

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
CAMPUS LOS ÁNGELES
ESCUELA DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA VEGETAL**



**MEJORAMIENTO DE ENZIMAS MONOOXIGENASAS LÍTICAS DE POLISACÁRIDOS
(LPMOs), MEDIANTE ORGANISMOS RECOMBINANTES E INGENIERÍA DE
PROTEÍNAS.**



**MEMORIA DE TÍTULO PARA
OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO
EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL.**

CHRISTIAN FELIPE DERAMOND GÁLVEZ

LOS ÁNGELES-CHILE

2021

**Mejoramiento de enzimas monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMOs),
mediante organismos recombinantes e ingeniería de proteínas.**

Alumno

**Christian Deramond Gálvez
Ingeniero en Biotecnología Vegetal**

Profesora guía

**Dra. Ángela Machuca Herrera
Profesora Asociada
Bioquímico**

Evaluador externo

**Dr. Regis Teixeira Mendonça
Profesor Titular
Ingeniero Químico**

Evaluador externo

**Dr. Edward Hermosilla Carrasco
Investigador Post-Doctoral
Ingeniero en Biotecnología Vegetal**

Jefe de carrera

**Pedro Quiroz Hernández
Profesor Instructor
Ingeniero (E) Forestal**

Director de Departamento

**M.Sc. Pablo Novoa Barra
Profesor Asistente
Ingeniero (E) Forestal**



AGRADECIMIENTOS

Es difícil pensar que ya han pasado varios años desde que decidí empezar esta carrera, donde viví buenos y malos momentos durante su transcurso, pero sin duda me hizo crecer como persona. Durante este periodo universitario realice nuevas amistades a las cuales les agradezco por su apoyo y las risas entregadas durante las etapas difíciles de este proceso universitario. Igualmente agradecer a algunos docentes que me formaron y me entregaron las herramientas para ser un buen profesional, especialmente a mi profesora guía, me guió de buena forma para culminar mi carrera universitaria, muchas gracias por siempre estar dispuestas a aclarar dudas e inquietudes y sobre todo por la paciencia. También agradecer a las personas más importante de mi vida, mi familia, especialmente a mis Padres que me han entregado gran parte de mis valores, los cuales siempre he tratado de demostrar, muchas gracias por apoyarme a cumplir esta meta, gran parte de este esfuerzo es gracias a ustedes.

Y por último agradecer el financiamiento del proyecto FONDECYT N° 1200504, el cual hizo posible esta investigación.

Tesis Financiada a través del proyecto Fondecyt N° 1200504

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULOS	PÁGINAS
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. Introducción.....	3
2. Enzimas involucradas en la descomposición de la pared celular vegetal.....	4
3. Enzimas LPMOS.....	6
3.1 Generalidades de las LPMOs.....	6
3.2 Mecanismo de acción.....	9
4. Problemáticas y desafíos de las LPMOs.....	11
5. Aplicación de Ingeniería de Proteínas en enzimas LPMOs.....	14
6. Uso de organismos recombinantes para la producción de LPMOs.....	16
6.1 Producción de LPMOs.....	20
7. Aplicación industrial de las enzimas LPMOs.....	21
7.1 Aplicación de las LPMOs en la industria de la celulosa.....	22
7.2 Aplicación de LPMOs en combinación con otras enzimas para la generación de productos industriales.....	25
8. Proyecciones futuras.....	28
9. Conclusiones.....	29
10. Bibliografía.....	31

INDICE DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1.....	5
Figura 2.....	7
Figura 3.....	9
Figura 4.....	10
Figura 5.....	11
Figura 6.....	13
Figura 7.....	15
Figura 8.....	18
Figura 9.....	19
Figura 10.....	20
Figura 11.....	23
Figura 12.....	24
Figura 13.....	25
Figura 14.....	27

INDICE DE TABLAS

	Páginas
Tabla 1.....	8
Tabla 2.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS

GH:	Enzima glucohidrolasas
LPMOs:	Enzimas monooxigenasas líticas de polisacáridos
O ₂ :	Oxígeno
H ₂ O ₂ :	Peróxido de hidrogeno
His:	Histidina
Tyr:	Tirosina
CBH:	Celobiohidrolasas
GH61:	Glucosil-hidrolasa 61
AA:	Actividad auxiliadora
Tm:	Temperatura de fusión
CBM:	Sitio de unión a carbohidratos
EG:	Endoglucanasa
EX:	Endoxilanasas



RESUMEN

Las enzimas monooxigenasas líticas de polisacáridos, abreviadas como LPMOs (del inglés *Lytic polysaccharide monooxygenases*), catalizan la ruptura oxidativa de enlaces β – glucosídicos, de los más abundantes en polisacáridos de la biomasa lignocelulósica. Esta cualidad ha despertado un interés creciente en la industria de la celulosa, sacarificación y biocombustibles, debido a su capacidad oxidativa y la interacción sinérgica con otras enzimas hidrolíticas. A pesar de la importancia de las LPMOs como catalizadores de interés industrial, aún existen brechas de conocimientos y dificultades asociadas a la evaluación de su funcionalidad que necesitan ser resueltas. Los procesos industriales al utilizar condiciones drásticas de trabajo, requieren de enzimas eficientes y adaptadas a esas condiciones, las que difícilmente se encuentran en la naturaleza, pero que se pueden conseguir con la ayuda de la ingeniería genética y la ingeniería de proteínas, por ejemplo. Entre las mejoras enzimáticas se han investigado modificaciones para obtener enzimas LPMOs más resistentes a la temperatura. Sin embargo, entre los objetivos que aún están pendientes para la optimización enzimática de LPMOs están la resistencia al estrés oxidativo y la especificidad por el sustrato. La ingeniería genética mediante organismos recombinantes ha sido una buena herramienta para mejorar la eficiencia industrial de esta enzima, obteniendo una mayor producción enzimática, con bajos costos industriales. Esta revisión bibliográfica se enfocó principalmente en estos dos puntos, para así relevar la importancia del mejoramiento enzimático de las LPMOs para su aplicación en diferentes procesos industriales.

Palabras claves: Enzimas oxidativas – Termoestabilidad – Resistencia oxidativa - Expresión heteróloga – Interacción sinérgica – Conversión de biomasa

ABSTRACT

Lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) are enzymes that catalyze the oxidative cleavage of β -glycosidic bonds, one of the most abundant bonds in lignocellulosic biomass polysaccharides. This quality has garnered increasing interest in the cellulose, saccharification and biofuels industries due to their oxidative capacity and the synergistic interaction with other hydrolytic enzymes. Despite the importance of LPMOs as catalysts of industrial interest, knowledge gaps and difficulties associated with the evaluation of their functionality are yet to be resolved. The industrial processes when using drastic working conditions require efficient enzymes adapted to those conditions, which are found in nature with difficulty, but which can be achieved with the aid of genetic engineering and protein engineering, for example. Among the enzyme improvements, modifications have been investigated to obtain more resistant LPMOs at high temperatures. Nevertheless, among the issues that are still pending for enzymatic optimization of LPMOs are resistance to oxidative stress and specificity by substrate. Genetic engineering using recombinant organisms has been a good tool to improve the industrial efficiency of this enzyme, achieving a greater enzymatic production with low industrial costs. This bibliographic review focused mainly on these two points, in order to highlight the importance of enzymatic improvement of LPMOs for their application in different industrial processes.

Keywords: Oxidative enzymes - Thermostability - Oxidative resistance - Heterologous expression - Synergistic interaction - Biomass conversion

1. Introducción.

La producción y descomposición de biomasa vegetal es un proceso de gran magnitud en la naturaleza. Cada año, el CO₂ fijado por las plantas consume alrededor del 15% del carbono total de la atmósfera. Aproximadamente la mitad del carbono se incorpora en forma de polisacáridos estructurales y lignina, que se denominan colectivamente lignocelulosa. La lignocelulosa es el componente principal y más abundante de la biomasa producida por la fotosíntesis, y anualmente se forman 2×10^{11} toneladas en todo el mundo (Ragauskas *et al.*, 2006).

La pared celular vegetal está compuesta por tres tipos principales de polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina, que están estrechamente entrelazados y conectados por enlaces covalentes y no covalentes. La celulosa es el componente más importante para las industrias ya que ésta es la materia prima para la fabricación de papel, textiles, películas, espesantes y una gran variedad de subproductos (Pérez *et al.*, 2002; Cosgrove, 2005).

La descomposición de la celulosa ha sido un desafío para las industrias por la complejidad de su estructura cristalina recalcitrante, por ello se han estudiado distintas herramientas para su despolimerización, una de ellas es la utilización de enzimas glucohidrolasas (GH) como las celulasas, las cuales mediante hidrólisis rompen los enlaces β -1,4- glucosídicos, que mantienen unidos los monómeros de glucosa (Sangred *et al.*, 2013). Pero para aumentar la eficiencia de ruptura de estos enlaces se necesita la ayuda de enzimas con actividad auxiliadora, las cuales reducen el número de estructuras cristalinas facilitando la descomposición de la celulosa por las GH.

Dentro de las enzimas auxiliadoras las recientemente descritas monooxigenasas líticas de polisacáridos, conocidas como LPMOs por sus siglas en inglés (*Lytic Polysaccharide Monooxygenases*), desempeñan un papel fundamental en la conversión de la biomasa vegetal por ruptura oxidativa (Bissaro *et al.*, 2020). Al oxidar las estructuras cristalinas de la celulosa, las LPMOs crean nuevos puntos de acceso para las GH, disminuyendo la cristalinidad del sustrato, y aumentando así la eficiencia de las celulasas (Eibinger *et al.*,

2017). Por este motivo, las LPMOs tienen gran importancia industrial, debido a que mejoran la actividad de los cócteles enzimáticos para la despolimerización de la celulosa, por lo que disminuyen la carga enzimática. Por ejemplo, reducen los costos en la etapa de sacarificación en la producción de etanol de segunda generación (Corrêa *et al.*, 2016; Bissaro *et al.*, 2018).

Las enzimas LPMOs se descubrieron solo en la década pasada (año 2010) y, aunque han recibido una atención considerable desde entonces y son de gran importancia industrial, existen aún pocos estudios que aborden el tema del mejoramiento de estos catalizadores enzimáticos. Aun así, existen estudios donde se ha modificado el sitio activo de esta enzima, para mejorar la termoestabilidad y para cambiar la especificidad por el sustrato (Forsberg *et al.*, 2020). También se han desarrollado organismos recombinantes para la producción de LPMOs a gran escala (Gaber *et al.*, 2020).

Esta revisión bibliográfica se enfocará principalmente en estos dos puntos, para así relevar la importancia del mejoramiento enzimático de las LPMOs para su aplicación en diferentes procesos industriales.

2. Enzimas involucradas en la descomposición de la pared celular vegetal.

Los microorganismos son reconocidos productores de enzimas y metabolitos secundarios, los que pueden tener una diversidad de aplicaciones en las más variadas áreas industriales, como en las industrias del ámbito forestal, en la creación de subproductos (Rao *et al.*, 2017). Un grupo muy importante de estas enzimas son las enzimas que degradan la biomasa lignocelulósica. Entre ellas se encuentran las celulasas, las cuales mediante hidrólisis rompen los enlaces β -1,4- glucosídicos, que mantienen unidos los monómeros de glucosa. (Sangred *et al.*, 2013). También se encuentran las xilanasas, que mediante hidrólisis despolimerizan un tipo de hemicelulosa (Pollet *et al.*, 2010). La despolimerización de la lignina, está dada por enzimas con un alto poder oxidativo que generan productos altamente oxidados e inestables, entre las que destacan principalmente las lacasas y peroxidases (Furukawa *et al.*, 2014).

La conversión enzimática de polisacáridos provenientes de la biomasa vegetal actualmente se ha transformado en un desafío, por ser un tema clave para el desarrollo industrial. La eficiencia en la despolimerización de la celulosa depende de la capacidad de las enzimas para hidrolizar las zonas cristalinas, que permitan el acceso a las cadenas individuales del polímero (Eijsink *et al.*, 2005). Recientemente se han descubierto enzimas oxidativas que desafían el modelo clásico de la degradación de polisacáridos mediante la vía hidrolítica (Hemsworth *et al.*, 2013). Estas enzimas, denominadas monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMOs) catalizan la despolimerización oxidativa de polisacáridos insolubles recalcitrantes (Figura 1), y constituyen un factor clave en la eficiencia de la despolimerización enzimática de biomasa lignocelulósica (Forsberg *et al.*, 2011; Bissaro *et al.*, 2019).

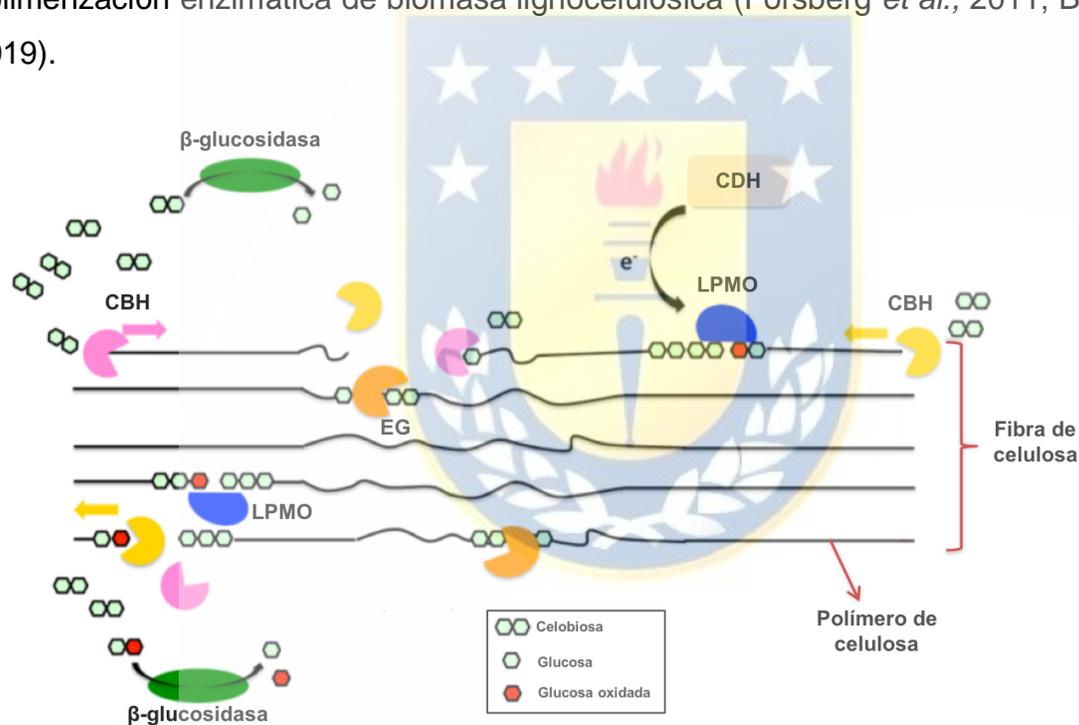


Figura 1. Representación esquemática de la degradación enzimática de la fibra de celulosa de acuerdo con Dimarogona *et al.* (2012). Las celobiohidrolasas (CBHs) degradan la celulosa desde ambos extremos (reductor y no reductor) liberando moléculas de celobiosa, en cuanto que las endoglucanasas (EGs) y las monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMOs) rompen enlaces internos de la cadena de celulosa creando nuevos puntos de acción para las CBHs. La celobiosa deshidrogenasa (CDH) se encarga de donar los electrones utilizados por las LPMOs. Finalmente, la β -glucosidasa hidroliza las moléculas de celobiosa liberando dos unidades de glucosa.

3. Enzimas LPMOs.

3.1. Generalidades de las LPMOs

Las LPMOs, presentan una masa molar aproximada de 50 kDa, son enzimas monocúpricas que presentan como grupo prostético un ion cobre (II) en un sitio activo inusual y expuesto, localizado en el centro de esta enzima (Figura 2), en una superficie relativamente plana (Forsberg *et al.*, 2020, Finn *et al.*, 2012). Esta topología es esencial para que las LPMOs ataquen los enlaces glucosídicos en las regiones recalcitrantes, ordenadas y planas de polisacáridos como celulosa y quitina (Bissaro *et al.*, 2018). Esta acción ocurre a través de un mecanismo oxidativo que involucra un donador de electrones y oxígeno molecular (O₂) o peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Labourel *et al.*, 2020).

El sitio activo como fue mencionado anteriormente, contiene un cobre mononuclear el cual se encuentra asociado a tres aminoácidos altamente conservados, dos son residuos de histidina (His), donde uno de ellos se encuentra en el extremo N-terminal, y un residuo de tirosina (Tyr) (Figura 2). En este sitio activo la His constituye una especie de “soporte” de unión para el Cu, que resulta ser una característica compartida transversalmente en estas enzimas (Koseki *et al.*, 2008). Esta composición del sitio activo facilita la unión del cosustrato O₂ y permite la reducción de un electrón de O₂ por oxidación, seguido por la oxidación del Cu (I) unido a la enzima (Brander *et al.*, 2020). Esto permite una mayor reducción del complejo enzima-sustrato seguido de la escisión del enlace glucosídico. En las LPMOs fúngicas, la His N-terminal del sitio activo puede sufrir modificaciones postraduccionales (metilación), que pueden aumentar la estabilidad redox de la enzima (Petrovic *et al.*, 2018).

Esta enzima fue clasificada inicialmente como glucohidrolasa (GH) de la familia proteica 61 (GH 61), siendo la primera enzima LPMO descrita la del hongo comestible *Agaricus bisporus* (Koseki *et al.*, 2008). En este estudio no se comprobó la actividad enzimática, pero sí se demostró que se expresaba cuando había presencia de celulosa en el medio (Lo Leggio *et al.*, 2012). No obstante, no fue sino hasta el año 2011 cuando estudios en la proteína GH 61 de *Thermoascus auranticus* (TaGH61A) demostraron que la actividad de la enzima estaba altamente relacionada con la oxidación y que la TaGH61A conteniendo Cu

degradaba oxidativamente la celulosa cristalina en presencia de moléculas redox pequeñas (Lo Leggio *et al.*, 2012; Karkehabadi *et al.*, 2008).

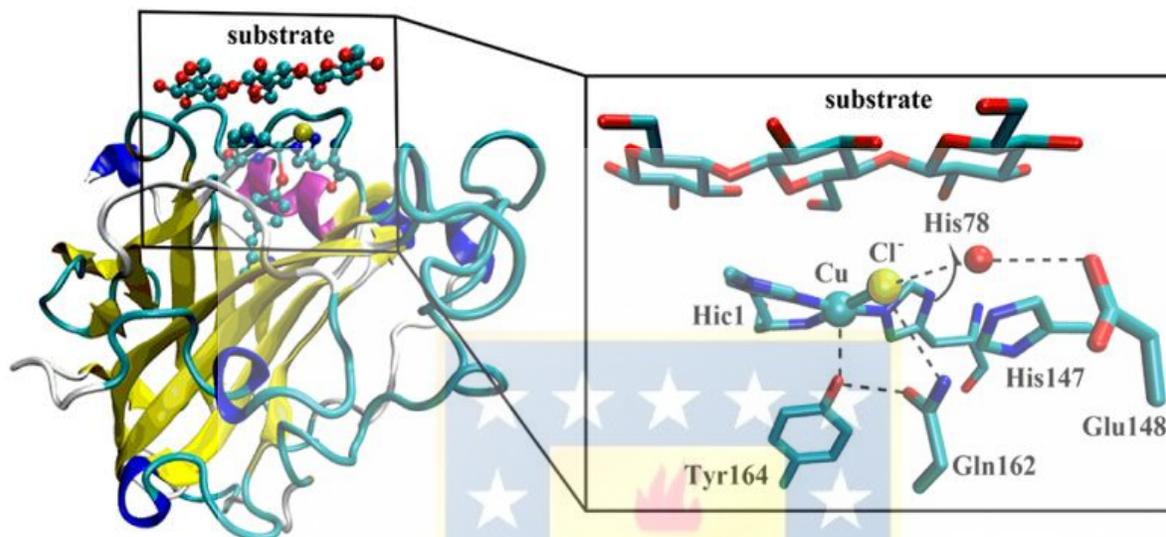


Figura 2. Estructura cristalina de la enzima LPMO de la familia LsAA9 con un sustrato de polisacárido unido a la superficie de la enzima. Al lado derecho de la figura se resalta la estructura del sitio activo, donde se aprecia el grupo prostético (con ion Cu^{2+}), además de los residuos de aminoácidos (Wang *et al.*, 2019).

Las LPMOs se clasifican como actividades auxiliares (AA) en la base de datos de enzimas activas de carbohidratos (CAZy; cazy.org) donde se dividen en siete familias (AA9 - 11 y AA13 - 16) (Tabla 1), basadas en similitudes de las secuencias. La gran mayoría de las LPMOs estudiadas en detalle pertenecen a las familias AA9 y AA10. Usando un solo átomo de cobre como su único cofactor (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2012; Quinlan *et al.*, 2011; Henrissat *et al.*, 2019), las LPMOs oxidan los enlaces C - H con energías que pueden llegar hasta 100 kcal/mol (Gao *et al.*, 2013) y probablemente mayores para los polisacáridos incrustados en una red cristalina (Walton *et al.*, 2013).

Tabla 1. Resumen de las familias de actividades auxiliares de la enzima LPMO (adaptada de Fosberg *et al.*, 2020).

Familia		Especificidad	Regioselectividad	Número de estructuras cristalinas
AA	Fuente	por Sustrato	d	
AA9	Hongos	Celulosa	Específico C1	17
		Celo-oligosacáridos	Específico C4	
		Glucomananos	Mixto C1-C4	
		Glucanos de enlace mixto		
		Xilano		
		Xilo-oligosacáridos		
		Xiloglucanos		
AA10	Bacteria	Celulosa	Específico C1	22
	Hongos	Quitina	Mixto C1-C4	
	Plantae			
	Animalia			
	Archea			
	Virus			
AA11	Hongos	Quitina	Específico C1	1
AA13	Hongos	Almidón (enlace α - 1,4)	Específico C1	1
AA14	Hongos	Xilano	Específico C1	1
	Animalia			
AA15	a	Celulosa	Específico C1	1
	Primitiva	Quitina		
	Eukarya			
	Virus			
AA16	Hongos	Celulosa	Específico C1	-----
X325	Hongos	-----	-----	1

3.2 Mecanismo de acción.

El mecanismo de acción de las LPMOs aún no está bien dilucidado, pero se conoce parte de su ciclo catalítico, donde generalmente se acepta que el ciclo es iniciado a través de la reducción, vía un electrón, del Cu (II) del sitio activo de la enzima por un donador de electrones externo, que puede ser un compuesto orgánico como ácido ascórbico, ácido gálico, L- cisteína o diferentes fenoles derivados de plantas u hongos o incluso por otras enzimas con actividad redox como la celobiosa deshidrogenasa (CDH) (Forsberg *et al.*, 2020; Kracher *et al.*, 2020; Frommhage *et al.*, 2018). Una vez reducido a Cu (I), la enzima puede reaccionar con un co-sustrato, los cuales pueden ser O₂ (reacción como monooxigenasa) o H₂O₂ (reacción como peroxidasa) (Figura 3), donde para la reacción como monooxigenasa necesita dos electrones suministrados externamente, para cada ciclo catalítico, mientras para la reacción como peroxidasa necesita recibir solo un electrón para poder reducirse de LPMO-Cu (II) a LPMO-Cu (I) (Kjaergaard *et al.*, 2014; Kuusk *et al.*, 2018). Independientemente del mecanismo de acción (monooxigenasa o peroxidasa), la reacción producida por la enzima LPMO da como resultado la hidroxilación de un carbono del enlace glucosídico, lo que conduce a la desestabilización y ruptura del enlace (Filandr *et al.*, 2020; Crouch *et al.*, 2016).

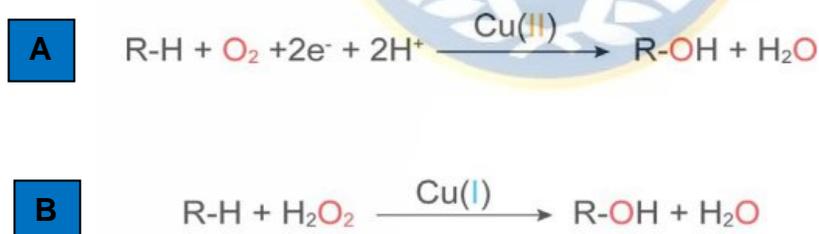


Figura 3. Representación de la reacción de LPMO como monooxigenasa (A), donde se necesitan dos electrones externos para poder reducir el grupo prostético Cu (II), y reacción como peroxidasa (B) donde solo se necesita un electrón para reducir el Cu (II) (Forsberg *et al.*, 2020).

Las LPMOs pueden oxidar el carbono C1 o C4 del sustrato, mientras que algunas producen mezclas de productos oxidados con C1 y C4 (Forsberg *et al.*, 2020; Isaksen *et al.*, 2014; Quinlan *et al.*, 2011) (Figura 4). La oxidación C1 genera lactonas que están en equilibrio con sus ácidos aldónicos, mientras que la oxidación C4 conduce a la formación de cetonas que están en equilibrio con sus gemidiones (Forsberg *et al.*, 2020).

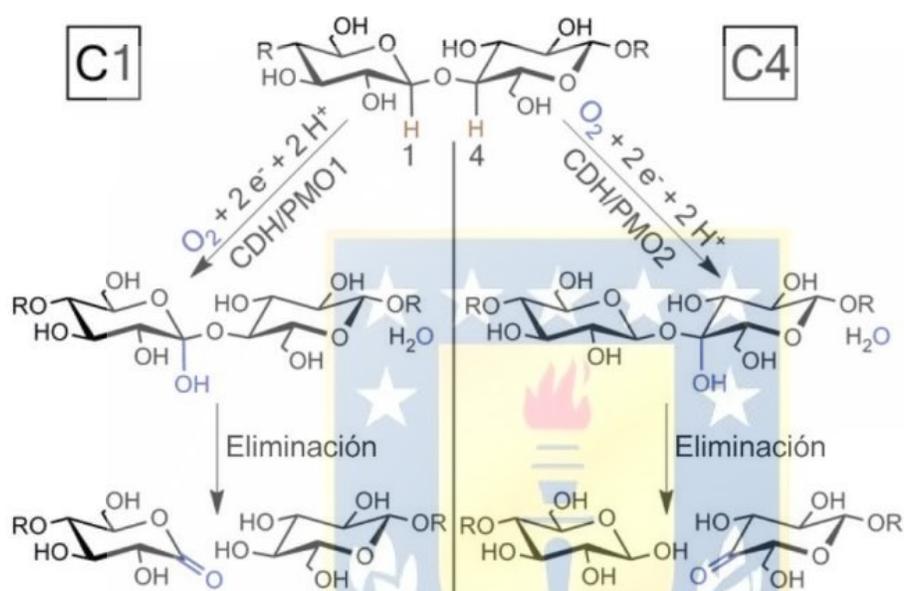


Figura 4. Mecanismos de acción propuestos para las LPMOs. A la izquierda se muestra el mecanismo mediado por la oxidación del C1 de la glucopiranososa, y a la derecha se muestra el mediado por la oxidación del C4, catalizados por la reacción de monooxigenasa (Beeson *et al.*, 2012).

Wang *et al.* (2019), estudiaron la catálisis de esta enzima mediante una simulación usando ascorbato como agente reductor. Se descubrió que, a partir del estado inicial de reposo de la LPMO, el Cu (II) se reduce a Cu(I) por acción del ascorbato. A esto le sigue una rápida unión de O₂ para generar su forma radical de superóxido LPMO – Cu (II)- O₂^{-•}. Posteriormente, la LPMO – Cu (II) -O₂^{-•} extrae un átomo de hidrógeno del ácido ascórbico (HAA) para generar LPMO– Cu (II) -OOH. A partir de esta especie, los investigadores descubrieron que existe una fuerte tendencia a formar un enlace de hidrógeno (con el hidrógeno extraído de otra molécula de ácido ascórbico) con el O proximal de Cu-OOH, lo que lleva a la formación de H₂O₂ y la reducción de Cu (II) a Cu (I). Finalmente, si no existe

unión del sustrato (polisacárido) al sitio activo, se produce un desacoplamiento del H_2O_2 . Mientras que, si hay un acoplamiento del sustrato al sitio activo de esta enzima, se rompe el enlace glucosídico y se liberan productos oxidados del polisacárido (Figura 5) (Wang *et al.*, 2019).

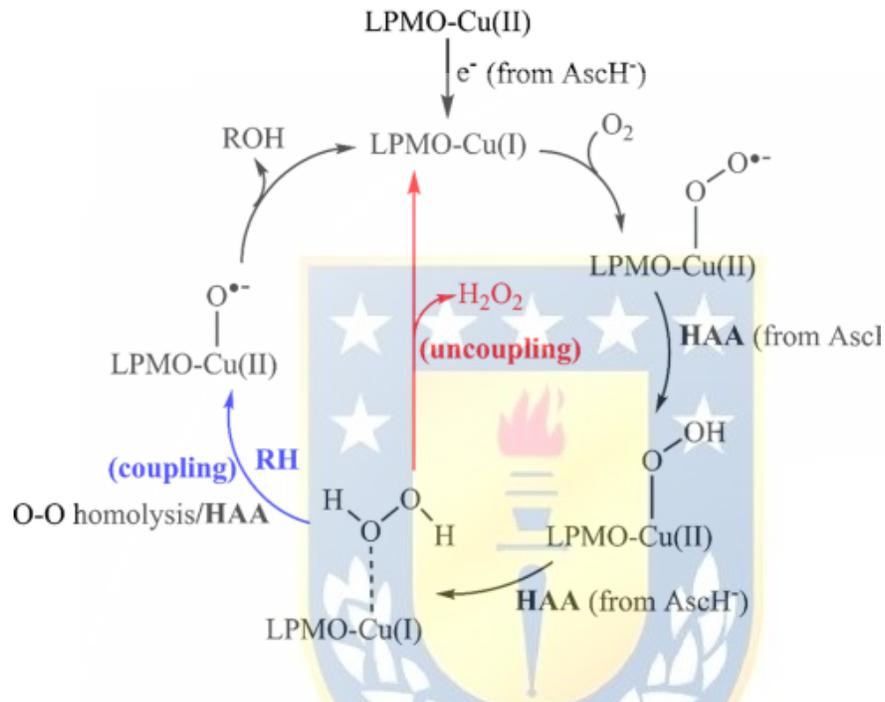


Figura 5. Ciclo catalítico de LPMO cuando actúa como monooxigenasa (con O_2) en presencia de ácido ascórbico propuesto en el trabajo de Wang *et al.* (2019). La flecha roja representa la ruta de desacoplamiento del sustrato del sitio activo, mientras que la flecha azul representa la reacción que se produce cuando ocurre acoplamiento del sustrato al sitio activo (RH representa el sustrato polisacárido).

4. Problemáticas y desafíos de las enzimas LPMOs.

A pesar de la enorme importancia industrial de las LPMOs y de todo el conocimiento reunido en los últimos años, aún existen aspectos poco conocidos y otros que han revelado algunas problemáticas asociadas a características propias de estas enzimas. Entre los aspectos aún poco conocidos de estas enzimas están los parámetros cinéticos, relacionados principalmente con las dificultades encontradas para evaluar la funcionalidad de la enzima en condiciones experimentales (Forsberg *et al.*, 2016, 2020; Eijsink *et al.*, 2019). Este es

uno de los grandes problemas que presentan las LPMOs, y estaría asociado a las múltiples reacciones secundarias que pueden catalizar.

Una de tales reacciones es la de autoinactivación oxidativa, que es producida cuando la enzima en su forma reducida (LPMO-Cu(I)) se encuentra en ausencia de sustrato o no está saturada con sustrato, o el complejo enzima-sustrato es débil. Entonces la enzima reacciona con H_2O_2 , lo que provoca oxidación del sitio activo e inactivación de la enzima (Figura 6, etapa vi). Por otro lado, en presencia de O_2 , las LPMOs reducidas que no están unidas a su sustrato, catalizan una reacción de oxidasa que produce H_2O_2 (Figura 6, etapa ii), o el H_2O_2 se puede producir por autooxidación del agente reductor (ej. ácido ascórbico) en una reacción catalizada por metales de transición que se encuentran libres en la solución (Figura 6, etapa iii). Todo este H_2O_2 generado puede conducir también a inactivación de la enzima (Kittl *et al.*, 2012; Bissaro *et al.*, 2020). Otra reacción secundaria puede ocurrir cuando se trabaja con sustratos que pueden contener componentes activos redox como contaminantes, los que pueden reaccionar con el O_2 o el H_2O_2 en el medio de reacción, donde las reacciones con O_2 normalmente conducirán a la formación de H_2O_2 y, por lo tanto, acelerarán la reacción de la LPMO. Mientras que las reacciones con H_2O_2 podrían conducir a una ralentización de la reacción de la LPMO (Eijsink *et al.*, 2019; Forsberg *et al.*, 2019, 2020). Las LPMOs producidas por hongos tienden a estar metiladas en la His N-terminal, producto de una modificación post-traduccional, lo que se ha relacionado con la resistencia a la inactivación de la enzima fúngica en presencia de altas concentraciones de H_2O_2 (Petrovic *et al.*, 2018).

Otro problema que está asociado a la expresión de esta enzima se relaciona con su sitio activo donde una unión deficiente con el péptido señal, puede cambiar el residuo His N-terminal necesario para la unión al Cu, limitando así la expresión de la enzima o produciendo enzimas inactivas catalíticamente. La forma más conveniente de producir enzima manteniendo la His N-terminal es que la síntesis ocurra en el espacio periplásmico o de forma extracelular, utilizando péptidos señal apropiados como son la translocación gemela de Arginina (TAT del inglés *Twin Arginine Translocation*) o las vías de secreción general (SEC) (Russo *et al.*, 2019; Frandsen *et al.*, 2016).

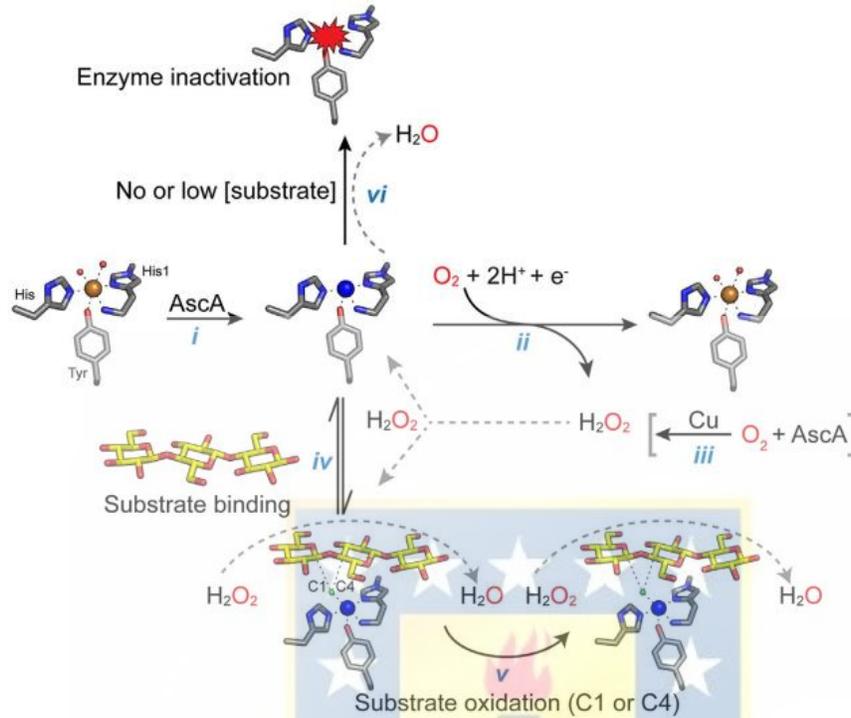


Figura 6. Descripción de las reacciones productivas y secundarias, realizadas por las LPMOs cuando usa H₂O₂ como co-sustrato. (i) La enzima LPMO (LsAA9A) oxidada se reduce en presencia de ácido ascórbico (AscA) a la forma LPMO-Cu (I). (ii) En condiciones aeróbicas, el H₂O₂ se genera mediante la reacción de LPMO-Cu (I) con O₂, en una actividad de oxidasa. (iii) El reductor AscA puede autooxidarse en presencia de Cu (II) en la solución, generando H₂O₂. (iv) Cuando la enzima reducida se une al polisacárido, cataliza la ruptura de enlaces glicosídicos mediante una reacción peroxidasa, en presencia de H₂O₂ como co-sustrato. (v) La enzima reducida puede catalizar diversos eventos sucesivos. (vi) En presencia de baja concentración de sustrato o en su ausencia la enzima puede inactivarse (Forsberg *et al.*, 2020).

Todas estas dificultades y reacciones no deseadas de las LPMOs, algunas de las cuales aún no son bien comprendidas, han provocado una limitación en las estrategias aplicadas al mejoramiento de la enzima, ya sea a través de la selección de nuevos microorganismos productores, o a través de ingeniería genética o ingeniería de proteínas.

5. Aplicación de Ingeniería de Proteínas en enzimas LPMOs.

Las LPMOs muestran una capacidad única, para degradar sustratos altamente cristalinos, pero la aplicación industrial de estas proteínas implica el uso de condiciones severas de trabajo que pueden restringir su aplicación y que por ello demandan una optimización enzimática (Forsberg *et al.*, 2020).

El procesamiento de biomasa lignocelulósica generalmente implica un pretratamiento a alta temperatura seguido de la adición de cócteles enzimáticos, para la despolimerización de los polisacáridos. La termoestabilidad de las enzimas en tales cócteles es un factor económicamente relevante, ya que las enzimas estables permiten temperaturas de reacción más elevadas que reducen los costos de enfriamiento, mejoran la solubilidad de los reactivos y reducen el riesgo de contaminación microbiana (Escuder-Rodríguez *et al.*, 2018). Existen numerosos estudios donde se han realizado modificaciones enzimáticas a las celulasas para proporcionarles resistencia, como por ejemplo a altas temperaturas (Ellinghaus *et al.*, 2018; Haq *et al.*, 2015; Nakabayashi *et al.*, 2019) mientras que se sabe poco sobre la estabilidad térmica de las LPMOs, con solo dos casos de enzimas termoestables producidas a través de ingeniería de proteínas descritos hasta ahora (Lo Leggio *et al.*, 2018; Tanghe *et al.*, 2017). Por lo tanto, esta es un área de investigación de interés creciente en la ingeniería de proteínas de LPMOs.

En el estudio de Lo Leggio *et al.* (2018), se mejoró la enzima LPMO AA9, proveniente de *Aspergillus fumigatus* (AfAA9_B), que posee en su sitio activo dos residuos de His y tres residuos de aminoácidos ácidos próximos entre sí, ácido glutámico (Glu84), ácido aspártico (Asp131) y Asp132. Esta característica le otorga a la enzima una baja termoestabilidad debido a inestabilidad del sitio activo por la diferencia de cargas entre los residuos de aminoácidos. Así que, mediante mutagénesis, se sustituyeron los aminoácidos Glu84, Asp131 y Asp132 por serinas (Ser), lo cual disminuyó las interacciones desfavorables de cargas, mejorando la termoestabilidad de la enzima. A través de esta modificación la termoestabilidad de la variante modificada de LPMO aumentó en 7 °C respecto a la enzima nativa AfAA9_B, que era moderadamente termoestable (Lo Leggio *et al.*, 2018).

Tanghe *et al.* (2017), mejoraron la enzima LPMO10c proveniente de la bacteria *Streptomyces coelicolor*, que presenta una temperatura de fusión (T_m) de 51° C, la cual es normal para enzimas mesófilas. Además, esta enzima contiene dos puentes disulfuro en su dominio catalítico (DC) y uno en el módulo de unión a carbohidratos (MUC). Cuando la enzima nativa es incubada a altas temperaturas (80°C) por un periodo de 2 horas presenta una actividad residual de 34%, capacidad relacionada a los puentes disulfuro. Para poder investigar más a fondo la resistencia al calor debida a los puentes disulfuro, los autores introdujeron en la enzima enlaces adicionales. Con esto demostraron que la ingeniería de los puentes disulfuro es una herramienta poderosa para aumentar la estabilidad térmica de la LPMO10C, cuya T_m aparente aumentó de 51 para 63° C mediante la introducción de dos puentes disulfuro adicionales (Tanghe *et al.*, 2017).

La tolerancia al H_2O_2 y la estabilidad oxidativa son otros objetivos relevantes e interconectados para la optimización enzimática de LPMO (Forsberg *et al.*, 2020; Bissaro *et al.*, 2017). Al respecto, Kuusk *et al.* (2018) demostraron que al añadir H_2O_2 al medio donde se encontraba la enzima CBP21 (AA9) se acelera la reacción de oxidación (Figura 7). Pero también se ha demostrado que al añadir concentraciones elevadas de H_2O_2 , se puede producir una autooxidación de la enzima (Forsberg *et al.*, 2020). Por lo tanto, sería de interés modificar el sitio activo de las LPMOs para otorgar estabilidad oxidativa y así acelerar las reacciones de oxidación.

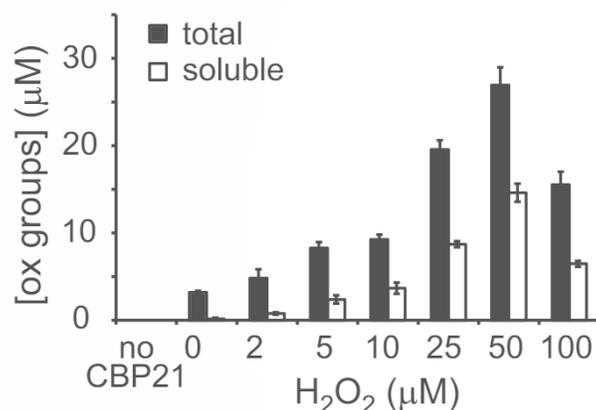


Figura 7. Formación de grupos oxidados solubles y totales tras la incubación de un sustrato de quitina (*chitin nanowhiskers*) con CBP21 (AA9) a diferentes concentraciones iniciales de H_2O_2 .

La actividad eficiente de las enzimas también depende de la unión al sustrato. Las enzimas LPMOs presentan sitios de unión a carbohidratos (CBM), y estos sitios promueven la actividad catalítica de la enzima, además de reducir su inactivación (Chalak *et al.*, 2019). Es por ello que otra forma de mejorar la eficiencia de esta enzima es introduciendo varios CBM al dominio de ésta, teniendo en consideración que las uniones fuertes al sustrato, pueden ralentizar la actividad enzimática, lo que se puede traducir en bajas tasas de actividad (Courtade *et al.*, 2018). Estudios más recientes relacionados con el mejoramiento de la actividad de las LPMOs, sugieren modificaciones en la regioselectividad del sustrato, donde la mayor dificultad está en la poca información sobre el sitio activo de la enzima y el mecanismo catalítico, aún poco estudiado (Jensen *et al.*, 2019; Forsberg *et al.*, 2020). Es por ello, que se necesita más información sobre el ciclo catalítico y sitio activo de esta enzima para poder ampliar los estudios sobre la transformación enzimática y así poder optimizar algunos procesos industriales.

6. Uso de organismos recombinantes para la producción de LPMOs.

La expresión homóloga no siempre es factible cuando se producen proteínas para caracterización y aplicaciones biotecnológicas. En varios casos, el organismo de origen no se puede cultivar *in vitro* y/o las proteínas no se pueden producir o aislar en cantidades suficientemente grandes para la caracterización y la aplicación biotecnológica (Forsberg *et al.*, 2020). Además, la producción de enzimas para aplicaciones industriales requiere organismos vivos que produzcan enzimas en alta concentración y en una forma relativamente pura. Por lo tanto, es necesario seleccionar organismos alternativos para la expresión heteróloga para la producción de enzimas de aplicación industrial como las LPMOs (Gaber *et al.*, 2020).

Un ejemplo en la expresión heteróloga de la enzima LPMO en bacterias Gram-positiva es *Bacillus subtilis*, que se ha utilizado como huésped de expresión para la producción de una LPMO AA10 de *B. atrophaeus* (BaAA10) (Yu *et al.*, 2016). Una de las ventajas de usar *B. subtilis*, es que naturalmente tiene una alta capacidad de secreción de metabolitos, donde las proteínas las secreta directamente al medio extracelular. Además el sistema de expresión de *B. subtilis* presentado en este artículo mostró varios beneficios en

comparación con el sistema de expresión de *E. coli*, como la ausencia de inducción isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), mayor productividad, secreción de la enzima en el medio y una purificación simple sin fraccionamiento periplasmático (Yu *et al.*, 2016).

Russo *et al.* (2019), han demostrado la expresión heteróloga de una LPMO de la bacteria Gram-positiva *Thermobifida fusca* en la cianobacteria *Synechococcus elongatus*. Una de las principales ventajas al usar una cianobacteria como huésped de expresión, es que éstas son de rápido crecimiento y genéticamente manipulables. Además, al ser una cianobacteria puede crecer en presencia de nutrientes inorgánicos de bajo costo. Aunque tiene todas estas ventajas, la proteína recombinante (TfAA10A) de *T. fusca*, tuvo un bajo rendimiento <1 mg / L. Por lo tanto, si bien las cianobacterias tienen un potencial creciente como fábricas de enzimas, su aplicación para la producción a gran escala aun es limitada y la secreción de la enzima es de forma intracelular. Es por ello que se probaron dos vías de secreción extracelular de proteínas dirigidas por péptidos señal, las cuales son TAT (TorA- Tf AA10A) y SEC (TfAA10A), donde la enzima TfAA10A, demostró ser más eficiente en la secreción extracelular. El procesamiento correcto del péptido señal se analizó usando electroforesis (SDS-PAGE), tomando muestras del medio de cultivo y del lisado celular, donde se sugirió que Tf AA10A (dirigido por SEC) fue secretada de forma correcta, ya que el tamaño observado de la proteína coincidía con el tamaño esperado de la proteína madura. Sin embargo, la TorA- Tf AA10A dirigida por TAT se encontró principalmente sin procesar (proteínas no maduras) y degradada en la membrana plasmática, en el espacio intracelular (Figura 8). Además, por densidad de bandas se determinó que el rendimiento de la enzima TfAA10A dirigida por SEC era de 779 ± 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Russo *et al.*, 2019). Cabe destacar que la correcta unión del péptido señal al N-terminal y la secreción extracelular son de gran importancia para poder purificar y cuantificar la enzima de forma eficiente y correcta, ya que facilitaría su extracción.

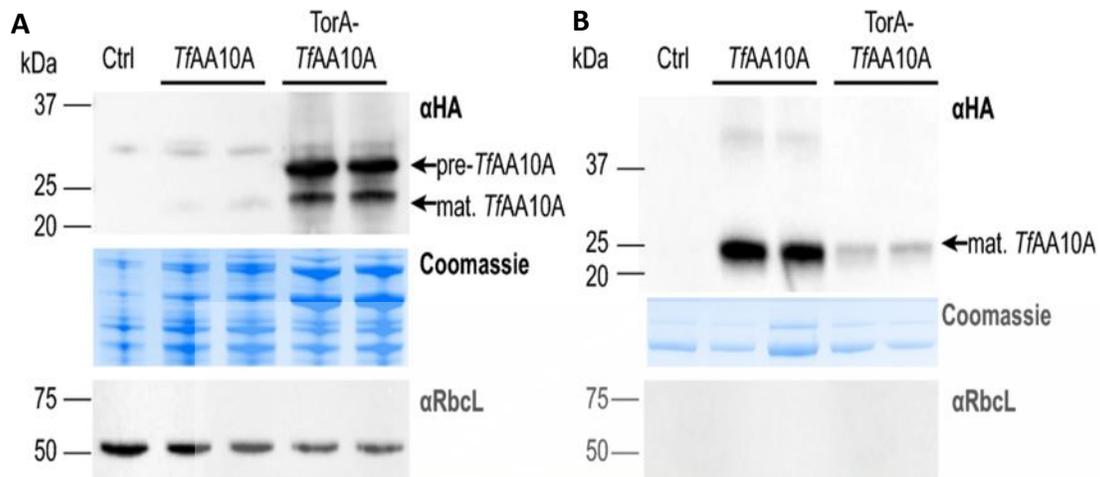


Figura 8. (A) Lisados celulares de dos transformantes independientes que expresan *TfAA10A* y *TorA-TfAA10A*. (B) Medio de cultivo de dos transformantes independientes que expresan *TfAA10A* y *TorA-TfAA10A*. La banda de proteína madura (procesada) se indica con una flecha. Ctrl indica una cepa de control de vectores vacía (Russo *et al.*, 2019).

Las LPMO eucariotas (principalmente fúngicas), por otro lado, se expresan más comúnmente con huéspedes de expresión eucariotas como la levadura *Pichia pastoris* o los hongos filamentosos *Hypocrea jecorina*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus oryzae* y *Myceliophthora thermophila* (Gaber *et al.*, 2020). En particular, muchas de estas cepas de hongos son cepas industriales utilizadas para la producción de cócteles de enzimas que degradan la biomasa (Makinen *et al.*, 2014; Punt *et al.*, 2010). Una ventaja principal del uso de sistemas de expresión eucariotas sobre los sistemas de expresión bacterianos es que en los primeros el gen de interés está incorporado en el ADN cromosómico; por tanto, no hay necesidad de un marcador de selección después de que se haya seleccionado una cepa de producción. Además, estos sistemas de expresión incluyen el reconocimiento y procesamiento correcto del péptido señal y la secreción de la proteína recombinante en el espacio extracelular (Petrović *et al.*, 2018).

Sanhueza *et al.* (2018), estudiaron dos proteínas auxiliares del hongo de la pudrición parda *Gloeophyllum trabeum*: una LPMO de la familia AA9 (GtLPMO) y una xilanasa GH10 (GtXyn10A), las cuales fueron expresadas en *P. pastoris* como organismo huésped. Las dos

enzimas se expresaron en la fracción extracelular del cultivo después de la inducción con metanol. El proceso de separación produjo proteínas altamente purificadas (Figura 9), con rendimientos de 22 mg/L para GtXyn10A y 1 mg/L para GtLPMO. Por otro lado, la proteína GtLPMO presentó un tamaño de 50 kDa determinado por electroforesis, casi el doble del tamaño predicho por la secuencia. Sin embargo, después de la desglicosilación con N-glicosidasa (Rapid™ PNGasaF), la proteína migró cerca de los 27 kDa, que era lo esperado. Para evaluar la actividad de la enzima GtLPMO recombinante, se midió su efecto sobre la hidrólisis del papel de filtro por la celulosa (Celluclast), donde alcanzó un incremento en la degradación del 60% con 3,5 µg/mL de la enzima GtLPMO (Figura 10). Cabe destacar que el incremento en la degradación del sustrato solamente se observó cuando se adicionaba ácido ascórbico a una concentración de 1 mM a la mezcla de reacción. La enzima GtLPMO también se probó en combinación con la enzima hidrolítica recombinante GtXyn10A, en el tratamiento de xilano (madera de haya), donde después de dos horas a 50 °C, la producción de azúcares reductores aumentó 2,3 veces con GtLPMO y xilanasa, en comparación con xilanasa sola (Sanhueza *et al.*, 2018).

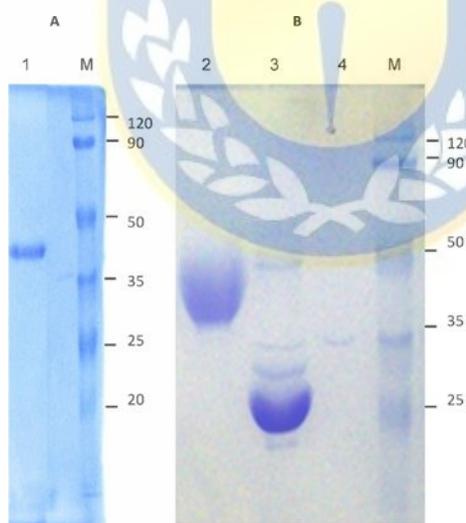


Figura 9. Electroforesis en gel SDS-PAGE de GtXyn10A y GtLPMO. A) GtXyn10A purificada (1); B) GtLPMO purificada (2), GtLPMO después del tratamiento con PNGasa (3), PNGasa F (4). M: marcador de masa molecular (Sanhueza *et al.*, 2018).

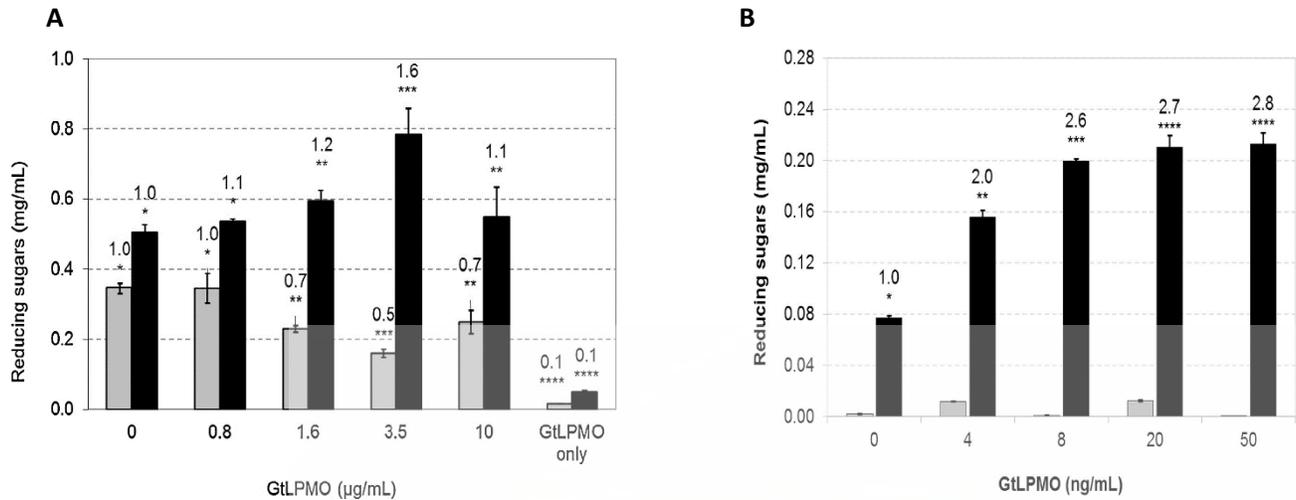


Figura 10. A) Efecto de GtLPMO sobre la hidrólisis de celulosa por Celluclast 1,5 L. B) Efecto de GtLPMO sobre la hidrólisis de xilano de madera de haya por GtXyn10A. Las barras grises representan los tratamientos en ausencia de ácido ascórbico y las barras negras en presencia de ácido ascórbico 1mM (Sanhueza *et al.*, 2018).)

6.1 Producción de LPMOs.

Las LPMOs se han producido a diversas escalas, como se informa en la literatura, utilizando placas de 96 pocillos o usando matraces Erlenmeyer bajo condición de agitación (Hansson *et al.*, 2017; Tanghe *et al.*, 2015). Las cepas de microorganismos seleccionadas se cultivan en matraces con agitación, lo que proporciona rendimientos proteicos satisfactorios para fines de caracterización bioquímica (Sabbadin *et al.*, 2018). Por ende, antes de escalar a la producción en biorreactor hay que encontrar la manera de analizar de forma efectiva la eficiencia de los extractos crudos de estas enzimas. Es por ello que los análisis deben ser simples, rápidos y adecuados para evaluar extractos crudos en forma directa. Diversos autores han desarrollado ensayos basados en espectroscopia para evaluar la actividad enzimática de las LPMOs así ser eficientes en la evaluación de los extractos crudos (Breslmayr *et al.*, 2018, 2019; Kittl *et al.*, 2012).

Los biorreactores son utilizados ampliamente para la producción de LPMO recombinante en *P. pastoris* (Bennati-Granier *et al.*, 2015; Karnaouri *et al.*, 2017) y en hongos filamentosos (Semenova *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019). La producción en biorreactor genera mayores

cantidades de enzima, esto beneficia la caracterización bioquímica y el desarrollo de ensayos enzimáticos (Hüttner *et al.*, 2019; Loose *et al.*, 2016). El uso de biorreactores es necesario para grandes aplicaciones industriales como la sacarificación de biomasa y modificación de fibras, donde se pueden incorporar además de las enzimas LPMO, cócteles de otras enzimas para favorecer y disminuir los costos energéticos en la degradación de celulosa o quitina (Moreau *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019). Para la producción de las enzimas LPMOs en biorreactor, se pueden utilizar medios de cultivo mínimos de bajo costo, adicionados de trazas de Cu, para garantizar una cantidad suficiente en el medio para la expresión de LPMO. Esto se usa en cultivos de producción de LPMOs por *P. pastoris*, donde el medio mínimo de cultivo se complementa con una solución de sales de *Pichia Trace Metal* (PTM1 o PTM4), la cual está descrito en el protocolo de fermentación de *P. pastoris* en Invitrogen (Bey *et al.*, 2013).

Una investigación realizada por Filiatrault-Chastel *et al.* (2019) ha informado que el cultivo de una cepa de *P. pastoris* que expresa AaAA16 de *A. aculeatus* en cultivo en matraz agitado ha conducido a la producción de proteínas recombinantes inactivas, mientras que el aumento de la producción mediante biorreactor ha permitido la producción de proteínas recombinantes activas, con una producción del 90% de la proteína AaAA16.

Forsberg *et al.* (2020) mencionan que la adición de H₂O₂ al medio de cultivo, actúa como una especie de catalizador, pero se debe tener precaución porque concentraciones muy altas pueden inducir a una autooxidación en el sitio activo de la LPMO (Forsberg *et al.*, 2020; Gaber *et al.*, 2020). Otro punto importante, si se está trabajando con organismos recombinantes para la producción de LPMOs, se debe escoger los componentes necesarios para su cultivo y además se debe incluir el marcador de selección (Forsberg *et al.*, 2011).

7. Aplicaciones industriales de la enzima LPMO.

En la naturaleza, la degradación de la biomasa vegetal se produce a través de la acción combinada y, a veces, sinérgica de varias enzimas hidrolíticas y oxidativas producidas por una diversidad de microorganismos (principalmente hongos y bacterias). En base a esto, la tecnología enzimática de lignocelulosa se ha enfocado durante años en la descomposición

de biomasa en azúcares para su posterior conversión en combustibles y productos químicos variados, utilizando diferentes combinaciones enzimáticas y otras proteínas accesorias (Gourlay *et al.*, 2013). Hoy en día, las LPMOs son un componente central de los cócteles de enzimas de última generación que se utilizan para la producción industrial de etanol lignocelulósico (Villares *et al.*, 2017; Valenzuela *et al.*, 2019).

7.1 Aplicación de las LPMOs en la industria de celulosa.

Las LPMOs se consideran un gran avance en los procesos que involucran la degradación enzimática de sustratos celulósicos porque rompen enlaces glucosídicos mediante reacciones de oxidación, y esto permite que el sustrato sea más susceptible a la hidrólisis por las celulasas convencionales (Xu *et al.*, 2013).

Una aplicación industrial de las LPMOs en la industria de la celulosa es en la fabricación de nanocelulosa (NC), donde la enzima LPMO ayuda a los cócteles de celulasas que son ocupados para la hidrólisis de la lignocelulosa (Xu *et al.*, 2013). Las LPMOs actúan sobre las cadenas de celulosa mediante la escisión oxidativa de los enlaces glucosídicos que conduce a la formación de unidades de glucosa oxidada en diferentes posiciones y, en consecuencia, un sustrato más susceptible a la hidrólisis por celulasas (Qing *et al.*, 2013). Hu *et al.* (2018), estudiaron el potencial de combinar endoglucanasa (EG), endoxilanasas (EX) y LPMO (AA9), para mejorar la fibrilación de la pulpa Kraft y encontraron diferencias importantes sobre las dimensiones y morfología de las fibras finales (Figura 11). La celulosa fibrilada, tratada con AA9 + EG + EX, presentó fibras con un grosor de 130 nm en promedio y una distribución de 60 a 260 nm entre las fibras (Hu *et al.*, 2018).

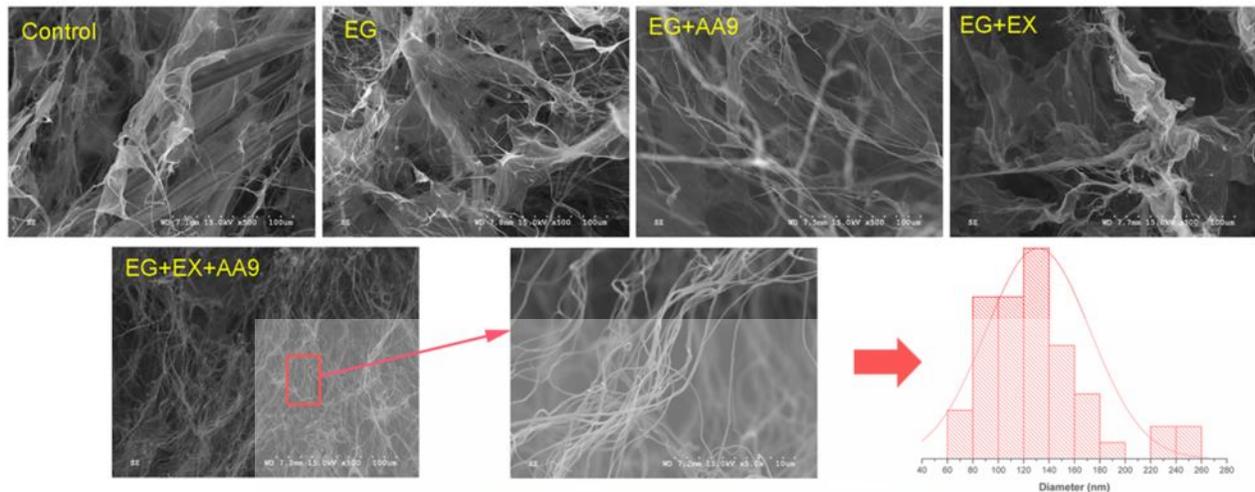


Figura 11. Fibrilación de la pulpa Kraft, después de los tratamientos enzimáticos con endoglucanasa (EG), LPMO AA9 y endoxilanas (EX), demostrando que la combinación sinérgica de enzimas hidrolíticas con LPMO genera una mayor nanofibrilación del material. El gráfico de la derecha muestra la distribución de diámetro de las fibras, donde el promedio fue 130 nm (Hu *et al.*, 2018).

Moreau *et al.* (2019) utilizaron la enzima LPMO recombinante fúngica *PaLPMO9E* en el procesamiento de pulpas Kraft (*birchwood*) para obtención de nanofibra de celulosa (NFC) (Figura 12). Los autores utilizaron ácido ascórbico como agente reductor y una relación enzima/sustrato de 1:500 y combinaron el tratamiento enzimático con tratamientos mecánicos de las pulpas. Los autores concluyeron que el tratamiento con la enzima LPMO (*PaLPMO9E*), facilitó el paso de las fibras de celulosa por la cámara del equipo (microfluidizador) y mejoró la nano fibrilación de la pulpa Kraft, después de pasar por la cámara de 200 y 100 μm , donde la pulpa Kraft NFC3 presentó alrededor de un 90% de elementos finos de manera similar a los tratamientos con endoglucanasa y/o exoglucanasa. (Figura 13). Además, con la acción de *PaLPMO9E*, se produce una pulpa con nano fibras bastante uniformes que potencialmente reducen la necesidad de refinado mecánico. A partir de los resultados los autores mencionan que la enzima *PaLPMO9E*, probablemente actúa sobre la superficie de las fibras elementales a través de una escisión oxidativa que libera una mezcla de oligosacáridos solubles oxidados en C1, sin modificación en la morfología y dimensiones de las fibras. El pretratamiento enzimático mantuvo casi intacta la cristalinidad de la red de celulosa. Sin embargo, el tratamiento mecánico posterior proporciona suficiente

energía para romper la red de celulosa tratada con PaLPMO9E, lo que sugiere que las LPMOs inducen un debilitamiento de la cohesión de las fibras elementales y aumentan la accesibilidad de las superficies (Moreau *et al.*, 2019). Cabe resaltar que a diferencia de la mayoría de los trabajos en la literatura que describen la utilización de LPMOs en combinación con otras enzimas, aquí se aplica un tratamiento que considera sólo LPMO y que se combina con un tratamiento mecánico posterior para la obtención de NCF.

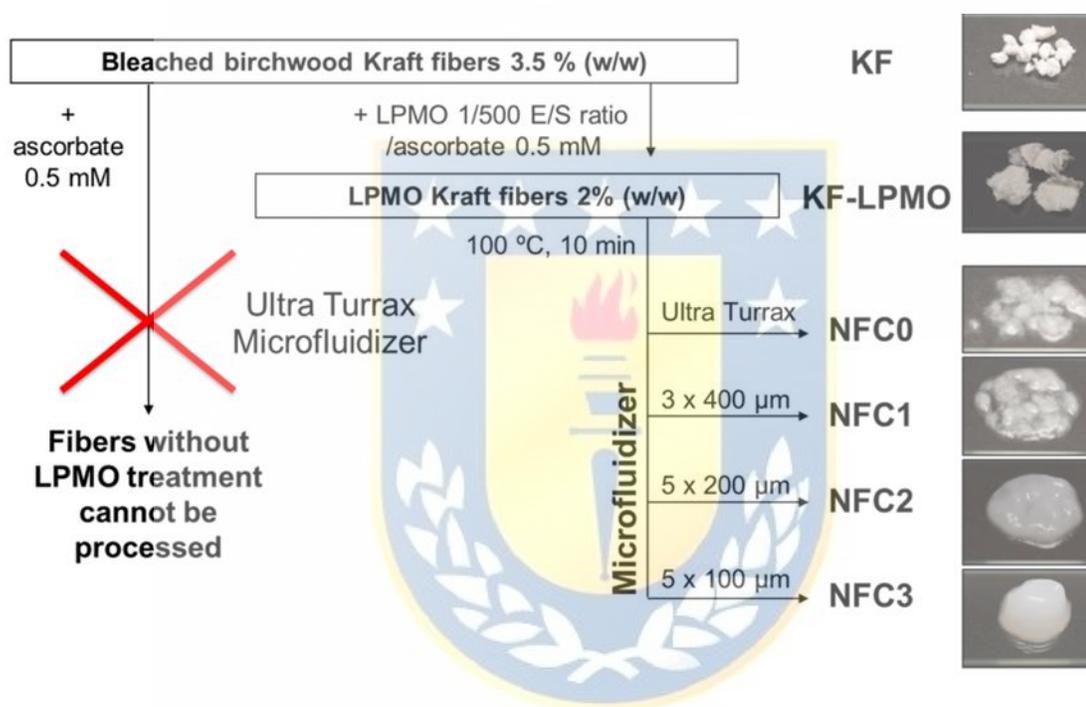


Figura 12. Procedimiento utilizado en la producción de nanofibra de celulosa (NFC) a partir de pulpa Kraft (KF) blanqueada, que incluye un tratamiento con la enzima LPMO y diferentes tratamientos mecánicos con microfluidizador. Las imágenes de la derecha muestran el material resultante después de la acción enzimática y mecánica (Moreau *et al.*, 2019).

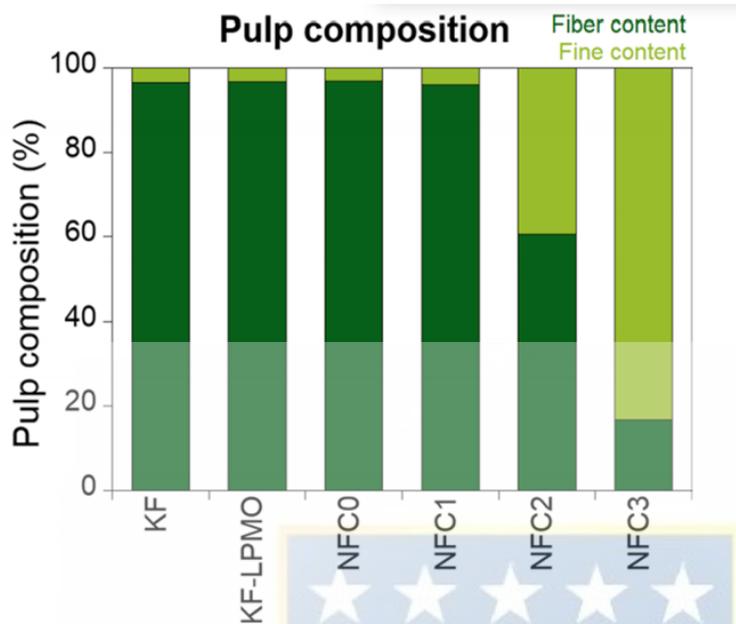


Figura 13. Composición de las pulpas luego de pasar por las acciones de la enzima LPMO (KF-LPMO) y la acción de diferentes tratamientos mecánicos (NFC0, NFC1 y NFC3). Se muestran los contenidos de fibra (verde oscuro) y de elementos finos (verde claro) en la pulpa (Moreau *et al.*, 2019).

La sacarificación rápida y rentable de la celulosa es fundamental para la generación de productos de valor agregado a partir de residuos vegetales (Salomon, 2016). La introducción de LPMO en cócteles comerciales de enzimas celulolíticas utilizados para la sacarificación de residuos vegetales pretratados ha dado lugar a una reducción significativa del coste de los procesos enzimáticos (Costa *et al.*, 2020). Chylenski *et al.* (2017), trataron pulpas de maderas blandas de abeto con celulasas comerciales y las compararon a tratamientos donde adicionaron una LPMO, obteniendo aumento en los rendimientos de sacarificación de aproximadamente 60%.

7.2 Aplicación de LPMOs en combinación con otras enzimas para la generación de productos industriales.

Por la actividad oxidativa de la enzima LPMO, ayuda a otras enzimas a hidrolizar enlaces glucosídicos, como fue mencionado anteriormente, es por ello que la combinación de esta

enzima con otras enzimas hidrolíticas favorece la reducción energética en los procesos industriales como en la industria de la sacarificación, biorrefinerías y de celulosa. Diversos estudios han demostrado la importancia del uso combinado (cócteles) de distintas enzimas hidrolíticas con la LPMO en la generación de productos de interés industrial (Hu *et al.* 2018; Müller *et al.*, 2015; Chylenski *et al.*, 2015; Quin *et al.*, 2013).

En un estudio realizado por Long *et al.* (2020), se realizó una expresión heteróloga de una enzima LPMO (PaAA9B) proveniente de *Podospora anserina* en *P. pastori*, para probar la sinergia de esta enzima cuando trabaja con una celulasa comercial (CTec2). La acción sinérgica de estas dos enzimas aumentó significativamente la hidrólisis de celulosa entre 2,3 y 1,4 veces, respecto al uso de las enzimas en forma separada. Por otro lado, Müller *et al.* (2015), aplicaron cuatro enzimas hidrolíticas comerciales: una β -glucosidasa (Novozym 188), Celluclast (1,5 L, Cellic™ y CTEC2) y LPMO sobre fibras de algodón. El tratamiento afectó la morfología de las fibras y produjo la degradación de la celulosa de forma eficiente. Se obtuvo una fibrilación mejorada y un rendimiento de fibrilación del 18% cuando se utilizó el cóctel de enzimas. Los autores obtuvieron nano fibra de alta cristalinidad (92%) y transparencia (86%), y de mayor suavidad. La introducción de un tratamiento con LPMO antes de la aplicación de la mezcla de celulasas produjo un mayor rendimiento de nanofibras de celulosa (23%), pero no mejoró las propiedades estructurales de las nanofibras (Müller *et al.*, 2015).

En un estudio reciente Valls *et al.* (2019), estudiaron el efecto de las enzimas celulasas, LPMO y lacasas en combinación y por separado, en la formación de nanofibra de celulosa (NFC) a partir de algodón. Observaron que la adición de una LPMO bacteriana a una mezcla de celulasas (SC_{mix}) tuvo efectos significativos sobre la producción de NFC a partir de algodón. En estas condiciones de tratamiento combinado los autores observaron un aumento de un 18% de fibrilación de nanocelulosa, obteniendo rendimientos de hasta un 23% de NFC (Tabla 2). La baja despolimerización producida por la LPMO sugirió que esta enzima afecta la morfología de la fibra sin degradar significativamente la celulosa, pero la combinación sinérgica entre la LPMO y el mix de celulasas, disminuyó significativamente el grado de polimerización de la celulosa (Figura 14).

Tabla 2. Efecto de los tratamientos enzimáticos sobre la morfología de la fibra y sobre la fibrilación mecánica. (Valls *et al.*, 2019).

	Pulp			After mechanical fibrillation	
	Fibre width (μm)	Fibre length (mm)	Fines (%)	Yield (%)	Transmittance at 700 nm (%)
R	25.5	0.25	52.58	0	2.4 \pm 0.5
C _k	24.9	0.25	53.7	0	3.2 \pm 0.7
C ₉	24.7	0.24	55.43	0	7.8 \pm 0.3
C ₅₀	24.2	0.22	59.25	0	45.6 \pm 1.2
C _F	24.8	0.22	59.01	0	32.9 \pm 0.9
C _{II}	23.2	0.21	62.18	0	27.9 \pm 0.8
C _{mix}	21.2	0.18	70.44	18 \pm 1	52.7 \pm 0.9
S _k	25.1	0.25	52.8	0	3.8 \pm 0.5
S	23.3	0.21	61.58	2.5 \pm 2	4.3 \pm 0.4
SC _{mix}	23.2	0.16	73.5	23 \pm 1	51.8 \pm 0.5
L_Tempo	23.0	0.23	57.13	10 \pm 2	4.5 \pm 0.6
Com	–	–	–	11 \pm 2	5.7 \pm 0.7

R: pulpa refinada; C_k: Control; C₉: celulasa Cel9B; C₅₀: celulasa sertec20; C_F: celulasa Fibercare; C_{II}: celulasa Cellucalst; C_{mix}: Sertec20 + Fibercare; S: enzima LPMO; SC_{mix}: LPMO + C_{mix}; L_Tempo: lacasas y Tempo; Com: NFC comercial.

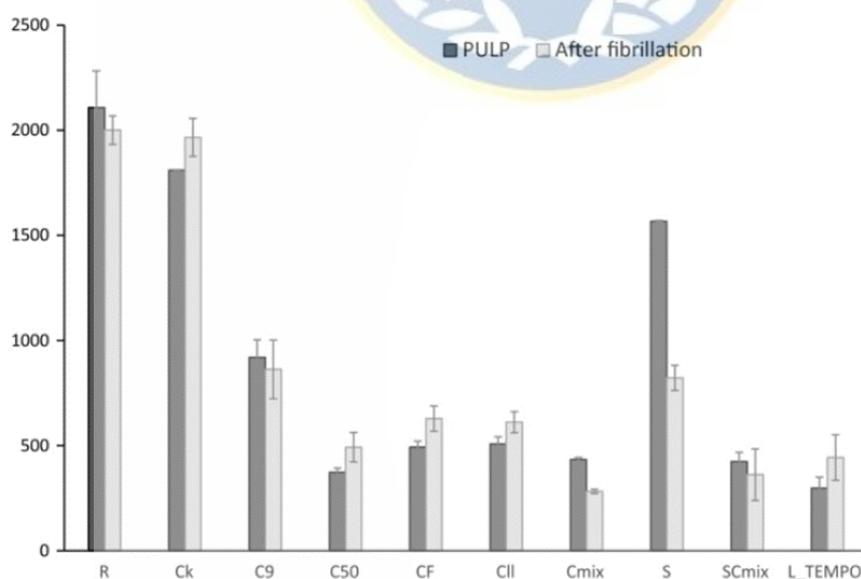


Figura 14. Efecto de los diferentes tratamientos enzimáticos sobre el grado de polimerización de la celulosa. Para explicación de los tratamientos ver Tabla 2. (Valls *et al.*, 2019).

8. Proyecciones futuras.

La escasa información sobre la regulación, la relación estructura-función y la dificultad de establecer métodos estandarizados que permitan evaluar la funcionalidad de la enzima LPMO, dificulta implementar con éxito modificaciones enzimáticas mediante ingeniería de proteínas. Por lo tanto, es necesario incrementar las investigaciones sobre esos aspectos, para así comprender de mejor manera las funciones estructurales de la enzima LPMO y poder realizar las modificaciones estructurales que permitan otorgarle resistencia a las condiciones industriales adversas (temperatura, pH, afinidad al sustrato, presencia de iones metálicos, etc.). Esto permitiría aumentar la eficiencia de la enzima para obtener subproductos derivados de la celulosa o quitina o incluso modificando la afinidad por el sustrato se le podría dar otras aplicaciones industriales a las LPMOs. La ingeniería de puentes de disulfuro, demostró ser una buena herramienta para poder otorgar termoestabilidad a esta enzima (Thange *et al.*, 2017). Es por ello que se podría utilizar esta herramienta para complementar otras modificaciones enzimáticas y así obtener una enzima más eficiente y termoestable.

La expresión heteróloga es muy beneficiosa para la producción enzimática a nivel industrial, ya que permite trabajar con organismos huéspedes más eficientes en la secreción de proteínas, con altas tasas de crecimiento y reproducción, bajas demandas nutricionales y energéticas, etc. Pero, aunque se han identificado algunos microorganismos huéspedes eficientes para la secreción de LPMOs, aún falta ampliar el rango de estudio dentro de otros organismos como son las cianobacterias, las cuales son de rápido crecimiento y genéticamente manejables, además pueden crecer utilizando nutrientes inorgánicos de bajo costo, como fue descrito por Russo *et al.* (2019). Aunque estos autores obtuvieron un bajo rendimiento de la enzima, ellos mencionan que aún son necesarios más estudios que permitan optimizar la producción de LPMOs por cianobacterias.

Finalmente, esta enzima oxidativa, ha demostrado tener un enorme potencial cuando se utiliza en combinación con otras enzimas hidrolíticas degradadoras de la pared celular, para la generación de productos derivados de la celulosa, como son la fibra, nanofibra, biocombustibles, etc. Por lo que se hace necesario ampliar los estudios en esta área, que

permitan optimizar la producción de la enzima y su utilización en procesos a nivel industrial, para mejorar la eficiencia en la obtención de subproductos derivados de la celulosa.

9. Conclusiones.

- El descubrimiento de las LPMOs, fue un gran aporte para los tratamientos de transformación de materiales lignocelulósicos, debido a su acción oxidativa sobre los enlaces glucosídicos, ya que esta cualidad permite que el sustrato sea más susceptible a la hidrólisis por enzimas GH, por ello la incorporación de LPMOs en cócteles de enzimas de uso industrial es fundamental.
- A pesar de la enorme relevancia de las LPMOs debido a sus múltiples potenciales aplicaciones, aún existen brechas de conocimiento sobre algunos aspectos como relación estructura-función, ciclo catalítico, especificidad por sustrato, además de las dificultades propias de la evaluación de su funcionalidad debido a las diversas reacciones colaterales que pueden ocurrir durante su determinación. La resolución de estas brechas de conocimiento permitirá avanzar en las investigaciones dirigidas al mejoramiento de la enzima.
- La ingeniería de proteínas y la tecnología del ADN recombinante, son necesarios para aumentar la eficacia y síntesis de las LPMOs para procesos industriales, ya que éstos generalmente requieren de grandes cantidades de enzimas que catalicen eficientemente bajo condiciones drásticas que podrían provocar la desnaturalización de las proteínas con pérdida de la actividad.
- A través de estrategias de ingeniería de proteínas se ha logrado modificar la resistencia térmica de las LPMOs, como es aquella que manipula los puentes disulfuro, y que demostró otorgar mayor estabilidad entre los plegamientos de la enzima, confiriéndole una mayor termoestabilidad.
- El estudio de la tolerancia oxidativa de las LPMOs, es de gran interés debido al aumento de la catálisis del sustrato en presencia de altas concentraciones de H_2O_2 , condiciones que sin embargo pueden inducir autooxidación de la enzima, inactivándola. Aun así,

faltan estudios para poder determinar las modificaciones necesarias en el sitio activo de la enzima que le permitan tolerar la oxidación.

- La expresión heteróloga de LPMOs, es una herramienta necesaria para poder aumentar los niveles de producción disminuyendo los costos del proceso de fermentación al utilizar organismos huéspedes de rápido crecimiento y poco exigentes, además de permitir la expresión de LPMOs producidas por organismos extremófilos.
- Las bacterias y hongos filamentoso, son excelentes huéspedes para expresar las enzimas LPMOs, por sus características de rápido crecimiento en medios de cultivo mínimos. Sin embargo, las cianobacterias surgen como prometedora alternativa, ya tienen otras ventajas adicionales como la facilidad para su manipulación genética y los mínimos requerimientos nutricionales e inorgánicos, de bajo costo.



10. Bibliografía.

Beeson WT, Phillips CM, Cate JHD (2012) Oxidative cleavage of cellulose by fungal copperdependent polysaccharide monooxygenases. *J. Am. Chem. Soc.* 134:890–2.

Bennati-Granier, C., Garajova, S., Champion, C., Grisel, S., Haon, M., Zhou, S., Fanuel, M., Ropartz, D., Rogniaux, H., Gimbert, I., Record, E., Berrin, J.G., (2015) Substrate specificity and regioselectivity of fungal AA9 lytic polysaccharide monooxygenases secreted by *Podospora anserina*. *Biotechnol. Biofuels* 8:90.

Bey, M., Zhou, S., Poidevin, L., Henrissat, B., Coutinho, P.M., Berrin, J.G., Sigoillot, J.C., (2013) Cello-oligosaccharide oxidation reveals differences between two lytic polysaccharide monooxygenases (family GH61) from *Podospora anserina*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(2):488–496.

Bisaaro B, Anikó V, Røhr A, Vincent G. H. Eijsink (2018) Oxidoreductases and Reactive Oxygen Species in Conversion of Lignocellulosic Biomass, *Microbiol MolBiol. Reviews* 82 (4):e00029-18.

Bissaro B, Isaksen L, Vaaje-Kolstad G, Eijsink V, Røhr A (2019) How a Lytic Polysaccharide Monooxygenase Binds Crystalline Chitin. *Biochem.* 57 (12):1893–1906.

Bissaro, B., Kommedal, E., Røhr, Å.K. (2020) Controlled depolymerization of cellulose by light-driven lytic polysaccharide oxygenases. *Nat. Commun.* 11:890.

Bissaro, B., Røhr, Å., Müller, G. (2017) Oxidative cleavage of polysaccharides by monocopper enzymes depends on H₂O₂. *Nat. Chem. Biol.* 13:1123–1128.

Brander, S., Horvath, I., Ipsen, J.Ø, Olsson L, Hernández C, Nørholm M, Lo Leggio L, Probst C, Thiele D, Johansen K. (2020) Biochemical evidence of both copper chelation and oxygenase activity at the histidine brace. *Sci. Rep.* 10:16369.

Breslmayr, E., Daly, S., Požgajčić, A., Chang, H., Rezić, T., Oostenbrink, C., Ludwig, R., (2019) Improved spectrophotometric assay for lytic polysaccharide monooxygenase. *Biotechnol. Biofuels* 12:283

Breslmayr, E., Hanžek, M., Hanrahan, A., Leitner, C., Kittl, R., Šantek, B., Oostenbrink, C., Ludwig, R., (2018) A fast and sensitive activity assay for lytic polysaccharide monooxygenase. *Biotechnol. Biofuels* 11:79.

Chalak, A., Villares, A., Moreau, C, Haron M, Grisel S, D'Orlando A, Herpoël-Gimbert I, Labourel A, Cathala B, Berrin J (2019) Influence of the carbohydrate-binding module on the activity of a fungal AA9 lytic polysaccharide monooxygenase on cellulosic substrates. *Biotechnol. Biofuels* 12:206.

Chylenski, P., Petrović, DM, Müller, (2017) Degradación enzimática de maderas blandas pulpadas al sulfito y el papel de los LPMO. *Biotechnol Biofuels* 10:177.

Corrêa, TLR, Santos D, LV, Pereira J (2016) GAG AA9 y AA10: from enigmatic to essential enzymes.. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100:9-16.

Cosgrove, D. J. (2005) Growth of the plant cell wall. *Nat Reviews. Mol Cell Biol*, 11:850–61.

Costa, T.H.F., Kadic', A., Chylenski, P., Várnai, A., Bengtsson, O., Lidén, G., Eijsink, V.G., Horn, S.J. (2020) Demonstration-scale enzymatic saccharification of sulfite-pulped spruce with addition of hydrogen peroxide for LPMO activation. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 14:734-745.

Courtade, G., Forsberg, Z., Heggset, E. B., Eijsink, V. G. H., Aachmann, F. L. (2018) The carbohydrate-binding module and linker of a modular lytic polysaccharide monooxygenase promote localized cellulose oxidation. *JBiol Chem.* 293(34):13006–13015.

Crouch L, Labourel A, Walton P.H, Davies G.J., Gilbert H.J (2016). The Contribution of Non-catalytic Carbohydrate Binding Modules to the Activity of Lytic Polysaccharide Monooxygenases. *J Biol Chem.* 91:7439–7449.

Dimarogona, M.; Topakas, E.; Christakopoulos, P. (2012) Cellulose degradation by oxidative enzymes. *Com.Struct. Biotechnol J2*, 201209015.

Eibinger, M., Sattelkow, J., Ganner, T. Plank H, Nideztky B (2017) Single-molecule study of oxidative enzymatic deconstruction of cellulose. *Nat. Commun.* 8:894.

Eijsink, V. G. H., Ga°seidnes, S., Borchert, T. V., van den Burg, B. (2005) Directed evolution of enzyme stability. *Biomol. Eng.* 22:21–30.

Ellinghaus TL, Pereira JH, McAndrew RP, Welner DH, DeGiovanni AM, Guenther JM, Tran HM, Feldman T, Simmons BA, Sale KL, Adams PD (2018) Engineering glycoside hydrolase stability by the introduction of zinc binding. *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* 74:702–710.

Escuder-Rodriguez, J. J., DeCastro, M. E., Cerdan, M. E., Rodriguez-Belmonte, E., Becerra, M., Gonzalez-Siso, M. I. (2018). Cellulases from thermophiles found by metagenomics. *Microorganisms.* 6(3):66.

Filandr, F., Man, P., Halada, P., Chang, H., Ludwig, R., Kracher, D. (2020). The H₂O₂-dependent activity of a fungal lytic polysaccharide monooxygenase investigated with aturbidimetric assay. *Biotechnol Biofuels* 13:37.

Filiatrault-Chastel, C., Navarro, D., Haon, M., Grisel, S., Herpoël-Gimbert, I., Chevret, D., Fanuel, M., Henrissat, B., Heiss-Blanquet, S., Margeot, A., Berrin, J.G., (2019) AA16, a new lytic polysaccharide monooxygenase family identified in fungal secretomes. *Biotechnol. Biofuels.* 12:55

Finn L. Aachmann, Morten Sørli, Gudmund Skjåk-Bræk, Vincent G. H. Eijsink, Gustav Vaaje-Kolstad (2012) NMR structure of a lytic polysaccharide monooxygenase provides

insight into copper binding, protein dynamics, and substrate interactions. *PNAS* 109 (46):18779-18784.

Forsberg Z, Stepnov A, Nærdal G.K, Klinkenberg G, Eijsink V.G.H (2020) Chapter One: Engineering lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs). *METHOD ENZYMOL* 644:1-34.

Forsberg, Z., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Bunæs, A.C., Stenstrøm, Y., MacKenzie, A., Sørli, M., Horn, S.J., Eijsink, V.G. (2011) Cleavage of cellulose by a CBM33 protein. *Protein Sci* 20:1479-1483.

Frandsen K., Simmons, T., Dupree, P. (2016) The molecular basis of polysaccharide cleavage by lytic polysaccharide monooxygenases. *Nat Chem Biol* 12:298-303.

Frommhagen, M., Westphal, A. H., van Berkel, W. J. H., Kabel, M. A. (2018) Distinct substrate specificities and electron-donating systems of fungal lytic polysaccharide monooxygenases. *Front. Microbiol* , 1080.

Furukawa, T., Bello, F.O. & Horsfall, L. (2014) Microbial enzyme systems for lignin degradation and their transcriptional regulation. *Front. Biol.* 9:448–471.

Gabera Y, Rashad B ,Husseinb R, Abdelgawad M, Alic N, Dishishaa T, Várnaie A (2020) Heterologous expression of lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs). *Biotechnol Advances* 43:107583.

Gao, J. S., Thomas, D. A., Sohn, C. H., Beauchamp, J. L. (2013) Biomimetic reagents for the selective free radical and acid-base chemistry of glycans: Application to glycan structure determination by mass spectrometry. *JACS*, 135(29):10684–10692.

Gourlay K,Hu J, Arantes V, Andberg M, Saloheimo M,Penttilä M, Saddler J (2013) Swollenin aids in the amorphogenesis step during the enzymatic hydrolysis of pretreated biomass, *Biores Tech.* 142:498-503.

Hansson, N. Mikkelsen, N.R. Douglas, S. Kim, A. Lam, T. Kaper, B. Kelemen, K.K. Meier, S.M. Jones (2017) High-resolution structure of a lytic polysaccharide monooxygenase from *Hypocrea jecorina* reveals a predicted linker as an integral part of the catalytic domain. *J. Biol. Chem.* 292(46):19099-19109.

Haq HI, Akram F, Khan MA, Hussain Z, Nawaz A, Iqbal K, Shah AJ (2015) CenC, a multidomain thermostable GH9 processive endoglucanase from *Clostridium thermocellum*: cloning, characterization and saccharification studies. *World J Microbiol Biotechnol* 31:1699–1710.

Hemsworth G, Taylor E, Robbert Q, Kim, R Gregory C, Sally J. Lewis, Johan P. Turkenburg, Parkin A, Gideon D, Walton P (2013) The Copper Active Site of CBM33 Polysaccharide Oxygenases. *J. Am. Chem. Soc.* 135(16):6069–6077.

Henrissat, B., Heiss-Blanquet, S., Margeot, A., Berrin, J.G., (2019) AA16, a new lytic polysaccharide monooxygenase family identified in fungal secretomes. *Biotechnol. Biofuels* 12:55.

Hu, J., Tian, D., Rennecker, S., Saddler J. (2018) Enzyme mediated nanofibrillation of cellulose by the synergistic actions of an endoglucanase, lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO) and xylanase. *Sci. Rep.* 8:3195.

Hüttner, S., Várnai, A., Petrović, D.M., Bach, C.X., Kim Anh, D.T., Thanh, V.N., Eijsink, V.G.H., Larsbrink, J., Olsson, L., (2019) Specific xylan activity revealed for AA9 lytic polysaccharide monooxygenases of the thermophilic fungus *Malbranchea cinnamomea* by functional characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 85(23):e01408-19.

Isaksen, T., Westereng, B., Aachmann, F. L., Agger, J. W., Kracher, D., Kittl, R. (2014). A C4-oxidizing lytic polysaccharide monooxygenase cleaving both cellulose and cello-oligosaccharides. *J. Biol.Chem.* 289(5):2632–2642.

Jensen M, Klinkenberg G, Bissaro B, Chylenski P, Vaaje-Kolstad G, Kvitvang H, Nærdal G, Sletta H, Forsberg Z, Eijsink V (2019) Engineering chitinolytic activity into a cellulose-active lytic polysaccharide monooxygenase provides insights into substrate specificity. *J. Biol.Chem.* 294(50):19349-19364.

Karkehabadi S, Hansson H, Kim S (2008) The first structure of a glycoside hydrolase family 61 member, Cel61B from *Hypocrea jecorina*, at 1.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 383:144–54.

Karnaouri, A., Muraleedharan, M.N., Dimarogona, M. (2017) Recombinant expression of thermostable processive *MtEG5* endoglucanase and its synergism with *MtLPMO* from *Myceliophthora thermophila* during the hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Biotechnol Biofuels* 10:126.

Kittl, R., Kracher, D., Burgstaller, D., Haltrich, D., Ludwig, R. (2012). Production of four *Neurospora crassa* lytic polysaccharide monooxygenases in *Pichia pastoris* monitored by a fluorimetric assay. *Biotechnol Biofuels.* 5(1):79.

Kjaergaard, C. H., Qayyum, M. F., Wong, S. D., Xu, F., Hemsworth, G. R., Walton, D. J., (2014). Spectroscopic and computational insight into the activation of O₂ by the mononuclear Cu center in polysaccharide monooxygenases. *PNAS.*111(24): 8797–8802.

Koseki T, Mese Y, Fushinobu S. (2008) Biochemical characterization of a glycoside hydrolase family 61 endoglucanase from *Aspergillus kawachii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77:1279–85.

Kracher, D., Forsberg, Z., Bissaro, B., Gangl, S., Preims, M., Sygmund, C., Eijsink, V.G.H. Ludwig, R. (2020) Polysaccharide oxidation by lytic polysaccharide monooxygenase is enhanced by engineered cellobiose dehydrogenase. *FEBS J.* 287:897-908.

Kuusik S, Bissaro B, Kuusk P, Forsberg F, Eijsink V, Sørli M, Väljamäe P (2018) Kinetics of H₂O₂-driven degradation of chitin by a bacterial lytic polysaccharide monooxygenase. *J. Am. Chem. Soc.* 293:523-531.

Labourel A, Frandsen K, Zhang F, Brouilly N, Grisel S. (2020) A fungal family of lytic polysaccharide monooxygenase-like copper proteins. *Nat. Chem. Biol.* **16**, 345–350.

Lo Leggio L., Welner D, Maria L De.(2012). A structural overview of GH61 proteins degrading polysaccharide monooxygenases – fungal cellulose. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2(3):201209019..

Lo Leggio, L., Weihe, C. D., Poulsen, J. C. N., Sweeney, M., Rasmussen, F., Lin, J.(2018). Structure of a lytic polysaccharide monooxygenase from *Aspergillus fumigatus* and an engineered thermostable variant. *Carbohydr. Res.* 469:55–59.

Long L, Huimin YangHuimin Y, Hongyan R, Rukuan L Fubao F, Zhihong X, Hu J, Zhenghong X (2020) Synergism of Recombinant *Podospora anserina*PaAA9B with Cellulases Containing AA9s Can Boost the Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Substrates. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 8(32) 11986–11993.

Loose, J.S., Forsberg, Z., Kracher, D., Scheiblbrandner, S., Ludwig, R., Eijsink, V.G., Vaaje Kolstad, G. (2016) Activation of bacterial lytic polysaccharide monooxygenases with cellobiose dehydrogenase. *Protein Sci.* 25 (12): 2175–2186.

Makinen, S., Juntunen, K., Komander, A., Langfelder, K., Vehmaanpera, J., Puranen, T., (2014) Proteins for the treatment of cellulosic material. Patent No. US/2014/ 0045225-A1.

Moreau C, Tapin-Lingua S, Grisel S, Gimbert I, Le Gall G, Meyer V, Petit-Conil M, Berrin J Cathala B, Villares A (2019) Lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) facilitate cellulose nanofibrils production. *Biotechnol Biofuels*, 12:156.

Müller, G., Várnai, A., Johansen, K.S. Eijsink V, Horn SJ. (2015) Harnessing the potential of LPMO-containing cellulase cocktails poses new demands on processing conditions. *Biotechnol Biofuels.* 8:187.

Nakabayashi M, Kamachi S, Malle D, Yanamoto T, Kishishita S, Fujii T, Inoue H, Ishikawa K (2019) Construction of thermostable cellobiohydrolase I from the fungus *Talaromyces cellulolyticus* by protein engineering. *Protein Eng Des Sel* 32:33–40.

Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T., Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *InterMicrobiol.* 5(2): 53–63.

Petrović, D.M., Bissaro, B., Chylenski, P., Skaugen, M., Sørli, M., Jensen, M.S., Aachmann, F.L., Courtade, G., Várnai, A., Eijsink, V.G. (2018) Methylation of the N-terminal histidine protects a lytic polysaccharide monooxygenase from auto-oxidative inactivation. *Protein Sci.* 27:1636-1650.

Pollet A, Jan A. Delcour, Courtin C (2010) Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families, *Crit Reviews Biotechnol.* 30(3):176-191.

Punt, P.J., Burlingame, R.P., Pynnonen, C.M., Olson, P.T., Wery, J., Visser, J.H., Emalfarb, M.A., Visser, J., Verdoes, J.C., (2010) *Chrysosporium lucknowense* protein production system. Patent No. WO/2010/107303-A3.

Qing, Y.; Sabo, R.; Zhu, J.Y.; Agarwal, U.; Cai, Z.; Wu, Y. A (2013) comparative study of cellulose nanofibrils disintegrated via multiple processing approaches. *Carbohydr. Polym.* 97:226–234.

Quinlan, R.J., Sweeney, M.D., Lo Leggio, L., Otten, H., Poulsen, J.C., Johansen, K.S., Krogh, K.B., Jorgensen, C.I., Tovborg, M., Anthonsen, A., Tryfona, T., Walter, C.P., Dupree, P., Xu, F., Davies, G.J., Walton, P.H., (2011) Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. *PNAS.* 108 (37):15079–15084.

Ragauskas, A. J., Williams, C. K., Davison, B. H., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C. A., Tschaplinski, T. (2006) The Path Forward for Biofuels. *Science*. 311:484–489.

Rao M.P.N., Xiao M., Li W-J. (2017) Fungal and bacterial pigments: secondary metabolites with wide applications. *Front. Microbiol.* 8:1113.

Russo, D.A., Zedler, J.A.Z., Wittmann, D.N., Möllers, B., Singh, R.K., Batth, T.S., van Oort, B., Olsen, J.V., Bjerrum, M.J., Jensen, P.E., (2019) Expression and secretion of a lytic polysaccharide monooxygenase by a fast-growing cyanobacterium. *Biotechnol. Biofuels* 12 (1):74.

Sabbadin, F., Hemsworth, G.R., Ciano, L., Henrissat, B., Dupree, P., Tryfona, T., Marques, R.D.S., Sweeney, S.T., Besser, K., Elias, L., Pesante, G., Li, Y., Dowle, A.A., Bates, R., Gomez, L.D., Simister, R., Davies, G.J., Walton, P.H., Bruce, N.C., McQueen-Mason, S.J., (2018) An ancient family of lytic polysaccharide monooxygenases with roles in arthropod development and biomass digestion. *Nat. Commun.* 9(1):756.

Salomon KJ (2016) Lytic Polysaccharide Monooxygenases: The Microbial Power Tool for Lignocellulose Degradation. *Trends Plant Sci.* 21(11):926-936.

Sandgren, M., Wu, M., Karkehabadi, S., Mitchinson, C., Kelemen, B. R., Larenas, E. A, Hansson, H. (2013) The structure of a bacterial cellobiohydrolase: the catalytic core of the *Thermobifida fusca* family GH6 cellobiohydrolase Cel6B. *J. Mol. Biol.* 425(3):622–35.

Sanhueza, Carvajal C, Soto-Aguilar G, Lienqueo J, Salazar M (2018) The effect of a lytic polysaccharide monooxygenase and a xylanase from *Gloeophyllum trabeum* on the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic residues using a commercial cellulase. *Enzyme Microb. Technol.* 113:75-82.

Sato K, Chiba D, Yoshida S, Takahashi M, Totani K, Shisa Y, Ogasawara W, Nakagawa Y. (2020) Functional analysis of a novel lytic polysaccharide monooxygenase from *Streptomyces griseus* on cellulose and chitin. *Int. J. Biol. Macromol* 164:2085–2091.

Semenova, M.V., Gusakov, A.V., Volkov, P.V., Matys, V.Y., Nemashkalov, V.A., Telitsin, V.D., Rozhkova, A.M., Sinitsyn, A.P. (2019) Enhancement of the enzymatic cellulose saccharification by *Penicillium verruculosum* multienzyme cocktails containing homologously overexpressed lytic polysaccharide monooxygenase. *Mol. Biol. Rep.* 46(2): 2363–2370.

Tanghe M, Danneels B, Last M, Beerens K, Stals I, Desmet T. (2017). Disulfide bridges as essential elements for the thermostability of lytic polysaccharide monooxygenase LPMO10C from *Streptomyces coelicolor*. *Protein Eng. Des. Sel.* 30 (5):401–408.

Tanghe, M., Danneels, B., Camattari Glieder A, Vandenberghe L, Devreese B, Ingeborg Stale D (2015) Recombinant Expression of *Trichoderma reesei* Cel61A in *Pichia pastoris*: Optimizing Yield and N-terminal Processing. *Mol Biotechnol* 57:1010–1017.

Vaaje-Kolstad G, Bøhle L, Gåseidnes S, Bjørn D, Magnar B, Mathiesen G, Eijsink V (2012) Characterization of the Chitinolytic Machinery of *Enterococcus faecalis* V583 and High-Resolution Structure of Its Oxidative CBM33 Enzyme. *Journal of Mol Biol.* 416(2):239-254.

Valenzuela S, Valls C, Schink V, Sánchez D, Roncero M.B, Diaz P, Martínez P, Pastor J. (2019) Differential activity of lytic polysaccharide monooxygenases on celluloses of different crystallinity. Effectiveness in the sustainable production of cellulose nanofibrils. *Carbohydr. Polym.* 207:59-67.

Valls, C.; Javier Pastor, F.I.; Blanca Roncero, M.; Vidal, T.; Diaz, P.; Martínez, J.; Valenzuela, S.V. (2019) Assessing the enzymatic effects of cellulases and LPMO in improving mechanical fibrillation of cotton linters. *Biotechnol. Biofuels.* 12:1–14.

Villares, A., Moreau, C., Bennati-Granier, C., Garajova, S., Foucat, L., Falourd, X., Saake, B., Berrin, J.G., Cathala, B., (2017) Lytic polysaccharide monooxygenases disrupt the cellulose fiber's structure. *Sci. Rep.* 7:40262.

Walton P, Gideon J. (2013) On the catalytic mechanisms of lytic polysaccharide monooxygenases. *Current Opinion in Chemical Biology*. 31:195-207.

Wang B, Walton PH, Rovira C (2019) Molecular Mechanisms of Oxygen Activation and Hydrogen Peroxide Formation in Lytic Polysaccharide Monooxygenases. *ACS Catalysis*. 9(6):4958-4969.

Xu, Y.; Salmi, J.; Kloser, E.; Perrin, F.; Grosse, S.; Denault, J.; Lau, P.C.K. (2013) Feasibility of nanocrystalline cellulose production by endoglucanase treatment of natural bast fibers. *Ind. Crops Prod*. 51:381–384.

Yu, M.-J., Yoon, S.-H., Kim, Y.-W., (2016) Overproduction and characterization of a lytic polysaccharide monooxygenase in *Bacillus subtilis* using an assay based on ascorbate consumption. *Enzyme Microb. Technol.* 93(94):150–156.

Zhang, R., Liu, Y., Zhang, Y., Feng, D., Hou, S., Guo, W., Niu, K., Jiang, Y., Han, L., Sindhu, L., Fang, X., (2019) Identification of a thermostable fungal lytic polysaccharide monooxygenase and evaluation of its effect on lignocellulosic degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103(14): 5739–5750.

