 5. La combinación de *PxXyn30_8* con *PxXyn10A* o *PxXyn11B* para hidrolizar XIN y BABe resultó en un cambio en el perfil de (U)XOS y una sinergia en la liberación de X1. *PxXyn30_8* desempeñaría, entonces, un papel importante al complementar la acción de *PxXyn10A* y *PxXyn11B* en la degradación de GX presentes en la biomasa lignocelulósica y a su vez puede generar productos ácidos, específicos.

Los distintos compuestos que pueden obtenerse a partir de los GX pueden presentar propiedades bioactivas de relevancia en industrias alimentaria y fármaco-cosmética. Se ha observado que los UXOS constituyen una alternativa natural a antioxidantes sintéticos, y que las sustituciones de MeGlcA, junto con un mayor grado de polimerización (GP), serían factores determinantes en dicho potencial antioxidante (Jagtap y col., 2017; Valls y col., 2018; Bouiche y col., 2020). En consecuencia, las diferentes enzimas activas exclusivamente sobre la cadena principal de GX, que preservan las decoraciones XOS durante la sacarificación, pueden resultar particularmente deseables (Morgan y col., 2017). Bajo este marco conceptual, y considerando la variabilidad observada en los productos de hidrólisis, se valuó la actividad antioxidante de los UXOS generados por la *PxXyn30_8* (XOS-30), así como la de los (U)XOS producidos por *PxXyn10A* (XOS-10), *PxXyn11B* (XOS-11) y por la combinación de estas enzimas.

Entre los resultados más relevantes, podemos destacar que 100 µg/mL de XOS_30 alcanzan una actividad antioxidante del 43%, equivalente a 5,6 µM de ácido gálico (GA). En contraste, la misma concentración de XOS_10 y XOS_11 exhiben una actividad sustancialmente menor (10%, equivalente a 1,2 µM de GA). Si bien la capacidad antioxidante de los XOS generados por la acción de endo-xilanasas ha sido previamente documentada, son escasos los estudios que comparan el efecto antioxidante de los XOS producidos por xilanasas pertenecientes a distintas familias. Además, en la mayoría de estos trabajos se emplean biomásas lignocelulósicas enriquecidas AX, como la mazorca de maíz (Ismail y col., 2022) y el bagazo de caña de azúcar (Puja y col., 2025). Valls y col. (2018) reportan que los UXOS obtenidos por Xyn30D presentan cuatro veces más actividad que los generados por Xyn10A, ambas de *Paenibacillus barcinonensis*, a partir de XIN, alcanzando hasta el 50% de actividad antioxidante con 70 µg/mL de UXOS-Xyn30D. No obstante, aunque también emplean la metodología con el radical ABTS⁺, como la utilizada en este trabajo, refieren la actividad a concentraciones de Trolox y no a GA, lo que dificulta comparaciones directas.

La correlación positiva entre la actividad antioxidante y el GP de los XOS ha sido reportada previamente (Bouiche y col., 2020; Batsalova y col., 2022). Asimismo, se ha descrito que la ramificación con MeGlcA presente en los UXOS es clave para conferir actividad antioxidante, dado que ni la xilosa, ni XOS neutros (X2-X6), ni el ácido glucurónico presentan esta propiedad (Valls y col., 2018; Bouiche y col., 2020). Nuestros resultados confirman que tanto la estructura de los XOS, como el GP y el tipo de sustitución, influyen significativamente en la capacidad antioxidante de los UXOS-30, reforzando el valor de las endo-xilanasas GH30_8 en el diseño de formulaciones enzimáticas orientadas a la obtención de compuestos bioactivos. Adicionalmente, mostramos que la actividad antioxidante de los derivados de BLC resultarían de la combinación entre los UXOS y compuestos fenólicos presentes en la misma, un control que no suele considerarse en otros estudios publicados.

Como ya se ha mencionado, las enzimas activas sobre los polisacáridos de la BLC tienen múltiples aplicaciones. En el contexto de la nutrición animal, enzimas exógenas se han utilizado ampliamente en las dietas para mejorar la digestión de nutrientes y promover el crecimiento animal. Generalmente, en Argentina se emplean dietas a base de maíz y harina de soja (SBM) que contienen niveles elevados de polisacáridos no amiláceos (PNAs) y factores antinutricionales, dificultando la digestión regular disminuyendo la eficiencia alimentaria y provocando trastornos intestinales que conllevan a una menor producción (Sureshkumar y col., 2023; Fu y col., 2024). En la actualidad, diversas enzimas están siendo incorporadas a las dietas de cerdos y pollos de engorde, incluyendo aquellas con actividad celulasa, β-mananasa, β-glucanasas, xilanasas, proteasas y galactosidasas, entre otras (Kim y col., 2017; Liang y col., 2022; Sureshkumar y col., 2023). Hasta el momento, se han desarrollado numerosos cócteles

enzimáticos fúngicos que contienen enzimas con fines biotecnológicos aplicados en la industria de la alimentación animal (Plouhinec y col., 2023, 2025). Un ejemplo de ello es Rovabio™ Advance, producido a partir de *Talaromyces versatilis* y comercializado por la empresa Adisseo® para la industria de la alimentación animal (Bampidis y col., 2022).

En este trabajo describimos que E-PxST presenta actividad xilanasa y evaluamos y conformamos que además tiene actividad β -glucanasa, la cual lo hace atractivo como un novedoso cóctel bacteriano nacional para ser aplicado como aditivo o suplemento dietario para animales monogástricos. En los ensayos sobre piensos de soja-maíz comerciales, el extracto enzimático E-PxST aumentó en un 20% la solubilidad del alimento animal luego de 24 hs de hidrólisis. El análisis de la composición del alimento reveló un bajo contenido de xilanos y una alta proporción de glucanos, por lo cual este aumento de solubilidad podría deberse a la actividad glucanasa del extracto. Las enzimas de las familias GH5, GH9, GH13, GH16 y GH48 presentes en E-PxST podrían estar relacionadas a dicha actividad. En trabajos similares, utilizando el sobrenadante del hongo *Aspergillus terreus* (ricos en enzimas activas en ramnogalacturonano-I presente en la soja) se reportaron niveles equivalentes de solubilidad (19%) luego de 48 hs de hidrólisis del alimento (Plouhinec y col., 2024). No obstante, el empleo de un cóctel enzimático bacteriano como E-PxST aumentaría la productividad del proceso.

La aplicación de las enzimas en el alimento puede darse como una aspersión sobre los *pellets* o como incorporación en la formulación peletizada. Factores como la presión, temperaturas elevadas, el tiempo del procesamiento y el nivel de humedad podrían causar la inactivación de las enzimas sometidas a los procesos de acondicionamiento del alimento (Liang y col., 2022). Sin embargo, el extracto E-PxST puede mantener más del 80% de su actividad enzimática a temperaturas de 70 °C y 80 °C durante 30 seg. El aumento en la solubilidad y la disminución de la viscosidad del alimento generados por E-PxST después de simular las condiciones de temperatura y tiempo de peletización, sugieren que el extracto se mantiene activo en las condiciones operativas del proceso, por lo cual podría incorporarse en la formulación sólida.

Otra aplicación posible para el extracto enzimático E-PxST, dada su capacidad de degradar distintos tipos de xilanos produciendo un conjunto diverso de XOS, con baja proporción de monosacáridos, es el desarrollo de bioestimulantes vegetales a partir de fuentes de BLC.

Los oligosacáridos derivados de la pared celular vegetal tienen la capacidad de promover la resistencia a enfermedades y el crecimiento de las plantas, debido a que actúan como estimuladores de la respuesta de defensa en varias especies vegetales, conocida como DAMPs (*damage associated molecular patterns*) por sus siglas en inglés (Dewangan y col., 2023; Sun y col., 2025). En especial, los XOS lineales,

que comprenden un GP entre X2 y X5, pueden ser reconocidos por el sistema inmunitario de las plantas con distinta especificidad activando mecanismos de defensa y modificando la estructura de la pared celular vegetal (Dewangan y col., 2023; Pring y col., 2023; Fernández-Calvo y col., 2024). Esta actividad como DAMPs ha sido probada para distintos XOS purificados, en distintas especies vegetales modelo y de interés agrícola (Dewangan y col., 2023; Sun y col., 2025). Por lo tanto, los XOS pueden tener potencial como bioestimulantes (Pring y col., 2023).

En esta tesis se realizó evaluó el efecto de los hidrolizados generados por E-PxST desde BABe y RACe como elicitores de la respuesta de defensa de plantas de tabaco. El ensayo se realizó mediante aspersión foliar de los XOS, en un modelo de infección viral buscando que, en aquellas plantas en las que se aplican moléculas elicitoras de respuesta de defensa, se observe una disminución local de las lesiones generadas por el virus.

Los XOS obtenidos a partir de la hidrólisis enzimática de BABe por E-PxST (XOS-BABe), enriquecidos en X2 de acuerdo con el perfil de productos determinado por TLC, disminuyeron el número de lesiones en hojas de plantas de tabaco frente a la infección con el virus del mosaico de tabaco (TMV). En este sentido, se ha reportado que X2 es capaz de desencadenar la respuesta inmune en plantas de *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis), alterando tanto la composición de la pared celular vegetal como los niveles de hormonas de la planta (Dewangan y col., 2023). Asimismo, también se ha demostrado que Arabidopsis puede activar mecanismos de defensa frente a UXOS, entre ellos la 2,3-(4-O-metil- α -D-glucuronil)-xilotetraosa (XUXX) (Fernández-Calvo y col., 2024). Sin embargo, niveles similares de estimulación del sistema inmune vegetal se observaron con el extracto E-PxST. Los extractos microbianos libres de células se reconocen como herramientas promisorias en distintos ámbitos de la agricultura, incluyendo la estimulación del crecimiento y la defensa de las plantas. Estos extractos pueden contener una amplia diversidad de metabolitos bioactivos, tales como azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, péptidos, volátiles, entre otros (Ansari y col., 2023). En este marco, se ha reportado que metabolitos secundarios y enzimas proteolíticas secretados por *Bacillus firmus* presentan actividad frente a diversos nematodos fitoparásitos (Peleg y col., 2002; Sharma y col., 2015; Susić y col., 2020). De manera similar, los exopolisacáridos de *Lactobacillus planetarium* estimulan la expresión de genes de defensa de plantas de tomate (Blainski y col., 2018).

Resultados concordantes han sido descritos para extractos fúngicos, como por ejemplo el producido por *Trichoderma harzianum*, el cual mostró eficacia en el biocontrol de *Fusarium* y promovió el crecimiento de plantas de tomate. El análisis proteómico de dicho extracto reveló la presencia de enzimas tales como glutaminasa, metaloproteinasa, quitinasa y péptido hidrolasa (da Silva Pereira y col., 2025). En este contexto, el extracto E-PxST presenta metaloproteinasas entre las proteasas

identificadas, así como algunas quitinasas. Si bien el extracto empleado fue inactivado por calor, la presencia residual de estas enzimas y/o de otros metabolitos podrían estar asociada a la actividad bioestimulante observada en plantas de tabaco frente a la infección viral.

Los XOS obtenidos enzimáticamente a partir de RACe por E-PxST (XOS-RACe) presentaron una menor capacidad elicitora, e incluso la auto-hidrólisis del sustrato (Control RACe) resultó ser levemente más efectiva. No obstante, diversos estudios han demostrado que los AXOS y en particular la 3,3- α -L-arabinofuranosyl-xylotetraose (XA³XX), poseen una capacidad elicitora, siendo capaces de desencadenar respuestas inmunes fuertes en *Arabidopsis* y de mejorar la resistencia de distintos cultivos frente a enfermedades (Mélida y col., 2020; Fernández-Calvo y col., 2024).

En este contexto, los resultados obtenidos podrían estar asociados a la dosis de XOS-RACe empleada. Si bien todos los tratamientos se aplicaron en una solución al 10% (v/v), la concentración de XOS presentes en el hidrolizado XOS-RACe, determinada como azúcares reductores totales, fue aproximadamente dos veces inferior a la del hidrolizado XOS-BABe.

Es importante destacar que en la actualidad los UXOS se encuentran discontinuados en el mercado, dificultando su disponibilidad para potenciales aplicaciones. En este sentido, nuestros resultados podrían ser una solución para producirlos enzimáticamente. Además, podrían emplearse las endoxilasas recombinantes disponibles en el grupo de trabajo, como Pxxyn30_8 y Pxxyn10A, para obtener productos definidos que sirvan como estándar para la caracterización de BLC o de otras enzimas.

Las evidencias de la mejora de la resistencia a las enfermedades en plantas tratadas con mezclas de XOS o extractos microbianos los convierte a ambos en una clase prometedora de compuestos para continuar su estudio tendiente a una posible aplicación práctica agrícola, con el fin de disminuir el uso de agroquímicos y, a su vez, darle un valor agregado a la biomasa lignocelulósica empleada para su producción.

Conclusiones

El presente trabajo de tesis doctoral contribuye al conocimiento y aprovechamiento biotecnológico de bacterias nativas como fuente de enzimas lignocelulolíticas de alta eficiencia. El estudio integral de *Cellulomonas* sp. B6 y *Paenibacillus xylanivorans* A59 permitió profundizar en la comprensión de los sistemas (hemi)celulolíticos bacterianos y en el desarrollo de formulaciones enzimáticas capaces de valorizar biomasas lignocelulósicas bajo un enfoque de bioeconomía circular.

A lo largo de esta tesis se desarrolló un cóctel enzimático a partir de *P. xylanivorans*, utilizando fuentes de carbono de bajo costo para su producción (E-PxST), que demostró ser una formulación efectiva para la hidrólisis de la hemicelulosa presente en diferentes tipos de biomasa lignocelulósica, en particular para la degradación de distintos tipos de xilanos y de β -glucanos presentes en el alimento animal regional. Asimismo, se evaluó la acción cooperativa entre la glucurono-xilanasas, PxXyn30_8 y las dos endo-xilanasas principales de la bacteria, PxXyn10A y PxXyn11B. En conjunto, estos resultados fueron relevantes para el diseño de cócteles enzimáticos sustentables y optimizados para distintos bioprocesos.

Los conocimientos generados en esta tesis consolidan las bases para el diseño de bioprocesos más eficientes, sustentables y ajustados a las particularidades de cada biomasa. Los resultados no solo evidencian el valor tecnológico de los recursos microbianos locales, sino que también proyectan un camino promisorio para el desarrollo de soluciones biológicas que fortalezcan una bio-agroindustria circular, resiliente y comprometida con la sostenibilidad ambiental y el desarrollo tecnológico responsable.

Bibliografía

A

- Abdeshahian P, Kadier A, Rai PK, da Silva SS (2020). Lignocellulose as a renewable carbon source for microbial synthesis of different enzymes. En Avinash P. Ingle, Anuj Kumar Chandel, and Silvio Silvério da Silva (Eds.) Lignocellulosic Biorefining Technologies, First Edition (pp. 185-202), John Wiley & Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119568858.ch9>
- Abdollahi MR, Ravindran V, Wester TJ, Ravindran G, Thomas DV (2013). Influence of pellet diameter and length on the quality of pellets and performance, nutrient utilisation and digestive tract development of broilers fed on wheat-based diets. British Poultry Science, 54(3), 337-345. <https://doi.org/10.1080/00071668.2013.780285>
- Abràmoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ (2004). Image processing with ImageJ. Biophotonics International, 11(7), 36-42.
- Adsul M, Sandhu SK, Singhania RR, Gupta R, Puri SK, Mathur A (2020). Designing a cellulolytic enzyme cocktail for the efficient and economical conversion of lignocellulosic biomass to biofuels. Enzyme and microbial technology, 133: 109442. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109442>
- Aftab U, Bedford MR (2018). The use of NSP enzymes in poultry nutrition: myths and realities. World's Poultry Science Journal, 74(2): 277-286. <https://doi.org/10.1017/S0043933918000272>
- Ahmed AAQ, Babalola OO, McKay T (2018). Cellulase-and xylanase-producing bacterial isolates with the ability to saccharify wheat straw and their potential use in the production of pharmaceuticals and chemicals from lignocellulosic materials. Waste and Biomass Valorization, 9(5), 765-775. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9849-5>
- Alongi M, Anese M (2021). Re-thinking functional food development through a holistic approach. Journal of functional foods, 81: 104466. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104466>
- Anderson I, Abt B, Lykidis A, Klenk HP, Kyrpides N, Ivanova N (2012). Genomics of aerobic cellulose utilization systems in actinobacteria. PLoS One, 7(6), e39331. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039331>
- Anderson P. (1995). Mutagenesis. Methods in Cell Biology, 48, 31-58. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)61382-5](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)61382-5)
- Andlar M, Rezić T, Mardetko N, Kracher D, Ludwig R, Santek B (2018). Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. Engineering in life sciences, 18: 768-778. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800039>
- Ansari M, Devi BM, Sarkar A, Chattopadhyay A, Satnami L, Balu P, Choudhary M, Shahid MA, Jailani AAK (2023). Microbial exudates as biostimulants: role in plant growth promotion and stress mitigation. Journal of Xenobiotics, 13(4), 572-603. <https://doi.org/10.3390/jox13040037>
- Arnal G, Bastien G, Monties N, Abot A, Anton Leberre V, Bozonnet S, O'Donohue M, Dumon C (2015). Investigating the function of an arabinan utilization locus isolated from a termite gut community. Applied and Environmental Microbiology, 81(1), 31-39. <https://doi.org/10.1128/AEM.02257-14>
- Aronsson A, Güler F, Petoukhov MV, Crennell SJ, Svergun DI, Linares-Pastén JA, Karlsson EN (2018). Structural insights of *RmXyn10A*—A prebiotic-producing GH10 xylanase with a non-conserved aglycone binding region. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 1866(2), 292-306. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.11.006>
- Ash C, Priest FG, Collins MD (1993). Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Antonie van Leeuwenhoek, 64: 253–60. <https://doi.org/10.1007/BF00873085>

Astolfi V, Astolfi AL, Mazutti MA, Rigo E, Di Luccio M, Camargo AF, Dalastra C, Kubeneck S, Fongaro G, Treichel H (2019). Cellulolytic enzyme production from agricultural residues for biofuel purpose on circular economy approach. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 42(5): 677-685. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02072-2>

B

Baghel RS, Reddy CRK, Singh RP (2021). Seaweed-based cellulose: Applications, and future perspectives. *Carbohydrate Polymers*, 267, 118241. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118241>

Bajpai P (2014). Xylan: occurrence and structure. En Bajpai P (Ed.) *Xylanolytic Enzymes*. Academic Press.

Baker JT, Duarte ME, Holanda DM, Kim SW (2021). Friend or foe? Impacts of dietary xylans, xylooligosaccharides, and xylanases on intestinal health and growth performance of monogastric animals. *Animals*, 11(3): 609. <https://doi.org/10.3390/ani11030609>

Balasubramaniam B, Park JH, Shanmugam S, Kim IH (2020). Influences of enzyme blend supplementation on growth performance, nutrient digestibility, fecal microbiota and meat-quality in grower-finisher pigs. *Animals*, 10: 386. <https://doi.org/10.3390/ani10030386>

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

Bampidis V, Azimonti G, Bastos MDL, Christensen H, Dusemund B, Durjava MF, Kouba M, López-Alonso M, López Puente S, Marcon F, Mayo B, Pechová A, Petkova M, Ramos F, Sanz Y, Villa RE, Woutersen R, Dierick N, Martelli G, Galobart J, Ortuño J, Anguita M (2022). Safety and efficacy of a feed additive consisting of endo-1, 4-beta-xylanase and endo-1, 3 (4)-beta-glucanase produced with *Talaromyces versatilis* IMI 378536 and DSM 26702 (ROVABIO® ADVANCE) for weaned piglets and pigs for fattening (ADISSEO France SAS). *EFSA Journal*, 20(5), e07251. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7251>

Batsalova T, Georgiev Y, Moten D, Teneva I, Dzhambazov B (2022). Natural xylooligosaccharides exert antitumor activity via modulation of cellular antioxidant state and TLR4. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18), 10430. <https://doi.org/10.3390/ijms231810430>

Benatti ALT, Polizeli M (2023). Lignocellulolytic biocatalysts: The main players involved in multiple biotechnological processes for biomass valorization. *Microorganisms*, 11(1), 162. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010162>

Bendtsen JD, Kierner L, Fausbøll A, Brunak S (2005). Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC microbiology*, 5(1), 58. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-58>

Berghout JAM, Venema P, Boom RM, van der Goot AJ (2015). Freeze-drying induces aggregation in lupin protein isolates. *Functionality-driven fractionation of lupin seeds*, 71. <https://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/fulltext/338830#page=71>

Bhagat DD, Dudhagara PR, Desai PV (2016). Statistical approach for pectinase production by *Bacillus firmus* SDB9 and evaluation of pectino-xylanolytic enzymes for pretreatment of kraft pulp. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 5(5): 396–406. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2016.5.5.396-406>

Bhalla A, Bansal N, Kumar S, Bischoff KM, Sani RK (2013). Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. *Bioresource technology*, 128, 751-759. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.145>

- Bhardwaj N, Kumar B, Verma P (2019). A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. *Bioresources and Bioprocessing*, 6(1): 1-36. <https://doi.org/10.1186/s40643-019-0276-2>
- Bhatia RK, Kumar R, Rathour RK, Kumar V, Sharma V, Rana N, Thakur S, Bhatt AK (2017). Enhancement of cellulose degradation potential of *Bacillus* sp. Hcb-21 through Mutagenesis. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 9(6): 257-265. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000374>
- Bilal M, Li D, Xie C, Yang R, Gu Z, Jiang D, Xu X, Wang P (2024). Valorization of wheat bran arabinoxylan: A review on nutritional and materials perspectives. *Grain & Oil Science and Technology*, 7(3), 196-208. <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2024.05.006>
- Blainski JML, da Rocha Neto AC, Schimidt EC, Voltolini JA, Rossi MJ, Di Piero RM (2018). Exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* induce biochemical and physiological alterations in tomato plant against bacterial spot. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(11), 4741-4753. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8946-0>
- Bohra V, Tikariha H, Dafale NA (2019). Genomically defined *Paenibacillus polymyxa* ND24 for efficient cellulase production utilizing sugarcane bagasse as a substrate. *Applied biochemistry and biotechnology*, 187: 266-281. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2820-5>
- Bouiche C, Boucherba N, Benallaoua S, Martinez J, Diaz P, Pastor FJ, Valenzuela SV (2020). Differential antioxidant activity of glucuronoxyloligosaccharides (UXOS) and arabinoxyloligosaccharides (AXOS) produced by two novel xylanases. *International Journal of Biological Macromolecules*, 155, 1075-1083. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.073>
- Bouras G, Judd LM, Edwards RA, Vreugde S, Stinear TP, Wick RR (2024). How low can you go? Short-read polishing of Oxford Nanopore bacterial genome assemblies. *Microbial Genomics*, 10(6), 001254. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.001254>
- Brebu M, Vasile C (2010). Thermal degradation of lignin—a review. *Cellulose Chemistry and Technology*, 44(9), 353.
- Briganti L, Capetti C, Pellegrini VO, Ghio S, Campos E, Nascimento AS, Polikarpov I (2021). Structural and molecular dynamics investigations of ligand stabilization via secondary binding site interactions in *Paenibacillus xylanivorans* GH11 xylanase. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 1557-1566. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.03.002>
- Brodeur G, Yau E, Badal K, Collier J, Ramachandran KB, Ramakrishnan S (2011). Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *Enzyme research*, 2011(1), 787532. <https://doi.org/10.4061/2011/787532>
- Bussamra BC, Freitas S, da Costa AC (2015). Improvement on sugar cane bagasse hydrolysis using enzymatic mixture designed cocktail. *Bioresource Technology*, 187: 173-181. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.117>

C

- Cai S, Li J, Hu FZ, Zhang K, Luo Y, Janto B, Boissy R, Ehrlich G, Dong X (2010). *Cellulosilyticum ruminicola*, a newly described rumen bacterium that possesses redundant fibrolytic-protein-encoding genes and degrades lignocellulose with multiple carbohydrate-borne fibrolytic enzymes. *Applied and environmental microbiology*, 76(12), 3818-3824. <https://doi.org/10.1128/AEM.03124-09>
- Campos E, Negro Alvarez MJ, Sabaris di Lorenzo G, Gonzalez S, Rorig M, Talia P, Grasso DH, Sáez F, Manzanares Secades P, Ballesteros Perdices M, Cataldi AA (2014). Purification and characterization of a GH43 β -xylosidase from *Enterobacter* sp. identified and cloned from forest soil bacteria. *Microbiological Research*, 169: 213-220. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.06.004>

- Cantoia A, Lucero DA, Ceccarelli EA, Rosano GL (2021). From the notebook to recombinant protein production in *Escherichia coli*: Design of expression vectors and gene cloning. *Methods in enzymology*, 659, 19-35. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2021.07.008>
- Caro MDP, Venturuzzi AL, Moschen S, Salazar SM, Díaz-Ricci JC, Asurmendi S (2022). A fungal protease named AsES triggers antiviral immune responses and effectively restricts virus infection in arabidopsis and *Nicotiana benthamiana* plants. *Annals of Botany*, 129(5), 593-606. <https://doi.org/10.1093/aob/mcac013>
- Caseiro C, Dias JNR, de Andrade Fontes CMG, Bule P (2022). From cancer therapy to winemaking: The molecular structure and applications of β -glucans and β -1, 3-glucanases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6): 3156. <https://doi.org/10.3390/ijms23063156>
- Cattaneo C, Spertino S, Boatti L, Icardi S, Cavaletto M (2014). Protein fingerprinting in the choice of cellulase cocktails for the conversion of lignocellulosic biomass. *Analytical Methods*, 6(12), 4046-4055. <https://doi.org/10.1039/C3AY42221F>
- Chakdar, H, Kumar M, Pandiyan K, Singh A, Nanjappan K, Kashyap PL, Srivastava AK (2016). Bacterial xylanases: biology to biotechnology. 3 *Biotech*, 6: 150. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0457-z>
- Chakladar S, Abadi SSK, Bennet AJ (2014). A mechanistic study on the α -N-acetylgalactosaminidase from *E. meningosepticum*: a family 109 glycoside hydrolase. *MedChemComm*, 5(8), 1188-1192. <https://doi.org/10.1039/C4MD00104D>
- Chantorn S, Aekkawatchai N, Chunya P, Oontawee S, Khumphai P, Charoenrat T (2021). Lignocellulolytic bacteria isolated from organic rice field soils for enzyme production using agricultural wastes: Screening, medium optimization, and co-culture. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 33: 101988. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.101988>
- Chauhan AK (2020). Biofuel: types and process overview. In *Nanomaterials in Biofuels Research* (Ed.) (pp. 1- 28). Singapore: Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-9333-4_1
- Chen HJ, Li S, Cai AH, Xie FW, Lin XY, Lin SQ (2012). Effects of xyloligosaccharides used as a soil conditioner on soil microorganism and enzyme. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 6:2870–2874.
- Choct M (2015). Feed non-starch polysaccharides for monogastric animals: classification and function. *Animal Production Science*, 55(12): 1360-1366. <https://doi.org/10.1071/AN15276>
- Choi H, Kim SW (2023). Characterization of β -glucans from cereal and microbial sources and their roles in feeds for intestinal health and growth of nursery pigs. *Animals*, 13(13): 2236. <https://doi.org/10.3390/ani13132236>
- Christiansen L, Pathiraja D, Bech PK, Schultz-Johansen M, Hennessy R, Teze D, Choi IG, Stougaard P (2020). A multifunctional polysaccharide utilization gene cluster in *Colwellia echini* encodes enzymes for the complete degradation of κ -carrageenan, ι -carrageenan, and hybrid β/κ -carrageenan. *mSphere*, 5(1), e00792-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.0079219>
- Christopherson MR, Suen G, Bramhacharya S, Jewell KA, Aylward FO, Mead D, Brumm PJ (2013). The genome sequences of *Cellulomonas fimi* and “*Cellvibrio gilvus*” reveal the cellulolytic strategies of two facultative anaerobes, transfer of “*Cellvibrio gilvus*” to the genus *Cellulomonas*, and proposal of *Cellulomonas gilvus* sp. nov. *PLOS ONE*, 8(1), e53954. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053954>
- Chukwuma OB, Rafatullah M, Tajarudin HA, Ismail N (2021). A review on bacterial contribution to lignocellulose breakdown into useful bio-products. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(11): 6001. <https://doi.org/10.3390/ijerph18116001>

- Colantonio AG, Werner SL, Brown M (2020). The effects of prebiotics and substances with prebiotic properties on metabolic and inflammatory biomarkers in individuals with type 2 diabetes mellitus: a systematic review. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 120(4): 587-607. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2018.12.013>
- Colonia BSO, Woiciechowski AL, Malanski R, Letti LAJ, Soccol CR (2019). Pulp improvement of oil palm empty fruit bunches associated to solid-state biopulping and biobleaching with xylanase and lignin peroxidase cocktail produced by *Aspergillus* sp. LPB-5. *Bioresource technology*, 285: 121361. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121361>
- Couturier M y Berrin JG. (2013) The Saccharification Step: The Main Enzymatic Components. En Faraco V. (Ed) (pp. 93-110) *Lignocellulose Conversion*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-37861-4_5
- Crooks C, Long L, St John FJ (2020). Ca Xyn30B from the solventogenic bacterium *Clostridium acetobutylicum* is a glucuronic acid-dependent endoxylanase. *BMC Research Notes*, 13(1), 281. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-05091-5>
- Cruz-Guerrero A, Gómez-Ruiz L, Guzmán-Rodríguez F (2022). Xylooligosaccharides (XOS). En *Handbook of Food Bioactive Ingredients: Properties and Applications* (Ed.) (pp. 1-28). Cham: Springer International Publishing.
- Curry TM, Peña MJ, Urbanowicz BR (2023). An update on xylan structure, biosynthesis, and potential commercial applications. *The Cell Surface*, 9: 100101. <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2023.100101>
- Cuskin F, Flint JE, Gloster TM, Morland C, Baslé A, Henrissat B, Coutinho PM, Strazzulli A, Solovyova AS, Davies GJ, Gilbert HJ (2012). How Nature can exploit nonspecific catalytic and carbohydrate binding modules to create enzymatic specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109: 20889-20894. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212034109>

D

- Da Silva ASA, Inoue H, Endo T, Yano S, Bon EP (2010). Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Bioresource technology*, 101(19), 7402-7409. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.008>
- da Silva Pereira L, Salomón AL, Bermudez VAC, Rius SP (2025). Bioactive proteins from *Trichoderma* for the control of *Fusarium*: Evaluation of antagonist efficacy and potential for agronomic application. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 103628. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2025.103628>
- Daly P, van Munster JM, Blythe MJ, Ibbett R, Kokolski M, Gaddipati S, Lindquist E, Singan VR, Barry KW, Lipzen A, Ngan CY, Petzold CJ, Chan LJG, Pullan ST, Delmas S, Waldron PR, Grigoriev IV, Tucker GA, Simmons BA, Archer DB (2017). Expression of *Aspergillus niger* CAZymes is determined by compositional changes in wheat straw generated by hydrothermal or ionic liquid pretreatments. *Biotechnology for Biofuels*, 10, 35. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0700-9>
- Das A, Ghosh P, Paul T, Ghosh U, Pati BR, Mondal KC (2016). Production of bioethanol as useful biofuel through the bioconversion of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *3 Biotech.*, 6(1):70. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0385-y>
- Dashora K, Gattupalli M, Javed Z, Tripathi GD, Sharma R, Mishra M, Bhargava A, Srivastava S (2022). Leveraging multiomics approaches for producing lignocellulose degrading enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79(2): 132. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04176-7>
- De Coster W, Rademakers R (2023). NanoPack2: population-scale evaluation of long-read sequencing data. *Bioinformatics*, 39(5), btad311. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btad311>

- de Mello Capetti CC, de Oliveira Arnoldi Pellegrini V, Vacilotto MM, da Silva Curvelo AA, Falvo M, Guimaraes FEG, Ontañón OM, Campos E, Polikarpov I (2023b). Evaluation of hydrothermal and alkaline pretreatment routes for xylooligosaccharides production from sugar cane bagasse using different combinations of recombinant enzymes. *Food and Bioprocess Technology*, 17(7), 1752-1764. <https://doi.org/10.1007/s11947-023-03226-7>
- de Mello Capetti CC, Ontañón O, Navas LE, Campos E, Simister R, Dowle A, Vizoná Liberato M, de Oliveira Arnoldi Pellegrini V, Gómez LD, Polikarpov I (2024). Sugarcane bagasse derived xylooligosaccharides produced by an arabinofuranosidase/xylobiohydrolase from *Bifidobacterium longum* in synergism with xylanases. *Carbohydrate Polymers*, 339, 122248. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.122248>
- de Mello Capetti CC, Pellegrini VOA, Santo MCE, Cortez AA, Falvo M, da Silva Curvelo AA, Campos E, Filgueiras JG, Guimarães FEG, de Azevedo ER, Polikarpov I (2023a). Enzymatic production of xylooligosaccharides from corn cobs: Assessment of two different pretreatment strategies. *Carbohydrate Polymers*, 299, 120174. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120174>
- Den W, Sharma VK, Lee M, Nadadur G, Varma RS (2018). Lignocellulosic Biomass Transformations via Greener Oxidative Pretreatment Processes: Access to Energy and Value-Added Chemicals. *Frontiers in chemistry*, 6: 141. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00141>
- Denaday F, Escartín C, Parodi G, Spinazzola E (2020). Actualización del balance de biomasa con fines energéticos en la Argentina. Colección Documentos Técnicos N.º 19. En FAO (Ed.). <https://doi.org/10.4060/ca8764es>
- Dewangan BP, Gupta A, Sah RK, Das S, Kumar S, Bhattacharjee S, Pawar PAM (2023). Xylobiose treatment triggers a defense-related response and alters cell wall composition. *Plant Molecular Biology*, 113(6), 383-400. <https://doi.org/10.1007/s11103-023-01391-z>
- Di Marco E, Soraire PM, Romero CM, Villegas LB, Martínez MA (2017). Raw sugarcane bagasse as carbon source for xylanase production by *Paenibacillus* species: a potential degrader of agricultural wastes. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(23), 19057-19067. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9494-3>
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW (2020). InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Domingues SZ, Timmers LFS, Granada CE (2022). Cellulase production by bacteria is a strain-specific characteristic with a high biotechnological potential. A review of cellulosome of highly studied strains. *Cellulose*, 29(15), 8065-8083. <https://doi.org/10.1007/s10570-022-04790-5>
- Drula E, Garron M-L, Dogan S, Lombard V, Henrissat B, Terrapon N (2022). The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. *Nucleic Acids Research*, 50, D571–D577. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1045>
- Dung NV, Vetayasuporn S, Kamio Y, Abe N, Kaneko J, Izaki K (1993). Purification and properties of β -1,4-xylanases 2 and 3 from *Aeromonas caviae* W-61. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 57(10), 1708-1712. <https://doi.org/10.1271/bbb.57.1708>
- DuPont (2017) Accellerase. Disponible en www.accelerated.dupont.com/
- Duque A, Manzanares P, Ballesteros M (2017). Extrusion as a pretreatment for lignocellulosic biomass: Fundamentals and applications. *Renewable Energy*, 114, 1427-1441. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.06.050>

E

- Ejaz U, Sohail M, Ghanemi A (2021). Cellulases: from bioactivity to a variety of industrial applications. *Biomimetics*, 6(3): 44. <https://doi.org/10.3390/biomimetics6030044>
- Elberson MA, Malekzadeh F, Yazdi MT, Kameranpour N, Noori-Daloii MR, Matte MH, Shahamat M, Colwell RR, Sowers KR (2000). *Cellulomonas persica* sp. nov. and *Cellulomonas iranensis* sp. nov., mesophilic cellulose-degrading bacteria isolated from forest soils. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50(3), 993-996. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-3-993>
- Ellilä S, Bromann P, Nyyssönen M, Itävaara M, Koivula A, Paulin L, Kruus K (2019). Cloning of novel bacterial xylanases from lignocellulose-enriched compost metagenomic libraries. *AMB Express*, 9(1), 124. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0847-9>
- Esquena-Moret J (2022). A Review of Xyloglucan: Self-Aggregation, Hydrogel Formation, Mucoadhesion and Uses in Medical Devices. *Macromol*, 2: 562-590. <https://doi.org/10.3390/macromol2040037>

F

- Fatma S, Hameed A, Noman M, Ahmed T, Shahid M, Tariq M, Imran S, Tabassum R (2018). Lignocellulosic biomass: a sustainable bioenergy source for the future. *Protein and Peptide Letters*, 25(2): 148-163. <https://doi.org/10.2174/0929866525666180122144504>
- Fernández-Calvo P, López G, Martín-Dacal M, Aitouguinane M, Carrasco-López C, González-Bodí S, Bacete L, Mélida H, Sánchez-Vallet A, Molina, A. (2024). Leucine rich repeat-malectin receptor kinases IGP1/CORK1, IGP3 and IGP4 are required for arabidopsis immune responses triggered by β -1, 4-D-Xylo-oligosaccharides from plant cell walls. *The Cell Surface*, 11, 100124. <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2024.100124>
- Ferreira VC, Barroso TLCT, Castro LEN, Da Rosa RG, de Siqueira Oliveira L (2023). An overview of prebiotics and their applications in the food industry. *European Food Research and Technology*, 249(11): 2957-2976. <https://doi.org/10.1007/s00217-023-04341-7>
- Forsberg Z, Sørli M, Petrović D, Courtade G, Achmann FL, Vaaje-Kolstad G, Bissaro B, Røhr AK, Eijsink VG (2019). Polysaccharide degradation by lytic polysaccharide monooxygenases. *Current Opinion in Structural Biology*, 59, 54-64. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.02.015>
- Fu J, Zhao J, Shang H (2024). Functions and mechanisms of nonstarch polysaccharides in monogastric animal production. *International Journal of Biological Macromolecules*, 281, 136488. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.136488>

G

- Gallardo O, Fernández-Fernández M, Valls C, Valenzuela SV, Roncero MB, Vidal T, Díaz P, Pastor FJ (2010). Characterization of a family GH5 xylanase with activity on neutral oligosaccharides and evaluation as a pulp bleaching aid. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(18), 6290-6294. <https://doi.org/10.1128/AEM.00871-10>
- Garai D, Kumar V (2013). Response surface optimization for xylanase with high volumetric productivity by indigenous alkali tolerant *Aspergillus candidus* under submerged cultivation. *3 Biotech*, 3, 127-136. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0077-1>
- Garrido MM, Piccinni FE, Landoni M, Peña MJ, Topalian J, Couto A, Wirth SA, Urbanowicz BR, Campos E (2022). Insights into the xylan degradation system of *Cellulomonas* sp. B6: biochemical characterization of rCsXyn10A and rCsAbf62A. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(13): 5035-5049. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12061-3>

- Gastelum-Arellanez A, Paredes-López O, Olalde-Portugal V (2014). Extracellular endoglucanase activity from *Paenibacillus polymyxa* BEb-40: production, optimization and enzymatic characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30: 2953-2965. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1723-z>
- Gautério GV, Amorim C, Silvério SC, Cardoso BB, Ballesteros LF, Alves JI, Alcina Pereira M, Silva SP, Coelho E, Coimbra MA, Juliano Kalil S, Rodrigues LR (2022). Hydrolysates containing xylooligosaccharides produced by different strategies: Structural characterization, antioxidant and prebiotic activities. *Food Chemistry*, 391, 133231. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133231>
- Gavande PV, Goyal A (2023). Endo- β -1, 4-glucanase. En *Glycoside hydrolases* (Ed.) (pp. 55-76). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91805-3.00001-0>
- Ghio S, Bradanini MB, Garrido MM, Ontañón OM, Piccinni FE, de Villegas RMD, Talia PM, Campos E (2020). Synergic activity of Cel8Pa β -1, 4 endoglucanase and Bg1Pa β -glucosidase from *Paenibacillus xylanivorans* A59 in beta-glucan conversion. *Biotechnology Reports*, 28: e00526. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00526>
- Ghio S, Insani EM, Piccinni FE, Talia PM, Grasso DH, Campos E (2016). GH10 XynA is the main xylanase identified in the crude enzymatic extract of *Paenibacillus* sp. A59 when grown on xylan or lignocellulosic biomass. *Microbiological Research*, 186: 16–26. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.02.006>
- Ghio S, Martinez Cáceres AI, Talia P, Grasso DH, Campos E (2015). Draft genome sequence of cellulolytic and xylanolytic *Paenibacillus* sp. A59, isolated from decaying forest soil from Patagonia, Argentina. *Genome Announcements*, 3(5) 10-1128. <https://doi.org/10.1128/genomea.01233-15>
- Ghio S, Ontañón O, Piccinni FE, Marrero Díaz de Villegas R, Talia P, Grasso DH, Campos E (2018). *Paenibacillus* sp. A59 GH10 and GH11 extracellular endoxylanases: application in biomass bioconversion. *BioEnergy Research*, 11: 174-190. <https://doi.org/10.1007/s12155-017-9887-7>
- Ghio S, Sauka DH, Ferrari AE, Piccini FE., Ontañón OM, Campos E (2019). *Paenibacillus xylanivorans* sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from decaying forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(12): 3818-3823. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003686>
- Giummarella N, Pu Y, Ragauskas AJ, Lawoko M (2019). A critical review on the analysis of lignin carbohydrate bonds. *Green Chemistry*, 21(7), 1573-1595. <https://doi.org/10.1039/C8GC03606C>
- Golan G, Shallom D, Teplitsky A, Zaide G, Shulami S, Baasov T, Stojanoff V, Thompson A, Shoham Y, Shoham G (2004). Crystal structures of *Geobacillus stearothermophilus* α -glucuronidase complexed with its substrate and products: mechanistic implications. *Journal of Biological Chemistry*, 279(4), 3014–3024. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310098200>
- Grady EN, MacDonald J, Liu L, Richman A, Yuan ZC (2016). Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microbial Cell Factories*, 15: 1-18. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0603-7>
- Grondin JM, Tamura K, Déjean G, Abbott DW, Brumer H (2017). Polysaccharide utilization loci: fueling microbial communities. *Journal of Bacteriology*, 199(15): 10-1128. <https://doi.org/10.1128/jb.00860-16>
- Guo Y, Gao Z, Xu J, Chang S, Wu B, He B (2018). A family 30 glucurono-xylanase from *Bacillus subtilis* LC9: expression, characterization and its application in Chinese bread making. *International Journal of Biological Macromolecules*, 117, 377-384. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.143>

- Gupta GK, Dixit M, Kapoor RK, Shukla P (2022). Xylanolytic enzymes in pulp and paper industry: new technologies and perspectives. *Molecular Biotechnology*, 64(2), 130-143. <https://doi.org/10.1007/s12033-021-00396-7>
- Gupta P, Samant K, Sahu A (2012). Isolation of Cellulose-Degrading Bacteria and Determination of Their Cellulolytic Potential. *International Journal of Microbiology*, 1, 578925. <https://doi.org/10.1155/2012/578925>
- Gupta PK, Raghunath SS, Prasanna DV, Venkat P, Shree V, Chithananthan C, Choudhary S, Surender K y Geetha K (2019). An Update on Overview of Cellulose, Its Structure and Applications. En *IntechOpen*, Rodriguez Pascual Alejandro y Eugenio Martin Maria E. (Eds.) (pp. 59-79). Cellulose.
- Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G (2013). QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072-1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Gutiérrez-Rojas I, Moreno-Sarmiento N, Montoya D (2015). Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32 (1): 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.10.009>

H

- Hanahan D (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology*, 166, 557-580. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8)
- Hankin L, Anagnostakis SL (1977). Solid media containing carboxymethylcellulose to detect Cx cellulase activity of micro-organisms. *Microbiology*, 98(1), 109-115. <https://doi.org/10.1099/00221287-98-1-109>
- Hatayama K, Esaki K, Ide T (2013). *Cellulomonas soli* sp. nov. and *Cellulomonas oligotrophica* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 60-65. <https://doi.org/10.1099/ijls.0.038364-0>
- He J, Han W, Wang J, Qian Y, Saito M, Bai W, Song J, Lv G (2022). Functions of oligosaccharides in improving tomato seeding growth and chilling resistance. *Journal of Plant Growth Regulation*, 41(2): 535-545. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10319-0>
- Hero JS, Pisa JH, Raimondo EE, Martínez MA (2021). Proteomic analysis of secretomes from *Bacillus* sp. AR03: characterization of enzymatic cocktails active on complex carbohydrates for xylooligosaccharides production. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 51(9), 871-880. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1870136>
- Himmel ME (2009). Biomass recalcitrance: deconstructing the plant cell wall for bioenergy (pp. xviii+-505). <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9781444305418>
- Houfani AA, Anders N, Spiess AC, Baldrian P, Benallaoua S (2020). Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars– a review. *Biomass and Bioenergy*, 134(105481): 105481. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105481>
- Hrmova M, Stratilová B, Stratilová E (2022). Broad specific xyloglucan: xyloglucosyl transferases are formidable players in the re-modelling of plant cell wall structures. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3): 1656. <https://doi.org/10.3390/ijms23031656>
- Huang Y, Niu B, Gao Y, Fu L, Li W (2010). CD-HIT suite: a web server for clustering and comparing biological sequences. *Bioinformatics*, 26, 680-682. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq003>
- Hwang SJ, Lee JH (2023). Comparison of antioxidant activities expressed as equivalents of standard antioxidant. *Food Science and Technology*, 43, e121522. <https://doi.org/10.1590/fst.121522>

Hyun YJ, Kim B, Kim DH (2012). Cloning and characterization of ginsenoside Ra1-hydrolyzing beta-D-xylosidase from *Bifidobacterium breve* K-110. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(4), 535-540. <https://doi.org/10.4014/jmb.1110.10001>

Ilić N, Davidović S, Milić M, Rajilić-Stojanović M, Pecarski D, Ivančić-Šantek M, Mihajlovski K, Dimitrijević-Branković S (2023). Valorization of lignocellulosic wastes for extracellular enzyme production by novel Basidiomycetes: screening, hydrolysis, and bioethanol production. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 13(18): 17175-17186. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-02145-x>

I

Iram A, Cekmecelioglu D, Demirci A (2020). Ideal feedstock and fermentation process improvements for the production of lignocellulolytic enzymes. *Processes*, 9(1): 38. <https://doi.org/10.3390/pr9010038>

Ishihama Y, Oda Y, Tabata T, Sato T, Nagasu T, Rappsilber J, Mann M (2005). Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per proteins. *Molecular and Cellular Proteomics*, 4(9): 1265-1272. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500061-MCP200>

Ismail SA, Nour SA, Hassan AA (2022). Valorization of corn cobs for xylanase production by *Aspergillus flavus* AW1 and its application in the production of antioxidant oligosaccharides and removal of food stain. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 41, 102311. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102311>

J

Jagtap S, Deshmukh RA, Menon S, Das S (2017). Xylooligosaccharides production by crude microbial enzymes from agricultural waste without prior treatment and their potential application as nutraceuticals. *Bioresource Technology*, 245, 283-288. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.174>

Jan N, Wani TA, Masoodi FA, Gani A, Naik HR (2021). Beta-Glucans. In *Food biopolymers: Structural, functional and nutraceutical properties* (Ed.) (pp. 93-125). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-27061-2_5

Javier PF, Óscar G, Sanz-Aparicio J, Díaz P (2007). Xylanases: molecular properties and applications. En Polaina J, MacCabe AP (Eds) (pp. 65-82). *Industrial enzymes*. Springer, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/1-4020-5377-0>

Jayasekara S y Ratnayake R (2019). Microbial cellulases: An overview and applications. En Rodriguez Pascual A y Eugenio Martín ME (Eds.). *Cellulose*. IntechOpen.

Jeyachandran S, Vibhute P, Kumar D, Ragavendran C (2024). Random mutagenesis as a tool for industrial strain improvement for enhanced production of antibiotics: a review. *Molecular Biology Reports*, 51(1), 19. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08975-4>

Jo JK, Ingale SL, Kim JS, Kim YW, Kim KH, Lohakare JD, Chae BJ (2012). Effects of exogenous enzyme supplementation to corn-and soybean meal-based or complex diets on growth performance, nutrient digestibility, and blood metabolites in growing pigs. *Journal of Animal Science*, 90: 3041–3048. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3430>

Johnson KL, Gidley MJ, Bacic A, Doblin MS (2018). Cell wall biomechanics: a tractable challenge in manipulating plant cell walls ‘fit for purpose’!. *Current Opinion in Biotechnology*, 49: 163-171. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.08.013>

Joseleau JP, Pérez S (2016). The plant cell walls: complex polysaccharide nano-composites.

Juturu V, Wu JC (2014). Microbial exo-xylanases: a mini review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(1): 81-92. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1042-8>

K

Kadowaki MA, Briganti L, Evangelista DE, Echevarría-Poza A, Tryfona T, Pellegrini VO, Nakayama DG, Dupree P, Polikarpov I (2021). Unlocking the structural features for the xylobiohydrolase activity of an unusual GH11 member identified in a compost-derived consortium. *Biotechnology and Bioengineering*, 118(10), 4052-4064. <https://doi.org/10.1002/bit.27880>

Keegstra K (2010). Plant cell walls. *Plant physiology*, 154: 483-486. <https://doi.org/10.1104/pp.110.161240>

Keen NT, Boyd C, Henrissat B (1996). Cloning and characterization of a xylanase gene from corn strains of *Erwinia chrysanthemi*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 9(7), 651-657. <https://doi.org/10.1094/MPMI-9-0651>

Kim Y, Baek J, Jang K, Kim J, Kim S, Mun D, Kim B, Kim Y, Par, Choe J, Song, M. (2017). Effects of dietary enzyme cocktail on growth performance, intestinal morphology, and nutrient digestibility of weaned pigs. *Korean Journal of Agricultural Science*, 44(4), 513-518.

Knob A, Terrasan CF, Carmona EC (2010). β -Xylosidases from filamentous fungi: an overview. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(3): 389-407. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0190-4>

Knudsen KEB (2014). Fiber and nonstarch polysaccharide content and variation in common crops used in broiler diets. *Poultry Science*, 93(9): 2380-2393. <https://doi.org/10.3382/ps.2014-03902>

Kohl M, Wiese S, Warscheid B (2011). Cytoscape: software for visualization and analysis of biological networks. En Hamacher M, Eisenacher M, Stephan C (Eds) *Data Mining in Proteomics. Methods in Molecular Biology*, vol 696. Humana Totowa, NJ, pp 291-303. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-987-1_18

Kolmogorov M, Yuan J, Lin Y, Pevzner PA (2019). Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nature biotechnology*, 37(5), 540-546. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0072-8>

Kongala SI, Kondreddy A (2023). A review on plant and pathogen derived carbohydrates, oligosaccharides and their role in plant's immunity. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 6, 100330. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2023.100330>

Kordala N, Walter M, Brzozowski B, Lewandowska M (2024). 2G-biofuel ethanol: an overview of crucial operations, advances and limitations. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14(3), 2983-3006. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02861-y>

Korsa G, Konwarh R, Masi C, Ayele A, Haile S (2023). Microbial cellulase production and its potential application for textile industries. *Annals of Microbiology*, 73(1): 13. <https://doi.org/10.1186/s13213-023-01715-w>

Krempel M, Griffin K, Khouryieh H (2019). Hydrocolloids as emulsifiers and stabilizers in beverage preservation. En *Preservatives and preservation approaches in beverages* (Ed.) (pp. 427-465). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816685-7.00013-6>

Kuhad RC, Deswal D, Sharma S, Bhattacharya A, Jain KK, Kaur A, Pletschke BI, Singh A, Karp M (2016). Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 55: 249-272. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.10.132>

- Kumar B, Bhardwaj N, Agrawal K, Chaturvedi V, Verma P (2020). Current perspective on pretreatment technologies using lignocellulosic biomass: An emerging biorefinery concept. *Fuel processing technology*, 199, 106244. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2019.106244>
- Kumar KS, Manimaran A, Permaul K, Singh S (2009). Production of β -xylanase by *Thermomyces lanuginosus* MC 134 mutant on corn cobs and its application in biobleaching of bagasse pulp. *Journal of bioscience and bioengineering*, 107, 494–498. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2008.12.020>
- Kumar R, Singh S, Singh OV (2008). Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(5), 377–391. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0327-8>
- Kumar R, Tabatabaei M, Karimi K, Sarvari Horvath I (2016). Recent updates on lignocellulosic biomass derived ethanol-A review. *Biofuel Research Journal*, 9: 347–356. <https://doi.org/10.18331/BRJ2016.3.1.4>
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

L

- Labourel A, Crouch LI, Brás JL, Jackson A, Rogowski A, Gray J, Yadav MP, Henrissat B, Fontes CMGA, Gilbert HJ, Najmudin S, Baslé A, Cuskin F (2016). The mechanism by which arabinoxylanases can recognize highly decorated xylans. *Journal of Biological Chemistry*, 291(42): 22149–22159. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.743948>
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lagaert S, Pollet A, Courtin CM, Volckaert G (2014). β -xylosidases and α -L-arabinofuranosidases: accessory enzymes for arabinoxylan degradation. *Biotechnology Advances*, 32: 316–332. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.005>
- Lambertz C, Garvey M, Klinger J, Heesel D, Klose H, Fischer R, Commandeur U (2014). Challenges and advances in the heterologous expression of cellulolytic enzymes: a review. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1): 135. <https://doi.org/10.1186/s13068-014-0135-5>
- Lan R, Li T, Kim IH (2017). Effects of xylanase supplementation on growth performance, nutrient digestibility, blood parameters, fecal microbiota, fecal score and fecal noxious gas emission of weaning pigs fed corn-soybean meal-based diet. *Animal Science Journal*, 88: 1398–1405. <https://doi.org/10.1111/asj.12771>
- Lante A, Canazza E, Tessari P (2023). Beta-glucans of cereals: Functional and technological properties. *Nutrients*, 15(9): 2124. <https://doi.org/10.3390/nu15092124>
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947–2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
- Larsbrink J, Thompson AJ, Lundqvist M, Gardner JG, Davies GJ, Brumer H (2014). A complex gene locus enables xyloglucan utilization in the model saprophyte *Cellvibrio japonicus*. *Molecular Microbiology*, 94(2), 418–433. <https://doi.org/10.1111/mmi.12776>
- Leadbeater DR, Oates NC, Bennett JP, Li Y, Dowle AA, Taylor JD, Sanchez Alponi J, Setchfield AT, Alessi AM, Helgason T, McQueen-Mason S, Bruce NC (2021). Mechanistic strategies of microbial communities regulating lignocellulose deconstruction in a UK salt marsh. *Microbiome*, 9(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00964-0>

- Leontakianakou S, Sundin A, Karlsson EN (2024). Characterization and interpretation of the reaction mechanism of a novel GH115 α -Glucuronidase from Flavobacteriaceae. ChemRxiv, 1-20. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv-2024-wmxtb>
- Li DD, Wang JL, Liu Y, Li YZ, Zhang Z (2021). Expanded analyses of the functional correlations within structural classifications of glycoside hydrolases. Computational and Structural Biotechnology Journal, 19: 5931-5942. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.10.039>
- Liang Q, Yuan M, Xu L, Lio E, Zhang F, Mou H, Secundo F (2022). Application of enzymes as a feed additive in aquaculture. Marine Life Science and Technology, 4(2), 208-221. <https://doi.org/10.1007/s42995-022-00128-z>
- Lisý M, Lisá H, Jecha D, Baláš M, Křižan P (2020). Characteristic properties of alternative biomass fuels. Energies, 13(6), 1448. <https://doi.org/10.3390/en13061448>
- Liu G, Gong H, Tang H, Meng Z, Wang Z, Cui W, Zhang H, Chen Y, Yang Y (2025). Enhanced lignocellulose degradation in *Bacillus subtilis* RL12019 through CRISPR/Cas9-Mediated chromosomal integration of ternary cellulase genes. International Journal of Biological Macromolecules, 306: 141727. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.141727>
- Liu J, Zhu J, Xu Q, Shi R, Liu C, Sun D, Liu W (2023). Functional identification of two novel carbohydrate-binding modules of glucuronoxylanase CrXyl30 and their contribution to the lignocellulose saccharification. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 16(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s13068-023-02290-7>
- Logan NA y De Vos P (2009). Genus *Bacillus*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 3. En The Firmicutes, 2nd edition. Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH y Whitman W (Eds.) (pp. 21-71). New York, USA: Springer.
- Loix C, Huybrechts M, Vangronsveld J, Gielen M, Keunen E, Cuypers A (2017). Reciprocal interactions between Cadmium-induced cell wall responses and oxidative stress in plants. Frontiers in Plant Science, 8: 1867. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01867>
- Lombard V, Ramulu HR, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. Nucleic Acids Research, 42: 490-495. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>
- Long L, Lin Q, Wang J, Ding S (2024). Microbial α -L-arabinofuranosidases: diversity, properties, and biotechnological applications. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 40(3). <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03882-z>
- Lopes AM, Ferreira Filho EX, Moreira LRS (2018). An update on enzymatic cocktails for lignocellulose breakdown. Journal Applied Microbiology, 125(3): 632-645. <https://doi.org/10.1111/jam.13923>
- Lopes AMM, Martins M, Goldbeck R (2021). Heterologous expression of lignocellulose-modifying enzymes in microorganisms: current status. Molecular Biotechnology, 63(3): 184-199. <https://doi.org/10.1007/s12033-020-00288-2>
- Lu H, Xue M, Nie X, Luo H, Tan Z, Yang X, Wang T (2023). Glycoside hydrolases in the biodegradation of lignocellulosic biomass. 3 Biotech, 13(12), 402. <https://doi.org/10.1007/s13205-023-03819-1>
- Lv Y, Liu X, Zhou S, Yu Q, Xu Y (2022). Microbial saccharification–biorefinery platform for lignocellulose. Industrial Crops and Products, 189, 115761. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115761>
- Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, Pretorius IS (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 66(3):506-77. <https://doi.org/10.1128/mmb.66.3.506-577.2002>

M

- MacWilliams MP, Liao MK (2006). Luria broth (LB) and Luria agar (LA) media and their uses protocol. ASM MicrobeLibrary. American Society for Microbiology, 2006, 1-4. <https://asm.org/getattachment/5d82aa34-b514-4d85-8af3-aeabe6402874/lb-luria-agar-protocol-3031.html>
- Madeira F, Pearce M, Tivey AR, Basutkar P, Lee J, Edbali O, Madhusoodanan N, Kolesnikov A, Lopez R (2022). Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. Nucleic Acids Research, 50(W1), W276-W279. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac240>
- Maehara T, Yagi H, Sato T, Ohnishi-Kameyama M, Fujimoto Z, Kamino K, Kitamura Y, St John F, Yaoi K, Kaneko S (2018). GH30 glucuronoxylan-specific xylanase from *Streptomyces turgidiscabies* C56. Applied and Environmental Microbiology, 84(4), e01850-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01850-17>
- Mafa MS, Pletschke BI, Malgas S (2021). Defining the frontiers of synergism between cellulolytic enzymes for improved hydrolysis of lignocellulosic feedstocks. Catalysts, 11(11), 1343. <https://doi.org/10.3390/catal11111343>
- Mäkelä MR, Mansouri S, Wiebenga A, Rytioja J, de Vries RP, Hildén KS (2016). *Penicillium subrubescens* is a promising alternative for *Aspergillus niger* in enzymatic plant biomass saccharification. New Biotechnol 33(6) 834-841. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.07.014>
- Malgas S, Mafa MS, Mathibe BN, Pletschke BI (2021). Unraveling synergism between various GH family xylanases and debranching enzymes during hetero-xylan degradation. Molecules, 26(22): 6770. <https://doi.org/10.3390/molecules26226770>
- Malgas S, Mafa MS, Mkabayi L, Pletschke BI (2019). A mini review of xylanolytic enzymes with regards to their synergistic interactions during hetero-xylan degradation. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 35(12), 187. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2765-z>
- Mankar AR, Pandey A, Modak A, Pant KK (2021). Pretreatment of lignocellulosic biomass: A review on recent advances. Bioresource Technology, 334, 125235. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125235>
- Martínez AT, Speranza M, Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, Martínez MJ, Gutiérrez A, del Río JC (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. International Microbiology, 8(3): 195-204. <https://scielo.isciii.es/pdf/im/v8n3/07%20Martinez.pdf>
- Martín-Peláez S, Cano-Ibáñez N, Pinto-Gallardo M, Amezcua-Prieto C (2022). The impact of probiotics, prebiotics, and synbiotics during pregnancy or lactation on the intestinal microbiota of children born by cesarean section: a systematic review. Nutrients, 14(2): 341. <https://doi.org/10.3390/nu14020341>
- Martín-Sampedro R, Eugenio ME, García JC, López F, Villar JC, Díaz MJ (2012). Steam explosion and enzymatic pre-treatments as an approach to improve the enzymatic hydrolysis of Eucalyptus globulus. Biomass and Bioenergy, 42, 97-106. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.03.032>
- Matsuta Y, Ito M, Tohsato Y (2013). ECOH: an enzyme commission number predictor using mutual information and a support vector machine. Bioinformatics, 29(3), 365-372. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts700>
- McDonald AG, Boyce S, Tipton KF (2015). Enzyme classification and nomenclature. eLS, 1-11. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000710.pub3>

- McNamara JT, Morgan JLW, Zimmer J (2015). A molecular description of cellulose biosynthesis. *Annual Review of Biochemistry*, 84: 895-921. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-033930>
- Mélida H, Bacete L, Ruprecht C, Rebaque D, Del Hierro I, López G, Brunner F, Pfrengle F, Molina A (2020). Arabinoxylan-oligosaccharides act as damage associated molecular patterns in plants regulating disease resistance. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1210. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01210>
- Mello BL, Alessi AM, Riaño-Pachón DM, deAzevedo ER, Guimarães FE, Espirito Santo MC, McQueen-Mason S, Bruce NC, Polikarpov I (2017). Targeted metatranscriptomics of compost-derived consortia reveals a GH11 exerting an unusual exo-1, 4- β -xylanase activity. *Biotechnology for biofuels*, 10(1), 254. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0944-4>
- Mendonça M, Barroca M, Collins T (2023). Endo-1, 4- β -xylanase-containing glycoside hydrolase families: characteristics, singularities and similarities. *Biotechnology Advances*, 65, 108148. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108148>
- Meng D, Ying Y, Chen X, Lu M, Ning K, Wang L, Li F (2015). Distinct roles for carbohydrate-binding modules of glycoside hydrolase 10 (GH10) and GH11 xylanases from *Caldicellulosiruptor* sp. strain F32 in thermostability and catalytic efficiency. *Applied Environmental Microbiology*, 81: 2006-2014. <https://doi.org/10.1128/AEM.03677-14>
- Meresa BK, Ayimut KM, Weldemichael MY, Geberemedhin KH, Kassegn HH, Geberemikael BA, Egigu EM (2024). Carbohydrate elicitor-induced plant immunity: Advances and prospects. *Heliyon*, 10(15). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e34871>
- Merino D, Quilez-Molina AI, Perotto G, Bassani A, Spigno G, Athanassiou A (2022). A second life for fruit and vegetable waste: a review on bioplastic films and coatings for potential food protection applications. *Green Chemistry: An International Journal and Green Chemistry Resource: GC*, 24(12): 4703-4727. <https://doi.org/10.1039/D1GC03904K>
- Mihajlovski KR, Radovanović NR, Miljković MG, Šiler-Marinković S, Rajilić-Stojanović MD, Dimitrijević-Branković SI (2015). β -Amylase production from packaging-industry wastewater using a novel strain *Paenibacillus chitinolyticus* CKS 1. *RSC Advances*, 5(110): 90895-90903. <https://doi.org/10.1039/C5RA11964B>
- Miller GL (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mohapatra SB, Manoj N (2023). Overview of structure-function relationships of glucuronidases. In *Glycoside hydrolases* (Ed.) (pp. 255-278). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91805-3.00015-0>
- Mollakhalili-Meybodi N, Arab M, Nematollahi A, Khaneghah AM (2021). Prebiotic wheat bread: Technological, sensorial and nutritional perspectives and challenges. *Lwt*, 149: 111823. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111823>
- Molski M (2023). Theoretical study on the radical scavenging activity of gallic acid. *Heliyon*, 9(1), e12806. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e12806>
- Montiel C, Hernández-Meléndez O, Marques S, Gírio F, Tavares J, Ontañón O, Campos E, Bárzana E (2024). Application of In-House Xylanases as an addition to a commercial cellulase cocktail for the sustainable saccharification of pretreated blue Agave Bagasse used for bioethanol production. *Sustainability*, 16(16), 6722. <https://doi.org/10.3390/su16166722>
- Montiel C, Hernández-Meléndez O, Vivaldo-Lima E, Hernández-Luna M, Bárzana E (2016). Enhanced bioethanol production from blue agave bagasse in a combined extrusion-saccharification process. *Bioenergy Research*, 9(4), 1005-1014. <https://doi.org/10.1007/s12155-016-9747-x>

- Moraïs S, David YB, Bensoussan L, Duncan SH, Koropatkin NM, Martens EC, Flint HJ, Bayer EA (2016). Enzymatic profiling of cellosomal enzymes from the human gut bacterium, *Ruminococcus champanellensis*, reveals a fine-tuned system for cohesin-dockerin recognition. *Environmental Microbiology*, 18(2), 542-556. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13047>
- Moreira LRS, Filho EXF (2008). An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 79(2): 165-178. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1423-4>
- Morgan NK, Wallace A, Bedford MR, Choct M (2017). Efficiency of xylanases from families 10 and 11 in production of xylo-oligosaccharides from wheat arabinoxylans. *Carbohydrate Polymers*, 167, 290-296. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.063>
- Muddasar M, Beaucamp A, Culebras M, Collins MN (2022). Cellulose: Characteristics and applications for rechargeable batteries. *International Journal of Biological Macromolecules*, 219: 788-803. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.08.026>
- Munteanu IG, Apetrei C (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Myers P, Yousten AA (1978). Toxic activity of *Bacillus sphaericus* SSII-1 for mosquito larvae. *Infection and Immunity*, 19(3), 1047-1053. <https://doi.org/10.1128/iai.19.3.1047-1053.1978>

N

- Nakamura A, Tsukada T, Auer SM, Furuta TM, Wada M, Koivula A, Igarashi K, Samejima M (2013). The tryptophan residue at the active site tunnel entrance of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase Cel7A is important for initiation of degradation of crystalline cellulose. *Journal of Biological Chemistry*, 288: 13503-10. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.452623>
- Nargotra P, Sharma V, Lee YC, Tsai YH, Liu YC, Shieh CJ, Tsai ML, Dong CD, Kuo CH (2022). Microbial lignocellulolytic enzymes for the effective valorization of lignocellulosic biomass: a review. *Catalysts*, 13(1): 83. <https://doi.org/10.3390/catal13010083>
- Nishitani K, Nevins DJ (1991). Glucuronoxylan xylanohydrolase. A unique xylanase with the requirement for appendant glucuronosyl units. *Journal of Biological Chemistry*, 266(10), 6539-6543. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)38151-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)38151-1)
- Niyonzima FN (2021). Detergent-compatible fungal cellulases. *Folia Microbiologica*, 66(1): 25-40. <https://doi.org/10.1007/s12223-020-00838-w>
- Novozymes (2022a). Spirizyme en <https://biosolutions.novozymes.com/en/bioenergy/products/saccharification/spirizyme>
- Novozymes (2022b). Cellic Ctec3 Hs en <https://biosolutions.novozymes.com/en/bioenergy/products/biomass-conversion/cellicctec3-hs>
- Nurizzo D, Nagy T, Gilbert HJ, Davies GJ. (2002). The structural basis for catalysis and specificity of the *Pseudomonas cellulosa* alpha-glucuronidase, GlcA67A. *Structure*, 10(4): 547-56. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(02\)00742-6](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(02)00742-6)

O

- Ontañón O, Bedo S, Ghio S, Garrido M, Topalian J, Jahola D, Fehér A, Valacco P, Campos E, Fehér C (2021). Optimisation of xylanases production by two *Cellulomonas* strains and their use for biomass deconstruction. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105: 4577-4588. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11305-y>

- Ontañón OM, Alvarez A, Martín V, Topalian J, Navas LE, de Mello Capetti C, Cerón-Cucchi ME, Hracek VM, Faas L, Dowle AA, Polikarpov I, Cíancia M, Gómez LD, Campos E (2025). Xylanases from *Cellulomonas* Sp. B6 Produce Xylooligosaccharides with Prebiotic Potential from Agroindustrial By-Products. <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.5288551>
- Ontañón OM, Ghio S, de Villegas RMD, Garrido MM, Talia PM, Fehér C, Campos E (2019). A thermostable GH8 endoglucanase of *Enterobacter* sp. R1 is suitable for β -glucan deconstruction. Food Chemistry, 298, 124999. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.124999>
- Ontañón OM, Ghio S, Marrero Díaz de Villegas R, Piccinni FE, Talia PM, Cerutti ML, Campos E (2018). EcXyl43 β -xylosidase: molecular modeling, activity on natural and artificial substrates, and synergism with endoxylanases for lignocellulose deconstruction. Applied Microbiology and Biotechnology, 102(16), 6959-6971. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9138-7>
- Orencia-Trejo M, De la Torre-Zavala S, Rodríguez-García A, Avilés-Arnaut H, Gastelum-Arellanez A (2016). Assessing the performance of bacterial cellulases: the use of *Bacillus* and *Paenibacillus* strains as enzyme sources for lignocellulose saccharification. BioEnergy Research, 9: 1023-1033. <https://doi.org/10.1007/s12155-016-9797-0>
- Østby H, Hansen LD, Horn SJ, Eijsink VGH, Várnai A (2020). Enzymatic Processing of Lignocellulosic Biomass: Principles, Recent Advances and Perspectives. Journal Industrial Microbiology and Biotechnology, 47: 623–657. <https://doi.org/10.1007/s10295-020-02301-8>
- Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Parrello B, Shukla M, Vonstein V, Wattam AR, Xia F, Stevens R (2014). The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). Nucleic Acids Research, 42(D1), D206-D214. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1226>

P

- Padilha IQ, Valenzuela Mayorga SV, Grisi T, Díaz Lucea P, de Araújo D, Pastor Blasco FIJ (2014). A glucuronoxylan-specific xylanase from a new *Paenibacillus favisporus* strain isolated from tropical soil of Brazil. International Microbiology, 17(3), 175-184. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.220>
- Park CS, Kang DO, Choi NS (2012). Characterization of cellulase and xylanase from *Bacillus subtilis* NC1 isolated from environmental soil and determination of its genes. Journal of Life Science, 22(7), 912-919. <https://doi.org/10.5352/JLS.2012.22.7.912>
- Pasin TM, de Almeida PZ, de Almeida Scarcella AS, da Conceição Infante J, de Teixeira de Moraes Polizeli MDL (2020). Bioconversion of agro-industrial residues to second-generation bioethanol. In Biorefinery of alternative resources: Targeting green fuels and platform chemicals (pp. 23-47). Singapore: Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1804-1_2
- Pathak P, Bhardwaj NK, Singh AK (2014). Production of crude cellulase and xylanase from *Trichoderma harzianum* PPDDN10 NFCCI-2925 and its application in photocopier waste paper recycling. Applied Biochemistry and Biotechnology, 172: 3776–3797. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0758-9>
- Payne CM, Knott BC, Mayes HB, Hansson H, Himmel ME, Sandgren M, Stahlberg J, Beckham GT (2015). Fungal cellulases. Chemical Reviews, 115: 1308-1448. <https://doi.org/10.1021/cr500351c>
- Peciulyte A, Pisano M, de Vries RP, Olsson L (2017). Hydrolytic potential of five fungal supernatants to enhance a commercial enzyme cocktail. Biotechnology letters, 39(9): 1403-1411. <https://doi.org/10.1007/s10529-017-2371-9>
- Peleg I, Feldman K (2002). U.S. Patent No. 6,406,690. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

- Piccinni FE, Murua Y, Ghio S, Talia P, Rivarola M, Campos E (2016). Draft genome sequence of cellulolytic and xylanolytic *Cellulomonas* sp. strain B6 isolated from subtropical forest soil. *Genome Announcements*, 4: e00891-16. <https://doi.org/10.1128/genomea.00891-16>
- Piccinni FE, Ontañón OM, Ghio S, Sauka DH, Talia P, Rivarola M, Valacco MP, Campos E (2019). Secretome profile of *Cellulomonas* sp. B6 growing on lignocellulosic substrates. *Journal Applied Microbiology*, 126: 811-825. <https://doi.org/10.1111/jam.14176>
- Plouhinec L, Bonnin E, Kielbasa M, Armengaud J, Neugnot V, Berrin JG, Lafond M (2024). A time-course analysis of *Aspergillus terreus* secretomes reveals the importance of pectin-degrading enzymes to increase the digestibility of soybean meal. *Applied and Environmental Microbiology*, 90(9), e02153-23. <https://doi.org/10.1128/aem.02153-23>
- Plouhinec L, Neugnot V, Lafond M, Berrin JG (2023). Carbohydrate-active enzymes in animal feed. *Biotechnology Advances*, 65, 108145. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108145>
- Plouhinec L, Zhang L, Pillon A, Haon M, Grisel S, Navarro D, Black I, Neugnot V, Azadi P, Urbanowicz B, Berrin JG, Lafond M (2025). Unlocking soybean meal pectin recalcitrance using a multi-enzyme cocktail approach. *Scientific Reports*, 15(1), 1716. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-83289-4>
- Pollet A, Delcour JA, Courtin CM (2010). Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(3): 176-91. <https://doi.org/10.3109/07388551003645599>
- Ponce-Noyola T, De la Torre M (1995). Isolation of a high-specific-growth-rate mutant of *Cellulomonas flavigena* on sugar cane bagasse. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 42(5), 709-712. <https://doi.org/10.1007/BF00171949>
- Poria V, Saini JK, Singh S, Nain L, Kuhad RC (2020). Arabinofuranosidases: Characteristics, microbial production, and potential in waste valorization and industrial applications. *Bioresource Technology*, 304(123019): 123019. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123019>
- Postemsky PD, Bidegain MA, González-Matute R, Figlas ND, Cubitto MA (2017). Pilot-scale bioconversion of rice and sunflower agro-residues into medicinal mushrooms and laccase enzymes through solid-state fermentation with *Ganoderma lucidum*. *Bioresource Technology*, 231, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.064>
- Pring S, Kato H, Imano S, Camagna M, Tanaka A, Kimoto H, Chen P, Shrotri A, Kobayashi H, Fukuoka A, Saito M, Suzuki T, Terauchi R, Sato I, Chiba S, Takemoto D (2023). Induction of plant disease resistance by mixed oligosaccharide elicitors prepared from plant cell wall and crustacean shells. *Physiologia Plantarum*, 175(5), e14052. <https://doi.org/10.1111/ppl.14052>
- Pršić J, Ongena M (2020). Elicitors of plant immunity triggered by beneficial bacteria. *Frontiers in Plant Science*, 11, 594530. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.594530>
- Puchart V, Šuchová K, Biely P (2021). Xylanases of glycoside hydrolase family 30—An overview. *Biotechnology Advances*, 47: 107704. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107704>
- Puja BK, Mallick S, Dey T, Chanda S, Ghosh S (2025). Xylooligosaccharide recovery from sugarcane bagasse using β -xylosidase-less xylanase, *BsXln1*, produced by *Bacillus stercoris* DWS1: Characterization, antioxidant potential and influence on probiotics growth under anaerobic conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 285, 138307. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.138307>
- Putro JN, Soetaredjo FE, Lin SY, Ju YH, Ismadji S (2016). Pretreatment and conversion of lignocellulose biomass into valuable chemicals. *RSC Advances*, 6(52): 46834-46852. <https://doi.org/10.1039/C6RA09851G>

R

- Rakitin AL, Ermakova AY, Ravin NV (2015). Novel endoxylanases of the moderately thermophilic polysaccharide-degrading bacterium *Melioribacter roseus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(9), 1476-1484. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1501.01061>
- Rasool G, Irfan M (2024). The role of microbial diversity in lignocellulosic biomass degradation: A biotechnological perspective. *ChemBioEng Reviews*, 11(3): 613-635. <https://doi.org/10.1002/cben.202300073>
- Robert X, Gouet P (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Research*, 42(Web Server issue), W320-4. <https://doi.org/10.1093/nar/gku316>
- Rodionov DA, Rodionova IA, Rodionov VA, Arzamasov AA, Zhang K, Rubinstein GM, Tanwee TNN, Bing RG, Crosby JR, Nookaew I, Basen M, Brown SD, Wilson CM, Klingeman DM, Poole II FL, Zhang Y, Kelly RM, Adams MW (2021). Transcriptional regulation of plant biomass degradation and carbohydrate utilization genes in the extreme thermophile *Caldicellulosiruptor bescii*. *Msystems*, 6(3), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/msystems.01345-20>
- Rodrigues Mano MC, Neri-Numa IA, da Silva JB, Paulino BN, Pessoa MG, Pastore GM (2018). Oligosaccharide biotechnology: an approach of prebiotic revolution on the industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(1): 17-37. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8564-2>
- Rodríguez-Fernández DE, Parada JL, Medeiros AB, de Carvalho JC, Lacerda LG, Rodríguez-León JA, Soccol CR (2013). Concentration by ultrafiltration and stabilization of phytase produced by solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 48(2), 374-379. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.12.021>
- Rogowski A, Baslé A, Farinas CS, Solovyova A, Mortimer JC, Dupree P, Hilbert HJ, Bolam DN (2014). Evidence that GH115 α -glucuronidase activity, which is required to degrade plant biomass, is dependent on conformational flexibility. *Journal of Biological Chemistry*, 289(1), 53-64. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.525295>
- Rojas-Rejón OA, Poggi-Varaldo HM, Ramos-Valdivia AC, Martínez-Jiménez A, Cristiani-Urbina E, de la Torre Martínez M, Ponce-Noyola T (2011). Production of cellulases and xylanases under catabolic repression conditions from mutant PR-22 of *Cellulomonas flavigena*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(1): 257-264. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0821-7>
- Rongpipi S, Ye D, Gomez ED, Gomez EW (2019). Progress and opportunities in the characterization of cellulose- An important regulator of cell wall growth and mechanics. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1894. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01894>
- Rose JKC y Lee SJ (2010). Straying off the highway: trafficking of secreted plant proteins and complexity in the plant cell wall proteome. *Plant Physiology*, 153: 433-436. <https://doi.org/10.1104/pp.110.154872>
- Rudjito RC, Jimenez-Quero A, Munoz MDCC, Kuil T, Olsson L, Stringer MA, Krogh KBRM, Eklöf J, Vilaplana F (2023). Arabinoxylan source and xylanase specificity influence the production of oligosaccharides with prebiotic potential. *Carbohydrate Polymers*, 320, 121233. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121233>
- Rusznayk A, Toth EM, Schumann P, Sproer C, Makk J, Szabo G, Vladar P, Marialigeti K, Borsodi AK (2011). *Cellulomonas phragmiteti* sp. nov., a cellulolytic bacterium isolated from reed (*Phragmites australis*) periphyton in a shallow soda pond. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61: 1662-1666. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.022608-0>
- Rytioja J, Hildén K, Yuzon J, Hatakka A, De Vries RP, Mäkelä MR (2014). Plant-polysaccharide-degrading enzymes from basidiomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(4): 614-649. <https://doi.org/10.1128/mmlbr.00035-14>

S

- Sabbadin F, Hemsworth GR, Ciano L, Henrissat B, Dupree P, Tryfona T, Marques R, Sweeney ST, Besser K, Elias L, Pesante G, Li Y, Dowle AA, Bates R, Gomez LD, Simister R, Davies GJ, Walton PH, Bruce NC, McQueen-Mason SJ (2018). An ancient family of lytic polysaccharide monooxygenases with roles in arthropod development and biomass digestion. *Nature communications*, 9:756. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03142-x>
- Sadula S, Athaley A, Zheng W, Ierapetritou M, Saha B (2017). Process intensification for cellulosic biorefineries. *ChemSusChem*, 10(12): 2566-2572. <https://doi.org/10.1002/cssc.201700183>
- Saini A, Aggarwal NK, Sharma Ayadav A (2015). Actinomycetes: A Source of Lignocellulolytic Enzymes. *Enzyme Research*, 2015: 279381. <https://doi.org/10.1155/2015/279381>
- Saini R, Patel AK, Saini JK, Chen CW, Varjani S, Singhania RR, Di Dong C (2022). Recent advancements in prebiotic oligomers synthesis via enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Bioengineered*, 13(2): 2139-2172. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.2023801>
- Sainz-Polo MA, Valenzuela SV, González B, Pastor FJ, Sanz-Aparicio J (2014). Structural analysis of glucuronoxylan-specific Xyn30D and its attached CBM35 domain gives insights into the role of modularity in specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 289(45), 31088-31101. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.597732>
- Sakka M, Tachino S, Katsuzaki H, van Dyk JS, Pletschke BI, Kimura T, Sakka K (2012). Characterization of Xyn30A and Axh43A of *Bacillus licheniformis* SVD1 identified by its genomic analysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 51(4), 193-199. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2012.06.003>
- Sampaolesi S, Briand LE, Saparrat MCN, Toledo MV (2023). Potentials of biomass waste valorization: case of South America. *Sustainability*, 15(10), 8343. <https://doi.org/10.3390/su15108343>
- Sangkharak K, Vangsirikul P, Jantachai S (2012). Strain improvement and optimization for enhanced production of cellulase in *Cellulomonas* sp. TSU-03. *African Journal of Microbiology Research*, 6(5), 1079-1084. <https://gpo.org/10.5897/AJMR11.1550>
- Sawhney N, Crooks C, Chow V, Preston JF, St John FJ (2016). Genomic and transcriptomic analysis of carbohydrate utilization by *Paenibacillus* sp. JDR-2: systems for bioprocessing plant polysaccharides. *BMC Genomics*, 17(1), 131. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2436-5>
- Scheller HV, Ulvskov P (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1): 263-289. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>
- Schomburg I, Jeske L, Ulbrich M, Placzek S, Chang A, Schomburg D (2017). The BRENDA enzyme information system—From a database to an expert system. *Journal of Biotechnology*, 261, 194-206. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.04.020>
- Schultink A, Liu L, Zhu L, Pauly M (2014). Structural Diversity and Function of Xyloglucan Sidechain Substituents. *Plants*, 3(4): 526-542. <https://doi.org/10.3390/plants3040526>
- Seidl V, Seiboth B (2010). *Trichoderma reesei*: genetic approaches to improving strain efficiency. *Biofuels*, 1(2), 343-354. <https://doi.org/10.4155/bfs.10.1>
- Serrano L, Cecilia JA, García-Sancho C, García A (2019). Lignin depolymerization to BTXs. En Serrano L, Luque R, Sels B (Eds) (pp. 169-196). *Lignin Chemistry. Topics in Current Chemistry Collections*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-00590-0_7
- Sharma A, Balda S, Gupta N, Capalash N, Sharma P (2020). Enzyme cocktail: An opportunity for greener agro-pulp biobleaching in paper industry. *Journal of Cleaner Production*, 271: 122573. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122573>

- Sharma A, Tewari R, Rana SS, Soni R, Soni SK (2016). Cellulases: Classification, Methods of Determination and Industrial Applications. *Applied biochemistry and biotechnology*, 179(8): 1346-80. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2070-3>
- Sharma D, Agrawal S, Yadav RD, Mahajan R (2017). Improved efficacy of ultrafiltered xylanase–pectinase concoction in biobleaching of plywood waste soda pulp. *3 Biotech*, 7(1): 2. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0614-z>
- Sharma D, Chaudhary R, Kaur J, Arya SK (2020). Greener approach for pulp and paper industry by Xylanase and Laccase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25: 101604. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101604>
- Sharma HK, Xu C, Qin W (2019). Biological pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and bioproducts: an overview. *Waste and Biomass Valorization*, 10(2), 235-251. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0059-y>
- Sharma M, Sangwan RS, Khatkar BS, Singh SP (2021). Development of a prebiotic oligosaccharide rich functional beverage from sweet sorghum stalk biomass. *Waste and Biomass Valorization*, 12(4): 2001- 2012. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01156-5>
- Sharma R, Chauhan A, Shirkot CK (2015). Characterization of plant growth promoting *Bacillus* strains and their potential as crop protectants against *Phytophthora capsici* in tomato. *Biological Agriculture & Horticulture*, 31(4), 230-244. <https://doi.org/10.1080/01448765.2015.1009860>
- Shi H, Xu J, Wang W, Jia M, Zhou Y, Sun L (2020). An efficient protocol for the preparation of linear arabino-oligosaccharides. *Carbohydrate Research*, 496, 108131. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108131>
- Shinoda K, Tomita M, Ishihama Y (2010). emPAI Calc-for the estimation of protein abundance from large-scale identification data by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Bioinformatics* 26(4): 576-577. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp700>
- Shoseyov O, Shani Z, Levy I (2006). Carbohydrate binding molecules: biochemical properties and novel applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70: 283-295. <https://doi.org/10.1128/mmb.00028-05>
- Singh V, Raheja Y, Basotra N, Sharma G, Tsang A, Chadha BS (2023). CRISPR/Cas9 mediated gene editing of transcription factor ACE1 for enhanced cellulase production in thermophilic fungus *Rasamsonia emersonii*. *Fungal Biology and Biotechnology*, 10(1): 18. <https://doi.org/10.1186/s40694-023-00165-y>
- Siqueira JGW, Rodrigues C, de Souza Vandenbergh LP, Woiciechowski AL, Soccol CR (2020). Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels: a review. *Biomass and Bioenergy*, 132, 105419. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105419>
- Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, Crocker D (2012). Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass Laboratory Analytical Procedure (LAP). Technical Report NREL/TP 1617(1): 510-42618. <https://www.nrel.gov/docs/gen/fy13/42618.pdf>
- Soares PA, Vaz AF, Correia MT, Pessoa Jr A, Carneiro-da-Cunha MG (2012). Purification of bromelain from pineapple wastes by ethanol precipitation. *Separation and purification technology*, 98, 389-395. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.06.042>
- Soni SK, Sharma A, Soni R (2018). Cellulases: role in lignocellulose biomass utilization. En Mette Lubeck (Ed.) (pp. 3-23), *Cellulases: Methods and Protocols*. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7877-9_1

- Sørensen HR, Pedersen S, Jørgensen CT, Meyer AS (2007a). Enzymatic hydrolysis of wheat arabinoxylan by a recombinant “minimal” enzyme cocktail containing β -xylosidase and novel endo-1, 4- β -xylanase and α -L-arabinofuranosidase activities. *Biotechnology Progress*, 23(1): 100-107. <https://doi.org/10.1021/bp0601701>
- Sørensen HR, Pedersen S, Meyer AS (2007b). Synergistic enzyme mechanisms and effects of sequential enzyme additions on degradation of water insoluble wheat arabinoxylan. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4): 908-918. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.07.026>
- Souza FP, Balthazar CF, Guimarães JT, Pimentel TC, Esmerino EA, Freitas MQ, Raices RSL, Silva MC, Cruz AG (2019). The addition of xyloligosaccharide in strawberry-flavored whey beverage. *Lwt*, 109: 118- 122. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.093>
- Spertino S, Boatti L, Icardi S, Manfredi M, Cattaneo C, Marengo E, Cavaletto M (2018). *Cellulomonas fimi* secretomes: in vivo and in silico approaches for the lignocellulose bioconversion. *Journal of Biotechnology*, 270, 21-29. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.01.018>
- Sporck D, Reinoso FA, Rencoret J, Gutiérrez A, Del Rio JC, Ferraz A, Milagres AM (2017). Xylan extraction from pretreated sugarcane bagasse using alkaline and enzymatic approaches. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 296. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0981-z>
- St John FJ, Dietrich D, Crooks C, Pozharski E, González JM, Bales E, Smith K, Hurlbert JC (2014). A novel member of glycoside hydrolase family 30 subfamily 8 with altered substrate specificity. *Biological Crystallography*, 70(11), 2950-2958. <https://doi.org/10.1107/S1399004714019531>
- St John FJ, Hurlbert JC, Rice JD, Preston JF, Pozharski E (2011). Ligand bound structures of a glycosyl hydrolase family 30 glucuronoxylan xylanohydrolase. *Journal of Molecular Biology*, 407(1), 92-109. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.01.010>
- St John FJ, Rice JD, Preston JF (2006). *Paenibacillus* sp. strain JDR-2 and XynA1: a novel system for methylglucuronoxylan utilization. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), 1496-1506. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1496-1506.2006>
- Subramaniyan S, Prema P (2000). Cellulase-free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 183(1): 1-7. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb08925.x>
- Sun G, Xiao Y, Yin H, Yu K, Wang Y, Wang Y (2025). Oligosaccharide elicitors in plant immunity: Molecular mechanisms and disease resistance strategies. *Plant Communications*, 6, 101469 <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2025.101469>
- Sureshkumar S, Song J, Sampath V, Kim I (2023). Exogenous enzymes as zootechnical additives in monogastric animal feed: A review. *Agriculture*, 13(12), 2195. <https://doi.org/10.3390/agriculture13122195>
- Susič N, Janežič S, Rupnik M, Stare BG (2020). Whole genome sequencing and comparative genomics of two nematocidal *Bacillus* strains reveals a wide range of possible virulence factors. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 10(3), 881-890. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400716>
- Suzuki T, Ibata K, Hatsu M, Takamizawa K, Kawai K (1997). Cloning and expression of a 58-kDa xylanase VI gene (xynD) of *Aeromonas caviae* ME-1 in *Escherichia coli* which is not categorized as a family F or family G xylanase. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(1), 86-89. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)82792-4](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)82792-4)

T

- Taiz L, Zeiger E, Moller IM, Murphy A (2014). *Plant Physiology and Development*. En Sinauer Associates. Inc. (Ed.) (pp. 761), Publishers Sunderland, Massachusetts.

- Takenaka M, Lee JM, Kahar P, Ogino C, Kondo A (2019). Efficient and supplementary enzyme cocktail from Actinobacteria and plant biomass induction. *Biotechnology Journal*, 14(3), 1700744. <https://doi.org/10.1002/biot.201700744>
- Tegenfeldt F, Kuznetsov D, Manni M, Berkeley M, Zdobnov EM, Kriventseva EV (2025). OrthoDB and BUSCO update: annotation of orthologs with wider sampling of genomes. *Nucleic Acids Research*, 53, D516–D522, <https://doi.org/10.1093/nar/gkae987>
- Teo SC, Liew KJ, Shamsir MS, Chong CS, Bruce NC, Chan K, Goh KM (2019). Characterizing a halo-tolerant GH10 xylanase from *Roseithermus sacchariphilus* strain RA and its CBM-truncated variant. *International journal of molecular sciences*, 20: 2284. <https://doi.org/10.3390/ijms20092284>
- Teufel F, Almagro Armenteros JJ, Johansen AR, Gíslason MH, Pihl SI, Tsirigos KD, Winther O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2022). SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. *Nature biotechnology*, 40(7), 1023-1025. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01156-3>
- Teune M, Suster C, Wolf Y, Michels N, Mieth H, Döhler T, Bartosik D, Krull J, Hehemann JH, Schweder T, Stanetty C, Bornscheuer UT (2025). Producing mixed linked xylooligosaccharides from red algae biomass through single-step enzymatic hydrolysis. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 18(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s13068-025-02686-7>
- Thakur V, Kumar V, Kumar V, Singh D (2022). Xylooligosaccharides production using multi-substrate specific xylanases secreted by a psychrotolerant *Paenibacillus* sp. PCH8. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 3, 100215. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2022.100215>
- Thapa S, Mishra J, Arora N, Mishra P, Li H, O’Hair J, Bhatti S, Zhou S (2020). Microbial cellulolytic enzymes: Diversity and biotechnology with reference to lignocellulosic biomass degradation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 19: 621–648. <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09536-y>
- Ticona AR, Ullah SF, Hamann PR, Lopes FA, Noronha EF (2021). *Paenibacillus barengoltzii* A1_50L2 as a source of plant cell wall degrading enzymes and its use on lignocellulosic biomass hydrolysis. *Waste and Biomass Valorization*, 12(1), 393-405. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-00975-w>
- Topalian J, Navas L, Ontañón O, Valacco MP, Nosedá DG, Blasco M, Peña MJ, Urbanowicz BR, Campos, E (2024). Production of a bacterial secretome highly efficient for the deconstruction of xylans. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40(9): 266. <https://doi.org/10.1007/s11274-024-04075-y>
- Trigo E, Regúnaga M, Aquaroni M, Giménez F y Peña Farinaccia J (2012). Biorrefinerías en la República Argentina: análisis del mercado potencial para las principales cadenas de valor. MINCyT, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, R. Argentina, 2012.

U

- Upton BM y Kasko A (2016). Strategies for the conversion of lignin to high-value added polymeric materials: review and perspective. *Chemical Reviews*, 116: 2275-2306. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00345>
- Urbániková Ľ, Vršanská M, Mørkeberg Krogh KB, Hoff T, Biely P (2011). Structural basis for substrate recognition by *Erwinia chrysanthemi* GH30 glucuronoxylanase. *The FEBS Journal*, 278(12), 2105-2116. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08127.x>

V

- Vacilotto MM, de Araujo Montalvão L, Pellegrini VDOA, Liberato MV, de Araujo EA, Polikarpov I (2024). Two-domain GH30 xylanase from human gut microbiota as a tool for enzymatic production of

- xylooligosaccharides: Crystallographic structure and a synergy with GH11 xylosidase. *Carbohydrate Polymers*, 337, 122141. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.122141>
- Valenzuela SV, Diaz P, Pastor FJ (2012). Modular glucuronoxylan-specific xylanase with a family CBM35 carbohydrate-binding module. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(11), 3923-3931. <https://doi.org/10.1128/AEM.07932-11>
- Valladares-Diestra KK, de Souza Vandenberghe LP, Vieira S, Goyzueta-Mamani LD, de Mattos PBG, Manzoki MC, Soccol VT, Soccol CR (2023). The potential of xylooligosaccharides as prebiotics and their sustainable production from agro-industrial by-products. *Foods*, 12(14), 2681. <https://doi.org/10.3390/foods12142681>
- Valls C, Pastor FJ, Vidal T, Roncero MB, Díaz P, Martínez J, Valenzuela SV (2018). Antioxidant activity of xylooligosaccharides produced from glucuronoxylan by Xyn10A and Xyn30D xylanases and eucalyptus autohydrolysates. *Carbohydrate Polymers*, 194, 43-50. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.028>
- Van Munster JM, Daly P, Blythe MJ, Ibbett R, Kokolski M, Gaddipati S, Lindquist E, Singan VR, Barry KW, Lipzen A, Ngan CY, Petzold CJ, Chan LJG, Arvas M, Raulo R, Pullan ST, Delmas S, Grigoriev IV, Tucker GA, Simmons BA, Archer DB (2020). Succession of physiological stages hallmarks the transcriptomic response of the fungus *Aspergillus niger* to lignocellulose. *Biotechnology for Biofuels*, 13, 69. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01702-2>
- Verma AK, Goyal A (2016). A novel member of family 30 glycoside hydrolase subfamily 8 glucuronoxylan endo- β -1, 4-xylanase (CtXynGH30) from *Clostridium thermocellum* orchestrates catalysis on arabinose decorated xylans. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 129, 6-14. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.04.001> [Get rights and content](#)
- Vieira TF, Corrêa RC, Peralta RA, Peralta-Muniz-Moreira RF, Bracht A, Peralta RM (2020). An overview of structural aspects and health beneficial effects of antioxidant oligosaccharides. *Current Pharmaceutical Design*, 26(16): 1759-1777. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180517120642>
- Voiniciuc C (2022). Modern mannan: a hemicellulose's journey. *New Phytologist*, 234(4): 1175-1184. <https://doi.org/10.1111/nph.18091>
- Voragen AG, Coenen GJ, Verhoef RP, Schols HA (2009). Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural chemistry*, 20(2), 263-275. <https://doi.org/10.1007/s11224-009-9442-z>
- Vuong TV, Wilson DB (2010). Glycoside hydrolases: catalytic base/nucleophile diversity. *Biotechnology and bioengineering*, 107(2), 195-205. <https://doi.org/10.1002/bit.22838>

W

- Wakarchuk WW, Brochu D, Foote S, Robotham A, Saxena H, Erak T, Kelly J (2016). Proteomic analysis of the secretome of *Cellulomonas fimi* ATCC 484 and *Cellulomonas flavigena* ATCC 482. *PLoS One*, 11(3), e0151186. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151186>
- Wakisaka Y, Masaki E, Koizumi K, Nishimoto Y, Endo Y, Nishimura MS, Nishiitsutsuji-Uwo J (1982). Asporogenous *Bacillus thuringiensis* mutant producing high yields of δ -endotoxin. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(6), 1498-1500. <https://doi.org/10.1128/aem.43.6.1498-1500.1982>
- Wang H, Liu YM, Qi ZM, Wang SY, Liu SX, Li X, Wang HJ, Xia XC (2013). An overview on natural polysaccharides with antioxidant properties. *Current Medicinal Chemistry*, 20(23): 2899-2913. <https://doi.org/10.2174/0929867311320230006>

- Wang S, Cheng A, Liu F, Zhang J, Xia T, Zeng X, Fan W, Zhang Y (2023). Catalytic conversion network for lignocellulosic biomass valorization: a panoramic view. *Industrial Chemistry and Materials*, 1(2), 188-206. <https://doi.org/10.1039/D2IM00054G>
- Ward NE (2021). Debranching enzymes in corn/soybean meal-based poultry feeds: a review. *Poultry Science*, 100(2): 765-775. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.10.074>
- Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, Clamp M, Barton GJ (2009). Jalview Version 2-a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9), 1189-1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
- Webb EC 1992. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme Nomenclature. Recommendations.
- Westbrook AW, Moo-Young M, Chou CP (2016). Development of a CRISPR-Cas9 tool kit for comprehensive engineering of *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(16), 4876-4895. <https://doi.org/10.1128/AEM.01159-16>
- Wilkens C, Andersen S, Dumon C, Berrin JG, Svensson B (2017). GH62 arabinofuranosidases: Structure, function and applications. *Biotechnology Advances*, 35(6): 792-804. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.06.005>
- Wilson DB (2009). Cellulases and biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(3): 295-299. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.05.007>
- Wong TS, Roccatano D, Zacharias M, Schwaneberg U (2006). A statistical analysis of random mutagenesis methods used for directed protein evolution. *Journal of Molecular Biology*, 355(4), 858-871. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.10.082>

X

- Xu H, Jia S, Liu J (2011). Development of a mutant strain of *Bacillus subtilis* showing enhanced production of acetoin. *African Journal of Biotechnology*, 10(5), 779-799. <https://doi.org/10.4314/ajb.v10i5>

Y

- Yadav M, Dhaka N, Saharan V, Kapoor RK (2025). Future-Forward: Emerging Methods for Optimizing Lignocellulolytic Enzyme Production from Microorganisms. *Lignocellulosic Biomass and Enzymes: Fundamentals, Emerging Technologies and Applications*, 99-123. https://doi.org/10.1007/978-981-96-3037-0_5
- Yao G, Wu R, Kan Q, Gao L, Liu M, Yang P, Du J, Li Z, Qu Y (2016). Production of a High-Efficiency Cellulase Complex via β -Glucosidase Engineering in *Penicillium oxalicum*. *Biotechnology for Biofuels*, 9: 78. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0491-4>
- Yegin S, Buyukkileci AO, Sargin S, Goksungur Y (2017). Exploitation of agricultural wastes and by-products for production of *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1 xylanase: screening, bioprocess optimization and scale up. *Waste Biomass Valorization*, 8, 999-1010. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9646-6>
- Yilmaz-Sercinoglu Z, Sayar NA (2020). Process simulation-integrated optimization of lignocellulolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal*, 153: 107420. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107420>
- Yin YL, Deng ZY, Huang HL, Li TJ, Zhong HY (2004). The effect of arabinoxylanase and protease supplementation on nutritional value of diets containing wheat bran or rice bran in growing pig. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 13: 445-461.

Yu CS, Chen YC, Lu CH, Hwang JK (2006). Prediction of protein subcellular localization. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 64(3): 643-651. <https://doi.org/10.1002/prot.21018>

Z

Zakaria MR, Fujimoto S, Hirata S, Hassan MA (2014). Ball milling pretreatment of oil palm biomass for enhancing enzymatic hydrolysis. *Applied biochemistry and biotechnology*, 173(7), 1778-1789. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0964-5>

Zaldívar M, Velásquez JC, Contreras I, Pérez LM (2001). *Trichoderma aureoviride* 7-121, a mutant with enhanced production of lytic enzymes: its potential use in waste cellulose degradation and/or biocontrol. *Electronic Journal of Biotechnology*, 4(3), 13-14. <https://doi.org/10.2225/vol4-issue3-fulltext-7>

Zallot R, Oberg N, Gerlt JA (2019). The EFI web resource for genomic enzymology tools: leveraging protein, genome, and metagenome databases to discover novel enzymes and metabolic pathways. *Biochemistry*, 58(41), 4169-4182. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00735>

Zavvalov AV, Rykov SV, Lunina NA, Sushokova VI, Yarotsky SV y Berezina OV (2019). Plant Polysaccharide Xyloglucan and Enzymes That Hydrolyze It (Review). *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 45: 845–859. <https://doi.org/10.1134/S1068162019070148>

Zhang L, Xi L, Qiu D, Song L, Dai X, Ruan J, Huang Y (2013). *Cellulomonas marina* sp. nov. isolated from deep-sea water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 3014-3018. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.048876-0>

Zhang S, Wang J, Chen Y, Zheng Z, Xu Z (2024). Efficient secretion of an enzyme cocktail in *Escherichia coli* for hemicellulose degradation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 259: 129205. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129205>

Zhang Y, Yin H, Zhao X, Wang W, Du Y, He A, Sun K (2014). The promoting effects of alginate oligosaccharides on root development in *Oryza sativa* L. mediated by auxin signaling. *Carbohydrate Polymers*, 113, 446-454. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.06.079>

Zheng J, Choo K, Bradt C, Lehoux R, Rehmann L (2014). Enzymatic hydrolysis of steam exploded corncob residues after pretreatment in a twin-screw extruder. *Biotechnology Reports*, 3, 99-107. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.06.008>

Zheng J, Ge Q, Yan Y, Zhang X, Huang L, Yin Y (2023). dbCAN3: automated carbohydrate-active enzyme and substrate annotation. *Nucleic Acids Research*, 51(W1), W115-W121. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad328>

Zhong R y Zheng-Hua Y (2015). Secondary cell walls: Biosynthesis, patterned deposition and transcriptional regulation. *Plant and Cell Physiology*, 56(2): 195–214. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu140>

Zhou J, Bao L, Chang L, Zhou Y, Lu H (2012). Biochemical and kinetic characterization of GH43 β -D-xylosidase/ α -L-arabinofuranosidase and GH30 α -L-arabinofuranosidase/ β -D-xylosidase from rumen metagenome. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(1), 143-152. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1009-5>

Zhou JM, Zhang Y (2020). Plant immunity: danger perception and signaling. *Cell*, 181(5), 978-989. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.028>

Zhu J, Zhang H, Jiao N, Xiao Y, Shi D, Xu Y (2021). A green process for producing xylooligosaccharides from poplar: Endoxylanase assisted autohydrolysis, activated carbon separation, and spent liquor for rice growth. *Industrial Crops and Products*, 174, 114187. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114187>

- Zschocke JC (2019). The Argentinian wheat milling industry-characterizing the operations of its two main company types. *International Food and Agribusiness Management Review*, 22(4), 601-620.
<https://doi.org/10.22434/IFAMR2018.0096>
- Zverlov VV, Schwarz WH (2008). Bacterial cellulose hydrolysis in anaerobic environmental subsystems-*Clostridium thermocellum* and *Clostridium stercorarium*, thermophilic plant-fiber degraders. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125: 298-307.
<https://doi.org/10.1196/annals.1419.008>

Anexos

Anexo 1: Secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de PxXyn30_8 y PxXyl30_2

- Secuencia codificante para la enzima glucuronoxilanas GH30_8, PxXyn30_8

> PxXyn30_8

AAAGGATCCGCGAATGATGTAAACGATTAACTGTCGGCAGAAAAACAGATTATACGGGGATTGGAGGGATCAA
 TCATCCTGCCTGGATCGGAGATCTTACAGCGGCGCAACGGGAAACCGCTTTCGGTAACGGTCAGAATCAACTTG
 GCTTCTCTATACTGAGAATTTATGTCGACCCTGATCGGAATAACTGGTATCGTGAAGTCCCCACAGCCAAACGTGC
 GATTGAACAGGGAGCTCTCGTATTTGCTTACCATGGAATCCGCCAGTGACATGATTGAAACCTTTAATCGCAAC
 GGGGATACAAATGCCAAACGACTCAAATACGATAAATATGTCGCATATGCGCAACACCTGAATGATTTTGTAACCT
 ATATGAAAAATAATGGTGTGAATTTGTATGCGGTTTCCGTGCAAAACGAGCCGGATTATGCACATGATTGGACCTG
 GTGGACGCCTCAGGAGATGCTCCGGTTTATGAAAGAAAATGCCGGATCAATCAACAACACCAAGGTGATGGCAC
 CAGAGTCGTTCCAATATTTGAAAAACATGTCTGATCCCATATTGAATGACCCACAGGCTCTTGCCAATATGGATATT
 CTCGGTGCCTACTTATGGAACACAGTTCAGCGACTTCCCTTATCCGTTGTTCAAACAGAAAGGCACAGGGAAA
 GAACTTTGGATGACTGAAGTTTATTATCCAAACAGCAACAATAATTCGGCTGACCTCTGGCCAGAAGCGCTCGAC
 GTCTCTATCATATGCACCATGCTATGGTAGAAGCAGATTTTTCAGGCTTATGTCTGGTGGTATATCCGCAGGCAGTA
 CGGTCCCATGAAAGAGGACGGCACGATTAGCAAGCGTGGTTACAATATGGCTCATTTCTCCAAATTCATTCGTCC
 AGGTTATGTCAGGGTTGACGCAACCAAAAATCCTGATACGAACACGTATACCTCAGCTTACAAAGGAGATAACAA
 GGTGCTTATCGTTGCGATCAACAGAGGTACCTCGGCAGCAAGTCAAAGGTTTGTGTTTGCAAAACGGCAATGCTT
 CTACAGTTTCCTCTTGGGTACGGACGTCAGCAGAAACCTGCAGGCAGGAACGCCAATTAGTGCATCCAGTGGT
 ACTTTTACAGCCACGCTGCCACCACAGAGTGTTACAACCTTCGTTGCCAGTCTTACAGGTGTTTCCAGTGTTCC
 AACACGGATAGTACCTATGAGGTGAGACGGTTACTAAACAGATAGCAGGCAATTGATAACTCGAGTTT

Secuencia nucleotídica correspondiente al gen *pxxyn30_8* amplificado a partir de ADN genómico de *P. xylanivorans*. Los sitios complementarios a los oligonucleótidos iniciadores para PCR (PxGH30_8 Fw y PxGH30_8 Rv, en orden de aparición) se encuentran subrayados. El codón de terminación de la transcripción del gen (TAA) se muestra remarcado en rosa. Se encuentran resaltados los sitios de corte de las enzimas de restricción *Bam*HI (rojo) y *Xho*I (azul).

- Secuencia aminoacídica PxXyn30_8

Proteína nativa:

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQMQMGRKGSANDVTINLSAEKQIRGFGGINHPAWIGDLTAAQRET
 AFGNGQNQLGFSILRIYVDPDRNNWYREVPTAKRAIEQGALVFASPWNPPSDMIETFNRNGDTNAKRLKYDKYV
 AYAQHLNDFVTYMKNNGVNLYAVSVQNEPDYAHDWTTWTPQEMLRFMKENAGSINNTKVMAPESFYQLKN
 MSDPILNDPQALANMDILGAHTYGTQFSDFPYPLFKQKGTGKELWMTEVYYPNSNNNSADLWPEALDVSYHMH
 HAMVEADFQAYVWYIRRYGPMKEDGTISKRGYNMAHFSKFIRPGYVRVDATKNPDTNTYTSAYKGDNKVVI
 VAINRGTSASQRFVLQNGNASTVSSWVTDVSRNLQAGTPISASSGFTTATLPPQSVTTTFVASLTGVSSGSNTDSTY
 EVETVTNQIAGNLEF

Proteína recombinante:

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQMQMGRKGSANDVTINLTAEKQIRGFGGINHPAWIGDLTAAQRET
 AFGNGQNQLGFSILRIYVDPDRNNWYREVPTAKRAIEQGALVFASPWNPPSDMIETFNRNGDTNAKRLKYDKYV
 AYAQHLNDFVTYMKNNGVNLYAVSVQNEPDYAHDWTTWTPQEMLRFMKENAGSINNTKVMAPESFYQLKN
 MSDPILNDPQALANMDILGAHTYGTQFSDFPYPLFKQKGTGKELWMTEVYYPNSNNNSADLWPEALDVSYHMH
 HAMVEADFQAYVWYIRRYGPMKGEDGTISKRGYNMAHFSKFIRPGYVRVDATKNPDTNTYTSAYKGDNKVVI

VAINRG TSAASQRFVLQNGNASTVSSWVTDVSRNLQAGTPISASSGTFTATLPPQSVTTTFVASLTGVSSGSNTDSTY
EVETVTNQUIAGN

En verde se resalta la secuencia proveniente del vector de expresión pET28a (+) y en celeste el tracto de seis histidinas (6His). En negrita y rojo se destacan cambios aminoacídicos ocurridos en la proteína recombinante: Ser → Thr y Glu → Gly.

- Secuencia codificante para la enzima β -xilanasas/ α -L-arabinofuranosidasa GH30_2, PxXyl30_2

>PxXyl30_2

AAA**GGATCC**CTGACGTTACATGGCTATTCCACTACACCAGATCTTTCGTGGAAAGAGATTTCTTATACAATCGCAA
ATGAAAGCGCTAACTTAAACTTACAGGTGAACAACATCAACTCGTAGAAGGATTTGGCGGCTGCTTCAATGAAC
TTGGTTATATCGCTCTTTCCACTTAAATGAGGAGCAGCGACATGAAGTCTTTCATTCCCTCTCCATCCGGAGGG
CGAACACAAATTCAACATCTGCCGCTGCCAATCGGCGCGAGTGATTATGCAGAGCAATGGTATAGTCATAATGA
GGTAGACGGCGATGTGGCCATGGAACATTTTTCGATTGAACGCGACTTCAAATATCTGATTCCATACATCAAGGA
GGCCCTGACCTACAATCCGAATCTTCAATTCTTGCCTCACCGTGGAGCCCGCTACCTGGATGAAGTCACCGAA
AGCCTATAACTACGGAACACTGCGCTGGGAAAAAGATATCCTGGAAGCGTATGCGTTGTATTTTCGTCAAATTCGTG
CAGGCTTACCGTGAGGCAGGTGTTACTATCCATCAGGTTACGTGCAGAACGAAGTCATCGCGGATCAGAAATTT
CCTTCCTGTATGTGGACTGGCGAGCAGCTGCGCGAGTTTATCGCCGATTACCTGGGCCCTGCTTTTGACCAGCAT
GGTCTGGACACGGAAATCTGGCTGGGGACGATCAACGCACCCGATCCATGGGAAGAATTGATCAAGAAAAAATC
GAATGATTTTCGATGAATACGCCGGACTGGTGCTTAGTGATCCGAAAGCGTACGCCTATATCAAGGGAGTAGGTTA
TCAGTGGGCAGGCAAAAATGCCATTCAACGGACAGCCGAAGCTACCCGGAGCTTCGTTACATGCAGACGGAG
AATGAATGCGGCGATGGCAACAATTCGTGGAATATGCCAAATATGTATTCAACCTGTACCAGCACTATTTTCAGCA
ATGGGGTCAATGCGTACATTTACTGGAACATGGTTCTGGAGCCGAAAGGCCGAGCACGTGGGGGTGGGAGCA
GAACTCGATGATTACGGTAGACCCGGATACGAATGAGGCCATTTCGAAATCCCGAGTATTATGTGATGAAGCATTTT
GCCCATCATGTTGTTCTGGTGACGAAGAGTGGGTCTGTCTGGTGCCTGGAGCGGCAAATCGGTGGCTTTTCG
CAACCCTGACAACAGTCTCGTGATTGTCATCAACAATCCGTTCAAGGAACTTCGTGACCTGTATTTGGCATACGAG
GGGCAGACACTCAAGTTTGAATTGGAGGCTGACTCCTTCAACAGTATTGTTGTCTCGGAAGGCTAGTAAC**CTCGA**
GTTT

Secuencia nucleotídica correspondiente al gen *pxxy130_2* amplificado a partir de ADN genómico de *P. xylanivorans*. Los sitios complementarios a los oligonucleótidos iniciadores para PCR (PxGH30_2 Fw y PxGH30_2 Rv, en orden de aparición) se encuentran subrayados. El codón de terminación de la transcripción del gen (TAA) se muestra remarcado en rosa. Se encuentran resaltados los sitios de corte de las enzimas de restricción *Bam*HI (rojo) y *Xho*I (azul).

- Secuencia aminoacídica PxXyl30_2

Proteína nativa:

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRKGS⁺LT LHGYSTTPDLSWKEISYTIANESANLKL TGEQHQLVE
GFGGCFNELGYIALSHLNEEQRHEVFHSLFHPEGEHKFNICRLPIGASDYAEQWYSHNEVDGDVAMEHFSIERDFKY
LIPYIKEALTYPNPNLQFFASPSPTWMKSPKAYNYGTLRWEKDILEAYALYFVKFVQAYREAGVTIHQVHVQNEVIA
DQKFPSCMWTGEQLREFIADYLGPAFDQHGLDTEIWLGTINAPDPWEELIKKSNDFDEYAGLVLSDPKAYAYIKGV
GYQWAGKNAIQRTAASYPELRMQTENECGDGNNNSWNYAKYVFNLYQHYFSNGVNAVYIYWNMVLPEPKGRSTWG
WEQNSMITVDPDTNEAIRNPEYVMKHFAHHVVPGARRVGLSGAWSGKSVAFRNPDNSLVIVINNPFKELRDLYLA
YEGQTLKFELEADSFNSIVVSEGLEF

Proteína recombinante:

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRKGS^{*}LTLHGYSTTPDLSWKEISYTIANESANLKLTEQHQQLVE
 GFGGCFNELGYIALSHLNEEQRHEVFHSLFHPEGEHKFNICRLPIGASDYAEQWYSHNEVDGDVAMEHFSIERDFKY
 LIPYIKEALTYPNQLQFFASPWSPPTWMKSPKAYNYGTLRWEKDILEAYALYFVKFVQAYREAGVTIHQVHVQNEVIA
 DQKFPSCMWTGEQLREFIADYLGPAFDQHGLDTEIWLGTINAPDPWEELIKKKSND^{*}FDE^{*}CAGLVLSDPKAYAYIKGV
 GYQWAGKNAIQRTAASYPELRMQTENECGDGNNSWNYAKYVFNLQHYFSNGVNAVYIYWNMVLPEPKGRSTWG
 WEQNSMITVDPDTNEAIRNPEYYVMKHFAHHVVPGARRVGLSGAWSGKSVAFRNPDNSLVIVINNPFKELRDLYLA
 YEGQTLKFELEADSFNSIVVSEG

En verde se resalta la secuencia proveniente del vector de expresión pET28a (+) y en celeste el tracto de seis histidinas (6His). En negrita y rojo se destacan cambios aminoacídicos ocurridos en la proteína recombinante: Tyr → Cys.

Los parámetros moleculares de las proteínas recombinantes se calculados en Protparam Expasy, disponible en <https://web.expasy.org/protparam/>, y se detallan en la siguiente tabla:

Proteína	N° aminoácidos	Peso molecular (kDa)	Punto Isoeléctrico	Coefficiente de extinción molar
PxXyn30_8	454	50,7	6,74	93.280
PxXyl30_2	481	55	5,61	121.950

Anexo 2: Cepas de *Escherichia coli* para el clonado y expresión utilizadas en esta tesis.***E. coli* DH5α**

Para los subclonados y amplificación de plásmidos se utilizó la cepa DH5α de *E. coli*. Genotipo: F-φ80lacZΔ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK- mK+) *phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1*.

***E. coli* BL21 (DE3)**

Cepa lisogénica para un profago que contiene una copia cromosómica del gen de la ARN polimerasa T7 bajo el control del promotor *lacUV5* inducible por IPTG. Estas cepas son adecuadas para la producción de proteínas a partir de genes diana clonados en vectores pET u otros vectores de expresión dirigidos por T7.

***E. coli* Rosetta (DE3)**

Cepa derivada de BL21 (DE3) que expresa los RNA de transferencia para el uso de los codones AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA, considerados “raros” en *E. coli*, a fin de mejorar la expresión de proteínas recombinantes de origen eucariota. La cepa BL21 posee el profago recombinante λ DE3 que porta el gen que codifica para la enzima T7 ARN polimerasa bajo control del promotor *lacUV5*, inducible por IPTG. Además, es deficiente en la expresión de determinadas proteasas, como Lon y ompT. Genotipo: F-, ompT, hsdSB (rB-, mB-), dcm, gal, λ(DE3).

Anexo 3: Análisis bioinformático de los dominios CAZy predichos en el genoma de *Cellulomonas* sp.

B6. Dominios CAZy y actividad enzimática inferidos en dbCAN3 (Zheng y col., 2023); localización subcelular determinada con CELLO v.2.5 (Yu y col., 2006).

N° GenBank	Dominio CAZy	Actividad enzimática (EC N°)	Localización Subcelular
WP_062102770.1	GH1	β -fucosidasa (EC 3.2.1.38)	Citoplasmática
KSW29522.1	GH1	β -glucosidasa (EC 3.2.1.21)	Citoplasmática
WP_062101912.1	GH1	β -galactosidasa (EC 3.2.1.23)	Citoplasmática
WP_062104175.1	GH2	β -galactosidase (EC 3.2.1.23)	Citoplasmática
WP_062104209.1	GH2	β -glucosidasa (EC 3.2.1.21)	Citoplasmática
KSW19794.1	GH3	β -glucosidasa (EC 3.2.1.21)	Citoplasmática
KSW21537.1	GH3		Citoplasmática
WP_223304978.1	GH3		Citoplasmática
WP_062102844.1	GH3		Extracelular
KSW21825.1	GH3		Extracelular
WP_062102213.1	GH3		Citoplasmática
WP_223304822.1	GH3	Exo- β -1,4-xilosidasa (EC 3.2.1.37)	Citoplasmática
WP_062102238.1	GH5_8-CBM2	Endo-1,4- β -mannosidasa (EC 3.2.1.78)	Extracelular
WP_062104075.1	GH5_1-CBM2	Celulasa endo- β -1,4-glucosidasa/exo- β -1,4-glucosidasa (EC 3.2.1.4/3.2.1.74)	Citoplasmática
WP_062101151.1	GH6-CBM2	Celulosa endo- β -1,4-glucobiosidasa/exo- β -1,4-glucobiosidasa (EC 3.2.1.4/3.2.1.91)	Extracelular
WP_062103894.1	GH6-CBM2		Extracelular
WP_062103894.1	GH6		Extracelular
WP_082659442.1	GH9-CBM2	Endo- β -1,4-glucanasa (EC 3.2.1.4)	Extracelular
WP_082659958.1	GH9		Extracelular
KSW29108.1	GH9-CBM4-CBM4		Extracelular
KSW29539.1	GH9-CBM4-CBM4		Extracelular
WP_062102228.1	GH10	Endo-1,4- β -xilanasa (EC 3.2.1.8)	Citoplasmática
KSW20567.1	GH10-CBM2		Extracelular
KSW21671.1	GH10-CBM13		Extracelular
KSW23552.1	GH10-CBM9		Extracelular
KSW29966.1	GH10-CBM2		Extracelular
KSW14744.1	GH10-CBM22-CBM2		Extracelular
KSW18330.1	GH10		Extracelular
KSW16349.1	GH10-CBM22-CBM22-CBM9		Extracelular
KSW19115.1	GH11		Extracelular
WP_062101334.1	GH13_13	Neopululanasa (EC 3.2.1.135) / Maltodextrina glucosidasa (EC 3.2.1.20)	Extracelular
WP_062101545.1	GH13_30	α -glucosidasa (EC 3.2.1.20)	Citoplasmática
WP_070319088.1	GH13_11-CBM48	Endo- α -1,6-glucosidasa/4- α -glucanotransferasa (EC 3.2.1.68/2.4.1.25)	Citoplasmática
WP_062103900.1	GH13_26	Malto-oligosiltrehalosa sintasa (EC 5.4.99.15)	Citoplasmática
WP_062103903.1	GH13_10	Maltotrehalosa α -1,4-glucosidasa (EC 3.2.1.141)	Citoplasmática

WP_062102556.1	GH13_31	Oligo exo- α -1,6-glucosidasa (EC 3.2.1.10)	Citoplasmática
KSW18933.1	GH13_11-CBM48	α -1,6-maltotetraosa-hidrolasa (EC 3.2.1.196)	Extracelular
WP_062103498.1	GH13_3	Fosforilasa del almidón (EC 2.4.99.16)	Citoplasmática
WP_062104203.1	GH13_16	trehalosa sintasa/maltosa glucosilmutasa (EC 5.4.99.16)	Extracelular
WP_062104210.1	GH13_9-CBM48	Enzima ramificadora de 1,4- α -glucano (EC 2.4.1.18)	Citoplasmática
WP_062104089.1	GH13_32-CBM20	Amilosa endo- α -1,4-glucosidasa/exo- α -1,4-glucosidasa (EC 3.2.1.1/3.2.1.116)	Extracelular
WP_062101307.1	GH13_20	Exo- α -1,4-panosidasa de pululano (EC 3.2.1.135)	Citoplasmática
WP_062103278.1	GH13_16	trehalosa sintasa/maltosa glucosilmutasa (EC 5.4.99.16)	Citoplasmática
WP_062103916.1	GH13_18	Sacarosa fosforilasa (EC 2.4.1.7)	Citoplasmática
WP_150118238.1	GH15	Glucoamilasa (EC 3.2.1.3)	Citoplasmática
WP_062103590.1	GH15	Amilosa exo- α -1,4-glucosidasa (EC 3.2.1.3)	Citoplasmática
WP_062101766.1	GH15	Amilosa exo- α -1,4-glucosidasa (EC 3.2.1.3)	Extracelular
KSW17651.1	GH16_3-CBM13	Glucano endo- β -1,3-glucosidasa/Quitinasa (EC 3.2.1.39/3.2.1.14)	Extracelular
WP_062103527.1	GH18-CBM2	Quitinasa (EC 3.2.1.14)	Extracelular
WP_062103230.1	GH20	β -N-acetilhexosaminidasa (EC 3.2.1.52)	Citoplasmática
WP_062102427.1	GH23	endo- β -1,4-N-acetilmuramidasa/ β -1,4-muraminidasa (EC 3.2.1.17/4.2.2.29)	Extracelular
WP_062102855.1	GH27	α -galactosidasa (EC 3.2.1.22)	Citoplasmática
WP_062101103.1	GH27-CBM13		Extracelular
WP_062102771.1	GH31_3	α -xilosidasa (EC 3.2.1.177)	Citoplasmática
WP_062103424.1	GH31_4		Citoplasmática
WP_062100945.1	GH32	sacarosa β -2,1-fructosidasa (EC 3.2.1.26)	Citoplasmática
WP_190278843.1	GH35	β -galactosidasa (EC 3.2.1.23)	Extracelular
WP_062101258.1	GH35		Citoplasmática
KSW13763.1	GH36	α -galactosidasa (EC 3.2.1.22)	Citoplasmática
WP_062101129.1	GH36		Citoplasmática
KSW30127.1	GH39	Exo- β -1,4-xilosidasa (EC 3.2.1.37)	Citoplasmática
WP_062102480.1	GH39		Citoplasmática
WP_062101508.1	GH42	β -galactosidasa (EC 3.2.1.23)	Citoplasmática
WP_062102772.1	GH42		Citoplasmática
WP_062101259.1	GH42		Citoplasmática
WP_062102481.1	GH42		Citoplasmática
WP_062102761.1	GH43_4	Endo-1,5- β -L-arabinosidasa (EC 3.2.1.99)	Citoplasmática
WP_062102856.1	GH43_5		Extracelular
KSW21678.1	GH43_36-CBM13 ₂ -CBM91	α -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55)	Extracelular
WP_223304992.1	GH43_36-CBM91		Extracelular

KSW29954.1	GH43_26		Extracelular
KSW30137.1	GH43_29-CBM6-CBM13	Exo- β -1,4-xilosidasa/ α -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.37/3.2.1.55)	Extracelular
WP_062102012.1	GH43_12-CBM91	Exo- β -1,4-xilosidasa (EC 3.2.1.37)	Citoplasmática
KSW21730.1	GH43_22		Citoplasmática
WP_062103874.1	GH48-CBM2	Celulosa 1,4- β -celobiosidasa (extremo no reductor) (EC 3.2.1.91)	Extracelular
KSW29942.1	GH51_1	α -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55)	Citoplasmática
WP_062104090.1	GH51_1		Citoplasmática
KSW29720.1	GH53	Endo-1,4- β -galactanasa (EC 3.2.1.89)	Extracelular
KSW17752.1	GH62-GH5_35	α -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55)	Extracelular
WP_062101426.1	GH67	α -glucuronidasa (EC 3.2.1.139)	Citoplasmática
WP_062101518.1	GH74-GH74-GH74-CBM2	Xiloglucanasa (EC 3.2.1.155)	Extracelular
WP_062101133.1	GH77	4- α -glucanotransferasa (EC 2.4.1.25)	Citoplasmática
WP_062103770.1	GH92	α -manosidasa (EC 3.2.1.24)	Citoplasmática
WP_062104285.1	GH94	Celobiosa fosforilasa/celodextrina fosforilasa (EC 2.4.1.20/2.4.1.49)	Extracelular
KSW28370.1	GH95	Exo- α -1,2-L-fucosidasa (EC 3.2.1.63)	Citoplasmática
KSW29266.1	GH114	Endo- α -1,4-poligalactosaminidasa (EC 3.2.1.109)	Extracelular
WP_062101102.1	GH120	Exo- β -1,4-xilosidasa (EC 3.2.1.37)	Citoplasmática
WP_062102918.1	GH127	β -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.185)	Citoplasmática
KSW19121.1	GH130_8	β -manósido fosforilasa (EC 2.4.1.-)	Citoplasmática
WP_082659466.1	GH146	β -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.185)	Extracelular
KSW30132.1	GH146		Citoplasmática
WP_062101719.1	GH179	β -N-acetilhexosaminidasa (EC 3.2.1.52)	Citoplasmática
KSW29527.1	GH179		Citoplasmática
WP_062101636.1	GH184	Endo- β -1,4-N-acetilmuramidasa del peptidoglicano (EC 3.2.1.17)	Extracelular
WP_062101023.1	GH184		Extracelular
WP_062102448.1	GH188	α -(6-sulfo)-quinovosidasa (EC 3.2.1.199)	Citoplasmática
WP_062102826.1	GH188		Citoplasmática
WP_082660059.1	AA6	1,4-benzoquinona reductasas (EC 1.6.5.6)	Extracelular
WP_062101668.1	AA7	α -1,4-oligogalacturónido oxidasa (EC 1.1.3.-)	Citoplasmática
WP_062101277.1	AA10	Monooxigenasa lítica de polisacáridos (EC 1.14.99)	Extracelular
WP_062103469.1	AA10-CBM2		Extracelular
WP_287920046.1	AA10-CBM2		Extracelular
WP_062102239.1	CE1	Carbohidrato esterasa (EC 2.3.1.- / 3.1.1.-)	Extracelular
KSW23802.1	CE1-CE1		Extracelular
WP_062101346.1	CE1-CBM2		Extracelular
WP_062103743.1	CE1		Extracelular
KSW21507.1	CE1		Extracelular
KSW14111.1	CE1		Membrana
KSW19118.1	CE1		Extracelular
WP_062101667.1	CE1		Citoplasmática

KSW15560.1	CE1	Glicosil transferasa (EC 2.4.1.-)	Extracelular
KSW19128.1	CE1-CBM2		Extracelular
KSW29963.1	CE2		Extracelular
WP_062104278.1	CE3-CBM2		Extracelular
WP_062101321.1	CE3-CBM13		Extracelular
WP_223305208.1	CE4		Citoplasmática
WP_062104012.1	CE7		Citoplasmática
WP_062102971.1	CE9		Citoplasmática
WP_062102912.1	CE14		Citoplasmática
WP_062101636.1	CE14		Citoplasmática
WP_062104021.1	CE14		Citoplasmática
WP_062101710.1	CE14		Citoplasmática
WP_062103164.1	GT2		Membrana
WP_062101937.1	GT2		Citoplasmática
WP_062101939.1	GT2-GT2		Citoplasmática
WP_062101953.1	GT2		Citoplasmática
KSW29271.1	GT2		Membrana
WP_062101957.1	GT2		Citoplasmática
WP_062101962.1	GT2		Membrana
KSW29282.1	GT2		Citoplasmática
KSW29290.1	GT2		Citoplasmática
WP_062103961.1	GT2		Citoplasmática
WP_062101175.1	GT2		Membrana
WP_082659594.1	GT2		Membrana
WP_062102845.1	GT2		Citoplasmática
WP_062102748.1	GT2		Membrana
KSW23500.1	GT2		Membrana
WP_062101772.1	GT2		Citoplasmática
WP_062103332.1	GT2		Citoplasmática
WP_062101869.1	GT4		Citoplasmática
WP_062101944.1	GT4		Citoplasmática
WP_062101956.1	GT4		Citoplasmática
KSW15293.1	GT4		Membrana
WP_062102746.1	GT4		Membrana
KSW28895.1	GT4		Citoplasmática
KSW28896.1	GT4		Citoplasmática
WP_082659914.1	GT4		Citoplasmática
WP_062103448.1	GT4		Citoplasmática
WP_062103449.1	GT4		Citoplasmática
WP_062103868.1	GT4		Citoplasmática
KSW30066.1	GT4		Citoplasmática
WP_062103095.1	GT5		Citoplasmática
WP_062101752.1	GT20		Citoplasmática
WP_062102098.1	GT28		Membrana
WP_062104097.1	GT35		Citoplasmática
KSW20493.1	GT39		Membrana

WP_223304756.1	GT51		Extracelular
WP_062104040.1	GT51		Extracelular
WP_062100992.1	GT81		Citoplasmática
KSW23494.1	GT83		Membrana
WP_062102732.1	GT94		Membrana
WP_062102251.1	GT94		Citoplasmática
WP_062102224.1	GT119		Membrana
KSW29181.1	GT119		Membrana
WP_062104274.1	PL3_4-CBM13	Polisacárido liasa (EC 4.2.2.2)	Extracelular
WP_062103217.1	CBM2	n.c.	Extracelular
KSW30030.1	CBM2		Extracelular
WP_062101525.1	CBM2		Extracelular
WP_062104119.1	CBM2		Extracelular
KSW29720.1	CBM61		Extracelular

Anexo 4: Enzimas extracelulares activas sobre carbohidratos (CAZimas) identificadas en los secretomas de *Cellulomonas* sp. B6. Sobrenadantes provenientes de distintas fuentes de carbono de cultivo: CMC (E-CsCMC), SCR (E-CsRAC), PTE (E-CsPTE) y ST (E-CsST). EmPAI representa la abundancia relativa de todas las proteínas presentes en las dos réplicas, expresada como porcentaje (emPAI %). Solo se incluyeron las proteínas detectadas en al menos una muestra de sobrenadantes de matraces. n.d.: no detectado. Datos adaptados de Piccinni y col., 2019 y Onteañon y col., 2021.

N° Acceso UniProt	Actividad predicha ¹	Dominio CAZy ²	emPAI (%)				Localización subcelular ³
			E-CsCMC	E-CsRAC	E-CsPTE	E-CsST	
A0A0V8S3C7	Endo- β -1,4-xilanasas (EC 3.2.1.8)	GH10-CBM22	n.d.	0,09	n.d.	0,18	Extracelular
A0A0V8TB53		GH10	0,92	0,59	0,59	6,71	Extracelular
A0A0V8S7T2		GH10-CBM9-CBM22	n.d.	0,58	0,64	0,15	Extracelular
A0A0V8SDQ3		GH10	n.d.	0,92	0,54	n.d.	Extracelular
A0A0V8SJU5		GH10-CBM2	n.d.	0,41	0,15	4,28	Extracelular
A0A0V8SMW4		GH10-CBM13	0,26	0,10	n.d.	1,43	Extracelular
A0A0V8ST89		GH10-CBM9-CBM22	8,06	1,68	1,40	1,16	Extracelular
A0A0V8SFL7		GH11-CBM2	n.d.	0,57	0,36	1,27	Extracelular
A0A0V8SMY7	β -xilosidasa / α -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.37 / 3.2.1.55)	CBM13-GH43	n.d.	0,06	n.d.	0,16	Extracelular
A0A0V8TBM3		CBM13-GH43	n.d.	n.d.	n.d.	0,05	Extracelular
A0A0V8SI61		GH3	n.d.	n.d.	n.d.	0,08	Intracelular
A0A0V8T9P9	Endo- β -1,4-glucanasa (EC 3.2.1.4)	GH9	n.d.	0,05	n.d.	0,53	Extracelular
A0A0V8T944		GH9-CBM2-CBM3	n.d.	0,05	n.d.	n.d.	Extracelular
A0A0V8T913		GH9-CBM4 ₂	n.d.	1,66	1,40	0,04	Extracelular
A0A0V8TA57		CBM4-GH9	n.d.	0,60	0,26	6,82	Extracelular
A0A0V8TC27		GH6-CBM2	n.d.	1,05	0,12	1,00	Extracelular
A0A0V8TC62		GH6-CBM2	n.d.	n.d.	n.d.	0,03	Extracelular
A0A0V8S5R6	Celobiohidrolasa (extremo no reductor) (EC 3.2.1.91)	GH6-CBM2	10,96	0,21	0,32	4,73	Extracelular
A0A0V8S6F9	Celobiohidrolasa (extremo reductor) (EC 3.2.1.176)	GH48-CBM2	2,41	0,20	0,34	0,55	Extracelular
A0A0V8SBG4	β -1,3-glucanasa (EC 3.2.1.39)	GH16-CBM13	n.d.	n.d.	n.d.	0,29	Extracelular
A0A0V8TAG7	Xiloglucanasa (EC 3.2.1.151)	GH74 ₄ -CBM2	n.d.	0,13	0,05	0,11	Extracelular
A0A0V8T8K6	β -glucosidasa (EC 3.2.1.21)	GH3	n.d.	n.d.	n.d.	0,05	Intracelular

A0A0V8SNB8		GH3	n.d.	0,08	0,10	0,01	Intracelular
A0A0V8SBR8	α -L-arabinofuranosidasa	GH62-CBM13	n.d.	0,32	0,08	9,85	Extracelular
A0A0V8TC25	α -galactosidase (EC 3.2.1.22)	GH27-CBM13	n.d.	n.d.	n.d.	0,18	Extracelular
A0A0V8TAX3	α -amilasa/Pululanasa (EC 3.2.1.1/3.2.1.41)	GH13	n.d.	0,01	n.d.	0,03	Extracelular
A0A0V8SE95	Quitinasa (EC 3.2.1.14)	GH18-CBM2	n.d.	0,27	n.d.	0,56	Extracelular
A0A0V8SFL6	Monooxigenasa lítica de polisacáridos (EC 1.14.99)	AA10-CBM2	n.d.	0,19	n.d.	n.d.	Extracelular
A0A0V8TBD5		AA10-CBM2	n.d.	n.d.	n.d.	0,09	Extracelular
A0A0V8SFN3	Carbohidrato esterasa (EC 2.3.1.- / 3.1.1.-)	CE1	n.d.	n.d.	n.d.	2,33	Extracelular
A0A0V8SMC4		CE1	n.d.	0,39	0,48	0,39	Extracelular
A0A0V8TCQ6		CE1-CBM2	n.d.	n.d.	n.d.	0,19	Extracelular
A0A0V8SMF4		CE1	n.d.	0,15	0,15	0,11	Extracelular
A0A0V8S5I5		CE1 ₂	n.d.	0,03	0,02	0,03	Extracelular
A0A0V8S487		CE7	n.d.	n.d.	n.d.	0,05	Extracelular
A0A0V8TBE3		CE2-CBM2	n.d.	n.d.	n.d.	0,03	Extracelular
A0A0V8S193	Glicosil transferasa (EC 2.4.1.-)	GT35	n.d.	0,02	0,01	0,02	Intracelular
A0A0V8T9I9		GT51	n.d.	n.d.	0,02	0,01	Extracelular
A0A0V8S0N0	Polisacárido liasa (EC 4.2.2.2)	CBM13-PL3	n.d.	0,04	n.d.	0,32	Extracelular
A0A0V8S1H4	Módulo de unión a carbohidratos	CBM2	n.d.	n.d.	n.d.	0,14	Extracelular
A0A0V8TAX2		CBM2	n.d.	0,05	0,04	n.d.	Extracelular
A0A0V8TB59		CBM32	n.d.	n.d.	0,05	0,04	Intracelular
A0A0V8TCD5		CBM32	n.d.	0,04	0,03	0,29	Extracelular
A0A0V8ST30		CBM44 ₂ -CBM66	n.d.	0,30	0,22	0,01	Extracelular

¹ Actividad predicha por CAZy and BLASTp (análisis de homología) en NCBI; ² Dominio CAZy predicho por dbCAN3 (Zhang y coll., 2023); ³ Localización subcelular predicha por CELLO v.2.5 (Yu y col., 2006).

Anexo 5: Análisis bioinformático de los dominios CAZy predichos en el genoma de *Paenibacillus xylanivorans* A59. Dominios CAZy y actividad enzimática inferidos en dbCAN3 (Zheng y col., 2023); localización subcelular determinada con CELLO v.2.5 (Yu y col., 2006).

N° GenBank	Dominio Cazy	Actividad enzimática (EC N°)	Localización Subcelular
WP_053779240.1	GH1	β -glucosidasa/ β -galactosidasa (EC 3.2.1.21/3.2.1.23)	Citoplasmática
WP_053780132.1	GH1		Citoplasmática
WP_053782742.1	GH1		Citoplasmática
WP_053780810.1	GH1	β -(6 fosfo)-glucosidasa/ β -glucosidasa (EC 3.2.1.86/3.2.1.21)	Citoplasmática
WP_053780827.1	GH1		Citoplasmática
WP_053781441.1	GH1		Citoplasmática
WP_053781442.1	GH1		Citoplasmática
WP_053781592.1	GH1		Citoplasmática
WP_053782137.1	GH1		Citoplasmática
WP_053782384.1	GH1		Citoplasmática
WP_053784098.1	GH2_1	β -galactosidasa (EC 3.2.1.23)	Citoplasmática
WP_053782906.1	GH2_10		Citoplasmática
WP_053783756.1	GH2_10		Citoplasmática
WP_053779343.1	GH2_13	β -manosidasa (EC 3.2.1.25)	Citoplasmática
WP_053779956.1	GH2_13		Citoplasmática
WP_053782272.1	GH2_19	β -galactosidasa (EC 3.2.1.23)	Citoplasmática
WP_053782273.1	GH2_19		Citoplasmática
WP_053782417.1	GH2_19		Citoplasmática
WP_053781895.1	GH2_20		Citoplasmática
WP_053779370.1	GH3	β -N-acetilhexosaminidasa (EC 3.2.1.52)	Extracelular
WP_053780053.1	GH3		Citoplasmática
WP_053784388.1	GH3		Citoplasmática
WP_053781619.1	GH3		Citoplasmática
WP_053782189.1	GH3		Extracelular
WP_053782986.1	GH3	β -glucosidasa (EC 3.2.1.21)	Citoplasmática
WP_053782991.1	GH3		Citoplasmática
WP_053783318.1	GH3		Citoplasmática
WP_053780488.1	GH3		Citoplasmática
WP_053783722.1	GH3	Exo- β -1,4-glucosidasa de celulosa/xiloglucano exo- β -1,4-glucosidasa (EC 3.2.1.74/3.2.1.120)	Citoplasmática
WP_053782759.1	GH3-CBM6	β -(6 fosfo)-glucosidasa (EC 3.2.1.86)	Citoplasmática
WP_053779697.1	GH4	α -galactosidasa (EC 3.2.1.22)	Citoplasmática
WP_053781859.1	GH4		Citoplasmática
WP_053783005.1	GH4		Citoplasmática
WP_053784023.1	GH4	β -galactosidasa (EC 3.2.1.23)	Citoplasmática
WP_053783226.1	GH5		Citoplasmática
WP_053782136.1	GH5_4	Celulosa endo- β -1,4-glucosidasa (EC 3.2.1.4)	Extracelular
WP_053782127.1	GH5_8	Manano endo- β -1,4-manosidasa (EC 3.2.1.78)	Extracelular

WP_053782765.1	GH5_54-CBM92 ₂	No se conoce actividad en esta subfamilia.	Extracelular
WP_053784024.1	GH6-CBM3	Exo- β -1,4-glucobiosidasa de celulosa (EC 3.2.1.91)	Extracelular
WP_053779698.1	GH8	Celulosa endo- β -1,4-glucosidasa (EC 3.2.1.4)	Extracelular
WP_053783505.1	GH9-CBM3 ₂		Extracelular
WP_053779305.1	GH10-CBM22 ₃ -CBM9	Endo-1,4- β -xilanasa (EC 3.2.1.8)	Extracelular
WP_053782506.1	GH10		Extracelular
WP_053780820.1	GH10		Citoplasmática
WP_053781844.1	GH11		Extracelular
WP_053779894.1	GH12	Endo- β -1,4-glucosidasa/xiloglucano endo- β -1,4-glucosidasa (EC 3.2.1.4/3.2.1.151)	Extracelular
WP_053782709.1	GH13_5	Amilosa endo- α -1,4-glucosidasa (EC 3.2.1.1)	Citoplasmática
WP_053780921.1	GH13_9	Enzima ramificadora de 1,4- α -glucano (EC 2.4.1.18)	Citoplasmática
WP_053779168.1	GH13_14	Endo- α -1,4-glucosidasa/endo- α -1,6-glucosidasa (EC 3.2.1.1/3.2.1.41 y 3.2.1.68)	Citoplasmática
WP_053779169.1	GH13_14		Citoplasmática
WP_053779794.1	GH13_20-CBM34	Ciclomaltodextrina glucanotransferasa/amilosa endo- α -1,4-glucosidasa/exo- α -1,4-glucosidasa (EC 2.4.1.19/3.2.1.1/3.2.1.133)	Citoplasmática
WP_053780924.1	GH13_20-CBM34		Citoplasmática
WP_053784100.1	GH13_20-CBM34		Citoplasmática
WP_053784175.1	GH13_2-CBM20		Extracelular
WP_053779878.1	GH13_29	Fosfotrehalosa α -1,1-(6 fosfo)-glucosidasa (EC 3.2.1.93)	Citoplasmática
WP_053779880.1	GH13_31	α -glucosidasa/oligo exo- α -1,6-glucosidasa (EC 3.2.1.20/3.2.1.10)	Citoplasmática
WP_053780120.1	GH13_31		Citoplasmática
WP_053781497.1	GH13_31		Citoplasmática
WP_053782301.1	GH13_31		Citoplasmática
WP_053779396.1	GH13_48	Amilosa endo- α -1,4-glucosidasa/exo- α -1,4-glucobiosidasa (EC 3.2.1.1/3.2.1.133)	Citoplasmática
WP_053781865.1	GH16_3	Endo- β -1,3/4-glucosidasa/endo- β -1,3-glucosidasa/endo- β -1,4-glucosidasa (EC 3.2.1.6/3.2.1.39/3.2.1.73)	Extracelular
WP_053782420.1	GH16_3		Extracelular
WP_053781078.1	GH16_21	Endo- β -1,3/4-glucosidasa (EC 3.2.1.6)	Extracelular
WP_053778955.1	GH18	Quitinasa (EC 3.2.1.14)	Citoplasmática
WP_053780034.1	GH18		Extracelular
WP_053782252.1	GH18		Extracelular
WP_053782576.1	GH18		Extracelular
WP_053782577.1	GH18-CBM12		Extracelular

WP_053783507.1	GH18		Citoplasmática
WP_053781249.1	GH23	Peptidoglicano lítico β -1,4-muraminidasa (EC 4.2.2.29)	Extracelular
WP_053783554.1	GH23		Extracelular
WP_053784493.1	GH23		Membrana
WP_053780374.1	GH26	Endo- β -1,4-glucosidasa/endo- β -1,4-manosidasa/xiloglucano endo- β -1,4-glucosidasa (EC 3.2.1.4/3.2.1.78/3.2.1.151)	Citoplasmática
WP_053781012.1	GH29	α -L-fucosidasa (EC 3.2.1.51)	Citoplasmática
WP_053782518.1	GH24	Peptidoglicano endo- β -1,4-N-acetilmuramidasa (EC 3.2.1.17)	Extracelular
WP_053783426.1	GH25		Extracelular
WP_053783664.1	GH27	α -galactosidasa (EC 3.2.1.22)	Extracelular
WP_053782374.1	GH29	α -L-fucosidasa (EC 3.2.1.51)	Citoplasmática
WP_053782987.1	GH29		Citoplasmática
WP_053782990.1	GH29		Citoplasmática
WP_053783377.1	GH29		Citoplasmática
WP_053782507.1	GH30_2	Exo- β -1,4-xilosidasa (EC 3.2.1.37)	Citoplasmática
WP_053782376.1	GH30_3	Endo- β -1,6-glucosidasa (EC 3.2.1.75)	Citoplasmática
WP_053782296.1	GH30_3		Extracelular
WP_053781470.1	GH30_5-CBM13 ₂	Galactano endo- β -1,6-galactosidasa/ exo- β -1,6-galactosidasa (EC 3.2.1.164/3.2.1.213)	Extracelular
WP_053781633.1	GH30_5		Citoplasmática
WP_053779434.1	GH30_8	Glucuronoxilanasa (EC 3.2.1.136)	Extracelular
WP_053783720.1	GH31_3	α -glucosidasa/ α -xilosidasa (EC 3.2.1.20/3.2.1.177)	Citoplasmática
WP_053781003.1	GH31_19	α -galactosidasa (EC 3.2.1.22)	Citoplasmática
WP_053782734.1	GH32	Endo- β -2,6-fructosidasa/exo- β -2,6-fructobiosidasa (EC 3.2.1.65/3.2.1.64)	Citoplasmática
WP_053782133.1	GH32	Sacarosa β -2,1-fructosidasa (EC 3.2.1.26)	Citoplasmática
WP_053781472.1	GH35	β -galactosidasa (EC 3.2.1.23)	Citoplasmática
WP_053781677.1	GH36	α -galactosidasa (EC 3.2.1.22)	Citoplasmática
WP_053783674.1	GH36		Citoplasmática
WP_053781063.1	GH38	α -manosidasa (EC 3.2.1.24)	Citoplasmática
WP_053781543.1	GH38		Citoplasmática
WP_053781828.1	GH38		Citoplasmática
WP_053782230.1	GH38		Citoplasmática
WP_053782992.1	GH38		Citoplasmática
WP_053783225.1	GH38		Citoplasmática
WP_053783228.1	GH38		Citoplasmática
WP_053782810.1	GH42	β -galactosidasa (EC 3.2.1.23)	Citoplasmática
WP_053783712.1	GH42		Citoplasmática
WP_053783749.1	GH42		Citoplasmática
WP_053780821.1	GH43_1	Exo- β -1,4-xilosidasa/ α -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.37/3.2.1.55)	Citoplasmática

WP_053782398.1	GH43_4	Arabinano endo- α -1,5-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.99)	Extracelular
WP_053783510.1	GH43_4		Extracelular
WP_053783509.1	GH43_5		Extracelular
WP_053780819.1	GH43_12-CBM91	Exo- β -1,4-xilosidasa/ α -L-arabinofuranosidasa/exo- β -1,3-xilosidasa (EC 3.2.1.37/3.2.1.55/3.2.1.72)	Citoplasmática
WP_053781573.1	GH43_12-CBM91		Citoplasmática
WP_053781471.1	GH43_23-CBM42	α -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55)	Extracelular
WP_053782893.1	GH43_24-CBM13	Galactano exo- β -1,3-galactosidasa/endo- β -1,3-galactosidasa (EC 3.2.1.145/3.2.1.181)	Extracelular
WP_053782497.1	GH43_24-CBM32-CBM42		Extracelular
WP_053782335.1	GH43_26-CBM35	α -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55)	Extracelular
WP_053782339.1	GH43_26		Extracelular
WP_053783386.1	GH43_26		Citoplasmática
WP_053781832.1	GH43_32-CBM6-CBM66 ₂	β -galactofuranosidasa (EC 3.2.1.146)	Extracelular
WP_053781035.1	GH46	Quitosano endo- β -1,4-N-glucosaminasa (EC 3.2.1.132)	Extracelular
WP_053783364.1	GH48-CBM3	Exo- β -1,4-glucobiosidasa de celulosa del extremo reductor (EC 3.2.1.176)	Extracelular
WP_053779045.1	GH51_1	α -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55)	Citoplasmática
WP_053782407.1	GH51_1		Citoplasmática
WP_053783366.1	GH51_1		Citoplasmática
WP_053782397.1	GH51_2	Exo- β -1,4-xilosidasa/ α -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.37/3.2.1.55)	Extracelular
WP_053780607.1	GH52	Exo- β -1,4-xilosidasa (EC 3.2.1.37)	Citoplasmática
WP_053780771.1	GH53-CBM32 ₂	Arabinogalactano endo- β -1,4-galactosidasa (EC 3.2.1.89)	Extracelular
WP_053783319.1	GH53		Extracelular
WP_053783928.1	GH53		Citoplasmática
WP_053782706.1	GH63	α -glucosidasa (EC 3.2.1.20)	Citoplasmática
WP_053780126.1	GH65	Kojibiosa α -1,2-glucosidasa (EC 3.2.1.216)	Citoplasmática
WP_053780608.1	GH67	Exo- α -1,2-(4 DIMetil)-glucuronidasa/ α -glucuronidasa (EC 3.2.1.131/3.2.1.139)	Citoplasmática
WP_053782234.1	GH76	α -glucosidasa/manano endo- α -1,6-manosidasa (EC 3.2.1.20/3.2.1.101)	Extracelular
WP_053780122.1	GH78	α -L-ramnosidasa/exo- α -1,4-L-ramnosidasa (EC 3.2.1.40/3.2.1.174)	Citoplasmática
WP_053780813.1	GH78-CBM67		Citoplasmática
WP_053784237.1	GH78		Citoplasmática
WP_053784238.1	GH78-CBM67		Citoplasmática
WP_053781538.1	GH85-CBM32		Extracelular
WP_053783234.1	GH85	manosil-oligosacárido endo- β -1,4-N-acetilglucosaminidasa (EC 3.2.1.96)	Extracelular

WP_053782298.1	GH87	Endo- α -1,3-glucosidasa/endo- α -1,4-glucosidasa (EC 3.2.1.59/3.2.1.61)	Extracelular
WP_053780060.1	GH88	β -1,4-glucuronidasa/ β -1,3-glucuronidasa (EC 3.2.1.179/3.2.1.180)	Citoplasmática
WP_053780627.1	GH88		Citoplasmática
WP_053782203.1	GH88		Citoplasmática
WP_053782976.1	GH88		Citoplasmática
WP_053780489.1	GH94	β -1,2-glucano fosforilasa (EC 2.4.1.333)	Extracelular
WP_053782805.1	GH94		Citoplasmática
WP_053779427.1	GH95	Exo- α -1,2-L-fucosidasa (EC 3.2.1.63)	Citoplasmática
WP_053780133.1	GH95		Citoplasmática
WP_053781557.1	GH95		Citoplasmática
WP_053783666.1	GH95		Citoplasmática
WP_053783668.1	GH95		Citoplasmática
WP_053783677.1	GH95		Citoplasmática
WP_053779334.1	GH101	Endo- α -N-acetilgalactosaminidasa (EC 3.2.1.97)	Extracelular
WP_053779166.1	GH105	Ramnogalacturonano I insaturado- α -1,2-galacturonidasa (EC 3.2.1.172)	Citoplasmática
WP_053779292.1	GH105		Citoplasmática
WP_053783032.1	GH105		Citoplasmática
WP_053783138.1	GH105		Citoplasmática
WP_053779682.1	GH106	α -L-ramnosidasa/exo- α -1,4-L-ramnosidasa (EC 3.2.1.40/3.2.1.174)	Citoplasmática
WP_053783140.1	GH106		Citoplasmática
WP_053779277.1	GH109	β -N-acetilhexosaminidasa (EC 3.2.1.52)	Citoplasmática
WP_053783924.1	GH110	α -galactosidasa (EC 3.2.1.22)	Citoplasmática
WP_053779291.1	GH112	β -1,3-galactosil-N-acetilgalactosamina fosforilasa (EC 2.4.1.211)	Citoplasmática
WP_053779333.1	GH112		Citoplasmática
WP_053782894.1	GH113	β -manosidasa/endo- β -1,4-manosidasa (EC 3.2.1.25/3.2.1.78)	Citoplasmática
WP_053782215.1	GH117	β -galactofuranosidasa (EC 3.2.1.146)	Citoplasmática
WP_053781011.1	GH123	β -N-acetilgalactosaminidasa (EC 3.2.1.53)	Citoplasmática
WP_053781099.1	GH125	Manosil-oligosacárido exo- α -1,6-manosidasa (EC 3.2.1.163)	Citoplasmática
WP_053783227.1	GH125		Citoplasmática
WP_053783332.1	GH125		Citoplasmática
WP_053782626.1	GH130_1	β -1,4-manosil-glucosa fosforilasa (EC 2.4.1.281)	Citoplasmática
WP_053782631.1	GH130_2	β -1,4-manano fosforilasa/ β -1,4-manosil-N-acetil-glucosamina fosforilasa (EC 2.4.1.319/2.4.1.320)	Citoplasmática
WP_053781103.1	GH130_5	β -1,3-manano fosforilasa (EC 2.4.1.-)	Citoplasmática
WP_053780052.1	GH171	Peptidoglicano exo- β -1,4-N-acetilmuramidasa (EC 3.2.1.92)	Citoplasmática
WP_053779069.1	GH177	α -neuraminidasa (EC 3.2.1.18)	Citoplasmática
WP_053780537.1	GH177		Citoplasmática
WP_053784036.1	GH177		Citoplasmática

WP_053779724.1	GH179	β -N-acetilhexosaminidasa (EC 3.2.1.52)	Citoplasmática
WP_053780184.1	GH179		Citoplasmática
WP_053780186.1	GH179		Citoplasmática
WP_053780576.1	GH179		Citoplasmática
WP_053780578.1	GH179		Citoplasmática
WP_053780581.1	GH179		Citoplasmática
WP_053782369.1	GH179		Citoplasmática
WP_053782370.1	GH179		Citoplasmática
WP_053782989.1	GH179		Citoplasmática
WP_053783285.1	GH179		Citoplasmática
WP_053783333.1	GH179		Citoplasmática
WP_053783897.1	GH179		Citoplasmática
WP_053784372.1	GH179		Citoplasmática
WP_053784374.1	GH179		Citoplasmática
WP_024633470.1	GH188	α -(6-sulfo)-quinovosidasa (EC 3.2.1.199)	Citoplasmática
WP_053779929.1	GH188		Citoplasmática
WP_053780226.1	GH188		Citoplasmática
WP_053781066.1	GH188		Citoplasmática
WP_053781879.1	GH188		Citoplasmática
WP_053782692.1	GH188		Citoplasmática
WP_053783587.1	GH188		Citoplasmática
WP_053783905.1	GH188		Citoplasmática
WP_053784045.1	GH188		Citoplasmática
WP_053782411.1	AA1	Lacasa / <i>p</i> -difenol:oxígeno oxidorreductasa (EC 1.10.3.2)	Citoplasmática
WP_053783691.1	AA6	<i>p</i> -benzoquinona reductasa (EC 1.6.5.6)	Citoplasmática
WP_053779383.1	AA7	α -1,4-oligogalacturónido oxidasa (EC 1.1.3.-)	Membrana
WP_053779964.1	AA7		Citoplasmática
WP_053779288.1	AA10	Monooxigenasa lítica de polisacáridos (EC 1.14.99)	Extracelular
WP_053779431.1	CE1	Carbohidrato esterasa (EC 2.3.1.- / 3.1.1.-)	Citoplasmática
WP_053779550.1	CE1		Citoplasmática
WP_053780228.1	CE1		Citoplasmática
WP_053780907.1	CE1		Citoplasmática
WP_053781125.1	CE1		Citoplasmática
WP_053781461.1	CE1		Citoplasmática
WP_053781465.1	CE1		Citoplasmática
WP_053781965.1	CE1		Extracelular
WP_053782124.1	CE1		Citoplasmática
WP_053782557.1	CE1		Citoplasmática
WP_053782911.1	CE1		Citoplasmática
WP_053784103.1	CE1		Citoplasmática
WP_053782491.1	CE2		Citoplasmática
WP_053780485.1	CE3		Citoplasmática
WP_053779134.1	CE4		Citoplasmática
WP_053779596.1	CE4		Membrana

WP_053779843.1	CE4		Membrana
WP_053780510.1	CE4		Extracelular
WP_053780664.1	CE4		Extracelular
WP_053780927.1	CE4		Extracelular
WP_053781388.1	CE4		Citoplasmática
WP_053782055.1	CE4		Extracelular
WP_053783139.1	CE4		Citoplasmática
WP_053783528.1	CE4		Membrana
WP_053783696.1	CE4		Extracelular
WP_053783776.1	CE4		Extracelular
WP_053783835.1	CE4		Citoplasmática
WP_053782887.1	CE8		Citoplasmática
WP_053781620.1	CE9		Citoplasmática
WP_053783146.1	CE9		Citoplasmática
WP_053780113.1	CE12		Citoplasmática
WP_053782043.1	CE12		Extracelular
WP_053780710.1	CE14		Citoplasmática
WP_053781932.1	CE14		Citoplasmática
WP_053781121.1	CE17		Citoplasmática
WP_053782042.1	CE19		Citoplasmática
WP_053781131.1	GT1	Glicosil transferasa (EC 2.4.1.-)	Citoplasmática
WP_053782969.1	GT1		Citoplasmática
WP_053779315.1	GT2		Membrana
WP_053780419.1	GT2		Citoplasmática
WP_053781817.1	GT2		Citoplasmática
WP_053782149.1	GT2		Citoplasmática
WP_053782358.1	GT2		Citoplasmática
WP_053782459.1	GT2		Membrana
WP_053782460.1	GT2		Membrana
WP_053782478.1	GT2		Extracelular
WP_053782666.1	GT2		Citoplasmática
WP_053782667.1	GT2		Citoplasmática
WP_053782971.1	GT2		Citoplasmática
WP_053783159.1	GT2		Citoplasmática
WP_053783160.1	GT2		Membrana
WP_053783195.1	GT2		Citoplasmática
WP_053783197.1	GT2		Citoplasmática
WP_053783198.1	GT2		Citoplasmática
WP_053783451.1	GT2		Citoplasmática
WP_053784514.1	GT2		Membrana
WP_053779174.1	GT4		Membrana
WP_053780351.1	GT4		Citoplasmática
WP_053780711.1	GT4		Citoplasmática
WP_053781985.1	GT4		Membrana
WP_053782669.1	GT4		Citoplasmática
WP_053783155.1	GT4		Membrana

WP_053783158.1	GT4		Citoplasmática
WP_053783164.1	GT4		Membrana
WP_053783446.1	GT4		Membrana
WP_053783448.1	GT4		Membrana
WP_053783449.1	GT4		Citoplasmática
WP_053783450.1	GT4		Citoplasmática
WP_053783655.1	GT4		Citoplasmática
WP_053780922.1	GT5		Citoplasmática
WP_053779076.1	GT26		Citoplasmática
WP_053782859.1	GT26		Citoplasmática
WP_053780417.1	GT28		Citoplasmática
WP_053781221.1	GT28		Citoplasmática
WP_053783436.1	GT28		Membrana
WP_053779883.1	GT35		Citoplasmática
WP_053779041.1	GT51		Membrana
WP_053784285.1	GT51		Extracelular
WP_053780864.1	GT51		Extracelular
WP_053781766.1	GT51		Membrana
WP_053782148.1	GT83		Membrana
WP_053781605.1	GT119		Membrana
WP_053782835.1	GT119		Membrana
WP_053782836.1	GT119		Membrana
WP_053784291.1	GT119		Membrana
WP_053782624.1	PL1	Polisacárido liasa (EC 4.2.2.2)	Extracelular
WP_053784147.1	PL3_1		Extracelular
WP_053782202.1	PL6_2-CBM32 ₂		Extracelular
WP_053782207.1	PL6_2		Citoplasmática
WP_053781417.1	PL9_2		Extracelular
WP_053781861.1	PL9_2		Extracelular
WP_053779775.1	PL11		Extracelular
WP_053784169.1	PL11 ₂		Extracelular
WP_053784001.1	PL15_1		Citoplasmática
WP_053780628.1	PL29-CBM32		Extracelular
WP_053780058.1	PL33_2		Citoplasmática
WP_053784000.1	PL44-CBM96-CBM32		Extracelular
WP_053781829.1	CBM9	n.c.	Extracelular
WP_053783378.1	CBM9		Citoplasmática
WP_053784172.1	CBM9		Citoplasmática
WP_053781007.1	CBM35		Extracelular
WP_053783673.1	CBM35 ₂		Extracelular
WP_053783398.1	CBM50		Extracelular

Anexo 6: Datos brutos del análisis proteómico de sobrenadantes de cultivo: sacarosa (E-PxSAC), xilano de madera de haya (E-PxXIN), residuo de caña de azúcar (E-PxRAC), salvado de trigo (E-PxST y E-bPxST) o bagazo de ágave extrusado (E-PxBABe). El EmPAI representa la abundancia relativa de todas las proteínas presentes en las réplicas analizadas, expresada en porcentaje (emPAI %). Se proporciona como archivo Excel independiente disponible para visualización en el siguiente enlace https://docs.google.com/spreadsheets/d/1T1uP_jsWC_RWg74FVD364xOMwkuBrzui/edit?usp=sharing&ouid=104296623495001182806&rtpof=true&sd=true

FE DE ERRATAS

Desarrollo de complejos enzimáticos bacterianos para la valorización de biomasa lignocelulósica

Biol. Juliana Topalian

Directora de tesis: Dra. Eleonora Campos

Co-director de tesis: Dr. Martín Blasco

Consejero de estudios: Dr. Oscar E. Pérez

Lugar de trabajo: Laboratorio de Enzimas Agroindustriales para Bioprocesos (EAB), Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO), CICVyA, INTA-CONICET.

Buenos Aires, 5 de febrero de 2026

El presente documento detalla correcciones menores de tipeo detectadas en el manuscrito final de la tesis. Las modificaciones no afectan el contenido científico del trabajo y responden exclusivamente a ajustes formales.

Las correcciones se detallan por sección indicando número de página correspondiente al manuscrito y entre paréntesis el número de página del pdf. Para cada caso el error en la oración se encuentra tachado y la corrección en rojo.

Introducción

Página 12 del manuscrito (34 del pdf)

El uso de un álcali provoca la degradación de las cadenas laterales éster y glicosídicas alterando la estructura de la lignina aumentando la accesibilidad ~~e~~ **de** las enzimas a la celulosa y la hemicelulosa (Brodeur y col., 2011; Mankar y col., 2021).

Página 16 del manuscrito (38 del pdf)

Se ~~denominadas~~ **denominan** con el signo positivo (+) seguido de números (+1, +2, +3), los residuos o subdominios hacia el extremo reductor del sustrato o aglicona, y con el símbolo negativo (-) seguido de números (-1, -2, -3) si se encuentran hacia el extremo no reductor o glicona (Aronsson y col., 2018).

Página 21 del manuscrito (43 del pdf)

Figura I11. Hidrólisis enzimática de los glucurono-xilanos (GX). Recuadros celestes ~~α -D-glucuronoxilanasas~~ **α -D-glucuronidasas**.

Página 23 del manuscrito (45 del pdf)

Entre las especies más estudiadas y consideradas de referencia dentro del género se destacan ~~Cellulomonas fimi y Cellulomonas flavigena~~ *Cellulomonas fimi* y *Cellulomonas flavigena* (Wakarchuk y col., 2016).

Página 23 del manuscrito (45 del pdf)

En investigaciones anteriores llevadas a cabo en el Laboratorio de Enzimas Agroindustriales (EAB), IABIMO, INTA-CONICET, se aisló la cepa *Cellulomonas* ~~sp.~~ *sp.* B6, filogenéticamente relacionada con *C. flavigena*, a partir de un consorcio celulolítico proveniente de una muestra de suelo de bosque subtropical nativo de la provincia de Misiones (Arnetina) (Campos y col., 2014).

Materiales y Métodos

Página 58 del manuscrito (82 del pdf)

Los productos de amplificación se analizaron en gel de agarosa 0,8% (p/v), con bromuro de etidio. Se seleccionaron 2 clones positivos de cada construcción a partir de los cuales se realizó a la extracción del ADN plasmídico utilizando el sistema de purificación Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) (ver sección 7. 6, pp. 56).

Página 62 del manuscrito (86 del pdf)

Para la preparación de AOS se incubaron 5 mg de ~~AN~~ *arabinano de remolacha (P-ARAB, Megazyme)* con 1 mL ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 M a 80 °C por 60 min y se siguieron los pasos como se describe en Shi y col. (2020) y se ajustó el pH a neutro (pH 7).

Resultados-Capítulo I

Página 70 del manuscrito (96 del pdf)

En este contexto, en el presente trabajo se completó el estudio genómico de la cepa mediante una nueva secuenciación genómica y ensamblado, lo que permitió obtener el genoma en un único *contig*, en ~~contraste~~ *contraste* con los ~~280~~ *279 contigs* reportados previamente, y se examinó la localización genómica de las CAZimas previamente identificadas en los sobrenadantes de cultivo (Piccinni y col., 2019; Ontañón y col., 2021), así como los posibles reguladores implicados en su expresión.

Página 71 del manuscrito (97 del pdf)

El genoma de *Cellulomonas* sp. B6 fue obtenido previamente utilizando la plataforma Illumina MiSeq y se encuentra anotado en ~~280~~ *279 contigs* (Piccinni y col., 2016, ~~numero~~ *número* de acceso NCBI: LNTD000000000.1).

Resultados-Capítulo III

Página 107 del manuscrito (135 del pdf)

Las secuencias amplificadas fueron clonadas en el vector de expresión pET28a (+) de forma tal que ambas proteínas son expresadas como una fusión a un tracto *de* 34 aminoácidos amino-terminales, que incluyen un *tag* de seis histidinas (His-tag), este

último utilizado para la purificación e inmunodetección ~~y~~ de las proteínas recombinantes (Figura R15).

Página 107 del manuscrito (135 del pdf)

La purificación fue confirmada por electroforesis ~~en~~ geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), revelados por tinción con Azul de Coomassie.

Página 110 del manuscrito (138 del pdf)

Para determinar su estabilidad térmica, las enzimas se pre-incubaron a diferentes temperaturas y a distintos tiempos, y luego se ensayó la actividad enzimática residual de cada una bajo sus ~~en-las~~ condiciones óptimas de reacción (pH 6 y 60 °C para *PxXyn30_8* y pH 6,5 y 40 °C para *PxXyl30_2*).

Página 110 del manuscrito (138 del pdf)

PxXyl30_2 retuvo ~90% de su actividad a 30°C durante 120 min de pre-incubación y ~60% ~~mientras~~ a 35 °C y a 40 °C por hasta 60 min.

Resultados-Capítulo IV

Página 128 del manuscrito (157 del pdf)

Sin embargo, E-*PxST*_{0,60} y E-*PxST*_{0,30} liberaron mayor glucosa total, 3,90 ± 0,37 mg/mL en ambos casos, ~~respeto~~ ~~respecto~~ de la condición E-*PxST*_{0,15} que liberó 2,75 ± 0,10 mg/mL.

Página 128 del manuscrito (157 del pdf)

Los resultados obtenidos fueron consistentes en dos ensayos de hidrólisis independientes, empleando dos ~~lotes~~ ~~lotes~~ independientes del cóctel E-*PxST* en cada caso.

Discusión y Conclusiones

Página 144 del manuscrito (174 del pdf)

Asimismo, se evaluaron el ~~Eucalyptus~~ (EUCA) ~~eucaliptus~~ (Euca) y el bagazo de ágave azul (BAB), ambos seleccionados como modelos para la valorización de glucuronoxilanos (GX).

Página 146 del manuscrito (176 del pdf)

Numerosos trabajos reportan la utilización de biomasa lignocelulósica en varios miembros de los géneros *Paenibacillus* y *Bacillus* para producir mezclas enzimáticas adecuadas para la conversión de la (hemi)celulosa en ~~producto~~ ~~productos~~ de interés (Di Marco y col., 2017; Ticona y col., 2020; Hero y col., 2021).

Página 156 del manuscrito (186 del pdf)

En este trabajo describimos que E-*PxST* presenta actividad xilanasa y evaluamos y ~~enformamos~~ ~~confirmamos~~ que además tiene actividad β-glucanasa, la cual lo hace atractivo como un novedoso cóctel bacteriano nacional para ser aplicado como aditivo o suplemento dietario para animales monogástricos.

Página 156 del manuscrito (186 del pdf)

Los oligosacáridos derivados de la pared celular vegetal tienen la capacidad de promover la resistencia a enfermedades y el crecimiento de las plantas, debido a que actúan como estimuladores de la respuesta de ~~densa~~ **defensa** en varias especies vegetales, conocida como DAMPs (*damage associated molecular patterns*) por sus siglas en inglés (Dewangan y col., 2023; Sun y col., 2025).

Página 157 del manuscrito (187 del pdf)

En esta tesis se ~~realizó~~ **evaluó** el efecto de los hidrolizados generados por E-PxST desde BABe y RACe como elicitores de la respuesta de defensa de plantas de tabaco.