REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expresión heteróloga y modelamiento estructural de nuevas LPMOs recombinantes degradadoras de biomasa lignocelulósica

Tesis presentada por la Bachiller:

Barrios Gutierrez, Solange Grace

ORCID: 0000-0001-6452-7096

para optar por el Título Profesional de Ingeniero Biotecnólogo

Asesora:

Dra. Barazorda Ccahuana, Haruna Luz

ORCID: 0000-0001-8791-0506

Arequipa – Perú

2025

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

INGENIERIA BIOTECNOLOGICA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 18 de Octubre del 2024

Dictamen: 013398-C-EPIB-2024

Visto el borrador del expediente 013398, presentado por:

2015243422 - BARRIOS GUTIERREZ SOLANGE GRACE

Titulado:

EXPRESIÓN HETERÓLOGA Y MODELAMIENTO ESTRUCTURAL DE NUEVAS LPMOS RECOMBINANTES DEGRADADORAS DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Titulo Profesional/Titulo de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

INGENIERO BIOTECNOLOGO

00476696 - BERNABE ORTIZ JULIO CESAR
DICTAMINADOR

29280938 - BARDALES ALVAREZ ROXANA MARGARITA
DICTAMINADOR

42671615 - CARPIO CARPIO JOSE MIGUEL
DICTAMINADOR

Expresión heteróloga y modelamiento estructural de nuevas LPMOs recombinantes degradadoras de biomasa lignocelulósica

INFORME DE ORIGINALIDAD

14%	13%	5%	3%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
2	teses.usp.br Fuente de Internet	1%
3	patents.google.com Fuente de Internet	1%
4	eprints.uanl.mx Fuente de Internet	1%
5	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	1%
6	repositorio.udec.cl Fuente de Internet	1%
7	www.teses.usp.br Fuente de Internet	1%
8	idus.us.es Fuente de Internet	<1%

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Dedicatoria

A mis padres y abuelos, María Huanqui y Mario Barrios, quienes me criaron con amor, acompañaron y confiaron en mí durante todo este tiempo.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Agradecimientos

Agradezco a Dios por la fuerza, sabiduría, alegría y progreso que puso en mí. A mis motores y motivos, María y Mario, quienes estuvieron siempre pendientes de mi bienestar y confiaron en mi crecimiento profesional. De igual forma, quiero expresar mi agradecimiento a mis orientadores, el profesor Fernando Segato y Haruna Barazorda, por guiarme y apoyarme en el desarrollo y conclusión de este proyecto. También agradezco a la Universidad de São Paulo, al laboratorio de biología molecular y sintética, y a las agencias de fomento CAPES (código de financiación 001), FAPESP (número de proceso 2021/06679-1) y OEA/GCUB (número de convocatoria 001/2022), que hicieron posible el intercambio cultural y me brindaron sus instalaciones y apoyo en la etapa experimental de este proyecto de tesis.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

RESUMEN

Las monooxigenasas líticas de polisacaráridos (LPMOs del inglés *Lytic polysaccharide monooxygenases*) son enzimas fundamentales en la degradación de biomasa lignocelulósica, un proceso crucial para la producción de biocombustibles de segunda generación y otros productos de biorefinería. Considerando que los hongos filamentosos en la naturaleza producen una amplia variedad de LPMOs, las cuales son clave en la degradación de material vegetal, este estudio tiene como objetivo explorar nuevas LPMOs provenientes del hongo ascomiceto *T. terrestris*. El enfoque principal de este estudio fue la expresión heteróloga y el modelamiento estructural de las LPMOs recombinantes *Tt*LPMO9K y *Tt*LPMO9L, para dar a conocer nuevas enzimas con potencial aplicación en procesos industriales, mejorando la eficiencia en la despolimerización de celulosa, hemicelulosa y lignina. Se utilizó el vector pEXPYR para insertar los genes de interés y *A.nidulans* como sistema hospedador para la expresión heteróloga de las LPMOs. Ambas enzimas fueron expresadas exitosamente, logrando altos niveles de secreción proteica, con rendimientos de 1,45 mg/ml para *Tt*LPMO9K y 3,2 mg/ml para *Tt*LPMO9L. La actividad enzimática se verificó mediante un ensayo con 2,6 DMP, donde se observó la formación del producto cromogénico coerulignona, evidenciando actividades específicas de 23,4 ± 2 U/µg para *Tt*LPMO9K y 32,8 ± 3,6 U/µg para *Tt*LPMO9L. Adicionalmente, mediante herramientas bioinformáticas se determinaron las características moleculares y estructurales de cada proteína, como el coeficiente de extinción molar, peso molecular, punto isoeléctrico, dominios, péptido señal, y regiones clave. El modelamiento estructural se realizó con Alphafold y fue visualizado en ChimeraX, revelando diferencias estructurales para cada proteína. *Tt*LPMO9K presentó tanto el dominio de la proteína como un módulo de unión al sustrato, mientras que *Tt*LPMO9L mostró únicamente el dominio de la proteína. Los resultados obtenidos contribuyen significativamente al avance y desarrollo de aplicaciones para la desconstrucción de biomasa, abriendo nuevas oportunidades para la producción industrial de biocombustibles y productos de valor agregado.

Palabras clave: LPMOs recombinantes, *T.terrestris*, modelamiento estructural.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

ABSTRACT

Lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) are essential enzymes in the degradation of lignocellulosic biomass, a critical process for producing second-generation biofuels and other biorefinery products. Given that filamentous fungi naturally produce a wide variety of LPMOs, which are key players in the breakdown of plant material, this study aims to explore new LPMOs derived from the ascomycete fungus *T. terrestris*. The main focus of this study was the heterologous expression and structural modeling of the recombinant LPMOs *Tt*LPMO9K and *Tt*LPMO9L, to identify novel enzymes with potential industrial applications, enhancing the depolymerization efficiency of cellulose, hemicellulose, and lignin. The pEXPYR vector was used to insert the genes of interest, and *A. nidulans* served as the host system to achieve heterologous expression. Both enzymes were successfully expressed, achieving high levels of protein secretion, with yields of 1.45 mg/ml for *Tt*LPMO9K and 3.2 mg/ml for *Tt*LPMO9L. Enzymatic activity was verified using a 2,6-DMP assay, which demonstrated the formation of the chromogenic product coerulignone, indicating specific activities of 23.4 ± 2 U/µg for *Tt*LPMO9K and 32.8 ± 3.6 U/µg for *Tt*LPMO9L. Additionally, bioinformatic tools were employed to determine the molecular and structural characteristics of each protein, such as molar extinction coefficient, molecular weight, isoelectric point, domains, signal peptides, and key regions. Structural modeling was performed using AlphaFold and visualized with ChimeraX, revealing significant structural differences between the proteins. *Tt*LPMO9K exhibited a protein domain and a substrate-binding module, whereas *Tt*LPMO9L displayed only the protein domain. The results obtained contribute significantly to the advancement and development of applications for biomass deconstruction, opening new opportunities for the industrial production of biofuels and high-value-added products.

Keywords: recombinant LPMOs, *T. terrestris*, structural modeling.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

INDICE

DEDICATORIA
AGRADECIMIENTO
RESUMEN
ABSTRACT
INTRODUCCIÓN 1
HIPÓTESIS 2
OBJETIVO GENERAL 2
OBJETIVOS ESPECÍFICOS 2
VARIABLES E INDICADORES 3
CAPITULO I 4
1. MARCO TEÓRICO 5
1.1 LPMOs 5
1.1.1 Clasificación 5
1.1.2 Estructura 7
1.1.3 Mecanismo de acción y regioselectividad en celulosa. 8
1.2 Expresión heteróloga de LPMO 10
1.3 LPMOs de hongos filamentosos 14
1.4 Papel de las LPMOs en la biomasa lignocelulósica 17
1.5 Otras aplicaciones de las LPMOs 19
CAPITULO II 21
2. MATERIALES Y MÉTODOS 22
2.1 LUGAR DE EJECUCIÓN 22
2.2 MATERIALES 22
2.2.1 Material Biológico 22
2.2.2 Insumos y Reactivos 22
2.2.3 Aparatos y Equipos 23
2.2.4 Softwares 23
2.3 MÉTODOS 24
2.3.1 Selección y obtención de las secuencias de genes de LPMOs 24
2.3.2 Modelaje y análisis estructural 24
2.3.3 Linajes de los hongos utilizados y vector de expresión 25
2.3.4 Aislamiento del ADN genómico 25
2.3.5 Construcción de los oligonucleótidos y amplificación de los genes 25
2.3.6 Construcción de los plásmidos 26
2.3.7 Transformación bacteriana 27

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

2.3.8 PCR de colonia y purificación de los plásmidos 27
2.3.9 Transformación de *A. nidulans* mediada por PEG 28
2.3.10 Selección de los transformantes de A. nidulans 29
2.3.11 Producción y concentración de las LPMOs recombinantes 29
2.3.12 Purificación enzimática 30
2.3.13 Cuantificación y evaluación de la actividad enzimática 30
CAPÍTULO III 32
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 33
3.1 Identificación de las secuencias y características bioquímicas de los genes de LPMOs 33
3.2 Análisis filogenético y modelado computacional de las LPMOs de interés 34
3.3 Amplificación de los genes *Tt*LPMO9K y *Tt*LPMO9L 39
3.4 Clonación en *E.coli* Turbo 40
3.5 Transformación en *A. nidulans* 41
3.6 Purificación enzimática 43
3.7 Actividad Enzimática 46
4. CONCLUSIÓN 48
5. PERSPECTIVAS FUTURAS 49
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 50

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la estructura de una LPMO. La estructura está coloreada de azul a rojo desde el N-terminal hasta el C-terminal. El ion de cobre y los residuos que lo coordinan están presentados. Los loops que forman la superficie plana comprendiendo la cara de unión del sustrato están marcados (L2, L3, L8, LS y LC). El núcleo formado por hojas β antiparalelas se muestra como (β1, β2, β3, β4, β5, β6, β7, β8 y β9). 8

Figura 2. Esquema de reacción simplificado de peroxigenación de una LPMO AA10. 10

Figura 3. Porcentaje de diferentes sistemas de expresión relativos para la producción de A) LPMOs bacterianos y virales, y B) LPMOs eucarióticos. 11

Figura 4. Vector pEXPYR usado para la superexpresión y secreción de proteínas recombinantes del género de *Aspergillus.* 13

Figura 5. Árbol filogenético de la ocurrencia de LPMOs fúngicas (AA9, AA11, AA13, AA14 y AA16) y proteínas similares a LPMO en filos fúngicos, presentadas a través de gráficos circulares en un árbol filogenético. Los números entre paréntesis representan el número de proteomas individuales depositados en la base de datos UniProt Reference Proteomes para el filo dado. Los gráficos circulares muestran la proporción de proteomas que contienen una o más copias de una determinada familia de proteínas 15

Figura 6. Actuación de las LPMOs y glucosil hidrolases (GHs) en la degradación de lignocelulosa..... 19

Figura 7. Diversidad de funciones biológicas de las LPMOs. Procesos de biorrefinería (zona azul). Estudios recientes en patogénesis en plantas, insectos y humanos, comportamientos mutualistas y comensalistas. Contribución a la remodelación de la pared celular durante las etapas de desarrollo de artrópodos y hongos (zona verde)..... 20

Figura 8. Secuencias de nucleótidos de los genes de LPMOs de interés. Las letras en negro son los exones y las letras en rojo son los intrones..... 33

Figura 9. Características bioquímicas de las LPMOs codificadas por genes presentes en el genoma de *T. terrestris*, *Tt*LPMO9K y *Tt*LPMO9L. Cazy dominio 1 (verde agua): se refieren al dominio catalítico de la proteína, CBM (azul): módulo de unión al carbohidrato cuando está presente. Péptido señal (amarillo), N-: región amino-terminal, -C: región carboxi-terminal, P.M (kDa): peso molecular de la proteína madura, ε: coeficiente de extinción molar, pI: punto isoeléctrico. 34

Figura 10. Alineamiento de secuencias basado en la estructura de las LPMOs, *Tt*LPMO9K y

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

*Tt*LPMO9L, con AA9s cristalizadas y caracterizadas. Las proteínas analizadas incluyen NcLPMO9C (PDB código 4D7U), TtLPMO9E (PDB código 3EII), y PcLPMO9D (PDB código 4B5Q). Los residuos completamente conservados están destacados en rojo. Los marcos azules en las columnas correspondientes exhiben los residuos con propiedades fisicoquímicas similares. Las regiones de loops que conforman la superficie de unión al sustrato, denominadas L2, LC, L3, y LS, se indican mediante barras horizontales debajo de la secuencia. La figura fue generada utilizando el software ESPript. 36

Figura 11. Estructura modelada de *Tt*LPMO9L. El núcleo central de β-sándwich presenta 7 hojas β cada una unida con su respectivo loop (L) y una hélice (η). Los residuos de aminoácidos se cada hoja β, se encuentran ordenados de la siguiente forma: β1 (51-54), β2 (58-62), β3 (96-101), β4 (73-79), β5 (119-123), β6 (131-141), β7 (152-163), β7 (142-151). Los loops expuestos en la superficie de unión del sustrato se encuentran en la posición L2 (2-33), LS (63-72) y LC (rojo, 164-210). Los residuos del sitio catalítico (His 1, His 75, His 162) se encuentran ampliados y coordinando al cobre que está representado como una esfera de color rojo..... 37

Figura 12. Estructura modelada de *Tt*LPMO9K. El núcleo central de β-sándwich presenta 9 hojas β cada una unida con su respectivo loop (L) y 3 hélices (η). Los residuos de aminoácidos de cada hoja β, se encuentran ordenados de la siguiente forma: β1 (3-7), β2 (44-47), β3 (51-58), β4 (78-84), β5 (97-103), β6 (130-134), β7 (142-152), β8 (153-165). Los loops expuestos en la superficie de unión del sustrato se encuentran en la posición L2 (8-43), LS (104-129) y LC (175-219). Los residuos del sitio catalítico (His 1, His 74, Tyr 165) se encuentran ampliados y coordinando al cobre que está representado como una esfera de color rojo. 38

Figura 13. A) Primers diseñados para la amplificación de *Tt*LPMO9K y *Tt*LPMO9L. B) Amplificación de los genes en gel de agarosa al 1%. M: Marcador GeneRuler 1 kb en pares de bases (pb), K: *Tt*LPMO9K, L: *Tt*LPMO9L,*: bandas de la amplificación. 40

Figura 14. Resultado de PCR de las colonias positivas en gel de agarosa al 1% (m/v). (A) Colonias positivas de *Tt*LPMO9K; siendo escogida la colonia de la banda 3 con *. (B) Colonias positivas de *Tt*LPMO9L; siendo escogida la colonia de la banda 1 con *. C1-C6: Número de clones obtenidos. Los asteriscos indican los clones de los transformantes positivos seleccionados para las siguientes etapas. 41

Figura 15. Colonias de los transformantes obtenidos de *Tt*LPMO9K y *Tt*LPMO9L en diferentes concentraciones de zeocina. 300* y 400* fueron las placas seleccionadas para testar la expresión de los transformantes. 42

Figura 16. Gel SDS-PAGE de las LPMOs recombinantes transformadas por *A. nidulans* A773. (A) Expresión de la enzima TtLPMO9K; los marcados con * corresponden a los 4

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

transformantes obtenidos. (B) Expresión de la enzima *Tt*LPMO9L; los marcados con * corresponden a los 5 transformantes obtenidos. M: marcador de peso molecular; C: control: A. nidulans transformado con el vector vacío. 43

Figura 17. Purificación por troca iónica. (A) Gel SDS-PAGE de las fracciones eluidas de *Tt*LPMO9K, (B) Gel SDS-PAGE de las fracciones eluidas de *Tt*LPMO9L. M: marcador, 1: flow-through, 2: lavado (buffer), 3-8: 50, 100, 200, 300, 400 e 500 mM de NaCl. 44

Figura 18. Purificación por cromatografía de exclusión de tamaño en la coluna HiLoad 16/600 Superdex 75. A lado de cada cromatograma se observa el gel de la proteína pura correspondiente a *Tt*LPMO9K y *Tt*LPMO9L. 45

Figura 19. Identificación de los péptidos encontrados por LC-MS. Las letras en rojo representan los péptidos encontrados. 46

Figura 20. Actividad enzimática en 2,6 DMP de *Tt*LPMO9K, *Tt*LPMO9L y control de $CuSO_4$ (1 µM). La concentración de coerulignona medida se presenta en UI (µmol/min). 47

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cuadro de Variables e indicadores..... 3

Tabla 2. Familias de las LPMOs, fuentes de origen, mecanismo de acción y estructuras depositadas en el PDB..... 6

Tabla 3. Expresión de LPMOs AA9 baseadas en la cepa de expresión y organismo fuente.. 13

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

INTRODUCCIÓN

El creciente interés en utilizar la biomasa lignocelulósica como una materia prima renovable para la producción de energía, biocombustibles y productos químicos sostenibles ha impulsado a las biorrefinerías a desarrollar diversas estrategias para su degradación (1). La viabilidad económica de este proceso depende de una bioconversión eficiente de los principales componentes de la biomasa lignocelulósica, celulosa, hemicelulosa y lignina siendo esencial para el ciclo del carbono y la producción de moléculas de alto valor agregado (2).

Las principales etapas en la desconstrucción de la biomasa lignocelulósica incluyen el pretratamiento, la hidrólisis enzimática, y el subsecuente aprovechamiento de los azucares mediante una fermentación (3). Dentro de esas, las dos primeras etapas son cruciales para una separación efectiva de los carbohidratos. En el pretratamiento, que puede ser ácido o alcalino, su objetivo es reducir al máximo el contenido de lignina para que posteriormente, la biomasa enriquecida con celulosa pase por la hidrólisis enzimática, donde las enzimas celulolíticas juegan un papel fundamental (4). En este proceso es esencial una acción sinérgica de todos los componentes de las celulasas para lograr una sacarificación eficiente.

La hidrólisis enzimática implica la ruptura de los enlaces glicosídicos en los polisacáridos (5). Las glucosil hidrolasas (GHs), denominadas celulasas, se clasifican en tres grupos: endo-β-1,4-glucanasas, exoglucanasas o celobiohidrolasas I y II, y β-glucosidasas. Las endoglucanasas (EGLs) hidrolizan aleatoriamente los enlaces glicosídicos internos, preferentemente en la porción amorfa de la celulosa. Las exoglucanasas o celobiohidrolasas (CBHs) clivan los enlaces en los extremos de la cadena de celulosa, liberando celobiosa como producto. Finalmente, las β-glucosidasas descomponen la celobiosa y otros celooligosacáridos generados por las EGLs y CBHs, produciendo glucosa (6).

Se creía que la despolimerización de polisacáridos como la celulosa dependía exclusivamente de enzimas hidrolíticas. Sin embargo, hace aproximadamente 12 años, el descubrimiento de las Monooxigenasas Líticas de Polisacaráridos (LPMOs del inglés Lytic *Polysaccharide Monooxygenases*) revolucionó este concepto. Las LPMOs oxidan regiones de la celulosa que son difíciles de acceder, reduciendo así su índice de cristalinidad y generando fragmentos insolubles de menor tamaño y menor grado de polimerización. Este proceso facilita que las celulasas puedan actuar sobre las áreas cristalinas altamente resistentes, promoviendo una degradación superficial más rápida y completa. La eficiencia de este proceso puede variar significativamente, desde un 5% hasta un 90%.(7).Este efecto potenciador ha impulsado la incorporación de LPMOs en cócteles enzimáticos industriales, transformando la producción de etanol de segunda generación (2G) (8). Por lo tanto, el objetivo de esta investigación es

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

identificar, mediante herramientas moleculares, nuevas LPMOs de hongos filamentosos, expresarlas de manera heteróloga y analizar sus características bioinformáticas para futuras aplicaciones en la desconstrucción de biomasa lignocelulósica.

HIPÓTESIS

Dado que *Aspergillus nidulans* y *Thermothielavioides terrestris* son hongos ascomicetos, se espera que la maquinaria celular de *Aspergillus nidulans* sea compatible con la expresión de genes que codifican para LPMOs provenientes de *T. terrestris*. Esta compatibilidad podría facilitar no solo la expresión eficiente, sino también la producción abundante de estas enzimas, permitiendo su caracterización detallada y potencial aplicación en procesos de desconstrucción de biomasa lignocelulósica.

OBJETIVO GENERAL

Expresar heterólogamente y modelar estructuralmente nuevas LPMOs recombinantes degradadoras de biomasa lignocelulósica

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Amplificar y clonar los genes codificantes de LPMOs de *T. terrestris.*
- Transformar los clones positivos en *Aspergillus nidulans* A773.
- Seleccionar los transformantes con los mayores niveles de secreción de proteínas.
- Purificar las proteínas y medir su actividad especifica.
- Modelar y predecir las estructuras de las LPMOs.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

VARIABLES E INDICADORES

Tabla 1. Cuadro de Variables e indicadores

Variables	Variable		Indicadores
Independientes	Amplificación de los genes de LPMO	*Tt*LPMO9 K	Presencia
		*Tt*LPMO9 L	
	Clonación en bacteria	*Tt*LPMO9 K	Presencia
		*Tt*LPMO9 L	
	Transformación em *A.nidulans*	*Tt*LPMO9 K	Presencia
		*Tt*LPMO9 L	
	Actividad enzimática	*Tt*LPMO9 K	Concentración de coerulignona (U/g^{-1})
		*Tt*LPMO9 L	
	Modelamiento estructural	*Tt*LPMO9 K	Estructura 3D
		*Tt*LPMO9 L	
Dependientes	Expresión de las proteínas recombinantes activas	*Tt*LPMO9 K	Gel SDS-PAGE y ensayo em 2,6 DMP
		*Tt*LPMO9 L	

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

CAPITULO I

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

1. MARCO TEÓRICO

1.1 LPMOs

Las LPMOs son enzimas oxidativas dependientes de cobre esenciales en la degradación de la biomasa lignocelulósica. Estas enzimas están ampliamente distribuidas en la naturaleza, presentes en bacterias, hongos, virus, insectos y algunos animales (9). Los hongos filamentosos, tanto basidiomicetos como ascomicetos, son reconocidos como los principales degradadores de biomasa vegetal y los principales organismos que codifican LPMOs. Estas desempeñan un papel crucial en la degradación de diversos polisacáridos, como celulosa, quitina, xiloglucano y almidón (10). Su función principal es catalizar la hidroxilación de las cadenas glicosídicas, lo que altera la superficie de los polisacáridos recalcitrantes y facilita su despolimerización por enzimas hidrolíticas, como las celulasas (11,12).

1.1.1 Clasificación

En la base de datos de enzimas activas de carbohidratos (CAZymes), las LPMOs se clasifican como enzimas de actividad auxiliar (AA) (13). Basándose en las similitudes en las secuencias de aminoácidos de las LPMOs, su origen (hongos filamentosos, bacterias, virus e insectos) y su mecanismo de acción, los análisis *in sílico* han agrupado estas enzimas en ocho familias: AA9, AA10, AA11 (14), AA13, AA14 (15), AA15, AA16 (16) y AA17 (17). Además, las LPMOs de diferentes familias presentan una alta especificidad de sustrato, que incluye polisacáridos altamente cristalinos como la celulosa y la quitina, así como almidón, pectina y oligosacáridos solubles (Tabla 2).

En cuanto a la degradación y modificación de la lignocelulosa, las LPMOs pertenecientes a las familias AA9, AA10, AA15 y AA16 se especializan en la oxidación de la celulosa. Las familias AA9 y AA14 incluyen LPMOs con actividad sobre la hemicelulosa (15,18), mientras que la familia AA17 contiene LPMOs con actividad sobre la pectina (17). Actualmente, se han depositado más de 80 estructuras tridimensionales de LPMOs en la base de datos de proteínas (PDB, Protein Data Bank – https://www.rcsb.org/).

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Tabla 2. Familias de las LPMOs, fuentes de origen, mecanismo de acción y estructuras depositadas en el PDB.

Familia AA	Fuente	Especificidades del sustrato	Regioselectividad	N° de estructuras cristalinas
9	Hongos	Celulosa Celo-oligosacáridos Glucomanano Glucano de enlace mixto Xilano Xilo-oligosacáridos Xiloglucano	C1-C4 específico de C1 mixto C1-C4 específico	17
10	Bacterias Hongos Plantas Animales Arqueas Virus	Quitina/Celulosa	C1-C4 Mixto específico para C1	22
11	Hongos	Hongos	Homogalacturano Poligalacturano	1
13	Hongos	Almidón (enlace α-1,4)	específico para C1	1
14	Hongos	Xilano	específico para C1	1
15	Vírus Eucariotas	Quitina/Celulosa	específico para C1	1
16	Hongos	Celulosa	específico para C1	–
17	Hongos	Homogalacturano Poligalacturonasa	específico para C4	1

Fuente: Extraído y adaptado de Forsberg, et al. (19)

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Entre todas las familias de LPMOs, la familia AA9 se destaca como una de las más representativas, debido a su capacidad para catalizar la escisión oxidativa de los enlaces glicosídicos en la celulosa, especialmente en las regiones cristalinas. Esta acción mejora la eficiencia de las celulasas durante el proceso de sacarificación (20,21). Esta familia está ampliamente distribuida en hongos y presenta diversas isoformas que varían en su especificidad de sustrato y regioselectividad. Estas enzimas pueden promover la oxidación en las posiciones C1 (tipo I), C4 (tipo II) y C1/C4 (tipo III) del enlace glicosídico. La variedad de LPMOs en la familia AA9 facilita la creación de cócteles enzimáticos y el desarrollo de nuevas estrategias de bioprocesamiento para diversas aplicaciones (22).

1.1.2 Estructura

En términos de estructura, todas las LPMOs se asemejan a la estructura de las inmunoglobulinas con un núcleo formado por hojas β antiparalelas, dando una forma cónica y piramidal. Entre los segmentos que componen esta estructura central en forma de hoja, las LPMOs poseen varios loops de longitudes variables que configuran la superficie de unión al sustrato alrededor del sitio activo. Estos loops desempeñan funciones clave, como la coordinación del sitio activo, la especificidad en la unión al sustrato, la flexibilidad estructural y la interacción con otras enzimas (19,23).

La región de unión al sustrato contiene un núcleo de cobre bivalente que proporciona estabilidad estructural. Este núcleo está compuesto por un brazo de histidina (His) junto con otros dos residuos de histidina y tirosina, formando una estructura en forma de "T", que coordinan el cobre en el sitio catalítico (20,24), como observado en la Figura 1. Los dos nitrógenos involucrados provienen del grupo amino de la histidina y de la cadena lateral del imidazol, mientras que el tercero es aportado por la tirosina conservada. Los iones de cobre obtienen electrones de un donante externo y utilizan la transferencia interna de electrones para reducir el oxígeno unido (25,26).

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

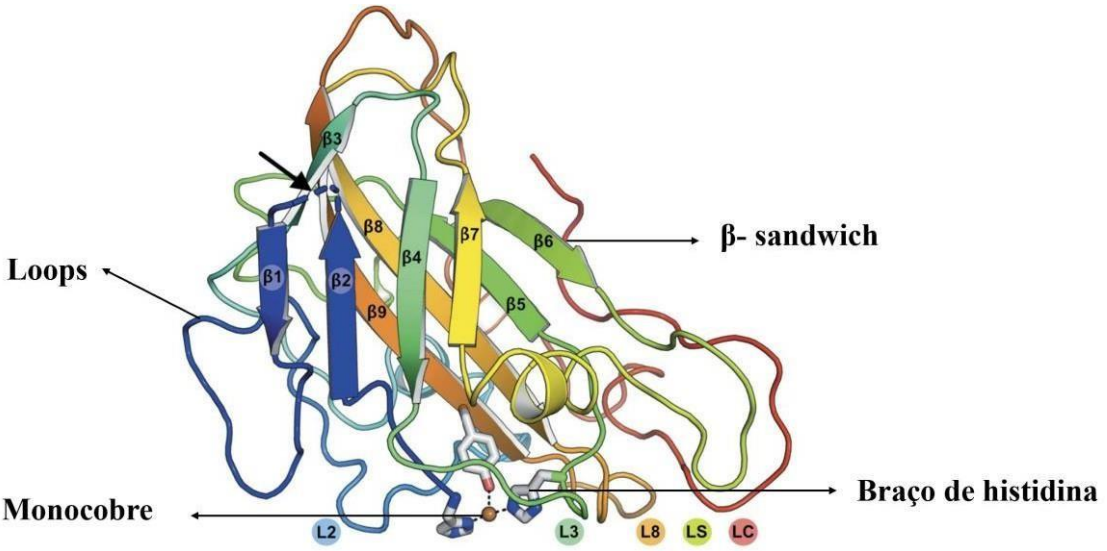


Figura 1. Representación esquemática de la estructura de una LPMO. La estructura está coloreada de azul a rojo desde el N-terminal hasta el C-terminal. El ion de cobre y los residuos que lo coordinan están presentados. Los loops que forman la superficie plana comprendiendo la cara de unión del sustrato están marcados (L2, L3, L8, LS y LC). El núcleo formado por hojas β antiparalelas se muestra como (β1, β2, β3, β4, β5, β6, β7, β8 y β9).

Fuente: Extraído y adaptado de Calderaro, et al. (8)

1.1.3 Mecanismo de acción y regioselectividad en celulosa.

Las LPMOs requieren un sustrato específico para su acción, que puede incluir polisacáridos como celulosa, quitina o xilano. Adicionalmente, es esencial la presencia de un cosustrato, como O_2 o H_2O_2, aunque la preferencia de estas enzimas por uno u otro sigue siendo un tema de discusión (27). Para que ocurra una reacción monooxigenasa, las LPMOs necesitan recibir dos electrones externos por cada ciclo catalítico, lo que activa el oxígeno (Ecuación 1) (12,26,28). Por otro lado, para una reacción peroxigenasa, solo se requiere un electrón para reducir LPMO-Cu (II) a LPMO-Cu(I), llamado "*priming reduction*". Después de la reducción inicial, la enzima puede llevar a cabo múltiples reacciones de peroxigenasa (Ecuación 2) (43,44). Estudios recientes sugieren que el peróxido de hidrógeno proporciona una mayor velocidad de reacción en la actividad enzimática (29)

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

$$R - H + O_2 + 2e^- + 2H^+ \xrightarrow{Cu\ (II)} R - OH + H_2O$$ Ecuación 1

$$R - H + H_2O_2 \xrightarrow{Cu\ (I)} R - OH + H_2O$$ Ecuación 2

Además de un sustrato polisacárido y un cosustrato que contenga oxígeno como O_2 o H_2O_2, las LPMOs requieren un reductor, es decir, un donante externo de electrones. Estos donantes pueden ser compuestos no enzimáticos y de bajo peso molecular, como ácido ascórbico, ácido ferúlico, cisteína, ácido gálico u otros derivados de lignina (7). Adicionalmente, este donador de electrones puede ser facilitada por donantes enzimáticos, como la celobiosa deshidrogenasa (CDH), que es la principal pareja redox de las LPMOs y dona electrones directamente para su activación inicial. Otro donador enzimático es el glutamato deshidrogenasa (GDH), interviene en la mediación de electrones, favoreciendo las reacciones de las LPMOs a través de la oxidación de glucosa para reciclar mediadores redox fenólicos (30,31). Por último, también existen sistemas de donación de electrones activados por luz, en los que las LPMOs se asocian con pigmentos y agentes reductores que, al ser iluminados, aumentan su actividad catalítica (32,33).

En una reacción peroxigenasa con H_2O_2, el mecanismo de acción comienza cuando LPMO-Cu(II) en estado de reposo pasa a un estado catalíticamente activo LPMO-Cu(I) (8). El átomo de Cu(I) reducido por el electrón externo, procedente del agente reductor, actúa posteriormente con H_2O_2 en presencia del sustrato, provocando la hidroxilación y la ruptura del enlace glicosídico. Cuando el sitio activo de LPMO está libre de polisacáridos, LPMO-Cu(I) puede re-oxidarse mediante H_2O_2 a LPMO-Cu(II) (27). El hidróxido resultante asociado con Cu(II) se une al sustrato a través de un mecanismo de recuperación, lo que lleva a su hidroxilación y la regeneración del cobre en el sitio catalítico de la enzima. Luego, el polisacárido hidroxilado formado puede sufrir un reordenamiento molecular, lo que conducirá a la formación de lactona y la escisión concomitante del enlace. Al final del ciclo catalítico en la Figura 2, el estado Cu(I) se conserva y la enzima puede potencialmente entrar en un nuevo ciclo catalítico o oxidarse mediante reacciones no productivas con oxidantes.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

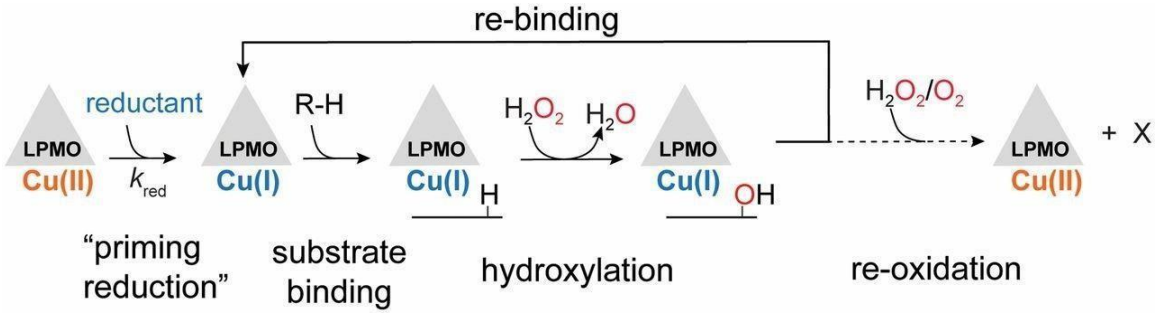


Figura 2. Esquema de reacción simplificada de peroxigenación de una LPMO AA10. **Fuente:** Extraído de Bissaro, et al. (34)

Las LPMOs exhiben una alta regioespecificidad en la celulosa, atacando la estructura cristalina mediante la hidroxilación de los carbonos C1, C4, o ambos (C1/C4) en la molécula de glucosa (35). La cadena de celulosa se rompe cuando los carbonos C1 o C4 del anillo de azúcar son oxidados, produciendo ácido aldónico, cetoaldosas, y en algunos casos, oligosacáridos. Esta regioespecificidad varía según la familia de LPMO, con la mayoría de las familias mostrando selectividad por el carbono C1. Sin embargo, la familia AA9, que es la más numerosa, es capaz de oxidar tanto C1 como C4 en la celulosa (36). Dependiendo de la especificidad de la enzima, puede producir una variedad de productos, como oligosacáridos nativos, oxidados, doblemente oxidados, o oxidados en C1 (19).

1.2 Expresión heteróloga de LPMO

La producción de enzimas para aplicaciones industriales exige hospedadores que faciliten una escalabilidad sin complicaciones, asegurando al mismo tiempo que las enzimas se obtengan en alta concentración y pureza. De esa forma, la expresión homóloga para la producción de proteínas destinadas a la caracterización y aplicaciones biotecnológicas, no es una opción viable, debido a los bajos rendimientos de proteínas como las LPMOs (37). Por lo tanto, la expresión heteróloga se destaca como una herramienta molecular indispensable para la producción a gran escala de enzimas, desempeñando un papel fundamental en la utilización de LPMOs, como en la sacarificación de biomasa lignocelulósica (38). La selección del organismo hospedador adecuado para la expresión heteróloga de LPMOs es igualmente crucial para lograr una expresión y producción exitosa. Este proceso requiere una consideración cuidadosa de factores como el reconocimiento de exones e intrones, la similitud en las vías de secreción y las diferencias en las modificaciones postraduccionales entre el organismo nativo y el hospedador de expresión (37). Generalmente, la expresión

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

heteróloga de LPMOs se realiza a partir de bacterias u hongos, destacando *Escherichia coli* como la cepa bacteriana en la que se expresa la mayoría de las LPMOs, y *Pichia pastoris* como la levadura donde se produce la mayor parte de las LPMOs de origen fúngico, incluyendo especies como *Aspergillus oryzae, Trichoderma reesei, A. nidulans* y *Myceliophthora thermophila* (37,39), Figura 3.

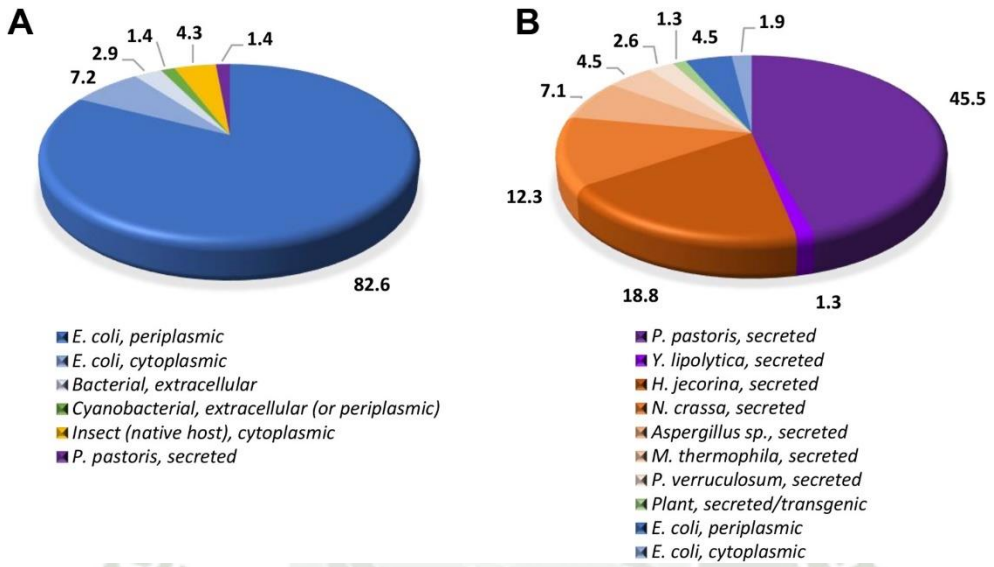


Figura 3. Porcentaje de diferentes sistemas de expresión relativos para la producción de A) LPMOs bacterianos y virales, y B) LPMOs eucarióticos.

Fuente: Extraído de Gaber, et al. (37)

Varias de estas cepas se utilizan en la industria para la producción de cócteles de enzimas degradadoras de biomasa y derivan de microorganismos nativos que han sufrido varias modificaciones y son deficientes en la producción de celulasas, dependiendo el rendimiento y la producción de LPMO de la cepa de expresión usada (40,41).

Una ventaja significativa de los sistemas de expresión eucariotas sobre los bacterianos es que, en los primeros, el gen de interés se integra en el ADN cromosómico, lo que elimina la necesidad de un marcador de selección para retener el plásmido con el gen deseado después de haber seleccionado la cepa productora (37). Dentro de estos sistemas eucariotas, *Pichia pastoris* se destaca como una de las cepas más comúnmente utilizadas para la expresión heteróloga de LPMOs, especialmente las de tipo AA9, debido a su alta eficiencia de secreción, fácil manipulación genética y capacidad para realizar modificaciones postraduccionales, como la glucosilación y la formación de enlaces disulfuro (7,42).

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Sin embargo, *P. pastoris* presenta una limitación importante: no puede realizar la metilación de la histidina después de la eliminación del péptido señal en sus modificaciones postraduccionales, debido a la falta de metiltransferasas (20,42). Aunque este factor no afecta directamente la actividad de las LPMOs, la metilación de la histidina contribuye a aumentar la resistencia al H_2O_2, la estabilidad oxidativa de la proteína y prolonga la vida útil de las LPMOs (42,43). Por ello, la expresión de LPMOs en hongos filamentosos ofrece una alternativa ventajosa, ya que estos organismos no solo pueden realizar la metilación de la histidina N-terminal, sino que también aseguran el correcto procesamiento del péptido señal nativo, permiten una alta secreción de la proteína de interés en el espacio extracelular y facilitan una glucosilación del péptido linker de LPMOs multidominio similar a la nativa, lo que resulta en un buen rendimiento proteico (37,44).

Dentro de los hongos filamentosos más comúnmente utilizado como hospedador está el *Aspergillus oryzae* y varias cepas de *A. oryzae* para la producción de LPMOs. Utilizando el péptido señal nativo, el gen de interés suele expresarse bajo el control de un promotor del hospedador (44–46). Por otro lado, el hongo *A. nidulans* utilizado en el presente trabajo también se destaca como un organismo modelo desde el punto de vista genético y molecular, debido a su facilidad de manipulación y porque cuenta con varios estudios relacionados con su metabolismo, desarrollo y regulación celular (47). Debido a las características de este microorganismo y su capacidad para producir grandes cantidades de proteínas heterólogas, fue seleccionado como sistema de producción de LPMO. Así mismo, con el fin de aumentar la expresión y secreción de las proteínas recombinantes en *A.nidulans*, Segato, et al. (48) desenvolvió el vector pEXPYR. Este vector fue construido baseado en el vector pUC19 de *E.coli*, el cual posee un promotor de glucoamilasa (glaA) inducido por maltosa. Adicionalmente contiene marcadores de selección que le dan resistencia a ampicilina y zeocina. Como marca auxotrófica para *A.nidulans*, el vector pEXPYR posee el gen pyrG que corrige la sistensis de pirimidinas y la presencia de este gen en el vector se utiliza para revertir la auxotrofia de *A. nidulans A773* (pyrG) (48) (Figura 4).

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

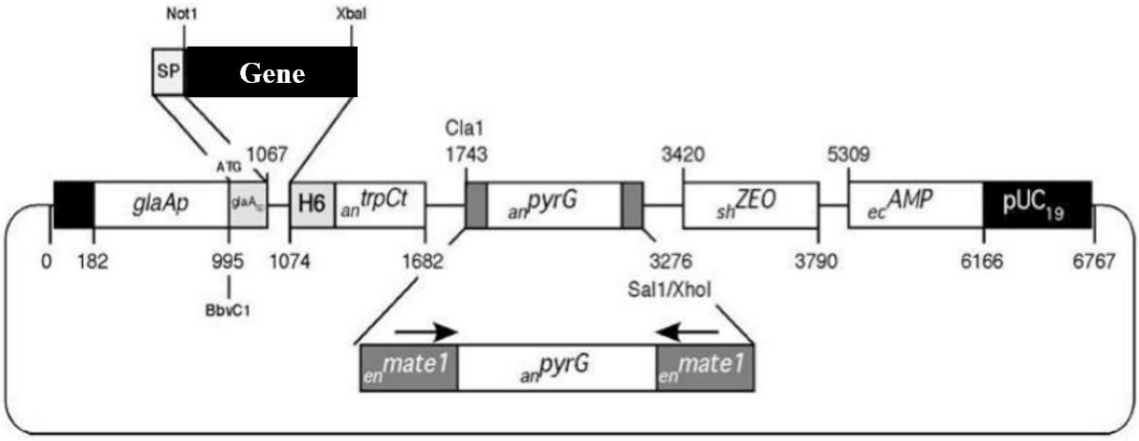


Figura 4. Vector pEXPYR usado para la superexpresión y secreción de proteínas recombinantes del género de Aspergillus.

Fuente: Extraído de Segato, et al.(48)

Actualmente, según lo reportado en la literatura sobre LPMOs, la cepa *Aspergillus nidulans* ha demostrado ser eficaz en la expresión y producción de cinco LPMOs AA9 de diferentes hongos (Tabla 3). En cuanto a las LPMOs de *Thermothielavioides terrestris* expresadas en este trabajo, es relevante destacar las variantes conocidas, como *Tt*LPMO9A, *Tt*LPMO9B, *Tt*LPMO9E, *Tt*LPMO9G y *Tt*LPMO9T (49), que fueron expresadas heterólogamente en *Pichia pastoris*. Estas presentaron una expresión a las 72h con padrones de glucosilación que aumentaron el tamaño de la proteína en un rango de 10 a 20 kDa.

Tabla 3. Expresión de LPMOs AA9 basadas en la cepa de expresión y organismo fuente.

Cepa de expresión	Familia CAZy	Organismo fuente	Vector de expresión	Gen	Ejemplo	Ref.
A. nidulans	AA9	*Aspergillus nidulans* FGSC A78	pEXPYR	cDNA	AN3046	(50)
	AA9	*Myceliophthora thermophila* M77	pEXPYR	ADN genómico	*MYCTH_79765 y MtLPMO9J*	(51)

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

	AA9	*Aspergillus fumigatus*	pEXPYR	ADN genómico	*Af*AA9A y *Af*AA9B	(52)
P.pastoris	AA9	*Thermothielavioides terrestris* LPH172	pPICZa	ADN genómico	*Tt*LPMO9 (A,B,G,T,U)	(49)

1.3 LPMOs de hongos filamentosos

El reciclaje de carbono lo llevan a cabo varios microorganismos en la naturaleza, que llevan a cabo la degradación de la biomasa vegetal mediante la acción complementaria y sinérgica de múltiples enzimas activas en carbohidratos (CAZymes) (53,54). Entre estos, los hongos filamentosos destacan como uno de los degradadores más eficientes, debido a su sistema enzimático extracelular altamente específico para los sustratos que encuentran (55), su capacidad para penetrar sustratos a través de sus hifas permite una colonización más eficiente. Los hongos filamentosos son de gran interés industrial porque son capaces de secretar altos niveles de varias enzimas activas en carbohidratos y constituyen la principal fuente de uso en cócteles de enzimas comerciales (56).

En el subreino Dikarya, los hongos filamentosos se encuentran en los filos Ascomycota y Basidiomycota. Estos representan la gran mayoría de los hongos terrestres incluidos mohos, hongos, royas y levaduras (57,58). Los microorganismos que se encuentran tanto en el filo Ascomycota como en Basidiomycota se conocen como las principales causadores de la pudrición parda y blanca. La mayoría degradan tanto la lignina como la celulosa y algunos eliminan selectivamente la lignina dejando la celulosa (57). Todos los hongos pertenecientes a estos filos, como *T.reesei, N. crassa, A. flavus, A.niger*, *A. nidulans, A. fumigatus, T. terrestris, T. versicolor, C. subvermispora*, se componen de varias familias que tienen las hifas filamentosas o unicelulares con un flagelo ausente (58). Dado que estos hongos son eficientes en la degradación de polisacáridos en ambientes naturales o controlados, incluso en tejidos altamente lignificados (59) se destaca la importancia de estudiar la variedadde familias de proteínas funcionales y genes que codifican LPMO (60).

En el subreino Dikarya y en la mayoría de los linajes de hongos divergentes, las LPMO AA11, activos en quitina, son los más extendidos. Después de ellos, LPMO AA9 son la segunda familia más extendida de hongos, especialmente en Ascomycota y Basiodiomycota, donde el 57,5% son basidiomicetos y el 76,6% son ascomicetos que tienen uno o más genes AA9 (61)

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

(Figura 5). Considerando que las LPMO AA9 oxidan una amplia variedad de polisacáridos vegetales (62), la complejidad de las paredes celulares de las plantas puede explicar la multiplicidad de LPMO AA9 en el subreino Dikarya (63). Esto se debe a que comprenden predominantemente degradadores de biomasa vegetal, simbiontes de plantas y patógenos de plantas (61) . La Figura 4 muestra la aparición de familias LPMOs en hongos.

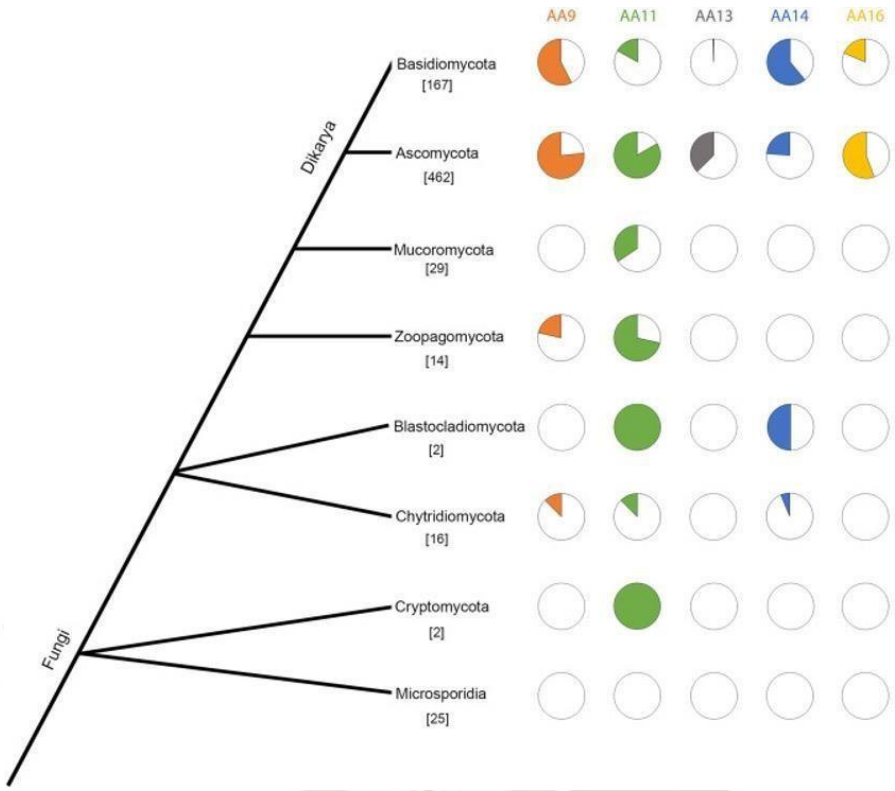


Figura 5. Árbol filogenético de la ocurrencia de LPMOs fúngicas (AA9, AA11, AA13, AA14 y AA16) y proteínas similares a LPMO en filos fúngicos, presentadas a través de gráficos circulares en un árbol filogenético. Los números entre paréntesis representan el número de proteomas individuales depositados en la base de datos UniProt Reference Proteomes para el filo dado. Los gráficos circulares muestran la proporción de proteomas que contienen una o más copias de una determinada familia de proteínas.

Fuente: Extraído de Frommhagen, et al. (61)

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Los hongos termófilos, *Thermothielavioides terrestris*, se presentan como una fuente prometedora de enzimas termoestables capaces de descomponer eficientemente la biomasa lignocelulósica. Esta capacidad inherente los convierte en valiosos para una variedad de aplicaciones industriales (64,65). El genoma de *T. terrestris* alberga una cantidad significativa de genes que codifican enzimas activas sobre carbohidratos (CAZymes). Por ejemplo, las bases de datos anotan un total de 474 genes de CAZymes, incluyendo 209 glicosyl hidrolasas (GHs), 91 glucosil transferasas (GTs), 5 liasas de polisacáridos (PLs), 27 esterasa de carbohidratos (CEs), 61 enzimas con actividades auxiliares (AAs) y 81 módulos de unión a carbohidratos (CBMs) (66).

Dentro del extenso repertorio enzimático que posee *T. terrestris* para degradar todo tipo de polisacáridos de la pared celular vegetal, las LPMOs emergen como enzimas de actividad auxiliar (AA). Las LPMOs ahora son reconocidas como enzimas oxidativas que actúan sobre la biomasa lignocelulósica, especialmente la celulosa (8). El descubrimiento constante de la diversidad de familias de LPMOs expresadas durante la degradación fúngica de la pared celular vegetal amplía nuestra comprensión y revela la afinidad principal de cada familia por diferentes polisacáridos. Actualmente, se reconocen ocho familias, siendo la familia AA9 la segunda más prevalente en hongos, seguida de la familia AA11 como la más común (60).

Durante el crecimiento de *Thermothielavioides terrestris* en diferentes sustratos lignocelulósicos, se transcriben varios genes de LPMOs. *T. terrestris* típicamente codifica 18 genes de LPMO AA9, 5 genes de LPMO AA11 y 1 gen de LPMO AA16 (67). El número considerable de LPMOs AA9, especialmente en *T. terrestris*, representa una característica industrialmente significativa, mostrando una mayor estabilidad térmica en condiciones extremas a 50 °C y tolerancia a condiciones ácidas a pH 3 (66). Las características únicas de la actividad de las LPMOs AA9 resultan esenciales para aplicaciones en la producción de biocombustibles, la industria de pulpa y papel, entre otros sectores. La expresión de nuevas LPMOs de hongos filamentosos, como en el caso de *T. terrestris*, facilitará el estudio detallado de sus diversas actividades oxidativas en la degradación de material vegetal.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

1.4 Papel de las LPMOs en la biomasa lignocelulósica

La biorrefinerias tradicionales tiene como uno de los procesos más importantes para la conversión de biomasa lignocelulósica a la sacarificación. Este paso esencial ayuda a la liberación de azucares simples a partir de la ruptura de las largas cadenas de polisacáridos, como la celulosa y la hemicelulosa, que luego simultáneamente pasan a ser fermentados para producir bioetanol y otros productos químicos de valor. Dentro de este proceso de sacarificación de los polisacarideos recalcitrantes, está bien establecido el papel de las (GHs) (68). No obstante, desde el descubrimiento de las enzimas oxidativas LPMOs, este proceso aumentó significativamente el rendimiento de la obtención de azucares, actuando en sinergismo con las GHs (38). Estas enzimas oxidativas dejan más susceptible las regiones cristalinas de difícil acceso de la celulose, liberando fragmentos insolubles con menor tamaño y grado de polimerización, lo que permite que las celulasas actúen sobre estas regiones y promuevan una hidrolisis más rápida y completa (69).

Desde entonces, las LPMOs han adquirido un papel crucial en la industria biotecnológica, siendo reconocidas como componentes esenciales en la nueva generación de cócteles enzimáticos comerciales (70). Gracias a su capacidad para mejorar los procesos en sinergia con las celulasas, se han realizado significativas inversiones tanto por parte de gobiernos, como el Departamento de Energía de los Estados Unidos, como del sector privado, como Novozymes, para integrar estas enzimas en los procesos de bioconversión (71,72). Su integración en los cocteles tuvo grandes ventajas como el incremento en los rendimientos de sacarificación. Muchos estudios demostraron mejoras del 30% en la sacarificación del material lignocelulósico de diferentes fuentes y utilizando diferentes LPMO (73). Desde el estudio de Harris, et al.(72) la relevancia comercial de las LPMOs se destacó por reportar una disminución del 50% en la necesidad de enzimas para la hidrólisis de biomasa al combinar el extracto de celulasas de la cepa comercial *Trichoderma reesei* con LPMOs. De esa misma forma Lo Leggio, et al. (74) destaco el más alto efecto sinérgico al lograr incorporar LPMO de *Aspergillus nidulans* (AnLPMO) y β-amilasa comercial, en almidón retrógrado y L-cisteína como sustrato celulósico y reactivo reductor. Como otro ejemplo también se tiene a Jagadeeswaran, et al. (50) que investigó el efecto sinérgico de AnLPMO en la sacarificación de rastrojo de sorgo, mostrando que la endoglucanasa sola liberó 4 mg/L de glucosa, mientras que una mezcla de endoglucanasa/AnLPMO y celobiohidrolasa produjo 8,4 mg/L de glucosa. Adicionalmente otro claro ejemplo es la LPMO de *Aspergillus fumigatus* (AfLPMO) que al ser añadido a un cóctel de celulosa comercial (Celloclast® 1,5 L), la eficiencia de sacarificación del bagazo de caña de

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

azúcar pretratado aumentó en un 22% (75). Por otro lado, este efecto potencializador fue observado en diferentes sustratos sujetos a diferentes pretratamientos. Dentro de esos se tiene al rastrojo de maíz (36), trigo (76), residuos de soja (77), paja de sorgo (50) y caña de azúcar (78).

En la degradación de la biomasa, además de la sinergia de las LPMOs con las celulasas, también se comprobó que las LPMOs trabajan en conjunto con hemicelulasas y pectinasas para facilitar este proceso (79). De esa forma, se hace importante destacar que dependiendo de las familias de LPMOs estas van a tener un papel especifico en cada región de la biomasa lignocelulósica. Por ejemplo, tanto AA9 como AA14 muestran actividad catalítica sobre la celulosa y hemicelulosa, mientras que la recientemente identificada AA17 tiene actividad catalítica sobre la pectina (80). Por lo tanto, investigaciones futuras podrían explorar la combinación de diferentes familias de LPMOs con celulasas, hemicelulasas, pectinasas e incluso lacasas (enzimas degradadoras de lignina), con el objetivo de desarrollar un cóctel enzimático rentable y eficaz para la conversión de biomasa (80).

Además de la celulosa y la hemicelulosa, las LPMOs también mostraron ser activas en la fracción más recalcitrante y de difícil degradación que es la lignina. Se pensaba que una eliminación completa de la lignina era deseable en los procesos de sacarificación enzimática, pero después de la inserción de LPMOs cambió este escenario, ya que la lignina residual en el material puede activar los LPMOs, evitando el uso de reductores externos (81,82). Los derivados de la lignina actúan como donadores de electrones para activar el ciclo catalítico de la LPMO. Por otro lado, también se destaca otros estudios recientes que muestran que algunas LPMOs AA9 tienen la capacidad de quebrar uno de los enlaces más abundantes de la lignina como el β-O-4, visto por Bhatia, et al. (83)

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

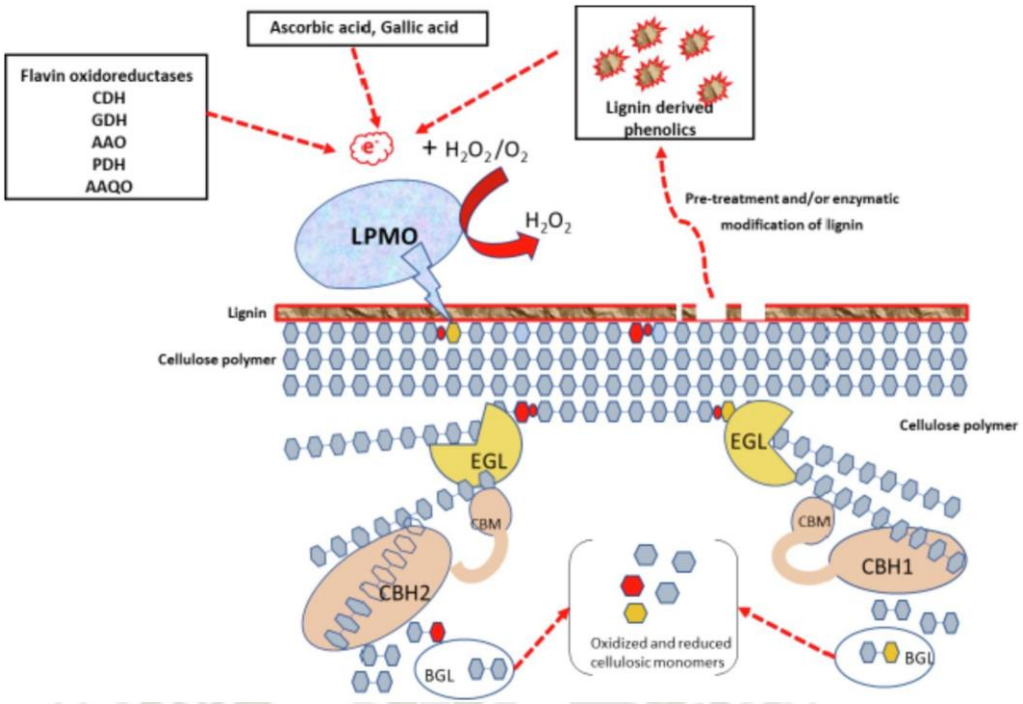


Figura 6. Acción de las LPMOs y glucosil hidrolasas (GHs) en la degradación de lignocelulosa.

Fuente: Extraído de Singhania, et al. (7)

1.5 Otras aplicaciones de las LPMOs

Las LPMOs desempeñan un papel crucial en la producción de nanofibras de celulosa (84,85) y son objeto de amplias investigaciones en sectores como la farmacéutica, la alimentación, la biotecnología, la química y el almacenamiento de energía, gracias a sus sobresalientes propiedades mecánicas (86,87). Estas nanofibras destacan por su resistencia mecánica, superficie química modulable, baja toxicidad, biodegradabilidad y biocompatibilidad (88). Tradicionalmente, las nanofibras se han fabricado mediante procesos químicos y tratamientos mecánicos intensivos, los cuales tienen un gran impacto ambiental (80). Sin embargo, los métodos biológicos ofrecen una alternativa más ecológica como los estudios revelados de la digestión enzimática de la celulosa utilizando LPMOs, que promueven eficazmente la producción de nanofibras (89–91). Las LPMOs pueden debilitar la cohesión entre las fibras, facilitando su ruptura mientras se mantiene el grado de cristalización de la celulosa, lo que permite procesar las fibras para la obtención de nanofibras (88).

Además de su aplicación en polímeros como la celulosa, estudios recientes han revelado que

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

las LPMOs desempeñan múltiples roles en procesos infecciosos. En plantas, los hongos patógenos y oomicetos emplean estas enzimas para penetrar las paredes celulares y degradar pectinas, favoreciendo la infección y la patogénesis (92,93). Como defensa insecticida, el helecho *Tectaria macrodonta* produce LPMOs que impiden la maduración de larvas mediante degradación oxidativa, protegiéndose de infecciones por insectos. Asimismo, se ha identificado la participación de LPMOs en infecciones humanas, lo que sugiere su potencial en futuras aplicaciones clínicas para combatir patógenos (94,95).

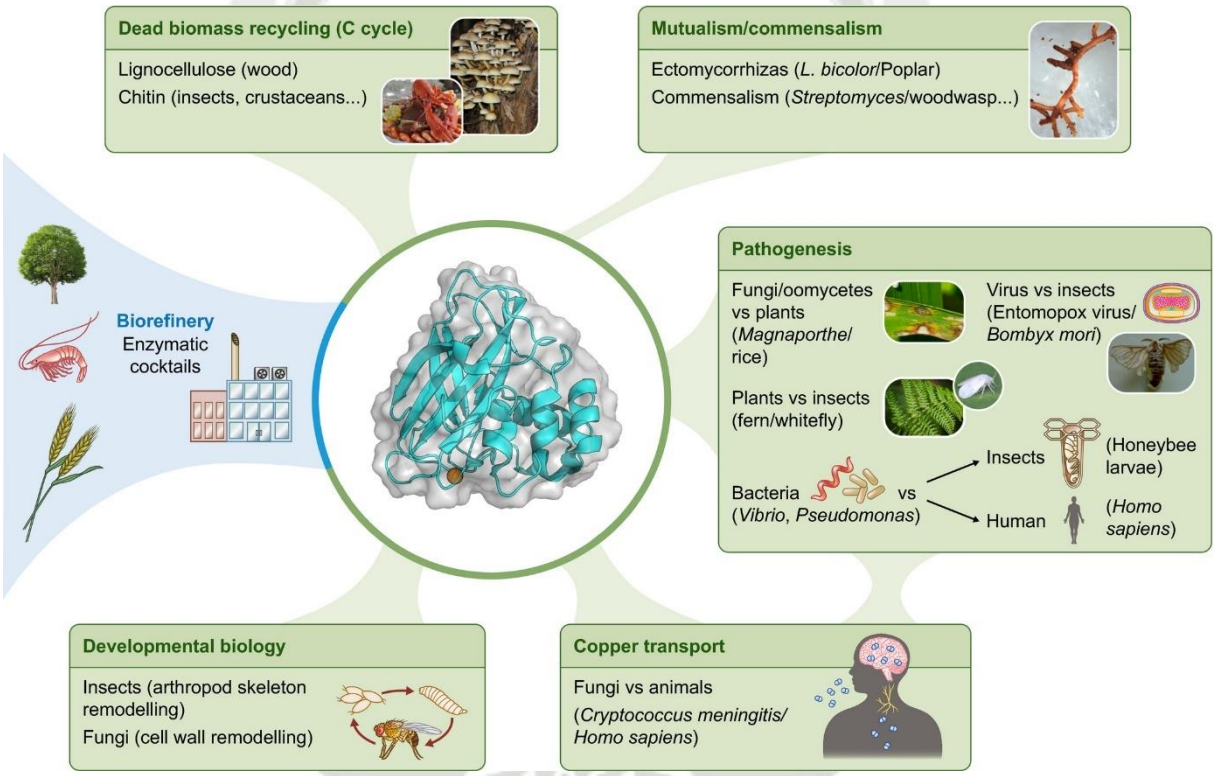


Figura 7. Funciones biológicas y aplicaciones de las LPMOs. Azul: LPMOs involucradas en cócteles enzimáticos para procesos de biorrefinería. Verde: LPMO utilizadas en el reciclaje del carbono, patogénesis en plantas, insectos y humanos, remodelación celular en hongos y artrópodos, transporte de cobre, y relaciones mutualistas/comensalistas.

Fuente: Extraído de Vandhana, et al. (96)

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

CAPITULO II

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular y Sintética de la Escola de Enghenaria de Lorena de la Universidad de São Paulo.

2.2 MATERIALES

2.2.1 Material Biológico

- ADN *Thermothielavioides terrestris*
- *E.coli* turbo
- Cepa de *A.nidulans*
- Lisozima
- Phusion Polimerasa
- DNA ligasa
- Exonucleasa

2.2.2 Insumos y Reactivos

- Solución salina (Buffer de sal)
- SDS (dodecil sulfato sódico)
- Tris EDTA
- NaCl
- Medio PDA
- Mg2Cl
- DMSO (dimetilsulfóxido)
- Medio LB
- Piridoxina
- Uracilo
- Uridina
- Maltosa
- PEG 4000
- STC 50
- Mycelium wash

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

- TSS
- Kit DNA purificacion de miniprep
- Sorbitol
- KCl
- Alcohol isoamílico
- 2,6 dimetoxiphenol
- Gel de agarosa
- Gel de poliacrilamida
- Temed
- Agua sanitaria

2.2.3 Aparatos y Equipos

- Termociclador
- Balanza analítica
- Shaker
- Baño María
- Autoclave
- Amicon con membrana de 10kda
- Concentradores Vivaspin
- Cubetas de electroforesis para DNA
- Cubetas de electroforesis para proteina
- Centrifuga
- Placas Petri de 500 ml
- Placas Petri de 25 ml
- Espectrofotómetro UV-Visible
- Cámara de flujo
- Estufas
- Columna cromatográfica DEAE- Sepharose L6B
- Balanza analítica

2.2.4 Softwares

- Alphafold
- Aplhafill

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

- Pymol
- ChimeraX
- Mega

2.3 MÉTODOS

2.3.1 Selección y obtención de las secuencias de genes de LPMOs

Las secuencias de LPMO de interés se obtuvieron a través de la plataforma JGI- Mycocosm, donde se encontró dentro de la familia AA9, 19 genes que codifican LPMOs para el hongo *Thermothielavioides terrestris.* De las cuales se analizó las secuencias de nucleotídeos de *Tt*LPMO9K y *Tt*LPMO9L, seguidamente se usó *blastx translate nucleotide-protein*, para obtener las proteínas de interés de cada una. Para conocer los dominios, estructura desordenada y saber si posee la región *Carbohydrate Binding Model* (CBM), se insirió la secuencia de la proteína en el software IUPread2A. Adicionalmente con el uso de banco de datos de NCBI se consiguió identificar también, el péptido señal, dominio de la proteína y la región de CBM. Para conocer las características de cada proteína como peso molecular, peso isoeléctrico y coeficiente de extinción molar se utilizó la herramienta de Protparam.

2.3.2 Modelaje y análisis estructural

El modelaje para la predicción de cada una de las proteínas en 3D, se hizo utilizando la herramienta *AlphaFold2* (97). Seguido de eso se utilizó la herramienta *Alphafill* (98), para hacer la correcta inserción del cobre en el sitio catalítico de la proteína. Cada predicción modelada de las proteínas se guardó en el formato pdb y se visualizó en el software ChimeraX. Seguidamente cada una de las secuencias de proteínas fue alineada con otras 3 LPMOs ya cristalizadas y caracterizadas, encontradas en *Protein data bank* (PDB). Utilizando la herramienta *Clustal omega* se consiguió alinear las secuencias y seguidamente se procedió a identificar los dominios conservados y los *loops* característicos de las de LPMOs.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

2.3.3 Linajes de los hongos utilizados y vector de expresión

En este trabajo se utilizó el linaje de *A. nidulans A773* (pyrG89; wA3; pyroA4), adquirida del Fungal Genetic Stock Center, como sistema de expresión heteróloga. La cepa del hongo ascomiceto *Thermothielavioides terrestris* fue adquirida respectivamente, de la colección de microorganismos del Laboratorio de Biología Sintética y Molecular de la Escuela de Ingeniería de Lorena de la Universidad de São Paulo (EEL-USP). El vector pEXPYR se utilizó para la clonación, sobreexpresión y secreción de la proteína de interés en el hongo filamentoso *A. nidulans A773*. Fue necesaria la linearización y amplificación del vector pEXPYR mediante la técnica de PCR para aumentar el número de copias y proceder con la etapa de construcción del plásmido.

2.3.4 Aislamiento del ADN genómico

Del micelio liofilizado de *T. terrestris,* se colocó una pequeña cantidad en un tubo Eppendorf de 2 ml. Posteriormente, este fue resuspendido con buffer de extracción de ADN y calentado a 65°C durante 15 minutos. Luego, la suspensión se enfrió sobre hielo durante 5 minutos y se añadieron 100 µl de acetato de potasio 8M, invirtiendo el tubo 8-10 veces para homogeneizarla. Después, se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de reacción, repitiendo el proceso de adición de acetato de potasio y centrifugación. Posteriormente, al sobrenadante se le añadieron 300 µl de isopropanol para precipitar el ADN. Tras centrifugar a 13000 rpm durante 15 minutos, se obtuvo un pellet de ADN que se lavó con 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó nuevamente. Se descartó el sobrenadante y el pellet se secó a 42°C durante 1 hora, luego se resuspendió en 50 µl de agua MilliQ que contenía 2 µl de RNAasa (10 mg/ml). La solución se incubó a 65°C durante 30 minutos y posteriormente se verificó la presencia del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa utilizando 3 µl de la muestra. Finalmente, el ADN aislado se almacenó a -20°C. (99).

2.3.5 Construcción de los oligonucleótidos y amplificación de los genes

Las secuencias de nucleótidos obtenidas se utilizaron para el diseño de primers específicos utilizando la herramienta Oligo Analyser Tool de Integrated DNA Technology (www.idtdna.com) y el software Reverse Complement (www.bioinformatics.org) para el diseño de los primers reversos. Al final del diseño de los primers, se añadieron colas

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

complementarias en los primers forward (fwd) y reverse (rev) para realizar el ensamblaje en el vector pEXPYR (48) y se enviaron para su síntesis a la empresa Exxtend Soluciones en Oligos.

La amplificación de los genes se realizó mediante la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) en el termociclador MyCycler T100 (Bio-Rad), utilizando la enzima Phusion DNA polimerasa y los oligonucleótidos iniciadores correspondientes para cada LPMO de interés. Tanto la *Tt*LPMO9K y *Tt*LPMO9L se amplificaron a partir del ADN genómico. Para la reacción de PCR se realizaron 25 ciclos con las siguientes condiciones: 98 °C durante 30", 68 °C durante 30", 72 °C durante 3' y 72 °C durante 10'. El producto de PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v), utilizando como estándar el marcador GeneRuler 1 Kb plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). Las muestras que presentaron una amplificación exitosa, com una banda en el tamaño esperado fueron purificadas con el kit Wizard® SV Gel and PCR System (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

2.3.6 Construcción de los plásmidos

Para la construcción de los plásmidos, el vector pEXPYR necesitó ser linealizado. De esta forma se realizó una reacción conteniendo 5 µl del vector circular (1µg), 1 µl de la enzima Xba I (2000U/ml) (New England Biolabs®), 2 µl de tampón Fast Digest 10X y agua ultrapura hasta un volumen final de 20 µl. La reacción se llevó a cabo en dos etapas: etapa de digestión enzimática con XBal y Notl por 2 horas a 37 °C, seguida de la etapa de inactivación de la enzima por 20 minutos a 65 °C. Posteriormente, el producto de la digestión se purificó con el Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) y se cuantificó en el Nanodrop One C (ThermoFisher).

Para la construcción de los plásmidos se utilizó la metodología de Gibson Assembly (GA), compuesto por la enzima T5 exonucleasa, que elimina los extremos en la dirección 5' → 3', la Phusion® DNA polimerasa, que llena los espacios dejados por la enzima T5, y una Taq DNA ligasa, que promueve la unión entre las regiones homólogas (100). En esta técnica se combinaron 4 µl (aproximadamente 200 ng) del gen de interés de *Tt*LPMO9K y *Tt*LPMO9L por separado, 2 µl del vector pEXPYR (25 ng/µl) y 5 µl de master mix GA (New England Biolabs®); incubando durante 2 horas a 50 °C.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

2.3.7 Transformación bacteriana

El proceso de transformación bacteriana se realizó utilizando la metodología de choque térmico, con células quimio-competentes de *E. coli Turbo* (New England Biolabs®). El producto de la reacción de GA se mezcló con 100 µl de *E. coli Turbo* y se dejó en hielo durante 30 minutos. Luego, la reacción se sometió a un choque térmico en baño maría a 42 °C durante 45 segundos y se colocó inmediatamente en hielo durante 2 minutos. Después de este tiempo, se añadió 1 ml de medio SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression), conteniendo 2% triptona; 0,5% extracto de levadura; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM $MgCl_2$; 10 mM $MgSO_4$ y 20 mM de glucosa. Este fue incubado inmediatamente a 37 °C durante 2 horas bajo agitación a 180 rpm. Luego, el cultivo se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos y se descartó el exceso de sobrenadante. La muestra restante (aproximadamente 100 µl) se transfirió a placas de Petri que contenían medio de cultivo LB (Luria-Bertani) sólido y se añadió 1 µg/ml de ampicilina. Finalmente, las placas se incubaron durante 18 horas a 37 °C para verificar el crecimiento de las colonias.

2.3.8 PCR de colonia y purificación de los plásmidos

Para identificar las colonias que presentaban el vector pEXPYR con el gen de interés, se seleccionaron 10 colonias de cada placa marcada para cada gen de LPMO. Con una puntera de 200 µl se agarraron las colonias seleccionadas una por una y se diluyeron en 10 ul de agua MiliQ, mezclando vigorosamente. Seguidamente utilizando los primers respectivos para cada gen de LPMO se realizó la PCR de colonia para volumen de reacción final de 25 µl. Las condiciones marcadas en el termociclador consistían en 25 ciclos dejando: 98 °C durante 5', 68 °C durante 30", 72 °C durante 1' y 72 °C durante 10'. El producto de la PCR se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en un foto documentador (GelDoc).

Las colonias bacterianas positivas (conteniendo el gen de interés), conteniendo un volumen de 9 µl de la suspensión celular, se inocularon en 10 ml de medio LB líquido, más 1µg/ml de ampicilina, por 24 horas a 180 rpm y 37 °C. Después de este período, las células fueron centrifugadas a 13,000 rpm durante 5 minutos. El pellet formado se sometió a extracción y purificación de los plásmidos, utilizando el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

2.3.9 Transformación de *A. nidulans* mediada por PEG

2.3.9.1 Obtención de protoplastos

La transformación del hongo *A. nidulans* A773 con el plásmido obtenido se realizó de acuerdo con el método de transformación mediado por polietilenglicol (PEG). Para la obtención de los protoplastos, se cultivaron esporas frescas de *A. nidulans* A773 en medio mínimo (5% solución de sales de nitrato 20X; 0,1% elementos traza; 1% glucosa; pH 6,5; 1,9% agar), que contenía piridoxina (1 mg/L), uracilo y uridina (2,5 mg/L cada uno) a pH 6,5 y 37 °C durante 2 días. Después de este período, se inocularon 10^8 esporas/ml en medio mínimo líquido que contenía piridoxina (1 mg/L), uracilo y uridina (2,5 mg/L cada uno) y se mantuvieron a 37°C bajo agitación de 180 rpm durante 18 horas. El micelio resultante se filtró con papel filtro (Whatman n°1) estéril y se lavó con solución DSPS (1,1 M KCl; 0,1 M ácido cítrico; 1 M KOH; pH 5,8). Después del lavado, el micelio se transfirió a un tubo Falcon (50 ml) que contenía 10 ml de DSPS, se añadió 125 mg de lisozima de clara de huevo de gallina (Sigma-Aldrich) y 1,02 g de VinoTaste Pro (Novozymes), y finalmente la mezcla se incubó a 30 °C bajo agitación de 100 rpm durante 2 a 3 horas.

2.3.9.2 Recuperación y lavado de los protoplastos

Los protoplastos obtenidos se lavaron con 40 ml de una solución de 0,6 M KCl y se centrifugaron durante 10 minutos a 2500 rpm a 4 °C. Después, se descartó el sobrenadante y se repitió esta etapa. Luego, los protoplastos se lavaron con 30 ml de STC50 (1,2 M sorbitol; 50 mM CaCl2; 50 mM Tris-HCl; pH 7,5) y se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 100 µl de STC50 por cada gen. La suspensión resultante se transfirió a un tubo estéril de 2 ml y luego se centrifugó a 2400 xg durante 3 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 120 µl de STC50, utilizándose una alícuota para cada gen de interés.

2.3.9.3 Transformación

A los tubos que contenían 120 µl de protoplastos se les añadieron entre 5 y 10 µg de ADN plasmídico y 50 µl de una solución al 25% de PEG 4000 (p/v). La mezcla se incubó en baño de hielo durante 20 minutos y luego se añadió 1 ml de PEG 4000 a temperatura ambiente, mezclando la solución por inversión y dejándola reposar durante 20 minutos. Después, se adicionó 10 ml de STC50 a cada tubo y la solución final se transfirió a placas de Petri (5 placas

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

con 2 ml del producto de transformación en cada una), para cada gen de interés de *Tt*LPMO9K y *Tt*LPMO9L. Las placas contenían medio mínimo con sorbitol 1,2 M y piridoxina 1 mg/L para la regeneración de los protoplastos y zeocina para una mejor selección de los transformantes de 0 a 400 µg/ml. Las placas se incubaron a 30 °C con las tapas hacia arriba durante 24 horas y luego se giraron con el agar hacia arriba y se mantuvieron durante 2 días más en la estufa para el crecimiento de los transformantes.

2.3.10 Selección de los transformantes de *A. nidulans*

Todas las colonias que mostraron crecimiento en el medio de regeneración y selección fueron evaluadas por su capacidad de producción heteróloga de la enzima LPMO de interés. Las esporas de las colonias transformantes se inocularon en placas de Petri que contenían 10 ml de medio inductor (medio mínimo, pH 6.5, que contenía 1 mg/L de piridoxina, 1% de glucosa y 3% de maltosa) y se mantuvieron en modo estacionario a 37 °C durante 48 horas. Después de este período, los extractos se concentraron 20 veces en tubos Vivaspin® de ultrafiltración (Cytiva Healthcare Life Science), con una membrana de corte de 10 kDa, mediante centrifugación a 8000 rpm durante 10 minutos. Luego, los niveles de secreción de la proteína de interés se analizaron mediante la visualización en Gel SDS-PAGE al 15% y, posteriormente, se tiñeron con azul brillante de Coomassie (101)

2.3.11 Producción y concentración de las LPMOs recombinantes

Una vez que se consiguió el transformante positivo que expresó LPMO recombinante, se procedió a la etapa de producción de la proteína. En placas de Petri de 250 ml se adicionó medio inductor, medio mínimo pH 6.5 suplementado con 1 mg/L de piridoxina y 3% de maltosa (WE Consultoria). Se inocularon las esporas de los transformantes y se mantuvieron en medio estacionario a 37 °C durante 48 horas. Después del período, el extracto se filtró en una membrana Miracloth® (Merck-Millipore) y se concentró en un concentrador Amicon Stirred Cell (Millipore) con una membrana de polisulfona (PES) con un corte de 10 kDa. Seguido de eso, se equilibró con una solución tampón acetato 100 mM pH 5.5 para *Tt*LPMO9K y tampón fosfato de sodio 100 mM pH 7.5 para *Tt*LPMO9L. El tampón y el pH utilizados fueron específicos para cada LPMO de acuerdo con el valor de su pI, el cual se estimó usando la herramienta bioinformática disponible en el servidor ProtParam. El extracto enzimático se concentró hasta un volumen de aproximadamente 35 ml.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

2.3.12 Purificación enzimática

La purificación consistió en al menos dos etapas: cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión por tamaño. En el primer paso, los extractos concentrados se inyectaron en una columna de intercambio iónico DEAE-Sepharose CL6B (Cytiva Healthcare Life Science), previamente equilibrada con tampón acetato 20 mM pH 5.5 para *Tt*LPMO9K y tampón fosfato de sodio 20 mM pH 7.5 para *Tt*LPMO9L. Las proteínas se eluyeron a partir de un gradiente de concentración de cloruro de sodio (NaCl) de 50-500 mM. Todas las fracciones eluídas después de la aplicación del extracto, se recolectaron y analizaron en Gel SDS-PAGE al 15%, para determinar en qué fracción se eluyó la proteína de interés. En la segunda etapa de purificación, las fracciones conteniendo las LPMO, se concentraron en dispositivos de ultrafiltración Vivaspin® 6 (Cytiva Healthcare Life Science), con una membrana de corte de 5 kDa y a una rotación de 1900 rpm en un rotor Swing Bucket, hasta alcanzar un volumen final de aproximadamente 5 ml. El concentrado se inyectó en una columna cromatográfica de exclusión por tamaño Superdex 75 10/300 acoplada al sistema Äkta Pure M25 (Cytiva Healthcare Life Science). Se recolectaron fracciones de 1 ml que mostraron un pico de absorbancia, como lo indicaba el software Unicorn 7 (Cytiva Healthcare Life Science), las cuales se analizaron en Gel SDS-PAGE al 15%. Las fracciones que presentaban bandas de acuerdo con el peso de cada LPMO se unieron y concentraron.

2.3.13 Cuantificación y evaluación de la actividad enzimática

Las 2 enzimas *Tt*LPMO9K y *Tt*LPMO9L obtenidas tras el proceso de purificación fueron cuantificadas utilizando un Nanodrop One C (ThermoFisher), realizando la lectura a una longitud de onda de 280 nm. La actividad enzimática de cada LPMO se midió siguiendo los parámetros establecidos por Breslmayr et al, (2018). La reacción se compuso de 100 µM de H_2O_2, 1,0 mM de 2,6-DMP, y un tampón fosfato de sodio 100 mM pH 7 a una temperatura de 40 °C, para lograr la máxima robustez y sensibilidad de la enzima. A esta reacción se añadieron 1µM de enzima (2-3 µg), 4 µl (2 mM) de H_2O_2, 2 µl (1µM) de 2,6-DMP y 174 µl de tampón 50mM. Para la reacción control, las enzimas fueron sustituidas por sulfato de cobre. Tras 10 minutos de reacción a una temperatura de 40 °C, se realizó la lectura a 469 nm en un espectrofotómetro Infinite 200 PRO (TECAN).

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

La actividad de la LPMO se definió como la conversión de 1 µmol de coerulignona/min y se calculó utilizando la siguiente ecuación:

Ecuación 1:

$$Abs = \varepsilon\, L\, x\, C$$

Abs: absorbancia;

ε: coeficiente de extinción molar (53,200 $M^{-1}.cm^{-1}$)

L: camino óptico (0,562 cm)

C: concentración molar (µmol)

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

CAPÍTULO III

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Identificación de las secuencias y características bioquímicas de los genes de LPMOs

Los genes de interés que codifican las LPMOs del hongo *T. terrestris* fueron identificados en las bases de datos JGI-MycoCosm y PhycoCosm. Se encontraron 19 genes pertenecientes a la familia AA9 de LPMOs, entre los cuales se seleccionaron la *Tt*LPMO9K, con el acceso "ThiteK_68900", y la *Tt*LPMO9L, con el acceso "ThiteL_128130". También se obtuvieron las secuencias de nucleótidos correspondientes a ambas LPMOs, permitiendo la observación del número de intrones y los pares de bases (pb) para cada una. La *Tt*LPMO9K presentó una longitud de 1253 pb con 3 intrones largos, mientras que la *Tt*LPMO9L tuvo una longitud de 798 pb con 2 intrones (Figura 8). Posteriormente, las secuencias de nucleótidos fueron analizadas utilizando la herramienta Blast protein para traducirlas a sus correspondientes secuencias de proteínas.

A) ***Tt*LPMO9K: 1253 pb**

ATGAGGACGACATTCGCCGCCGCGTTGGCAGCCTTCGCTGCGCAGGAAGTGGCAGGCCATGCCATCTTCCAACAGCTCTGGGTGGACGGCACCGACTATATACGTGCTCCCCT
TTTCCTTTTGTGTTTGCCCATCCTCGATTGATAACCCGAGGCCATCCAATGCTGACTCTTACAGCACGGCTCCTCCTGCGTCCGCATGCCGCTGTCGAACTCGCCCGTCACGAAC
GTCGGCAGCAGGGACATGATCTGCAACGCCGGCACGCGCCCCGTCAGCGGGAAGTGCCCCGTCAAGGCCGGCGGCACCGTGACGGTTGAGATGCACCAGGTGGGCTGATTTC
CTGAGCGTCCTATTCCTCCCGGAAGCCCCTTTCCCATCCTTTGCCCTGGCTAACCCCTCCGCCCCTCCCAGCAACCCGGGGATCGGTCGTGTAACAACGAAGCCATCGGCGGCG
CCCACTGGGGACCGGTGCAGGTGTACCTCAGCAAGGTGGAGGACGCGAGCACGGCGGACGGGTCGACGGGCTGGTTCAAGATCTTCGCGGACACGTGGTCCAAGAAGGCGGG
CAGCTCGGTGGGGGACGACGACAACTGGGGCACGCGCGACCTCAACGCGTGCTGCGGCAAGATGCAGGTCAGATCCCGGCGGACATCCCGTCGGGCGACTACCTGCTGCGGG
CGGAGGCGCTGGCGCTGCACACGGCGGGCCAGGTGGGCGGCGCGCAGTTCTACATGAGCTGCTACCAGATCACCGTGTCGGGCGGCGGCAGCGCCAGCCCGGCCACCGTCAA
GTTCCCCGGCGCCTACAGCGCCAACGACCCGGGCATCCACATCAACATCCACGCGGCCGTGTCCAACTACGTCGCGCCCGGCCCGGCCGTCTATTCCGGCGGCACGACCAAGG
TGGCCGGGTCCGGGTGCCAAGGCTGCGAGAACACGTGCAAGGTCGGCTCGTCGCCCACGGCGACGGCGCCGTCGGGCAAGAGCGGCGCGGGTTCCGACGGCGGCGCTGGGAC
CGACGGCGGGTCTTCGTCTCGAGCCCCGACACGGGCAGCGCGTGCAGCGTGCAGGCCTACGGGCAGTGCGGCGGGAACGGGTACTCGGGTTGCACCCAGTGCGCGGTAAGTT
CGGGGTCGTCTGTCTTTTGTAGGAACATCCGAGAGGCTTGGCTGACGAGGCGTTGTTGTAGCCCGGCTATACTTGCAAGGCGGTCTCTCCGCCGTACTATTCGCAGTGCGCCCC
TTCTTCTTAG

B) ***Tt*LPMO9L: 798 pb**

ATGAAGCTGAGCGTTGCCATCGCCGTGCTGGCGTCGGCTCTTGCCGAGGCTCACTGTGAGTGCATCGTCTCACTCCAGCTACTGCGAAGCTTGCTGACGATGGTCCCTAGACAC
CTTCCCCAGCATCGGAAACACCGCTGACTGGCAGTATGTGCGGATTACAACGAACTACCAGAGCACGGGCCGGTGACGGACGTCACCTCGGATCAAATTCGGTGCTACGAACG
GAACCCAGGCACGGGAGCGCAGGGCATATACAACGTCACCGCCGGCCAGACCATCAACTACAACGCGAAGGCGTCCATCTCCCACCCGGGGCCCATGTCCTTCTACATTGCTA
AGGTTCCCGCCGGCCAAACCGCTGCGACCTGGGACGGTAAGGGGGCTGTGTGGACCAAGATCTACCAGGACATGCCCAAGTTCGGCAGCAGCCTGACCTGGCCCACCATGGG
TAAGAATTCTCACCCTGGAAATGAACGCACATTTGCACAGATCTAACATGGCCTACAGGCGCCAAGTCTGTCCCCGTCACCATCCCTCGTTGCCTCCAGAACGGCGATTACCTT
CTGCGAGCCGAGCACATCGCTCTACACAGCGCGAGCAGCGTCGGTGGCGCCCAGTTCTACCTCTCGTGCGCCCAGCTTACTGTCAGCGGCGGCAGTGGCACCTGGAACCCCAA
GAACCGGGTCTCCTTCCCCGGCGCTTACAAGGCAACAGACCCGGGCATCTTGATCAACATCTACTACCCCGTGCCGACCAGCTACTCGCCGCCCGGCCCGCCGGCTGAGACGT
GCTAA

Figura 8. Secuencias de nucleótidos de los genes de LPMOs de interés. Las letras en negro son los exones y las letras en rojo son los intrones.

Con la base de datos de NCBI se consiguió analizar las regiones de la proteína para cada LPMO como se observa en la Figura 9. La *Tt*LPMO9K presentó 334 aminoácidos que corresponden a la proteína, encontrándose el péptido señal nativo entre los aminoácidos 1 y 19, seguido de un residuo de histidina en la posición 20 localizado en la región N-terminal. Este residuo es una característica común de las LPMOs, ya que forma parte de la región denominada "brazo de histidina", donde se une el átomo de cobre necesario para la actividad catalítica de la enzima. Así, tras las modificaciones postraduccionales, esta histidina será His1(20). Para esta LPMO se

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

observa el dominio de la proteína que va del residuo de histidina 20 hasta el aminoácido 235 y la región del CBM que va del aminoácido 298 al 236. De manera similar, para *Tt*LPMO9L se analizó la secuencia según los datos mostrados en el NCBI. La proteína presenta 227 aminoácidos, donde el péptido señal se localiza cerca de la región N-terminal (aminoácido 1 al 17) y el dominio de la proteína (aminoácido 18 al 223), seguido de la región de C-terminal.

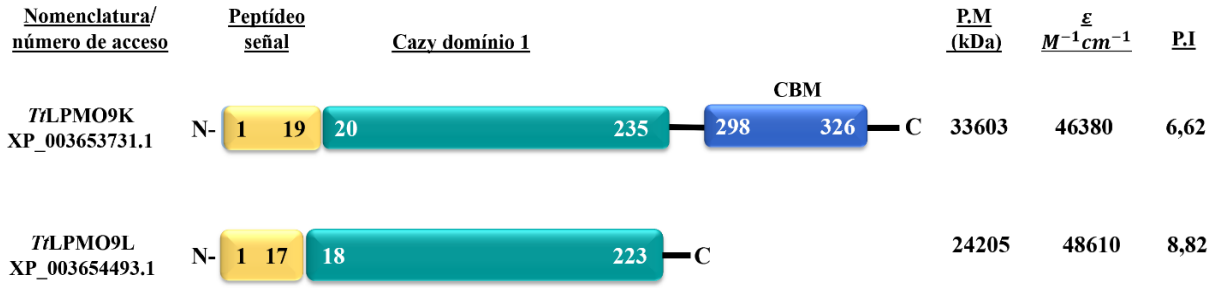


Figura 9. Características bioquímicas de las LPMOs codificadas por genes presentes en el genoma de *T. terrestris*, *Tt*LPMO9K y *Tt*LPMO9L. Cazy dominio 1 (verde agua): se refieren al dominio catalítico de la proteína, CBM (azul): módulo de unión al carbohidrato cuando está presente. Péptido señal (amarillo), N-: región amino-terminal, -C: región carboxi-terminal, P.M (kDa): peso molecular de la proteína madura, ε: coeficiente de extinción molar, pI: punto isoeléctrico.

3.2 Análisis filogenético y modelado computacional de las LPMOs de interés

El análisis de las secuencias y el modelado de estas LPMOs no reportadas representan una parte crucial tanto para el trabajo bioinformático como experimental, permitiendo conocer las regiones y estructura de la proteína. Con la ayuda del software Clustal Omega y ESPript software se consiguió alinear las secuencias de *Tt*LPMO9K y *Tt*LPMO9L con tres LPMOs de la familia AA9 de diferentes organismos. Estas LPMOs previamente caracterizadas y cristalizadas fueron, *Nc*LPMO9C de *Neurospora crassa* (23) (activa para C4), *Tt*LPMO9E de *T. terrestris* (36) (activa para C1/C4), y *Pc*LPMO9D de *Phanerodontia chrysosporium* (102) (activa para C1). Como observado en la Figura 10, los cuadros en rojo resaltados muestran los residuos totalmente conservados característicos de las LPMOs, como la His 1 que se encuentra en la mayoría de LPMOs en su sitio catalítico, aunque este residuo tienda a ser metilado en LPMO9s producidas en hongos (20). Además de ser estas regiones conservadas importantes para la función catalítica también están asociadas con la estabilidad estructural de las LPMOs. Por otro lado, los recuadros azules indican que más del 70% de los residuos en las columnas correspondientes presentan propiedades fisicoquímicas similares (mostrados como residuos

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

rojos sobre un fondo blanco). Teniendo en cuenta las regiones conservadas y loops ya identificados por las otras LPMO9s se pudo encontrar los *loops*; LC, LS, L2, L3 para *Tt*LPMO9K y LC, LS, L2 para *Tt*LPMO9, sin la presencia del L3 y con un LS menos extenso que la *Tt*LPMO9K. Este L3 es atribuido por influir en la superficie de unión al sustrato y de estar relacionado con la oxidación C4 de la celulosa, así como la *Nc*LPMO9C de *Neurospora crassa* que es activa para C4 (23). Por otro lado, las LPMOs que carecen del L2, tienen una posibilidad de ser solo activas en xilano en vez de celooligosacaridos, así como McAA9H. Particularmente si la porción que contiene el residuo de tirosina L2 típicamente conservado, también tiene una región L3 corta similar a las otras enzimas AA9 caracterizadas de *M. cinnamomea* (103). La diversidad en estos loops ofrece una estructura flexible que ajusta la especificidad hacia diferentes sustratos (23).

Tras alinear las secuencias de las proteínas *Tt*LPMO9K y *Tt*LPMO9L, se procedió a su modelado tridimensional utilizando el servidor AlphaFold (97). De las cinco posibles estructuras 3D generadas, se seleccionó la de mayor puntuación (rank 1) en ChimeraX, por ser la que más se asemejaba a la proteína predicha. Posteriormente, se incorporó el ion cobre en el sitio catalítico de la proteína empleando el servidor Alphafill (98). Las proteínas modeladas, ahora con Cu(II), fueron visualizadas nuevamente en ChimeraX, donde se identificaron los residuos conservados de histidina y tirosina en el sitio catalítico de cada una. Utilizando el alineamiento previamente realizado con otras LPMOs y el software ChimeraX, se determinaron las posiciones de las estructuras β-sándwich, los loops, el linker, y la región CBM cuando estaba presente.

.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

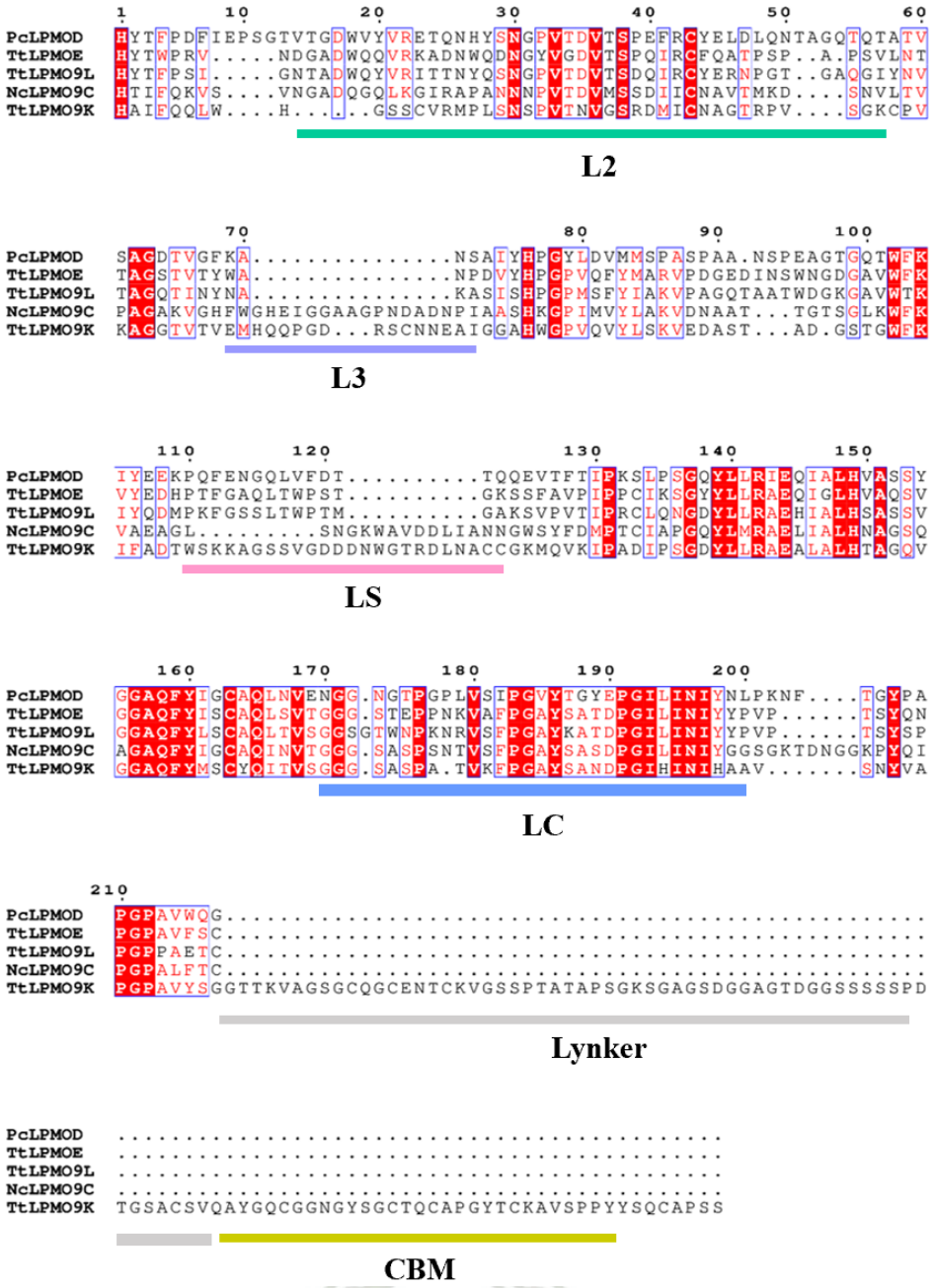


Figura 10. Alineamiento de secuencias basado en la estructura de las LPMOs, *Tt*LPMO9K y *Tt*LPMO9L, con AA9s cristalizadas y caracterizadas. Las proteínas analizadas incluyen NcLPMO9C (PDB código 4D7U), TtLPMO9E (PDB código 3EII), y PcLPMO9D (PDB código 4B5Q). Los residuos completamente conservados están destacados en rojo. Los marcos azules en las columnas correspondientes exhiben los residuos con propiedades fisicoquímicas similares. Las regiones de loops que conforman la superficie de unión al sustrato, denominadas L2, LC, L3, y LS, se indican mediante barras horizontales debajo de la secuencia. La figura fue generada utilizando el software ESPript.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Como observado en la Figura 11 *Tt*LPMO9L presenta una estructura cónica piramidal de β-sándwich formada por hojas β antiparalelas, en las cuales las cadenas β están interconectadas por varios loops extendidos. Entre las regiones de los loops, se encuentra una hélice (η) conectada a la región β1 y en el sitio catalítico podemos observar el ion de cobre (rojo) unido a la superficie plana de unión al sustrato. El sitio catalítico de unión al cobre está compuesto por la amina N-terminal, His 1 y His 69, y una de las posiciones de coordinación axial es ocupada por el oxígeno fenólico de Tyr154. Comparadas con otras estructuras típicas de LPMOs esta *Tt*LPMO9L no presenta α-hélices y tiene menor número de hélice (η) y hojas β. La ausencia del loop 3 (L3) en *Tt*LPMO9L podría sugerir que la enzima tiene actividad tanto en C1 como en C4, similar a la *Tt*LPMO9E de *T. terrestris*, que también muestra esta doble oxidación en celulosa y carece del L3, como se observa en el alineamiento (Figura10). Además, Harris et al. subraya que la falta de L3 desempeña un papel crucial en la interacción con sustratos solubles y contribuye a la amplia especificidad entre las enzimas, siendo generalmente más corto en comparación con otras LPMOs, como LsAA9A y CvAA9A (104).

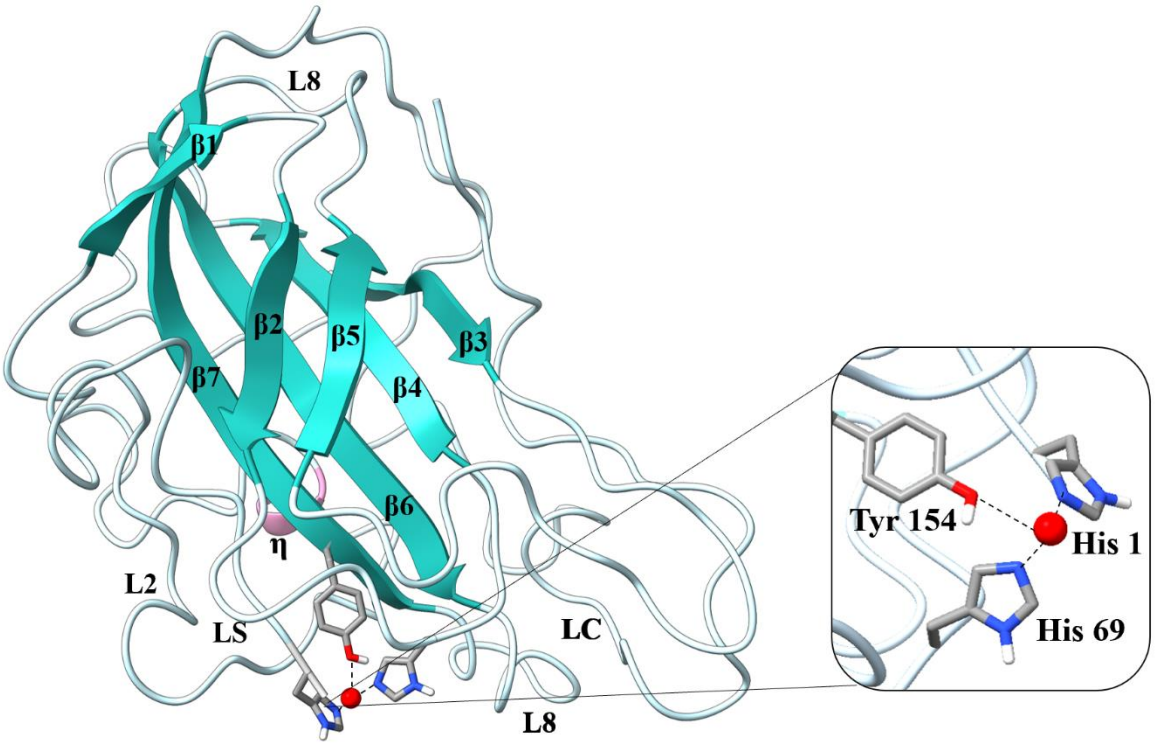


Figura 11. Estructura modelada de *Tt*LPMO9L. El núcleo central de β-sándwich presenta 7 hojas β cada una unida con su respectivo loop (L) y una hélice (η). Los residuos de aminoácidos se cada hoja β, se encuentran ordenados de la siguiente forma: β1 (51-54), β2 (58-62), β3 (96-101), β4 (73-79), β5 (119-123), β6 (131-141), β7 (152-163), β7 (142-151). Los loops expuestos en la superficie de unión del sustrato se encuentran en la posición L2 (2-33), LS (63-72) y LC

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

(rojo, 164-210). Los residuos del sitio catalítico (His 1, His 75, His 162) se encuentran ampliados y coordinando al cobre que está representado como una esfera de color rojo.

La predicción estructural de *Tt*LPMO9K, revela una estructura en forma de β-sándwich compuesta por hojas β antiparalelas conectadas por varios loops extendidos. Dentro de estas regiones de loops, se encuentran tres hélices η unidas a las regiones β y una α-hélice. A diferencia de la proteína *Tt*LPMO9L, *Tt*LPMO9K presenta un linker extenso unido a un Módulo de Unión a Carbohidratos (CBM) de la familia 1 de CAZy (CBM1), ubicado entre los residuos 278-315. En el sitio catalítico, se conservan los residuos clave, como el brazo de histidina y los residuos de tirosina en las posiciones H1, H74, y Tyr165, que coordinan el cobre (esfera roja), tal como se observa en la Figura 12. Al igual que NcLPMO9C, vista en el alineamiento, *Tt*LPMO9K muestra un loop L3 corto, lo que sugiere que, al igual que esta LPMO alineada, su actividad podría estar orientada hacia la oxidación del C4 en celulosa.

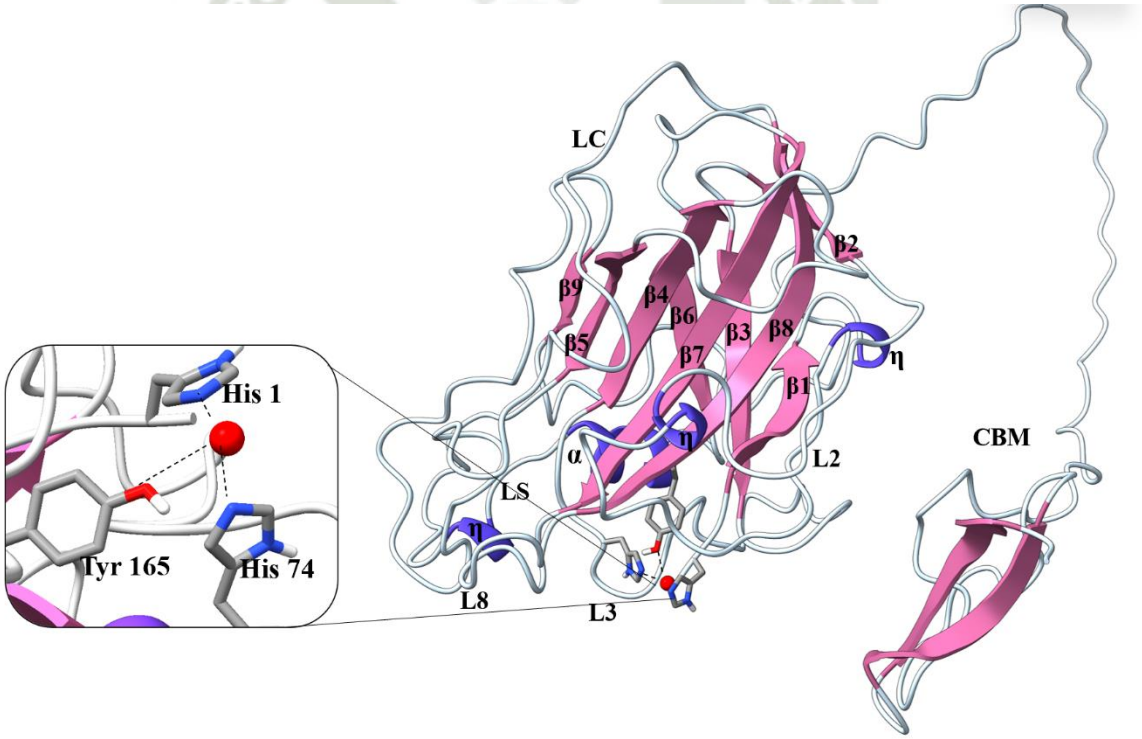


Figura 12. Estructura modelada de *Tt*LPMO9K. El núcleo central de β-sándwich presenta 9 hojas β cada una unida con su respectivo loop (L) y 3 hélices (η). Los residuos de aminoácidos de cada hoja β, se encuentran ordenados de la siguiente forma: β1 (3-7), β2 (44-47), β3 (51-58), β4 (78-84), β5 (97-103), β6 (130-134), β7 (142-152), β8 (153-165). Los loops expuestos en la superficie de unión del sustrato se encuentran en la posición L2 (8-43), LS (104-129) y LC (175-219). Los residuos del sitio catalítico (His 1, His 74, Tyr 165) se encuentran ampliados y coordinando al cobre que está representado como una esfera de color rojo.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Actualmente, todas las estructuras cristalizadas de LPMOs de la familia AA9 comparten una arquitectura conservada tipo β-sandwich con el sitio activo de cobre ubicado en una superficie plana, mientras que la conformación local de las regiones de los loops varía entre diferentes enzimas dentro de esta familia (74,105,106). Las enzimas que contienen cobre (Cu) en su sitio activo, activadoras de O_2, son conocidas por ajustar la reactividad de varias maneras, y las características distintivas del sitio activo de las LPMOs pueden ser parte integral de este mecanismo de reacción. Cuando el AA9 está en estado oxidado, la coordinación Cu(II) implica ligantes adicionales y forma una geometría octaédrica distorsionada, mientras que en estado reducido, Cu(I) típicamente adopta una configuración en forma de T de tres coordenadas dentro del lazo de histidina. La superficie de AA9 puede ser plana o tener contornos, y esta topografía parece depender de la forma del sustrato (107).

3.3 Amplificación de los genes *Tt*LPMO9K y *Tt*LPMO9L

Con la herramienta de Oligoanalizer fueron construidos los primers respectivos para los genes que codifican *TtL*PMO9K y *Tt*LPMO9L, colocando las colas complementarias del vector pEXPYR siendo inseridas tanto en el sentido forward (fw) como reverse (rv) (tabla 3). Después de la extracción del ADN de *T.terrestris*, se usó 100 pg/µl para montar la reacción PCR con los primers respectivos y la enzima Phusion.

Mediante la técnica de PCR, fue posible aumentar el número de copias de los genes que codifican las LPMO de interés con una temperatura de extensión de 68 °C. Los primers sintetizados y utilizados en este estudio fueron diseñados a partir del codón de inicio (ATG) y del codón de terminación (TGA) presente en la región codificante de los genes. Como resultado se consiguió amplificar los genes de interés de *Tt*LPMO9K y *Tt*LPMO9L presentando un tamaño similar al predicho de 1253 pb y 798 pb respectivamente, figura 10. Después de ser amplificados estos fueron purificados con el Kit PCR Clean-up Wizard Plus, obteniendo una concentración final de 45 ng/ µl para *Tt*LPMO9K y 58 ng/µl para *Tt*LPMO9L.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

A)

Genes	Sentido (5'– 3')	Primers
*Tt*LPMO9K	fwd	CAT TAC ACC TCA GCA CTA AGA AGA AGG GGC GCA CTG
	rev	GTC CCG TGC CGG TTA CTA AGA AGA AGG GGC GCA
*Tt*LPMO9L	fwd	CAT TAC ACC TCA GCA TTA GCA CGT CTC AGC CGG
	rev	GTC CCG TGC CGG TTA ATG AAG CTG AGC GTT GCC AT

B)

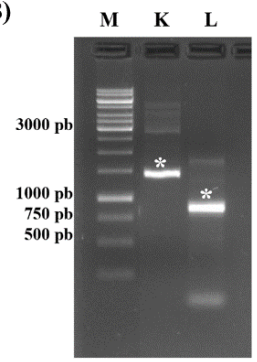


Figura 13. A) Primers diseñados para la amplificación de *Tt*LPMO9K y *Tt*LPMO9L. B) Amplificación de los genes en gel de agarosa al 1%. M: Marcador GeneRuler 1 kb en pares de bases (pb), K: *Tt*LPMO9K, L: *Tt*LPMO9L, *: bandas de amplificación seleccionadas.

3.4 Clonación en *E.coli* Turbo

Los fragmentos de interés amplificados y purificados de *Tt*LPMO9K y *Tt*LPMO9L fueron introducidos por separado en el vector pEXPYR mediante la técnica de Gibson Assembly (GA). Dado que las células procariotas tienen un sistema de replicación y condiciones de crecimiento más simples en comparación con las células eucariotas, se utilizó *E. coli Turbo* como hospedero para la clonación génica.

Dado que las células procariotas tienen un sistema de replicación y condiciones de crecimiento más simples en comparación con las células eucariotas, se utilizó *E. coli Turbo* como hospedero para la clonación génica. Estas células, que se replican rápidamente en cuestión de minutos, permitieron la replicación de los plásmidos dentro de las colonias bacterianas (108). El éxito de la unión de los genes correctamente en el vector pEXPYR fue visualizado tras una PCR de colonia después de dejar crecer las colonias 18h en medio LB con ampicilina. Para la técnica de PCR de colonia se seleccionaron de la placa Petri 9 colonias aleatoriamente y se siguió las condiciones de PCR con los respectivos primers. Como resultado, se obtuvieron cinco colonias positivas para *Tt*LPMO9K y seis para *Tt*LPMO9L (figura 11). Eso quiere decir que la construcción del plásmido fue exitosa con una eficiencia de transformación de 55% (*Tt*LPMO9K) y 66% (*Tt*LPMO9L). De las colonias positivas obtenidas se seleccionó aquellas que mostraron una banda más predominante, como marcadas con *. El ADN plasmídico de las colonias positivas fue luego purificado mediante el Kit Miniprep Wizard Plus, del cual se obtuvo una concentración final de 354 ng/µl para *Tt*LPMO9K y 450 ng/µl para *Tt*LPMO9L.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

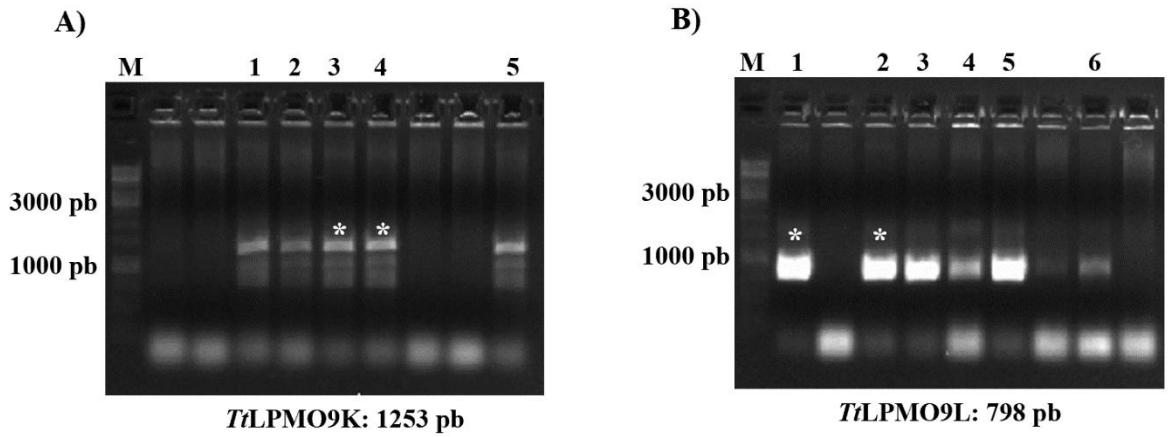


Figura 14. Resultado de PCR de las colonias positivas en gel de agarosa al 1% (m/v). (A) Colonias positivas de *Tt*LPMO9K; siendo escogida la colonia de la banda 3 con *. (B) Colonias positivas de *Tt*LPMO9L; siendo escogida la colonia de la banda 1 con *. C1-C6: Número de clones obtenidos. Los asteriscos indican los clones de los transformantes positivos seleccionados para las siguientes etapas.

3.5 Transformación en *A. nidulans*

Los vectores que contenían los genes de interés fueron extraídos de las colonias bacterianas positivas e insertados en el sistema de expresión del hongo filamentoso *A. nidulans* A773, utilizando la técnica de transformación mediada por PEG. Luego, los protoplastos fueron inoculados en medio mínimo sólido con piridoxina y sin la adición de uracilo ni uridina como marcador auxotrófico, ya que el vector pEXPYR contiene el gen pyrG, que corrige la vía de síntesis de estos compuestos en *A. nidulans*. En el medio fue adicionado la zeocina como marcador de selección, en diferentes concentraciones de 0, 100, 200, 300 y 400 µg/ml, para evitar contaminación y una mejor selección de las colonias. Después de 3 días del crecimiento se observaron algunas diferencias macroscópicas en cuanto al tamaño y la cantidad de esporas entre ellas. En las placas de Petri que contenían 0, 100 y 200 µg/ml de zeocina, se obtuvieron varias colonias pequeñas que presentaron una menor cantidad de esporas. No obstante, en las colonias que crecieron en concentraciones más elevadas, entre 300 y 400 µg/ml de ZEO, el número de colonias se redujo, pero presentaron un crecimiento más pronunciado y mayor producción de esporas. De acuerdo con estos resultados, se seleccionaron las colonias de mayor

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

tamaño y producción de esporas, obtenidas en las placas con 400 µg/ml de ZEO para su debida inducción de las proteínas *Tt*LPMO9K y *Tt*LPMO9L (Figura 15).

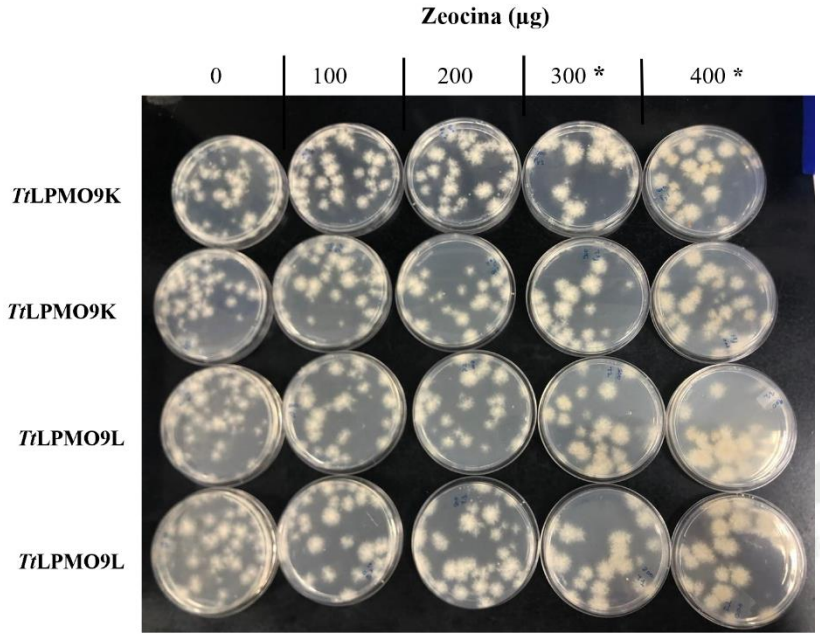


Figura 15. Colonias de los transformantes obtenidos de *Tt*LPMO9K y *Tt*LPMO9L en diferentes concentraciones de zeocina 300* y 400* fueron las placas seleccionadas para testar la expresión de los transformantes.

Estas colonias fueron luego cultivadas en medio mínimo líquido, adicionado con maltosa (3% de maltosa (m/v), un inductor de expresión). Después de 48 horas de crecimiento del micelio, se recolectó el extracto y se concentró en las columnas Vivaspin de 10 kDa hasta un volumen de 500 µl para luego ser analizado en gel SDS-PAGE. De las colonias evaluadas, 4 mostraron expresión positiva para *Tt*LPMO9K y 5 para *Tt*LPMO9L, ya que presentaron bandas con mayores niveles de expresión de la proteína que otras, y con tamaños aproximadamente previstos a lo teórico (Figura 16). Usando el servidor de ProtParam se observó que las bandas correspondientes a *Tt*LPMO9K tienen un tamaño previsto de 33,6 kDa, mientras que la proteína *Tt*LPMO9L mostró un tamaño de 24 kDa. Como puede ser observado en el gel SDS-PAGE, los tamaños donde aparecen las bandas se encuentran superiores a lo previsto. Esto se debe a que los hongos filamentosos normalmente tienden a glucosilar (109) adicionando -N o -O glucosilaciones en la proteína después del proceso de traducción. Según los servidores NetOGlyc y NetNGlyc, ambas proteínas no presentan N-glucosilación, pero sí muestran O-glucosilaciones. En particular, la proteína *Tt*LPMO9K tiene 21 sitios de O-glucosilación, mientras que la *Tt*LPMO9L cuenta con 4 sitios. Estas O-glucosilaciones se encuentran comúnmente en los linkers de LPMOs fúngicas (110). Estas modificaciones pueden ser

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

beneficiosas para las *Tt*LPMOs, ya que, según la literatura, mejoran la rigidez de las proteínas, especialmente en los linkers, reducen la hidrofobicidad de la superficie, lo que previene la agregación, y esto puede resultar en enzimas más eficientes y con mayor actividad, además de ofrecer protección y estabilidad (110–112). Por otro lado, la utilización de un hongo filamentoso como sistema de expresión heteróloga beneficia a las LPMOs recombinantes, ya que estos hongos poseen metiltransferasas que metilan la histidina de las LPMOs (20). Esta metilación proporciona mayor resistencia a las LPMOs del H_2O_2, lo que se traduce en una mayor vida útil de la enzima y un tiempo de reacción prolongado (43,113). En comparación con otros sistemas, como *P. pastoris*, comúnmente usada para la expresión de LPMOs, que no poseen esta modificación pos-traduccional (114,115).

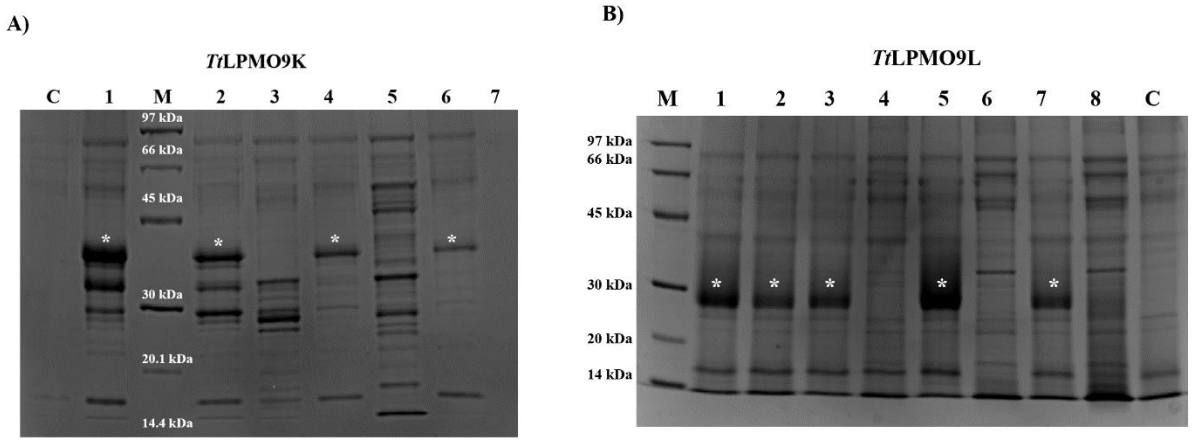


Figura 16. Gel SDS-PAGE de las LPMOs recombinantes transformadas por *A. nidulans* A773. (A) Expresión de la proteína *Tt*LPMO9K; los marcados con * corresponden a los 4 transformantes obtenidos. (B) Expresión de la proteína *Tt*LPMO9L; los marcados con * corresponden a los 5 transformantes obtenidos. M: marcador de peso molecular; C: control: *A. nidulans* transformado con el vector vacío.

3.6 Purificación enzimática

Se emplearon dos metodologías para la purificación de las proteínas. En primer lugar, se realizó una cromatografía de intercambio iónico, cuyo propósito es separar las moléculas en función de su carga. Según el software ProtParam, los puntos isoeléctricos (pI) de las enzimas *Tt*LPMO9K y *Tt*LPMO9L son 6.62 y 8.82, respectivamente. Con base en estos valores, se optó por iniciar la purificación mediante intercambio aniónico. Para ajustar la carga de las enzimas, los extractos crudos que contenían las proteínas de interés fueron concentrados y dializados en tampón acetato 100 mM pH 5 para *Tt*LPMO9K y en tampón fosfato de sodio 100 mM pH 7 para *Tt*LPMO9L, asegurando así que las proteínas adquirieran una carga negativa. El mismo

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

tampón utilizado en la diálisis, pero con una concentración de 50 mM, se empleó para equilibrar la columna que contenía la resina DEAE Sepharose CL6B. Tras inyectar la enzima, se lavó la columna con 10 ml del tampón y se procedió a la elución con el mismo tampón, variando las concentraciones de NaCl (50, 100, 200, 300, 400 y 500 mM). Las fracciones recolectadas se analizaron mediante SDS-PAGE, como se muestra en la Figura 17. Aunque se esperaba que las proteínas *Tt*LPMO9K y *Tt*LPMO9L se unieran a la resina y eluyeran a concentraciones específicas de sal, estas fueron eluidas en las primeras fracciones de flujo continuo y en las fracciones correspondientes a 50, 100 y 200 mM de NaCl. A pesar de que las proteínas no se ligaron adecuadamente a la resina, se eluyeron en las primeras fracciones con un mínimo de bandas contaminantes.

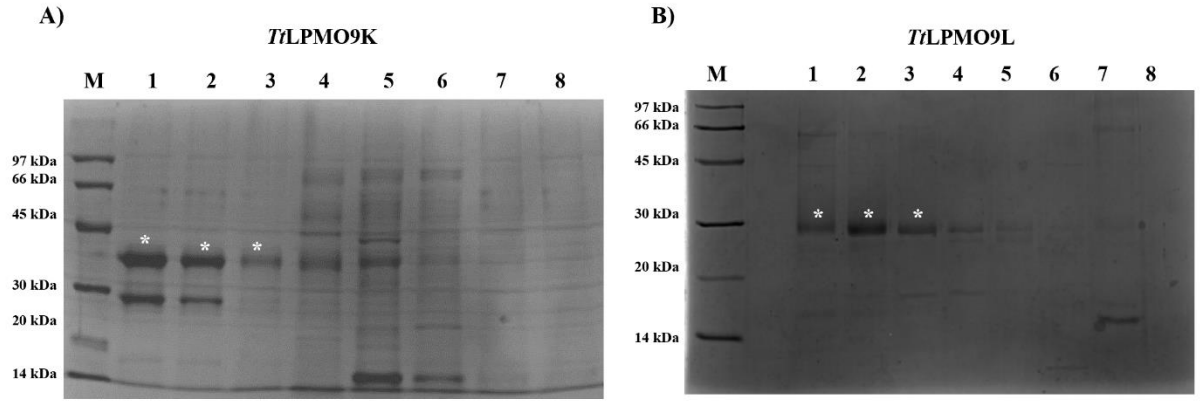


Figura 17. Purificación por troca iónica. (A) Gel SDS-PAGE de las fracciones eluidas de *Tt*LPMO9K, (B) Gel SDS-PAGE de las fracciones eluidas de *Tt*LPMO9L. M: marcador, 1: *flow-through*, 2: lavado (buffer), 3-8: 50, 100, 200, 300, 400 e 500 mM de NaCl.

Después de la purificación por intercambio iónico, las fracciones donde eluyeron las LPMOs de interés, se concentraron hasta un volumen de 10 ml utilizando un concentrador tipo Vivaspin® 20 con un corte de 5 kDa. Considerando que la presencia del átomo de cobre en el sitio catalítico de las LPMOs, es fundamental para que estén en su forma activa y no en su forma de apoenzima; la fracción final obtenida de la purificación de troca ionica, fue saturada con cobre. Se adicionó 3 veces la concentración de la enzima, incubado durante 15 minutos, ya que la afinidad que estas LPMOs presentan por el ion metálico, es grande. Posteriormente, se inyectaron en el sistema Äkta Pure M25 (Cytiva Healthcare Lifescience) de purificación por exclusión de tamaño utilizando una columna HiLoad 16/600 Superdex 75. Se recolectaron 7 fracciones que correspondían al pico obtenido en el cromatograma de eluición de la proteína y estas fueron observadas inmediatamente mediante gel SDS-PAGE (Figura 18). Con esta etapa

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

final de purificación se observó que la proteína se encontraba totalmente pura sin la presencia de otras proteínas contaminantes tanto para *Tt*LPMO9K como para *Tt*LPMO9L.

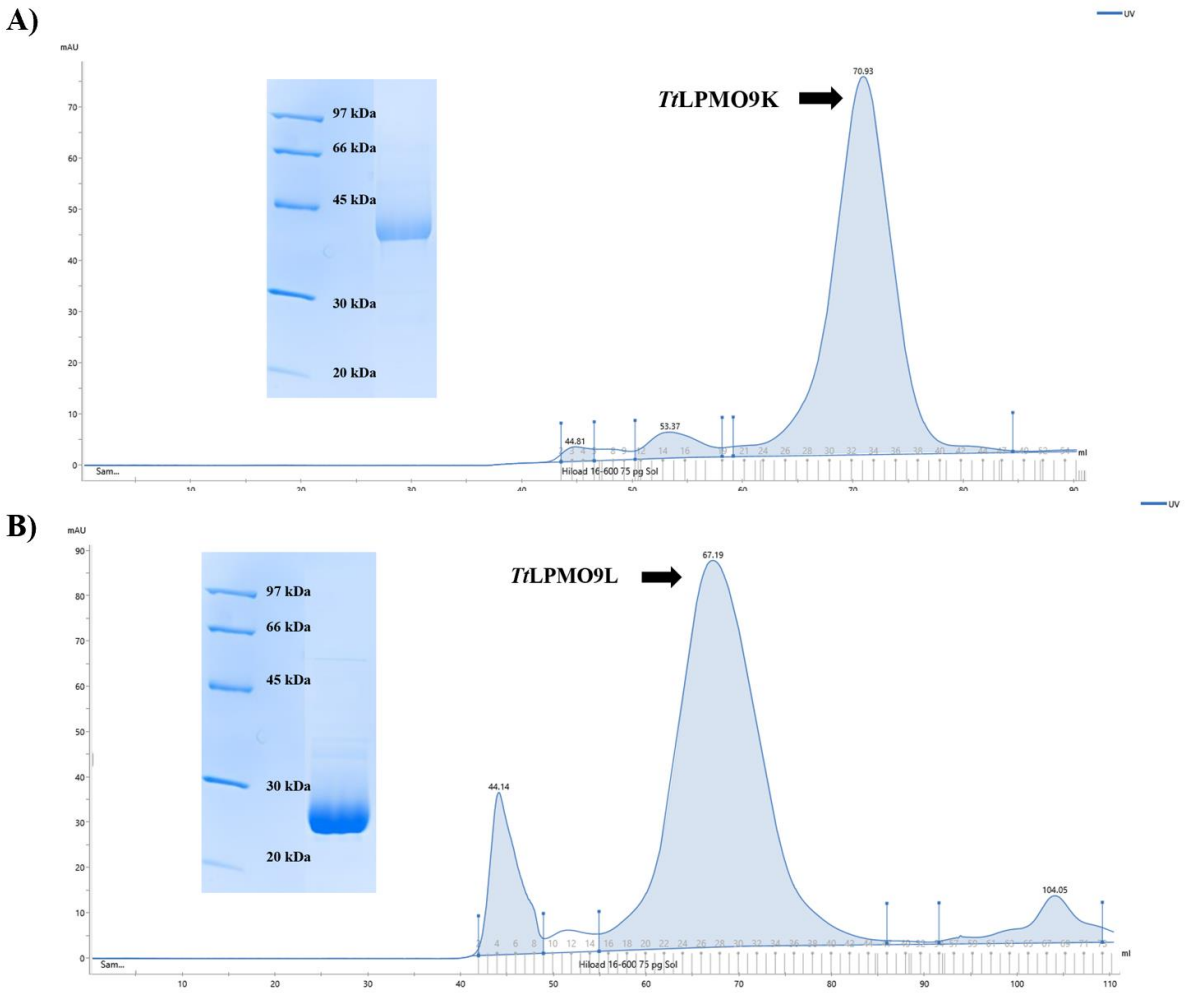


Figura 18. Purificación por cromatografía de exclusión de tamaño en la coluna HiLoad 16/600 Superdex 75. A lado de cada cromatograma se observa el gel de la proteína pura correspondiente a *Tt*LPMO9K y *Tt*LPMO9L.

Con la ayuda de la espectrometría de masas LC-MS, se logró identificar ambas LPMOs y confirmar la identidad de las proteínas, obteniendo una cobertura del 34 % para *Tt*LPMO9K y del 31 % para *Tt*LPMO9L (Figura 19). Estos resultados confirman tanto la pureza como la presencia de las dos LPMOs de *T. terrestris*, previamente modeladas y obtenidas de manera heteróloga.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

***Tt*LPMO9K - 34%**

MRTTFAAALAAFAAQEVAGHAIFQQLWHGSSCVRMPLSNSPVTNVGSRDMICNAGTRPVSGKCP
VKAGGTVTVEMHQQPGDRSCNNEAIGGAHWGPVQVYLSKVEDASTADGSTGWFKIFADTWSKKA
GSSVGDDDNWGTRDLNACCGKMQVKIPADIPSGDYLLRAEALALHTAGQVGGAQFYMSCYQITV
SGGGSASPATVKFPGAYSANDPGIHINIHAAVSNYVAPGPAVYSGGTTKVAGSGCQGCENTCKV
GSSPTATAPSGKSGAGSDGGAGTDGGSSSSSPDTGSACSVQAYGQCGGNGYSGCTQCAPGYTCK
AVSPPYYSQCAPSS

***Tt*LPMO9L - 31%**

MKLSVAIAVLASALAEAHYTFPSIGNTADWQYVRITTNYQSNGPVTDVTSDQIRCYERNPGTGA
QGIYNVTAGQTINYNAKASISHPGPMSFYIAKVPAGQTAATWDGKGAVWTKIYQDMPKFGSSLT
WPTMGAKSVPVTIPRCLQNGDYLLRAEHIALHSASSVGGAQFYLSCAQLTVSGGSGTWNPKNRV
SFPGAYKATDPGILINIYYPVPTSYSPPGPPAETC

Figura 19. Identificación de los péptidos encontrados por LC-MS. Las letras en rojo representan los péptidos encontrados.

3.7 Actividad Enzimática

Considerando el coeficiente de extinción molar de *Tt*LPMO9K (ε469 = 46380 $M^{-1}.cm^{-1}$) y *Tt*LPMO9L (ε469 = 48610 $M^{-1}.cm^{-1}$), se cuantificaron las proteínas en el Nanodrop One C (ThermoFisher) a 280 nm. El resultado obtenido por el Nanodrop mostró concentraciones altas para una LPMO purificada a partir de 1 litro de medio de cultivo, la cual fue de 1,45 mg/ml para *Tt*LPMO9K y 3,2 mg/ml para *Tt*LPMO9L, teniendo como volumen final 8ml. Siendo estas concentraciones mayores o similares a otras LPMOs reportadas como de *Neurospora crassa (NcAA9E: 2,2 mg; NcAA9F: 2,4 mg, NcAA9J: 24 mg; NcAA9C: 67 mg)* (116,117). Con la *Tt*LPMO9K y *Tt*LPMO9L purificadas y cuantificadas se realizó un ensayo de actividad enzimática para evaluar si la enzima estaba catalíticamente activa. Para ello, primero se utilizó el ensayo de Breslmayr em 2,6 DMP (dimetoxyphenol) (118) Con 1 µM de cada LPMO fue evaluada la actividad específica en 2,6 DMP, teniendo como cosustrato al H_2O_2 y el buffer fosfato succinato 100 mM pH 7. Adicionalmente fue colocado un control de $CuSO_4$ en la misma cantidad equimolar de LPMO (1 µM), para evitar interferencia con el cobre libre de la solución enzimática. En la misma concentración, la actividad de *Tt*LPMO9K y *Tt*LPMO9L en 2,6 DMP superaron la concentración de producto de coerulignona por minuto, con respecto de la reacción control con $CuSO_4$, lo que confirmó que estas dos LPMOs fueron corrrectamente plegadas con cobre, siendo coordinado en el sitio catalítico.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Después de 10 minutos de incubación a 40°C, se observó una coloración amarillenta de los pozos de la placa indicando macroscópicamente que la oxidación fue realizada, obteniendo el producto cromogénico, coerulignona (Figura 20). Después de las reacciones ser medidas en triplicatas por el Infinite 200 PRO (TECAN) a 469 nm, se calculó la concentración de coerulignona en UI, utilizando la Ecuación 1. La oxidación colorimétrica de hidrocoerulignona a coerulignona resultó en 210 ± 22,9 UI para *Tt*LPMO9L; 169 ± 14,7 UI para *Tt*LPMO9L y 17,2 ± 5,5 para $CuSO_4$ UI (Figura 14), mostrando diferencia significativa de la actividad de las dos LPMOs con respecto al cobre e individualmente también. Finalmente fue calculada la actividad especifica de estas dos LPMOs en 2,6DMP teniendo en cuenta la concentración en ug de proteína. Los resultados de la actividad especifican fueron de 23,4 ± 2 U/µg de proteína para *Tt*LPMO9K y 32,8 ± 3,6 U/µg de proteína para *Tt*LPMO9L.

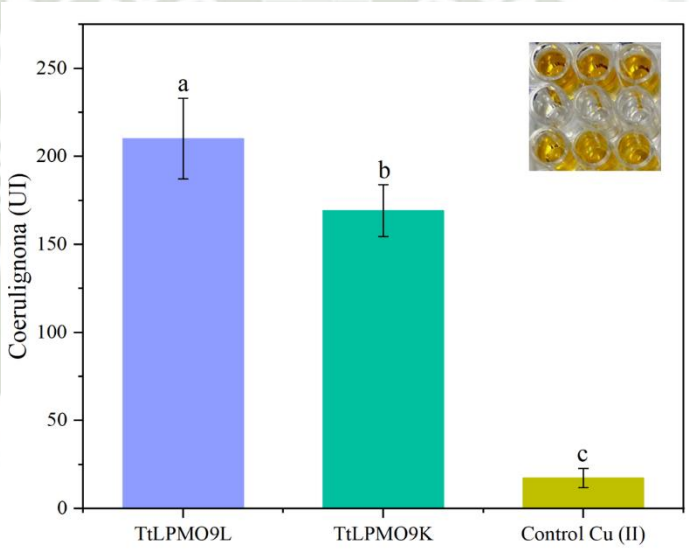


Figura 20. Actividad enzimática en 2,6 DMP de *Tt*LPMO9K, *Tt*LPMO9L y control de CuSO4 (1 µM). La concentración de coerulignona medida se presenta en UI (µmol/min).

La oxidación de 2,6-DMP en el producto final de la reacción mostró un color amarillo, indicando la presencia de coerulignona, lo cual también sugiere que las LPMOs se plegaron correctamente con el átomo de cobre y se coordinaron adecuadamente con el brazo de histidina. El alto coeficiente de absorción molar de la coerulignona formada hace que el ensayo sea sensible y permita mediciones confiables de la actividad de LPMO en concentraciones de aproximadamente 0,5 – 50 mg/L. Los resultados de *Tt*LPMO9K y *Tt*LPMO9L revelaron una actividad específica similar a las reportadas en la literatura como las de *Neurospora crassa* (LPMO9C, LPMO9E, LPMO9J), que exhiben actividades de 31 ± 3 U/g, 22 ± 3 U/g y 13 ± 1 U/g, respectivamente (118). No obstante, considerando que la cantidad de enzima utilizada para

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

*Tt*LPMO9K y *Tt*LPMO9L fue menor, esto sugiere que estas enzimas podrían tener un potencial similar o incluso superior al de *Neurospora crassa*, destacando su eficacia en condiciones específicas.

4. CONCLUSIÓN

Se amplificaron exitosamente los genes *Tt*LPMO9K y *Tt*LPMO9L de *T. terrestris* mediante PCR. Posteriormente, fueron clonados en vectores de expresión y la secuenciación confirmó su integridad y orientación correcta. La clonación optimizada resultó en una alta eficiencia de transformación, manteniendo la estabilidad genética en los clones obtenidos.

Aspergillus nidulans A773 se utilizó como hospedador eficaz para la expresión heteróloga de las LPMOs. Los clones transformados integraron establemente el vector en su genoma, secretando las proteínas de manera exitosa.

Se identificaron transformantes de *A. nidulans* con altos niveles de secreción de las LPMOs. Mediante ensayos cualitativos, se seleccionaron aquellos con mayor producción de proteínas activas. Estos transformantes mantuvieron estabilidad en la producción de la proteína a lo largo de varios subcultivos, facilitando su selección para futuras aplicaciones.

Las LPMOs se purificaron de manera eficiente utilizando dos etapas cromatográficas, obteniendo proteínas puras y estructuralmente estables. Las pruebas de actividad enzimática en en 2,6 DMP demostraron una alta capacidad catalítica al igual que su actividad específica, validando la pureza y eficacia de las enzimas.

Se generaron modelos estructurales precisos para *Tt*LPMO9K y *Tt*LPMO9L mediante simulaciones moleculares. Estos modelos revelaron dominios clave, como el CBM, que influyen en la afinidad por el sustrato y el sitio catalítico. Esta información estructural obtenida servirá para la futura optimización de las LPMOs mediante ingeniería de proteínas.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

- ✓ Aplicación de *Tt*LPMO9K y *Tt*LPMO9L en la degradación de diversos tipos de biomasa lignocelulósica, con el objetivo de mejorar procesos industriales como la producción de biocombustibles y bioproductos.
- ✓ Desarrollar estudios de sinergia de *Tt*LPMO9K y *Tt*LPMO9L con otras enzimas degradadoras de polisacáridos, como celulasas y xylanasas, para desarrollar cocteles enzimáticos más eficientes para la degradación de biomasa.
- ✓ Realizar estudios piloto para escalar la producción de estas LPMOs y evaluar su viabilidad económica y eficiencia en procesos industriales a gran escala.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wang F, Ouyang D, Zhou Z, Page SJ, Liu D, Zhao X. Lignocellulosic biomass as sustainable feedstock and materials for power generation and energy storage. Journal of Energy Chemistry. 2021;57:247–80.
2. Singh N, Singhania RR, Nigam PS, Dong C Di, Patel AK, Puri M. Global status of lignocellulosic biorefinery: Challenges and perspectives. Bioresour Technol. 2022;344:126415.
3. Zhao L, Sun ZF, Zhang CC, Nan J, Ren NQ, Lee DJ, et al. Advances in pretreatment of lignocellulosic biomass for bioenergy production: Challenges and perspectives. Bioresour Technol. 2022;343:126123.
4. Huang C, Li R, Tang W, Zheng Y, Meng X. Improve Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass by Modifying Lignin Structure via Sulfite Pretreatment and Using Lignin Blockers. Fermentation 2022, Vol 8, Page 558 [Online]. 2022 [zuletzt aufgerufen am 27.07.2024];8(10):558. Verfügbar unter: https://www.mdpi.com/2311-5637/8/10/558/htm.
5. Planas A. Glycoside hydrolases: Mechanisms, specificities, and engineering. Glycoside Hydrolases: Biochemistry, Biophysics, and Biotechnology. 2023;25–53.
6. Piccinni FE. Caracterización de enzimas activas sobre carbohidratos de un aislamento de Cellulomonas sp. para degradación de biomasa lignocelulósica. 2019 [zuletzt aufgerufen am 27.07.2024]; Verfügbar unter: https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/82915.
7. Rani Singhania R, Dixit P, Kumar Patel A, Shekher Giri B, Kuo CH, Chen CW, et al. Role and significance of lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) in lignocellulose deconstruction. Bioresour Technol. 2021;335:125261.
8. Calderaro F, Bevers LE, van den Berg MA. Oxidative Power: Tools for Assessing LPMO Activity on Cellulose. Biomolecules [Online]. 2021 [zuletzt aufgerufen am 17.01.2024];11(8). Verfügbar unter: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34439765/.
9. Tamburrini KC, Terrapon N, Lombard V, Bissaro B, Longhi S, Berrin JG. Bioinformatic analysis of lytic polysaccharide monooxygenases reveal the pan-families occurrence of intrinsically disordered C-terminal extensions. Biomolecules [Online]. 2021 [zuletzt aufgerufen am 21.01.2023];11(11). Verfügbar unter: /pmc/articles/PMC8615602/.
10. Kont R, Bissaro B, Eijsink VGH, Väljamäe P. Kinetic insights into the peroxygenase activity of cellulose-active lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs). Nat Commun [Online]. 2020 [zuletzt aufgerufen am 23.10.2021];11(1):1–10. Verfügbar unter: https://www.nature.com/articles/s41467-020-19561-8.
11. Eibinger M, Sattelkow J, Ganner T, Plank H, Nidetzky B. Single-molecule study of oxidative enzymatic deconstruction of cellulose. Nature Communications 2017 8:1 [Online]. 2017 [zuletzt aufgerufen am 19.07.2022];8(1):1–7. Verfügbar unter: https://www.nature.com/articles/s41467-017-01028-y.
12. Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Horn SJ, Liu Z, Zhai H, Sørlie M, et al. An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. Science (1979) [Online]. 2010 [zuletzt aufgerufen am 23.10.2021];330(6001):219–22. Verfügbar unter: https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1192231.
13. Levasseur A, Drula E, Lombard V, Coutinho PM, Henrissat B. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. Biotechnol Biofuels [Online]. 2013 [zuletzt aufgerufen am 15.07.2022];6(1):1–14. Verfügbar unter: https://link.springer.com/articles/10.1186/1754-6834-6-41.
14. Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. Nucleic Acids Res [Online]. 2014 [zuletzt aufgerufen am 23.10.2021];42(D1):D490–5. Verfügbar unter: https://academic.oup.com/nar/article/42/D1/D490/1057423.
15. Couturier M, Ladevèze S, Sulzenbacher G, Ciano L, Fanuel M, Moreau C, et al. Lytic xylan oxidases from wood-decay fungi unlock biomass degradation. Nat Chem Biol. 2018;14(3):306–10.
16. Hossain M, Dodda SR, Kapoor BS, Aikat K, Mukhopadhyay SS. Biochemical, structural insights of newly isolated AA16 family of Lytic Polysaccharide Monooxygenase (LPMO) from

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Aspergillus fumigatus and investigation of its synergistic effect using biomass. bioRxiv [Online]. 2021 [zuletzt aufgerufen am 15.07.2022];2020.04.24.059154. Verfügbar unter: https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.24.059154v2.

17. Sabbadin F, Urresti S, Henrissat B, Avrova AO, Welsh LRJ, Lindley PJ, et al. Secreted pectin monooxygenases drive plant infection by pathogenic oomycetes. Science (1979) [Online]. 2021 [zuletzt aufgerufen am 17.08.2022];373(6556):774–9. Verfügbar unter: https://www.science.org/doi/10.1126/science.abj1342.
18. Bissaro B, Røhr ÅK, Müller G, Chylenski P, Skaugen M, Forsberg Z, et al. Oxidative cleavage of polysaccharides by monocopper enzymes depends on H2O2. Nat Chem Biol. 2017;13(10):1123–8.
19. Forsberg Z, Stepnov AA, Nærdal GK, Klinkenberg G, Eijsink VGH. Engineering lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs). In 2020. S. 1–34.
20. Quinlan RJ, Sweeney MD, Lo Leggio L, Otten H, Poulsen JCN, Johansen KS, et al. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. Proc Natl Acad Sci U S A [Online]. 2011 [zuletzt aufgerufen am 25.10.2021];108(37):15079–84. Verfügbar unter: https://www.pnas.org/content/108/37/15079.
21. Song B, Li B, Wang X, Shen W, Park S, Collings C, et al. Real-time imaging reveals that lytic polysaccharide monooxygenase promotes cellulase activity by increasing cellulose accessibility. Biotechnol Biofuels [Online]. 2018 [zuletzt aufgerufen am 22.10.2022];11(1):1–11. Verfügbar unter: https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-018-1023-1.
22. Chen K, Zhang X, Long L, Ding S. Comparison of C4-oxidizing and C1/C4-oxidizing AA9 LPMOs in substrate adsorption, H2O2-driven activity and synergy with cellulase on celluloses of different crystallinity. Carbohydr Polym. 2021;269:118305.
23. Borisova AS, Isaksen T, Dimarogona M, Kognole AA, Mathiesen G, Várnai A, et al. Structural and Functional Characterization of a Lytic Polysaccharide Monooxygenase with Broad Substrate Specificity *. Journal of Biological Chemistry [Online]. 2015 [zuletzt aufgerufen am 16.08.2024];290:22955–69. Verfügbar unter: http://wwpdb.org/.
24. Ciano L, Davies GJ, Tolman WB, Walton PH. Bracing copper for the catalytic oxidation of C–H bonds. Nat Catal. 2018;1(8):571–7.
25. Courtade G, Wimmer R, Dimarogona M, Sandgren M, Eijsink VGH, Aachmann FL. Backbone and side-chain 1H, 13C, and 15N chemical shift assignments for the apo-form of the lytic polysaccharide monooxygenase NcLPMO9C. Biomolecular NMR Assignments 2016 10:2 [Online]. 2016 [zuletzt aufgerufen am 25.10.2021];10(2):277–80. Verfügbar unter: https://link.springer.com/article/10.1007/s12104-016-9683-x.
26. Kjaergaard CH, Qayyum MF, Wong SD, Xu F, Hemsworth GR, Walton DJ, et al. Spectroscopic and computational insight into the activation of O2 by the mononuclear Cu center in polysaccharide monooxygenases. Proceedings of the National Academy of Sciences [Online]. 2014 [zuletzt aufgerufen am 25.10.2021];111(24):8797–802. Verfügbar unter: https://www.pnas.org/content/111/24/8797.
27. Kuusk S, Kont R, Kuusk P, Heering A, Sørlie M, Bissaro B, et al. Kinetic insights into the role of the reductant in H2O2-driven degradation of chitin by a bacterial lytic polysaccharide monooxygenase. Journal of Biological Chemistry. 2019;294(5):1516–28.
28. Walton PH, Davies GJ. On the catalytic mechanisms of lytic polysaccharide monooxygenases. Curr Opin Chem Biol. 2016;31:195–207.
29. Sagarika MS, Parameswaran C, Senapati A, Barala J, Mitra D, Prabhukarthikeyan SR, et al. Lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) producing microbes: A novel approach for rapid recycling of agricultural wastes. Science of The Total Environment. 2022;806:150451.
30. Kracher D, Scheiblbrandner S, Felice AKG, Breslmayr E, Preims M, Ludwicka K, et al. Extracellular electron transfer systems fuel cellulose oxidative degradation. Science (1979) [Online]. 2016 [zuletzt aufgerufen am 01.04.2023];352(6289):1098–101. Verfügbar unter: https://www.science.org/doi/10.1126/science.aaf3165.
31. Cannella D, Möllers KB, Frigaard NU, Jensen PE, Bjerrum MJ, Johansen KS, et al. Light-driven oxidation of polysaccharides by photosynthetic pigments and a metalloenzyme. Nature Communications 2016 7:1 [Online]. 2016 [zuletzt aufgerufen am 02.09.2022];7(1):1–8.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Verfügbar unter: https://www.nature.com/articles/ncomms11134.

32. Velasco J, Sepulchro AG V., Higasi PMR, Pellegrini VOA, Cannella D, De Oliveira LC, et al. Light Boosts the Activity of Novel LPMO from Aspergillus fumigatus Leading to Oxidative Cleavage of Cellulose and Hemicellulose. ACS Sustain Chem Eng [Online]. 2022 [zuletzt aufgerufen am 21.01.2023];10(50):16969–84. Verfügbar unter: https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acssuschemeng.2c06281.
33. Chylenski P, Bissaro B, Sørlie M, Røhr ÅK, Várnai A, Horn SJ, et al. Lytic Polysaccharide Monooxygenases in Enzymatic Processing of Lignocellulosic Biomass. ACS Catal [Online]. 2019 [zuletzt aufgerufen am 19.07.2022];9(6):4970–91. Verfügbar unter: https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acscatal.9b00246.
34. Bissaro B, Streit B, Isaksen I, Eijsink VGH, Beckham GT, DuBois JL, et al. Molecular mechanism of the chitinolytic peroxygenase reaction. Proc Natl Acad Sci U S A [Online]. 2020 [zuletzt aufgerufen am 19.07.2022];117(3):1504–13. Verfügbar unter: https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1904889117.
35. Higasi PMR, Velasco JA, Pellegrini VOA, de Araújo EA, França BA, Keller MB, et al. Light-stimulated T. thermophilus two-domain LPMO9H: Low-resolution SAXS model and synergy with cellulases. Carbohydr Polym. 2021;260:117814.
36. Harris P V., Welner D, McFarland KC, Re E, Navarro Poulsen JC, Brown K, et al. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: Structure and function of a large, enigmatic family. Biochemistry [Online]. 2010 [zuletzt aufgerufen am 16.08.2024];49(15):3305–16. Verfügbar unter: https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/bi100009p.
37. Gaber Y, Rashad B, Hussein R, Abdelgawad M, Ali NS, Dishisha T, et al. Heterologous expression of lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs). Biotechnol Adv. 2020;43:107583.
38. Moon M, Lee JP, Park GW, Lee JS, Park HJ, Min K. Lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO)-derived saccharification of lignocellulosic biomass. Bioresour Technol. 2022;359:127501.
39. Rani Singhania R, Dixit P, Kumar Patel A, Shekher Giri B, Kuo CH, Chen CW, et al. Role and significance of lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) in lignocellulose deconstruction. Bioresour Technol. 2021;335:125261.
40. Oy R, Susanna Makinen R, Juntunen K, Komander A, Langfelder K. Proteins for the treatment of cellulosic material. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 2013;101(5):9205–10.
41. Frommhagen M, Koetsier MJ, Westphal AH, Visser J, Hinz SWA, Vincken JP, et al. Lytic polysaccharide monooxygenases from Myceliophthora thermophila C1 differ in substrate preference and reducing agent specificity. Biotechnol Biofuels [Online]. 2016 [zuletzt aufgerufen am 24.08.2024];9(1):1–17. Verfügbar unter: https://link.springer.com/articles/10.1186/s13068-016-0594-y.
42. Petrović DM, Bissaro B, Chylenski P, Skaugen M, Sørlie M, Jensen MS, et al. Methylation of the N-terminal histidine protects a lytic polysaccharide monooxygenase from auto-oxidative inactivation. Protein Science [Online]. 2018 [zuletzt aufgerufen am 24.08.2024];27(9):1636–50. Verfügbar unter: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pro.3451.
43. Kumar A, Singh A, Sharma VK, Goel A, Kumar A. The upsurge of lytic polysaccharide monooxygenases in biomass deconstruction: characteristic functions and sustainable applications. FEBS J [Online]. 2024 [zuletzt aufgerufen am 29.05.2024]; Verfügbar unter: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/febs.17063.
44. Frandsen KEH, Lo Leggio L. Lytic polysaccharide monooxygenases: a crystallographer's view on a new class of biomass-degrading enzymes. urn:issn:2052-2525 [Online]. 2016 [zuletzt aufgerufen am 29.11.2022];3(6):448–67. Verfügbar unter: //scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?be5273.
45. Lo Leggio L, Simmons TJ, Poulsen JCN, Frandsen KEH, Hemsworth GR, Stringer MA, et al. Structure and boosting activity of a starch-degrading lytic polysaccharide monooxygenase. Nature Communications 2015 6:1 [Online]. 2015 [zuletzt aufgerufen am 22.07.2022];6(1):1–9. Verfügbar unter: https://www.nature.com/articles/ncomms6961.
46. Simmons TJ, Frandsen KEH, Ciano L, Tryfona T, Lenfant N, Poulsen JC, et al. Structural and

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

electronic determinants of lytic polysaccharide monooxygenase reactivity on polysaccharide substrates. Nature Communications 2017 8:1 [Online]. 2017 [zuletzt aufgerufen am 24.08.2024];8(1):1–12. Verfügbar unter: https://www.nature.com/articles/s41467-017-01247-3.

47. Aro N, Pakula T, Penttilä M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. FEMS Microbiol Rev [Online]. 2005 [zuletzt aufgerufen am 28.10.2022];29(4):719–39. Verfügbar unter: https://academic.oup.com/femsre/article/29/4/719/492673.
48. Segato F, Damásio ARL, Gonçalves TA, de Lucas RC, Squina FM, Decker SR, et al. High-yield secretion of multiple client proteins in Aspergillus. Enzyme Microb Technol. 2012;51(2):100–6.
49. Tõlgo M, Hegnar OA, Østby H, Várnai A, Vilaplana F, Eijsink VGH, et al. Comparison of Six Lytic Polysaccharide Monooxygenases from Thermothielavioides terrestris Shows That Functional Variation Underlies the Multiplicity of LPMO Genes in Filamentous Fungi. Appl Environ Microbiol [Online]. 2022 [zuletzt aufgerufen am 25.10.2022];88(6). Verfügbar unter: https://journals.asm.org/journal/aem.
50. Jagadeeswaran G, Gainey L, Prade R, Mort AJ. A family of AA9 lytic polysaccharide monooxygenases in Aspergillus nidulans is differentially regulated by multiple substrates and at least one is active on cellulose and xyloglucan. Appl Microbiol Biotechnol [Online]. 2016 [zuletzt aufgerufen am 24.08.2024];100(10):4535–47. Verfügbar unter: https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-016-7505-9.
51. Kadowaki MAS, Várnai A, Jameson JK, Leite AET, Costa-Filho AJ, Kumagai PS, et al. Functional characterization of a lytic polysaccharide monooxygenase from the thermophilic fungus Myceliophthora thermophila. PLoS One [Online]. 2018 [zuletzt aufgerufen am 24.08.2024];13(8):e0202148. Verfügbar unter: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0202148.
52. Velasco J, de Oliveira Arnoldi Pellegrini V, Sepulchro AGV, Kadowaki MAS, Santo MCE, Polikarpov I, et al. Comparative analysis of two recombinant LPMOs from Aspergillus fumigatus and their effects on sugarcane bagasse saccharification. Enzyme Microb Technol. 2021;144:109746.
53. Cragg SM, Beckham GT, Bruce NC, Bugg TDH, Distel DL, Dupree P, et al. Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life. Curr Opin Chem Biol. 2015;29:108–19.
54. Borin GP, Sanchez CC, De Souza AP, De Santana ES, De Souza AT, Leme AFP, et al. Comparative Secretome Analysis of Trichoderma reesei and Aspergillus niger during Growth on Sugarcane Biomass. PLoS One [Online]. 2015 [zuletzt aufgerufen am 28.10.2022];10(6):e0129275. Verfügbar unter: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0129275.
55. Louise Glass N, Schmoll M, Cate JHD, Coradetti S. Plant Cell Wall Deconstruction by Ascomycete Fungi. https://doi.org/101146/annurev-micro-092611-150044 [Online]. 2013 [zuletzt aufgerufen am 28.10.2022];67:477–98. Verfügbar unter: https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-micro-092611-150044.
56. Stajich JE, Berbee ML, Blackwell M, Hibbett DS, James TY, Spatafora JW, et al. Primer -- The Fungi. Curr Biol [Online]. 2009 [zuletzt aufgerufen am 26.10.2022];19(18):R840. Verfügbar unter: /pmc/articles/PMC2913116/.
57. Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. Mycol Res. 2007;111(5):509–47.
58. Hori C, Gaskell J, Igarashi K, Kersten P, Mozuch M, Samejima M, et al. Temporal alterations in the secretome of the selective ligninolytic fungus ceriporiopsis subvermispora during growth on aspen wood reveal this organism's strategy for degrading lignocellulose. Appl Environ Microbiol [Online]. 2014 [zuletzt aufgerufen am 28.10.2022];80(7):2062–70. Verfügbar unter: https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.03652-13.
59. PEI G liang, GUO J, WANG Q hu, KANG Z sheng. Comparative analysis of protein kinases and associated domains between Ascomycota and Basidiomycota. J Integr Agric. 2019;18(1):96–107.
60. Várnai A, Hegnar OA, Horn SJ, Eijsink VGH, Berrin JG. Fungal lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs): Biological importance and applications. In: Encyclopedia of

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Mycology. Elsevier; 2021. S. 281–94.

61. Frommhagen M, Westphal AH, Hilgers R, Koetsier MJ, Hinz SWA, Visser J, et al. Quantification of the catalytic performance of C1-cellulose-specific lytic polysaccharide monooxygenases. Appl Microbiol Biotechnol [Online]. 2018 [zuletzt aufgerufen am 22.07.2022];102(3):1281–95. Verfügbar unter: https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-017-8541-9.
62. Lampugnani ER, Khan GA, Somssich M, Persson S. Building a plant cell wall at a glance. J Cell Sci [Online]. 2018 [zuletzt aufgerufen am 26.10.2022];131(2). Verfügbar unter: https://journals.biologists.com/jcs/article/131/2/jcs207373/76999/Building-a-plant-cell-wall-at-a-glance.
63. Oliva B. Expressão heteróloga, caracterização bioquímica e avaliação da suplementação da enzima oxidativa Celobiose Desidrogenase na sacarificação da biomassa [Online]. [Lorena]: Universidade de São Paulo; 2019 [zuletzt aufgerufen am 30.10.2021]. Verfügbar unter: http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/97/97132/tde-28052019-141337/.
64. Berka RM, Grigoriev I V., Otillar R, Salamov A, Grimwood J, Reid I, et al. Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi Myceliophthora thermophila and Thielavia terrestris. Nat Biotechnol [Online]. 2011 [zuletzt aufgerufen am 29.11.2022];29(10):922–9. Verfügbar unter: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21964414/.
65. López-López A, Santiago-Hernández A, Cayetano-Cruz M, García-Huante Y, Campos JE, Bustos-Jaimes I, et al. TtCel7A: A Native Thermophilic Bifunctional Cellulose/Xylanase Exogluclanase from the Thermophilic Biomass-Degrading Fungus Thielavia terrestris Co3Bag1, and Its Application in Enzymatic Hydrolysis of Agroindustrial Derivatives. Journal of Fungi [Online]. 2023 [zuletzt aufgerufen am 29.01.2024];9(2):152. Verfügbar unter: https://www.mdpi.com/2309-608X/9/2/152/htm.
66. Thanh VN, Thuy NT, Huong HTT, Hien DD, Hang DTM, Anh DTK, et al. Surveying of acid-tolerant thermophilic lignocellulolytic fungi in Vietnam reveals surprisingly high genetic diversity. Sci Rep. 2019;9(1).
67. Tõlgo M, Hüttner S, Rugbjerg P, Thuy NT, Thanh VN, Larsbrink J, et al. Genomic and transcriptomic analysis of the thermophilic lignocellulose-degrading fungus Thielavia terrestris LPH172. Biotechnol Biofuels [Online]. 2021 [zuletzt aufgerufen am 17.01.2024];14(1):1–16. Verfügbar unter: https://link.springer.com/articles/10.1186/s13068-021-01975-1.
68. Corrêa CL, Midorikawa GEO, Filho EXF, Noronha EF, Alves GSC, Togawa RC, et al. Transcriptome Profiling-Based Analysis of Carbohydrate-Active Enzymes in Aspergillus terreus Involved in Plant Biomass Degradation. Front Bioeng Biotechnol [Online]. 2020 [zuletzt aufgerufen am 28.08.2024];8:564527. Verfügbar unter: www.frontiersin.org.
69. Moreau C, Tapin-Lingua S, Grisel S, Gimbert I, Le Gall S, Meyer V, et al. Lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) facilitate cellulose nanofibrils production. Biotechnol Biofuels [Online]. 2019 [zuletzt aufgerufen am 25.08.2024];12(1):1–13. Verfügbar unter: https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-019-1501-0.
70. Sharma S, Modi R, Kaur A. Lytic polysaccharide monooxygenases producing microbes: A key indicator for biomass-degrading enzymes. Biocatal Agric Biotechnol. 2024;60:103337.
71. Johansen KS. Discovery and industrial applications of lytic polysaccharide mono-oxygenases. Biochem Soc Trans [Online]. 2016 [zuletzt aufgerufen am 25.08.2024];44(1):143–9. Verfügbar unter: /biochemsoctrans/article/44/1/143/65488/Discovery-and-industrial-applications-of-lytic.
72. Harris P V., Xu F, Kreel NE, Kang C, Fukuyama S. New enzyme insights drive advances in commercial ethanol production. Curr Opin Chem Biol. 2014;19(1):162–70.
73. Zhang R. Functional characterization of cellulose-degrading AA9 lytic polysaccharide monooxygenases and their potential exploitation. Applied Microbiology and Biotechnology 2020 104:8 [Online]. 2020 [zuletzt aufgerufen am 17.01.2024];104(8):3229–43. Verfügbar unter: https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-020-10467-5.
74. Lo Leggio L, Simmons TJ, Poulsen JCN, Frandsen KEH, Hemsworth GR, Stringer MA, et al. Structure and boosting activity of a starch-degrading lytic polysaccharide monooxygenase. Nature Communications 2015 6:1 [Online]. 2015 [zuletzt aufgerufen am 17.01.2024];6(1):1–9. Verfügbar unter: https://www.nature.com/articles/ncomms6961.
75. de Gouvêa PF, Gerolamo LE, Bernardi AV, Pereira LMS, Uyemura SA, Dinamarco TM. Lytic

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Polysaccharide Monooxygenase from Aspergillus fumigatus can Improve Enzymatic Cocktail Activity During Sugarcane Bagasse Hydrolysis. Protein Pept Lett. 2019;26(5):377–85.

76. Cannella D, Jørgensen H. Do new cellulolytic enzyme preparations affect the industrial strategies for high solids lignocellulosic ethanol production? Biotechnol Bioeng [Online]. 2014 [zuletzt aufgerufen am 25.08.2024];111(1):59–68. Verfügbar unter: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bit.25098.
77. Pierce BC, Agger JW, Wichmann J, Meyer AS. Oxidative cleavage and hydrolytic boosting of cellulose in soybean spent flakes by Trichoderma reesei Cel61A lytic polysaccharide monooxygenase. Enzyme Microb Technol. 2017;98:58–66.
78. Rodríguez-Zúñiga UF, Cannella D, Giordano RDC, Giordano RDLC, Jørgensen H, Felby C. Lignocellulose pretreatment technologies affect the level of enzymatic cellulose oxidation by LPMO. Green Chemistry [Online]. 2015 [zuletzt aufgerufen am 08.05.2023];17(5):2896–903. Verfügbar unter: https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2015/gc/c4gc02179g.
79. Laothanachareon T, Bunterngsook B, Suwannarangsee S, Eurwilaichitr L, Champreda V. Synergistic action of recombinant accessory hemicellulolytic and pectinolytic enzymes to Trichoderma reesei cellulase on rice straw degradation. Bioresour Technol. 2015;198:682–90.
80. Guo X, An Y, Liu F, Lu F, Wang B. Lytic polysaccharide monooxygenase – A new driving force for lignocellulosic biomass degradation. Bioresour Technol. 2022;362:127803.
81. Hu J, Chandra R, Arantes V, Gourlay K, Susan van Dyk J, Saddler JN. The addition of accessory enzymes enhances the hydrolytic performance of cellulase enzymes at high solid loadings. Bioresour Technol. 2015;186:149–53.
82. Monclaro AV, Filho EXF. Fungal lytic polysaccharide monooxygenases from family AA9: Recent developments and application in lignocelullose breakdown. Int J Biol Macromol. 2017;102:771–8.
83. Bhatia S, Purohit A, Yadav SK. Kinetic Characterization of a Lytic Polysaccharide Monooxygenase Reveals a Unique Specificity for Depolymerization at β-O-4 of Lignin Compounds. ACS Sustain Chem Eng [Online]. 2023 [zuletzt aufgerufen am 13.01.2024];11(11):4398–408. Verfügbar unter: https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acssuschemeng.2c07133.
84. Karnaouri A, Chorozian K, Zouraris D, Karantonis A, Topakas E, Rova U, et al. Lytic polysaccharide monooxygenases as powerful tools in enzymatically assisted preparation of nano-scaled cellulose from lignocellulose: A review. Bioresour Technol. 2022;345:126491.
85. Magri S, Nazerian G, Segato T, Vieira Monclaro A, Zarattini M, Segato F, et al. Polymer ultrastructure governs AA9 lytic polysaccharide monooxygenases functionalization and deconstruction efficacy on cellulose nano-crystals. Bioresour Technol. 2022;347:126375.
86. Liu H, Xu T, Cai C, Liu K, Liu W, Zhang M, et al. Multifunctional Superelastic, Superhydrophilic, and Ultralight Nanocellulose-Based Composite Carbon Aerogels for Compressive Supercapacitor and Strain Sensor. Adv Funct Mater [Online]. 2022 [zuletzt aufgerufen am 25.08.2024];32(26):2113082. Verfügbar unter: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/adfm.202113082.
87. Xu T, Du H, Liu H, Liu W, Zhang X, Si C, et al. Advanced Nanocellulose-Based Composites for Flexible Functional Energy Storage Devices. Advanced Materials [Online]. 2021 [zuletzt aufgerufen am 25.08.2024];33(48):2101368. Verfügbar unter: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/adma.202101368.
88. Xiaofei S, Chao F. Lytic polysaccharide monooxygenase and its application. [zuletzt aufgerufen am 25.08.2024];2023(7):2535. Verfügbar unter: http://journals.im.ac.cn/actamicrocn.
89. Valenzuela S V., Valls C, Schink V, Sánchez D, Roncero MB, Diaz P, et al. Differential activity of lytic polysaccharide monooxygenases on celluloses of different crystallinity. Effectiveness in the sustainable production of cellulose nanofibrils. Carbohydr Polym. 2019;207:59–67.
90. Muraleedharan MN, Karnaouri A, Piatkova M, Ruiz-Caldas MX, Matsakas L, Liu B, et al. Isolation and modification of nano-scale cellulose from organosolv-treated birch through the synergistic activity of LPMO and endoglucanases. Int J Biol Macromol. 2021;183:101–9.
91. Koskela S, Wang S, Xu D, Yang X, Li K, Berglund LA, et al. Lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO) mediated production of ultra-fine cellulose nanofibres from delignified softwood fibres. Green Chemistry. 2019;21(21):5924–33.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

92. Li Y, Liu X, Liu M, Wang Y, Zou Y, You Y, et al. Magnaporthe oryzae Auxiliary Activity Protein MoAa91 Functions as Chitin-Binding Protein To Induce Appressorium Formation on Artificial Inductive Surfaces and Suppress Plant Immunity. mBio. 2020;11(2).
93. Sabbadin F, Urresti S, Henrissat B, Avrova AO, Welsh LRJ, Lindley PJ, et al. Secreted pectin monooxygenases drive plant infection by pathogenic oomycetes. Science (1979). 2021;373(6556):774–9.
94. Kracher D, Lanzmaier T, Carneiro LV. Active roles of lytic polysaccharide monooxygenases in human pathogenicity. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics. 2024;1872(4):141012.
95. Singh J, Singh P, Singh AP, Singh PK. Lytic Polysaccharide Monooxygenase Activity of Tma12 Is Critical for Its Toxicity to Whitefly. J Agric Food Chem. 2023;71(37):13696–705.
96. Vandhana TM, Reyre J, Sushmaa D, Berrin J, Bissaro B, Madhuprakash J. On the expansion of biological functions of lytic polysaccharide monooxygenases. New Phytologist. 2022;233(6):2380–96.
97. Bolton MD, Thomma BPHJ, Herausgeber. Plant Fungal Pathogens. 2012 [zuletzt aufgerufen am 28.08.2024];835. Verfügbar unter: https://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-501-5.
98. Gibson DG. Enzymatic Assembly of Overlapping DNA Fragments. Methods Enzymol. 2011;498:349–61.
99. Shapiro AL, Viñuela E, V. Maizel Jr. J. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. Biochem Biophys Res Commun. 1967;28(5):815–20.
100. Wu M, Beckham GT, Larsson AM, Ishida T, Kim S, Payne CM, et al. Crystal Structure and Computational Characterization of the Lytic Polysaccharide Monooxygenase GH61D from the Basidiomycota Fungus Phanerochaete chrysosporium * □ S. Journal of Biological Chemistry [Online]. 2013 [zuletzt aufgerufen am 16.08.2024];288:12828–39. Verfügbar unter: http://wwpdb.org/.
101. Mazurkewich S, Seveso A, Hüttner S, Brändén G, Larsbrink J. Structure of a C1/C4-oxidizing AA9 lytic polysaccharide monooxygenase from the thermophilic fungus *Malbranchea cinnamomea*. Acta Crystallogr D Struct Biol. 2021;77(8):1019–26.
102. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Tunyasuvunakool K, et al. AlphaFold 2. 2020;
103. Hekkelman ML, de Vries I, Joosten RP, Perrakis A. AlphaFill: enriching AlphaFold models with ligands and cofactors. Nature Methods 2022 20:2 [Online]. 2022 [zuletzt aufgerufen am 21.12.2023];20(2):205–13. Verfügbar unter: https://www.nature.com/articles/s41592-022-01685-y.
104. Hüttner S, Várnai A, Petrović DM, Bach CX, Kim Anh DT, Thanh VN, et al. Specific Xylan Activity Revealed for AA9 Lytic Polysaccharide Monooxygenases of the Thermophilic Fungus *Malbranchea cinnamomea* by Functional Characterization. Appl Environ Microbiol. 2019;85(23).
105. Frandsen KEH, Lo Leggio L. Lytic polysaccharide monooxygenases: a crystallographer's view on a new class of biomass-degrading enzymes. urn:issn:2052-2525 [Online]. 2016 [zuletzt aufgerufen am 21.05.2023];3(6):448–67. Verfügbar unter: //scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?be5273.
106. Singh A, Rodríguez Jasso RM, Gonzalez-Gloria KD, Rosales M, Belmares Cerda R, Aguilar CN, et al. The enzyme biorefinery platform for advanced biofuels production. Bioresour Technol Rep. 2019;7:100257.
107. Forsberg Z, Stepnov AA, Nærdal GK, Klinkenberg G, Eijsink VGH. Engineering lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs). In: Methods in Enzymology. Academic Press; 2020. S. 1–34.
108. Nevalainen KMH, Te'o VSJ, Bergquist PL. Heterologous protein expression in filamentous fungi. Trends Biotechnol. 2005;23(9):468–74.
109. Rubio MV, Zubieta MP, Franco Cairo JPL, Calzado F, Paes Leme AF, Squina FM, et al. Mapping N-linked glycosylation of carbohydrate-active enzymes in the secretome of Aspergillus nidulans grown on lignocellulose. Biotechnol Biofuels [Online]. 2016 [zuletzt aufgerufen am 29.11.2022];9(1):1–19. Verfügbar unter: https://link.springer.com/articles/10.1186/s13068-016-

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

0580-4.

110. Meier KK, Jones SM, Kaper T, Hansson H, Koetsier MJ, Karkehabadi S, et al. Oxygen Activation by Cu LPMOs in Recalcitrant Carbohydrate Polysaccharide Conversion to Monomer Sugars. Chem Rev. 2018;118(5):2593–635.
111. Sutthirak P, Dharmsthiti S, Lertsiri S. Effect of glycation on stability and kinetic parameters of thermostable glucoamylase from Aspergillus niger. Process Biochemistry. 2005;40(8):2821–6.
112. Jafari-Aghdam J, Khajeh K, Ranjbar B, Nemat-Gorgani M. Deglycosylation of glucoamylase from Aspergillus niger: Effects on structure, activity and stability. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics. 2005;1750(1):61–8.
113. Petrović DM, Várnai A, Dimarogona M, Mathiesen G, Sandgren M, Westereng B, et al. Comparison of three seemingly similar lytic polysaccharide monooxygenases from Neurospora crassa suggests different roles in plant biomass degradation. J Biol Chem [Online]. 2019 [zuletzt aufgerufen am 28.10.2022];294(41):15068–81. Verfügbar unter: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31431506/.
114. Liu B, Kognole AA, Wu M, Westereng B, Crowley MF, Kim S, et al. Structural and molecular dynamics studies of a C1-oxidizing lytic polysaccharide monooxygenase from *Heterobasidion irregulare* reveal amino acids important for substrate recognition. FEBS J. 2018;285(12):2225–42.
115. Borisova AS, Isaksen T, Dimarogona M, Kognole AA, Mathiesen G, Várnai A, et al. Structural and Functional Characterization of a Lytic Polysaccharide Monooxygenase with Broad Substrate Specificity. Journal of Biological Chemistry. 2015;290(38):22955–69.
116. Kittl R, Kracher D, Burgstaller D, Haltrich D, Ludwig R. Production of four Neurospora crassa lytic polysaccharide monooxygenases in Pichia pastoris monitored by a fluorimetric assay. Biotechnol Biofuels [Online]. 2012 [zuletzt aufgerufen am 22.07.2022];5(1):1–14. Verfügbar unter: https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/1754-6834-5-79.
117. Rieder L, Ebner K, Glieder A, Sørlie M. Novel molecular biological tools for the efficient expression of fungal lytic polysaccharide monooxygenases in Pichia pastoris. Biotechnol Biofuels [Online]. 2021 [zuletzt aufgerufen am 26.12.2023];14(1):1–17. Verfügbar unter: https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-021-01971-5.
118. Breslmayr E, Hanžek M, Hanrahan A, Leitner C, Kittl R, Šantek B, et al. A fast and sensitive activity assay for lytic polysaccharide monooxygenase. Biotechnology for Biofuels 2018 11:1 [Online]. 2018 [zuletzt aufgerufen am 30.10.2021];11(1):1–13. Verfügbar unter: https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-018-1063-6.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis