



**Universidad de León**

Dpto. Ciencias Biomédicas

Área de Toxicología



**INBIOTEC**

Instituto de Biotecnología de  
León

## **TESIS DOCTORAL**

**Búsqueda de nuevas feruloil esterasas  
fúngicas con aplicaciones biotecnológicas**

**A search for novel fungal feruloyl esterases  
with biotechnological applications**

Laura García Calvo

León 2018



**Memoria presentada por Laura García Calvo**  
**para optar al grado de Doctor**





*A mi madre*



El presente trabajo de Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en el **Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC)** y ha sido financiado por una ayuda para contratos predoctorales para la formación de doctores, convocatoria 2013 (referencia **BES-2013-064578**) y una ayuda a la movilidad predoctoral para la realización de estancias breves en centros de I+D, convocatoria 2015 (referencia **EEBB-I-16-11760**), ambas otorgadas por el Ministerio de Economía y Competitividad. La ayuda con referencia BES-2013-064578 se adscribió inicialmente al proyecto “Nuevas feruloyl esterases como herramientas para una biotecnología blanca”, de la convocatoria de Proyectos de Investigación Fundamental No Orientada 2012 (referencia **CTM2012-32026**) y, posteriormente, al proyecto ProWood (*wood and derivatives protection by novel bio-coating solutions*) de la convocatoria ERA-IB 2 *7th Joint Call*, a través de las Acciones de Programación Conjunta Internacional del Programa Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación Orientada a los Retos de la Sociedad 2016, del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (referencia **PCIN-2016-081**).





Decía Cicerón en uno de sus discursos que “no hay nada que pueda estimar como más importante que ser y parecer agradecido. Pues esta sola virtud no sólo es la más grande, sino que también es la madre de todas las demás virtudes”. En mi caso, este trabajo de Tesis Doctoral no habría sido posible sin la ayuda de muchas personas, a las que me gustaría dar las gracias.

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento al Ministerio de Economía y Competitividad, por otorgarme una ayuda para contratos predoctorales 2013 (ref. BES-2013-064578), adscrita al proyecto de Investigación Fundamental No Orientada 2012 con ref. CTM2012-32026 y al proyecto ProWood (“*Wood and derivatives protection by novel biocoating solutions*”; ref. PCIN-2016-081, ERA-IB 7th Joint Call), así como una ayuda a la movilidad para la realización de estancias breves 2015 (ref. EEBB-I-16-11760). Gracias al proyecto BIOCORIN (ID 282881), por suministrar las muestras ambientales. A la Universidad de León y al departamento de Ciencias Biomédicas, por el apoyo administrativo. Me gustaría también agradecer al Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC) y a su dirección por recibirme y por su valiosa colaboración a lo largo del periodo de Tesis Doctoral.

Al Dr. Ricardo Vicente Ullán, director de esta Tesis, por la oportunidad de realizar un Doctorado e incorporarme a su grupo de investigación, así como por toda su ayuda.

Al Dr. Rafael Balaña Fouce, tutor y codirector, por la oportunidad de desarrollar esta Tesis Doctoral. Sus valiosas sugerencias y su apoyo han facilitado la culminación de este trabajo.

Quiero dar las gracias de una forma especial al Dr. Carlos Barreiro. Nunca olvidaré su ayuda inestimable, sus enseñanzas en el campo de la Proteómica y su buen saber hacer en el laboratorio, en general. La importancia de la organización del trabajo, el rigor y el cuidado exquisito en cada experimento son nociones que llevaré conmigo durante todo mi futuro científico.

No puedo olvidarme de todos mis compañeros de INBIOTEC, sin los cuales esta Tesis habría sido una odisea. Gracias a Charly por ser un mentor, padre o hermano, en función de lo que necesitara. Por ayudarme siempre en lo científico y por estar disponible a cualquier hora del día para aconsejarme sobre dilemas laboratoriales y vitales. Gracias, Clara, por enseñarme a utilizar (y domesticar) los HPLC, por las charlas, por ayudarme en los malos momentos por los que tú ya habías pasado antes de mí, por tu sabiduría, tu paciencia y por contagiar tu alegría. En INBIOTEC he tenido grandes compañeros y buenísimos mentores: Carlos y Katarina en lo fúngico, Antonio y Rosma en el mundo de los ácidos nucleicos, Clara y Mar en la cromatografía,

Charly en la Proteómica y Alberto en la purificación proteica. Gracias a todos por resolver siempre mis dudas con una sonrisa y ayudarme a crecer como investigadora. No me olvido de Josefina y Berna, sin cuyo apoyo inestimable muchos de los experimentos de esta Tesis no habrían llegado a buen puerto. Gracias a todos los compañeros con los que he compartido mi tiempo en INBIOTEC: Alba, David, Estela, Inés, Lucía, Marta, Rebeca, Seomara, Sonia y aquellos que seguro olvido en estas líneas, pero que siempre recordaré. A Alexia, Esmeralda y Ana, por los buenos momentos. A Eva, por las largas charlas sobre la vida, la ciencia y la peliaguda burocracia con la que hay que lidiar para ser doctora. Gracias también a Andrea por el apoyo administrativo.

Along my PhD, I had the opportunity to carry out a scientific international stay. I would like to thank the host institution SINTEF for having me and for their assistance throughout the stay. I am particularly grateful to Håvard Sletta, my stay supervisor, for always being kind to me in a foreign land, for his support in SINTEF, as well as for his invaluable scientific advice. Thanks to the labmates who made those months some of the happiest in my life. Thank you, Lisa, for the northern lights, the late-night scientific talks and your friendly and genuine advice. Thank you, Son, for welcoming me to the office, your special sense of humor and your help in the lab. I want to thank the rest of the labmates for their kindness, advice and support with the experiments.

Quiero dar mil gracias a mis dos mejores amigas, mis Saras, que creen en mí más que nadie y que no dejan de apoyarme en todos los proyectos en los que me embarco. Gracias por darme ese último empujón siempre que lo necesito y por quererme incondicionalmente desde hace años.

Dejo para el final al verdadero pilar de mi vida, mi familia. Gracias a mis padres por inculcarme la importancia de los valores que me han llevado a terminar esta Tesis: humildad, perseverancia, responsabilidad, coherencia y el valor del esfuerzo, sin importar la tarea. A mi madre, le pido perdón por el tiempo que esta Tesis nos ha robado y le doy gracias de corazón por su generosidad al haber puesto siempre por delante el futuro de sus hijos. A mi padre, porque gran parte de lo bueno que tengo se lo debo a él, por enseñarme a poner cuidado y pasión en todo lo que hago y por tantas horas de consejos y ayuda para que terminara esta Tesis, sobre todo durante los últimos meses. A mi hermano Alonso, que siempre me anima, apoya y cree en mí.

Jeg ønsker også å takke Johan for hans grenseløse støtte, kjærighet og forståelse. Takk for at du trodde på meg og minnet meg på at jeg var sterk nok til å fullføre denne avhandlingen. Bedre støtte på livets eventyr kunne jeg ikke ha drømt om.

***“Los naturalistas de otros tiempos sabían menos que nosotros y se creían muy cerca del objetivo. Nosotros hemos dado enormes pasos en este sentido y vemos que aún estamos muy lejos. Entre los filósofos más juiciosos, la convicción de su ignorancia aumenta al mismo tiempo que sus conocimientos”***

Georg Christoph Lichtenberg (Alemania 1742-1799)

Científico y escritor

***“No temas a las dificultades, lo mejor surge de ellas”***

Rita Levi-Montalcini (Italia 1909-2012)

Neurocientífica, senadora y filántropa. Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1986





---

# Índice

---

<b>ÍNDICE</b> .....	I
<b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS</b> .....	VII
<b>RESUMEN</b> .....	IX
<b>ABSTRACT</b> .....	X
<b>1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	<b>1</b>
1.1. Hongos e industria.....	3
1.1.1. El reino Fungi.....	3
1.1.2. Hongos: ecosistemas diversos, distintas actividades .....	5
1.1.3. Importancia económica de los ascomicetos .....	9
1.2. Economía Circular y residuos lignocelulósicos .....	13
1.2.1. La Economía Circular y la Biotecnología Blanca .....	13
1.2.2. Aplicaciones de la biomasa.....	15
1.3. Proteómica aplicada al estudio de enzimas fúngicas .....	18
1.4. La pared celular vegetal .....	20
1.4.1. Estructura de la pared celular vegetal.....	21
1.4.2. Composición de la pared celular vegetal .....	22
1.4.3. Características de los sustratos vegetales empleados .....	27
1.5. El ácido ferúlico y otros ácidos hidroxicinámicos .....	31
1.5.1. El ácido ferúlico en la pared vegetal: presencia y función biológica .....	32
1.5.2. Métodos de recuperación de AHC .....	35
1.5.3. Propiedades y aplicaciones del ácido ferúlico.....	37
1.6. Enzimas lignocelulolíticas .....	44
1.6.1. Usos industriales de enzimas lignocelulolíticas fúngicas .....	50
1.6.2. Búsqueda de organismos con actividad lignocelulolítica .....	52
1.7. Feruloil esterasas.....	53
1.7.1. Descripción y nomenclatura.....	53
1.7.2. Reacción catalítica y estructura .....	55
1.7.3. Clasificación .....	59
1.7.4. Métodos de determinación de la actividad FAE .....	61
1.7.5. FAEs fúngicas .....	63
1.7.6. Aplicaciones industriales de las FAEs .....	65

1.8. Objetivos.....	68
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>71</b>
2.1. Reactivos químicos de uso general .....	73
2.1.1. Reactivos para determinación de actividades lignocelulolíticas.....	73
2.2. Reactivos específicos para Biología Molecular.....	73
2.2.1. Enzimas .....	73
2.2.2. Marcadores de peso molecular.....	74
2.2.3. Vectores plasmídicos .....	75
2.2.4. Oligonucleótidos cebadores .....	77
2.2.5. Reactivos y sistemas comerciales .....	79
2.3. Reactivos específicos para Proteómica.....	80
2.4. Equipamiento .....	80
2.4.1. Equipamiento para Microbiología .....	80
2.4.2. Equipamiento para Biología Molecular .....	81
2.4.3. Equipamiento para estudios de Proteómica.....	83
2.4.4. Equipos de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	85
2.4.5. Equipo de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC).....	85
2.4.6. Otros equipos.....	85
2.5. Microorganismos utilizados.....	86
2.5.1. Cepas bacterianas.....	86
2.5.2. Cepas fúngicas .....	87
2.6. Medios de cultivo.....	89
2.6.1. Medios de cultivo para <i>E. coli</i> .....	89
2.6.2. Medios de cultivo para levaduras .....	91
2.6.3. Medios de cultivo para hongos filamentosos.....	97
2.6.4. Suplementación con antibióticos .....	99
2.7. Cultivo, crecimiento y mantenimiento de microorganismos .....	100
2.7.1. Cepas bacterianas.....	100
2.7.2. Levaduras .....	100
2.7.3. Hongos filamentosos.....	101
2.8. Herramientas de análisis informático .....	102
2.9. Aislamiento de ADN.....	104
2.9.1. Aislamiento de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> a gran escala (lisis alcalina).....	104
2.9.2. Minipreparaciones de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> (minipreps).....	106
2.9.3. Aislamiento de ADN total de levaduras .....	106
2.9.4. Aislamiento de ADN total de hongos filamentosos.....	108

---

2.10. Manipulación de ADN .....	111
2.10.1. Limpieza y precipitación del ADN.....	111
2.10.2. Eliminación selectiva de ácidos nucleicos contaminantes .....	112
2.10.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	113
2.10.4. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	114
2.10.5. Extracción de ADN de geles de agarosa .....	115
2.10.6. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción .....	118
2.10.7. Ligación de fragmentos de ADN .....	119
2.11. Cuantificación y análisis de pureza de ácidos nucleicos.....	120
2.12. Método de hibridación Southern .....	120
2.12.1. Transferencia de ácidos nucleicos mediante sistema de vacío .....	121
2.12.2. Marcaje no radiactivo de sondas para Southern.....	122
2.12.3. Prehibridación e hibridación .....	124
2.12.4. Lavado de las membranas.....	124
2.12.5. Detección inmunológica.....	125
2.13. Secuenciación de ADN .....	126
2.14. Obtención de células competentes de <i>E. coli</i> .....	126
2.14.1. Método del cloruro de rubidio .....	126
2.14.2. Método SEM.....	127
2.15. Transformación de <i>E. coli</i> .....	128
2.16. Transformación de levaduras.....	129
2.16.1. Transformación química: <i>kit Pichia EasyComp</i> .....	129
2.16.2. Transformación mediante electroporación.....	131
2.16.3. Transformación mediante esferoplastos.....	132
2.17. Métodos para la extracción y el análisis de ARN .....	135
2.17.1. Obtención de ARN total de hongos filamentosos .....	135
2.17.2. Obtención de ARN total de levaduras .....	136
2.17.3. Tratamiento con ADNasa .....	138
2.17.4. Transcripción inversa de ARN (RT-PCR).....	140
2.18. Valoración de la actividad FAE mediante ensayo en placa .....	141
2.19. Preparación de extractos enzimáticos .....	143
2.20. Determinación cuantitativa de la actividad FAE .....	144
2.20.1. Ensayo FAE frente a sustratos sintéticos .....	144
2.20.2. Ensayo FAE frente a sustratos lignocelulósicos naturales .....	145
2.20.3. Cuantificación de ácidos hidroxicinámicos y sus ésteres mediante HPLC.....	145
2.21. Determinación de actividad celulolítica .....	146

2.21.1. Determinación de actividad $\beta$ -glucosidasa.....	147
2.21.2. Determinación de actividad celobiohidrolasa .....	147
2.21.3. Determinación de actividad endoglucanasa .....	148
2.22. Determinación de actividad xilanolítica.....	149
2.22.1. Determinación de actividad $\beta$ -xilosidasa.....	149
2.22.2. Determinación de actividad endoxilanasas .....	149
2.23. Análisis de la capacidad de sacarificación .....	150
2.24. Análisis proteómico de los extractos enzimáticos .....	151
2.24.1. Preparación de las muestras.....	152
2.24.2. Cuantificación de proteínas .....	153
2.24.3. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE).....	154
2.24.4. Electroforesis bidimensional.....	156
2.24.5. Detección de proteínas .....	159
2.24.6. Digitalización y análisis de geles.....	161
2.24.7. Digestión triptica de proteínas .....	161
2.24.8. Identificación de proteínas por MS MALDI-TOF/TOF .....	163
2.25. Electrotransferencia de proteínas ( <i>western blotting</i> ).....	166
2.25.1. Transferencia de proteínas a soporte sólido .....	166
2.25.2. Inmunodetección .....	167
2.26. Purificación de proteínas .....	169
2.27. Análisis metabolómicos .....	170
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>173</b>
<b>Capítulo 1. Búsqueda de nuevas cepas fúngicas con actividad FAE.....</b>	<b>175</b>
3.1.1. Introducción y objetivos del capítulo .....	177
3.1.2. Aislamiento de cepas fúngicas .....	177
3.1.3. Determinación cualitativa de la actividad FAE en placa.....	179
3.1.4. Identificación de los aislados ambientales con actividad FAE .....	184
3.1.5. Selección de sustrato lignocelulósico .....	190
3.1.6. Selección de la cepa con mayor actividad FAE .....	197
3.1.7. Análisis de la actividad celulolítica de los aislados ambientales .....	199
<b>Capítulo 2. Estudio de la capacidad del aislado ambiental <i>A. alternata</i> PDA1 para la degradación de la biomasa vegetal .....</b>	<b>205</b>
3.2.1. Introducción y objetivos del capítulo .....	207
3.2.2. Determinación del tiempo óptimo de recogida .....	208
3.2.3. Estudio de la influencia del desalado de los extractos en la actividad FAE.....	211
3.2.4. Caracterización de la actividad FAE del extracto enzimático .....	213

3.2.5. Análisis de otras actividades lignocelulolíticas .....	228
3.2.6. Estudio de la capacidad de sacarificación del extracto enzimático .....	233
3.2.7. Estudio del proteoma extracelular de <i>A. alternata</i> PDA1 .....	236
3.2.8. Estudio del metaboloma parcial de <i>A. alternata</i> PDA1 .....	254
3.2.9. Escalado del proceso fermentativo para la producción de FAEs.....	262
<b>Capítulo 3. Expresión heteróloga de la enzima PrFaeB de <i>P. rubens</i> en levaduras del género <i>Komagataella</i> spp.....</b>	<b>269</b>
3.3.1. Introducción y objetivos del capítulo .....	271
3.3.2. Expresión inducible de FAEs de <i>P. rubens</i> Wisconsin 54-1255.....	272
3.3.3. Expresión constitutiva de FAEs de <i>P. rubens</i> Wisconsin 54-1255.....	291
<b>Capítulo 4. Caracterización de la PrFaeB recombinante de <i>P. rubens</i> Wisconsin 54-1255, expresada en <i>K. phaffii</i> GS115 .....</b>	<b>315</b>
3.4.1. Introducción y objetivos del capítulo .....	317
3.4.2. Purificación de la enzima PrFaeB recombinante .....	318
3.4.3. Caracterización bioquímica y enzimática de PrFaeB recombinante .....	323
3.4.4. Estudio del metaboloma parcial de <i>P. rubens</i> Wisconsin 54-1255 .....	334
<b>4. DISCUSIÓN GENERAL .....</b>	<b>339</b>
4.1. Nuevas cepas fúngicas con actividad FAE.....	341
4.1.1. Búsqueda y selección de cepas fúngicas con actividad FAE.....	341
4.1.2. <i>Alternaria</i> sp. como hongo lignocelulolítico .....	343
4.2. Actividad FAE en organismos seleccionados para aplicaciones biotecnológicas ....	348
4.2.1. <i>K. phaffii</i> como sistema de expresión heteróloga de FAEs fúngicas .....	348
4.2.1. FAEs de <i>P. rubens</i> Wisconsin 54-1255.....	353
4.3. FAEs fúngicas como recurso para la Biotecnología Blanca.....	357
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>359</b>
Conclusions.....	362
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>363</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>401</b>
7.1 Material suplementario .....	403
7.2. Publicaciones científicas .....	405



## Abreviaturas y acrónimos

<b>ADNg:</b> ADN genómico	<b>ESI-qTOF:</b> espectrometría de masas mediante ionización por <i>electrospray</i> y analizador de cuadrupolo
<b>ADNr:</b> ADN ribosómico	<b>FAE:</b> feruloil esterasa
<b>AHC:</b> ácidos hidroxicinámicos	<b>FPLC:</b> cromatografía líquida rápida de proteínas
<b>AME:</b> alternariol monometil éter	<b>GAP:</b> gliceraldehído-3-fosfato
<b>Amp:</b> ampicilina	<b>GC:</b> cromatografía de gases
<b>AOH:</b> alternariol	<b>GH:</b> glucósido hidrolasa o glucosidasa
<b>AOX:</b> alcohol oxidasa	<b>GRAS:</b> organismo generalmente considerado seguro
<b>ARNm:</b> ARN mensajero	<b>GST:</b> glutatión S-transferasa
<b>ARNpn:</b> ARN pequeño nuclear	<b>GT:</b> glucosiltransferasa
<b>ARNt:</b> ARN de transferencia	<b>HDL:</b> lipoproteínas de alta densidad
<b>ATX-I, -II y -III:</b> alvertoxina I, II y III	<b>HPLC:</b> cromatografía líquida de alta eficacia
<b>BSA:</b> albúmina sérica bovina	<b>HST:</b> toxinas específicas de hospedador
<b>CAZy:</b> base de datos de enzimas que actúan sobre carbohidratos	<b>HTS:</b> cribado de alto rendimiento
<b>CE:</b> carbohidrato esterasa	<b>IEF:</b> isoelectroenfoque
<b>CIA:</b> cloroformo/alcohol isoamílico	<b>IMAC:</b> cromatografía de afinidad por metales inmovilizados
<b>CMC:</b> sal sódica de carboximetilcelulosa	<b>INBIOTEC:</b> Asociación de Investigación Instituto de Biotecnología de León
<b>COG:</b> agrupación de proteínas ortólogas	<b>ITS:</b> espaciadores transcritos internos
<b>DMSO:</b> dimetilsulfóxido	<b>LC-DAD:</b> cromatografía líquida con detector de matriz de fotodiodos
<b>DNS:</b> ácido 3,5-dinitrosalícilico	<b>LC-qTOF-MS:</b> cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con un analizador de tiempo de vuelo cuadrupolo
<b>DO:</b> densidad óptica	
<b>DTT:</b> ditiotreitól	
<b>dUTP:</b> 2'-desoxiuridina-5'-trifosfato	
<b>EDTA:</b> ácido etilendiaminotetraacético	

<b>LDL:</b> lipoproteínas de baja densidad	<b>pI:</b> punto isoelectrico
<b>LPMO:</b> monooxigenasa lítica de polisacáridos	<b>PL:</b> polisacárido liasa
<b>MALDI-TOF/TOF:</b> desorción/ionización láser asistida por una matriz, con analizador de tiempo de vuelo en tandem	<b>PMSF:</b> fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>MCA:</b> metil cafeato	<b>pNPC:</b> 4-nitrofenil-β-D-celobiósido
<b>MES:</b> ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico	<b>pNPG:</b> 4-nitrofenil-β-D-glucopiranosido
<b>MFA:</b> metil ferulato	<b>pNPX:</b> 4-nitrofenil-β-D-xilopiranosido
<b>MIC:</b> corrosión inducida por microorganismos	<b>ppm:</b> partes por millón
<b>MOPS:</b> ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico	<b>PTFE:</b> politetrafluoroetileno, teflón
<b>MpCA:</b> metil <i>p</i> -cumarato	<b>PVDF:</b> fluoruro de polivinilideno
<b>MS:</b> espectrometría de masas	<b>RNPpn:</b> ribonucleoproteínas pequeñas nucleares
<b>MSA:</b> metil sinapato	<b>ROS:</b> especies reactivas de oxígeno
<b>MW:</b> masa molecular	<b>RT-PCR:</b> reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa
<b>NCBI:</b> National Center for Biotechnology Information	<b>SCP:</b> biomasa microbiana ( <i>single cell protein</i> )
<b>NHST:</b> toxinas no específicas de hospedador	<b>SDS:</b> dodecilsulfato sódico
<b>NL:</b> no lineal	<b>SDS-PAGE 1-D/2-D:</b> electroforesis monodimensional/bidimensional en gel de poliacrilamida con SDS
<b>OD:</b> concentración de oxígeno disuelto	<b>T<sup>a</sup>:</b> temperatura
<b>ORF:</b> marco abierto de lectura	<b>TCA:</b> ácido tricloroacético
<b>p/p:</b> peso/peso	<b>TeA:</b> ácido tenuazónico
<b>p/v:</b> peso/volumen	<b>TEMED:</b> tetrametiletildiamina
<b>pb:</b> pares de bases	<b>TEN:</b> tentoxina
<b>PCR:</b> reacción en cadena de la polimerasa	<b>TFA:</b> ácido trifluoroacético
<b>PEG:</b> polietilenglicol	<b>TLC:</b> cromatografía en capa fina
<b>PES:</b> polietersulfona	<b>UV(B):</b> radiación ultravioleta (B)
	<b>v/v:</b> volumen/volumen
	<b>Zeo:</b> zeocina



## Resumen

---

La biomasa vegetal es el reservorio de carbono orgánico más abundante del planeta, así como una fuente de compuestos con aplicabilidad en industria farmacéutica, alimentaria, cosmética, papelería y textil. La utilización de dichos recursos requiere de la degradación de la pared celular de las plantas, que puede realizarse mediante la acción sinérgica de enzimas lignocelulolíticas. Unas de las enzimas lignocelulolíticas accesorias más interesantes son las feruloil esterasas (FAEs). En el presente trabajo, se estudió la actividad FAE de aislados fúngicos ambientales y de una cepa de colección seleccionada para la producción de antibióticos (*P. rubens* Wisconsin 54-1255). Se identificaron siete aislados ambientales con actividad FAE, destacando *A. alternata* PDA1, que fue capaz de liberar ácido ferúlico y azúcares sencillos a partir de pulpa de remolacha. El estudio de su secretoma apunta a *A. alternata* PDA1 como un prometedor productor de enzimas lignocelulolíticas. Por otro lado, se llevó a cabo la producción heteróloga y caracterización de la enzima PrFaeB de *P. rubens* Wisconsin 54-1255, cuyos óptimos de actividad FAE fueron pH 4,5 y 40 °C, y que demostró estabilidad frente a cationes metálicos. Los resultados del presente trabajo confirman a los hongos filamentosos como una fuente de nuevas FAEs para aplicaciones en Biotecnología Blanca.

## Abstract

---

Plant biomass is the most abundant carbon source on Earth and it also includes valuable compounds with applications in pharmaceutical, food and feed, cosmetics, paper and textile industries. The exploitation of these resources requires the hydrolysis of the plant cell wall, which can be achieved through the synergistic action of lignocellulolytic enzymes. Some of the most interesting lignocellulolytic enzymes are feruloyl esterases (FAEs). In this work, FAE activity from fungal environmental isolates was analyzed, as well as from a classical antibiotic producer (*P. rubens* Wisconsin 54-1255). Seven environmental isolates displaying FAE activity were identified, *A. alternata* PDA1 being the most promising candidate. *A. alternata* PDA1 was capable of releasing ferulic acid and simple sugars from sugar beet pulp. Considering the results of its secretome analysis, *A. alternata* PDA1 emerges as a promising lignocellulolytic enzyme producer. Moreover, the heterologous expression and characterization of PrFaeB, a fungal FAE from *P. rubens* Wisconsin 54-1255, was achieved. Its pH and temperature optima were pH 4,5 and 40 °C, respectively, and its FAE activity was barely affected by the presence of metal ions. The results in the present work confirm the importance of filamentous fungi as a source of novel FAEs, suitable for White Biotechnology applications.



Moho azul, por R. Hooke (1665). Wellcome Collection. CC BY

## INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



## 1.1. Hongos e industria

---

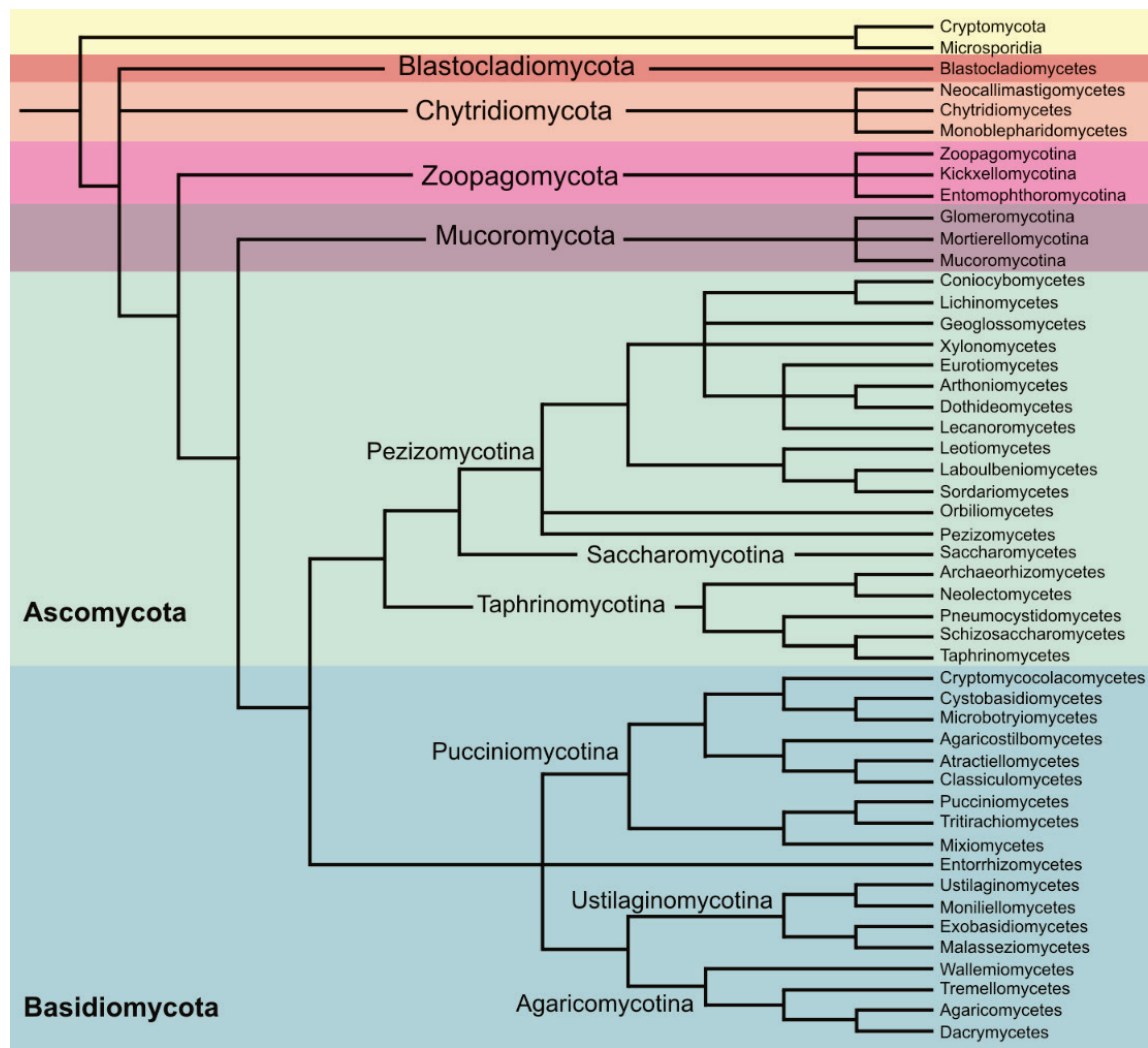
### 1.1.1. El reino Fungi

El reino Fungi es un grupo complejo de organismos eucariotas caracterizados por poseer una forma vegetativa filamentosa (en ocasiones, unicelular) y un modo de nutrición heterótrofa y absorbitiva. Su morfología y variedad de estrategias ecológicas han dificultado el establecimiento de relaciones filogenéticas dentro de este reino, así como sus límites (McLaughlin *et al.*, 2009). Sin embargo, esta diversidad biológica y ecológica determina que el reino Fungi contenga organismos con múltiples aplicaciones, tanto en la industria como en la investigación.

El número de especies que conforman el reino Fungi es difícil de determinar. En 1991, Hawksworth estimó un total de 1,5 millones, basándose en la relación entre número de especies fúngicas y vegetales en algunas de las regiones mejor estudiadas en cuanto a la presencia de hongos (Hawksworth, 1991). Esta estimación es considerablemente mayor que las de publicaciones anteriores, que hablaban de 100.000-250.000. No obstante, trabajos más recientes consideran que la estimación de Hawksworth es conservadora. Teniendo en cuenta las nuevas perspectivas en la identificación de especies derivadas de la aplicación de técnicas moleculares, así como la posible presencia de hongos en hábitats aún desconocidos, se cree que el número de especies podría oscilar entre 3,5 y 5,1 millones (Blackwell, 2011).

El Diccionario de los Hongos (Kirk *et al.*, 2008) recoge en su apartado “*numbers of fungi*” 97.330 especies descritas, lo que, sumado a 1.300 microsporidios, arrojaría un total de aproximadamente 99.000 especies. Estos datos corresponden a la 10ª edición de esta publicación que, en su 1ª edición, de 1943, incluía 38.000 especies (un incremento en el número de especies descritas de más de 60.000, a lo largo de un periodo de 65 años). El número de especies fúngicas conocidas aumenta, aproximadamente, un 1,2 % cada año (McLaughlin *et al.*, 2009). El porcentaje de especies descritas dentro de los grupos del reino Fungi es variable, debido a la dificultad de aislamiento y empleo de métodos moleculares en algunos clados concretos. Sin embargo, la gran mayoría de la diversidad de los hongos se adscribe a los grupos de los ascomicetos y los basidiomicetos (Blackwell, 2011).

En comparación con otros eucariotas, los hongos presentan genomas relativamente pequeños (30 o 40 millones de nucleótidos, pudiendo oscilar entre 2 y 180 millones, si se consideran todos los organismos del reino Fungi), por lo que suponen una alternativa interesante como modelos de secuenciación. El primer genoma eucariota publicado fue, precisamente, un genoma fúngico, correspondiente a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Goffeau *et al.*, 1996). Desde entonces, el número de genomas fúngicos depositados ha crecido considerablemente, habiéndose publicado más de 800, con diferentes grados de completitud (Spatafora *et al.*, 2017). En la actualidad existen varios proyectos encaminados a la secuenciación de genomas fúngicos a gran escala, como 1000 *Fungal Genomes Project* (<http://1000.fungalgenomes.org>) o *The Fungal Genome Initiative* (<https://www.broadinstitute.org/fungal-genome-initiative>), que enriquecerán aún más la información genética disponible (Stukenbrock y Croll, 2014; Choi y Kim, 2017).



**Fig. 1.1. Filogenia de los hongos.** Cladograma a partir de filogenias basadas en análisis multi-gen y a nivel de genoma. Las politomías se refieren a regiones sin resolver. (Modificado de Spatafora *et al.*, 2017).

Dentro del reino Fungi se incluyen grupos de características diversas, algunos de ellos estrechamente relacionados con los protistas. Esta relación permite esperar que la clasificación continúe evolucionando y modificándose a medida que se obtienen nuevos datos (Richards *et al.*, 2017). La Fig. 1.1 recoge una clasificación filogenética de los hongos aceptada en la actualidad.

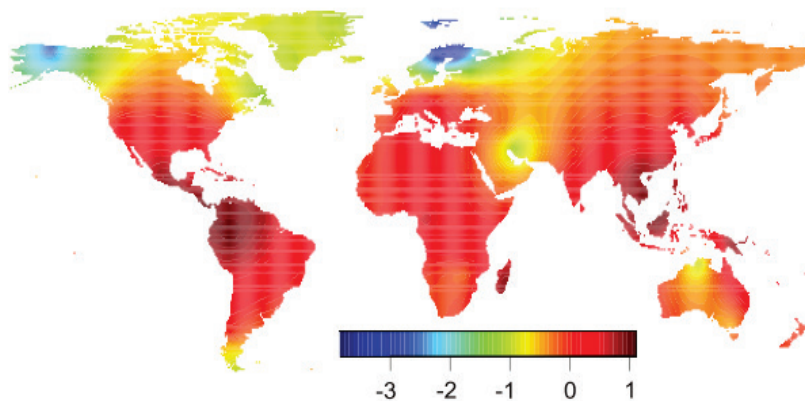
### **1.1.2. Hongos: ecosistemas diversos, distintas actividades**

El reino Fungi es una categoría muy amplia, con variedad de ciclos biológicos, metabolismos, morfogénesis y ecologías. En este grupo se encuadran especies parásitas (como patógenos de plantas y animales), mutualistas y comensalistas (Choi y Kim, 2017). La distribución de los hongos incluye prácticamente todos los hábitats conocidos del planeta, debido a su excelente capacidad para afrontar temperaturas extremas, valores desfavorables de actividad de agua y escasez de fuentes de carbono, sólo superada por las bacterias (Blackwell, 2011).

Los hongos asumen papeles ecológicos cruciales. Los hongos saprófitos son importantes en la degradación de polímeros y recircularización de nutrientes, especialmente el carbono que se encuentra secuestrado en la madera y otros tejidos vegetales. Los hongos patógenos y parásitos afectan a todos los grupos de organismos: bacterias, otros hongos, plantas y animales, incluyendo el ser humano. Mediante el establecimiento de relaciones de simbiosis, los hongos han facilitado la colonización de hábitats por parte de otros organismos. En este sentido, las asociaciones planta-hongo, como las micorrizas, pueden haber constituido un factor clave en la transición de las plantas desde los hábitats acuáticos a los terrestres (Lutzoni *et al.*, 2004).

Existen indicios que indican que la mayor variedad de especies de hongos se encuentra en zonas tropicales, que están consideradas en términos generales como las más ricas en biodiversidad. Además, los hongos son muy abundantes en regiones templadas, de donde proceden varias de las especies más importantes en lo que se refiere a producción de sustancias con utilidad farmacológica (por ejemplo, *Penicillium rubens*, que produce penicilina; *Tolyposcladium inflatum*, que sintetiza el inmunosupresor ciclosporina; *Aspergillus terreus*, productor de estatinas, que contribuyen a reducir los niveles de colesterol, etc.) (Mueller *et al.*, 2004; Blackwell, 2011; Tedersoo *et al.*, 2014). Se han encontrado especies fúngicas en climas menos favorables, como ecosistemas desérticos, en los que habitan hongos que forman parte de micorrizas, hongos que degradan plantas vivas o muertas, incluyendo cactáceas, así como hongos asociados a ecosistemas

extremos como las salinas (Sterflinger *et al.*, 2012; Santiago *et al.*, 2018). Los hongos ocupan también ecosistemas fríos. Varias especies fúngicas son responsables de la degradación de cabañas históricas construidas a principios del siglo XX en asentamientos de los exploradores de la Antártida. Asimismo, los líquenes son comunes en las regiones ártica y antártica, existiendo levaduras activas en condiciones de congelación (Blackwell, 2011). Pese a encontrarse hongos en todas las latitudes del planeta, su distribución y proporción respecto al total de organismos no es constante. Se han publicado estudios que indican que la proporción relativa de la diversidad hongos respecto a plantas aumenta al acercarse hacia los polos. Estos cambios deberían tenerse en cuenta a la hora de calcular la estimación del número total de especies fúngicas, puesto que se ha venido realizando en base a la relación hongo-planta y esta no permanece constante (Tedersoo *et al.*, 2014) (Fig. 1.2). Las diferencias en la distribución de la diversidad fúngica parecen estar influenciadas, principalmente, por factores climáticos, aunque también influyen otros como la presencia de plantas (debido a formas de vida asociadas a vegetales, como micorrizas), la dispersión de esporas a larga distancia, las migraciones producidas a través de conexiones de tierra existentes en el pasado y otros factores dependientes de la acción humana, como el comercio a escala mundial (Desprez-Loustau *et al.*, 2007; Tedersoo *et al.*, 2014).



**Fig. 1.2. Relación entre la distancia al ecuador y el ratio estandarizado riqueza en plantas/riqueza en hongos (valores interpolados).** Colores cálidos indican mayor riqueza relativa de especies vegetales; colores fríos, de especies fúngicas. (Modificado de Tedersoo *et al.*, 2014).

Además de estar presentes en todos los biomas del planeta, los hongos ocupan diferentes nichos ecológicos. Aparte de las mencionadas micorrizas, se cree que los hongos están presentes en el interior de prácticamente todas las plantas del planeta (Rodríguez *et al.*, 2009). En algunos casos los hongos producen síntomas de enfermedad (hongos patógenos) y, en muchos otros, no la provocan (hongos endófitos). Alrededor de un 20 % de los hongos y un 40 % de los ascomicetos pueden formar parte de líquenes (Blackwell, 2011). Se han aislado hongos a partir de artrópodos



e invertebrados: algunos hongos actúan como patógenos, otros son saprófitos que se alimentan de los cadáveres de los animales y también existen levaduras en los tractos digestivos de muchos insectos, especialmente aquellos asociados a fuentes de alimento específicas, como setas o madera (Lovett y St. Leger, 2017; Blackwell, 2017). Se han descrito especies fúngicas adaptadas a ecosistemas acuáticos, tanto de agua dulce y salobre como marinos (Shearer *et al.*, 2007). Por último, pero no menos importante, hay una diversidad muy amplia de hongos que habitan en los suelos (Tedersoo *et al.*, 2014; Franç *et al.*, 2018). En este sentido, los hongos y bacterias del suelo son importantes en los ciclos biogeoquímicos y la diversidad es mayor al acercarse a zonas ricas en materia orgánica, como raíces o sus exudados. Los hongos cumplen un papel importante en la estabilización de suelos de zonas desérticas, mediante la formación de costras en las que conviven ascomicetos pigmentados, líquenes y cianobacterias fijadoras de nitrógeno (Blackwell, 2011). Además, diversas especies fúngicas ocupan ambientes inesperados: tanto ecosistemas con condiciones ambientales extremas como otros en los que escasean los nutrientes. Este es el fundamento de la búsqueda de nuevas actividades enzimáticas lignocelulolíticas a partir de hongos procedentes de ambientes poco estudiados, llevada a cabo en la presente Tesis Doctoral.

El éxito de los hongos en la colonización de ecosistemas tan variados puede deberse a varios factores. Algunos estudios sugieren que un factor importante puede haber sido el hecho de que los hongos se originaron mucho antes que otros organismos eucariotas similares (como los oomicetos o los hifocitridios, que conforman el grupo de los pseudohongos), lo que les dotó de tiempo suficiente para desarrollar estrategias de adaptación a los diferentes nichos ecológicos y excluir por competición a otros microorganismos. Los hongos se desarrollaron a partir de un ancestro común con los animales hace 1.000-500 millones de años, mientras que algunos pseudohongos lo hicieron hace 250 millones de años. A pesar de que este tipo de hipótesis es difícil de confirmar, es posible que dicho periodo de tiempo adicional haya facilitado la evolución de capacidades que permitan retener ciertos nichos terrestres, como los asociados a plantas. Otra posible razón es que poseen una mayor eficiencia metabólica que sus competidores a la hora de acoplar los procesos de síntesis de la pared celular, el crecimiento celular polarizado y la alimentación mediante osmotrofia. Esto puede deberse a los mecanismos de transporte de vesículas a los extremos de las hifas en crecimiento y a otros procesos, como el hecho de que, en los hongos filamentosos, el crecimiento se produzca casi exclusivamente a partir de los extremos de las hifas, lo que les permite crecer a medida que se alimentan (Richards *et al.*, 2017).

Todas las especies estudiadas en el presente trabajo pertenecen al **subreino Dikarya**, cuyo nombre se refiere a la presencia en el talo de dos núcleos con distinto genotipo, en algún momento del ciclo biológico. Además, todas se incluyen en el **filo Ascomycota** que, junto con Basidiomycota, alberga el mayor número de especies fúngicas. En el caso de Ascomycota, el estado dicariótico se restringe a las células para reproducción sexual, siendo el micelio vegetativo homocariótico. Ascomycota es un filo diverso que incluye simbioses, patógenos, endófitos y saprófitos asociados con cientos de sustratos (Spatafora *et al.*, 2017).

Todos los hongos filamentosos aislados y analizados en el presente trabajo se adscriben al **subfilo Pezizomycotina**. Pezizomycotina constituye el subfilo con mayor número de especies de los tres que conforman el filo Ascomycota (Pezizomycotina, Saccharomycotina y Taphrinomycotina). La mayoría de las especies son filamentosas, aunque algunas pueden llevar a cabo crecimiento dimórfico, pasando de forma micelial a levaduriforme. Además de poseer formas sexuales, las especies de Pezizomycotina se reproducen de forma prolífica mediante reproducción asexual, en la cual los núcleos de las esporas se producen por división mitótica. Las especies presentan pleomorfismo (aunque poseen una única forma sexual, pueden presentar varios estados asexuales) (Spatafora *et al.*, 2017). Durante la **fase meiótica** (estado reproductivo sexual o teleomorfo), tiene lugar la fecundación de un gametangio femenino (ascogonio) por parte de un gametangio masculino (anteridio), o bien un gameto masculino (macroconidio). Los ascogonios fecundados se convierten en hifas ascógenas dicarióticas, que se transforman en ascas. Las ascas son el lugar donde se produce la meiosis y producción de ascosporas. La **fase mitótica** (estado reproductivo asexual o anamorfo) supone la producción de propágulos mitóticos, siendo los más frecuentes mitosporas (esporas o conidios), producidos a partir de células conidiógenas (células especializadas, agrupadas en conidióforos). Alternar entre la reproducción sexual y asexual dota de versatilidad a estos organismos: la fase meiótica permite la variabilidad genética mediante recombinación, lo que es ventajoso en ambientes cambiantes; la fase mitótica facilita la dispersión del hongo de forma rápida y “económica”, apropiada en ambientes estables. Históricamente, las formas sexuales y asexuales de las especies recibían nombres distintos, según el denominado sistema dual de nomenclatura, basado en caracteres morfológicos. Actualmente, este sistema se desaconseja y se aboga por el empleo de un solo nombre específico para cada especie (McNeill y Turland, 2011; McNeill *et al.*, 2012).

Dentro de los hongos filamentosos estudiados en el presente trabajo, se encuentran cepas de la especie *Alternaria alternata*, un hongo saprófito, patógeno de plantas y el mayor productor de alérgenos de origen fúngico a nivel mundial (Gabriel *et al.*, 2016). Asimismo, se estudiaron cepas de otras especies fitopatógenas, como *Fusarium oxysporum* y *Pleospora herbarum*. Se identificaron dos especies de *Penicillium* spp. capaces de producir metabolitos secundarios como micotoxinas: *P. roseopurpureum* (curvularina) y *P. verrucosum* (ocratoxina A y citrinina). Por último, se analizó una cepa seleccionada en laboratorio: *P. rubens* Wisconsin 54-1255 (Houbraken *et al.*, 2011a).

Las levaduras empleadas en el presente trabajo para la expresión heteróloga de feruloil esterases (FAEs, del inglés *ferulic acid esterases*) pertenecen al **subfilo Saccharomycotina**, que incluye la mayoría de las levaduras, caracterizadas por llevar a cabo reproducción asexual mediante gemación. Las células somáticas e hifas de Saccharomycotina pueden ser haploides o diploides. Estas últimas se convierten en gametos mediante meiosis, los cuales se fusionan para formar un cigoto y se desarrollan en forma de ascas, que producen de una a ocho ascosporas. Las hifas ascógenas no se producen como en Pezizomycotina (Webster y Weber, 2007).

La variedad de nichos ecológicos que ocupan los hongos está relacionada con su potente maquinaria enzimática extracelular, su capacidad de producir metabolitos secundarios y su adaptación a condiciones ambientales diversas. Estas características determinan que posean aplicaciones industriales interesantes, que se discuten en los apartados siguientes.

### **1.1.3. Importancia económica de los ascomicetos**

La presencia prácticamente ubicua de ascomicetos en el planeta, sus capacidades enzimáticas, metabolitos secundarios y formas de vida determinan que tengan un impacto económico y social muy importante (Bhatnagar *et al.*, 2002; Kendrick, 2011; Ward, 2012; Lange *et al.*, 2012; Lange, 2014). Este impacto tiene una doble vertiente y supone repercusiones tanto negativas como positivas, siempre desde el punto de vista del interés humano. La traducción a cifras económicas concretas es casi imposible, debido a la variedad de niveles a los que están implicados.

En cuanto al **impacto económico negativo**, los ascomicetos son responsables de pérdidas cuantiosas en las áreas de agricultura, ganadería y salud. Existen especies de ascomicetos que actúan como patógenos obligados u oportunistas, afectando a plantas y animales. Algunos hongos producen daños a estructuras y edificios, sobre todo aquellos fabricados con madera

(Gravesen *et al.*, 1999; Andersen *et al.*, 2011). Los hongos filamentosos afectan a las cosechas, tanto previamente a su recogida (fitopatógenos) como durante el almacenamiento. El grupo de los ascomicetos incluye múltiples especies fitopatógenas, siendo muy importantes algunas pertenecientes a los géneros *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Colletotrichum* spp. y al grupo de los hongos dematiáceos. Estos últimos son hongos caracterizados por la presencia de pigmentos similares a la melanina en la pared celular, de color pardo claro hasta negro, e incluyen especies de géneros como *Alternaria* spp., *Curvularia* spp. y *Cladosporium* spp. (De Lucca, 2007).

Además de las pérdidas en las cosechas debidas a enfermedades de las plantas, los ascomicetos producen daños al ser productores de micotoxinas. El término micotoxina deriva de las palabras griegas *μύκης* (*mykes*, hongo) y *τοξικόν* (*toxikon*, veneno). Las micotoxinas se definen como productos naturales producidos como metabolitos secundarios por parte de hongos, capaces de dar lugar a una respuesta tóxica en vertebrados superiores y otros animales, tras su ingestión incluso en bajas cantidades. Las micotoxinas pueden también afectar a plantas y otros organismos. A nivel químico y estructural, las micotoxinas son compuestos de bajo peso molecular derivados principalmente de aminoácidos, del ácido shikímico o del malonil coenzima A (malonil-CoA). Son producidos por el micelio de hongos filamentosos, aunque pueden acumularse en estructuras especializadas, como los conidios, o en el entorno que rodea al hongo. Las condiciones óptimas para la producción de micotoxinas no siempre coinciden con las condiciones de crecimiento del organismo productor. El efecto tóxico puede ser agudo o crónico, provocando hepatopatías, problemas renales, diferentes formas de cáncer y mutaciones o malformaciones en fetos, entre otras consecuencias (Bhatnagar *et al.*, 2002). En países desarrollados, la mayor parte del impacto económico de las micotoxinas se debe a la pérdida de cosechas y su disminución de valor al superarse los niveles establecidos en la legislación, así como al gasto en labores destinadas a reducir la presencia de estas toxinas y a actuaciones de control (Cleveland *et al.*, 2003; Mitchell *et al.*, 2016). Las micotoxinas existen también en alimentos consumidos en nuestro país, habiéndose realizado estudios que indican su presencia en productos como la cebada (Ibáñez-Vea *et al.*, 2012) y otros cereales como el maíz, en frutos secos, semillas, plátanos, uvas y productos procesados, como bebidas de café (García-Moraleja *et al.*, 2015), vino, pan o zumos (Mateo *et al.*, 2004). Los más importantes productores de micotoxinas son tres géneros de ascomicetos: *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. y *Fusarium* spp., aunque existen otros, como *Claviceps* spp. o *Alternaria* spp. (Bhatnagar *et al.*, 2002).

Además del impacto negativo en la economía por parte de los ascomicetos, existe también un **impacto negativo en la sociedad**, debido a su capacidad de provocar enfermedades. El impacto sanitario de las micotoxinas es sobre todo importante en países subdesarrollados o en vías de desarrollo, donde afectan a las personas y al ganado (Wagacha y Muthomi, 2008). En países desarrollados, además de producir enfermedades (principalmente en individuos inmunodeprimidos), los ascomicetos son uno de los responsables más importantes del desarrollo de problemas respiratorios. Ciertos metabolitos fúngicos actúan como alérgenos ambientales y están relacionados con patologías como hipersensibilidad y asma (Mudarri y Fisk, 2007). Por otra parte, varios ascomicetos producen enfermedades emergentes que están teniendo un impacto importante en especies protegidas o en riesgo de extinción, como murciélagos, abejas, tortugas o especies de coral (Fisher *et al.*, 2012).

Afortunadamente, pese a las implicaciones negativas de los ascomicetos, este grupo de hongos presenta numerosas características aprovechables por el ser humano. Algunos ascomicetos constituyen **alimentos** en sí mismos y otros se añaden como **aditivos o componentes alimentarios**, como los empleados en el pan, las bebidas fermentadas o en la maduración de quesos. Los hongos filamentosos producen **metabolitos primarios** de utilidad, como los ácidos cítrico, glucónico, fumárico, itacónico o ácidos grasos, entre otros (Ward, 2012). Además, los ascomicetos producen también un amplio abanico de metabolitos secundarios, como respuesta fisiológica a estímulos ambientales y factores de estrés biótico o abiótico. Los metabolitos secundarios, si bien no están directamente relacionados con los procesos metabólicos fundamentales de crecimiento y obtención de energía, presentan actividades biológicas que contribuyen a la supervivencia del productor en un nicho ecológico, tales como la defensa frente a competidores, mediación en las interacciones de simbiosis, adquisición de nutrientes, factores de virulencia o señales de comunicación (Macheleidt *et al.*, 2016). Entre los **metabolitos secundarios con aplicaciones** farmacéuticas producidos por ascomicetos, se encuentran antibióticos (penicilinas, cefalosporinas), antifúngicos (griseofulvina), fármacos anticancerígenos (el taxol, producido por hongos endófitos) y otros fármacos (ciclosporinas y otros inmunosupresores; compuestos que reducen los niveles de colesterol, como la lovastatina, etc.), siendo sólo superados en la producción de este tipo de sustancias por el filo Actinobacteria (Barreiro *et al.*, 2012b). Otros metabolitos secundarios fúngicos con aplicaciones son: pigmentos

(astaxantina,  $\beta$ -caroteno, monascina, ankaflavina, etc.), reguladores del crecimiento vegetal (el ácido giberélico, que es una fitohormona), etc. (Boruta, 2018).

Los ascomicetos poseen una **potente maquinaria celular**, que determina que estén siendo empleados como productores de enzimas (endógenas y exógenas) y otros compuestos. El mercado global de enzimas tuvo un valor de 8,18 miles de millones de dólares sólo en el año 2015 y se prevé un crecimiento en los próximos años. Más de 500 productos fabricados a escala industrial requieren de la utilización de enzimas. En la actualidad, la mayoría del mercado de las enzimas a nivel mundial está en manos de grandes compañías procedentes de países de Europa (Dinamarca, Alemania, Países Bajos) y América del Norte (Estados Unidos, Canadá), aunque se prevé que aumente la importancia de las economías asiáticas emergentes, como China, Japón o la India (Manisha y Yadav, 2017). Según el propósito de su uso, las enzimas industriales pueden dividirse en tres categorías: i) enzimas técnicas, empleadas en las industrias de los detergentes, el almidón, textil, biocombustibles, farmacéuticas y otras industrias menores; ii) enzimas alimentarias, usadas en la industria panadera, de bebidas fermentadas y otras, como las lácteas y las de producción de aceites y grasas; iii) enzimas empleadas en alimentación animal, para enriquecer piensos, reducir el contenido en antinutrientes, etc. (Kumar *et al.*, 2014).

Entre los hongos filamentosos se encuentran especies productoras de **enzimas endógenas** con aplicaciones en campos como industria alimentaria humana y animal, papelera o de biocombustibles. Este es el caso de enzimas que degradan la pared celular vegetal, como  $\beta$ -glucanasas, xilanasas, mananasas, pectinasas o galactosidasas (Gifre *et al.*, 2017). La importancia de las enzimas lignocelulolíticas fúngicas se indica en el apartado 1.6.

Además de enzimas endógenas, la maquinaria celular de síntesis y secreción de los ascomicetos puede utilizarse para la producción heteróloga de **enzimas y compuestos procedentes de otros organismos**. Los hongos filamentosos son particularmente efectivos como sistemas de expresión heteróloga de enzimas procedentes de otros hongos (Archer, 2000). Además, al tratarse de organismos eucariotas, presentan la ventaja de llevar a cabo modificaciones postraduccionales. La producción de cócteles enzimáticos por parte de grandes empresas como Novozymes, DSM y DuPont (antes Danisco-Genencor) se lleva a cabo empleando un pequeño número de ascomicetos con buenas características para la fermentación, como *Trichoderma reesei* y *Aspergillus* spp. (Mäkelä *et al.*, 2014). Una de las mayores dificultades en la expresión heteróloga

empleando hongos filamentosos es la presencia de proteasas endógenas que degradan los productos finales. Existen cepas de hongos filamentosos desarrolladas para reducir la actividad proteasa, con vistas a mejorar la producción; sin embargo, en algunos casos, dicha actividad proteasa permanece a niveles basales que son suficientes para afectar significativamente a los rendimientos (Punt *et al.*, 2002; Nevalainen *et al.*, 2005; Yoon *et al.*, 2011). Otro de los problemas a solventar es la presencia de cuellos de botella importantes en los procesos de transcripción, traducción y, sobre todo, en las modificaciones postraduccionales y en la secreción.

Dentro del grupo de los ascomicetos encontramos también las **levaduras**, cuyas aplicaciones en la expresión heteróloga de proteínas y otros compuestos de importancia industrial están muy extendidas y son prometedoras. *S. cerevisiae* se ha empleado históricamente en la industria alimentaria y de bebidas fermentadas. Esta levadura también se utiliza como plataforma de expresión heteróloga. Por otra parte, la levadura metilotrófica *Komagataella* spp. (anteriormente denominada *Pichia pastoris*) se emplea para la producción heteróloga de diversos compuestos: i) hormonas animales, como FSH (hormona folículoestimulante), LH (hormona luteinizante) o CG (gonadotropina coriónica); ii) enzimas fibrolíticas (enzimas que contribuyen a la degradación de la pared celular vegetal y enzimas que inactivan antinutrientes y favorecen la disponibilidad de otros, como fitasas); iii) proteínas recombinantes para profilaxis y terapia, como anticuerpos (Ac) recombinantes o citoquinas (Gifre *et al.*, 2017). En la actualidad, uno de los objetivos de diversas investigaciones es la obtención de cepas de *Komagataella* spp. cuyos patrones de N-glicosilación se asemejen a los llevados a cabo en mamíferos, para permitir una mayor vida media y eficacia de los compuestos terapéuticos recombinantes (Jacobs *et al.*, 2009).

## 1.2. Economía Circular y residuos lignocelulósicos

---

### 1.2.1. La Economía Circular y la Biotecnología Blanca

El incremento en la explotación de los recursos naturales, la creciente urbanización, el aumento de la población humana y la aparición de problemas medioambientales a escala mundial, como el calentamiento global, están dando lugar a la búsqueda de nuevos modelos productivos

basados en la sostenibilidad. En este sentido, son importantes tres conceptos: la Economía Circular, la Economía Verde y la Bioeconomía.

El concepto de **Economía Circular** se popularizó durante la década de los años 90, como contraposición a los modelos de “economía lineal”. La Economía Circular aboga por la utilización eficiente de los recursos naturales, de modo que se minimice su explotación y se reduzca la producción de residuos. Además, contempla la reutilización de los subproductos industriales como recursos para otras producciones, potenciando la cooperación y la dinámica intersectorial (D’Amato *et al.*, 2017; Winans *et al.*, 2017).

El concepto de la **Economía Verde** ha tomado gran importancia a partir de la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo Sostenible (Río de Janeiro, Brasil, 2012). La Economía Verde pretende basar el crecimiento económico en la inversión pública y privada orientada a reducir las emisiones de gases de efecto invernadero y la contaminación, mejorar la eficiencia de obtención de recursos y energía y prevenir la pérdida de biodiversidad y ecosistemas (Barbier, 2012).

En cuanto a la **Bioeconomía**, la Comisión Europea la define como la producción de recursos renovables biológicos y la conversión de los mismos y sus residuos en productos de valor añadido, incluyendo tanto sectores tradicionales como emergentes (*European Commission 2012 Bioeconomy Strategy and Action Plan "Innovating for Sustainable Growth: A Bioeconomy for Europe"*).

En conclusión, los conceptos de la Economía Circular, Economía Verde y Bioeconomía están interrelacionados y, aunque presentan matices (Tabla 1.1), todos hacen referencia a la modificación de los modelos económicos para orientarlos hacia la sostenibilidad económica, social y medioambiental.

La implementación y desarrollo de la Bioeconomía Circular constituye una de las principales líneas estratégicas para la sostenibilidad en la Unión Europea (Dupont-Inglis y Borg, 2018). España lanzó su propia estrategia sobre Bioeconomía en enero de 2016, con vistas a potenciar un modelo económico basado en el empleo de recursos biológicos y sistemas de producción eficientes y sostenibles. Los sectores incluidos en dicha estrategia son alimentación, agricultura, pesca, acuicultura y silvicultura, condicionados por la disponibilidad de agua y su empleo racional. Dicha estrategia atiende también a la Economía Circular, incluyendo industrias de revalorización de subproductos y obtención de energía a partir de la biomasa (Lainez *et al.*, 2018).



**Tabla 1.1. Puntos en común, divergencias, limitaciones y sinergias entre los conceptos de Economía Circular, Economía Verde y Bioeconomía.** (Modificado de D’Amato et al., 2017).

Puntos en común	Divergencias	Limitaciones	Sinergias
Utilización de los recursos naturales, energía y emisiones.  Ecoeficiencia, en Economía Circular y Verde.	La Economía Circular y Bioeconomía se centran en los recursos (con diferente enfoque), mientras que la Economía Verde atiende a todos los procesos naturales. La Economía Circular se centra en la urbanización y la Bioeconomía en el desarrollo rural.	Ninguno trata el paradigma del crecimiento ilimitado y el mantenimiento de la sostenibilidad. No atienden a todos los aspectos de las dimensiones de la sostenibilidad.	Los tres términos están interrelacionados y amparados dentro del concepto de Bioeconomía Circular.

Uno de los campos en desarrollo más prometedores a la hora de orientar la economía hacia la sostenibilidad es la Biotecnología Industrial, o “**Biotecnología Blanca**”. La Biotecnología Blanca consiste en el uso de células vivas (levaduras, hongos, bacterias o plantas, entre otros) o su maquinaria celular (enzimas) para sintetizar productos de valor comercial, más fácilmente degradables, que requieren menos energía para su producción o que dan lugar a menos residuos (Frazzetto, 2003). La Biotecnología Blanca permite la obtención de compuestos de interés, como metabolitos primarios (aminoácidos, nucleótidos y nucleósidos, vitaminas, solventes, ácidos orgánicos, etc.), metabolitos secundarios (antibióticos, anticuerpos, hipolipemiantes, antitumorales, inmunosupresores, antiparasitarios, promotores del crecimiento, etc.) y otras moléculas de pequeño o gran tamaño. Además, la Biotecnología Industrial incluye el mercado de enzimas y las bioconversiones (Demain, 2007), que poseen un valor económico muy importante, como se indicó en el apartado 1.1.3.

## 1.2.2. Aplicaciones de la biomasa

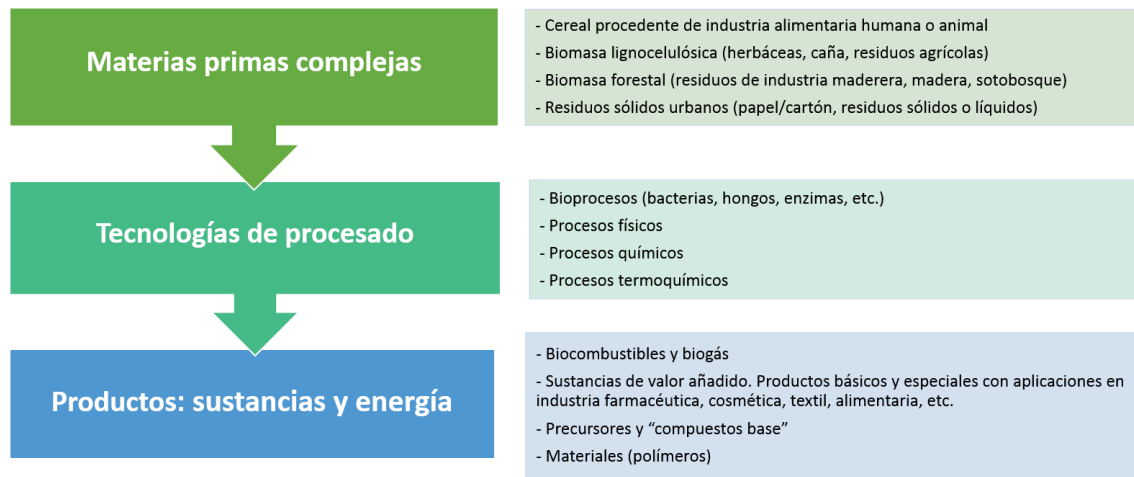
Uno de los campos relacionados con el concepto de la Bioeconomía Circular que mayor interés ha suscitado en los últimos años es la utilización de la biomasa. La **biomasa** se define como la materia orgánica que se origina en los procesos biológicos, espontáneos o provocados por la acción humana, que puede ser empleada como fuente de energía. La biomasa puede derivar de procesos naturales de los organismos, o bien constituir un residuo de la actividad humana.

Dentro de la biomasa total que existe en el planeta, tiene especial importancia la derivada de las plantas, cuyo principal componente seco es la **lignocelulosa** (Wang, 2007). La lignocelulosa

es un polímero natural que forma parte de las paredes celulares vegetales, constituido, de forma general, por celulosa, hemicelulosas, pectinas y lignina, en porcentajes variables según su tipo y origen (Jäger y Büchs, 2012). La biomasa lignocelulósica supone más del 60 % de la biomasa total y procede, principalmente, de las siguientes fuentes: residuos de la madera (desechos de la industria papelera, serrín), papel, cultivos dedicados (especies herbáceas y pastos), residuos agrícolas (rastros, paja, mazorcas, cáscaras, pieles, tallos, cañas, semillas no aptas para alimentación y bagazo), residuos domésticos (aguas residuales y basura lignocelulósica), residuos de la industria alimentaria humana o animal y residuos sólidos urbanos. La cantidad de biomasa lignocelulósica es especialmente importante en países con alta actividad agrícola (Bilal *et al.*, 2017). Se estima que el sector agrícola genera unos 140 mil millones de toneladas de biomasa cada año. Una parte importante se consideran residuos y no pueden emplearse como alimento sin antes ser transformados (Zuin y Ramin, 2018).

La sociedad actual depende en gran medida de la utilización de combustibles fósiles, debido al alto consumo de derivados del petróleo. La demanda mundial de crudo se sitúa en, aproximadamente, 84 millones de barriles al día, con previsiones de aumentar hasta 116 millones de barriles diarios hacia 2030 (Cherubini, 2010). Los problemas asociados al empleo de combustibles fósiles (contaminación, escasez de reservas, problemas sociales, cambio climático) pueden afrontarse mediante la implementación de nuevas cadenas de producción basadas en recursos renovables. La biomasa lignocelulósica tiene potencial para sustituir a los combustibles fósiles, tanto en el sector de la energía (biocombustibles) como en otros (materiales y químicos).

El concepto de la **biorrefinería** se basa en el empleo de moléculas de carbono procedentes de plantas para obtener energía, moléculas con elevado valor añadido (químicos, precursores, cosméticos, fármacos), materiales (plásticos y polímeros mezclados) e ingredientes para la industria alimentaria (Fig. 1.3). La biorrefinería implica la optimización de la eficiencia de los procesos, de modo que se acabe transformando la totalidad de la planta, sobre todo aquellas partes que actualmente se considera que carecen de valor comercial. La biorrefinería es un concepto propuesto como contraposición a la refinería del petróleo, basado en cuatro pilares: i) sostenibilidad; ii) empleo de procesos en cascada, para la obtención del máximo número posible de productos de utilidad; iii) evitar sustratos aptos para alimentación y iv) huella de carbono neutra (Kamm y Kamm, 2004; Octave y Thomas, 2009; Escamilla-Alvarado *et al.*, 2017).



**Fig. 1.3. Diagrama del procesamiento industrial de la biomasa vegetal.** Esquema basado en el funcionamiento de una biorrefinería de tercera generación, en la que se partiría de una materia prima vegetal compleja para, aplicando una combinación de tecnologías de procesado, obtener varias líneas de productos. (Modificado de Kamm y Kamm, 2004).

La mayor parte de la biomasa procedente de desechos está compuesta por una mezcla compleja de moléculas, cuya separación no es sencilla. Una complicación añadida es que algunos de los residuos y materiales vegetales a separar son sólidos, por lo que frecuentemente se necesita emplear solventes orgánicos, procedentes en muchas ocasiones de la destilación del petróleo. Si se pretende conseguir una producción sostenible e independiente del petróleo, es necesario que dichos solventes también se obtengan mediante procesos "verdes" (Tuck et al., 2012). Castilla y León, al ser una región cuya actividad principal es la agricultura y las industrias agroalimentarias cerealistas, puede ser muy apropiada para aplicar estrategias de biorrefinería encaminadas a aprovechar subproductos como paja de cereal, cañote de maíz o desechos de las industrias maderera o azucarera.

En los últimos años ha aumentado la investigación orientada a la implementación de industrias basadas en recursos renovables. En el caso de la biomasa lignocelulolítica, el mayor impedimento para la difusión de su utilización es la escasez de tecnologías de bajo coste capaces de degradar en profundidad la estructura de la pared celular vegetal (Lynd *et al.*, 2002).

Las aplicaciones industriales de la biomasa lignocelulósica son variadas. Tiene usos directos en la industria papelera, maderera y de alimentación. Tras su hidrólisis en monómeros, los carbohidratos pueden emplearse como sustrato para la fabricación de biocombustibles. La biomasa contiene precursores y químicos de base con aplicaciones en industrias de biopolímeros.

Estos biopolímeros puede servir para reemplazar materiales contaminantes, como los plásticos, y en la industria farmacéutica (polímeros biodegradables en traumatología; hidrogeles para la distribución de fármacos, etc.) (Goyanes y D'Accorso, 2017). Los ácidos hidroxicinámicos (AHC), como el ácido ferúlico, pueden emplearse como antioxidantes con aplicaciones farmacéuticas o cosméticas (Ou y Kwok, 2004; El-Seedi *et al.*, 2012; Taofiq *et al.*, 2017), o transformarse en sustancias aromatizantes, como la vainillina (Kumar y Pruthi, 2014). La ramnosa puede ser utilizada como precursor de otros aromatizantes, como el furaneol, que se emplea en sabores frutales, de caramelo, tostados, etc. Pectinas y arabinosilanos presentan propiedades gelificantes de interés en industria alimentaria (Morales-Ortega *et al.*, 2013). El ácido galacturónico puede transformarse en agentes tensioactivos, mediante esterificación con ácidos grasos, mientras que la L-arabinosa tiene usos diagnósticos en bacteriología y propiedades contra la enfermedad de Parkinson (Micard *et al.*, 1996).

### 1.3. Proteómica aplicada al estudio de enzimas fúngicas

---

El concepto de Proteómica, o estudio del **proteoma** (perfil de proteínas presente en un cultivo, tejido u organismo en un momento y condiciones determinadas), fue introducido a mediados de los años 90, aunque se basa en avances importantes en Bioquímica y Genética desarrollados a principios de la década de los 70.

De modo similar a lo ocurrido en la Genómica y Transcriptómica, la Proteómica ha incorporado tecnologías de alto rendimiento (*high-throughput*) que han permitido aumentar la complejidad de las muestras a analizar y reducir el tiempo requerido para ello (de Oliveira y de Graaff, 2011). Durante las últimas dos décadas, se han llevado a cabo estudios de Proteómica basados en espectrometría de masas (MS), para elucidar el arsenal de proteínas producidas por algunos de los hongos filamentosos con mayor impacto social y económico.

Dentro de estas proteínas son especialmente interesantes las enzimas extracelulares. Los hongos filamentosos son capaces de secretar un abanico de enzimas con aplicaciones en la industria, como aquellas capaces de degradar las paredes celulares vegetales y otros biopolímeros (Kim *et al.*, 2007). El **secretoma** se define como la combinación de las proteínas nativas secretadas por un organismo y la maquinaria celular implicada en dicha secreción. Debido a su

naturaleza heterótrofa absorbitiva, los hongos filamentosos son capaces de secretar un gran número de enzimas degradativas y otro tipo de proteínas, con funciones como la adquisición de nutrientes, la colonización de sustratos y el establecimiento de interacciones ecológicas (González-Fernández *et al.*, 2010). Las técnicas proteómicas han permitido caracterizar el secretoma de cepas de especies fúngicas tan célebres como el hongo productor de penicilina *P. rubens* (Barreiro *et al.*, 2012b).

La Proteómica fúngica, especialmente aquella relacionada con hongos filamentosos, ha avanzado enormemente en los últimos 10 años. Este avance ha sido posible gracias a la disponibilidad creciente de genomas fúngicos secuenciados, la difusión de nuevas tecnologías para la secuenciación de ácidos nucleicos y el avance de las técnicas y tecnologías proteómicas [preparación de muestras, técnicas de separación de proteínas de alta resolución, programas informáticos para la identificación y caracterización proteica mediante MS en tándem (MS-MS) y tecnologías bioinformáticas] (González-Fernández *et al.*, 2010; Doyle, 2011). Algunas de las técnicas aplicadas al estudio proteómico de especies fúngicas son la electroforesis mono y bidimensional de proteínas en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE, 1-D y 2-D), espectrometría de masas mediante desorción/ionización láser asistida por una matriz, con analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF) y con analizador de tiempo de vuelo en tándem (MALDI-TOF/TOF), espectrometría de masas mediante ionización por *electrospray* y analizador de cuadrupolo (ESI-qTOF) o la nanocromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (Nano HPLC MS-MS), entre otras (Barreiro *et al.*, 2012a).

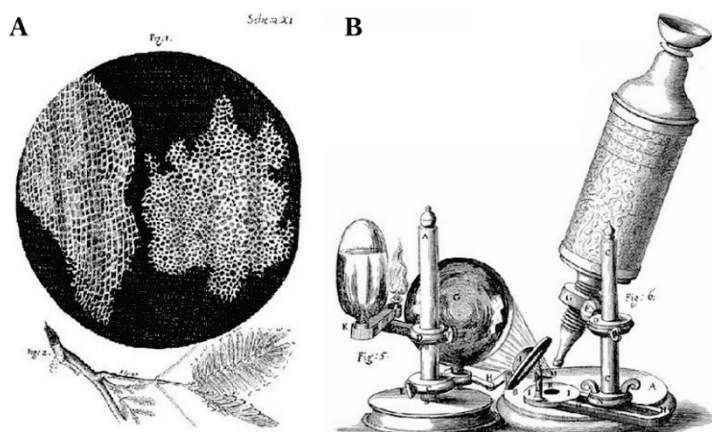
A pesar de estos avances, el potencial de la Proteómica para el estudio de los hongos filamentosos no está tan explorado como en el caso de otros organismos, como las levaduras o el ser humano. Esto es especialmente patente en grupos como los hongos fitopatógenos, en los que, pese a la importancia de sus sistemas enzimáticos, el número de especies estudiadas es aún reducido. La gran diversidad y flexibilidad genética en los genomas fúngicos es otro de los obstáculos frente al avance de la Proteómica fúngica (González-Fernández *et al.*, 2010).

La Proteómica fúngica es un campo aún en desarrollo, pero que está experimentando una rápida evolución. Se esperan avances significativos capaces de mejorar la producción de enzimas y metabolitos que puedan contribuir a procesos biotecnológicos actuales y por descubrir (de Oliveira y de Graaff, 2011).

## 1.4. La pared celular vegetal

---

En el siglo XVII, el científico británico Robert Hooke desarrolló el primer microscopio compuesto y lo utilizó para visualizar materiales y organismos, entre ellos, una fina lámina de corcho (Hooke, 1665). En la descripción de esta imagen, Hooke empleó por primera vez el término “célula” como concepto biológico, para referirse a unas estructuras semejantes a las celdillas de una colmena (Fig. 1.4). Las celdillas de la lámina de corcho correspondían, precisamente, a paredes celulares vegetales. Desde la primera observación de una pared celular vegetal, el conocimiento acerca de estas estructuras ha avanzado enormemente. Sin embargo, aún hay mucho por elucidar sobre las paredes celulares, cuya composición y abundancia en el planeta las convierten en fuentes prometedoras de sustancias químicas, azúcares fermentables y biopolímeros (Guerrero *et al.*, 2016).



**Fig. 1.4.** A) Detalle de una lámina de corcho al microscopio. B) Ilustración del microscopio compuesto desarrollado en 1655 por Robert Hooke. (Modificado de Hooke, 1665).

La pared celular es la capa más externa de la célula vegetal, localizada exteriormente a la membrana plasmática y con un espesor variable. La pared celular vegetal desempeña funciones variadas y muy importantes, como son: i) soporte mecánico, manteniendo y determinando la forma de la célula, incluso tras producirse la muerte del protoplasto (la parte de la célula vegetal delimitada por la pared celular); ii) protección frente a cambios de volumen de la célula debidos a procesos osmóticos, si bien permite la expansión reversible (elástica) de la célula; iii) permitir el crecimiento de la planta; iv) permeabilidad al paso de moléculas pequeñas solubles en agua, como iones, azúcares o aminoácidos; v) capacidad de unión de cationes inorgánicos, como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ , que puede ser aprovechable para retirar metales pesados de suelos contaminados; vi) protección frente a daño mecánico o infecciones de patógenos, actuando como barrera física

y fuente de moléculas con actividad biológica; vii) implicación en la comunicación entre la matriz extracelular y el interior de la célula, a través de vías de señalización; viii) reservorio de carbohidratos, que pueden emplearse en otros procesos metabólicos (especialmente en las semillas); ix) otras funciones, como lubricación durante el avance de las raíces a través del suelo, control de la textura en la maduración de las frutas, etc. (Srivastava *et al.*, 2017).

### 1.4.1. Estructura de la pared celular vegetal

La pared celular vegetal es una estructura compleja y dinámica, cuya composición y disposición varían en función de la especie, fase de crecimiento, tejido, célula, tipo de pared (primaria o secundaria) e, incluso, entre diferentes capas dentro del mismo tipo de pared (Wei *et al.*, 2009). En general, las paredes celulares se originan a partir una serie de capas con diferente composición y papel fisiológico. Durante la división celular, se deposita una primera capa denominada **lámina media**, que se encuentra entre dos células hijas. La lámina media está formada principalmente por polisacáridos pécticos ácidos que actúan como adhesivo, manteniendo la unión entre células adyacentes.

Entre la lámina media y la membrana plasmática, una vez que la placa celular está completa, se deposita la **pared celular primaria**, una capa flexible y de escaso grosor (alrededor de 0,1  $\mu\text{m}$ , si bien en algunos tejidos plásticos de sostén, como el colénquima, su grosor puede alcanzar los 10  $\mu\text{m}$ , frente a los menos de 0,01  $\mu\text{m}$  de las membranas celulares). La pared celular primaria es aquella cuyas microfibrillas se depositan alrededor de células en elongación y división y está constituida en su mayor parte por polisacáridos (celulosa, hemicelulosas y pectinas) y, aproximadamente, un 10 % de proteínas, además de ésteres fenólicos (Guerriero *et al.*, 2016).

En algunos tipos de células vegetales especializadas, una vez que finaliza el crecimiento o cuando comienza la especialización, se crea una nueva capa en la cara interna de la pared primaria: **la pared secundaria** (Revilla y Zarra, 2013). La pared secundaria tiene un grosor mayor que la primaria y está formada por una matriz de celulosa, hemicelulosas y lignina. Si bien la lignina es característica de las paredes secundarias, en algunos casos las células vegetales poseen paredes secundarias no lignificadas (Harris, 2006). La presencia de lignina se ha documentado también en la lámina media y en la pared primaria. La pared secundaria está implicada en funciones biológicas como proporcionar soporte mecánico, el transporte de agua y nutrientes, la dehiscencia de las

anteras y la defensa frente a patógenos. Uno de los principales reservorios de carbono del planeta, la madera, está constituida en su mayor parte por paredes secundarias, con una composición aproximada de un 50 % de celulosa, 25 % hemicelulosas y 25 % de lignina, si bien los valores exactos varían con la especie y tipo de madera (Martínez *et al.*, 2005; Guerriero *et al.*, 2016; Álvarez *et al.*, 2016).

## 1.4.2. Composición de la pared celular vegetal

Las diferentes capas de la pared celular vegetal están compuestas por una mezcla variable de polisacáridos, que constituyen alrededor del 90 % del peso seco de las paredes celulares primarias y el 65-85 % de las secundarias (Revilla y Zarra, 2013). La composición de las paredes se completa con otras moléculas, como polímeros polifenólicos (lignina), polímeros alifáticos, proteínas estructurales, enzimas, minerales, etc., en proporciones variables. Algunas partes especializadas de la planta presentan recubrimientos de la pared celular con sustancias como suberina, cutina o ceras (Barceló Coll *et al.*, 1987; Srivastava *et al.*, 2017). Los principales componentes de la pared celular vegetal se indican a continuación.

### ○ POLISACÁRIDOS

Los polisacáridos que constituyen la pared celular vegetal son biopolímeros construidos a partir de la unión de los doce monosacáridos que más frecuentemente se encuentran en dicha estructura:  $\beta$ -D-glucopiranososa (Glc, glucosa),  $\beta$ -D-galactopiranososa (Gal, galactosa),  $\beta$ -D-manopiranososa (Man, manosa);  $\alpha$ -D-galacturonopiranososa (GalU, ácido galacturónico),  $\beta$ -D-xilopiranososa (Xil, xilosa),  $\alpha$ -L-arabinofuranosa (Ara, arabinosa),  $\alpha$ -L-fucopiranososa (Fuc, fucosa),  $\alpha$ -L-ramnopiranososa (Rha, ramnosa),  $\beta$ -D-apiofuranosa (Api, apiosa),  $\beta$ -D-glucuronopiranososa (GlcU, ácido glucurónico), ácido  $\beta$ -L-acérico (AceA) y ácido cetodesoxioctulosónico (KDO) (Revilla y Zarra, 2013). Además de estos, se han descrito otros monosacáridos menos habituales como componentes de la pared celular (Wei *et al.*, 2009).

Los polisacáridos de la pared celular vegetal se han agrupado tradicionalmente en **celulosa, hemicelulosas y polisacáridos pécticos**.

La **celulosa** es un polímero lineal constituido a partir de la unión de monómeros de  $\beta$ -D-glucopiranososa, mediante enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glucosídicos. Aproximadamente, 30 moléculas



individuales de celulosa se unen mediante interacciones no covalentes para formar unidades mayores, conocidas como fibrillas elementales (protofibrillas). Las protofibrillas se compactan gracias a fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno, a través de grupos hidroxilo, dando lugar a microfibrillas insolubles cristalinas y, posteriormente, a fibras de celulosa. Además de regiones cristalinas, la celulosa incluye también regiones amorfas o paracristalinas (Guerriero *et al.*, 2016). El espacio entre microfibrillas está ocupado por hemicelulosas y pectinas, así como otras sustancias como lignina o suberina, que confieren estabilidad a la pared (Revilla y Zarra, 2013). La celulosa es el componente más abundante de la biomasa vegetal y se encuentra en la naturaleza casi exclusivamente en las paredes celulares de las plantas, aunque también puede ser producida por algunos animales (como los tunicados), por bacterias y por hongos (Lynd *et al.*, 2002; Kączkowski, 2003).

La categoría de las **hemicelulosas** conforma, junto con las pectinas, los denominados “polisacáridos de matriz” (Harris y Stone, 2008). La función principal de las hemicelulosas es reforzar las paredes celulares vegetales, mediante la unión y estabilización de las microfibrillas de celulosa (Scheller y Ulvskov, 2010). En general, las hemicelulosas presentan una cadena relativamente larga formada por moléculas de glucosa, xilosa o manosa unidas mediante enlaces glucosídicos  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), adornada con otros componentes, como monosacáridos (arabinosa, galactosa, fucosa y/o ácido glucurónico) y moléculas no glucídicas (metil ésteres, éteres, acetyl ésteres y feruloil ésteres) (Srivastava *et al.*, 2017). Sobre esta cadena lineal relativamente larga, pueden aparecer cadenas laterales cortas (Revilla y Zarra, 2013). Las hemicelulosas son un grupo heterogéneo, siendo los compuestos más importantes el xiloglucano, los xilanos (arabinoxilanos, glucuronoxilanos y glucuronoarabinoxilanos), mananos, glucomananos y  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 4)-glucanos. Algunos autores consideran dentro de este grupo otros compuestos, como galactanos, arabinanos, arabinogalactanos (relacionados con las pectinas) y la callosa (Scheller y Ulvskov, 2010). La presencia relativa de hemicelulosas en la pared celular vegetal varía entre especies y entre tipos de células (Tabla 1.2). El xiloglucano es el polímero hemicelulósico más abundante en dicotiledóneas, mientras que el xilano lo es en monocotiledóneas, donde supone hasta el 70 % del total (Dashtban *et al.*, 2009; Tousehik *et al.*, 2017).

**Tabla 1.2. Presencia de hemicelulosas en las paredes primaria y secundaria de plantas espermatófitas.** (Modificado de Scheller y Ulvskov, 2010).

Composición de polisacáridos en la pared (% p/p) <sup>a</sup>						
Polisacárido	Dicotiledóneas		Herbáceas		Coníferas	
	1 <sup>aria</sup>	2 <sup>aria</sup>	1 <sup>aria</sup>	2 <sup>aria</sup>	1 <sup>aria</sup>	2 <sup>aria</sup>
Xiloglucano	20-25	Minoritario	2-5	Minoritario	10	- <sup>b</sup>
Glucuronoxilano	-	20-30	-	-	-	-
Glucuronoarabinosilano	5	-	20-40	40-50	2	5-15
(Gluc)manano	3-5	2-5	2	0-5	-	-
Galactoglucomanano	-	0-3	-	-	+ <sup>b</sup>	10-30
β-(1→3,1→4)-glucano	Ausente	Ausente	2-15	Minoritario	Ausente	Ausente

<sup>a</sup> Los números corresponden a valores típicos, que pueden variar entre especies y tejidos.

<sup>b</sup> -: ausente o minoritario, +: presente, aunque no están disponibles datos cuantitativos.

Los **polisacáridos pécticos**, o **pectinas**, están constituidos por una mezcla de azúcares ácidos y neutros, formando cadenas altamente ramificadas, y son ricos en ácido galacturónico. Algunos cationes divalentes (Ca<sup>2+</sup>) forman complejos con los grupos carboxilo e hidroxilo de los residuos de ácido galacturónico (Barceló Coll *et al.*, 1987). Se caracterizan por ser altamente solubles en agua y capaces de formar geles, determinando la porosidad de la pared celular vegetal y modulando el pH y el balance iónico (Revilla y Zarra, 2013). En la parte exterior de la pared primaria se localiza la fracción soluble de las pectinas, que colabora en el mantenimiento de la correcta hidratación de la célula y facilita la cohesión entre las células de los tejidos. Existe también una fracción péctica insoluble, que refuerza la estructura de la pared y participa en la creación de carga eléctrica negativa (Kączkowski, 2003). Su capacidad gelificante tiene aplicaciones industriales. Las pectinas pueden dividirse en varios grupos: homogalacturonano, galacturonanos modificados (xilogalacturonano, apiogalacturonano), ramnogalacturonano I y ramnogalacturonano II (Caffall y Mohnen, 2009).

## ○ PROTEÍNAS

Las paredes celulares contienen diferentes proteínas, tanto estructurales como enzimáticas, llegando a constituir hasta el 10 % del peso seco de las paredes primarias. En general, se trata de glicoproteínas, con un grado de glicosilación variable.

Entre las **proteínas estructurales**, los cuatro grupos más importantes son: i) las proteínas ricas en glicina, ii) las proteínas ricas en prolina, iii) las proteínas-arabinogalactano (proteínas solubles con un alto grado de glicosilación) y iv) las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina, que es el aminoácido más abundante en las paredes celulares vegetales (Kączkowski, 2003). Entre estas últimas están las denominadas extensinas, que son las proteínas estructurales de la pared mejor caracterizadas y desempeñan funciones de control de la extensión celular, curación de heridas, ensamblado de la pared celular y resistencia a patógenos (Barceló Coll *et al.*, 1987; Srivastava *et al.*, 2017). La clasificación de las proteínas estructurales en base a su riqueza en aminoácidos puede ser más apropiada como clasificación de dominios, puesto que se han descrito proteínas en la pared celular vegetal con una mezcla de varios tipos (Cassab, 1998).

Además de proteínas estructurales, en la pared celular vegetal puede encontrarse todo un abanico de **enzimas**. Entre los tipos de enzimas más frecuentes están oxidorreductasas (peroxidasas, malato deshidrogenasa, NADH oxidasa, lacasa), hidrolasas (exoglucanasas, endoglucanasas, pectina-metil esterasa) y transglucosilasas (xiloglucano endotransglucosilasa). Se han detectado actividades enzimáticas capaces de actuar sobre prácticamente todos los componentes de la estructura de la pared vegetal; *in vivo*, esta actividad enzimática está sometida a una fuerte regulación (Revilla y Zarra, 2013). En la pared celular se encuentran, también, las denominadas  $\alpha$  y  $\beta$ -expansinas, pequeñas proteínas que inducen la extensión de la pared.

## ○ LIGNINA

La lignina es el segundo biopolímero más abundante del planeta, tras la celulosa. Se trata de un polímero polifenólico complejo formado a partir de la unión oxidativa de tres monolignoles: los alcoholes aromáticos *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico, unidos entre sí mediante enlaces éster o carbono-carbono. La lignina se entrelaza con microfibrillas de celulosa y con hemicelulosas (arabinoxilano) y pectinas (arabinogalactano), mediante enlaces éster, a través de los residuos hidroxicinámicos. Esto crea una red que rodea al resto de componentes y aporta fuerza, hidrofobicidad y rigidez a la pared secundaria. Es especialmente abundante en tejidos conductores (vasos xilemáticos) y de soporte (fibras) con engrosamiento secundario, donde supone un 20-30 % del peso seco de la pared (Bonawitz y Chapple, 2010; Revilla y Zarra, 2013).

El proceso de síntesis de la lignina, iniciado con una deshidrogenación enzimática seguida por una polimerización no controlada enzimáticamente, determina que la estructura de la lignina

sea variable y, hasta cierto punto, aleatoria, lo que explica su resistencia a la digestión enzimática. Esta cualidad permite que sirva como barrera física ante la colonización por parte de patógenos, pero también contribuye a la dificultad en los procesos de degradación industrial de las paredes celulares vegetales (Barceló Coll *et al.*, 1987; Srivastava *et al.*, 2017).

En general, los hongos y ciertos insectos se consideran los principales organismos ligninolíticos (Feofilova y Mysyakina, 2016). Los hongos basidiomicetos poseen la maquinaria enzimática más potente que se conoce para degradar la lignina, con enzimas como fenol oxidasas o lacasas y peroxidasas (lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa, peroxidasas versátiles).

#### ○ OTROS CONSTITUYENTES DE LA PARED CELULAR VEGETAL

Además de los componentes anteriormente mencionados, en la pared celular de las plantas existen otros constituyentes minoritarios, como es el caso de las **sustancias de recubrimiento de la pared** (ceras, cutina y suberina). Las ceras constituyen una mezcla de ésteres de ácidos alifáticos, alcoholes y cetonas. La cutina y suberina están formadas por ácidos grasos de cadena larga y ambas son muy resistentes al ataque enzimático. Todas ellas realizan la función de crear una cubierta hidrófoba protectora frente a la deshidratación, el daño mecánico y los patógenos.

Aparecen también **sustancias minerales**, como la sílice (en paredes de gramíneas y equisetos) o carbonato cálcico y otras moléculas como los **taninos**. Los taninos pueden ser hidrolizables, liberando glucosa y ácidos fenólicos (como el ácido gálico), o no hidrolizables, formados por flavanos. Están relacionados con funciones de defensa frente a virus, hongos o insectos (Barceló Coll *et al.*, 1987).

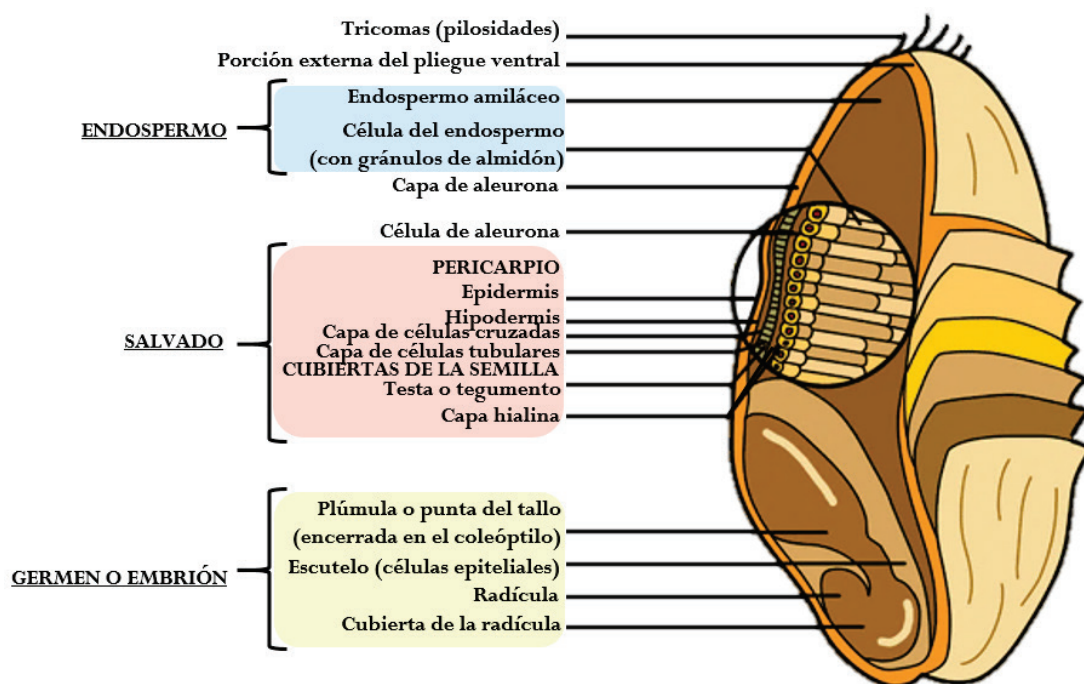
Otro de los componentes minoritarios de la pared celular vegetal son los **AHC**, que están unidos de forma covalente a hemicelulosas y polisacáridos pécticos, como los arabinoxilanos de las gramíneas (trigo, maíz, cebada) o a las pectinas de las dicotiledóneas (espinacas, pulpa de remolacha). Los AHC más frecuentes son el ácido ferúlico, sinápico, cafeico y *p*-cumárico, que tienen un papel importante en la integridad de la pared, mantenimiento de su forma y la defensa frente a la infección por parte de patógenos, tanto en la célula vegetal en crecimiento como una vez madura (Faulds y Williamson, 1999). La estructura, importancia y aplicaciones de los AHC se detallan en el apartado 1.5.

### 1.4.3. Características de los sustratos vegetales empleados

En el presente trabajo de Tesis Doctoral, se han empleado cuatro sustratos lignocelulósicos: fibra de avena de molienda, pulpa de remolacha molida y semillas de trigo y maíz molidas. Como se ha indicado previamente, la composición de la pared vegetal celular varía con la especie y otras características, como el tipo de tejido o el estado de crecimiento, lo que determina que estos sustratos presenten particularidades propias.

#### ○ Avena, maíz y trigo

La avena (*Avena sativa* L.), el maíz (*Zea mays* L.) y el trigo (*Triticum aestivum* L.) son plantas monocotiledóneas pertenecientes a la familia Poaceae, habitualmente conocidas como gramíneas o poáceas. Dentro de los granos de cereal o cariósides, característicos de estas plantas, existen tejidos con composición química diversa (Fig. 1.5).



**Fig. 1.5. Representación esquemática de un grano o cariósido de cereal.** Se indican las partes más representativas. (Modificado de Phu Thinh Co, 2012. Disponible en la dirección <https://www.flickr.com/photos/phuthinhco/7591964306/> bajo una licencia *Creative Commons BY-SA 2.0*).

En los tejidos que rodean al germen y el endospermo del grano, las paredes celulares son ricas en celulosa y, en muchos casos, están fuertemente lignificadas. Esto contrasta con las paredes

celulares del endospermo, con un bajo contenido en celulosa y no lignificadas. Los bajos niveles de celulosa y lignina en el endospermo se deben a que este tejido no realiza la función de soporte estructural y, además, un contenido alto en estos polímeros de difícil hidrólisis no permitiría una degradación rápida, que es necesaria cuando el grano germina (Burton y Fincher, 2014).

Las paredes celulares de las poáceas son marcadamente diferentes de las de otras monocotiledóneas y de las de las dicotiledóneas. En dicotiledóneas y monocotiledóneas no comelínidas, los polisacáridos no celulósicos más abundantes en las paredes primarias son xiloglucanos, polisacáridos pécticos y, en menor medida, heteroxilanos y heteromananos (Burton y Fincher, 2012). Sin embargo, en todos los tejidos de las monocotiledóneas, los heteroxilanos son los polisacáridos no celulósicos principales (un 40 %, aproximadamente, en el salvado de maíz). En ocasiones, la arabinofuranosa se encuentra unida al ácido ferúlico mediante un enlace de tipo éster en posición O-5. El ácido ferúlico supone, aproximadamente, el 0,66 % (p/p) del salvado de trigo y el 3,1 % (p/p) del salvado de maíz (Mathew y Abraham, 2006). El salvado de maíz contiene gran cantidad de dímeros del ácido ferúlico, productos del acoplamiento oxidativo del ácido ferúlico, lo que estabiliza la pared celular vegetal y limita su degradación enzimática (Bonnin *et al.*, 2002; Benoit *et al.*, 2006b; Muralikrishna y Subba Rao, 2007; Boz, 2016). Las poáceas presentan también  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 4)-glucanos, con un contenido importante en la avena, en menor medida en el trigo y prácticamente inexistente en el maíz (Burton y Fincher, 2012).

Los cereales tienen aplicaciones de forma directa en alimentación humana y animal y, además, a partir de ellos es posible extraer moléculas bioactivas como  $\beta$ -glucano, compuestos fenólicos, tocoles, fitoesteroles, proteínas y péptidos bioactivos (Gangopadhyay *et al.*, 2015).

### ○ **Pulpa de remolacha**

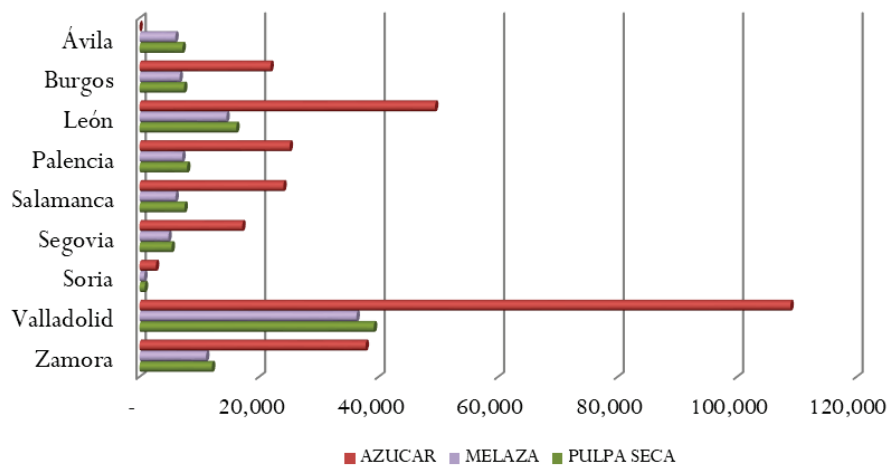
La remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *altissima*) es una especie dicotiledónea de ciclo bianual, perteneciente al orden Caryophyllales, familia Amaranthaceae, cuyo genoma ha sido secuenciado recientemente (Dohm *et al.*, 2014). El interés industrial principal de esta especie radica en su alto contenido en sacarosa, que se ha incrementado de un 8 % a un 18 %, gracias al proceso de selección desarrollado durante los últimos 200 años.

La remolacha azucarera es un cultivo importante en los climas templados y supone cerca del 16-30 % de la producción anual de azúcar en el mundo, además de constituir un recurso para producción de biocombustibles y en alimentación animal. Según datos de la Oficina Europea de

Estadística (Eurostat), la Unión Europea es el primer productor de remolacha azucarera (48,5 % de la producción mundial en 2014), con cerca de 102 millones de toneladas cosechadas a partir de 1,4 millones de hectáreas en 2015, siendo Alemania y Francia los principales productores. Dentro de la Unión Europea, España es el octavo productor (Ministerio de Agricultura y Pesca Alimentación y Medio Ambiente, 2014), con una producción distribuida entre la zona norte (Castilla y León, País Vasco, La Rioja y Navarra, con siembra en primavera y recogida en otoño) y la zona sur (Andalucía, con siembra en otoño y recogida en primavera).

El territorio español que mayor cantidad de remolacha azucarera produce es Castilla y León, con un 67,6 % de la producción estatal, en 2016 (Ministerio de Agricultura y Pesca Alimentación y Medio Ambiente, 2017). En Castilla y León, las provincias con mayor producción de remolacha azucarera son Valladolid y León, con 726.328 y 329.733 toneladas totales, respectivamente, en el año 2016 (Consejería de Agricultura y Ganadería, 2018). Los principales productos derivados de la remolacha azucarera son el azúcar, la melaza y la pulpa de remolacha (Fig. 1.6).

**Distribución provincial de la producción de la remolacha azucarera (t)**



**Fig. 1.6. Distribución provincial de la producción de remolacha azucarera en Castilla y León.** Se indica el destino de la producción de remolacha azucarera. Datos del Anuario de Estadística Agraria de Castilla y León 2016. (Consejería de Agricultura y Ganadería, 2018).

El sustrato en concreto empleado en el presente trabajo fue la pulpa de remolacha, que constituye un subproducto de la industria azucarera. Tras la cosecha, la remolacha azucarera se lava para eliminar materiales no deseados y se corta en pequeñas tiras, denominadas cosetas. Las cosetas son láminas de escaso grosor, lo que aumenta la superficie de contacto y permite mejores rendimientos de extracción. Las cosetas se mezclan con agua caliente (72 °C) y el azúcar se extrae mediante difusión, pasando a formar parte de una solución que se emplea en el proceso de

producción de sacarosa. Tras la extracción del jugo concentrado de sacarosa, las cosetas conforman la pulpa húmeda. La pulpa de remolacha puede emplearse como pulpa húmeda, o tras su prensado y secado para reducir el contenido en agua, en forma de pulpa seca (Draycott, 2006). La pulpa seca presenta la ventaja de ser menos susceptible a la degradación, con lo que se prolonga su vida útil y puede almacenarse durante más tiempo. Castilla y León es el principal productor de pulpa de remolacha en España, con un 72 % del total estatal, en 2016 (Ministerio de Agricultura y Pesca Alimentación y Medio Ambiente, 2017).

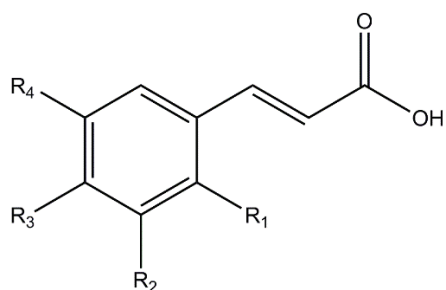
En cuanto a su composición química, la pulpa de remolacha seca contiene un 75 % (p/p) de polisacáridos (Kühnel *et al.*, 2011). Es rica en celulosa [20-30 % (p/p)], aunque el polisacárido más importante son las pectinas [15-30 % (p/p)]: el ácido galacturónico, ramnosa, arabinosa, galactosa y, también, metanol y ácido acético, suponen aproximadamente el 50 % (p/p) de la pulpa (Micard *et al.*, 1996). Los polisacáridos pécticos de la pulpa de remolacha son diferentes de los típicos de las frutas. Se han identificado diferencias entre las pectinas de pulpa de remolacha y las de manzana y cítricos, principalmente la presencia de grupos acetilo unidos al ácido galacturónico y el contenido en ramnosa y ácido ferúlico (Hutnan *et al.*, 2000). La pulpa de remolacha es rica en ácidos fenólicos [0,64-1 % (p/p)], sobre todo el ácido ferúlico (Micard *et al.*, 1996; Saulnier y Thibault, 1999; Benoit *et al.*, 2006b). El ácido ferúlico está esterificado en la posición O-2 de los residuos de la arabinofuranosa (50-60 %) y la posición O-6 de la galactopiranososa (40-50 %) (Bonnin *et al.*, 2002; Mathew y Abraham, 2004; Benoit *et al.*, 2006b). El bajo contenido en lignina [3-4 % (p/p)] facilita su digestibilidad, por lo que la pulpa de remolacha se ha empleado tradicionalmente en alimentación animal (Hutnan *et al.*, 2000). La pulpa de remolacha tiene también aplicaciones en la industria de biocombustibles, biogás y como fuente de sustancias de valor añadido, como la vainillina (sintetizable empleando como precursor el ácido ferúlico) o la betaína (un metil derivado de la glicina con aplicaciones en medicina y suplementación alimentaria, si bien se encuentra sobre todo en otras fracciones de la remolacha, como las melazas) (Cholewa *et al.*, 2014).



## 1.5. El ácido ferúlico y otros ácidos hidroxicinámicos

Los AHC son uno de los grupos de compuestos fenólicos con mayor presencia en la naturaleza. En este grupo se encuadran sustancias como los ácidos cinámico, *o*-cumárico, *p*-cumárico, *m*-cumárico, cafeico, sinápico y ferúlico (Fig. 1.7).

Su síntesis tiene lugar mediante la misma red metabólica que origina compuestos como ligninas, cumarinas, antocianinas o flavonoides (El-Seedi *et al.*, 2012). Los AHC se producen a partir de la L-fenilalanina y la L-tirosina, mediante la ruta del shikimato. Inicialmente, la Phe y la Tyr se transforman en ácido cinámico y *p*-cumárico, con la participación de las enzimas fenilalanina amonio liasa y tirosina amonio liasa, respectivamente. El ácido *p*-cumárico se convierte en ferúlico mediante reacciones de hidroxilación y metilación. La oxidación y metilación del ácido ferúlico y otros compuestos aromáticos dan lugar a derivados dihidroxi y trihidroxi del ácido cinámico, que intervienen en la formación de la lignina, junto con el ferúlico (Kumar y Pruthi, 2014).



**Ác. cinámico:**  $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$   
**Ác. *o*-cumárico:**  $R_1 = OH$   
**Ác. *m*-cumárico:**  $R_2 = OH$   
**Ác. *p*-cumárico:**  $R_3 = OH$   
**Ác. cafeico:**  $R_2 = R_3 = OH$   
**Ác. ferúlico:**  $R_2 = OCH_3; R_3 = OH$   
**Ác. sinápico:**  $R_2 = R_4 = OCH_3; R_3 = OH$

**Fig. 1.7.**  
**Estructura química de los AHC más comunes.**  
 (Modificado de El-Seedi *et al.*, 2012).

Los AHC están formados por un esqueleto de carbono  $C_6-C_3$  y un enlace doble en la cadena lateral, que puede presentar una configuración *cis* (*Z*) o *trans* (*E*), siendo esta última la más frecuente en la naturaleza (Faulds y Williamson, 1999; Wong, 2006; Teixeira *et al.*, 2013; Taofiq *et al.*, 2017). Pueden aparecer en forma soluble libre, o bien esterificados o eterificados con otras moléculas, como flavonoides, esteroides, hidroxiácidos o carbohidratos. Además de los AHC, también son importantes algunos de sus derivados, como el ácido clorogénico, que se forma mediante condensación entre el ácido cafeico y el ácido quínico, siendo abundante en frutas, vegetales, la planta de tabaco y el café (El-Seedi *et al.*, 2012).

Los AHC están presentes en la mayoría de especies vegetales de uso alimentario, incluyendo las que se emplean en la fabricación de bebidas, como frutas, verduras, cereales, té, café, sidra o vino tinto. En los últimos años, los AHC han sido objeto de interés creciente, dado que se trata de unas de las sustancias antioxidantes más abundantes en la dieta y poseen numerosas aplicaciones en campos como la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria (El-Seedi *et al.*, 2012).

Uno de los AHC más abundantes es el ácido ferúlico, que está ampliamente distribuido en especies del reino vegetal y sus derivados (Fazary y Ju, 2007). Dadas sus múltiples aplicaciones y el interés suscitado por este compuesto, el ácido ferúlico es el principal AHC al que se hace referencia en la presente revisión bibliográfica.

### **1.5.1. El ácido ferúlico en la pared vegetal: presencia y función biológica**

Los AHC son ubicuos en las plantas vasculares (El-Seedi *et al.*, 2012). Los ácidos cafeico y cumárico son los AHC con mayor presencia en la mayoría de frutas. Por su parte, el ácido ferúlico es el AHC más abundante en la naturaleza. Se ha identificado en plantas comelínidas, especias, hierbas, verduras, frutas, flores, hojas, vainas, semillas de café y frutos secos. El contenido es especialmente alto en las paredes vegetales de los granos de cereales y algunas dicotiledóneas, como la remolacha azucarera. En estas especies, existe un 0,5-2 % (p/p) de ácido ferúlico extraíble (Kumar *et al.*, 2014).

El ácido ferúlico puede encontrarse en forma libre, formar parte de complejos o bien estar covalentemente unido a polímeros de la pared celular vegetal (sobre todo polisacáridos de matriz y componentes de la lignina) (Gopalan *et al.*, 2015). Está distribuido a lo largo de las paredes celulares primarias y secundarias de las plantas y es particularmente abundante en la epidermis, los vasos del xilema, los vasos leñosos y el esclerénquima (Faulds y Williamson, 1999).

El ácido ferúlico se considera uno de los componentes estructurales esenciales de la familia Poaceae, que forma parte de las **monocotiledóneas** comelínidas e incluye especies de gran interés económico, como el trigo, el arroz, la avena, la cebada, el maíz, el sorgo y la caña de azúcar. El ácido ferúlico se une a los polisacáridos de la pared vegetal mediante enlace éster entre su grupo carboxilo y el grupo hidroxilo en posición O-5 de los residuos  $\alpha$ -L-arabinofuranosil del

glucuronoarabinosilano. También puede unirse, como en el caso del bambú, en la posición O-4 de los residuos  $\alpha$ -D-xilopiranosil de los xiloglucanos (Faulds y Williamson, 1999).

Dentro de las **eudicotiledóneas**, el ácido ferúlico es especialmente abundante en el orden Caryophyllales, que incluye especies como la remolacha azucarera y la espinaca. En este grupo, el ácido ferúlico se une preferentemente a las pectinas en los grupos hidroxilo en posición O-2 y O-5 de los residuos  $\alpha$ -L-arabinofuranosil del arabinano, así como en el grupo hidroxilo O-6 de los residuos  $\beta$ -D-galactopiranosil del (arabino)galactano (Dilokpimol *et al.*, 2016).

El contenido en ácido ferúlico y otros AHC en las paredes vegetales es variable, existiendo diferencias entre especies, así como entre las distintas partes de cada planta en concreto. Algunas de las especies vegetales y subproductos de las mismas con más relevancia desde el punto de vista de la industria se recogen en la Tabla 1.3.

**Tabla 1.3. Contenido en AHC en diferentes tipos de biomasa vegetal.** (Modificado de Gopalan *et al.*, 2015).

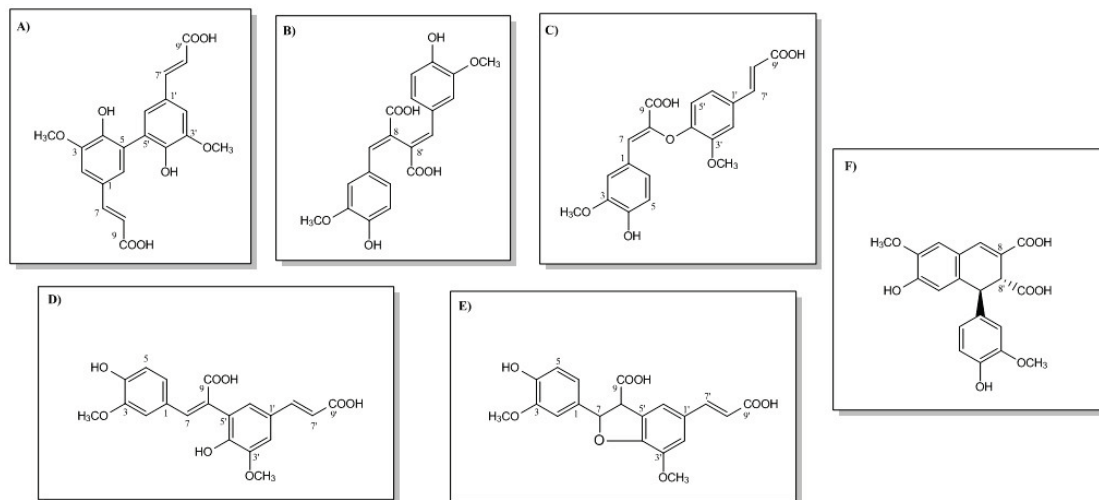
Biomasa	Contenido en AHC [% (p/p)]	Referencia
Salvado de maíz	Ácido ferúlico: 2,9-3,22 Ácido <i>p</i> -cumárico: 0,31	Benoit <i>et al.</i> , 2006; Mathew y Abraham, 2004; Saulnier y Thibault, 1999
Fibra de maíz	Ácido ferúlico: 1,84	Mathew y Abraham, 2004
Pulpa de remolacha	Ácido ferúlico: 0,5-1,1	Benoit <i>et al.</i> , 2006b; Kühnel <i>et al.</i> , 2011; López Alonso <i>et al.</i> , 2011; Mathew y Abraham, 2006; Micard <i>et al.</i> , 1996; Ralet <i>et al.</i> , 1994
Paredes celulares endospermo del arroz	Ácido ferúlico: 0,91	Shibuya, 1984
Salvado de trigo	Ácido ferúlico: 0,4-0,66	Smith y Hartley, 1983; Xie <i>et al.</i> , 2010
Cáscara de avena	Ácido ferúlico: 0,21-0,38 Ácido <i>p</i> -cumárico: 0,52	Yu <i>et al.</i> , 2002; Yu <i>et al.</i> , 2003
Maíz para palomitas	Ácido ferúlico: 0,31	Zhao y Moghadasian, 2008
Brotos de bambú	Ácido ferúlico: 0,24	Zhao y Moghadasian, 2008
Salvado de triticale	Ácido ferúlico: 0,23	Wu <i>et al.</i> , 2012
Gimnospermas	Ácido ferúlico: 0,01-0,16	Carnachan y Harris, 2000
Paja de trigo explotada por vapor	Ácido ferúlico: 0,14 Ácido <i>p</i> -cumárico: 0,21	Benoit <i>et al.</i> , 2006
Granos de cebada	Ácido ferúlico: 0,14	Nordkvist <i>et al.</i> , 1984

**Tabla 1.3 (continuación)**

Biomasa	Contenido en AHC [% (p/p)]	Referencia
Salvado de avena	Ácido ferúlico: 0,033	Mattila et al., 2005
Pulpa de café	Ácido ferúlico: 0,024	Benoit et al., 2006
	Ácido cafeico: 0,27	
	Ácido <i>p</i> -cumárico: 0,008	
Residuo sólido del prensado de la manzana	Ácido ferúlico: 0,018	Benoit et al., 2006
	Ácido cafeico: 0,033	
	Ácido <i>p</i> -cumárico: 0,027	

*El contenido en AHC puede variar según factores diversos, como la variedad de la planta, el estado de crecimiento, etc.*

Una proporción considerable del ácido ferúlico total presente en las paredes celulares vegetales puede dar lugar a estructuras diméricas, como dehidrodímeros y ciclodímeros. Estos dímeros se forman mediante una unión oxidativa catalizada por peroxidasas, a través del anillo aromático del ácido ferúlico o de su grupo alifático lateral (Wong, 2006). Los dímeros pueden producirse también a través de reacciones de cicloadición favorecidas por la radiación ultravioleta (UV), que son más frecuentes en el caso del ácido *p*-cumárico (Saulnier y Thibault, 1999; Faulds y Williamson, 1999). Los dímeros están implicados en las interacciones polisacárido-polisacárido y polisacárido-lignina de la pared celular vegetal, puesto que se unen mediante enlaces cruzados con xilanos, pectinas y lignina. Los dímeros más frecuentes son 5,5'-, 8-O-4'-, 8,5'- y 8,8'-diferulato (Fig. 1.8). Se han detectado principalmente en zonas del arabinoxilano ricas en sustituyentes laterales de arabinosa, ya que la dimerización requiere que las moléculas de ácido ferúlico estén próximas (Dilokpimol *et al.*, 2016). En el maíz, el contenido en diferulatos se sitúa en torno a un 2,5 % (p/p de la pared celular) y en la pulpa de remolacha en torno al 0,14 % (p/p) (Saulnier y Thibault, 1999). Existen estudios que sugieren que el acoplamiento oxidativo de unidades de ácido ferúlico no se detiene en la formación de dímeros, sino que también pueden formarse estructuras mayores, como trímeros o tetrámeros de ácido ferúlico (Wong, 2006; Fazary y Ju, 2007).



**Fig. 1.8. Estructura química de los diferulatos más frecuentes.** A) Ácido 5,5'-diferúlico. B) Ácido 8,8'-diferúlico. C) Ácido 8-O-4'-diferúlico. D) Ácido 8,5'-diferúlico. E) Ácido 8,5'-(benzofurano)-diferúlico. F) Ácido 8,8'-(aril)-diferúlico. (Modificado de Dilokpimol et al., 2016; Wong, 2006).

Las funciones biológicas de los AHC en las plantas derivan de su capacidad para reforzar la estructura de la pared celular vegetal, mediante uniones con los polisacáridos de matriz y la lignina. Estas uniones determinan que los AHC aporten rigidez a la pared, limitando el crecimiento de las células y determinando su forma. La estabilización de los biopolímeros de la pared celular vegetal sirve también como mecanismo de defensa frente a patógenos microbianos, puesto que dificulta el proceso de degradación. Algunos compuestos fenólicos como el ácido ferúlico afectan a los procesos fermentativos del rumen, por lo que su presencia determina una menor digestibilidad de la planta, que puede funcionar también como mecanismo de protección (Mathew y Abraham, 2004). Se ha sugerido que las uniones entre el ácido ferúlico y los polisacáridos de la pared celular vegetal pueden actuar como lugar de nucleación durante la formación de la lignina (Benoit *et al.*, 2008). Las uniones entre los AHC y otros componentes de las paredes modifican las propiedades mecánicas de las mismas, así como otras propiedades, como la estabilidad térmica de las adhesiones célula-célula, lo que tiene importancia en industrias basadas en el procesamiento de biomasa lignocelulósica (Faulds y Williamson, 1999).

### 1.5.2. Métodos de recuperación de AHC

Los AHC presentan numerosas aplicaciones, que se detallan en el apartado 1.5.3. Sin embargo, para su aprovechamiento es necesaria su extracción de fuentes naturales, o bien su síntesis a partir de otras moléculas.

Existen tres mecanismos de extracción de ácido ferúlico a partir de productos naturales: i) a partir de conjugados de ácido ferúlico de bajo peso molecular, ii) a partir de las paredes celulares vegetales y iii) a partir de cultivos de tejidos o fermentación microbiana. En la actualidad, la mayor parte del ácido ferúlico comercial se obtiene a partir del  $\gamma$ -orizanol del aceite de salvado de arroz, a pesar de que su contenido en ácido ferúlico es menor que en las paredes celulares (Fazary y Ju, 2007). El  $\gamma$ -orizanol constituye una mezcla de ácido ferúlico, ésteres y fitoesteres (esteres y alcoholes triterpénicos), con usos médicos como hipolipemiente, antiinflamatorio, anticancerígeno o antidiabético (Minatel *et al.*, 2016). El empleo del  $\gamma$ -orizanol como fuente para la extracción del ácido ferúlico está más extendido que su obtención a nivel industrial a partir de paredes celulares vegetales, debido a la dificultad de degradación de estas estructuras.

La obtención de ácido ferúlico y otros AHC a partir de las paredes celulares vegetales necesita de la ruptura de los enlaces que unen estas moléculas con hemicelulosas, pectinas y lignina. Esta ruptura puede conseguirse mediante métodos químicos (hidrólisis ácida y alcalina) o enzimáticos. Los **métodos químicos** se basan en la exposición de las paredes celulares vegetales a valores extremos de pH, lo que produce la ruptura de ciertos enlaces. La hidrólisis ácida rompe enlaces glucosídicos y solubiliza los azúcares, generalmente sin afectar a los enlaces éster. Por su parte, la hidrólisis alcalina produce la ruptura de los enlaces éster que unen los AHC a las paredes celulares vegetales. La hidrólisis alcalina a altas temperaturas se ha empleado como el método clásico para extraer la totalidad del ácido ferúlico de las paredes vegetales de salvado de cereal. Sin embargo, la purificación de este AHC a partir del producto de la hidrólisis alcalina no es sencilla (Fazary y Ju, 2007). El ácido ferúlico es soluble en agua caliente, etil acetato, etanol y etil éter, habiéndose observado que el etanol es capaz de extraer el ácido ferúlico (Kumar y Pruthi, 2014). Además de estos tratamientos químicos, en algunas industrias, como la de biocombustibles, es habitual el empleo de otros **pretratamientos físico-químicos**. Entre estos pretratamientos se encuentran el pretratamiento hidrotermal y la explosión por vapor, o el pretratamiento basado en agentes oxidantes (Talebnia *et al.*, 2010).

Los tratamientos físico-químicos presentan la desventaja de emplear mayor cantidad de energía, ser contaminantes, requerir el empleo de altas concentraciones de ácidos y bases y modificar algunos componentes de la pared celular vegetal (Mathew y Abraham, 2004).

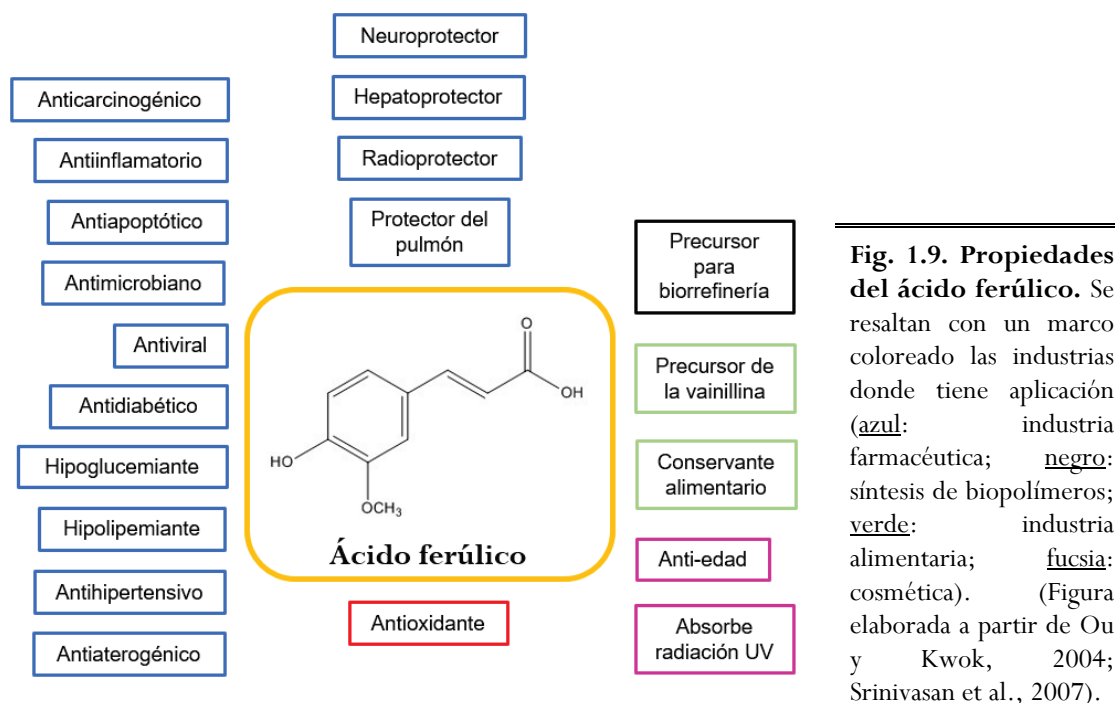
Los inconvenientes de los métodos físico-químicos han dado lugar a un incremento del interés por los **métodos enzimáticos**. Estos métodos presentan la ventaja de ser menos contaminantes y más específicos, de modo que permiten liberar AHC sin dañar otras moléculas con aplicabilidad presentes en la pared, como el furfural (Gopalan *et al.*, 2015). El furfural, que se ve afectado durante la hidrólisis alcalina, es un compuesto que puede emplearse en la fabricación de biocombustibles y como precursor para la producción de compuestos de valor añadido, como resinas, fragancias, solventes o ácidos orgánicos (Mariscal *et al.*, 2016). Los métodos enzimáticos, además, gozan de mayor aceptabilidad por parte de los consumidores, puesto que los AHC así obtenidos se pueden considerar y comercializar como “naturales” (Kumar y Pruthi, 2014). Para la extracción enzimática de ácido ferúlico es necesario el empleo de un abanico de enzimas que, como se ha expuesto previamente, actúan de forma sinérgica. Las FAEs son uno de los grupos enzimáticos con más importancia en este proceso. Los métodos actuales para la extracción enzimática de ácido ferúlico no son económicamente competitivos, por lo que es necesario incrementar la investigación y desarrollo encaminados a encontrar enzimas que den como resultado procesos más eficientes.

Además de su obtención mediante hidrólisis de las paredes celulares vegetales, el ácido ferúlico puede obtenerse mediante **síntesis química**, a través de una reacción de condensación de la vainillina con el ácido malónico, catalizada por la piperidina. Sin embargo, este método produce una mezcla de isómeros *cis* y *trans* de ácido ferúlico. El rendimiento es alto, pero se trata de una reacción larga, de hasta tres semanas (Fazary y Ju, 2007). Da y Xu publicaron un estudio en el que mejoraron el método, empleando benzilamina como catalizador y metilbenceno como solvente. A pesar de conseguir reducir el tiempo de reacción a 2 h, esta modificación requirió el empleo de solventes peligrosos y altas temperaturas (85-95 °C) y no se han publicado más estudios al respecto (Ou y Kwok, 2004).

### **1.5.3. Propiedades y aplicaciones del ácido ferúlico**

Las propiedades del ácido ferúlico llamaron la atención por primera vez cuando un grupo de investigadores japoneses descubrió la capacidad antioxidante de compuestos que contienen ferulatos extraídos del aceite de salvado de arroz, como el  $\gamma$ -orizanol (Kumar y Pruthi, 2014). A lo largo de los últimos años, se han publicado varios estudios acerca de las funciones fisiológicas

del ácido ferúlico en humanos, así como sus aplicaciones en otros campos, como la industria alimentaria o cosmética (Ou y Kwok, 2004) (Fig. 1.9).



**Fig. 1.9. Propiedades del ácido ferúlico.** Se resaltan con un marco coloreado las industrias donde tiene aplicación (azul: industria farmacéutica; negro: síntesis de biopolímeros; verde: industria alimentaria; fucsia: cosmética). (Figura elaborada a partir de Ou y Kwok, 2004; Srinivasan et al., 2007).

La gran mayoría de las aplicaciones del ácido ferúlico derivan de su capacidad **antioxidante**. El potencial antioxidante de este AHC se atribuye a sus características estructurales, con su núcleo fenólico y cadena lateral insaturada. Los radicales reactivos que entran en contacto con el ácido ferúlico toman de él un hidrógeno y dan lugar a un radical fenoxi. Este radical está estabilizado mediante resonancia, dado que el electrón desapareado puede encontrarse no sólo sobre el átomo de oxígeno, sino a lo largo de toda la molécula. La estabilización del radical fenoxi es aún mayor gracias a la conjugación de la cadena lateral insaturada. Los radicales fenoxi estabilizados no pueden iniciar o propagar una reacción en cadena de radicales libres y su destino habitual es colisionar y conjugarse con otro radical ferulato, originando el dímero curcumina (Srinivasan *et al.*, 2007). El ácido ferúlico ha demostrado gran capacidad para capturar radicales libres de peróxido de hidrógeno, superóxido, hidroxilo y dióxido de nitrógeno (Ou y Kwok, 2004).

### APLICACIONES EN MEDICINA E INDUSTRIA FARMACÉUTICA

El estrés oxidativo afecta a muchos organismos, incluido el ser humano, donde el ataque de los radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) está relacionado con el envejecimiento y la aparición de enfermedades (cáncer, aterosclerosis,



diabetes, enfermedades degenerativas, hepatopatías y enfermedades renales). Las sustancias antioxidantes, como el ácido ferúlico, ayudan a combatir las ROS y los daños que producen (Ou y Kwok, 2004). Pese a los prometedores ensayos realizados en modelos animales y líneas celulares, aún es necesario llevar a cabo un mayor número de pruebas clínicas que indiquen el potencial de los AHC y las dosis apropiadas para su empleo en medicina (El-Seedi *et al.*, 2012).

Investigaciones en modelos animales indican que el ácido ferúlico se absorbe en estómago, yeyuno, íleon y colon (Zhao y Moghadasian, 2008). La absorción es relativamente rápida y su biodisponibilidad es mayor que la de otros compuestos fenólicos como los flavonoides, si bien tanto absorción como biodisponibilidad dependen de la complejidad de las uniones del ácido ferúlico a los biopolímeros vegetales. El ácido ferúlico se mantiene en sangre durante más tiempo que otros antioxidantes, como la vitamina C (Srinivasan *et al.*, 2007). Aunque el mecanismo de absorción es aún objeto de estudio, se ha descrito la implicación de transportadores de ácidos monocarboxílicos de las células del epitelio intestinal, así como del mecanismo de difusión pasiva y de transportadores dependientes de Na<sup>+</sup> mediados por proteínas (Alam *et al.*, 2016).

Algunos de los usos terapéuticos del ácido ferúlico se recogen a continuación.

○ **Agente contra la diabetes.** La diabetes mellitus es una de las enfermedades endocrinas más extendidas en el ser humano, caracterizada por hiperglucemia, sobreproducción de ROS y estrés oxidativo (Srinivasan *et al.*, 2007). El ácido ferúlico contribuye a neutralizar ROS presentes en el páncreas. La reducción del estrés oxidativo puede ayudar a las células  $\beta$  del páncreas a proliferar y producir insulina, lo que regula los altos niveles de glucosa en sangre. Algunos estudios indican la capacidad del ácido ferúlico para actuar como estimulante de la secreción de insulina en una línea celular tumoral de páncreas de rata (Kumar y Pruthi, 2014).

○ **Agente hipolipemiante y frente a enfermedades cardiovasculares.** El ácido ferúlico y otros AHC y sus derivados, como los ácidos cafeico, *p*-cumárico o clorogénico, disminuyen los niveles de triglicéridos, colesterol total y lipoproteínas de baja densidad (LDL) en ratas Wistar hipertensas, aumentando los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en ratas Wistar normales (El-Seedi *et al.*, 2012). También se ha descrito que el ácido ferúlico reduce la tensión arterial en ratas hipertensas. Al reducir el índice aterogénico (relación entre los niveles de colesterol total y las HDL, que transportan el colesterol para su metabolización), presenta propiedades antiaterogénicas. Algunos estudios vinculan el ácido ferúlico a un menor riesgo de

infarto de miocardio (relacionado con el aumento del estrés oxidativo en el corazón), así como una disminución del riesgo de trombosis (Kayahara *et al.*, 1999; Srinivasan *et al.*, 2007).

○ **Prevención y tratamiento del cáncer.** Uno de los mayores agentes carcinogénicos son las ROS, generadas exógena o endógenamente, y los radicales electrofílicos que se producen como consecuencia de procesos oxidativos ambientales y de los propios organismos. La aparición de tumores se relaciona con niveles aumentados de estas ROS, por lo que el ácido ferúlico, mediante su capacidad antioxidante, puede actuar en la prevención del cáncer (El-Seedi *et al.*, 2012). Además, el ácido ferúlico estimula las enzimas detoxificantes hepáticas (Kumar y Pruthi, 2014). Los AHC inducen los procesos de apoptosis de células cancerígenas y causan la inhibición del crecimiento de tumores. Se ha descrito que el ácido ferúlico tiene efectos anticarcinogénicos en distintos tipos de tumores, como cáncer oral, de hígado, de colon, piel, pulmón y líneas celulares de cáncer de mama (Ou y Kwok, 2004).

○ **Protección frente a los efectos secundarios de quimioterapia y radioterapia.** Algunos de los efectos secundarios de la quimioterapia frente al cáncer, como náuseas o molestias abdominales, pueden paliarse con el empleo de fármacos como la metoclopramida y agentes antioxidantes, como el ácido ferúlico. Este último es capaz de mejorar el retraso en el vaciado gástrico asociado a algunos fármacos anticancerígenos (El-Seedi *et al.*, 2012). La radioterapia es un tipo de tratamiento frente al cáncer que emplea radiación ionizante para destruir células cancerígenas y disminuir el tamaño de tumores. Sin embargo, esta radiación afecta también a las células sanas y al sistema inmunitario del paciente. El daño oxidativo inducido por la radiación puede dar lugar a aberraciones cromosómicas, oxidación lipídica, peroxidación y alteraciones en los antioxidantes endógenos. La capacidad antioxidante del ácido ferúlico puede actuar contra este estrés oxidativo. Además, el ácido ferúlico modula enzimas que participan en reacciones de biotransformación de fase II, como la glutatión S-transferasa. El ácido ferúlico potencia, además, otros mecanismos antioxidantes intrínsecos, como las actividades superóxido dismutasa, catalasa y glutatión reductasa (Srinivasan *et al.*, 2007).

○ **Efecto antiinflamatorio.** La inflamación crónica y aguda son procesos complejos, regulados por sustancias como citoquinas proinflamatorias y otros mediadores (ROS, óxido nítrico, prostaglandinas, etc.). El ácido ferúlico disminuye los niveles de algunos mediadores de la inflamación, como interleucinas (IL-8), prostaglandina E2 y factor de necrosis tumoral  $\alpha$ .

Además, derivados del ácido ferúlico, como ciertos ésteres hidrofóbicos, reducen la expresión de enzimas implicadas en la cascada de la inflamación, como la óxido nítrico sintasa inducible y la ciclooxigenasa 2 (Ou y Kwok, 2004; Mathew y Abraham, 2004; Srinivasan *et al.*, 2007).

○ **Actividad antimicrobiana y antiviral.** Los AHC tienen cierta actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram +, Gram - y levaduras. Entre las especies bacterianas frente a las que actúan, se encuentran *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas syringe*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter koseri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori* y *Shigella sonnei*. Algunos AHC inhiben el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. Los mecanismos de acción antimicrobiana no se conocen en profundidad, aunque se han descrito algunos como la inhibición de la arilamina N-acetiltransferasa (El-Seedi *et al.*, 2012). El ácido ferúlico presenta actividad inhibitoria de la reproducción de virus como la gripe, el virus sincitial respiratorio y el virus de inmunodeficiencia humana (Mathew y Abraham, 2004; Ou y Kwok, 2004).

○ **Efecto hepatoprotector, protector pulmonar y neuroprotector.** Algunos estudios indican que la ingesta regular de ácido ferúlico puede aportar protección frente a la hepatotoxicidad inducida por el consumo de alcohol. La nicotina aumenta la peroxidación lipídica y da lugar a daño celular oxidativo. El ácido ferúlico incrementa las defensas del organismo frente al daño oxidativo, capturando ROS, previniendo el daño a la membrana celular y evitando la liberación de enzimas a la circulación. Por último, el daño oxidativo es un factor importante en las enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer. Se ha demostrado que el ácido ferúlico actúa como modulador de la  $\beta$ -secretasa y reductor de los depósitos de  $\beta$ -amiloide *in vivo* e *in vitro* en modelos animales, lo que le convierte en un compuesto terapéutico potencial frente a esta enfermedad neurodegenerativa (Srinivasan *et al.*, 2007; Sgarbossa *et al.*, 2015).

○ **Otros efectos beneficiosos.** El consumo diario de AHC puede tener efectos protectores frente a la pérdida de masa ósea con la edad, sin afectar negativamente a las células de la médula ósea (El-Seedi *et al.*, 2012).

## **APLICACIONES EN INDUSTRIA COSMÉTICA**

○ **Protector solar y agente antienviejamiento.** La exposición aguda y crónica a los rayos del sol produce el envejecimiento prematuro de la piel, causando eritema, inflamación y pudiendo dar lugar a carcinogénesis. La exposición a radiación UV da lugar a la formación de ROS

y especies reactivas de nitrógeno y el consiguiente daño oxidativo (Srinivasan *et al.*, 2007). Las propiedades antioxidantes del ácido ferúlico son capaces de contrarrestar dicho daño oxidativo. Además, el ácido ferúlico es un potente absorbente de radiación UV. El potencial del ácido ferúlico como protector frente a la radiación solar se ha probado en formulaciones tópicas por sí solo, o bien junto a otros antioxidantes como las vitaminas E y C (Mathew y Abraham, 2004; Kumar y Pruthi, 2014). Los AHC y sus derivados presentan también propiedades antioxidantes, anticolegenasa, antiinflamatorias, antimicrobianas y antitirosinasa. Todo ello los convierte en ingredientes cosmecéuticos de interés como agentes antienvjecimiento, conservantes, antiinflamatorios y correctores de la hiperpigmentación (Taofiq *et al.*, 2017).

○ **Aromas y fragancias.** La vainillina, que puede sintetizarse a partir del ácido ferúlico, se emplea en la industria de la elaboración de perfumes de alta calidad (Kumar y Pruthi, 2014).

#### **APLICACIONES EN INDUSTRIA ALIMENTARIA**

○ **Conservante alimentario.** Su actividad antioxidante y antimicrobiana, así como su seguridad y poca toxicidad, convierten al ácido ferúlico en un conservante alimentario interesante. El primer informe de uso del ácido ferúlico como conservante alimentario se registró en Japón, donde se empleó para conservar naranjas e inhibir la autooxidación del aceite de linaza, la manteca y el aceite de soja (Kumar y Pruthi, 2014). Además de su baja toxicidad, otra ventaja del empleo de ácido ferúlico como conservante es que es más estable frente a los cambios de pH que otros compuestos fenólicos antioxidantes, como ácido cafeico, gálico o clorogénico. Uno de los principales inconvenientes es que el ácido ferúlico puede convertirse en 4-vinil guayacol durante el procesado, mediante descarboxilación, lo que produce sabores indeseados en alimentos procesados y en bebidas como la cerveza y el zumo de naranja (Ou y Kwok, 2004).

○ **Precursor para la síntesis de vainillina.** La vainillina natural tiene una gran demanda como sustancia aromatizante en alimentos, bebidas y otras industrias. La industria del chocolate y la de los helados utilizan alrededor del 75 % del mercado global de vainillina, siendo empleada también en repostería, en menores cantidades. La vainillina comercial puede obtenerse en forma de i) vainillina pura, mediante síntesis química a partir de guayacol o residuos de la industria papelera, o bien ii) extracto de vainilla, obtenido mediante la maduración y extracción alcohólica de las vainas de la planta de la vainilla. A pesar de que su uso está extendido, ambos procesos de obtención presentan inconvenientes. La vainillina obtenida mediante síntesis química no se

considera un producto natural y no puede ser incluida en alimentos como tal. En cuanto al extracto de vainilla obtenida de fuentes botánicas, tiene un coste elevado y una disponibilidad limitada (Mathew y Abraham, 2004). Estos inconvenientes han motivado la aparición de un gran interés hacia las técnicas de biosíntesis de vainillina, en las que se emplean microorganismos considerados GRAS (del inglés *generally recognized as safe*, es decir, microorganismos aceptados como inocuos para el ser humano), o bien sus enzimas, de modo que se obtiene un producto que puede comercializarse como natural (Kumar y Pruthi, 2014). La biosíntesis de vainillina a partir de ácido ferúlico se lleva a cabo en microorganismos mediante distintas rutas biosintéticas (Ou y Kwok, 2004). Otra de las ventajas del empleo de la biosíntesis es que las condiciones de biocatálisis son moderadas en cuanto a parámetros como temperatura, lo que supone un ahorro energético (Mathew y Abraham, 2004).

○ **Ingrediente en alimentación funcional y preparados para deportistas.** El ácido ferúlico se utiliza en alimentos para deportistas, debido a sus beneficios como antioxidantes y estimulante de la secreción hormonal en humanos. Es por ello que se emplea como suplemento ergogénico, es decir, que mejora el uso de energía, la producción, o la recuperación de un deportista. A pesar de su empleo en preparaciones para deportistas y los resultados prometedores en modelos animales, son necesarios nuevos estudios que demuestren efectos beneficiosos significativos en humanos (Ou y Kwok, 2004; You *et al.*, 2009; Manore *et al.*, 2011).

○ **Otras aplicaciones en industria alimentaria.** El ácido ferúlico se ha empleado para evitar la pérdida de color de algunos alimentos, como el color verde de los guisantes y del té verde. También se ha empleado, junto con el  $\gamma$ -orizanol, en la prevención de la foto-oxidación de la luteína y astaxantina en pescados (Kumar y Pruthi, 2014). Algunos estudios indican que las propiedades del ácido ferúlico para formar enlaces cruzados entre diferentes polisacáridos de la pared celular vegetal y otras moléculas (proteínas) tiene aplicaciones como agente espesante en la formación de geles (Ou y Kwok, 2004).

## **OTRAS APLICACIONES INDUSTRIALES DEL ÁCIDO FERÚLICO**

○ **Precursor para la síntesis de compuestos de valor añadido.** La transformación biocatalítica del ácido ferúlico origina compuestos como alquilbencenos, epóxidos, polímeros con aplicación industrial, catecoles relacionados con el ácido protocatéquico, guayacol, alcohol coniferílico, etc. También pueden producirse metabolitos de la vainillina, como el ácido vanílico,

alcohol vanílico y 4-hidroxibenzaldehído, así como AHC, como el ácido cafeico. Estas moléculas tienen aplicaciones industriales directas y pueden emplearse para la síntesis de biopolímeros y compuestos de valor añadido (Mathew y Abraham, 2004; Mathew y Abraham, 2006).

## 1.6. Enzimas lignocelulolíticas

---

Según se ha detallado en el apartado 1.4, la pared celular vegetal está formada por una estructura tridimensional compleja, en la que la celulosa se distribuye en microfibras organizadas y asociadas con hemicelulosas y pectinas. Esta microestructura puede presentar también el heteropolímero fenólico lignina. La complejidad y variabilidad de esta estructura formada por diferentes tipos de moléculas convierte la pared celular vegetal en un sustrato difícil de degradar.

Algunas de las dificultades a la hora de degradar biomasa lignocelulósica son su naturaleza fibrosa, la presencia de lignina (que estabiliza las cadenas de celulosa y dificulta su degradación. Además, la degradación de la lignina puede dar lugar a moléculas que inhiben celulasas, como la vainillina o el ácido tánico) y la generación otros inhibidores, como el furfural o el ácido fórmico, durante los procesos de pretratamiento (Wei *et al.*, 2009; Kubicek y Kubicek, 2016).

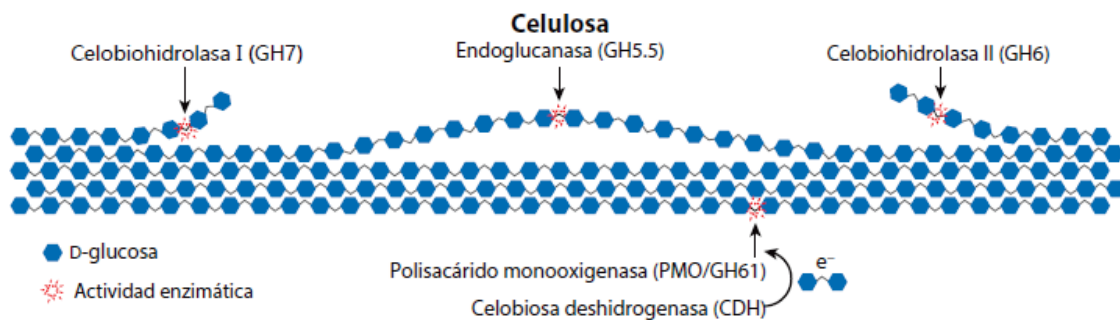
Las enzimas que degradan las paredes celulares vegetales están incluidas dentro de la categoría de las CAZy (*carbohydrate active enzymes*), que incluye aquellas enzimas que interactúan con carbohidratos, bien sea durante su ensamblaje, o, como el caso de las enzimas lignocelulolíticas, en su ruptura. En la base de datos disponible en <http://www.cazy.org/>, las enzimas se clasifican en familias, en función de las secuencias de aminoácidos de sus módulos catalíticos, relacionando información sobre secuencia, estructura y mecanismo molecular (Lombard *et al.*, 2014). Las enzimas incluidas en la categoría de las CAZy se dividen en cinco grupos: i) glucósido hidrolasas (GHs) o glucosidasas, que hidrolizan los enlaces glucosídicos entre dos o más carbohidratos o entre carbohidratos y otras fracciones; ii) glucosiltransferasas (GTs), que catalizan la transferencia de la fracción glucídica de una molécula donante activada a una molécula receptora específica, formando enlaces glucosídicos durante la biosíntesis de carbohidratos; iii) polisacárido liasas (PLs), que rompen las cadenas de polisacáridos conteniendo ácido urónico, mediante un mecanismo de  $\beta$ -eliminación, generando un residuo de ácido hexenurónico insaturado y un nuevo extremo reductor; iv) carbohidrato esterasas (CEs), que catalizan la O-desacilación o la N-desacilación de carbohidratos sustituidos y v) enzimas con

actividades auxiliares, que son enzimas con actividades redox que actúan en conjunción con el resto de enzimas CAZy.

Para llevar a cabo la degradación de la pared celular vegetal, son necesarias distintas enzimas que actúan de forma sinérgica (de Souza, 2013), las cuales se detallan a continuación.

### ENZIMAS QUE DEGRADAN LA CELULOSA

Para la degradación de la celulosa se requieren tres tipos de enzimas, que constituyen el denominado “complejo celulasa”: i) endoglucanasas o endo- $\beta$ -1,4-D-glucanasas (EC 3.2.1.4), ii) exoglucanasas, exo- $\beta$ -1,4-D-glucanasas o celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) y iii)  $\beta$ -glucosidasas (EC 3.2.1.21). Las **endoglucanasas** catalizan la hidrólisis de los enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glucosídicos internos de la cadena de celulosa (principalmente, en las regiones amorfas), dando lugar a nuevos extremos terminales. Las **celobiohidrolasas** catalizan la liberación de moléculas de celobiosa (disacárido formado por dos moléculas de glucosa), mediante la ruptura de los enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glucosídicos de los extremos reductores o no reductores de las cadenas de celulosa. Por último, las  **$\beta$ -glucosidasas** se encargan de la hidrólisis de la celobiosa (y celodextrinas), liberándose moléculas de glucosa. Estos tres tipos enzimáticos actúan de forma conjunta y secuencial, para conseguir la degradación de celulosa a monómeros de glucosa (Dashtban *et al.*, 2009; Escamilla-Alvarado *et al.*, 2017) (Fig. 1.10).

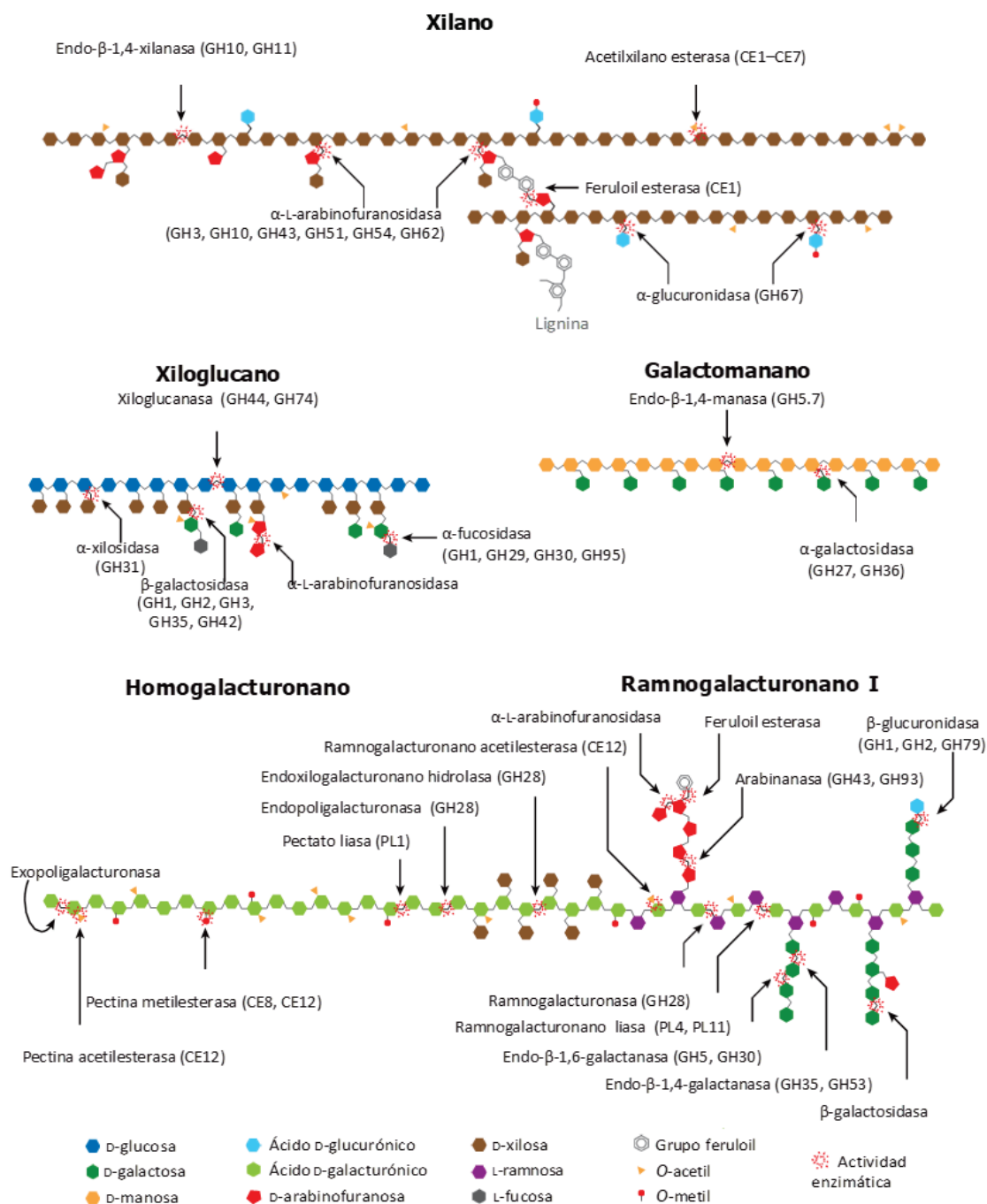


**Fig. 1.10. Enzimas que degradan la celulosa.** Se indican dos de los tres tipos de celulasas y su lugar de acción. (Modificado de Glass *et al.*, 2013).

El complejo celulasa comprende enzimas con diferentes mecanismos catalíticos, pertenecientes a las familias de GH 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 26, 44, 45, 48 y 51. Algunos autores incluyen también dentro de este complejo las familias GH61 y 74 (Toushik *et al.*, 2017). Los productos de la hidrólisis de la celulosa pueden emplearse como fuente de carbono y energía para

los microorganismos celulolíticos y otros microorganismos presentes en el entorno, siendo la liberación de glucosa a partir de celulosa la base de las interacciones microbianas que ocurren en este tipo de ambiente (Pérez *et al.*, 2002).

## ENZIMAS QUE DEGRADAN LA HEMICELULOSA



**Fig. 1.11. Hemicelulasas y pectinasas.** Se indican las enzimas que degradan los principales polisacáridos de matriz lignocelulósicos y sus lugares de acción. (Modificado de Glass *et al.*, 2013).



La hemicelulosa es una matriz compleja de polisacáridos, constituida por tres tipos de cadenas principales (xilanos, xiloglucanos y mananos) con sustituciones laterales de naturaleza diversa. Para su degradación es necesaria la acción conjunta de enzimas que rompen los enlaces de la cadena principal, enzimas que liberan azúcares monoméricos y enzimas accesorias que actúan sobre las cadenas laterales (de Souza, 2013) (Fig. 1.11).

Los xilanos son degradados mediante la acción de **endo-1,4- $\beta$ -xilanasas** (EC 3.2.1.8) y  **$\beta$ -xilosidasas** (EC 3.2.1.37); los xiloglucanos, por las **endo- $\beta$ -1,4-glucanasas específicas de xiloglucano** (EC 3.2.1.151) y las **exo- $\beta$ -1,4-glucanasas específicas de xiloglucano** (EC 3.2.1.155) y los (galacto) mananos, mediante **endo- $\beta$ -1,4-mananasas** (EC 3.2.1.78) y  **$\beta$ -1,4-manosidasas** (EC 3.2.1.25), entre otras (van den Brink y de Vries, 2011).

**Tabla 1.4. Clasificación de las hemicelulasas fúngicas.** Se indica la adscripción de cada grupo a diferentes familias de enzimas. (Modificado de van den Brink y de Vries, 2011).

Tipo de enzima lignocelulolítica	Familia de enzimas CAZy
Endo-1,4- $\beta$ -xilanasas	GH10 y GH11
$\beta$ -xilanasas	GH3 y GH43
Endo- $\beta$ -1,4-glucanasas específicas de xiloglucano	GH12 y GH74
Endo-1,4- $\beta$ -mananasas	GH5 y GH26
$\beta$ -1,4-manosidasas	GH2
$\alpha$ -L-arabinofuranosidasas	GH51 y GH54
Acetilxilano esterasas	CE1
Feruloil/ <i>p</i> -cumaroil esterasas	CE1
$\alpha$ -xilosidasas	GH31
$\alpha$ -fucosidasas	GH29 y GH95
$\alpha$ -1,4-galactosidasas	GH27 y GH36
$\beta$ -1,4-galactosidasas	GH2 y GH35
Arabinoxilano $\alpha$ -arabinofuranohidrolasas	GH62
$\alpha$ -glucuronidasas	GH67 y GH115

GH: glucósido hidrolasa; CE: carbohidrato esterasa

La complejidad de las hemicelulosas y la abundancia de sustituyentes que presentan determina que para su hidrólisis también sean necesarios otros grupos enzimáticos, como

**$\alpha$ -glucuronidasas** (EC 3.2.1.1),  **$\alpha$ -L-arabinofuranosidasas** (EC 3.2.1.55), **acetilxilano esterasas** (EC 3.1.1.72), **carboxilesterasas** (EC 3.1.1.1) y **FAEs** (EC 3.1.1.73). Estas últimas son enzimas capaces de catalizar la ruptura del enlace éster entre el ácido ferúlico y componentes glucídicos, como la arabinosa, actuando de forma sinérgica con celulasas, xilanasas y otras hemicelulasas en los procesos de sacarificación de la hemicelulosa (Peralta *et al.*, 2017). Las FAEs son el principal objeto de estudio del presente trabajo de Tesis Doctoral y sus peculiaridades se detallan en el apartado 1.7.

La degradación de la hemicelulosa requiere, al menos, de nueve actividades enzimáticas, pertenecientes a 20 familias de GHs (GH1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 11, 26, 27, 36, 39, 43, 51, 52, 53, 54, 57, 62 y 67) y 7 familias de CE (CE1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7). Todas las familias se han encontrado en hongos, con la excepción de 4 familias de GHs (GH4, 8, 52 y 57) y una de CEs (CE7) (Dashtban *et al.*, 2009). La Tabla 1.4 recoge algunas de estas actividades y familias, descritas a partir de diferentes especies fúngicas.

### ENZIMAS QUE DEGRADAN LAS PECTINAS

Dentro de los polisacáridos que forman parte de las paredes celulares vegetales, las pectinas poseen la mayor complejidad funcional y estructural y para su degradación son necesarios distintos tipos de enzimas que se conocen, en general, como pectinasas (Fig. 1.11). Dentro de las pectinasas hay enzimas pertenecientes a los grupos de las GHs, PLs y CEs (Tabla 1.5).

**Tabla 1.5. Clasificación moderna de las enzimas pectinolíticas o pectinasas.** Se indica la adscripción de cada grupo a diferentes familias de enzimas. (Modificado de Ruiz *et al.*, 2017).

Enzima	Nombre común	Código EC
<b>Hidrolasas</b>		
GHs	Endopoligalacturonasa	EC 3.2.1.15
	Exopoligalacturonasa	EC 3.2.1.67
	Ramnogalacturonasa	EC 3.2.1.171
	Ramnogalacturonano galacturonohidrolasa	EC 3.2.1.173
	Ramnogalacturonano ramnohidrolasa	EC 3.2.1.174
	Xilogalacturonano hidrolasa	EC 3.2.1.-

Tabla 1.5 (continuación)

Enzima	Nombre común	Código EC
<b>Hidrolasas</b>		
GHs	Endogalactanasa	EC 3.2.1.89
	$\alpha$ -galactosidasa	EC 3.2.1.22
	$\beta$ -galactosidasa	EC 3.2.1.23
	Endoarabinasa	EC 3.2.1.99
	$\alpha$ -L-arabinofuranosidasa	EC 3.2.1.55
CEs	Pectina metilesterasa	EC 3.1.1.11
	Pectina acetilesterasa	EC 3.1.1.6
	Ramnogalacturonano acetilesterasa	EC 3.1.1.86
	Feruloil esterasa	EC 3.1.1.73
<b>Liasas</b>		
	Pectina liasa	EC 4.2.2.10
	Pectato liasa	EC 4.2.2.2
	Ramnogalacturonano liasa	EC 4.2.2.23
<b>Oxididasas</b>		
	Galacturónico oxidasa	

## ENZIMAS QUE DEGRADAN LA LIGNINA

La complejidad estructural de la lignina, su insolubilidad y su alto peso molecular dificultan su degradación. Los pasos iniciales de la despolimerización de la lignina pueden ser catalizados por enzimas extracelulares, oxidativas e inespecíficas, que liberan productos altamente inestables (Pérez *et al.*, 2002). Estas enzimas ligninolíticas pueden adscribirse a dos grandes categorías: i) peroxididasas y ii) fenol oxididasas o lacasas. Dentro de las peroxididasas, destacan las lignina peroxididasas (EC 1.11.1.14), manganeso peroxididasas (EC 1.11.1.13) y peroxididasas versátiles (EC 1.11.1.16). En cuanto a las fenol oxididasas, el grupo más importante son las lacasas, que pertenecen a la familia de las oxididasas de cobre azul (EC 1.10.3.2). Otros grupos enzimáticos capaces de degradar polímeros de lignina son las glioxal oxididasas (EC 1.2.3.15), aril-alcohol oxididasas (EC 1.1.3.7) y glucosa oxididasas (EC 1.1.3.4) (Feofilova y Mysyakina, 2016; Tousehik *et al.*, 2017).

De entre los organismos capaces de degradar la lignina conocidos, los más prometedores son algunas especies de basidiomicetos responsables de producir la podredumbre blanca de la madera, como *Phanerochaete chrysosporium*, *Coriolus versicolor* y *Trametes versicolor* (Dashtban *et al.*, 2009).

## ENZIMAS AUXILIARES O ACCESORIAS

Además de los grupos previamente descritos, existen otras enzimas que colaboran en los procesos de degradación de la pared celular vegetal. Este es el caso de las monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMOs), una familia que ha captado el interés de la comunidad científica en los últimos años. Se ha propuesto que las LPMOs actúan de forma sinérgica con otras enzimas, como celulasas y quitinasas (Escamilla-Alvarado *et al.*, 2017).

### 1.6.1. Usos industriales de enzimas lignocelulolíticas fúngicas

La importancia de las enzimas capaces de degradar la lignocelulosa es considerable, teniendo en cuenta sus múltiples aplicaciones industriales y el beneficio económico asociado. Existen organismos productores de enzimas lignocelulolíticas en prácticamente todos los reinos, incluyendo bacterias, hongos filamentosos, levaduras, algas marinas, semillas y otras partes de las plantas, animales, como insectos, crustáceos, moluscos, etc. Desde el punto de vista de los niveles de producción de este tipo de enzimas, los hongos filamentosos son especialmente interesantes y objeto de numerosos estudios (Dashtban *et al.*, 2009; Glass *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2016; Escamilla-Alvarado *et al.*, 2017). En la Tabla 1.6 se detallan algunos de los usos industriales actuales de enzimas lignocelulolíticas fúngicas.

**Tabla 1.6. Aplicaciones industriales de las enzimas lignocelulolíticas fúngicas.** (Modificado de Gifre *et al.*, 2017; Hoondal *et al.*, 2002; Khalikova *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2014; McKelvey y Murphy, 2017; Singh *et al.*, 2016; Touthik *et al.*, 2017).

Industria	Enzima	Función	Organismo
Panadera	Xilanasas	Digestión de hemicelulosas para acondicionamiento de la masa	<i>A. niger</i>
	Pentosanasas	Digestión de pentosanas/hemicelulosas en el tratamiento de la harina (horneados, pasta, etc.)	<i>Thermomyces lanuginosus</i>
Aceites vegetales	Celulasa y hemicelulasa	Potenciador del aroma, aumento del contenido en polifenoles y vitamina E, evita el enranciamiento	<i>Trichoderma</i> spp.
	Pectinasa	Mejora estabilidad del aceite en almacenamiento	<i>Aspergillus aculeatus</i>

Tabla 1.6 (continuación)

Industria	Enzima	Función	Organismo
Almidón y azúcar	Xilanasa	Reducción de la viscosidad de la pulpa. Hidrólisis de xilano en grano de cereal y biomasa lignocelulósica	<i>A. niger</i> , <i>Trichoderma konignii</i> , <i>T. reesei</i>
	Dextranasa	En industria azucarera, eliminación de dextranos	<i>Purpureocillium lilacinum</i> , <i>Chaetomium gracile</i>
Zumos y vino	Pectinasa	Hidrólisis de pectinas. Clarificación de zumos	<i>A. niger</i> , <i>T. reesei</i> , <i>Penicillium notatum</i> , <i>Botrytis cinerea</i>
	Celulasa y hemicelulasa	Procesado de vegetales. Reducción de la viscosidad. Licuefacción de la fruta	<i>A. niger</i> , <i>Trichoderma atroviride</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>T. reesei</i>
	Lacasa	Clarificación de los zumos	<i>T. versicolor</i>
	$\beta$ -glucanasa	Disminución de la turbidez	<i>Aspergillus</i> spp.; <i>Trichoderma</i> spp.
Cervecería	Amiloglucosidasa	Aumento del contenido de glucosa	<i>A. niger</i> , <i>Aspergillus phoenicis</i> , <i>Rhizopus delemar</i> , <i>A. awamori</i>
	Pentosanasa, xilanasa	Hidrólisis de pentosanas de la malta, cebada y trigo. Extracción y filtración de la cerveza	<i>A. niger</i> , <i>T. lanuginosus</i>
Alimentación animal	$\beta$ -glucanasa	Aumento de la digestibilidad. Reducción de la viscosidad del alimento	<i>A. niger</i> ; <i>Trichoderma</i> spp.
	Celulasa	Aumento de la digestibilidad	<i>T. viride</i>
	Xilanasa	Aumento de la digestibilidad	<i>Aspergillus</i> spp.; <i>Trichoderma</i> spp.
Textil	Celulasa y celobiohidrolasa	Efecto de desteñido en tejido vaquero. Empleado en el acabado de tejidos textiles, consiguiendo tejidos más suaves y lustrosos	<i>H. insolens</i> ; <i>Trichoderma</i> sp.
	Pectinasa	Eliminación de ceras y otras impurezas de tejidos celulósicos (ramio), en condiciones alcalinas	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Penicillium italicum</i>
Papelera	Celulasa y celobiohidrolasa	Limpieza de la pulpa. Mejor drenaje y durabilidad de la maquinaria. Eliminación de la tinta.	<i>A. niger</i> , <i>T. viride</i> , <i>T. reesei</i>
	Xilanasa	Facilitar la degradación de la lignina por parte de blanqueadores químicos.	<i>T. reesei</i> , <i>T. lanuginosus</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>T. konignii</i> , <i>A. niger</i>
	Ligninasa	Reblandecimiento del papel	<i>T. versicolor</i>
	Lacasa	Incremento del brillo del papel	<i>T. versicolor</i>
	Mananasa	Incremento del brillo del papel	
Cosmética	Lacasa	Funciones en tintes capilares	<i>T. versicolor</i>
Polímeros	Lacasa	Polimerización de bisfenol A	<i>Trametes hirsuta</i>

**Tabla 1.6 (continuación)**

<b>Industria</b>	<b>Enzima</b>	<b>Función</b>	<b>Organismo</b>
Detergentes	Celulasa alcalina	Suavizado del algodón. Incremento de la luminosidad del color	<i>A. niger</i> <i>Trichoderma</i> spp.; <i>Humicola insolens</i>
Síntesis orgánica	Lacasa	Producción de tintes textiles, pigmentos cosméticos, agentes saborizantes y plaguicidas	<i>T. versicolor</i>
Biocombustibles	Celulasa, hemicelulasa	Digestión de residuos agroindustriales para producción de bioetanol	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Trichoderma</i> spp., <i>Penicillium</i> spp.
Gestión residuos	Amiloglucosidasa	Digestión de almidón para biorremediación	<i>A. niger</i> , <i>A. phoenicis</i> , <i>R. delemar</i> , <i>A. awamori</i>
	Lacasa	Degradación de residuos que contienen olefinas, poliuretano y compuestos fenólicos	<i>T. versicolor</i> , <i>Alternaria tenuissima</i>
	Manganeso peroxidasa	Degradación de compuestos fenólicos	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Coprinus cinereus</i>
	Lignina peroxidasa	Degradación de compuestos fenólicos	<i>P. chrysosporium</i> , <i>C. cinereus</i>

## 1.6.2. Búsqueda de organismos con actividad lignocelulolítica

Los hongos, particularmente ascomicetos y basidiomicetos, poseen un arsenal enzimático con diversas aplicaciones. Teniendo en cuenta que únicamente un pequeño porcentaje de las especies fúngicas se han descubierto, y aún menos se han estudiado en profundidad, son necesarios nuevos estudios encaminados a encontrar actividades enzimáticas fúngicas aún sin caracterizar.

En los últimos años, se han realizado investigaciones para aislar, identificar y caracterizar nuevas cepas fúngicas capaces de degradar la pared celular vegetal. Los aislados fúngicos se han obtenido tanto de sustratos ricos en biomasa vegetal como a partir de ambientes extremos o inusuales. Entre los sustratos ricos en lignocelulosa se incluye materia vegetal en descomposición, residuos provenientes de vertederos industriales y residuos domésticos (Manisha y Yadav, 2017).

En 2014, se publicó el aislamiento y caracterización de una cepa moderadamente halófila de *Aspergillus caesiellus* con actividad lignocelulolítica, procedente de muestras de suelo, mediante fermentación de bagazo de caña de azúcar en presencia de NaCl (Batista-García *et al.*, 2014). Se han caracterizado también las actividades lignocelulolíticas de hongos aislados a partir de una especie de esponja que habita en el fondo del mar (*Stelletta normani*). Esta búsqueda permitió el

aislamiento de catorce cepas de hongos extremófilos, de las cuales tres se identificaron como hongos halotolerantes con actividad lignocelulolítica (Batista-García *et al.*, 2017).

Otras cepas fúngicas lignocelulolíticas se han aislado de ambientes extremos, como muestras minerales procedentes de zonas frías (4-6 °C) y alcalinas (pH > 10) de aguas de Groenlandia (Vester *et al.*, 2014) o muestras de suelo de la Antártida (Martorell *et al.*, 2017; Duarte *et al.*, 2018). También se han identificado enzimas lignocelulolíticas en ambientes templados y tropicales, como los manglares (Arfi *et al.*, 2013).

Algunos hongos, como *A. niger*, presentan la capacidad de producir *biofilms* o tapices microbianos, lo que amplía aún más la variedad de nichos ecológicos y ecosistemas en los que es posible encontrar nuevas cepas capaces de degradar biopolímeros (Villena y Gutiérrez-Correa, 2007; Gutiérrez-Correa *et al.*, 2012). Así, se han identificado hongos en sustratos, *a priori*, pobres en materia orgánica, como pueden ser plásticos o metales (Liu *et al.*, 2014b) y otros ambientes hostiles, como efluentes de lavaderos de coches (Sibanda *et al.*, 2017).

La posibilidad de encontrar cepas fúngicas lignocelulolíticas en entornos extremos o inusuales es un campo actualmente en estudio y con gran interés de cara al descubrimiento de nuevas enzimas capaces de degradar la biomasa vegetal.

---

## 1.7. Feruloil esterases

---

### 1.7.1. Descripción y nomenclatura

Según se ha indicado previamente, la degradación de la biomasa vegetal requiere de la acción combinada de varias enzimas. Para degradar los polisacáridos de matriz de las paredes celulares vegetales son necesarios dos grandes grupos de enzimas: i) enzimas encargadas de hidrolizar las cadenas principales, como endoxilanasas y  $\beta$ -xilosidasas y ii) enzimas accesorias o auxiliares, que eliminan los sustituyentes laterales y uniones entre polímeros diferentes. Entre estas últimas se encuentran las FAEs, que catalizan la ruptura de las uniones entre AHC y polisacáridos de la pared celular, facilitando el acceso de otras pectinasas y hemicelulasas (Wong, 2006).

Las FAEs (EC 3.1.1.73), constituyen una subclase dentro de las hidrolasas de ésteres carboxílicos (EC 3.1.1). Reciben también otros nombres, como esterases del ácido ferúlico,

cinamoil esterasas, hidrolasas de ácidos cinámicos, *p*-cumaroil esterasas, etc. Las primeras FAEs se descubrieron a finales de la década de los 80, con el hallazgo de un nuevo tipo de esterasa capaz de liberar el ácido ferúlico unido covalentemente al xilano. En 1988, se publicaron dos de los primeros estudios sobre enzimas con actividad FAE, una de ellas procedente del basidiomiceto *Schizophyllum commune* (Mackenzie y Bilous, 1988) y otra a partir de varias especies del actinomiceto *Streptomyces* spp. (Johnson *et al.*, 1988). En 1998, se publicó la primera revisión sobre FAEs y otras enzimas auxiliares (Williamson *et al.*, 1998). Desde entonces, el interés suscitado por este grupo ha continuado creciendo, con un incremento importante en el número de estudios y revisiones publicados (Fazary y Ju, 2007; Faulds, 2010).

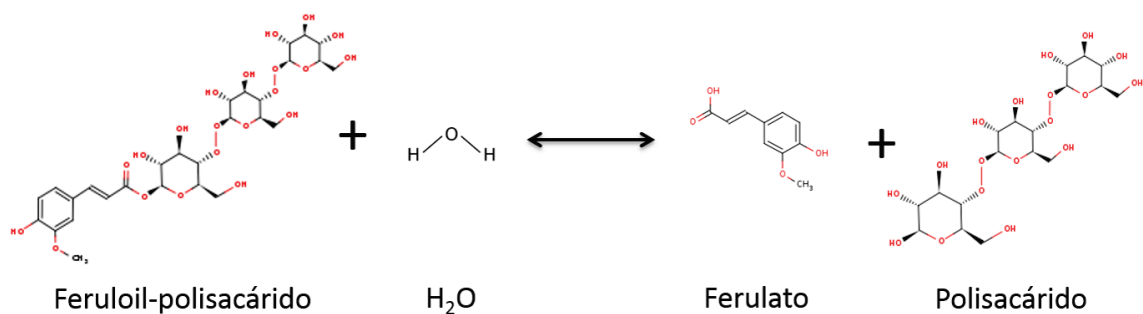
Todas las FAEs son enzimas extracelulares (Wong, 2006). Las características biofísicas y bioquímicas de las FAEs son variables y dependen de su procedencia. Se han purificado y caracterizado FAEs con pesos moleculares entre 27 y 210 kDa, distintos puntos isoeléctricos y diferentes condiciones de actividad. Las FAEs presentan actividad en un amplio rango de pH (3,0-10,0) y temperatura (20-75 °C), si bien los valores óptimos suelen encontrarse en el rango de pH de 4,0 a 7,0 y a temperaturas inferiores a 50 °C. A día de hoy, no se ha encontrado correlación entre las características bioquímicas de las FAEs y sus óptimos de actividad (Fazary y Ju, 2007; Dilokpimol *et al.*, 2016).

La **nomenclatura** empleada para designar las FAEs no sigue unas directrices estandarizadas, por lo que es habitual hallar en la bibliografía denominaciones dispares entre sí, en ocasiones para la misma enzima. Este es el caso de dos de las FAEs mejor estudiadas, la enzima FAEA (también denominada FAE-III) y la enzima FAEB (conocida también como CinnAE o FAE-I) de *A. niger* (Wong, 2006). Debido a esta heterogeneidad, que puede dar lugar a equívoco, se han llevado a cabo esfuerzos para tratar de unificar la nomenclatura de estas enzimas. Uno de ellos consiste en un sistema de nomenclatura basado en el desarrollado para las GHs. Según este sistema, cada FAE debe designarse empleando las dos primeras letras del organismo productor, seguido por el término “Fae” y una letra para indicar la subclase propuesta, según la clasificación basada en su actividad frente a cuatro metil ésteres del ácido ferúlico (clasificación ABCD). Según este sistema, las dos enzimas de *A. niger* mencionadas en el presente párrafo deberían pasar a denominarse AnFaeA y AnFaeB, respectivamente (Faulds, 2010). Pese a que este sistema puede constituir una forma adecuada de nomenclatura, la clasificación de FAEs en cuatro clases está obsoleta y ha sido sustituida por otras de mayor complejidad, según se detalla en el apartado 1.7.3.



## 1.7.2. Reacción catalítica y estructura

Las FAEs catalizan la hidrólisis de los enlaces éster que mantienen unidos AHC, como el ácido ferúlico, a arabinoxilanos y ciertas pectinas de las paredes celulares vegetales. En condiciones adecuadas, las FAEs son capaces de catalizar la reacción inversa, dando lugar a la esterificación de AHC (Fig. 1.12) (Giuliani *et al.*, 2001; Wong, 2006; Tsuchiyama *et al.*, 2006).



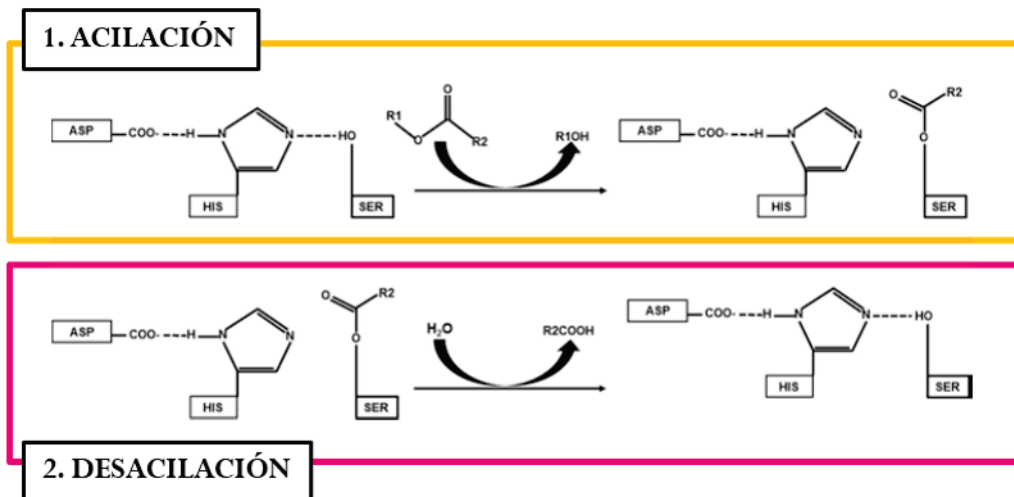
**Fig. 1.12. Esquema de la reacción catalizada por las FAEs.** Figura elaborada a partir de datos de estructura química 2D recogidos en PubChem (Kim *et al.*, 2016).

El ácido ferúlico ( $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$ ), también conocido como ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico, o por su nombre sistemático, ácido (3-metoxi-4-hidroxi)-3-fenil-2-propenoico (Wong, 2006), recibe su denominación de la especie vegetal de la que se aisló por primera vez, *Ferula foetida* Reg., perteneciente a la familia Apiaceae (Koseki *et al.*, 2009a).

Dado que el ácido ferúlico se encuentra unido de forma covalente a los complejos formados por los carbohidratos y la lignina, la ruptura de los enlaces lignina-ferulato-arabinoxilano facilita la completa degradación de la pared celular vegetal. Así, las FAEs llevan a cabo una función importante, favoreciendo el acceso de GHs y PLs a las fibras de la lignocelulosa. Esta acción sinérgica se traduce en el aumento del rendimiento de la sacarificación de la biomasa vegetal.

El mecanismo de acción de las FAEs es similar al proceso clásico descrito para las lipasas (EC 3.1.1.3), serina proteasas (EC 3.4.21) y otras esterasas, con la intervención de una tríada catalítica conservada Ser-His-Asp. En el caso de algunos basidiomicetos, Asp es sustituido por Glu. El mecanismo catalítico comprende dos pasos: i) una **acilación** inicial del residuo de Ser, formándose un intermediario acil-enzima tetraédrico y liberándose la porción de la molécula correspondiente al radical R1, y ii) una **desacilación** posterior de dicho intermediario,

finalizando el proceso con la enzima libre y la hidrólisis del enlace éster (Fig. 1.13). Dentro de la tríada catalítica, la Ser actúa como nucleófilo, la His como el ácido-base general y el Asp colabora en la orientación del residuo de His y neutraliza la carga que se forma sobre esta durante el proceso. Esto determina que el estado de protonación o la carga neta de los residuos Asp e His sea crucial para mantener la actividad FAE (Wong, 2006; Fazary y Ju, 2007; Dilokpimol *et al.*, 2016; de Souza Moreira *et al.*, 2017).



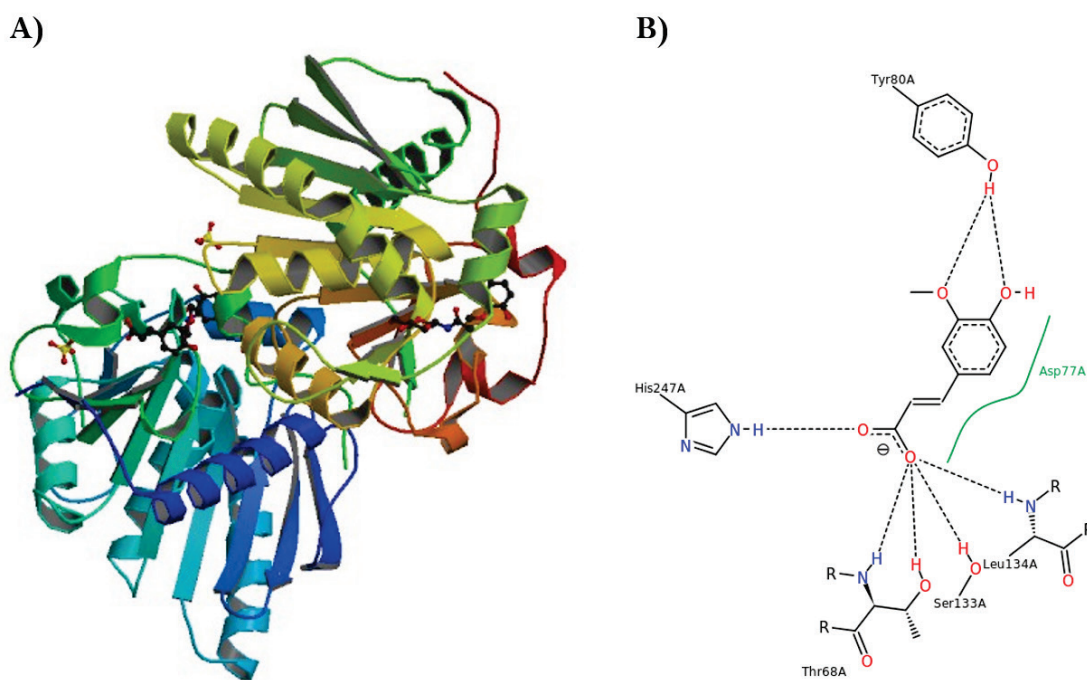
**Fig. 1.13. Mecanismo general de acción de las FAEs.** Se representa la actividad FAE sobre un residuo de arabinosa unido al ácido ferúlico. En este caso, R1 correspondería a la molécula de arabinosa y R2 al ácido ferúlico. (Modificado de de Souza Moreira *et al.*, 2017).

Los estudios de cristalografía indican que varias FAEs son modulares, conteniendo un dominio catalítico y un dominio no catalítico de unión a carbohidratos. Además, se ha sugerido que las FAEs pueden formar parte de estructuras multidominio, como los celulosomas, que son complejos multienzimáticos que actúan de forma sinérgica en procesos lignocelulolíticos, producidos principalmente por organismos anaerobios (Doi y Kosugi, 2004; Fazary y Ju, 2007; Dilokpimol *et al.*, 2016). Se han publicado varios estudios que analizan la estructura y los dominios funcionales de FAEs tanto bacterianas como fúngicas.

En lo que respecta a **FAEs bacterianas**, ha sido especialmente estudiado FAE\_XynZ (el dominio FAE de la xilanasa Z celulosomal de la bacteria termófila anaerobia *Clostridium thermocellum*) (Blum *et al.*, 2000). Este organismo posee dos xilanasas bifuncionales con dos módulos catalíticos separados, uno de los cuales hidroliza enlaces glucosídicos de la estructura del xilano del sustrato natural y el otro (el módulo FAE) hidroliza el enlace éster entre las cadenas

laterales de la arabinofuranosidasa y el ácido ferúlico. Además, poseen dominios de unión a carbohidratos y para la integración en los celulosomas. FAE\_XynZ presenta un plegamiento  $\alpha/\beta$ -hidrolasa, donde se encuentra la tríada catalítica Ser-His-Asp. Se ha descrito un bolsillo de unión hidrofóbico en la superficie de la enzima con determinantes de especificidad para los sustituyentes metoxilo e hidroxilo de los residuos de ácido ferúlico libre y ha sido posible inferir la localización del bolsillo de unión a carbohidratos (Prates *et al.*, 2001; Schubot *et al.*, 2001). Se ha analizado también la estructura de la FAE Est1E, de la bacteria ruminal *Butyrivibrio proteoclasticus*, hallándose rasgos sorprendentes, como un dominio *lid* (“tapa”) con plegamientos distintos a los descritos en otros trabajos para  $\alpha/\beta$ -hidrolasas (Goldstone *et al.*, 2010). Las diferencias en la secuencia de aminoácidos próximos a la tríada catalítica y el sitio de unión a sustrato dan lugar a FAEs con distintas características y especificidad (Tarbouriech *et al.*, 2005).

Las **FAEs fúngicas** cuya estructura se ha estudiado con mayor detalle son las del género *Aspergillus* spp., concretamente *A. niger*, *A. awamori* y *A. oryzae*. Dentro de las producidas por *A. niger*, la FAE mejor descrita estructuralmente es AnFaeA (Fig. 1.14). Estudios de cristalografía han determinado que AnFaeA es una enzima globular, con una estructura de  $\alpha/\beta$ -hidrolasa y que presenta la tríada catalítica Ser-His-Asp. Su disposición general contiene plegamientos muy similares a los de dos lipasas fúngicas (TLL, de *Thermomyces lanuginosus*, y RML, de *Rhizomucor miehei*), aunque no presenta esta actividad (McAuley *et al.*, 2004). Si se compara con estas lipasas, AnFaeA presenta diferencias estructurales que explicarían su distinta actividad enzimática, sobre todo en un *loop* próximo a la cavidad del centro activo. Se ha comparado la estructura de AnFaeA con otras enzimas que comparten el mismo sustrato, como el mencionado dominio FAE\_XynZ de *C. thermocellum*, pudiendo comprobarse que la homología es baja. En FAE\_XynZ, el reconocimiento del ácido ferúlico se basa en interacciones hidrofóbicas y no existe un residuo que interaccione con los sustituyentes polares del anillo aromático del ácido ferúlico o con el segundo residuo ferulato de los dímeros de ácido ferúlico, como parece ocurrir en AnFaeA (Hermoso *et al.*, 2004). La estructura tridimensional de AnFaeA se ve protegida y estabilizada mediante su glicosilación, que también incrementa su estabilidad térmica (Benoit *et al.*, 2006a). Estudios de cristalografía aplicada a la enzima AwFaeA de *A. awamori* han demostrado que presenta similitudes estructurales con AnFaeA (Fazary *et al.*, 2010).



**Fig. 1.14. Estructura tridimensional de la enzima AnFaeA. A)** Unidad asimétrica correspondiente a la estructura cristalográfica del complejo AnFaeA-ácido ferúlico. **B)** Interacciones con el ácido ferúlico unido al centro activo. Las líneas negras con guiones indican puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas o enlaces metálicos. La línea sólida verde indica interacciones hidrofóbicas. (McAuley *et al.*, 2004; Stierand y Rarey, 2010).

En cuanto a otras especies fúngicas, se ha estudiado la estructura de la enzima AoFaeB de *A. oryzae*. Dicha estructura presenta dos dominios: i) un dominio hidrolasa central, con una topología similar a una acilaminoacil peptidasa y una esterasa hipertermófila; ii) un dominio *lid* con un plegamiento estabilizado mediante un ion calcio. Presenta la tríada catalítica Ser-His-Asp, estando Ser e His conectados directamente mediante un puente disulfuro entre cisteínas cercanas. Este rasgo estructural, el “motivo CS-D-HC”, es esencial para el mantenimiento de la actividad enzimática y no se había descrito previamente en serina hidrolasas (Suzuki *et al.*, 2014). De las trece FAEs que se predice que contiene el genoma de *A. oryzae*, tres se han expresado de forma heteróloga para determinar su estructura, aplicando también predicciones computacionales (Udatha *et al.*, 2012). Por último, se ha analizado la estructura de EstA, una FAE modular con tres dominios distintos, que forma parte de un complejo enzimático producido por el hongo anaerobio *Piromyces equi*. EstA presenta: i) un dominio conservado frecuente en celulasas y hemicelulasas; ii) un dominio de función desconocida, que probablemente actúa como unión

entre los otros dos y iii) un dominio catalítico con homología con el de varias acetilxilano esterasas (Fillingham *et al.*, 1999).

En resumen, existen FAEs con estructuras claramente relacionadas y alto grado de homología entre sí, mientras que otras difieren. Este hecho sugiere que el origen y la evolución de los distintos grupos de FAEs ha sido distinto y paralelo, llegando a diferentes conformaciones que, en ocasiones, convergen en cuanto a su especificidad de sustrato o actividad catalítica.

### 1.7.3. Clasificación

Las categorías de clasificación de las FAEs han ido evolucionando con la realización y publicación de nuevos estudios. Inicialmente, se optó por una clasificación en **dos grupos**, en función de su sustrato de inducción y especificidad de sustrato, desarrollada a partir de AnFaeA y AnFaeB (Dilokpimol *et al.*, 2016).

Tras esta primera clasificación surgió otra más compleja, con **cuatro categorías (A, B, C, D)**, basada en los sustratos de inducción, la homología de sus secuencias aminoacídicas, la capacidad para liberar diferulatos y la especificidad frente a cuatro sustratos modelo: metil ferulato (MFA), metil cafeato (MCA), metil *p*-cumarato (MpCA) y metil sinapato (MSA) (Crepin *et al.*, 2004a). Esta clasificación está muy extendida y se continúa empleando. Las características de cada categoría A, B, C y D se detallan en la Tabla 1.7.

Esta clasificación es útil desde un punto de vista funcional, pero, pese a que en un principio se consideró apoyada por análisis filogenéticos, el aumento en el número de secuencias de FAEs disponibles ha evidenciado que no es suficiente para reflejar la variedad existente. Este hecho motivó la aparición de nuevos sistemas de clasificación que tienen en cuenta la homología de secuencia entre distintas FAEs y su posible origen, puesto que parece claro que las FAEs han evolucionado a partir de diferentes familias enzimáticas y no tienen un ancestro común. Una de estas nuevas clasificaciones fue desarrollada a partir del análisis de 365 secuencias relacionadas con FAEs, procedentes de hongos, bacterias y plantas. Esta clasificación propone **12 categorías**, correspondientes a subfamilias de FAEs (Udatha *et al.*, 2011).

**Tabla 1.7. Clasificación de FAEs, según el modelo ABCD.** (Modificado de Crepin et al., 2007).

Clase	Sustrato de inducción	Actividad frente a sustratos modelo	Capacidad para liberar diferulatos	Similitud secuencia
<b>A</b>	Derivados de cereales	Mayor actividad frente a sustratos que contienen sustituciones metoxilo en C-3 y C-5, como MFA y MSA. Activas frente a MpCA, pero no MCA	Liberan pequeñas cantidades de ácidos 5,5'- y 8-O-4'-diferúlicos, con ayuda de xilanasas	Lipasas
<b>B</b>	Pulpa de remolacha	Más activas frente a sustratos con una (MpCA) o dos sustituciones hidroxilo (MCA). Actividad menor si existe un grupo metoxilo. Activas frente a MFA, pero no MSA	No son capaces de liberar diferulatos	Acetilxilano esterasas, familia CE1
<b>C</b>	Varios (cereales, pulpa de remolacha)	Activas frente a los cuatro sustratos modelo	No son capaces de liberar diferulatos	Clorogenato esterasas, tanasas
<b>D</b>	Derivados de cereales	Activas frente a los cuatro sustratos modelo	Liberan ácidos 5,5'-diferúlicos	Xilanasas

La clasificación más actualizada disponible a día de hoy fue propuesta por Dilokpimol y colaboradores en 2016, a partir de una actualización de análisis filogenéticos previos (Benoit *et al.*, 2008). En esta nueva clasificación, se construyó un nuevo árbol filogenético, a partir de 1.251 secuencias correspondientes a FAEs hipotéticas. Además, en el estudio se incluyeron varias acetilxilano esterasas, lipasas y tanasas conocidas, para revelar las relaciones de dichas enzimas con las FAEs. A partir del análisis se propusieron **13 subfamilias** (frente a las 7 propuestas por Benoit y colaboradores). Esta clasificación filogenética indicó que la mayoría de las FAEs parecen haber evolucionado de tanasas, puesto que FAEs de las subfamilias SF1-4 y SF9-11 están relacionadas con estas enzimas. Las subfamilias SF5 y SF6 muestran relación con acetilxilano esterasas, mientras que la SF7 se relaciona con lipasas. Las subfamilias SF12 y SF13 presentan relación con lipasas y colinesterasas. Por último, existen otras FAEs relacionadas con xilanasas,  $\alpha$ -L-ramnosidasas y que no muestran similitud con ninguna de las enzimas mencionadas. El hecho de que diferentes FAEs hayan evolucionado a partir de distintos grupos enzimáticos puede explicar las diferencias en cuanto a especificidad de sustrato (Dilokpimol *et al.*, 2016).

La clasificación ABCD, aunque presenta utilidad y da una idea acerca de la especificidad de las distintas FAEs, no refleja las relaciones filogenéticas dentro de este grupo de enzimas. La

clasificación propuesta por Dilokpimol y colaboradores en 2016 arroja luz sobre estas relaciones y acerca del origen de las diferentes FAEs.

#### **1.7.4. Métodos de determinación de la actividad FAE**

A lo largo de los últimos años, se han desarrollado diversos métodos para la determinación de la actividad FAE. Existen métodos empleados de forma clásica y, recientemente, se han realizado esfuerzos encaminados a optimizar métodos de alto rendimiento (*high-throughput*), que permitan realizar el máximo número de análisis en el menor tiempo posible.

##### **MÉTODOS CLÁSICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FAE**

###### **○ Métodos basados en técnicas cromatográficas**

El método de determinación de la actividad FAE más extendido se basa en el empleo de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para cuantificar los AHC liberados a partir de la hidrólisis de un sustrato apropiado. Concretamente, el método más empleado es HPLC de fase reversa, empleando detectores UV (Dilokpimol *et al.*, 2016). Los sustratos empleados pueden ser naturales, como polisacáridos derivados de plantas, sus fragmentos, o compuestos con residuos de ácido ferúlico o *p*-cumárico, obtenidos mediante purificación a partir de fuentes naturales e hidrólisis química/enzimática controlada (como los compuestos FAX, FAXX o PAXX). Además, de estos sustratos naturales, pueden emplearse sustratos sintéticos comerciales, como MFA, MCA, MpCA, MSA, etil ferulato, etc. El empleo de unos u otros aporta información distinta y complementaria. Los principales inconvenientes en cuanto al uso de sustratos naturales son el aumento en el tiempo y la dificultad de preparación de las muestras, así como su heterogeneidad. En cuanto a los sustratos sintéticos, es que carecen de los residuos alcohólicos presentes en la L-arabinosa de la mayoría de plantas. Al ser distintos de los compuestos que las FAEs hidrolizan en la biomasa vegetal, los resultados de actividad pueden no ser extrapolables a las condiciones que tienen lugar en la naturaleza (Ramírez-Velasco *et al.*, 2016). El empleo de HPLC permite obtener resultados precisos y análisis cuantitativos reproducibles; sin embargo, son técnicas complejas y costosas, que necesitan del empleo de grandes cantidades de solventes orgánicos (Ramos-de-la-Peña y Contreras-Esquivel, 2016).

Otro de los métodos cromatográficos en uso es la cromatografía de gases (GC). Su empleo está mucho menos extendido que las técnicas de HPLC, puesto que sólo puede emplearse con ciertos sustratos y requiere de un proceso complejo de preparación de las muestras (extracción de solventes, concentración y derivatización).

Por último, se ha empleado también la cromatografía en capa fina (TLC), que permite estimar la actividad FAE por medio de fragmentos naturales, sintéticos y sustratos cromogénicos. Esta técnica presenta la ventaja de poder analizar varias muestras al mismo tiempo. Sin embargo, tiene el inconveniente de que sólo arroja resultados cualitativos (Ramírez-Velasco *et al.*, 2016).

### ○ **Métodos espectrofotométricos**

Los métodos espectrofotométricos se basan en el empleo de sustratos cromogénicos artificiales (como el 4-nitrofenil-ferulato o el 4-metilumbeliferil-ferulato). El empleo de este tipo de sustratos tiene el inconveniente de que, en ocasiones, pueden ser hidrolizados por otras enzimas, como proteasas o carboxilesterasas, lo que puede dar lugar a resultados erróneos. A partir de la década de los 90, se han desarrollado nuevos sustratos más específicos para superar esta desventaja (Marmuse *et al.*, 2007; Marmuse *et al.*, 2008). Otros inconvenientes son que algunos de estos sustratos presentan baja solubilidad en tampones acuosos, la necesidad de utilizar cosolventes, la inestabilidad de las emulsiones en el tiempo y, al tratarse de sustratos sintéticos, que los resultados no siempre pueden ser extrapolados a la hidrólisis de sustratos naturales (Ramírez-Velasco *et al.*, 2016).

La principal ventaja de los métodos espectrofotométricos es que emplean un equipamiento menos costoso que las técnicas HPLC. Además, permiten analizar un número amplio de muestras y facilitan la realización de estudios cinéticos (Ramos-de-la-Peña y Contreras-Esquivel, 2016).

### ○ **Otros métodos**

Se han desarrollado técnicas de zimografía o zimogramas para determinación de actividad FAE. Los zimogramas se basan en la separación electroforética de una muestra proteica, generalmente en condiciones no desnaturizantes, para, seguidamente, determinar una actividad enzimática concreta gracias al empleo de sustratos específicos y reacciones de revelado. Un ejemplo de estas técnicas es un método basado en la detección de fluorescencia azul claro en las bandas que presentan actividad FAE, frente a un fondo con fluorescencia verde intensa



(McCallum *et al.*, 1991). Otro método de zimografía descrito se basa en la determinación de actividad FAE tras electroforesis en geles de poliacrilamida, a partir de la hidrólisis del sustrato sintético etil ferulato, con la subsiguiente liberación de ácido ferúlico y descenso del pH. Este descenso del pH produce la precipitación de la caseína, que se emplea como indicador y da lugar a bandas blanquecinas sobre el área de actividad FAE (Palaniswamy y Govindaswamy, 2017).

Para la determinación cualitativa de la actividad FAE, es posible emplear ensayos enzimáticos en placa, que permiten analizar un gran número de muestras a la vez. En estos ensayos, se emplean sustratos como el etil ferulato, PAXX o FAXX, embebidos en una matriz de agar o agarosa. La actividad FAE puede determinarse mediante indicadores de pH que revelen un descenso del pH debido a la liberación de ácido ferúlico (Donaghy y McKay, 1994). Estos ensayos, en general, arrojan resultados cualitativos.

Por último, se han desarrollado métodos de electroforesis capilar en zona, si bien estos ensayos presentan inconvenientes: i) necesitan de equipamiento costoso; ii) la técnica es laboriosa, puesto que se requiere pretratamiento (extracción, concentración y resuspensión de las muestras) y iii) se trata de una técnica discontinua (Ramírez-Velasco *et al.*, 2016).

## **MÉTODOS DE ALTO RENDIMIENTO**

En los últimos años se han realizado estudios orientados a desarrollar técnicas de cribado de alto rendimiento para la búsqueda y caracterización de FAEs (del inglés, *high-throughput screening*, HTS). El ensayo HTS ideal ha de ser económico, sencillo de realizar y permitir una determinación rápida y fiable de valores de actividad y selectividad, con precisión y reproducibilidad. Se han publicado algunos métodos HTS para determinación de actividad FAE. Este es el caso de diferentes ensayos en microplaca, empleando sustratos cromogénicos, con fluoróforos o indicadores de pH, determinando la actividad mediante medición en espectrofotómetro en el rango UV o visible (Ramírez *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2012b; Ramírez-Velasco *et al.*, 2016).

### **1.7.5. FAEs fúngicas**

Las FAEs son producidas por organismos pertenecientes a grupos tan diversos como plantas, bacterias y hongos (Udatha *et al.*, 2011), siendo las procedentes de estos últimos las más empleadas en la industria. Estrategias de minería de datos aplicadas a genomas fúngicos para la

búsqueda de FAEs han identificado más de 1000 secuencias hipotéticas de FAEs (Dilokpimol *et al.*, 2016; Dilokpimol *et al.*, 2018). Teniendo en cuenta la presencia de genes potencialmente relacionados con FAEs en varios genomas fúngicos, determinada a partir de estudios recientes, únicamente se conoce un pequeño porcentaje del total de FAEs fúngicas que existen en la naturaleza (Benoit *et al.*, 2008).

Las FAEs fúngicas pueden producirse en cultivo sumergido, o bien mediante fermentación en estado sólido (Gopalan *et al.*, 2015). Además, se ha llevado a cabo su expresión homóloga y heteróloga, esta última empleando plataformas de expresión como *E. coli* (Benoit *et al.*, 2007; Fazary *et al.*, 2010), *S. cerevisiae* (Wong *et al.*, 2011) y *K. phaffii* (Juge *et al.*, 2001; Crepin *et al.*, 2003a; Crepin *et al.*, 2003b; Topakas *et al.*, 2012; Gong *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013; Zeng *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2015; Kelle *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016; Oleas *et al.*, 2017).

Dentro de las FAEs descubiertas, sólo un pequeño número han sido caracterizadas en detalle, pertenecientes únicamente a las subfamilias SF1, SF2, SF5, SF6, SF7 y SF13 (Dilokpimol *et al.*, 2018). Asimismo, por el momento se han publicado pocos estudios sobre la estructura cristalográfica de FAEs fúngicas, destacando, como se ha indicado previamente, los centrados en las enzimas AnFaeA de *A. niger* (McAuley *et al.*, 2004; Hermoso *et al.*, 2004) y AoFaeB de *Aspergillus oryzae* (Suzuki *et al.*, 2014).

Los primeros genes que codifican para FAEs que fueron identificados procedían de los ascomicetos *Aspergillus tubingensis* y *A. niger* (Wong, 2006; Dilokpimol *et al.*, 2016). La expresión de estos genes está sometida a una regulación compleja. Dado que únicamente se han realizado ensayos de expresión en un pequeño número de hongos productores, las bases moleculares de la producción de FAEs se desconocen aún en muchas especies (Benoit *et al.*, 2008). En hongos filamentosos, se han descrito represores (por ejemplo, represores catabólicos como el represor CreA) (Mathew y Abraham, 2004), así como numerosos inductores (factores derivados de los sustratos de crecimiento, como polisacáridos de plantas, AHC y otros compuestos fenólicos; además de otros reguladores transcripcionales, como el activador transcripcional xilanólítico XlnR de *Aspergillus spp.*) (Williamson *et al.*, 1998; de Vries y Visser, 1999). El sistema de inducción mediante ácido ferúlico parece ser independiente del regulador XlnR (Crepin *et al.*, 2004a; Dilokpimol *et al.*, 2016).

Estudios recientes han analizado la presencia de FAEs en especies fúngicas con importancia ecológica e industrial. Este es el caso del hongo productor de antibióticos *P. rubens* Wisconsin 54-1255, en el cual se identificaron 5 secuencias correspondientes a FAEs hipotéticas, adscritas a las subfamilias SF1, SF5, SF7, SF11 y SF13 (Dilokpimol *et al.*, 2016). Dos de ellas, PrFaeA (PcFaeA) y PrFaeB (PcFaeB), han sido objeto de estudio de una Tesis Doctoral, desarrollada en INBIOTEC (Rodríguez-Castro, 2017).

El incremento en el número de genomas fúngicos secuenciados permite llevar a cabo búsquedas por homología para identificar secuencias hipotéticamente relacionadas con FAEs. En este aspecto, la minería de datos será una de las herramientas más prometedoras para el descubrimiento de nuevas FAEs fúngicas (Dilokpimol *et al.*, 2016).

### **1.7.6. Aplicaciones industriales de las FAEs**

Las FAEs de origen fúngico presentan numerosas aplicaciones industriales. Las más importantes se indican a continuación.

#### **○ PROCESAMIENTO DE BIOMASA**

Las FAEs son enzimas accesorias muy importantes para conseguir la hidrólisis completa de la biomasa lignocelulósica (Fazary y Ju, 2008b). Debido a ello, tienen aplicaciones directas en biorrefinería y producción de biocombustibles. Hasta la fecha, se han registrado más de 150 patentes relacionadas con FAEs, orientadas al procesamiento de biomasa. Algunas de estas patentes corresponden a FAEs procedentes de especies fúngicas, como es el caso de varias especies del género *Aspergillus* spp. (*A. oryzae*, *A. niger*, *A. aculeatus*, *A. awamori*, *A. clavatus*, *A. fumigatus*, etc.), que es uno de los productores de FAEs mejor caracterizados, y otras especies, como los ascomicetos *Penicillium funiculosum*, *Chaetomium thermophilum* y *Trichoderma viride* (Dilokpimol *et al.*, 2016).

La hidrólisis completa de los arabinosilanos de la pared celular vegetal requiere de la despolimerización de las cadenas principales, así como de enzimas que eliminen los sustituyentes laterales, como las FAEs (Fazary y Ju, 2007). En general, las FAEs por sí solas no son capaces de extraer altas cantidades de ácido ferúlico libre y tampoco dan lugar a cambios significativos en la estructura de la lignocelulosa o en su solubilidad. No obstante, la inclusión de FAEs en el

tratamiento de la biomasa mejora el rendimiento de la sacarificación. En lo que a esto se refiere, existe una acción sinérgica entre FAEs, celulasas y xilanasas (Fazary y Ju, 2008b). En la producción de biocombustibles, es común llevar a cabo un pretratamiento que libere los carbohidratos de la pared celular vegetal de los compuestos aromáticos a los que están unidos covalentemente. Las FAEs pueden colaborar en estos procesos, sustituyendo o complementando los métodos de pretratamiento físicos y químicos (Faulds, 2010). Las FAEs pueden emplearse también en la producción de xilo-oligosacáridos, con aplicaciones como prebióticos (Dilokpimol *et al.*, 2016).

### ○ **OBTENCIÓN DE ÁCIDO FERÚLICO Y OTROS COMPUESTOS RELACIONADOS**

Las FAEs se emplean en los procesos de extracción de AHC a partir de biomasa lignocelulósica. Los AHC, como el ácido ferúlico, son sustancias de interés industrial debido a sus múltiples aplicaciones, que se detallan en el apartado 1.5.3. El ácido ferúlico puede emplearse de forma directa o utilizarse como precursor para la síntesis de otras moléculas de valor añadido, como la vainillina, que se emplea como aromatizante (Fazary y Ju, 2008b).

Además, puesto que las FAEs son enzimas capaces de catalizar las reacciones de transesterificación de los AHC, pueden emplearse para obtener productos con nuevas propiedades químicas y biológicas (Dilokpimol *et al.*, 2016). Las FAEs han demostrado ser catalizadores interesantes para la síntesis de ésteres azúcar-fenólicos y podrían emplearse para conseguir polímeros funcionales de carbohidratos, mediante la adición de derivados fenólicos a los biopolímeros naturales (Fazary y Ju, 2008b).

Los AHC presentan poca solubilidad en medios apróticos, lo que dificulta su utilización en formulaciones de cosmética y alimentación basadas en aceites y grasas. Las FAEs pueden emplearse en los procesos de modificación de AHC mediante esterificación del grupo funcional carboxilo con sustituyentes adecuados, como glicerol, alcohol o lípidos, lo que permite mejorar su solubilidad en este tipo de solventes (Faulds, 2010).

### ○ **INDUSTRIA PAPELERA**

El blanqueamiento de la pulpa de papel es un proceso importante en la industria papelera, basado en la eliminación de la lignina. En los procesos de blanqueamiento de la pulpa se emplean

sustancias químicas contaminantes o costosas, como derivados del cloro (dióxido de cloro, gas cloro) o peróxido de hidrógeno (Record *et al.*, 2003; Dilokpimol *et al.*, 2016). Estos procesos pueden ser sustituidos por el blanqueamiento enzimático, en el que se emplean FAEs combinadas con xilanasas y enzimas capaces de oxidar la lignina. El blanqueamiento enzimático de la pulpa es sostenible, menos contaminante y, además, permite reducir el consumo de energía durante el proceso y la demanda química de oxígeno de las aguas residuales (Dilokpimol *et al.*, 2016).

Las FAEs pueden ser empleadas, también, para degradar partículas de la pulpa, de modo que se facilite la eliminación del agua (Fazary y Ju, 2008b).

### ○ ALIMENTACIÓN ANIMAL

La mejora de los piensos y productos para alimentación animal es decisiva a la hora de conseguir rendimientos óptimos de la ganadería. Los problemas de digestibilidad afectan al crecimiento de los animales y provocan estrés inmunológico, que facilita la aparición de enfermedades infecciosas (Fazary y Ju, 2008b).

La utilización de FAEs en alimentación animal facilita la degradación de las paredes celulares vegetales y, con ello, mejora la digestibilidad. Además, pese a que los AHC tienen beneficios para la salud, la presencia de estos compuestos fenólicos en las paredes celulares vegetales puede afectar a los procesos fermentativos de los microorganismos ruminales. Las FAEs pueden emplearse para detoxificar productos vegetales y reducir la presencia de dichos compuestos en formulaciones alimentarias para rumiantes (Dilokpimol *et al.*, 2016).

### ○ INDUSTRIA CERVECERA Y DE OTROS PRODUCTOS FERMENTADOS

Las FAEs tienen utilidad en la eliminación de compuestos que producen olores y sabores indeseables, así como para realzar el aroma de ciertas bebidas fermentadas o preparaciones culinarias. Entre los compuestos aromatizantes más importantes relacionados con las FAEs están el etil ferulato (aroma fuerte a cacahuete), el ácido ferúlico y sus derivados, como la vainillina (aroma a vainilla), ácido vanílico y 4-vinil guayacol (aroma a clavo y otras especias, o a manzana). Estos compuestos tienen importancia en bebidas fermentadas, como la cerveza y el sake japonés, o preparaciones culinarias como el *mirin* japonés, un condimento para cocinar de bajo contenido en alcohol (Hashizume *et al.*, 2013; Dilokpimol *et al.*, 2016).

## ○ OTRAS APLICACIONES

Además de los usos industriales de las FAEs anteriormente mencionados, este grupo enzimático tiene aplicaciones en otros campos.

Las FAEs pueden utilizarse en el procesamiento del almidón, junto con proteasas y celulasas, así como en la mejora de las cualidades del pan. También tienen aplicaciones en formulaciones enzimáticas empleadas como detergentes. Algunos microorganismos productores de FAEs, como *Lactobacillus* spp., se emplean como suplemento alimentario para reducir las concentraciones séricas de triglicéridos, la resistencia a insulina y la inflamación hepática (Dilokpimol *et al.*, 2016).

Las FAEs poseen utilidad como herramientas para facilitar el estudio de la estructura de las paredes celulares vegetales, en investigaciones en el campo de la bioquímica de carbohidratos (Fazary y Ju, 2008b). Asimismo, pueden emplearse en industria textil, para mejorar las características de los tejidos de origen vegetal, como el algodón o el lino (Fazary y Ju, 2007).

## 1.8. Objetivos

---

El interés por las FAEs se ha incrementado de manera considerable en los últimos años (Fazary y Ju, 2008b; Gopalan *et al.*, 2015; Dilokpimol *et al.*, 2016) dadas sus aplicaciones biotecnológicas en las industrias farmacéutica, alimentaria animal y humana, papelera, textil y de producción de biocombustibles. La tendencia hacia el desarrollo e implementación de bioprocesos verdes, que sean menos contaminantes y más sostenibles, está potenciando la necesidad de descubrir microorganismos y enzimas lignocelulolíticas con aplicabilidad industrial.

En base a la necesidad de descubrir y caracterizar nuevas FAEs, el **primer objetivo principal** del presente trabajo de Tesis Doctoral es realizar una búsqueda de nuevos cócteles enzimáticos con actividad lignocelulolítica, a partir de especies de hongos procedentes de aislados ambientales y colecciones obtenidas a lo largo de diferentes investigaciones llevadas a cabo en INBIOTEC.

Teniendo en cuenta que la actividad FAE está presente en varias especies del género *Penicillium* spp. (Castanares *et al.*, 1992; Donaghy y McKay, 1997; Panagiotou *et al.*, 2006), en trabajos previos del grupo de investigación se realizó una búsqueda de los genes que codifican para FAEs hipotéticas en el genoma del hongo filamentoso *P. rubens*, hallándose los genes *faeA* y

*faeB* (Rodríguez-Castro, 2017). Las levaduras metilotróficas como *Komagataella* spp. constituyen una herramienta biotecnológica que ofrece la posibilidad de producir altas cantidades de proteínas recombinantes de manera rápida y económica, como se ha demostrado en trabajos previos (Cregg et al., 2000). El **segundo objetivo principal** del presente trabajo de Tesis Doctoral es producir de manera heteróloga las proteínas PrFaeA y PrFaeB de *P. rubens* en cepas de *Komagataella* spp. y purificarlas, para llevar a cabo su caracterización enzimática.

Los objetivos principales y secundarios de la Tesis Doctoral se resumen a continuación:

**A) Búsqueda de nuevos cócteles enzimáticos, a partir de especies fúngicas, para la degradación de residuos lignocelulósicos.**

A.1. Búsqueda cualitativa de nuevas actividades FAE, mediante un cribado inicial de microorganismos potencialmente productores, empleando bioensayo en placa.

A.2. Cuantificación de la actividad FAE y lignocelulolítica de cepas fúngicas preseleccionadas. Selección de cepas fúngicas con actividad FAE.

A.3. Análisis y cuantificación de la capacidad de sacarificación de sustratos vegetales, por parte de los cócteles enzimáticos de las cepas fúngicas seleccionadas.

A.4. Análisis proteómico de los cócteles enzimáticos de las cepas fúngicas seleccionadas.

A.5. Análisis del metaboloma de las cepas microbianas seleccionadas, para identificar los compuestos producidos durante la producción de los cócteles enzimáticos.

A.6. Escalado a nivel de planta piloto para la producción de cócteles enzimáticos lignocelulolíticos.

**B) Expresión heteróloga de las enzimas PrFaeA y PrFaeB de *P. rubens* en levaduras del género *Komagataella* spp. Caracterización bioquímica de PrFaeA y PrFaeB.**

B.1. Clonación de los genes *faeA* y *faeB* de *P. rubens* en plásmidos de expresión de levaduras.

B.2. Expresión heteróloga de los genes *faeA* y *faeB* de *P. rubens* en levaduras. Selección de transformantes con actividad FAE.

B.3. Optimización de medios y condiciones de cultivo para la producción de FAEs en las cepas de levaduras seleccionadas.

B.4. Purificación de FAEs a partir de caldos de fermentación.

B.5. Caracterización bioquímica de las enzimas PrFaeA y PrFaeB.

B.6. Escalado a nivel de planta piloto para la producción de FAEs, empleando transformantes de levaduras productoras.





Laboratorio químico del MIT, Boston: mujeres y hombres en clase (c. 1880). Wellcome Collection. CC BY

# MATERIALES Y MÉTODOS



## 2.1. Reactivos químicos de uso general

---

### 2.1.1. Reactivos para determinación de actividades lignocelulolíticas

Con el objetivo de determinar actividades lignocelulolíticas (actividad FAE, actividades celulolíticas, actividades xilanolíticas), se adquirieron los siguientes reactivos:

**Sustratos sintéticos.** El metil-4-hidroxi-3-metoxicinamato (MFA) se adquirió a Alfa Aesar. El etil-4-hidroxi-3-metoxicinamato (etil ferulato), ácido ferúlico, xilano de madera de abedul, ácido 3,5-dinitrosalícilico (DNS), 4-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosido (pNPX), 4-nitrofenil- $\beta$ -D-celobiosido (pNPC), 4-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (pNPG), 4-nitrofenol, sal sódica de carboximetilcelulosa (CMC), ácido D-(+)-glucónico delta-lactona, rojo Congo y Avicel® PH-101 se obtuvieron de Sigma-Aldrich. El metil-4-hidroxicinamato (MpCA), MCA, MSA, ácido cafeico y ácido sinápico fueron adquiridos a Carbosynth.

**Sustratos lignocelulósicos naturales.** La fibra de avena de molienda en polvo y las semillas de trigo y maíz se adquirieron a un proveedor local. La Sociedad Cooperativa General Agropecuaria ACOR (Valladolid, España) proporcionó la pulpa de remolacha, en forma de *pellets*. A excepción de la avena, que se adquirió en forma de polvo fino, el resto de los sustratos fueron molidos en el laboratorio hasta conseguir un polvo grueso con un diámetro de partícula de 1-5 mm.

## 2.2. Reactivos específicos para Biología Molecular

---

### 2.2.1. Enzimas

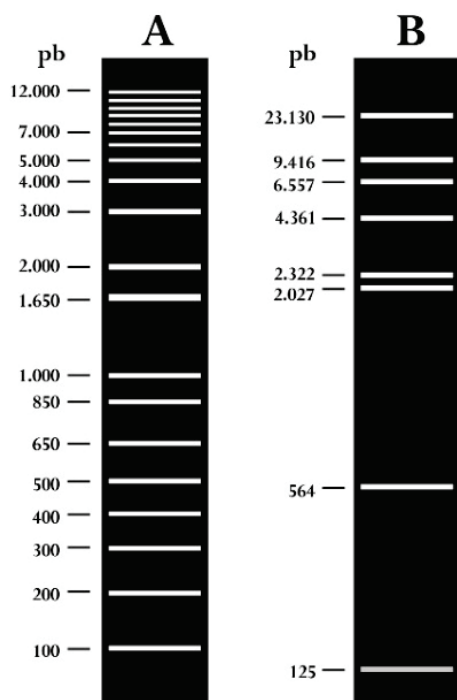
Las endonucleasas de restricción utilizadas en esta memoria se adquirieron a las casas comerciales New England BioLabs, MBI Fermentas, Takara Bio y Roche.

Además, se emplearon polimerasas y enzimas de modificación/ligasas, como ADN **ligasa** del fago T4 (Roche); **ADNasa** I grado amplificación (Sigma-Aldrich); **ADNasa** TURBO™ (Ambion); **ADNasa** libre de ARNasa (Qiagen); **ribonucleasa** A de páncreas bovino

(Sigma-Aldrich); ADN polimerasa GoTaq<sup>®</sup> G2 Flexi (Promega); ADN polimerasa *Pfu* (Biotools); ADN polimerasa de Biotools, en la mezcla *AmpliTools Green Master Mix* (Biotools); ADN polimerasa *Hybrid* (EurX); enzima Klenow (MBI Fermentas). lisozima de clara de huevo (Chemiker-Biochemika Fluka); enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (**Glucanex<sup>®</sup>**, Sigma-Aldrich). Las enzimas se utilizaron según las instrucciones suministradas por el fabricante.

## 2.2.2. Marcadores de peso molecular

El tamaño de los fragmentos de ADN correspondientes a cada banda en las electroforesis en gel de agarosa se determinó por comparación, utilizando los siguientes marcadores comerciales de peso molecular (Fig. 2.1).



**Fig. 2.1.** Esquema de los marcadores de peso molecular de ADN en geles de agarosa al 1%. Se indica el tamaño de los fragmentos en pares de bases (pb). **A)** 1 kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen); **B)** *DNA Molecular Weight Marker II, Digoxigenin-labeled* (Roche).

○ **1 kb Plus DNA Ladder** (Invitrogen). Marcador comercial que presenta bandas entre 100 pb y 12 kpb. Previamente a su utilización, el marcador comercial se diluye en tampón TE <sup>(1)</sup>, a una concentración final de 50 ng/μL. Se emplearon 8 μL por gel.

<sup>(1)</sup> TE: Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 1 mM, pH 8,0; agua destilada.

○ **DNA Molecular Weight Marker II, Digoxigenin-labeled** (Roche). Marcador comercial correspondiente al ADN del fago  $\lambda$ , digerido con la endonucleasa de restricción HindIII y marcado con digoxigenina. Presenta bandas entre 125 pb y 23 kpb. Se utilizaron 15  $\mu$ L por gel.

### 2.2.3. Vectores plasmídicos

Para la clonación de PrFaeA y PrFaeB en levaduras se emplearon tres vectores plasmídicos. Todos los vectores empleados presentan secuencias de vectores bacterianos previstas para la amplificación y manejo en *E. coli*, por lo que se trata de vectores bifuncionales o “lanzadera”.

○ **pPICZ $\alpha$ A (Thermo Fisher Scientific)**. Vector integrativo bifuncional (3,6 kpb), para expresión inducible de proteínas en *Komagataella* spp. Presenta un fragmento de 942 pb que contiene el promotor de la alcohol oxidasa 1 (*AOX1*), un promotor fuerte que permite niveles altos de expresión mediante inducción por metanol. Además, la presencia de este promotor dirige la integración del plásmido en el locus *AOX1* de la levadura, mediante recombinación. El plásmido pPICZ $\alpha$ A presenta una región de clonación múltiple con nueve sitios únicos reconocidos por endonucleasas de restricción, precedida por el factor  $\alpha$  de *S. cerevisiae*, como sistema de secreción. Posee dos epítomos que permiten la detección de la proteína recombinante: i) *c-myc*, reconocido por los anticuerpos Anti-*myc* y Anti-*myc*-HRP (Evan *et al.*, 1985); ii) cola de histidinas C-terminal (6xHis), reconocida por los anticuerpos Anti-His(C-term) (Lindner *et al.*, 1997) y Anti-His(C-term)-HRP, lo que permite la purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad por ligandos metálicos, como  $\text{Ni}^{2+}$  o  $\text{Co}^{2+}$ . Este plásmido incluye también una señal nativa de terminación de la transcripción y poliadenilación del gen *AOX1* que mejora la estabilidad del ARNm. Para la selección de transformantes de *E. coli* y *Komagataella* spp., el vector presenta un gen de resistencia al antibiótico zeocina (Zeo): el gen *Sh ble*, de *Streptoalloteichus hindustanus* (Gatignol *et al.*, 1988; Drocourt *et al.*, 1990; Calmels *et al.*, 1991), regulado por el promotor *TEF1* de *S. cerevisiae* y el promotor sintético de procariotas EM7 de *E. coli*. Por último, pPICZ $\alpha$ A incluye el origen de replicación pUC, para permitir la replicación y el mantenimiento del plásmido en *E. coli*.

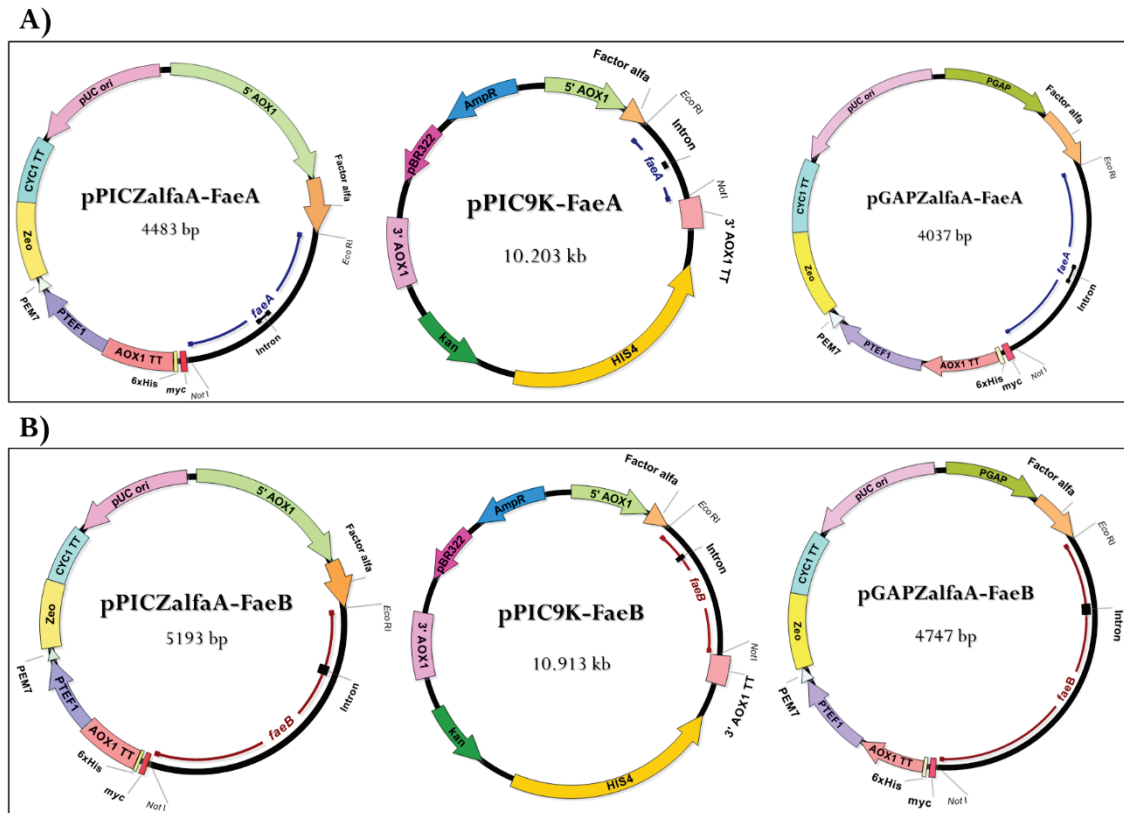
○ **pPIC9K (Thermo Fisher Scientific)**. Vector integrativo bifuncional (9,3 kpb), para expresión inducible de proteínas en *Komagataella* spp. Al igual que pPICZ $\alpha$ A, contiene el promotor *AOX1* y la señal de secreción  $\alpha$ . La selección de transformantes de la levadura que

porten el plásmido se realiza a partir de la reversión de la auxotrofia para His en cepas *his4* de *Komagataella* sp., mediante la presencia en el plásmido del gen que codifica para la histidinol deshidrogenasa (*HIS4*) del fenotipo silvestre. La selección en *E. coli* se realiza mediante el gen de resistencia a ampicilina (*Amp<sup>R</sup>*) o el gen de resistencia a kanamicina (*kan*), que también puede emplearse para la búsqueda de transformantes multicopia utilizando geneticina. El plásmido incluye el origen de replicación para *E. coli* del vector pBR322.

○ **pGAPZ $\alpha$ A (Thermo Fisher Scientific)**. Vector integrativo bifuncional (3,1 kpb), para expresión constitutiva de proteínas en *Komagataella* spp. Presenta el promotor constitutivo de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAP*), lo que además dirige la integración hacia el locus *GAP* del genoma de la levadura. La señal de secreción  $\alpha$  precede a la región de clonación múltiple y, como pPICZ $\alpha$ A, presenta en el extremo C-terminal los epítomos *c-myc* y 6xHis. La selección de transformantes en levaduras y *E. coli* que portan el plásmido se realiza por medio de resistencia a Zeo, de modo similar al pPICZ $\alpha$ A. Presenta el origen de replicación para *E. coli* pUC.

#### 2.2.3.1. Construcciones plasmídicas

Para conseguir la sobreexpresión de los genes *faeA* (933 pb) y *faeB* (1643 pb) de *P. rubens* Wisconsin 54-1255 en cepas de *Komagataella* spp., se llevaron a cabo construcciones empleando los plásmidos previamente indicados. Se diseñaron oligonucleótidos cebadores mediante homología con la secuencia de cada gen, incluyendo sitios de corte para las endonucleasas de restricción EcoRI (cebadores directos) y NotI (cebadores inversos), según se detalla en el apartado 2.2.4. Se diseñaron construcciones para conseguir la expresión de los genes con y sin intrones (ADNc). En la Fig. 2.2 se indican las construcciones empleadas.



**Fig. 2.2.** Esquemas de los plásmidos empleados para la sobreexpresión de *faeA* y *faeB* en *Komagataella* spp. Se indican las construcciones correspondientes a la clonación de *faeA* y *faeB* con fragmentos intrónicos. Las construcciones se realizaron también sin los fragmentos intrónicos (ADNc), de 90 pb (*faeA*) y 59 pb (*faeB*). Todas las construcciones incluyen la señal de secreción  $\alpha$ . **A) Construcciones *faeA*.** De izq. a dcha.: construcción para expresión inducible por metanol, selección mediante resistencia a Zeo; construcción para expresión inducible por metanol, selección mediante reversión de la auxotrofia para His; construcción para expresión constitutiva, selección mediante resistencia a Zeo. **B) Construcciones *faeB*.** Las características, de izq. a dcha., son similares a las indicadas para las construcciones *faeA*.

## 2.2.4. Oligonucleótidos cebadores

Los oligonucleótidos sintéticos utilizados como cebadores en las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) fueron adquiridos a Sigma-Aldrich e IDT. El diseño de los oligonucleótidos, a los que se les añadieron secuencias de corte para endonucleasas de restricción, se llevó a cabo según las recomendaciones incluidas en el catálogo comercial de New England Biolabs. En la Tabla 2.1, se indican los oligonucleótidos empleados, así como sus características.

**Tabla 2.1. Oligonucleótidos cebadores empleados.** Se detalla el nombre, secuencia (5' a 3') y modificaciones que presentan con respecto a la secuencia original (subrayadas). La letra F indica que se trata de un cebador directo; la letra R, de un cebador inverso.

Nombre	Secuencia 5'→3'	Modificaciones
PP-A-F	CCG <u>G</u> AATTCATGAAAATCTCCGCACCACG	Corte EcoRI
PP-B-F	CCG <u>G</u> AATTCATGACTCGTCTTCATGTGTT	Corte EcoRI
PP-N-A-R	AAGGAAAAA <u>A</u> GC <u>G</u> GC <u>C</u> CGCTACCAGCTGCAAGCTCCGC	Corte NotI
PP-N-B-R	AAGGAAAAA <u>A</u> GC <u>G</u> GC <u>C</u> CGCTAAACACACTGCCAAGCGT	Corte NotI
1- <i>fae</i> B-F	CTTCATGTGTTGCCCTTGTT	Ninguna
2- <i>fae</i> B-F	TTCCC <span style="text-decoration: underline;">G</span> AAACCAACAT	Ninguna
3- <i>fae</i> B-F	CGCTGGTGC <u>C</u> CCCTGCTATC	Ninguna
4- <i>fae</i> B-F	ATCCTCGCTGCACCAATAAT	Ninguna
5- <i>fae</i> B-F	ATTGCGGTGATGGAGATG	Ninguna
1- <i>fae</i> B-R	CACACTGCCAAGCGTTCT	Ninguna
2- <i>fae</i> B-R	CAGCTTGGAGTTGTCG	Ninguna
3- <i>fae</i> B-R	GACTTGGGCGCTTGTGAGAC	Ninguna
4- <i>fae</i> B-R	TTGT <span style="text-decoration: underline;">C</span> GAAGCCCTCCTCA	Ninguna
5- <i>fae</i> B-R	CGTGATCTCGCTGCTA	Ninguna
<i>LfaeA</i>	TACAACGCCCAAACCGATA	Ninguna
<i>RfaeA</i>	TGTCAAATGGAGCGAGAGTG	Ninguna
<i>LfaeB</i>	AAATGGTGGTATCTCTGGGTGT	Ninguna
<i>RfaeB</i>	TGTACCGTTGTGTCCGTTGT	Ninguna
HispGAPZ-R	AAGGAAAAA <u>A</u> GC <u>G</u> GC <u>C</u> CGCAACACACTGCCAAGCGTTCTC	Corte NotI. Eliminado el codón de paro del inserto
pGAP_F	GTCCCTATTTCAATCAATTGAA	Ninguna
3'_AOX1	GCAAATGGCATTCTGACATCC	Ninguna
PCRcheckRHis	TGTCTAAGGCTAAAACCTCAATG	Ninguna
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Ninguna
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Ninguna
NL-1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	Ninguna
NL-4	GGTCCGTGTTTTCAAGACGG	Ninguna



## 2.2.5. Reactivos y sistemas comerciales

Varios de los procedimientos que se describen en esta memoria se han realizado utilizando *kits* comerciales. Estos *kits* incluyen los reactivos necesarios y se utilizaron de acuerdo a las instrucciones suministradas por el fabricante. Los *kits* empleados se indican a continuación:

○ ***illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit*** (GE Healthcare Life Sciences). Recuperación, purificación y concentración de productos de PCR y fragmentos de ADN de tamaño entre 50 pb y 10 kpb, a partir de geles de agarosa o soluciones de ADN.

○ **Kit de transformación *Pichia EasyComp™*** (Invitrogen). *Kit* para preparación de células competentes y transformación en *Komagataella* spp.

○ ***QIAEX® II Gel Extraction Kit*** (Qiagen). Recuperación, purificación y concentración de productos de PCR y fragmentos de ADN de tamaño comprendido entre 40 pb y 50 kpb, a partir de bandas de geles de agarosa o soluciones de ADN.

○ ***RNeasy Plant Mini Kit*** (Qiagen). Obtención y purificación de ARN total de hongos filamentosos a pequeña escala. Contiene además todos los reactivos del sistema comercial RNeasy Mini Kit, para aislamiento de ARN total de levaduras. Se empleó también para el tratamiento de muestras de ARN con ADNasa en columna.

○ **Sistema de RT-PCR *SuperScript® III One-Step con ADN polimerasa Platinum® Taq*** (Invitrogen). Sistema comercial para síntesis de ADNc, mediante transcripción inversa y amplificación por PCR (RT-PCR). Incluye una mezcla de transcriptasa inversa *SuperScript® III* y ADN polimerasa de alta fidelidad *Platinum® Taq*.

○ ***TURBO DNA-free™*** (Ambion). Sistema comercial para la eliminación selectiva de ADN contaminante en muestras de ARN. Empleado para la eliminación de ADN genómico (ADNg), previamente a su empleo en RT-PCR.

○ ***2-D Clean-Up Kit*** (GE Healthcare Life Sciences). *Kit* para limpieza de muestras de proteínas para su empleo en electroforesis bidimensional.

## 2.3. Reactivos específicos para Proteómica

---

Para llevar a cabo los métodos proteómicos incluidos en la memoria, se utilizaron los siguientes reactivos específicos:

○ **Marcador de peso molecular para proteínas *Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards*** (Bio-Rad). Marcador comercial de peso molecular para proteínas, constituido por una mezcla de diez proteínas recombinantes con tinción azul, de tamaños comprendidos entre 10 y 250 kDa.

○ **Otros reactivos específicos.** Cóctel de Inhibidores de Proteasas cComplete™ (Roche); reactivo para la cuantificación de proteínas basado en el método de Bradford (Bio-Rad); *Buffer IPG* (PlusOne, GE Healthcare); glicina (PlusOne, GE Healthcare); persulfato de amonio (PlusOne, GE Healthcare); TEMED (PlusOne, GE Healthcare); SDS (PlusOne, GE Healthcare); tiourea (PlusOne, GE Healthcare); iodoacetamida (PlusOne, GE Healthcare); Tris (PlusOne, GE Healthcare); urea (PlusOne, GE Healthcare); CHAPS (PlusOne, GE Healthcare); DTT (PlusOne, GE Healthcare); azul de bromofenol (PlusOne, GE Healthcare); aceite de cobertura para las tiras *Immobiline DryStrip* (PlusOne, GE Healthcare); Endo H (New England Biolabs).

## 2.4. Equipamiento

---

### 2.4.1. Equipamiento para Microbiología

#### 2.4.1.1. Cabinas de flujo laminar

La siembra de microorganismos y la preparación de soluciones en esterilidad se llevó a cabo en la cabina de flujo laminar vertical Telstar AV-100 (Telstar Life Sciences, Terrassa, España).

#### 2.4.1.2. Agitadores orbitales con incubación

El cultivo sumergido de *E. coli* (37 °C), *K. phaffii* (23 y 28-30 °C) y hongos filamentosos (28 °C) en matraz Erlenmeyer de 50 mL, 100 mL, 250 mL 500 mL y 2 L se llevó a cabo en el interior de agitadores orbitales con incubación.

○ **Agitador orbital INNOVA 4230** (New-Brunswick Scientific). Matraces Erlenmeyer de 50, 100, 250, 500 mL y 2 L.

○ **Agitador orbital FORMA 480** (Thermo Electron Corporation, actualmente Thermo Fisher Scientific). Matraces Erlenmeyer de 250, 500 mL y 2 L.

### *2.4 1.3. Biorreactores*

El cultivo a menor escala de levaduras del género *Komagataella* spp. se llevó a cabo en el microbiorreactor **BioLector**<sup>®</sup>, empleando placas de 48 pocillos *FlowerPlate*<sup>®</sup> (m2p-labs GmbH, Baesweiler, Alemania). Estas placas poseen pocillos en forma de flor, que aumentan la superficie de intercambio gaseoso y favorecen la oxigenación. Los pocillos presentan fondo transparente para la determinación de densidad óptica en tiempo real. Incluyen en la base dos optodos (sensores ópticos precalibrados) para la determinación en tiempo real de valores de oxígeno disuelto (OD) y pH, en cada pocillo independientemente. El equipo *BioLector*<sup>®</sup> empleado pertenece a la organización de investigación SINTEF (Trondheim, Noruega), y se utilizó en el marco de una estancia investigadora internacional.

El escalado a mayores volúmenes (a escala laboratorial) se realizó en los siguientes biorreactores:

○ **Biorreactor Braun Biostat**<sup>®</sup> **B**. Biorreactor de 5 L, propiedad de INBIOTEC, donde se realizaron cultivos sumergidos de hongos filamentosos en un volumen de trabajo de 3 L (B. Braun Biotech. Melsungen, Alemania. Actualmente Sartorius).

○ **Biorreactor Applikon 3 L**. Biorreactor de 3 L, propiedad de SINTEF, utilizado para el cultivo sumergido de levaduras del género *Komagataella* spp. en un volumen de trabajo de 1,5 L (Applikon Biotechnology. Delft, Países Bajos).

## **2.4.2. Equipamiento para Biología Molecular**

### *2.4.2.1. Termocicladores*

Para la amplificación de ADN por PCR y RT-PCR se usaron los instrumentos indicados a continuación.

○ **Termociclador *Biometra Thermocycler TGradient ThermoBlock*** (Biometra. Goettingen, Alemania).

○ **Termociclador *Biometra TProfessional Basic Gradient PCR Thermocycler*** (Biometra).

#### 2.4.2.2. Equipos de electroforesis

La electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa se llevó a cabo empleando:

○ **Fuente de alimentación *PowerPac 300*** (Bio-Rad).

○ **Cubeta de electroforesis horizontal *Sub-cell<sup>®</sup> GT*** (Bio-Rad).

○ **Cubeta de electroforesis horizontal *Mini-Sub<sup>®</sup> Cell GT*** (Bio-Rad).

○ **Cubeta de electroforesis horizontal *Wide Mini-Sub Cell GT Cell*** (Bio-Rad).

#### 2.4.2.3. Transiluminadores de luz UV

La visualización de los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, se realizó mediante transiluminadores de luz UV.

○ **Transiluminador de luz UV *ECX-26-M*** ( $\lambda = 312$  nm. Vilber Lourmat. Francia).

○ **Transiluminador de luz UV *Spectroline TR-302*** ( $\lambda = 302$  nm. Spectrum Medical Industries Inc. Los Ángeles, California, EEUU), incluido en un sistema de documentación de geles ***GeneFlash Bio Imaging Gel Documentation System*** (Syngene Bioimaging, Synoptics group. Reino Unido). Incluye vídeo-impresora ***Video Graphic Printer UP-860CE*** (Sony Corporation. Tokio, Japón) acoplada, para la captura en papel de las imágenes fluorescentes de los geles de agarosa registradas por el equipo.

○ **Sistema de documentación de geles *VWR Smart3*** (VWR). Sistema para la visualización en tiempo real de geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Incluye una pantalla táctil y permite salvar las imágenes obtenidas en dispositivos USB. Incluye un transiluminador de luz UV ( $\lambda = 302$  nm).

#### *2.4.2.4. Equipamiento para hibridación de tipo Southern*

La transferencia de ADN dentro del método de hibridación Southern se llevó a cabo utilizando el sistema de inmunotransferencia de ácidos nucleicos por vacío **Amersham™ VacuGene XL** y la bomba **VacuGene Pump** (GE Healthcare Life Sciences).

Para fijar el ADN a membranas de *nylon* mediante irradiación con luz UV, se empleó el equipo **Stratalinker® 2400 UV Crosslinker, 230V** (Stratagene).

Las hibridaciones se llevaron a cabo en el **baño con agitación de vaivén Unitronic 320 OR** (J.P. Selecta).

#### *2.4.2.5. Equipamiento para electroporación*

Para llevar a cabo la transformación de levaduras mediante electroporación, se utilizó el instrumento **Gene Pulser® II** (Bio-Rad).

#### *2.4.2.6. Equipamiento para análisis de calidad y cuantificación de ácidos nucleicos*

Para determinar la calidad, integridad y limpieza de muestras de ARN se empleó el equipo **Bioanalyzer 2100** (Agilent), que permite realizar electroforesis mediante chips y nanocapilares.

Para cuantificar muestras de ADN y ARN se utilizó el espectrofotómetro **Nanodrop 1000** (Thermo Fisher Scientific).

### **2.4.3. Equipamiento para estudios de Proteómica**

#### *2.4.3.1. Equipos para electroforesis*

La electroforesis monodimensional de proteínas se llevó a cabo utilizando el siguiente equipamiento:

- **Fuente de alimentación PowerPac 300** (Bio-Rad).
- **Cámara de electroforesis y sistema de polimerización de geles Mini-Protean II** (Bio-Rad).

Todos los instrumentos empleados para electroforesis bidimensional de proteínas fueron adquiridos a GE Healthcare Life Sciences. Se utilizó el siguiente equipamiento:

- **Unidad para separación de proteínas por isoelectroenfoque (IEF) Ettan IPGphor II.**

- **Sarcófagos (*strip holders*)** para tiras *Immobiline™ DryStrip* y Sistema de IEF *Ettan IPGphor II*.

- **Tiras *Immobiline™ DryStrip*** de 7 cm y de 18 cm, con gradiente de pH inmovilizado de 3,0 a 10,0 NL (no lineal).

- **Sistema de electroforesis Ettan DALTsix:** molde vertical para la preparación y polimerización de geles; cámara de electroforesis para separación de proteínas (segunda dimensión); fuente de alimentación/unidad de control EPS 601.

- **Refrigerador por circulación *MultiTemp III ThermoStatic Circulator*, 230 VAC.** Permite una mejor separación y resolución en la segunda dimensión de la electroforesis bidimensional de proteínas.

- **Escáner *ImageScanner III*** y *software* para el análisis de imágenes de geles bidimensionales de proteínas *ImageMaster 2D Platinum v.5.0*.

#### 2.4.3.2. *Sistemas de transferencia de proteínas*

La transferencia de proteínas en geles de poliacrilamida a membranas se realizó mediante:

- **Sistema para transferencia semiseca *Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell*** (Bio-Rad).

- **Sistema para transferencia rápida *Trans-Blot® Turbo™ Transfer System*** (Bio-Rad).

#### 2.4.3.3. *Espectrometría de masas (MS)*

Se empleó un espectrómetro de masas 4800 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF (AB Sciex).

#### 2.4.4. Equipos de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

○ **Equipo HPLC Agilent.** Constituido por un módulo de desgasificación *Agilent 1100 HPLC G1379A*; inyector automático *Agilent 1100 HPLC G1329A*; termostato para inyector automático *Agilent 1200 Series G1330B ALS Therm*; bomba binaria *Agilent 1200 Series G1312A*; compartimento termostatizado de columna *Agilent 1100 HPLC G1316A* y detector de matriz de fotodiodos (PDA) *Agilent 1100 HPLC G1315B*.

○ **Equipo HPLC Waters.** Con módulo de desgasificación *Waters In-Line Degasser*; inyector automático *Waters 717 Plus*; bomba *Waters 600*; controlador de sistema *Waters 600*; termostato de columna *CAN/CSA C22.2*; detector de luz UV-Vis de doble longitud de onda *Waters 2487*; detector de matriz de fotodiodos (PDA) *Waters 996*; detector de índice de refracción *Waters 2410*.

○ **Columnas HPLC.** Los AHC y sus ésteres se determinaron mediante dos columnas cromatográficas analíticas de fase reversa: i) *Kinetex<sup>®</sup> 2.6 $\mu$ m EVO C18 100 Å* (150 x 4,6 mm. Phenomenex. Torrance, California, EEUU) y ii) *Mediterranea<sup>™</sup> Sea 18 3  $\mu$ m* (150 x 4,6 mm. Teknokroma. Barcelona, España). Los azúcares se analizaron con la columna cromatográfica *CARBOSEP COREGEL 87P 8 $\mu$ m* (300 x 7,8 mm. Transgenomic. Omaha, Nebraska, EEUU).

#### 2.4.5. Equipo de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC)

La purificación de proteínas con epítopos 6xHis, se realizó mediante el equipo *ÄKTA FPLC* (GE Healthcare Life Sciences) y la columna *IMAC HisTrap<sup>™</sup> HP* (GE Healthcare Life Sciences). *ÄKTA FPLC* incluye un monitor con una unidad óptica *UPC-9000* (lámpara UV y detector 280 nm); bomba *P-920*; cámara de mezclado *M-925* y sistema de inyección *INV-907*.

#### 2.4.6. Otros equipos

##### 2.4.6.1. Centrífugas

○ **Centrífuga Sorvall RC-5B Plus** (Sorvall. Newtown, Connecticut, EEUU), rotor GSA.

- **Centrífuga de mesa ALLEGRA 21R** (Beckman Coulter). Refrigerada, tubos 50 mL.
- **Centrífuga de mesa ALLEGRA X22R** (Beckman Coulter). Refrigerada, tubos 10 mL.
- **Centrífuga de mesa 5810R** (Eppendorf). Refrigerada, tubos 10 mL y Falcon 50 mL.
- **Centrífugas de mesa 5415R** (refrigerada), **5415C** y **5415D** (Eppendorf). Microtubos de 1,5 y 2,2 mL.

#### 2.4.6.2. Instrumentos de uso general

- **Espectrofotómetros de luz UV-Visible U-2900 y U-2001** (Hitachi. Tokio, Japón).
- **Centrífugas evaporadoras de solventes SVC-100H Speedvac SC-110** (Savant Instruments Inc. Hicksville, Nueva York, EEUU) y **RC10.10** (Jouan SA. Saint-herblain, Pays de la Loire, Francia).

---

## 2.5. Microorganismos utilizados

---

### 2.5.1. Cepas bacterianas

○ ***E. coli* XL1-Blue** (Bullock *et al.*, 1987). Cepa bacteriana empleada para la amplificación del ADN plasmídico. Es una cepa deficiente en endonucleasa I (*endA1*), lo que aumenta la calidad de las preparaciones de ADN. La estabilidad de los insertos se ve incrementada al presentar la forma inactiva de la proteína RecA (*recA1*), implicada en la reparación y mantenimiento del ADN, por lo que esta mutación reduce la aparición de recombinaciones indeseadas. La mutación *hsdR* evita la digestión del ADN clonado provocada por el sistema *EcoK* de la bacteria. Además, esta cepa posee una deleción en el gen *lacZ* del operón *lac* (*lacIqZΔM15* presente en el episoma F'). La deleción da lugar a una forma inactiva de la β-galactosidasa (fragmento ω) que, al ser complementada por el fragmento α presente en distintos vectores de clonación, restituye la actividad β-galactosidasa (α-complementación). La α-complementación es el fundamento de la selección de clones mediante el método *blue-white* (azul-blanco).

Genotipo: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZΔM15 Tn10* (Tetr)].



## 2.5.2. Cepas fúngicas

### 2.5.2.1. Levaduras

Las cepas de levaduras empleadas pertenecen a la especie denominada tradicionalmente *Pichia pastoris*, aislada por primera vez en 1920 a partir del exudado de un castaño en Francia (Guilliermond, 1920). Tras análisis filogenéticos, *P. pastoris* ha sido reasignada al género *Komagataella* spp., dividido a su vez en tres especies: *K. pastoris*, *K. pseudopastoris* y *K. phaffii* (Yamada *et al.*, 1995; Kurtzman, 2005). Todas las cepas empleadas en el presente trabajo para la expresión heteróloga de FAEs poseen un fenotipo de crecimiento rápido en metanol (Mut<sup>+</sup>).

○ ***K. phaffii* GS115.** Cepa derivada de la cepa NRRL Y-11430 (Küberl *et al.*, 2011; Sturmberger *et al.*, 2016), producida mediante mutagénesis química con nitrosoguanidina y selección por auxotrofia para His. Dicha auxotrofia se debe a una mutación en el gen de la histidinol deshidrogenasa (*his4*), que puede ser revertida mediante la utilización de vectores de clonación que contengan el gen *HIS4* (Cregg *et al.*, 1985). Este proceso se emplea como marcador de selección autotrófico (De Schutter *et al.*, 2009). Cepa adquirida a Invitrogen.

Genotipo: *his4*.

○ ***K. phaffii* X-33.** Cepa de fenotipo silvestre obtenida a partir de *K. phaffii* GS115, mediante reversión de la auxotrofia para His. Cepa adquirida a Invitrogen.

○ ***K. phaffii* SMD1168H.** Cepa con actividad proteolítica reducida, por ausencia de actividad proteinasa A (*pep4*), lo que mejora la estabilidad de las proteínas recombinantes producidas.

Genotipo: *pep4*.

### 2.5.2.2. Hongos filamentosos

En el presente trabajo, se ha analizado la actividad FAE de distintas cepas de hongos filamentosos, obtenidas tanto de colecciones como por aislamiento a partir de muestras ambientales (García-Calvo *et al.*, 2018).

○ ***P. rubens* Wisconsin 54-1255.** Cepa obtenida mediante mutación y selección de *P. rubens* NRRL1951, a su vez aislada durante la Segunda Guerra Mundial a partir de un melón cantalupo enmohecido en Illinois, EEUU (Raper *et al.*, 1944; Elander, 1983). Constituye una cepa de baja producción de penicilina que se ha convertido en un referente como modelo de laboratorio. Su genoma completo ha sido secuenciado y publicado (van den Berg *et al.*, 2008). La cepa fue amablemente cedida por el Dr. A. L. Demain (M.I.T., Cambridge, Massachusetts, EEUU).

○ ***P. rubens* Wisconsin A78.** Cepa derivada de *P. rubens* Wisconsin 54-1255, obtenida mediante ingeniería genética para la sobreexpresión de PrFaeA. Dicha cepa forma parte del trabajo de Tesis Doctoral de la Dra. R. Rodríguez Castro (Rodríguez-Castro, 2017).

○ ***P. rubens* Wisconsin B13.** Cepa derivada de *P. rubens* Wisconsin 54-1255, obtenida de forma similar a *P. rubens* A78, pero, en este caso, para la sobreexpresión de PrFaeB. Ha sido obtenida durante el trabajo de Tesis Doctoral de la Dra. R. Rodríguez Castro (Rodríguez-Castro, 2017).

○ ***P. roseopurpureum* PDA(2)10.** Aislado ambiental procedente de superficies metálicas originarias de una zona costera con clima atlántico (La Coruña, España). Las muestras ambientales fueron recogidas en el marco del proyecto europeo BIOCORIN (“*New biocoating for corrosion inhibition in metal surfaces*” FP7-ENVIRONMENT PROJECT ID 282881).

○ ***P. verrucosum* JCOS10C.** Cepa aislada a partir de una superficie plástica procedente de un clima continental frío (León, España). El aislado ambiental pertenece a la especie *P. verrucosum*, descrita a principios del siglo XX.

○ ***A. alternata* PDA1.** Cepa aislada a partir de muestras ambientales obtenidas de superficies metálicas dentro del proyecto BIOCORIN (García-Calvo *et al.*, 2018). Las muestras se recogieron de un clima mediterráneo seco (Madrid, España). *Alternaria* spp. fue descrita por primera vez a principios del siglo XIX (Nees von Esenbeck, 1816) y constituye un género ubicuo que incluye especies de hongos saprófitos, endófitos y patógenos.

○ ***A. alternata* PDA8.** Cepa obtenida de muestras ambientales recuperadas de superficies metálicas dentro del proyecto BIOCORIN, procedentes de un clima mediterráneo seco (Madrid, España).

○ *F. oxysporum* PDA(2)2. Cepa aislada de muestras ambientales obtenidas de superficies metálicas dentro del proyecto BIOCORIN, originarias de una zona costera con clima atlántico (La Coruña, España).

○ *F. oxysporum* PDA(2)4. Cepa obtenida mediante aislamiento, procedente de muestras ambientales de una zona costera con clima atlántico (La Coruña, España), dentro del proyecto BIOCORIN.

○ *P. herbarum* PDA(3)1. Aislado ambiental obtenido a partir de muestras ambientales recogidas de superficies metálicas de una zona costera mediterránea (Nápoles, Italia), como parte del proyecto BIOCORIN.

## 2.6. Medios de cultivo

En el presente trabajo se utilizaron medios complejos y definidos para el cultivo de bacterias, levaduras y hongos filamentosos. Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121 °C, durante 20 min. Para evitar la reacción de Maillard entre aminoácidos y azúcares, las soluciones ricas en azúcares se esterilizaron por separado y fueron añadidas antes de utilizar los medios. La esterilización de soluciones por filtración se llevó a cabo mediante filtros estériles de PES (polietersulfona) de 0,22 µm de diámetro de poro y unidades de filtración Stericup® (Millipore).

A continuación, se detallan las cantidades necesarias para la preparación de 1 L de cada medio. Todos los medios se prepararon utilizando agua destilada.

### 2.6.1. Medios de cultivo para *E. coli*

○ **Medio LB** (Luria-Bertani) (Miller, 1972).

<i>Componente</i>	<i>Cantidad (para 1 L)</i>
NaCl	10 g
Bacto-triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g

Ajustar el pH a 7,5 empleando NaOH 1 N. Ajustar el volumen final hasta 1 L con agua destilada. Para su utilización como medio sólido (**LA**), añadir un 2 % (p/v) de agar.

○ **Medio LB bajo en sales.** Modificación del medio LB para su utilización en selección de transformantes de *E. coli* por resistencia al antibiótico Zeo. En presencia de elevada fuerza iónica, o en medio muy ácido o muy alcalino, la actividad de la Zeo se ve inhibida.

<i>Componente</i>	<i>Cantidad (para 1 L)</i>
NaCl	5 g
Bacto-triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g

Ajustar el pH a 7,5 empleando NaOH 1 N. Ajustar el volumen final hasta 1 L con agua destilada. Para su utilización como medio sólido (LA bajo en sales), añadir 1,5 % (p/v) de agar.

○ **Medio TB** (*Terrific Broth*) (Tartof y Hobbs, 1987). Medio líquido para el crecimiento de *E. coli*.

<i>Componente</i>	<i>Cantidad (para 1 L)</i>
Bacto-triptona	12 g
Extracto de levadura	24 g
Glicerol	4 g
Agua destilada	Hasta 900 mL

Después de esterilizar, añadir 100 mL de una solución de  $K_2HPO_4$  720 mM,  $KH_2PO_4$  170 mM, previamente esterilizada por filtración.

○ **Medio SOB** (Hanahan, 1983). Medio de cultivo empleado para el crecimiento de *E. coli* en la preparación de células competentes.

<i>Componente</i>	<i>Cantidad (para 1 L)</i>
Bacto-triptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	0,5 g

Tras disolver estos componentes, añadir 10 mL de KCl 250 mM. Ajustar el pH a 7,0 con KOH 5 M y añadir agua destilada hasta 1L. Después de autoclavar, añadir 10 mL de  $MgCl_2$  1 M  $MgSO_4$  1 M, esterilizado por filtración.

## 2.6.2. Medios de cultivo para levaduras

○ **Medio YPD** (Lodder, 1970). Medio complejo para el crecimiento y almacenamiento de levaduras del género *Komagataella* spp.

<i>Componente</i>	<i>Cantidad (para 1 L)</i>
Bacto-peptona	20 g
Extracto de levadura	10 g
Agua destilada	Hasta 900 mL

Disolver los componentes, esterilizar en autoclave y añadir 100 mL de la solución concentrada de dextrosa (D 10X)<sup>(2)</sup>, esterilizada por filtración. Para su utilización como medio sólido, añadir un 2 % (p/v) de agar.

<sup>(2)</sup> Solución concentrada de dextrosa (D 10X): 20 % (p/v) dextrosa (D-glucosa), agua destilada.

○ **Medio YPDm**. Medio YPD modificado (40 g/L de dextrosa, en lugar de 20 g/L).

○ **Medio YPDS**. Medio complejo para la selección de transformantes de *Komagataella* spp. mediante resistencia a Zeo. El sorbitol contribuye a la regeneración de las levaduras tras la transformación, proceso en el que el daño a la pared celular aumenta su sensibilidad osmótica.

<i>Componente</i>	<i>Cantidad (para 1 L)</i>
Sorbitol (1 M)	182,2 g
Bacto-peptona	20 g
Extracto de levadura	10 g
Agua destilada	Hasta 900 mL

Una vez disueltos estos componentes, esterilizar en autoclave y añadir 100 mL de la solución concentrada de dextrosa (D 10X), esterilizada por filtración. Para su utilización como medio sólido, añadir un 2 % (p/v) de bacto-agar.

○ **Medios RDB y RDHB**. Medio sólido para el cultivo en placa de *Komagataella* spp. Utilizado para preparar la base de las placas para selección por reversión de la auxotrofia para His.

<i>Componente</i>	<i>Cantidad (para 1 L)</i>
Sorbitol	186 g
Bacto-agar	20 g
Agua destilada	700 mL

Autoclavar la solución con los componentes arriba mencionados. Atemperar a 60 °C y añadir una mezcla de soluciones precalentadas a 45 °C: 100 mL de D 10X, 100 mL de YNB 10X <sup>(3)</sup>, 2 mL de la solución concentrada de biotina (B 500X) <sup>(4)</sup>, 10 mL de la solución concentrada de aminoácidos (AA 100X) <sup>(5)</sup> y 88 mL de agua destilada estéril. Para cepas con genotipo *his4*, añadir a lo anterior 10 mL de la solución concentrada de His (H 100X) <sup>(6)</sup> (medio RDBH); para la selección de transformantes protótrofos para His, omitir la adición de H 100X.

<sup>(3)</sup> **YNB 10X**: 13,4 % (p/v) base nitrogenada de levadura (YNB) con sulfato de amonio y sin aminoácidos (Invitrogen), agua destilada. Calentar la solución hasta su disolución. Esterilizar por filtración, mantener a 4 °C. <sup>(4)</sup> **Solución concentrada de biotina (B 500X)**: 0,02 % (p/v) biotina. Esterilizar por filtración y mantener a 4 °C. <sup>(5)</sup> **Solución concentrada de aminoácidos (AA 100X)**: 0,5 % (p/v) de cada uno de los siguientes aminoácidos: ácido L-glutámico, L-metionina, L-lisina, L-leucina y L-isoleucina, agua destilada. Esterilizar por filtración y mantener a 4 °C. <sup>(6)</sup> **Solución concentrada de His (H 100X)**: 0,4 % (p/v) His, agua destilada. Calentar la solución hasta un máximo de 50 °C para disolver. Esterilizar por filtración, mantener a 4 °C.

○ **Medios RD y RDH top agar**. Medio utilizado en forma líquida, atemperado a 45 °C, para añadir a las soluciones de levaduras tras la transformación de esferoplastos y verter como capa cobertera sobre placas de medio RD/RDH. Su preparación es similar a la de los medios RDB/RDBH, pero utilizando un 1 % (p/v) de bacto-agar en lugar de 2 %.

○ **Medios MD y MDH** (medio mínimo con dextrosa y medio mínimo con dextrosa e His). Medios empleados para la determinación del fenotipo Mut de los transformantes de levaduras.

<i>Componente</i>	<i>Cantidad (para 1 L)</i>
Agua destilada estéril	800 mL
YNB 10X	100 mL
D 10X	100 mL
B 500X	2 mL

Atemperar la solución de agua destilada estéril a 60 °C y añadir el resto de componentes, en condiciones de esterilidad. Esterilizar todas las soluciones por filtración (el agua destilada, en autoclave). Para el crecimiento de cepas de *Komagataella* spp. con genotipo *his4*, preparar el medio MDH, añadiendo a los componentes anteriores 10 mL de H 100X. Para preparar placas,

añadir un 1,5 % (p/v) de bacto-agar, mediante la inclusión de 15 g de bacto-agar en la solución de agua destilada, antes de esterilizarla en autoclave.

○ **Medios MM y MMH** (medio mínimo con metanol y medio mínimo con metanol e His). Medios empleados para la determinación del fenotipo Mut de los transformantes de levaduras. La preparación es similar a los medios MD/MDH, pero añadiendo 100 mL de la solución concentrada de metanol (M 10X)<sup>(7)</sup>, en lugar de D 10X.

<sup>(7)</sup> Solución concentrada de metanol (M 10X): 5 % (v/v) metanol. Esterilizar por filtración y mantener a 4 °C.

○ **Medios BMGY y BMMY** (medio complejo tamponado, con glicerol y medio complejo tamponado, con metanol). Medio empleado en la expresión extracelular de proteínas recombinantes en *Komagataella* spp. El extracto de levadura mejora la estabilidad de la proteína recombinante. BMGY se emplea en la primera fase de la expresión, orientada a la obtención de biomasa, mientras que BMMY se utiliza en la fase siguiente, donde se induce la expresión.

Componente	Cantidad (para 1 L)
Bacto-peptona	20 g
Extracto de levadura	10 g
Agua destilada	Hasta 700 mL

Mezclar los componentes y esterilizar en autoclave. Enfriar a temperatura ambiente y añadir 100 mL tampón fosfato de potasio 1 M, pH 6,0<sup>(8)</sup>; 100 mL de YNB 10X; 100 mL de la solución concentrada de glicerol (GY 10X)<sup>(9)</sup>; 2 mL de B 500X. Para preparar el medio BMMY, añadir 100 mL de M 10X, en lugar de GY 10X.

<sup>(8)</sup> Tampón fosfato de potasio 1 M, pH 6,0: 132 mL  $K_2HPO_4$  1 M, 868 mL  $KH_2PO_4$  1 M. Verificar pH de 6,0 ± 0,1 (ajustar con KOH y  $H_3PO_4$ ). <sup>(9)</sup> Solución concentrada de glicerol (GY 10X): 10 % (v/v) glicerol. Esterilizar en autoclave o por filtración.

○ **Medio LM1** (comunicación personal H. Sletta. Resultados pendientes de publicación). Medio líquido definido para el crecimiento de cepas de la levadura metilotrófica *Hansenula polymorpha* (syn. *Pichia angusta*), adaptado para *Komagataella* spp. Se utilizaron combinaciones distintas para analizar diferentes condiciones. En todos los casos, el medio LM1 se preparó partiendo de una solución principal, a la que se añadieron soluciones de minerales traza, vitaminas y sulfato de magnesio. Además, se analizaron diferentes condiciones en cuanto a la estabilidad del

pH (medio sin tamponar, incluyendo MOPS o MES) y a la suplementación con componentes ricos en proteínas y aminoácidos (sin suplementos, con/sin extracto de levadura y con/sin peptona/casaminoácidos).

Solución principal LM1

<i>Componentes</i>	<i>Cantidad (para 1 L)</i>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10,9 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,76 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 g
KCl	2,3 g
NaCl	0,5 g
Na-EDTA	0,1 g
Agua destilada	Hasta 602 mL

Mezclar los componentes, ajustar el pH a 6,0 con HCl concentrado y esterilizar en autoclave. Antes de utilizar, añadir el resto de soluciones, en condiciones de esterilidad: 10 mL de solución de minerales traza LM1 por L de medio; 20 mL de solución de vitaminas<sup>(10)</sup> por L de medio; 18,2 mL de solución concentrada de sulfato de magnesio<sup>(11)</sup> por L de medio. Además, se añadieron 100 mL por L de medio de la solución de fuente de carbono, esterilizada por separado, para una concentración final de 20 o 40 g/L de dextrosa, o bien 20 o 40 g/L de glicerol.

Solución de minerales traza LM1

<i>Componentes</i>	<i>Cantidad (para 1 L)</i>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,05 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	10 g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,8 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3 g
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	4 g
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,09 g
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,1 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,1 g
KI	0,1 g
HCl concentrado	50 mL
Agua destilada	Hasta 1 L

<sup>(10)</sup> *Solución de vitaminas (50X):* 0,5 % (p/v) tiamina-HCl, 0,0015 % (p/v) biotina. <sup>(11)</sup> *Solución sulfato de magnesio:* 24,65 % (p/v) MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O.



El medio LM1 base fue modificado para analizar distintas condiciones:

- Control del pH: añadir 100 mL por L de medio de i) agua destilada, ii) tampón MES 10X<sup>(12)</sup>, o bien iii) tampón MOPS 10X<sup>(13)</sup>.
- Suplementación con reactivos ricos en sustancias de naturaleza proteica.
  - Extracto de levadura: añadir 50 mL de solución concentrada de extracto de levadura 20X<sup>(14)</sup> por L de medio.
  - Peptona/casaminoácidos: añadir 100 mL de: i) solución concentrada de peptona 10X<sup>(15)</sup>, o ii) solución concentrada de casaminoácidos 10X<sup>(16)</sup> por L de medio.

<sup>(12)</sup> *Tampón MES 10X*: 10 % (p/v) MES hidrato (Sigma-Aldrich). <sup>(13)</sup> *Tampón MOPS 10X*: 10 % (p/v) MOPS (Sigma-Aldrich).

<sup>(14)</sup> *Extracto de levadura 20X*: 20 % (p/v) extracto de levadura. <sup>(15)</sup> *Peptona 10X*: 20 % (p/v) peptona bacteriológica (BD).

<sup>(16)</sup> *Casaminoácidos 10X*: 20 % (p/v) bacto-casaminoácidos (BD).

○ **Medio BSM, Basal Salts Medium** (Stratton *et al.*, 1998) **modificado**. Medio definido para fermentación en *Komagataella* spp. El medio BSM se preparó partiendo de una solución principal, suplementada con una solución de minerales traza y biotina.

<u>Solución principal BSM</u>	
<i>Componentes</i>	<i>Cantidad (para 1 L)</i>
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 85 %	26,7 mL
CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,93 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	18,2 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	14,9 g
KOH	4,13 g
Agua destilada	Hasta 900 mL

Mezclar los componentes arriba mencionados. Ajustar el pH a 5,0 con una solución de NH<sub>4</sub>OH 30 %, que además actúa como fuente de nitrógeno durante la fermentación, y esterilizar en autoclave. Previamente a su utilización, añadir 100 mL de solución de fuente de carbono, esterilizada por separado, para una concentración final de 40 g/L de dextrosa o 40 g/L de glicerol. El medio final se completó con la adición de 2 mL de solución de minerales traza PMT1 por L de medio y 1 mL de B 500X por L de medio.

Solución de minerales traza PMT1

<i>Componentes</i>	<i>Cantidad (para 1 L)</i>
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	6 g
KI	0,8 g
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	3 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,2 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,2 g
CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,5 g
ZnCl <sub>2</sub>	20 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	65 g
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrado	5 mL
Agua destilada	Hasta 1 L

○ **Medio FM22** (Stratton *et al.*, 1998) **modificado**. Medio definido para fermentación de *Komagataella* spp.

Solución principal FM22

<i>Componentes</i>	<i>Cantidad (para 1 L)</i>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	42,9 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 g
CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	14,3 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	11,7 g
Agua destilada	Hasta 900 mL

Solución de minerales traza PMT4

<i>Componentes</i>	<i>Cantidad (para 1 L)</i>
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	2 g
NaI	0,08 g
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	3 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,2 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,02 g
CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,5 g
CoCl <sub>2</sub>	0,5 g
ZnCl <sub>2</sub>	7 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	22 g
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrado	1 mL
Agua destilada	Hasta 1 L

Mezclar los componentes de la solución principal, ajustar el pH a 4,5 con KOH concentrado y autoclavar. Antes de utilizar, añadir 100 mL de solución de fuente de carbono, esterilizada por separado, para una concentración final de 40 g/L de dextrosa o 40 g/L de glicerol. Añadir 1 mL de solución de minerales traza PMT4 y 1 mL de B 500X por L de medio.

Al igual que en el caso del medio LM1, se realizaron modificaciones del medio FM22 para el análisis de distintas condiciones de cultivo. En este caso, se incluyeron los siguientes suplementos, para un volumen final de 1 L de medio:

- Suplementación con reactivos ricos en sustancias de naturaleza proteica.
  - Extracto de levadura: se añadieron 50 mL por L de medio de agua destilada, o bien solución concentrada de extracto de levadura 20X.
  - Peptona/casaminoácidos: se añadieron 100 mL por L de medio de i) agua destilada, ii) solución madre de peptona 10X, o bien iii) solución madre de casaminoácidos 10X.

### 2.6.3. Medios de cultivo para hongos filamentosos

○ **Medio Power 2 (PW2).** Medio empleado para la esporulación y mantenimiento de ascomicetos procedentes de aislados ambientales y *P. rubens* Wisconsin 54-1255. Obtenido a partir de una modificación del medio Power, que se prepara mediante la combinación de los medios PM<sub>1</sub> y Czapek-KCl 0,7 M (López-nieto *et al.*, 1985; Fernández *et al.*, 1994).

<i>Componentes</i>	<i>Cantidad (para 1 L)</i>
Sacarosa	25 g
Lactosa	5 g
Peptona bacteriológica	2,5 g
Sólidos de maceración del maíz	0,5 g
KCl	52 g
NaNO <sub>3</sub>	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,25 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,275 g
NaCl	2 g
CuSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,0005 g
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,0015 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,03 g

Ajustar el pH a 6,75 y el volumen final a 1 L con agua destilada. Para su utilización como medio sólido, añadir un 2 % (p/v) de agar. Esterilizar en autoclave.

○ **Medio MPPY o PMMY** (Anné, 1977; Fierro *et al.*, 1993) **modificado**. Medio líquido para germinación y crecimiento de hongos filamentosos:

<i>Componentes</i>	<i>Cantidad (para 1 L)</i>
Glucosa	40 g
NaNO <sub>3</sub>	3 g
Extracto de levadura	2 g
KCl	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01 g

Ajustar el pH a 6,0 y el volumen final hasta 1 L con agua destilada. Esterilizar en autoclave.

○ **Medio EF** (Donaghy y McKay, 1994). Medio sólido empleado para la búsqueda de nuevas actividades FAE en cepas fúngicas. Se utilizó para determinar el grado de actividad FAE de forma cualitativa, a partir del halo de hidrólisis de etil ferulato alrededor de colonias o caldos de cultivo.

<i>Componentes</i>	<i>Cantidad (para 1 L)</i>
<u>Solución A</u>	
Agar bacteriológico	10 g
Agua destilada	Hasta 1 L
<u>Solución B</u>	
Etil ferulato	0,5 g
Etanol absoluto	Hasta 10 mL

Las soluciones A y B se esterilizan por separado [solución A en autoclave; solución B por filtración, mediante filtros estériles de 0,22 µm de diámetro de poro (Millipore)]. Atemperar la solución A a 50 °C y añadir 1,5 mL de solución B estéril por cada 100 mL de solución A.

○ **Medio SL** (medio con sustratos lignocelulósicos). Medio para el crecimiento en cultivo sumergido de hongos filamentosos. Contiene glucosa como primera fuente de carbono para favorecer la proliferación del hongo, además de un sustrato de carácter lignocelulósico como fuente de carbono en etapas posteriores de la fermentación. Los sustratos lignocelulósicos actúan, asimismo, como inductores de la producción de enzimas lignocelulolíticas.

Componentes	Cantidad (para 1 L)
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5 g
KCl	0,5 g
Peptona de soja	1 g
Glucosa	1 g
Agua destilada	Hasta 1 L

Ajustar el pH a 5,0 y añadir 1 mL de solución concentrada de FeSO<sub>4</sub><sup>(17)</sup> por L de medio. Añadir 2 % (p/v) de sustrato lignocelulósico: en su caso, pulpa de remolacha (medio **M-SBP**), fibra de avena de molienda en polvo (medio **M-OAT**), harina de trigo (medio **M-WHEAT**), harina de maíz (medio **M-CORN**) o Avicel<sup>®</sup> PH-101 (Sigma-Aldrich). Esterilizar en autoclave.

<sup>(17)</sup> Solución concentrada de FeSO<sub>4</sub>: FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 67,26 mM. Esterilizar por filtración y almacenar a 4 °C y en oscuridad.

## 2.6.4. Suplementación con antibióticos

Los medios de cultivo fueron suplementados con antibióticos para favorecer la selección de clones que presenten resistencias (Sambrook y Russell, 2001).

Los antibióticos se disolvieron en agua destilada para obtener soluciones concentradas, que se esterilizaron por filtración a través de filtros estériles de 0,22 μm (Fisherbrand, Millipore). Para su conservación, se prepararon alícuotas que se almacenaron a -20 °C.

○ **Ampicilina** (Amp). Se preparó una solución a una concentración de 200 mg/mL del producto farmacéutico Britapen (Laboratorio Reig Jofre, SA). Se utilizó para la selección de transformantes a través del gen de resistencia a Amp del vector plasmídico pPIC9K. La concentración final de Amp empleada para selección en *E. coli* fue de 100 μg/mL, en medio LB.

○ **Zeocina** (Zeo. Apollo Scientific). Se preparó una solución a una concentración de 100 mg/mL. Empleado como marcador de selección bifuncional para *E. coli* (concentración final de 25 μg/mL, en medio LB bajo en sales) y *Komagataella* spp. (concentración final de 100 μg/mL, en medio YPD/YPDS), tras su transformación con pPICZαA y pGAPZαA.

## 2.7. Cultivo, crecimiento y mantenimiento de microorganismos

---

### 2.7.1. Cepas bacterianas

El **crecimiento** de *E. coli* XL1-Blue en medio sólido se realizó en placas de Petri con medio LA, a 37 °C, durante 12 h. Los cultivos en medio líquido se llevaron a cabo inoculando colonias desde una placa a un matraz liso de 500 mL, con 100 mL de medio LB en agitadores orbitales, a 37 °C y con una agitación constante de 220 o 250 rpm. Para el cultivo selectivo de clones resistentes a antibióticos, los medios se suplementaron con: i) para clones resistentes a Amp, 100 µg/mL en medio LB; ii) para clones resistentes a Zeo, 25 µg/mL en medio LB bajo en sales.

La **conservación** de las cepas bacterianas se llevó a cabo de distinto modo, en función del tiempo de mantenimiento requerido. Para periodos cortos de hasta un mes, se conservaron a 4 °C, en placa de Petri protegida con Parafilm<sup>®</sup>, para evitar la pérdida de humedad. Para la conservación de los cultivos durante periodos de tiempo mayores, se realizó una suspensión de glicerol a una concentración final del 20 % (v/v), que se almacenó a -20 °C o, para una viabilidad más prolongada, a -80 °C.

La **medida del crecimiento** bacteriano se determinó por un método turbidimétrico, mediante la lectura de la absorbancia del cultivo a 600 nm en un espectrofotómetro.

### 2.7.2. Levaduras

El **crecimiento** de *Komagataella* spp., se llevó a cabo en placas de Petri con medio sólido YPD, a 30 °C. Para el cultivo en medio líquido, se utilizaron los medios recogidos en el apartado 2.6.2, a 23 o 28-30 °C y agitación orbital de 250 rpm. Se emplearon tanto matraces lisos como con deflectores, que favorecen la oxigenación. Los cultivos a menor escala se realizaron en el microbiorreactor *BioLector*<sup>®</sup>, empleando placas de 48 pocillos *FlowerPlate*<sup>®</sup>. Se utilizó un volumen de trabajo de 1,2 mL de medio por pocillo, con una agitación de 1.250 rpm, humedad relativa del 85% y temperatura de 30 °C. El escalado a mayores volúmenes se llevó a cabo en un fermentador Applikon 3 L, a 30 °C, empleando un volumen de trabajo de 1,5 L de medio YPDm.

La **conservación** de las cepas de levaduras para almacenamiento a corto plazo se llevó a cabo en placas de Petri con medio YPD, protegidas con Parafilm<sup>®</sup>, a 4 °C. Los cultivos se mantuvieron mediante siembra periódica a partir de placas, resemebradas mensualmente. Para su conservación durante periodos más prolongados, se prepararon suspensiones de células en glicerol a una concentración final del 20 % (v/v), almacenadas a -20 o a -80 °C.

La **medida del crecimiento** de las levaduras se determinó por un método turbidimétrico, mediante la lectura de la absorbancia del cultivo a 600 nm en un espectrofotómetro.

### 2.7.3. Hongos filamentosos

El **crecimiento y esporulación** en medio sólido de las diferentes cepas de hongos filamentosos, se realizó en medio PW2, incubándose durante 120 h a una temperatura de 28 °C. Para el crecimiento en medio líquido, se inocularon esporas procedentes de una placa de medio PW2 en matraz liso con medio MPPY y se cultivaron durante 24 h, con agitación orbital de 250 rpm y a 28 °C, hasta conseguir una masa micelial uniforme. Este cultivo se utilizó como preinóculo para la siembra en matraces lisos con medio SL. El escalado se llevó a cabo en fermentadores Braun Biostat<sup>®</sup> de 5 L, con un volumen de trabajo de 3 L de medio SL.

Para la **conservación** de las cepas fúngicas, se aprovechó la capacidad que presentan estos organismos para dar lugar a estructuras asexuales de reproducción que actúan como formas de resistencia (conidios). La conservación a corto plazo (meses) se realizó almacenando placas de Petri con medio PW2 con micelio esporulado, selladas con Parafilm<sup>®</sup>, a 4 °C. Para la conservación para periodos de tiempo más prolongados (hasta varios años) se almacenaron suspensiones de esporas al 40 % (v/v) de glicerol, a -20 °C. Para periodos mayores, las soluciones de esporas fueron almacenadas a -80 °C, o bien se liofilizaron las suspensiones de conidios.

La **medida del crecimiento** de hongos filamentosos durante las fermentaciones se llevó a cabo mediante el cálculo de peso seco por volumen de medio. Para ello, se llevaron a cabo recogidas seriadas a distintos tiempos de fermentación. Se separó la masa micelial del sobrenadante por filtración a través de membranas de *nylon* NYTAL de 30 µm de poro, o bien centrifugación a 2.880 x *g* durante 30 min. El micelio se colocó en recipientes adecuados y se sometió a secado durante mínimo una semana en horno a 80 °C, hasta la estabilización del peso.

## 2.8. Herramientas de análisis informático

---

El análisis y tratamiento rutinario de las secuencias de ADN y proteínas se llevó a cabo mediante el paquete informático **DNA STAR Lasergene** v. 7.1.0, que contiene diferentes programas: i) *EditSeq*, para importar y editar secuencias en formato especial, así como para determinar la secuencia de proteínas traducida a partir de una secuencia de ADN y obtener secuencias complementarias y reversas complementarias; ii) *SeqBuilder*, para la edición de secuencias, simulaciones virtuales de clonación y diseño de oligonucleótidos; iii) *PrimerSelect*, para el diseño avanzado y evaluación de oligonucleótidos; iv) *SeqMan*, para la realización de alineamientos entre diferentes secuencias y análisis de homología.

El análisis de geles de Proteómica se llevó a cabo con las siguientes aplicaciones: i) para geles monodimensionales SDS-PAGE, **ImageQuant TL** (GE Healthcare Life Sciences); ii) para geles bidimensionales, **Labscan 5.00** v. 1.0.8 (GE Healthcare Life Sciences) e **ImageMaster™ 2D Platinum** v. 5.0 (GE Healthcare Life Sciences).

Las cinéticas enzimáticas fueron estudiadas por medio del paquete estadístico para análisis de datos científicos *SigmaPlot*® 12, siendo verificadas mediante ajuste no lineal por medio del método de mínimos cuadrados con el complemento “*Solver*” de Microsoft Excel (Kemmer y Keller, 2010).

Para el desarrollo del presente trabajo, han sido empleadas las siguientes bases de datos:

- **CDD** (*Conserved Domains Database*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>).
- **ChemSpider** ([www.chemspider.com](http://www.chemspider.com))
- **COGs** (*Clusters of Orthologous Groups*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>).
- **DDBJ** (*DNA Data Bank of Japan*. <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>).
- **EMBL-EBI** (*European Bioinformatics Institute*. [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)).
- **GenBank** (*NIH genetic sequence database*. [www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/)).
- **KEGG** (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*. <http://www.genome.jp/kegg/>).



○ **MassHunter METLIN Metabolite PCD** (*Personal Compound Database. Agilent Technologies*).

○ **PDB** (*Protein Data Bank. <http://www.rcsb.org/>*).

○ **PubChem** (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

○ **RefSeq** (*NCBI Reference Sequence Database. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>*).

Además, se han empleado motores de búsqueda y análisis de homología, así como otras herramientas disponibles en internet (Li *et al.*, 2015b):

○ **BLAST** (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1990). Herramienta que permite el alineamiento de secuencias de ADN, ARN y proteínas con secuencias almacenadas en bases de datos, ordenándolas en base a su porcentaje de identidad. Disponible *online* a través del NCBI (National Center of Biotechnology Information) en la página web <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

○ **Clustal Omega** (Sievers *et al.*, 2014). Herramienta *online* que permite el alineamiento múltiple de tres o más secuencias (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

○ **InterPro** (Finn *et al.*, 2017). Herramienta para el análisis funcional de proteínas a través de su clasificación en familias y estudio de dominios y sitios funcionales, a partir de modelos predictivos obtenidos de las bases de datos que conforman el consorcio InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

○ **Mascot** (Perkins *et al.*, 1999). Motor de búsqueda empleado para la identificación, caracterización y cuantificación de proteínas a partir de los resultados obtenidos por MS ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)).

○ **SignalP v. 4.1** (Nielsen *et al.*, 1997; Petersen *et al.*, 2011). Servidor *online* de DTU Bioinformatics (Dinamarca) que predice la presencia y localización de péptidos señal a partir de secuencias de aminoácidos de diferentes microorganismos ([www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)).

○ **SecretomeP v. 2.0** (Bendtsen *et al.*, 2004). Servidor *online* del DTU Bioinformatics (Dinamarca) para la predicción de la presencia de mecanismos de secreción que no tienen un

comportamiento clásico y, por consiguiente, no pueden ser detectados por la herramienta *SignalP* ([www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP](http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP)).

○ **ExPASy ProtParam tool** (Gasteiger *et al.*, 2005). Herramienta que permite estimar diferentes parámetros de una proteína, como peso molecular (MW), punto isoeléctrico (pI), índices de inestabilidad, composición aminoacídica, etc. (<https://web.expasy.org/protparam/>).

○ **Servidores NetNGlyc 1.0** (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) y **NetOGlyc 4.0** (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>). Permite la predicción de sitios potenciales de N-glicosilación y O-glicosilación en proteínas, respectivamente.

---

## 2.9. Aislamiento de ADN

---

### 2.9.1. Aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli* a gran escala (lisis alcalina)

Para llevar a cabo el aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli* a gran escala, se siguió el método de la lisis alcalina, basado en la desnaturalización alcalina selectiva a pH controlado del ADN cromosómico, mientras que el ADN plasmídico permanece en forma circular. Tras la neutralización del pH, el ADN cromosómico se renaturaliza en forma de un coágulo insoluble, quedando el ADN plasmídico en el sobrenadante (Birnboim y Doly, 1979). El protocolo empleado se basa en el descrito por Zhou y colaboradores (Zhou *et al.*, 1997).

- ▶ Inocular 100 mL de medio TB o LB, en matraz liso de 500 mL, con células de *E. coli* portadoras del plásmido a aislar. Incubar durante 12-16 h, a 37 °C y 250 rpm. El medio debe estar suplementado con el o los antibióticos de selección para el mantenimiento del plásmido.
- ▶ Repartir cada cultivo en dos tubos Falcon de 50 mL. Recoger las células mediante centrifugación a 3.220 x *g*, durante 10 min a 4 °C y retirar el sobrenadante.
- ▶ Resuspender el precipitado celular en 1 mL de GTE<sup>(18)</sup> frío por tubo (2 mL de GTE por cada 100 mL cultivo), con ayuda de un agitador vórtex. Juntar en un mismo tubo los 2 mL de suspensión de células en GTE correspondientes a un mismo matraz.
- ▶ Añadir 2 mL de solución de lisozima<sup>(19)</sup> en GTE. Mezclar con cuidado e incubar durante 5 min a temperatura ambiente.

- ▶ Desnaturalizar selectivamente el ADN cromosómico, mediante la adición de 8 mL de solución alcalina/SDS<sup>(20)</sup> y agitación suave. Mantener la mezcla en hielo durante 10 min, mezclando cada 1 min. La mezcla debe ir tomando un aspecto mucoso o coagulado.
- ▶ Para precipitar las proteínas y restos celulares, añadir 6 mL de una solución fría de acetato potásico 4 M pH 4,8 y agitar vigorosamente, hasta conseguir una mezcla homogénea. Incubar en hielo durante 10 min y centrifugar a 3.220 x g, durante 30 min a 4 °C.
- ▶ Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo Falcon de 50 mL, filtrando a través de una gasa estéril. Añadir 0,7 volúmenes de isopropanol (aprox. 12,6 mL) y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5,2 (aprox. 1,8 mL). Mezclar e incubar a temperatura ambiente, durante 15 min.
- ▶ Los ácidos nucleicos se recogen por centrifugación durante 30 min, a 4 °C y 3.220 x g. Desechar el sobrenadante y lavar el precipitado con una solución de etanol al 70 %<sup>(21)</sup>.
- ▶ Centrifugar durante 5 min, a 4 °C y 3.220 x g. Retirar el sobrenadante y dejar secar el precipitado al aire hasta la completa evaporación del etanol.
- ▶ Resuspender el precipitado en 1 mL de tampón TE. Es posible interrumpir el protocolo en este paso, almacenando la muestra a 4 °C durante el menor tiempo posible.
- ▶ Eliminar el ARN contaminante tratando cada mL de muestra con 1 µL de una solución de 10 mg/mL de ARNasa libre de ADNasa, durante 1 h, a 37 °C.
- ▶ Eliminar las proteínas de la muestra mediante fenolización (ver apartado 2.10.1), repitiendo, al menos, dos veces el paso de fenol-CIA y una el de CIA (cloroformo/alcohol isoamílico).
- ▶ Precipitar el ADN con 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío (-20 °C) y 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5,2, durante un mínimo de 12 h a -20 °C.
- ▶ Recuperar el ADN plasmídico aislado mediante centrifugación a 16.168 x g y 4°C, durante 30 min. Lavar con etanol al 70 %, centrifugar, eliminar el etanol y dejar secar el precipitado. Resuspender en 100 µL de agua destilada. Almacenar a -20 °C. En lugar de agua destilada, puede emplearse tampón TE y almacenarse a 4 °C (el tampón TE puede interferir en la utilización subsiguiente de la muestra de ADN en reacciones con enzimas de restricción, PCR, etc.).

<sup>(18)</sup> **GTE:** glucosa 50 mM; Tris-HCl 25 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM, pH 8,0. Esterilizar en autoclave, excepto la glucosa, que se esteriliza por filtración y se añade posteriormente. Conservar a 4°C. <sup>(19)</sup> **Solución de lisozima:** 10 mg/mL lisozima en tampón GTE. <sup>(20)</sup> **Solución alcalina/SDS:** NaOH 0,2 N; 1 % (p/v) SDS (dodecil-sulfato sódico), en solución acuosa. Preparar esta solución justo antes de utilizar. <sup>(21)</sup> **Etanol 70 %:** diluir etanol absoluto en agua destilada para una concentración 70 % (v/v).

## 2.9.2. Minipreparaciones de ADN plasmídico de *E. coli* (minipreps)

El método de minipreparaciones (Holmes y Quigley, 1981) se utilizó para obtener ADN plasmídico de *E. coli* rápidamente y a pequeña escala. El ADN plasmídico recuperado es suficiente para analizar plásmidos recombinantes aislados de transformantes de *E. coli*, verificarlos mediante enzimas de restricción, PCR o secuenciación y llevar a cabo una selección rápida de clones.

- ▶ Tomar una colonia aislada de *E. coli* con un palillo estéril e inocular un microtubo de 1,5 mL, que contenga 1 mL de medio TB, suplementado con el marcador o los marcadores de resistencia necesarios para el mantenimiento del plásmido. Incubar a 37 °C y 250 rpm de agitación, durante 8-16 h.
- ▶ Recoger las células centrifugando a 5.000 x *g*, durante 4 min. Eliminar el sobrenadante y resuspender las células en 300 µL de tampón STET<sup>(22)</sup>. Añadir 10 µL de una solución de lisozima 10 mg/mL, preparada en agua destilada justo antes de su empleo. Incubar durante 45 s con agitación fuerte.
- ▶ Inmediatamente después de la lisis de las células, incubar la reacción en **agua hirviendo** durante 45 s. Este tratamiento produce la desnaturalización del ADN cromosómico y de las proteínas. Centrifugar durante 15 min a 16.168 x *g*. Eliminar el precipitado de proteínas y restos celulares con ayuda de un palillo estéril.
- ▶ Añadir sobre el sobrenadante 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5,2 y un volumen de isopropanol. Tras 10 min, el ADN plasmídico precipitado se recupera centrifugando durante 10 min a 16.168 x *g*.
- ▶ Lavar el precipitado con una solución de etanol al 70 %. Tras centrifugar, eliminar la solución de etanol y dejar secar al aire. Resuspender el precipitado en 40 µL de tampón TE y almacenar a 4 °C.

<sup>(22)</sup> **Tampón STET:** 8 % (p/v) sacarosa; 0,5 % (v/v) Tritón X-100; Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 50 mM, pH 8,0; en solución acuosa.

## 2.9.3. Aislamiento de ADN total de levaduras

Para llevar a cabo el aislamiento de ADN total de levaduras se emplearon dos protocolos. El primero permite recuperar una mayor cantidad de ADN, que es de mayor calidad y con menos contaminantes. El segundo es un método rápido adecuado para obtener ADN que pueda ser empleado de forma directa en reacciones de amplificación por PCR para el análisis rápido de transformantes.

### 2.9.3.1. Método de lisis mediante preparación de esferoplastos

Este método se basa en el incluido en el manual *Pichia Expression Kit for expression of recombinant proteins in Pichia pastoris*, de Invitrogen. Permite aislar ADN total de levaduras para aplicaciones tales como hibridación de tipo Southern o reacciones de amplificación por PCR.

- ▶ A partir de un parche en placa procedente de una colonia aislada, inocular con un asa de siembra 10 mL de medio mínimo para levaduras (MD, o bien MDH para levaduras auxótrofas para la His). Dejar crecer hasta una  $DO_{600}$  de 5-10 (24-36 h).
- ▶ Recoger las células mediante centrifugación a 1.500 x g, durante 5-10 min, a temperatura ambiente.
- ▶ Eliminar el sobrenadante, lavar las células con 10 mL de agua estéril y centrifugar a 1.500 x g, durante 5-10 min, a temperatura ambiente.
- ▶ Resuspender las células en 2 mL de tampón SCED pH 7,5<sup>(23)</sup>, preparado justo antes de su utilización.
- ▶ Añadir 48 µL de una solución de Glucanex<sup>®</sup> (24) y tratar durante 50 min a 37 °C. El tiempo óptimo de tratamiento se determinó para un porcentaje de esferoplastos <80 % (apartado 2.16.3).
- ▶ Añadir 2 mL de 1 % (p/v) SDS, mezclar con cuidado y colocar en hielo (0 a 4 °C), durante 5 min.
- ▶ Añadir 1,5 mL de acetato potásico 5 M, pH 8,9. Mezclar con cuidado.
- ▶ Centrifugar a 10.000 x g, durante 5-10 min. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio.
- ▶ Añadir dos volúmenes de etanol absoluto sobre el sobrenadante. Incubar a temperatura ambiente durante 15 min.
- ▶ Centrifugar a 10.000 x g, durante 20 min, a 4 °C.
- ▶ Resuspender el precipitado con cuidado en 700 µL de tampón TE, pH 7,4. Transferir a un microtubo de 2,2 mL.
- ▶ Eliminar las proteínas de la muestra mediante fenolización (apartado 2.10.1).
- ▶ Recuperar la fase acuosa (superior) y precipitar el ADN con 1/2 volumen de acetato de amonio 7,5 M, pH 7,5 y dos volúmenes de etanol absoluto frío (-20 °C). Mantener un mínimo de 10 min a -80 °C, o 1 h a -20 °C.
- ▶ Centrifugar a 10.000 x g, durante 20 min, a 4 °C. Lavar el precipitado con etanol al 70 %. Centrifugar nuevamente y dejar secar el precipitado al aire, hasta que el etanol se haya evaporado por completo.
- ▶ Resuspender el precipitado en 50 µL de tampón TE pH 7,5.

<sup>(23)</sup> **Tampón SCED:** sorbitol 1 M; citrato de sodio 10 mM, pH 7,5; EDTA 10 mM; DTT 10mM; en solución acuosa, preparado justo antes de su uso. <sup>(24)</sup> **Solución de Glucanex<sup>®</sup>:** solución de 15 mg/mL de Glucanex<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich), en agua destilada.

### 2.9.3.2. Método rápido de extracción de ADN para aplicaciones de PCR

El método de extracción rápida de ADN<sub>g</sub> de levaduras a partir de cultivos líquidos de bajo volumen o colonias en placa (Lõoke *et al.*, 2017)., se fundamenta en el empleo de una solución de acetato de litio-SDS. Permite la recuperación de aproximadamente 100 ng de ADN<sub>g</sub> total a partir de  $1 \times 10^7$  células. Esta técnica puede ser empleada para el genotipado rápido, detección de productos de PCR o una amplificación de ADN<sub>g</sub> inicial, previa a su secuenciación.

- ▶ Tomar una colonia de levaduras en placa, o bien centrifugar a 15.000 x *g* durante 5 min un cultivo líquido de 100-200  $\mu$ L ( $DO_{600}=0,4$ ). Resuspender las células en 100  $\mu$ L de solución de acetato de litio-SDS<sup>(25)</sup>.
- ▶ Incubar durante 5 min a 70 °C.
- ▶ Añadir 300  $\mu$ L de etanol absoluto frío (-20 °C) y mezclar mediante agitador tipo vórtex.
- ▶ Centrifugar el ADN y los restos celulares, durante 3 min a 15.000 x *g*.
- ▶ Lavar el precipitado con una solución de etanol al 70 %.
- ▶ Centrifugar durante 5 min a 15.000 x *g*. Eliminar el sobrenadante y dejar secar al aire, hasta que el etanol se haya evaporado completamente.
- ▶ Disolver el precipitado en 100  $\mu$ L de agua destilada estéril, mediante incubación a 65 °C, durante 10 min y agitación vórtex.
- ▶ Una vez disuelto el precipitado, centrifugar durante 15 s a 15.000 x *g*, para precipitar los restos celulares en el fondo el microtubo.
- ▶ Transferir 75  $\mu$ L de sobrenadante conteniendo ADN<sub>g</sub> a un microtubo limpio, evitando aproximarse al precipitado de restos celulares.
- ▶ Emplear 1  $\mu$ L de sobrenadante como ADN molde para amplificación mediante PCR.

<sup>(25)</sup> *Solución de acetato de litio-SDS: acetato de litio 0,2 M; 1 % (p/v) SDS; esterilizar por filtración.*

### 2.9.4. Aislamiento de ADN total de hongos filamentosos

La extracción de ADN total de hongos filamentosos se llevó a cabo mediante **dos métodos rápidos** que permiten recuperar una cantidad de ADN en suficiente cantidad y calidad. En aquellos casos en los cuales ninguno de estos métodos sirvió para conseguir ADN total de suficiente calidad, se optó por un **método más complejo**, basado en la congelación de micelio mediante N<sub>2</sub> líquido, pulverización y extracción con ayuda de un tampón de rotura.

### 2.9.4.1. Métodos rápidos de extracción

Para aislar ADN total a utilizar como molde en reacciones de amplificación por PCR, se utilizaron dos técnicas rápidas de extracción a partir de micelio esporulado, cultivado en placa.

#### Método 1 (Cassago *et al.*, 2002):

- ▶ Con ayuda de una espátula metálica estéril, raspar una zona de 2 x 2 cm en una placa de PW2 conteniendo micelio esporulado, crecido sobre una lámina de celofán estéril <sup>(26)</sup>. Transferir el micelio raspado a un microtubo de 1,5 mL conteniendo 500 µL de tampón de resuspensión <sup>(27)</sup>.
- ▶ Añadir un volumen aproximado de 200 µL de microesferas de vidrio de 300-500 µm de diámetro. Mezclar mediante agitador vórtex, durante dos ciclos de 10 s de agitación seguidos de 15 s en hielo, para evitar el sobrecalentamiento de la muestra.
- ▶ Añadir 400 µL de fenol-CIA. Agitar el microtubo con la mezcla, durante 15 min a 200 rpm y 37 °C.
- ▶ Centrifugar durante 5 min a 15.000 x g. Transferir la fase acuosa (superior), unos 400 µL de volumen, a un microtubo limpio.
- ▶ Precipitar el ADN total, añadiendo 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío (-20 °C) y 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M, pH 5,2. Mantener a -20 °C durante un mínimo de 30 min.
- ▶ Recuperar el ADN precipitado mediante centrifugación a 15.000 x g, durante 15 min, a 4 °C.
- ▶ Lavar el precipitado con etanol al 70 %. Recuperar por centrifugación a 15.000 x g, durante 5 min, a 4 °C. Eliminar el sobrenadante y dejar secar el precipitado al aire.
- ▶ Resuspender el precipitado en 20-30 µL de tampón TE-ARNasa <sup>(28)</sup>.

<sup>(26)</sup> **Celofán estéril:** recortar una lámina de celofán de un diámetro adecuado para la placa. Hervir dos veces durante 15 min, cambiando de recipiente. Esterilizar en autoclave. Antes de colocar en la placa, humedecer la lámina de celofán en agua destilada estéril. Sembrar la suspensión de conidios directamente sobre el celofán. <sup>(27)</sup> **Tampón de resuspensión:** Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; EDTA 10 mM; 1 % (p/v) SDS; esterilizar en autoclave. <sup>(28)</sup> **Tampón TE-ARNasa:** solución de 20 µg/mL ARNasa, en tampón TE.

#### Método 2 (Pallez *et al.*, 2014):

- ▶ Con ayuda de una espátula metálica estéril, raspar una zona de 2 x 2 cm en una placa de PW2 conteniendo micelio esporulado, crecido sobre el medio directamente, o bien sobre una lámina de celofán estéril. Transferir el micelio raspado a un microtubo de 1,5 mL conteniendo 100 µL de tampón AE <sup>(29)</sup>.
- ▶ Tratar los microtubos durante 5 min en un microondas a máxima potencia (alrededor de 750 W).

- ▶ Centrifugar durante 5 min a 16.168 x *g*. Transferir el sobrenadante a un nuevo microtubo estéril, con cuidado de no arrastrar el precipitado. 5 µL de sobrenadante son suficientes como molde para una reacción de amplificación por PCR, en un volumen final de 50 µL.

<sup>(29)</sup> **Tampón AE:** Tris-HCl 10 mM, pH 9,0; EDTA 0,5 mM; esterilizar en autoclave.

#### 2.9.4.2. Método de extracción de ADN mediante congelación y pulverización

Se optó por este método (Casqueiro *et al.*, 1999) en aquellos casos en los cuales los métodos rápidos detallados en el apartado anterior no funcionaron adecuadamente.

- ▶ Inocular 100 mL de medio MPPY con conidios frescos, procedentes de una placa de medio PW2 bien esporulada (120-168 h de crecimiento). Incubar el cultivo en un matraz liso de 500 mL, durante 48 h a 25 °C y una agitación de 250 rpm.
- ▶ Recoger el micelio a través de un filtro de *nylon* NYTAL estéril (30-45 µm de diámetro de poro)<sup>(30)</sup>. Realizar un lavado con 100 mL de 0,9 % (p/v) NaCl.
- ▶ Eliminar el exceso de humedad y compactar el micelio entre papeles de filtro. Congelar inmediatamente mediante N<sub>2</sub> líquido. Mantener almacenado a -80 °C hasta el momento de la extracción de ADN.
- ▶ Pulverizar 500 mg de micelio hasta convertirlo en un polvo fino, con ayuda de un mortero y N<sub>2</sub> líquido.
- ▶ Transferir el micelio pulverizado a un microtubo de 2,2 mL. Añadir 1 mL de tampón de rotura<sup>(31)</sup>. Mezclar hasta conseguir una mezcla homogénea.
- ▶ Añadir 500 µL de fenol neutro y 500 µL de CIA (ver apartado 2.10.1). Mezclar por agitación suave e incubar a 50 °C, durante 30 min, agitándolo cada 5 min.
- ▶ Centrifugar a 16.168 x *g* y temperatura ambiente, durante 5 min. Transferir la fase acuosa (superior) a un microtubo limpio. Extraer con fenol-CIA hasta que la interfase aparezca libre de proteínas y restos celulares.
- ▶ Realizar una última extracción con CIA, para eliminar los restos de fenol.
- ▶ Precipitar el ADN total añadiendo 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío (-20 °C) y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5,2. Incubar a -20 °C durante, al menos, 2 h.
- ▶ Recuperar el ADN precipitado mediante centrifugación a 16.168 x *g*, durante 30 min, a 4 °C.
- ▶ Lavar el precipitado con etanol al 70% en agua. Centrifugar a 16.168 x *g*, durante 5 min. Eliminar el sobrenadante y dejar secar el precipitado al aire.
- ▶ Resuspender el ADN total en 100 µL de tampón TE, o bien agua destilada.



<sup>(30)</sup> Preparar los filtros NYTAL mediante lavado tres veces con agua Milli-Q y esterilización en autoclave, dentro de papel de aluminio. <sup>(31)</sup> **Tampón de rotura:** Tris-HCl 0,18 M, pH 8,2; EDTA 10 mM; SDS 1 %.

## 2.10. Manipulación de ADN

### 2.10.1. Limpieza y precipitación del ADN

Las proteínas y otras impurezas presentes en las soluciones de ADN se eliminaron mediante limpieza con fenol (**fenolización**).

- ▶ Añadir sobre la solución de ADN un volumen de fenol neutro<sup>(32)</sup> y mezclar vigorosamente por inversión, durante 20-30 s.
- ▶ Centrifugar la mezcla durante 5 min a 16.168 x g, a temperatura ambiente.
- ▶ Recuperar con cuidado la fase superior (fase acuosa) y transferirla a un microtubo limpio. Añadir sobre la solución de ADN un volumen de fenol-CIA<sup>(33)</sup> y mezclar por inversión.
- ▶ Centrifugar la mezcla durante 5 min a 16.168 x g, a temperatura ambiente.
- ▶ Recuperar con cuidado la fase superior (fase acuosa) y transferirla a un microtubo limpio. Repetir la adición de fenol-CIA hasta conseguir que la interfase se vea libre de impurezas.
- ▶ Añadir a la solución acuosa un volumen de CIA<sup>(34)</sup>, para eliminar restos de fenol. Mezclar por inversión.
- ▶ Recuperar la fase acuosa y depositar en un microtubo limpio.

<sup>(32)</sup> **Fenol neutro:** Mezclar mediante agitación fuerte 3 volúmenes de fenol ácido con un volumen de Tris-HCl 1 M, pH 8,0. Dejar reposar hasta la separación de las dos fases. El pH de la fase superior acuosa se puede determinar con un pHmetro (no utilizar tiras de medida de pH, el fenol puede interferir en el resultado). El valor de pH debe ser  $7,5 \pm 0,05$ . Conservar a 4°C en un recipiente opaco. <sup>(33)</sup> **Fenol-CIA:** 0,5 volúmenes de fenol neutro pH 7,4:0,5 volúmenes volumen de CIA. <sup>(34)</sup> **CIA:** Cloroformo/Alcohol isoamílico, (v/v): 24/1.

El método de **precipitación** se basa en la pérdida de solubilidad del ADN al añadir sales y un alcohol.

- ▶ Añadir sobre la suspensión acuosa de ADN 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío (mantenido a -20 °C)<sup>(35)</sup> y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M pH 5,2. Mezclar por inversión.
- ▶ Mantener la mezcla durante un mínimo de 2 h a -20 °C, o bien 30 min a -80 °C.
- ▶ Centrifugar a 16.168 x g durante 30 min, a una temperatura de 4 °C.

- ▶ Eliminar el sobrenadante y lavar el precipitado con 0,5 volúmenes de etanol al 70 %. El porcentaje de agua presente en esta solución contribuye a limpiar el precipitado de sales.
- ▶ Centrifugar a 16.168 x g, durante 5 min. Retirar el sobrenadante y dejar secar el precipitado.
- ▶ Resuspender en agua (preferible si se empleará en reacciones donde las sales pueden actuar como quelante o inhibidor, como PCR o secuenciación) o en tampón TE. Conservar a 4 °C, o bien a -20 °C, para largos periodos de tiempo.

<sup>(35)</sup> El etanol absoluto puede sustituirse por 0,6 volúmenes de isopropanol (2-propanol), realizando en ese caso la precipitación a temperatura ambiente.

En determinadas ocasiones, las soluciones de ADN se trataron mediante el método de **diálisis en gota**, para reducir el contenido en sales y otros contaminantes.

- ▶ Añadir 30-100 mL la solución de diálisis (agua Milli-Q estéril) sobre una placa de Petri.
- ▶ Colocar flotando sobre la solución de diálisis un disco de membrana de ésteres mezclados de celulosa (Millipore) de 25 mm de diámetro y diámetro de poro medio de 0,025 µm, con la cara brillante del disco hacia arriba. Dejar que el disco se humedezca antes de aplicar la muestra (esperar aprox. 5 min) y asegurarse de que no existen burbujas de aire entre el disco y la solución de diálisis.
- ▶ Aplicar una gota de aprox. 10 µL de muestra de ADN sobre la parte central del disco. Si la muestra tiene un exceso de fenol o de cloroformo no se mantendrá en el centro y es necesario eliminar los solventes orgánicos antes de proceder a la diálisis en gota.
- ▶ Cubrir con su tapa la placa de Petri para evitar la evaporación y mantener la diálisis durante 1 h. Asegurarse de que la muestra no entra en contacto con la solución de diálisis.
- ▶ Recuperar la gota de muestra del disco de membrana y cuantificar la cantidad de ADN.

## 2.10.2. Eliminación selectiva de ácidos nucleicos contaminantes

Durante los procesos de purificación de ADN o ARN, es frecuente que las muestras resultantes presenten contaminación con ácidos nucleicos indeseados. La **eliminación selectiva de ARN** se llevó a cabo empleando ribonucleasa A de páncreas bovino (Sigma-Aldrich), a una concentración final de 10 µg/mL, incubando la reacción durante 60 min en un baño a 37 °C y fenolizando después. La **eliminación selectiva de ADN** se detalla en el apartado 2.17.3.

### 2.10.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, habitualmente conocida como (PCR) por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), es una técnica de Biología Molecular originalmente descrita por Mullis y Faloona (Mullis y Faloona, 1987), que permite la amplificación ácidos nucleicos.

En el presente trabajo se utilizaron las siguientes ADN polimerasas para PCR:

○ **ADN polimerasa *GoTaq® G2 Flexi* (Promega)**. Se empleó en aquellos casos en los que la introducción de un pequeño número de errores en la secuencia amplificada no fue crucial para el experimento, o bien para estimar la temperatura óptima de anillamiento de los cebadores.

○ **ADN polimerasa *Pfu* (Biotools) y ADN polimerasa *Hybrid* (EurX)**. Polimerasas utilizadas cuando fue imprescindible la fidelidad en la amplificación, como en fragmentos amplificados para clonación, o en secuenciación de ARNr 18S para la identificación de cepas.

Los valores de cada uno de los componentes en las reacciones de PCR varían en función de la ADN polimerasa que se emplee, el tipo de secuencia a amplificar y las características del ADN molde, entre otros. De forma general, la Tabla 2.2 recoge los valores orientativos.

**Tabla 2.2.** Concentración final de cada uno de los componentes necesarios para llevar a cabo una PCR, en un volumen de 50  $\mu$ L de reacción.

<b>ADN molde</b>	10-50 ng ADN total/0,1-1 ng ADN plasmídico
<b>Cebadores (18-24 pb)</b>	0,1-1,0 $\mu$ M
<b>ADN polimerasa</b>	0,5-2,5 unidades
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1-5 mM (normalmente 1,5 mM)
<b>dNTPs</b>	50-500 $\mu$ M (normalmente 200 $\mu$ M)
<b>Tampón 10X</b>	1X
<b>Agua destilada</b>	Hasta completar el volumen de reacción

Las temperaturas y tiempos utilizados para la reacción de PCR son empíricos y dependen de factores diversos como: contenido en G+C del ADN molde y de los oligonucleótidos, longitud del fragmento a amplificar, ADN polimerasa empleada y su velocidad de procesamiento, cantidad de ADN molde para realizar la amplificación, etc. De modo general, estas temperaturas y tiempos aparecen recogidos en la Tabla 2.3.

**Tabla 2.3.** Temperaturas y tiempos de reacción típicos en una reacción de amplificación por PCR.

<b>Desnaturalización inicial</b>		5 min a 94-98 °C	1 ciclo
<b>Amplificación</b>	Desnaturalización	30 s a 94-98 °C	25-40 ciclos
	Anillamiento	30-45 s; temperatura según cebadores	
	Extensión	Tiempo variable (según ADN polimerasa y longitud fragmento a amplificar) a 72°C	
<b>Extensión final</b>		10 min a 72 °C	1 ciclo

La correcta amplificación se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa.

### 2.10.4. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La electroforesis de ADN en geles de agarosa (Sambrook y Russell, 2001) se realizó con diferentes porcentajes de agarosa, desde 0,5 % hasta 2 % (p/v), según el tamaño de banda esperado (Tabla 2.4). Se empleó Tris-acetato-EDTA (TAE 1X) como tampón de electroforesis.

**Tabla 2.4.** Concentración de agarosa utilizada para resolver mediante electroforesis fragmentos de ADN de diferentes tamaños.

<b>Concentración agarosa [% (p/v) en TAE 1X]</b>	<b>Tamaño de los fragmentos de ADN a separar</b>
0,5	1.000-30.000 pb
0,7	800-12.000 pb
1,0	500-10.000 pb
1,2	400-7.000 pb
1,5	200-3.000 pb
2,0	50-2.000 pb

El protocolo seguido para llevar a cabo la electroforesis aparece detallado a continuación.

- ▶ Disolver agarosa D1-Electroendosis Media (Pronadisa) en tampón TAE <sup>(36)</sup> 1X, en un porcentaje apropiado para el tamaño de los fragmentos de ADN (Tabla 2.4), mediante calentamiento en microondas. Compensar las pérdidas por evaporación con agua destilada.
- ▶ Enfriar moderadamente la solución de agarosa, sin que llegue a solidificarse, y verter sobre la bandeja colocada en el soporte para la preparación de geles. Eliminar las posibles burbujas, colocar el peine que

formará los pocillos y dejar enfriar hasta la total solidificación del gel, al menos durante 15-20 min.

Colocar el gel en la cubeta de electroforesis y llenar la misma con tampón TAE 1X hasta cubrir el gel.

- ▶ Mezclar las muestras de ADN con 1/10 del volumen final de tampón de carga concentrado (10X)<sup>(37)</sup>. Dispensar las muestras en los pocillos del gel. Llevar a cabo la electroforesis aplicando una diferencia de potencial de entre 1 y 5 V/cm de distancia entre electrodos.
- ▶ Teñir el ADN sumergiendo el gel durante 15-30 min en una solución de bromuro de etidio (BrEt)<sup>(38)</sup>.
- ▶ Los geles se visualizan y fotografían empleando el transiluminador de luz UV *Spectroline TR-302* incluido en un sistema de documentación de geles *GeneFlash Bio Imaging Gel Documentation System*. La captura de imágenes en formato digital se llevó a cabo también, directamente, con el sistema de documentación de geles *VWR Smart 3* (VWR).

<sup>(36)</sup> **TAE (50X)**: 242 g de Tris base (2 M); 57,1 mL de ácido acético glacial (5,7 %); 100 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0 (50 mM); agua destilada hasta completar 1 L. <sup>(37)</sup> **Tampón de carga concentrado (10X)**: 0,25 % (p/v) azul de bromofenol; 40 % (p/v) sacarosa; 0,25 % (p/v) xilén-cianol; en solución acuosa. Esterilizar en autoclave. Conservar a 4 °C o a temperatura ambiente. En un gel de agarosa al 1 % el azul de bromofenol migra a una velocidad similar a un fragmento de 500 pb y el xilén-cianol a una velocidad similar a un fragmento de 4.000 pb. <sup>(38)</sup> **BrEt**: Se prepara una solución concentrada a 10 mg/mL en agua y se conserva a 4 °C, protegido de la luz. Para la tinción de geles, se diluye la solución concentrada para una concentración final de 0,5-2 µg/mL. Conservar a temperatura ambiente, protegido de la luz.

El tamaño de los fragmentos de ADN separados por electroforesis se estimó por comparación con marcadores de peso molecular de ADN. En función del experimento, se utilizó *1 kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen), o bien *DNA Molecular Weight Marker II, Digoxigenin-labeled* (Roche).

## 2.10.5. Extracción de ADN de geles de agarosa

Para la extracción de ADN de geles de agarosa se emplearon tres métodos.

### 2.10.5.1. Método de congelación rápido (*freeze-squeeze*) (Tautz y Renz, 1983)

- ▶ Iluminar el gel en un transiluminador de luz UV, para identificar la banda de interés. Escindir la banda con un bisturí, procurando tomar la menor cantidad de agarosa sobrante posible. Intentar exponer el gel a la luz UV el menor tiempo posible, para evitar daños en el ADN.
- ▶ Introducir el fragmento de agarosa en un microtubo de 1,5 mL, con un orificio en el fondo obturado con una pequeña cantidad de algodón hidrófilo, esterilizado. Colocar el microtubo perforado sobre un microtubo intacto y congelar a -20 °C durante un mínimo de 30 min, o bien a -80 °C durante 15 min.
- ▶ Tomar los tubos congelados y centrifugar a 16.168 x g en una centrífuga de mesa, durante 10 min.

- ▶ Fenolizar la fase acuosa recogida en el tubo inferior, una vez con fenol-CIA y a continuación con CIA.
- ▶ Precipitar el ADN con etanol.
- ▶ Resuspender el precipitado en un volumen de agua destilada de 10  $\mu$ L.

#### 2.10.5.2. *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*

Se basa en la utilización de un agente caotrópico que desnaturaliza proteínas, ayuda a disolver la agarosa y facilita la unión del ADN bicatenario a la matriz de la membrana de la columna. Las proteínas, sales y otras moléculas contaminantes son eliminadas de la muestra mediante lavado con un tampón que incluye etanol. El ADN es recuperado de la matriz de la columna mediante elución con soluciones de baja fuerza iónica, tampón TE o agua destilada.

El sistema comercial *illustra*<sup>™</sup> *GFX*<sup>™</sup> *PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare Life Sciences) utiliza microcolumnas GFX, que poseen una matriz de fibra de vidrio. Este sistema permite el aislamiento y concentración de fragmentos de ADN de tamaños comprendidos entre 50 pb y 10 kpb. La cantidad máxima de ADN que es capaz de retener cada columna son 25  $\mu$ g. También permite extraer fragmentos de ADN a partir de PCR y digestiones con endonucleasas.

- ▶ Con ayuda de un bisturí y un transiluminador de luz UV, escindir el fragmento de gel de agarosa con la banda de interés. Colocar el fragmento en un microtubo de 1,5 mL, previamente pesado.
- ▶ Añadir 10  $\mu$ L de tampón de captura <sup>(39)</sup> (*capture buffer type 3*) por cada 10 mg de gel de agarosa, teniendo en cuenta que no deben añadirse menos de 300  $\mu$ L.
- ▶ Cerrar la tapa del microtubo y mezclar (si el fragmento a purificar es de más de 5 kpb, evitar el empleo de agitador tipo vórtex, que puede dar lugar a la fragmentación del ADN). Incubar a 60 °C, hasta que la agarosa se disuelva completamente (15-30 min, mezclando por inversión cada 3 min). El pH es importante para la adsorción del ADN a la membrana de la columna: el color de la mezcla debe ser amarillo-anaranjado. De no ser así, reajustar el pH con 10  $\mu$ L de tampón acetato de sodio 3 M pH 5,0.
- ▶ Colocar una microcolumna GFX en su microtubo correspondiente (incluidos en el *kit*) y transferir la mezcla tampón de captura-muestra, hasta 800  $\mu$ L. Si el volumen total supera los 800  $\mu$ L, transferir en una segunda ronda). Mantener a temperatura ambiente 1 min y centrifugar a 16.168 x *g*, durante 30 s.
- ▶ Desechar el eluido y colocar la columna en el mismo microtubo.
- ▶ Añadir 500  $\mu$ L de tampón de lavado <sup>(40)</sup> (*wash buffer type 1*) sobre la microcolumna y centrifugar a 16.168 x *g*, durante 30 s. El tampón de lavado contiene etanol, que puede interferir en el empleo de la muestra. Para eliminarlo por completo, repetir el paso de centrifugación durante 1 min adicional.

- ▶ Colocar la microcolumna en un microtubo de 1,5 mL nuevo y añadir sobre el centro de la membrana 10-50  $\mu\text{L}$  de agua a 50  $^{\circ}\text{C}$ . No debe realizarse la elución con volúmenes inferiores a 10  $\mu\text{L}$ . La temperatura de la solución de elución mejora la recuperación de ADN [puede emplearse también tampón TE o el tampón de elución<sup>(41)</sup> (*elution buffer*) suministrado con el *kit*]. Mantener a temperatura ambiente durante 5 min y centrifugar a 16.168 x g, durante 1 min.
- ▶ Para conseguir un mayor porcentaje de recuperación, realizar dos eluciones de 30-40  $\mu\text{L}$ .

<sup>(39)</sup> *Tampón de captura*: solución tamponada que contiene acetato, una sustancia caotrópica y un indicador de pH.

<sup>(40)</sup> *Tampón de lavado*: previamente a su uso, es necesario añadirle etanol absoluto. <sup>(41)</sup> *Tampón de elución*: Tris-HCl 10 mM, pH 8,0.

### 2.10.5.3. Extracción mediante QIAEX II Gel Extraction Kit

Este sistema comercial permite la extracción de ADN de entre 40 pb y 50 kpb, a partir de soluciones o de fragmentos de geles de agarosa. Se basa en la utilización de una matriz de partículas de gel de sílice, a la cual se adsorbe el ADN en presencia de altas concentraciones de sales. La capacidad de unión de ADN de la suspensión de gel de sílice QIAEX II es de hasta 5  $\mu\text{g}$  de ADN por cada 10  $\mu\text{L}$  de gel. También permite realizar extracciones a partir de PCR y digestiones.

- ▶ Con ayuda de un bisturí y un transiluminador de luz UV, escindir el fragmento de gel de agarosa con la banda de interés. Colocar el fragmento de hasta 250 mg en un microtubo de 1,5 mL, previamente pesado. Calcular el peso de la banda de agarosa por diferencia respecto al peso del microtubo vacío.
- ▶ Para fragmentos de ADN de un **tamaño entre 100 pb y 4 kpb**, añadir tres volúmenes de tampón QX1 por cada volumen de gel de agarosa (por ejemplo, para 100 mg de gel, añadir 300  $\mu\text{L}$  de tampón QX1). Si el fragmento de ADN tiene un **tamaño inferior a 100 pb**, añadir 6 volúmenes de tampón QX1 por cada volumen de gel de agarosa. Si tiene **más de 4 kpb**, añadir tres volúmenes de tampón QX1 y dos volúmenes de agua destilada por cada volumen de gel de agarosa.
- ▶ Resuspender las partículas QIAEX II mediante agitación en agitador vórtex, durante 30 s. Añadir suspensión de gel de sílice QIAEX II a la mezcla que contiene ADN, siguiendo la tabla a continuación:

$\leq 2 \mu\text{g}$ ADN	Añadir 10 $\mu\text{L}$ de QIAEX II
2-10 $\mu\text{g}$ ADN	Añadir 30 $\mu\text{L}$ de QIAEX II
Por cada 10 $\mu\text{g}$ adicionales de ADN	Añadir 30 $\mu\text{L}$ adicionales de QIAEX II

- ▶ Incubar a 50  $^{\circ}\text{C}$  durante 10 min, para solubilizar la agarosa y favorecer la unión del ADN a las partículas del gel de sílice. Mezclar con agitador vórtex cada 2 min, para mantener las partículas de QIAEX II en suspensión. El color de la mezcla debe ser amarillo (si es naranja o morado, el pH está por encima de

7,5 y un pH inferior es necesario para la correcta unión de ADN al gel QIAEX II. Para corregir el pH, añadir 30 µL de tampón acetato de sodio 3 M, pH 5,0, mezclar e incubar durante 5 min adicionales).

- ▶ Centrifugar las muestras durante 30 s a velocidad máxima ( $\geq 10.000 \times g$ ). Retirar el sobrenadante con cuidado, con ayuda de una pipeta.
- ▶ Lavar el precipitado con 500 µL de tampón QX1, centrifugar a velocidad máxima durante 30 s y eliminar el sobrenadante. Este lavado permite la eliminación de los restos de agarosa.
- ▶ Hacer dos lavados del precipitado con 500 µL de tampón PE, centrifugar a velocidad máxima durante 30 s y eliminar el sobrenadante. Este paso de lavado permite eliminar la contaminación residual de sales.
- ▶ Dejar secar el precipitado al aire durante 10-15 min, o hasta que el precipitado tome un color blanquecino. Si se emplearon 30 µL de QIAEX II, dejar secar durante 30 min, aprox. No secar mediante vacío, puesto que un secado excesivo puede afectar el rendimiento de la elución.
- ▶ Para eluir el ADN, añadir 20 µL de agua destilada o tampón TE y resuspender el precipitado mediante agitación. Incubar de acuerdo a la siguiente tabla:

Fragmentos de ADN $\leq 4$ kpb	Incubar durante 5 min a temperatura ambiente
Fragmentos de ADN 4-10 kpb	Incubar durante 5 min a 50 °C
Fragmentos de ADN $> 10$ kpb	Incubar durante 10 min a 50 °C

- ▶ Centrifugar durante 30 s. Recoger el sobrenadante y transferir a un nuevo microtubo. Para aumentar el rendimiento de recuperación de ADN en un 10-15 %, repetir el paso de elución una vez más.

## 2.10.6. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

Las enzimas de restricción utilizadas en el presente trabajo se emplearon según las recomendaciones de los proveedores (Takara, MBI Fermentas y New England Biolabs).

Si bien difieren ligeramente en función de la endonucleasa utilizada, los componentes generales de una reacción de restricción aparecen detallados a continuación.

**Tabla 2.5.** Componentes básicos de una reacción de digestión con enzimas de restricción.

<b>Tampón de digestión 10X</b>	1/10 del volumen final
<b>Albúmina sérica bovina (BSA) 0,01 % (si la enzima lo requiere)</b>	1/10 del volumen final
<b>ADN</b>	1-2 µg de ADN por cada 20 µL de reacción (esta cantidad puede aumentarse si los tiempos de reacción son más largos)
<b>Enzima de restricción</b>	1-2 U/µg de ADN
<b>Agua destilada</b>	Hasta completar volumen



Tras la digestión, las muestras fueron analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa. La reacción se detuvo mediante inactivación por calor (a temperatura dependiente de cada enzima), mediante fenolización, o bien mediante sistema comercial de purificación de ADN.

### 2.10.7. Ligación de fragmentos de ADN

Se empleó la enzima ADN ligasa del fago T4 (Roche), que cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos 3'-hidroxil y 5'-fosfato del ADN de doble cadena, requiriendo iones  $Mg^{2+}$  y ATP como cofactores (ambos incluidos en el tampón suministrado por el fabricante). Para el cálculo de las cantidades respectivas de inserto y de vector, se empleó la siguiente ecuación, para una relación en molaridad vector-inserto 1:5:

$$\frac{ng \text{ de vector} \times \text{tamaño del inserto (kb)}}{\text{tamaño del vector (kb)}} \times 5 = ng \text{ de inserto}$$

A pesar de que la relación 1:5 se empleó inicialmente, en aquellas ligaciones especialmente dificultosas se probaron otras relaciones, desde 1:2 hasta 1:10. Las reacciones de ligación fueron, en todos los casos, con extremos cohesivos y se realizaron a 8-16 °C, durante un mínimo de 12 h.

- Añadir en un microtubo todos los componentes de la reacción de ligación:

ADN del vector	50-100 ng
ADN del inserto	Cantidad calculada mediante la ecuación (1:5)
Tampón de ligación 10X <sup>(42)</sup>	1 µL
Ligasa del fago T4	1 µL (5 U)
Agua destilada	Hasta 10 µL

- Mezclar suavemente y dar un pulso de centrifuga para evitar pérdidas de volumen en las paredes del tubo. Incubar durante 12 h a 8-16 °C en un baño de agua-hielo a temperatura controlada, dentro de una caja de poliestireno expandido.
- Inactivar la ligasa mediante calor, sometiendo las reacciones a 65 °C, durante 10 min.
- Transformar en células competentes de *E. coli* XL1-Blue (ver apartado 2.15).

<sup>(42)</sup> **Tampón de ligación 10X:** Tris-HCl 660 mM; MgCl<sub>2</sub> 50 mM; DTT 50 mM; ATP 10 mM; pH 7,5. El ATP que contiene el tampón es altamente inestable y esto influye en la eficiencia de la reacción, por lo que se realizaron alícuotas de pequeño volumen (4 µL), que se almacenaron a -20 °C hasta su empleo.

## 2.11. Cuantificación y análisis de pureza de ácidos nucleicos

---

Se emplearon dos métodos: i) por comparación de la intensidad de fluorescencia emitida por las bandas de ADN del marcador de peso molecular cuya cantidad es conocida, mediante **electroforesis en gel de agarosa**; ii) espectrofotométricamente, por medio del equipo *Nanodrop 1000* (Thermo Fisher Scientific), de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

La cuantificación en *Nanodrop 1000* se realiza mediante una modificación de la ecuación de Beer-Lambert, para utilizar coeficientes de extinción expresados en ng-cm/ $\mu$ L:

$$c = (A \times e)/b$$

Donde  $c$  es la concentración de ácidos nucleicos (ng/ $\mu$ L);  $A$ , la absorbancia (AU);  $e$ , el coeficiente de extinción dependiente de la longitud de onda (ng-cm/ $\mu$ L) y  $b$  es la longitud de camino óptico (cm). Los coeficientes de extinción para los ácidos nucleicos son: i) 50 ng-cm/ $\mu$ L, para ADN bicatenario; 33 ng-cm/ $\mu$ L, para ADN monocatenario; 40 ng-cm/ $\mu$ L, para ARN.

Además de medir la cantidad de ácidos nucleicos presentes en la muestra, *Nanodrop 1000* calcula el índice de pureza mediante la relación  $A_{260}/A_{280}$  que debe ser de aproximadamente 1,8 para ADN y 2,0 para ARN. La relación  $A_{260}/A_{230}$  es un segundo indicador de pureza; su valor suele ser superior al de la anterior relación, aproximadamente 1,8-2,2, y si es apreciablemente menor pueden existir contaminantes (*ND-1000 Spectrophotometer. V3.8 User's Manual*).

Por otra parte, para analizar la calidad e integridad de muestras de ARN se utilizó el equipo *Bioanalyzer 2100* (Agilent).

## 2.12. Método de hibridación Southern

---

El método de hibridación Southern se basa en la transferencia a un soporte sólido de fragmentos de ADN, obtenidos tras digestión con enzimas de restricción y sometidos a migración electroforética en geles de agarosa. Tras la fragmentación in situ del ADN y la separación de sus cadenas, el ADN monocatenario transferido a un soporte sólido es fijado con la ayuda de luz UV y sometido a detección, empleando sondas marcadas específicas (Southern, 1975).

### 2.12.1. Transferencia de ácidos nucleicos mediante sistema de vacío

Una vez se ha extraído el ADN que se pretende analizar, se ha digerido mediante enzimas de restricción y desarrollado mediante electroforesis en un gel de agarosa, la transferencia se realiza empleando un sistema de vacío (*VacuGene XL*, GE Healthcare Life Sciences), el cual permite transferir de forma óptima moléculas de ADN de pequeño y mediano tamaño.

- ▶ Digerir el ADN total con endonucleasas de restricción. Separar el ADN mediante electroforesis en gel de agarosa, empleando el marcador de peso molecular marcado con digoxigenina *DNA Molecular Weight Marker II, Digoxigenin-labeled* (Roche). Teñir el ADN, sumergiendo el gel en una solución de BrEt durante 15 min. Comprobar que el desarrollo del gel es adecuado mediante luz UV y fotografiarlo.
- ▶ Una vez fotografiado el gel, colocarlo en una cubeta y lavarlo varias veces con agua destilada, para reducir la carga de BrEt. Tras los lavados, depositar el gel sobre una pletina sin bordes dentro de una cubeta, para facilitar su posterior colocación en el sistema de transferencia.
- ▶ Recortar una membrana de *nylon Amersham Hybond-N+* (GE Healthcare Life Sciences), 1 cm mayor por cada lado que el tamaño del gel (aprox. 17 x 17 cm). Equilibrar la membrana, sumergiéndola durante 1 min en agua destilada y 5 min en solución SSC 20X<sup>(43)</sup>. La membrana debe ser manipulada con pinzas.
- ▶ Depositar la membrana sobre la capa porosa de la unidad de transferencia, ensamblada de acuerdo a las instrucciones del fabricante (placa porosa con la parte rugosa hacia abajo).
- ▶ Colocar sobre la membrana una lámina de plástico (ventana de transferencia) que cubra toda su superficie y que tenga una abertura central con un tamaño ligeramente inferior al del gel. Esto permitirá que, al colocar todos los elementos del sistema (cubeta del sistema de transferencia, goma, placa porosa, membrana, ventana de transferencia y gel) y accionar la bomba, se produzca un vacío que permita la “succión” y transferencia del ADN desde el gel de agarosa hacia la membrana.
- ▶ Colocar el gel sobre la membrana, asegurándose de que sus extremos se encuentran sobre la ventana de plástico. Comenzar por el extremo con pocillos e ir dejándolo caer suavemente. Eliminar las burbujas, que interfieren en la transferencia. El gel debe estar intacto para la formación de vacío. Si el gel se daña, preparar 20 mL de 1,2 % (p/v) agarosa y dispensarlo con una pipeta gota a gota sobre la rotura.
- ▶ Encender la bomba de vacío. Comprobar en el manómetro que el sistema está sellado y estable (50-60 mbar).
- ▶ Proceder al tratamiento químico del ADN, para su transferencia a la membrana en forma desnaturalizada y de hebra simple. Cubrir toda la superficie del gel con solución depurinizante<sup>(44)</sup> y mantener 20-30 min.

En este tiempo el tampón de carga presente en el frente de migración debe cambiar de color azul a amarillo, debido a un descenso del pH.

- ▶ Retirar la solución. Cubrir la superficie del gel con solución desnaturalizante<sup>(45)</sup>, durante 20 min. El frente de migración debe recuperar su color azul original.
- ▶ Retirar la solución y cubrir la superficie del gel con la solución neutralizante<sup>(46)</sup>, durante 25 min.
- ▶ Retirar la solución neutralizante y cubrir la superficie del gel con SSC 20X, durante al menos 120 min.
- ▶ Retirar todo el líquido y marcar la posición de los pocillos del gel sobre el filtro con bolígrafo azul. Desmontar la carcasa del transferidor y la goma que lo conecta con la botella colectora. Apagar la bomba de vacío y retirar el gel y la ventana de transferencia.
- ▶ Lavar la membrana en una solución de SSC 6X durante 5 min y dejarla secar completamente sobre un papel absorbente Whatman 3 MM. Recortar la membrana tomando como referencia las marcas de los pocillos en el gel. Cortar la esquina superior izquierda de la membrana, para su orientación.
- ▶ Colocar la membrana sobre un pliego limpio de papel Whatman 3 MM y fijar el ADN mediante dos pulsos de luz UV a máxima potencia (equipo *Stratalinker 2400 UV Crosslinker 230V*, Stratagene).
- ▶ La membrana se puede conservar a 4 °C durante meses, protegida por papel Whatman y de aluminio.

<sup>(43)</sup> SSC 20X: NaCl 3 M; citrato sódico 0,3 M, pH 7,0. <sup>(44)</sup> Solución depurinizante: HCl 0,25 M. <sup>(45)</sup> Solución desnaturalizante: NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M. <sup>(46)</sup> Solución neutralizante: NaCl 1,5 M; Tris-HCl 0,05 M, pH 7,2; EDTA 1 mM.

## 2.12.2. Marcaje no radiactivo de sondas para Southern

El sistema de marcaje no radiactivo (Roche) se basa en la utilización de dUTP, modificado con digoxigenina (digoxigenina-11-dUTP), que actúa como antígeno. Las sondas marcadas con digoxigenina-11-dUTP son generadas enzimáticamente por el método de cebado al azar (*random primed labeling*), que se fundamenta en la incorporación al azar de digoxigenina-11-dUTP en el ADN, por medio de la extensión de hexanucleótidos iniciadores por el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* (Feinberg y Vogelstein, 1983). El protocolo se detalla a continuación.

- ▶ Disolver el ADN (1-3 µg) a marcar con digoxigenina en 15 µL de agua destilada estéril. Desnaturalizar el ADN, hirviéndolo durante 10 min y transferirlo rápidamente a hielo.
- ▶ Añadir 2 µL de digoxigenina-11-dUTP *DNA labeling mix* 10X<sup>(47)</sup> (Sigma-Aldrich), 2 µL de *hexanucleotide mix* 10X<sup>(48)</sup> (Sigma-Aldrich) y 1 µL de enzima Klenow (2U/µL, MBI Fermentas). Centrifugar para recoger la muestra en el fondo del microtubo.

- ▶ Incubar la mezcla a 37 °C durante, al menos, 60 min (preferiblemente, entre 16 y 24 h).
- ▶ Purificar la sonda para eliminar los restos de sales y enzima, añadiendo 2 µL EDTA 0,2 M, pH 8,0; 2,5 µL de LiCl 4 M y 75 µL de etanol absoluto frío (-20 °C). Mezclar suavemente por inversión e incubar a -20 °C durante toda la noche.
- ▶ Recuperar el ADN de la sonda precipitado, mediante centrifugación a 16.168 x g, durante 30 min, a 4°C. Lavar el precipitado con etanol al 70 %, para eliminar los restos de sales.
- ▶ Centrifugar de nuevo, eliminar el sobrenadante y dejar secar el precipitado al aire. Resuspender en 400 µL de tampón TE. La sonda puede recogerse en 20-30 mL de tampón de hibridación <sup>(49)</sup> y almacenarse, una vez marcada, durante más de un año.

<sup>(47)</sup> *Digoxigenina-11-dUTP DNA labeling mix 10X*: dATP/dCTP/dGTP, cada uno 1 mM; dTTP 0,65 mM; digoxigenina-11-dUTP sensible a la alcalinidad 0,35 mM, pH 7,5. <sup>(48)</sup> *Hexanucleotide mix 10X*: mezcla concentrada de nucleótidos aleatorios en tampón de reacción (Tris-HCl 0,5M; MgCl<sub>2</sub> 0,1M; ditioeritrol (DTE) 1 mM; BSA 2 mg/mL, pH 7,2). <sup>(49)</sup> **Tampón de hibridación**: 40 % (v/v) formamida; SSC 5X; 2 % (p/v) agente bloqueante (blocking reagent, Roche); 0,1 % (p/v) N-lauroil sarcosina; 0,02 % (p/v) SDS.

### 2.12.2.1. Cuantificación del marcaje

Para cuantificar el marcaje, se preparan diluciones seriadas (1:5) de la solución de ADN marcado, asumiendo que a partir de 1 µg de ADN se obtienen 780 ng de sonda marcada, tras 20 h de incubación, y que se tiene un volumen final de 400 µL de producto. Los cálculos para 1 µg de ADN se recogen a continuación.

Dilución	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5
Cantidad de ADN (pg/µL)	390	78	15,6	3,12	0,624

- ▶ Aplicar 1 µL de cada dilución sobre una membrana Hybond-N+.
- ▶ Fijar la sonda mediante luz UV, de igual manera que en el protocolo de transferencia de ácidos nucleicos mediante sistema de vacío (apartado 2.12.1).
- ▶ Seguir el protocolo de detección inmunológica (apartado 2.12.5) a partir del paso de equilibrado de membrana con solución I, durante 5 min, en agitación. Es suficiente con que se aprecie marcaje con claridad entre los puntos de 78-15,6 pg.

### 2.12.3. Prehibridación e hibridación

La prehibridación pretende equilibrar la membrana y eliminar posibles señales de hibridación inespecíficas, mediante el tratamiento de la membrana con un agente bloqueante (Roche).

- ▶ Colocar la membrana de *nylon*, a la cual se ha transferido el ADN digerido, en una bolsa de plástico preparada ajustándose al tamaño de la membrana, con una apertura que permita la adición de soluciones.
- ▶ Añadir 10-25 mL de tampón de hibridación <sup>(49)</sup> (aprox., 20 mL/100 cm<sup>2</sup> de membrana) y retirar las burbujas que se puedan haber formado, para evitar que interfieran en el proceso de hibridación.
- ▶ Sellar la bolsa completamente para evitar fugas de tampón de hibridación y la entrada de agua procedente del baño de hibridación.
- ▶ Colocar la bolsa en un baño de agua con agitación constante e incubar a la temperatura de hibridación adecuada (generalmente 42 °C) durante 1-4 h (preferiblemente, 4 h).

Una vez finalizada la prehibridación, se procede a realizar la hibridación, donde tiene lugar la unión de la sonda marcada con digoxigenina-11-dUTP al ADN fijado a la membrana. La especificidad de la unión depende de las condiciones de incubación y lavado empleadas (temperatura, concentración de sales y detergentes en el tampón de hibridación). La hibridación de filtros con ADN se realizó a una temperatura de 42 °C y con un 40 % de formamida.

- ▶ Antes de su empleo, la sonda previamente marcada debe desnaturalizarse, hirviendo durante 10 min y enfriándola rápidamente en hielo. Añadir la sonda desnaturalizada a 20 mL de tampón de hibridación, a una concentración de 5-25 ng/mL. Esta solución de hibridación puede ser reutilizada varias veces, en cuyo caso es necesario desnaturalizar de nuevo previamente a cada uso.
- ▶ Eliminar el tampón de hibridación empleado en la prehibridación y añadir la solución de hibridación, incluyendo la sonda desnaturalizada.
- ▶ Sellar herméticamente la bolsa, eliminando previamente todas las posibles burbujas de aire. Incubar en baño con agitación (45-50 oscilaciones/min), a 42 °C, durante 12 h. Transcurrido este tiempo, recoger la solución de hibridación en un tubo y conservarla a -20 °C para su reutilización.

### 2.12.4. Lavado de las membranas

El lavado pretende eliminar la sonda unida de forma inespecífica a la membrana.

- ▶ Sacar la membrana de la bolsa de plástico empleada en la hibridación y colocarla en una cubeta. Lavar la membrana con solución de lavado I<sup>(50)</sup>, durante 15 min, a la temperatura de hibridación.
- ▶ Lavar la membrana con solución de lavado II<sup>(51)</sup>, durante 15 min, a la temperatura de hibridación.
- ▶ Lavar la membrana con solución de lavado II, durante 10 min, a 65 °C. Tras el último lavado, dejar secar los filtros al aire y proceder a la detección inmunológica.

<sup>(50)</sup> *Solución de lavado I:* SSC 2X y 0,1 % (p/v) SDS. Preparar 250 mL y atemperar en un baño a la temperatura de hibridación. <sup>(51)</sup> *Solución de lavado II:* SSC 0,1X y 0,1 % (p/v) SDS. Preparar 500 mL; atemperar 250 mL a la temperatura de hibridación y 250 mL a 65 °C.

### 2.12.5. Detección inmunológica

La sonda se detecta mediante unión a un anticuerpo antidigoxigenina conjugado con la fosfatasa alcalina. Esta enzima actúa sobre el compuesto comercial CDP, desfosforilándolo y generando una señal quimioluminiscente que se puede registrar en películas de autorradiografía.

- ▶ Colocar la membrana en una bandeja de plástico. Tratarla a temperatura ambiente con tampón 1<sup>(52)</sup> (100 mL), durante 5 min y en agitación (80-100 oscilaciones/min, en un agitador de vaivén).
- ▶ Bloquear la membrana con tampón 2<sup>(53)</sup>, durante 30 min, en agitación y a temperatura ambiente.
- ▶ Introducir la membrana en una bolsa de plástico, ajustada a su tamaño. Añadir 20 mL de tampón 2 más anticuerpo antidigoxigenina conjugado con la fosfatasa alcalina (Roche), en una dilución 1/5000. Incubar durante, al menos, 2 h, en agitación.
- ▶ Eliminar la solución de anticuerpo y lavar la membrana dos veces con tampón 1, durante 15 min cada una, para eliminar el exceso de anticuerpo.
- ▶ Sustituir el tampón 1 por tampón 3<sup>(54)</sup> (tampón de la fosfatasa alcalina) y tratar durante 10 min. Esto permite equilibrar la membrana y la prepara para los siguientes pasos, que se realizan **en oscuridad**.
- ▶ Tratar la membrana con la solución de CDP-Star<sup>(55)</sup> (Roche), durante 5 min, en reposo y oscuridad. Es importante que la luz no incida sobre esta solución.
- ▶ Secar la membrana al aire e introducirla en un casete de autorradiografía, colocando sobre él una película fotográfica de autorradiografía (*Amersham Hyperfilm*, GE Healthcare Life Sciences). Cerrar el casete y esperar un tiempo de exposición variable, que depende de la intensidad de la señal, el estado del CDP, el estado del revelador, etc. Una aproximación inicial pueden ser 3 min de exposición.

- Revelar la película fotográfica de autorradiografía, utilizando las siguientes soluciones: **i)** revelador<sup>(56)</sup>, hasta que aparezcan las señales de hibridación); **ii)** solución de paro<sup>(57)</sup>, durante 1 min y **iii)** solución de fijación<sup>(58)</sup>, hasta que la película se vuelva transparente.

<sup>(52)</sup> **Tampón 1:** ácido maleico 100 mM; NaCl 150 mM; 0,3 % (v/v) Tween 20; pH 7,5. <sup>(53)</sup> **Tampón 2:** tampón 1 suplementado con 1 % (p/v) agente bloqueante (blocking reagent, Roche). <sup>(54)</sup> **Tampón 3:** Tris-HCl 0,1 M, pH 9,5; NaCl 1 M; MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 50 mM. <sup>(55)</sup> **Solución de CDP-Star:** diluir 100 veces en tampón 3, la solución CDP-Star 100X (Roche), quedando a 0,25 mM. Almacenar a 4 °C y en oscuridad. <sup>(56)</sup> **Revelador:** diluir 1:30 en agua destilada el preparado comercial Kodak Professional HC-110 Developer (Eastman Kodak Company). Almacenar en oscuridad. <sup>(57)</sup> **Solución de paro:** 2,5 % (v/v) ácido acético en agua destilada. Almacenar en el cuarto oscuro. <sup>(58)</sup> **Solución de fijación:** diluir el preparado comercial de Kodak en proporción 1:9 en agua destilada.

---

## 2.13. Secuenciación de ADN

---

El método de secuenciación empleado se basó en la síntesis de ADN complementario a partir de un cebador, con una ADN polimerasa, en presencia de didesoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977). Con tal fin, se utilizó el *kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) y la secuenciación de los productos de amplificación se realizó mediante electroforesis capilar en el secuenciador *ABI PRISM 3130* (Applied Biosystems) del **Área de Análisis de Ácidos Nucleicos del Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León**, o bien en el **Servicio de Genómica de INBIOTEC**. Una vez obtenidas, las secuencias se analizaron y procesaron por medio de herramientas bioinformáticas.

---

## 2.14. Obtención de células competentes de *E. coli*

---

La obtención de células competentes de *E. coli* XL1-Blue capaces de incorporar ADN exógeno de forma estable se realizó mediante dos métodos.

### 2.14.1. Método del cloruro de rubidio

El método del cloruro de rubio (Hanahan, 1983; Hanahan, 1985) permite preparar células competentes con eficiencias de transformación de hasta  $5 \times 10^8$  transformantes por  $\mu\text{g}$  de ADN.



- ▶ Inocular una colonia aislada de *E. coli* XL1-Blue, procedente de una placa fresca de medio LA, en 50 mL de medio SOB suplementado con sales de Mg (ver apartado 2.6.1). Incubar durante 12-14 h, con una agitación de 250 rpm y a 37 °C.
- ▶ Inocular 100 mL de medio SOB con 200-400 µL del preinóculo obtenido en el paso anterior. Incubar a 37 °C y 250 rpm, hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0,4-0,5.
- ▶ Cuando el cultivo alcanza la DO<sub>600</sub> deseada, detener el crecimiento enfriando rápidamente en un baño de agua-hielo, durante 10 min. A partir de este momento, mantener las células a una temperatura constante de 4 °C, para que no se vea afectada la eficiencia de las células competentes obtenidas.
- ▶ Transferir el cultivo a tubos GSA y recoger las células mediante centrifugación en una centrífuga *Sorvall RC-5B Plus*, a 2.600 x *g*, durante 5 min, a 4 °C. Retirar el sobrenadante, sin arrastrar el precipitado celular. Resuspender el precipitado en 30 mL de solución RF1 <sup>(59)</sup> fría y mantener 30 min en hielo.
- ▶ Centrifugar los tubos GSA a 4 °C, durante 5 min, a 2.600 x *g*. Retirar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 8 mL de solución RF2 <sup>(60)</sup> fría.
- ▶ Repartir la suspensión de células en alícuotas de 120 µL. Congelar las alícuotas inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido. Conservar los viales a -80 °C.
- ▶ Comprobar la eficiencia de transformación de las células competentes, expresada en transformantes/µg de ADN, empleando 10-20 pg de un plásmido previamente cuantificado.

<sup>(59)</sup> **Solución RF1:** RbCl 100 mM; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 50 mM; acetato potásico 30 mM; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 10 mM; 15 % (v/v) glicerol. Ajustar el pH a 5,8 con ácido acético 0,2 M. Esterilizar por filtración. <sup>(60)</sup> **Solución RF2:** MOPS 10 mM; RbCl 10 mM; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 75 mM; 15 % (v/v) glicerol. Ajustar el pH a 6,8 con NaOH 1 N.

## 2.14.2. Método SEM

El método SEM (del inglés, *simple and efficient method*) es una modificación del anterior, con una eficiencia ligeramente inferior, pudiendo alcanzarse valores de 1-3x10<sup>8</sup> colonias/µg de ADN (Inoue *et al.*, 1990).

- ▶ Inocular una colonia aislada de *E. coli* XL1-Blue de una placa fresca de medio LA, en 50 mL de medio SOB suplementado con sales de Mg. Incubar durante 6-8 h, a 37 °C, con una agitación de 250 rpm.
- ▶ Inocular diferentes volúmenes del cultivo anterior (50, 200 y 400 µL) en 100 mL de medio SOB suplementado con sales de Mg. Incubar a 18 °C, con una agitación de 220 rpm. La baja temperatura de cultivo mejora, en teoría, la adquisición de competencia por parte de las células.
- ▶ Controlar la densidad óptica (DO) de los cultivos y recoger cuando se alcance una DO<sub>600</sub> próxima a 0,22. Detener el crecimiento bacteriano en un baño de agua-hielo, durante 10 min.

- ▶ Transferir el cultivo a tubos GSA y recoger las células mediante centrifugación a  $2.500 \times g$  y  $4^\circ\text{C}$ , durante 10 min. Desechar el sobrenadante y resuspender el precipitado celular, de manera cuidadosa, en 32 mL de tampón de Inoue frío<sup>(61)</sup> ( $4^\circ\text{C}$ ).
- ▶ Centrifugar de nuevo a  $2.500 \times g$ , durante 10 min y a  $4^\circ\text{C}$ . Desechar el sobrenadante y resuspender las células en 8 mL de tampón de Inoue frío. Añadir 600  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO), mezclar y mantener 10 min en hielo.
- ▶ Repartir la solución de células competentes en alícuotas de 120  $\mu\text{L}$ , que deben congelarse rápidamente mediante inmersión en  $\text{N}_2$  líquido. Conservar las células a  $-80^\circ\text{C}$ , hasta el momento de su utilización. La velocidad de congelación y el mantenimiento a bajas temperaturas es determinante para conseguir elevadas eficiencias de transformación.
- ▶ Comprobar la eficiencia de transformación de las células competentes, expresada como número de transformantes/ $\mu\text{g}$  de ADN, empleando 10-20 pg de un plásmido previamente cuantificado.

<sup>(61)</sup> *Tampón de Inoue (Tampón TB):* PIPES 10 mM (a partir de una solución de PIPES 0,5 M, pH 6,7);  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  15 mM; KCl 250 mM. Ir añadiendo KOH 1 M para que se disuelvan los componentes y para ajustar el pH a 6,7. Después, añadir  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , para una concentración final de 55 mM. Esterilizar por filtración y conservar a  $4^\circ\text{C}$ .

---

## 2.15. Transformación de *E. coli*

---

Para la incorporación de material genético exógeno (vectores plasmídicos), las células competentes de *E. coli* fueron transformadas mediante choque térmico (Hanahan, 1983).

- ▶ Descongelar un vial de células competentes, manteniéndolo en hielo.
- ▶ Transferir 20  $\mu\text{L}$  de células competentes a un nuevo microtubo limpio. Añadir 2  $\mu\text{L}$  del ADN plasmídico a transformar. Mezclar suavemente con ayuda de una micropipeta e incubar durante 30 min en hielo.
- ▶ Realizar un choque térmico a  $42^\circ\text{C}$  durante 45 s e, inmediatamente, enfriar en hielo durante 2 min.
- ▶ Añadir aprox. 600  $\mu\text{L}$  de medio LB líquido e incubar las células durante 1 h, a  $37^\circ\text{C}$  y 250 rpm. Durante este tiempo, las células se recuperan y expresan los genes de resistencia a antibióticos incluidos en el plásmido empleado en la transformación.
- ▶ Sembrar las células en placas de medio suplementado con el antibiótico para la selección de transformantes (medio LB bajo en sales, para selección con Zeo; medio LB, para selección con Amp).

## 2.16. Transformación de levaduras

El proceso de transformación en *Komagataella* spp. es un proceso inherentemente complicado, puesto que el material genético exógeno debe penetrar en la célula hospedadora e integrarse en sitios específicos de su ADN cromosómico (Wu y Letchworth, 2004). En el presente trabajo fueron empleados tres métodos de transformación diferentes.

### 2.16.1. Transformación química: *kit Pichia EasyComp*

El sistema de transformación química comercial *Pichia EasyComp*<sup>TM</sup> (Invitrogen), se basa en la utilización de soluciones con sorbitol y DMSO para la preparación de células competentes, para, posteriormente, llevar a cabo la transformación empleando soluciones tamponadas con polietilenglicol (PEG) (Dohmen *et al.*, 1991). Consta de dos etapas indicadas a continuación.

#### 2.16.1.1. Preparación de células competentes

- ▶ Cultivar la cepa de *Komagataella* sp. de interés en placas de medio sólido YPD mediante siembra por agotamiento, a 28-30 °C, durante 48 h, hasta la aparición de colonias aisladas.
- ▶ Inocular 10 mL de medio YPD líquido con una colonia aislada de la cepa de *Komagataella* sp. de interés. Incubar durante 12-13 h a 28-30 °C en un agitador orbital, a 250 rpm.
- ▶ Diluir las células del cultivo anterior hasta una DO<sub>600</sub> de 0,1-0,2, en 10 mL de medio YPD líquido. Incubar las células a 250 rpm, 28-30 °C, durante 4-6 h, hasta que la DO<sub>600</sub> alcance 0,6-1,0.
- ▶ Precipitar las células mediante centrifugación a 500 x *g*, durante 5 min, a temperatura ambiente. Desechar el sobrenadante. Resuspender el precipitado de células en 10 mL de solución I<sup>(62)</sup>, **previamente atemperada a temperatura ambiente.**
- ▶ Precipitar las células mediante centrifugación a 500 x *g*, durante 5 min, a temperatura ambiente. Desechar el sobrenadante. Resuspender el precipitado de células en 1 mL de solución I. Las células son ya competentes.
- ▶ Repartir la suspensión de células en alícuotas de 50-200 µL (el volumen empleado posteriormente para cada transformación son 50 µL).
- ▶ Las células competentes pueden mantenerse a temperatura ambiente y emplearse inmediatamente, o almacenarse a -80 °C. Es muy **importante que las células se congelen de forma progresiva y lenta**, por ejemplo, empleando gradillas de poliestireno expandido cubiertas de capas de papel.

<sup>(62)</sup> **Solución I:** solución del sistema comercial *Pichia EasyComp™* (Invitrogen). Contiene sorbitol, etilenglicol y DMSO, para la preparación de células competentes. Almacenar a 4 °C y atemperar a temperatura ambiente antes de su uso.

### 2.16.1.2. Transformación de células competentes

La segunda etapa supone la transformación de las células competentes.

- ▶ Descongelar un vial de células competentes. Tomar una alícuota de 50  $\mu$ L de células y transferir a un microtubo estéril.
- ▶ Añadir 3  $\mu$ g de ADN plasmídico, previamente linealizado mediante una endonucleasa de restricción (puede ser empleado directamente a partir de la reacción, sin extraer y precipitar). La cantidad de ADN utilizada puede aumentarse, lo que puede mejorar la eficiencia, hasta un volumen máximo de 5  $\mu$ L.
- ▶ Añadir 1 mL de solución II <sup>(63)</sup> a la suspensión de células y ADN y mezclar.
- ▶ Incubar las reacciones de transformación durante 1 h, a 30 °C, mezclando cada 15 min. Mezclar las reacciones afecta positivamente a la eficiencia de transformación.
- ▶ Aplicar un choque térmico a 42 °C, durante 10 min.
- ▶ **Si se emplea Zeo para la selección de transformantes**, dividir el volumen de la mezcla de transformación en dos microtubos estériles nuevos (aprox., 525  $\mu$ L por microtubo) y añadir 1 mL de medio YPD líquido a cada microtubo. Incubar las células a 30 °C, durante 1 h, para permitir la expresión de la resistencia a Zeo. Si no se emplea dicho antibiótico como marcador de selección, proceder directamente al paso siguiente.
- ▶ Precipitar las células mediante centrifugación a 3.000 x *g* durante 5 min a temperatura ambiente. Desechar el sobrenadante.
- ▶ Si se emplea Zeo para la selección de transformantes, añadir 500  $\mu$ L de solución III <sup>(64)</sup> a cada microtubo, resuspender el precipitado de células y combinar en un único microtubo. Para otros marcadores de selección, resuspender el precipitado de células en 1 mL de solución III.
- ▶ Precipitar las células por centrifugación a 3.000 x *g* durante 5 min a temperatura ambiente. Desechar el sobrenadante.
- ▶ Resuspender el precipitado de células en 100-150  $\mu$ L de solución III. Sembrar la suspensión de células en placas con el antibiótico o marcador de selección. Incubar las placas durante 48-96 h, a 30 °C.
- ▶ Analizar el fenotipo Mut, cultivando los transformantes positivos en placas con medio MD/MDH y MM/MMH.

<sup>(63)</sup> **Solución II:** solución que forma parte del sistema comercial *Pichia EasyComp™* (Invitrogen). Contiene PEG, para la transformación de células competentes. Almacenar a temperatura ambiente, para evitar la precipitación del PEG.

<sup>(64)</sup> **Solución III:** solución de sales que forma parte del sistema comercial *Pichia EasyComp™* (Invitrogen), empleada para realizar lavados de las células y previamente a sembrar en placa. Almacenar a 4 °C y atemperar a temperatura ambiente previamente a su uso.

## 2.16.2. Transformación mediante electroporación

La transformación por electroporación se realizó según el manual *Pichia Expression Kit for expression of recombinant proteins in Pichia pastoris* (Invitrogen). Las eficiencias de transformación con este método son varios órdenes de magnitud mayores que por el método químico y comparables a los del método de producción de esferoplastos (hasta  $1 \times 10^5 / \mu\text{g}$ ) (Cregg, 2007).

- ▶ Inocular una colonia aislada de la cepa de *Komagataella* sp. elegida en 5 mL de medio YPD líquido, en un tubo Falcon de 50 mL. Incubar durante 12-14 h, a 30 °C y 250 rpm.
- ▶ Inocular 500 mL de medio YPD líquido en matraz de 2 L, con 0,1-0,5 mL del cultivo anterior. Incubar durante 12-14 h, a 28-30 °C y 250 rpm, hasta que se alcance una  $\text{DO}_{600}$  de 1,3-1,5.
- ▶ Transferir el cultivo a tubos GSA y centrifugar durante 5 min, a 1.500 x g y 4 °C. Retirar el sobrenadante con cuidado y resuspender el precipitado de células en 500 mL de agua destilada estéril a 4 °C.
- ▶ Centrifugar las células durante 5 min, a 1.500 x g y 4 °C. Resuspender el precipitado de células en 250 mL de agua destilada estéril a 4 °C.
- ▶ Centrifugar las células durante 5 min, a 1.500 x g y 4 °C. Resuspender el precipitado de células en 20 mL de sorbitol 1 M a 4 °C.
- ▶ Centrifugar las células durante 5 min, a 1.500 x g y 4 °C. Resuspender el precipitado celular en 1 mL de sorbitol 1 M a 4 °C, consiguiendo un volumen final de, aprox., 1,5 mL.
- ▶ Mezclar 80  $\mu\text{L}$  de células obtenidas en el paso anterior con 1-20  $\mu\text{g}$  de ADN plasmídico **previamente linealizado y desalado**, en un volumen de 5-10  $\mu\text{L}$  de tampón TE. Transferir la mezcla a una cubeta de electroporación de 0,2 cm a 0 °C.
- ▶ Incubar la cubeta con las células y el ADN en hielo, durante 5 min.
- ▶ Electroporar mediante el equipo *Gene Pulser® II* (Bio-Rad), empleando los parámetros recomendados por el fabricante para levaduras (1,5-2,0 kV; 25  $\mu\text{F}$ ; 200-400  $\Omega$ ;  $t \approx 7-8$  ms).
- ▶ Añadir inmediatamente 1 mL de sorbitol 1 M a la cubeta y transferir el contenido de la misma a un tubo de 10 mL nuevo estéril. Incubar durante un mínimo de 1 h (2-4 h), a 30 °C, sin agitación, para que las levaduras expresen el gen de resistencia a Zeo.

- ▶ Sembrar 10, 25, 50, 100, 200  $\mu$ L de la suspensión de células en placas de Petri con medio sólido YPDS, suplementado con el antibiótico de selección (Zeo).
- ▶ Incubar las placas durante 48-72 h, a 30 °C, hasta que aparezcan colonias.
- ▶ Tomar 10-20 colonias y volver a sembrar en placas de medio sólido YPDS suplementado con Zeo, para verificar la presencia de resistencia al antibiótico.
- ▶ Analizar el fenotipo Mut, cultivando los transformantes en placas con medio MD/MDH y MM/MMH.

### 2.16.3. Transformación mediante esferoplastos

El método se basa en la formación de esferoplastos mediante la digestión enzimática parcial de la pared de las levaduras, de modo que se vuelvan permeables a la entrada de material genético (Eddy y Williamson, 1957; Sommer y Lewis, 1971; Hinnen *et al.*, 1978; Cregg, 2007).

El protocolo empleado para la preparación de esferoplastos se basa en el descrito en el manual *Pichia Expression Kit for expression of recombinant proteins in Pichia pastoris* (Invitrogen), con modificaciones, como la sustitución de la enzima zimoliasa (un complejo enzimático con actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa,) por enzimas líticas de *T. harzianum* (Glucanex<sup>®</sup>. Sigma-Aldrich).

#### Preparación de esferoplastos

- ▶ Cultivar en placas de medio YPD sólido, mediante siembra por agotamiento, la cepa de *Komagataella* sp. seleccionada. Incubar durante 48 h a 30 °C, hasta conseguir colonias aisladas.
- ▶ Inocular una colonia aislada en 10 mL de medio YPD líquido, en un tubo Falcon de 50 mL. Incubar durante 12-14 h, a 30 °C y 250 rpm. Este preinóculo puede mantenerse a 4 °C durante varios días.
- ▶ Preparar 3 matraces lisos de 500 mL, cada uno con 200 mL de medio YPD líquido. Inocular los matraces con 5, 10 y 20  $\mu$ L del cultivo anterior, respectivamente. Incubar durante 12-14 h, a 30 °C y 250 rpm.
- ▶ Atemperar a temperatura ambiente las soluciones de transformación (tampón SE<sup>(65)</sup>, tampón SCE<sup>(66)</sup>, agua Milli-Q estéril, medio SOS<sup>(67)</sup>, solución PEG<sup>(68)</sup>, tampón CaS<sup>(69)</sup>, tampón CaT<sup>(70)</sup> y sorbitol 1 M), placas de medio RDB (para selección de transformantes) y RDBH (para el control de viabilidad celular).
- ▶ Monitorizar la DO<sub>600</sub> y recoger el cultivo cuando alcance un valor comprendido entre 0,2 y 0,3. Transferir el cultivo a tubos GSA y precipitar las células mediante centrifugación a temperatura ambiente y 1.500 x g, durante 5-10 min. Desechar el sobrenadante.
- ▶ Lavar el precipitado de células del paso anterior, resuspendiéndolo en 20 mL de agua destilada estéril, mediante movimientos circulares de la base del tubo. Transferir la suspensión de células a un nuevo tubo Falcon de 50 mL estéril.

- ▶ Precipitar las células mediante centrifugación a 1.500 x g, durante 5 min a temperatura ambiente. Desechar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 20 mL de tampón SED<sup>(71)</sup>, **preparado justo antes de su uso.**
- ▶ Precipitar las células mediante centrifugación a 1.500 x g, durante 5 min, a temperatura ambiente. Resuspender el precipitado de células en 20 mL de sorbitol 1 M y centrifugar de nuevo a 1.500 x g, durante 5 min, a temperatura ambiente.
- ▶ Resuspender el precipitado de células en 20 mL de tampón SCE, moviendo la base del tubo en círculos, y dividir la suspensión de células en dos tubos Falcon de 50 mL (aprox. 10 mL/tubo). Reservar uno de ellos a temperatura ambiente y emplear el otro en la optimización de las condiciones de reacción con enzimas líticas, que debe realizarse empíricamente cada vez que se lleva a cabo el protocolo.
- ▶ Para determinar las **condiciones óptimas de reacción con Glucanex<sup>®</sup>** (72), se monitoriza el porcentaje de esferoplastos. Preparar dos series de microtubos rotulados con los tiempos de monitorización (0, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60 min). Dispensar 800 µL de 5 % (p/v) SDS en cada uno de los microtubos. Ajustar la longitud de onda en un espectrofotómetro de luz UV-visible a 800 nm y hacer un blanco con 800 µL de 5 % (p/v) SDS y 200 µL de tampón SCE.
- ▶ Una vez listas las dos series de microtubos y puesto a punto el espectrofotómetro, añadir 200 µL de suspensión de células a los microtubos rotulados como tiempo 0 min y medir inmediatamente su DO<sub>800</sub> (esta será la referencia que se toma como porcentaje de esferoplastos igual a cero).
- ▶ Tomar uno de los tubos Falcon con 10 mL de suspensión de células y dividirlo, a su vez, en dos muestras de 5 mL. Añadir a cada una de ellas 7,5 y 15 µL de la solución de Glucanex<sup>®</sup>, respectivamente. Mezclar **con suavidad** e incubar a 30 °C, tomando medidas de densidad óptica a los tiempos designados en los microtubos. Para calcular el porcentaje de esferoplastos a cada tiempo de recogida, aplicar la siguiente fórmula:
 
$$\% \text{ de esferoplastos} = 100 - \left[ \left( \frac{DO_{800} \text{ a tiempo } t}{DO_{800} \text{ a tiempo } 0} \right) \times 100 \right]$$
- ▶ Determinar la cantidad de Glucanex<sup>®</sup> y el tiempo de incubación que resulta en la obtención de, aprox., un porcentaje del 70 % de esferoplastos. Una vez determinadas las condiciones óptimas de digestión de la pared, añadir dicha proporción de Glucanex<sup>®</sup> a la suspensión de células de 10 mL que se había reservado e incubar durante el tiempo calculado.
- ▶ Tras el tratamiento, recoger los esferoplastos mediante centrifugación a 750 x g, durante 10 min y a temperatura ambiente. Desechar el sobrenadante.
- ▶ Lavar el precipitado de células, resuspendiéndolo en 10 mL de sorbitol 1 M. Recoger los esferoplastos mediante centrifugación a 750 x g, durante 10 min y a temperatura ambiente. Desechar el sobrenadante.
- ▶ Lavar el precipitado de células, resuspendiéndolo en 10 mL de tampón CaS y centrifugar como en el paso anterior. Desechar el sobrenadante y resuspender los esferoplastos en 600 µL de tampón CaS. Los

esferoplastos preparados mediante este método deben usarse inmediatamente (**hasta 30 min**), pudiendo realizarse con estas cantidades hasta 6 transformaciones.

### **Transformación**

- ▶ Asegurarse de disponer de placas con medio RDB a temperatura ambiente y medios RD y RDH top agar en forma líquida y atemperados a 45 °C.
- ▶ Por transformación, transferir 100 µL de la muestra de esferoplastos a un microtubo de 1,5 mL estéril.
- ▶ Añadir a cada microtubo 10 µg de ADN plasmídico, previamente linealizado, mezclar con cuidado e incubar durante 10 min a temperatura ambiente. Durante esta incubación, preparar la solución PEG/CaT<sup>(73)</sup> fresca.
- ▶ Añadir 1 mL de solución PEG/CaT a la suspensión de células y ADN, mezclar con cuidado e incubar a temperatura ambiente, durante 10 min.
- ▶ Centrifugar los microtubos a 750 x g, durante 10 min, a temperatura ambiente. Retirar la solución PEG/CaT con cuidado, con ayuda de una micropipeta.
- ▶ Resuspender el precipitado de células transformadas en 150 µL de medio SOS. Incubar a temperatura ambiente, durante 20 min. Preparar y rotular tres tubos de 10 mL por transformación (un tubo/placa).
- ▶ Añadir a cada microtubo 850 µL de sorbitol 1 M.
- ▶ Para proceder a la siembra en placa, repartir 300 µL de la suspensión de células en SOS-sorbitol 1 M en cada uno de los tres tubos de 10 mL preparados a este efecto. Añadir a cada tubo 10 mL de medio RD top agar en forma líquida, atemperado a 45 °C. Cerrar los tubos de 10 mL y mezclar por inversión, con rapidez para que el medio no gelifique, pero con cuidado para no formar burbujas. Dispensar cada uno de los tubos sobre una placa conteniendo una capa de medio RDB.
- ▶ Permitir que la capa cobertera de medio RD/RDH top agar polimerice y solidifique. Incubar a 30 °C, durante 96-144 h, hasta la aparición de colonias de transformantes positivos.
- ▶ Para determinar la viabilidad celular tras el proceso de transformación, mezclar 50 µL de la suspensión de esferoplastos con 450 µL de sorbitol 1 M. Añadir 100 µL de esta mezcla a 10 mL de medio RDH top agar líquido atemperado a 45 °C y dispensar en una placa de RDBH. Dejar solidificar e incubar de forma similar a lo indicado en el punto anterior. Esto permite demostrar que los esferoplastos preparados son viables y capaces de regenerarse en forma de células íntegras que mantienen la facultad de dividirse.

<sup>(65)</sup> **Tampón SE:** sorbitol 1 M; EDTA 25 mM, pH 8,0. <sup>(66)</sup> **Tampón SCE:** sorbitol 1 M; EDTA 1 mM; tampón citrato de sodio 10 mM, pH 5,8. <sup>(67)</sup> **Medio SOS:** sorbitol 1 M; medio YPD líquido 0,3X; CaCl<sub>2</sub> 10 mM. <sup>(68)</sup> **Solución PEG:** 40 % (p/v) PEG 3350, en agua destilada. <sup>(69)</sup> **Tampón CaS:** sorbitol 1 M; Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; CaCl<sub>2</sub> 10 mM. <sup>(70)</sup> **Tampón CaT:** Tris 20 mM, pH 7,5; CaCl<sub>2</sub> 20 mM. <sup>(71)</sup> **Tampón SED:** en condiciones de esterilidad, mezclar 19 mL de tampón SE y 1 mL de DTT 1 M. Preparar fresca, justo antes de su empleo. <sup>(72)</sup> **Solución de Glucanex®:** 15 mg/mL de Glucanex® (Sigma-Aldrich), en agua destilada. Esterilizar por filtración y mantener en hielo. Preparar justo antes de su uso, no almacenar. <sup>(73)</sup> **Solución PEG/CaT:** mezclar un volumen de solución PEG y un volumen de tampón CaT, justo antes de su uso. Todas las soluciones empleadas para preparar esferoplastos se esterilizaron mediante filtración.



## 2.17. Métodos para la extracción y el análisis de ARN

La obtención de ARN es un proceso delicado, debido a la posibilidad de contaminación de las muestras con ARNasas. Para asegurar la integridad del ARN, es preciso extremar la limpieza del material, trabajar rápido, dentro de lo posible, manteniendo las muestras en hielo.

### 2.17.1. Obtención de ARN total de hongos filamentosos (Chomczynski y Sacchi, 1987)

- ▶ Sembrar en una placa de Petri con medio PW2 la cepa de *Penicillium* sp. de interés. Incubar durante 120 h a 28 °C, hasta el crecimiento de micelio y esporulación.
- ▶ Raspar la superficie de una placa esporulada y recoger los conidios con una punta de pipeta estéril y una micropipeta P5000. Emplear los conidios para inocular un matraz con 100 mL de medio MPPY. Incubar 24 h a 28 °C, con una agitación de 250 rpm.
- ▶ Pasadas 24 h, inocular un matraz de medio MPR con un 10 % (v/v) del cultivo en medio MPPY detallado en el paso anterior. Incubar durante 50 h, a 28 °C y 250 rpm.
- ▶ Recoger el micelio a través de un filtro de *nylon* NYTAL estéril (30-45 µm de diámetro de poro). Lavar con 100 mL de 0,9 % (p/v) NaCl. Dejar secar el micelio recuperado y compactarlo con ayuda de papeles de filtro. Agrupar las muestras en discos de aprox. 3 cm de diámetro y 0,5 cm de ancho. Congelar rápidamente, con N<sub>2</sub> líquido. Almacenar a -80 °C hasta que se vaya a continuar.
- ▶ Pulverizar el micelio congelado en un mortero con N<sub>2</sub> líquido, hasta reducirlo a un polvo fino. Recoger 500 mg de micelio pulverizado en un microtubo de 2.2 mL. Añadir 1,3 mL de tampón EFA<sup>(74)</sup> y agitar vigorosamente mediante vórtex, durante 1 min, hasta conseguir una mezcla homogénea.
- ▶ Centrifugar a 14.000 x g y 4 °C, durante 5 min. Transferir el sobrenadante a un microtubo de 2,2 mL estéril nuevo. Añadir al nuevo microtubo 130 µL de CIA y agitar enérgicamente, durante 15 s.
- ▶ Centrifugar a 14.000 x g y 4 °C, durante 5 min. Transferir a un nuevo microtubo la fase superior (acuosa) y hacer una extracción con fenol-CIA (apartado 2.10.1).
- ▶ Si es necesario, volver a centrifugar como en el paso anterior y repetir la extracción, hasta que la interfase esté libre de proteínas y restos celulares.
- ▶ Recuperar la fase superior y transferirla a un nuevo microtubo estéril. Precipitar el ARN total mediante la adición de 0,5 volúmenes de LiCl 8 M e incubación a 4 °C durante, al menos, 30 min (hasta 12-14 h).

- ▶ Recuperar el ARN total mediante centrifugación a 14.000 x *g*, 4 °C, durante 15 min. Retirar el sobrenadante, con cuidado y ayuda de una micropipeta.
- ▶ Lavar el precipitado dos veces, empleando primero 1 mL y luego 400 µL de etanol al 70 % en agua. Centrifugar a 14.000 x *g*, durante 5 min, a temperatura ambiente. Desechar el sobrenadante y resuspender el ARN total precipitado en 30 µL de agua destilada libre de ARNasas. Conservar a -80 °C.

<sup>(74)</sup> **Tampón EFA:** un volumen de tampón de extracción (isotiocianato de guanidina 4 M y 5 % (p/v) N-lauroil sarcosina, en tampón citrato sódico 25 mM, pH 7,0), suplementado con 7 volúmenes de β-mercaptoetanol y un volumen de fenol neutro, añadidos en este orden.

## 2.17.2. Obtención de ARN total de levaduras

La extracción de ARN total se llevó a cabo mediante dos métodos, el primero más laborioso, (obteniéndose una muestra más limpia y enriquecida en ARNm) y el segundo más rápido.

### 2.17.2.1. Extracción mediante-RNeasy Mini Kit

*RNeasy Mini Kit* (Qiagen) permite recuperar hasta 25 µg de ARN, a partir de  $1 \times 10^7$  células. La muestra de ARN recuperada contiene una alta proporción de ARNm, puesto que aquellas moléculas de ARN de menos de 200 nucleótidos (como ARNr 5,8S, ARNr 5S y ARNt, que en conjunto suponen hasta el 20 % del ARN total) se excluyen de forma selectiva.

- ▶ Sembrar en una placa de Petri con medio YPD los transformantes de *Komagataella* sp. de interés. Incubar durante 24-48 h a 30 °C, hasta que aparezcan colonias aisladas.
- ▶ Inocular con una colonia aislada un matraz con 100 mL del medio. Incubar a las condiciones a analizar, monitorizar la  $DO_{600}$ . Recoger el cultivo cuando se encuentre en fase logarítmica.
- ▶ Transferir el cultivo a tubos Falcon de 50 mL y recuperar las células mediante centrifugación a 3.220 x *g*, durante 10 min a 4 °C. Secar el precipitado de células y compactarlo con cuidado, con ayuda de papel de filtro. Formar discos con el precipitado y congelarlos inmediatamente, empleando N<sub>2</sub> líquido. Almacenar a -80 °C hasta que se continúe con la extracción.
- ▶ Preparar un mortero limpio, realizando lavados con cloroformo y etanol absoluto. Repetir el proceso dos veces y secar (puede emplearse un secador, para acelerar el proceso).
- ▶ Añadir al mortero la muestra de células congeladas a -80 °C. Pulverizar hasta conseguir un polvo fino, con ayuda del mortero y N<sub>2</sub> líquido. Transferir rápidamente a un microtubo y añadir 600 µL de tampón RLT<sup>(75)</sup>. Resuspender con ayuda de vórtex y rápidamente transferir a hielo.

- ▶ Centrifugar durante 2 min a  $16.168 \times g$  y  $4^\circ\text{C}$ . A partir de aquí, realizar las centrifugaciones a temperatura ambiente, trabajando lo más deprisa posible.
- ▶ Transferir el sobrenadante a un nuevo microtubo, con cuidado de no arrastrar el precipitado. Añadir un volumen de etanol 70 % en agua libre de ARNasas al lisado homogeneizado. Mezclar bien mediante pipeteo y **no centrifugar**.
- ▶ Transferir la muestra (aprox., unos 700  $\mu\text{L}$ ) a una columna RNeasy Mini Spin (columna de color rosa), colocada sobre un microtubo colector de 2 mL. Cerrar la tapa con cuidado y centrifugar durante 15 s a  $\geq 8.000 \times g$ . Desechar el sobrenadante. Si el volumen de muestra supera los 700  $\mu\text{L}$ , repetir el proceso empleando la misma columna, hasta pasar toda la muestra. Después de este paso, es posible continuar con el tratamiento con ADNasa en columna, como se detalla en el apartado 2.17.3.
- ▶ Añadir 700  $\mu\text{L}$  de tampón RW1 <sup>(76)</sup> sobre la membrana de columna. Cerrar la tapa con cuidado y centrifugar durante 15 s a  $\geq 8.000 \times g$ , para lavar la membrana de la columna. Desechar el sobrenadante (si se realiza tratamiento con ADNasa en columna, evitar este paso y pasar al siguiente).
- ▶ Añadir 500  $\mu\text{L}$  de tampón RPE <sup>(77)</sup> sobre la membrana de la columna. Cerrar la tapa con cuidado y centrifugar durante 15 s a  $\geq 8.000 \times g$ , para lavar la membrana de la columna. Desechar el sobrenadante.
- ▶ Repetir el paso anterior, centrifugando durante 2 min, en lugar de 15 s, para eliminar de la membrana el etanol residual que pudiera interferir con los siguientes usos de la muestra.
- ▶ Colocar la columna a un nuevo tubo, para evitar la transferencia de etanol a la muestra. Centrifugar durante 1 min a  $16.168 \times g$ , para asegurarse de eliminar el etanol residual.
- ▶ Colocar la columna en un nuevo microtubo de 1,5 mL. Añadir 30  $\mu\text{L}$  de agua destilada libre de ARNasas directamente sobre el centro de la membrana de la columna. Cerrar la tapa con cuidado y centrifugar durante 1 min a  $\geq 8.000 \times g$ , para eluir el ARN.
- ▶ Repetir el paso anterior, eluyendo con otros 30  $\mu\text{L}$  de agua destilada libre de ARNasas. Centrifugar, manteniendo el mismo microtubo colector bajo la columna. Es posible emplear en este paso el eluido del paso anterior, en vez de más agua destilada. Esto determina una concentración final de ARN en la muestra mayor, pero un porcentaje de recuperación del ARN unido a la membrana un 15-30 % inferior que el obtenido añadiendo un segundo volumen de agua destilada.

<sup>(75)</sup> La composición exacta de los tampones del kit es confidencial y propiedad de Qiagen. El **tampón RLT** contiene una alta concentración de isotiocianato de guanidina, que favorece la unión del ARN a la membrana de sílice. Previamente a su uso, el tampón se suplementa con 10  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol por cada mL de tampón, para inactivar ARNasas.

<sup>(76)</sup> El **tampón RW1** contiene una sal de guanidina y etanol, siendo un tampón de lavado intenso que elimina eficazmente biomoléculas como carbohidratos, proteínas, ácidos grasos y otras sustancias adheridas a la membrana de forma inespecífica. También elimina las moléculas de ARN de menos de 200 pb, por lo que no es apropiado para estudios sobre moléculas de ARN pequeño. <sup>(77)</sup> El **tampón RPE** se utiliza para el lavado suave de las muestras, eliminando sales, y contiene etanol, que debe ser añadido por el usuario previamente a su uso.

### 2.17.2.2. Extracción de ARN (Schmitt *et al.*, 1990)

El segundo método empleado para el aislamiento de ARN de levaduras se llevó a cabo de acuerdo al manual *Pichia Expression Kit for expression of recombinant proteins in Pichia pastoris* (Invitrogen). Esta técnica es rápida y permite aislar 60-300 µg de ARN total de levaduras.

- ▶ Sembrar en una placa de Petri con medio YPD los transformantes de *Komagataella* sp. de interés. Incubar durante 24-48 h a 30 °C, hasta que aparezcan colonias aisladas.
- ▶ Inocular con una colonia aislada un matraz con 100 mL de medio de crecimiento de levaduras de interés. Incubar a las condiciones a analizar, monitorizar la DO<sub>600</sub>. Tomar muestras del cultivo a los tiempos de interés, o bien recoger todo el cultivo cuando se encuentre en fase logarítmica.
- ▶ Precipitar las células mediante centrifugación a 1.500 x g, durante 10 min, a temperatura ambiente. Resuspender el precipitado de células en 400 µL de tampón AE<sup>(78)</sup> y transferirlo a un microtubo.
- ▶ Añadir 40 µL de una solución 10 % (p/v) SDS y agitar mediante vórtex, durante aprox. 20 s.
- ▶ Añadir un volumen de tampón de fenol tamponado<sup>(79)</sup> (aprox., 450-500 µL) al microtubo y mezclar mediante agitador de tipo vórtex, durante 20 s. Incubar la suspensión de células a 65 °C, durante 4 min.
- ▶ Incubar la suspensión de células a -80 °C, hasta que aparezcan cristales (aprox. 1 min). Centrifugar a 16.168 x g, durante 2 min, a 4 °C.
- ▶ Transferir la fase superior (acuosa) a un nuevo microtubo. Añadir un volumen de fenol-CIA y mezclar mediante agitador vórtex, durante 20 s. Centrifugar a 16.168 x g, durante 2 min, a 4 °C.
- ▶ Transferir la fase superior a un nuevo microtubo y añadir 40 µL de acetato de sodio 3 M, pH 5,3 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío (-20 °C). Centrifugar el microtubo a 16.168 x g, durante 15 min, a 4 °C. Desechar el sobrenadante.
- ▶ Lavar el precipitado con etanol al 80 % en solución acuosa y dejar secar al aire ligeramente. Resuspender el ARN total en 20 µL de agua destilada libre de ARNasas y almacenar a -80 °C.
- ▶ El ARN total puede ser tratado con ADNasa para eliminar el ADN contaminante (apartado 2.17.3).

<sup>(78)</sup> **Tampón AE:** acetato de sodio 50 mM, pH 5,3; EDTA 10 mM. <sup>(79)</sup> **Fenol tamponado:** mezclar un volumen de fenol con un volumen de tampón AE. Voltear el tubo para mezclar. Dejar reposar y medir el pH mediante una tira de pH. Repetir el proceso hasta conseguir un pH en torno a 5,3. Conservar en un recipiente opaco, a 4 °C.

### 2.17.3. Tratamiento con ADNasa

Para la eliminación selectiva de ADN se utilizaron dos métodos: i) ADNasa TURBO<sup>®</sup> (Ambion); ii) empleo secuencial de dos ADNasas: ADNasa I grado amplificación (Sigma-Aldrich)

y ADNasa libre de ARNasa (Qiagen), junto con el sistema comercial *RNeasy Mini Kit* (Qiagen). Las muestras de ARN purificado son poco estables, por lo que se almacenaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Todas las soluciones utilizadas en el protocolo empleando ADNasa TURBO<sup>®</sup> (Ambion), que se detalla a continuación, forman parte del sistema comercial *TURBO DNA-free*<sup>™</sup> (Ambion).

- ▶ Tomar el volumen que corresponda a 1,5  $\mu\text{g}$  de ARN y completar con agua destilada libre de ARNasas, hasta un volumen final de 35,2  $\mu\text{L}$ .
- ▶ Añadir 4  $\mu\text{L}$  de tampón TURBO<sup>®</sup> MIX 10X y 0,8  $\mu\text{L}$  de ADNasa TURBO<sup>®</sup>. Mezclar con suavidad, mediante pipeteo.
- ▶ Incubar a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 30 min.
- ▶ Añadir 0,8  $\mu\text{L}$  de ADNasa TURBO<sup>®</sup>, mezclar e incubar de nuevo, 30 min a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- ▶ Detener la reacción con 8  $\mu\text{L}$  de tampón de inactivación.
- ▶ Incubar durante 5 min a temperatura ambiente, mezclando ocasionalmente.
- ▶ Centrifugar durante 3 min a máxima velocidad, para compactar la resina del tampón de inactivación.
- ▶ Recuperar el sobrenadante (aprox., unos 45  $\mu\text{L}$ ) y almacenarlo en un microtubo nuevo.

El segundo protocolo de tratamiento con ADNasa, que combina el uso de ADNasa I grado amplificación (Sigma-Aldrich) y ADNasa libre de ARNasa (Qiagen), junto con el sistema comercial *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) se detalla a continuación.

#### Primer tratamiento con ADNasa I (Sigma-Aldrich) en microtubo

- ▶ Tomar el volumen que corresponda a 10-15  $\mu\text{g}$  de ARN, añadir 10  $\mu\text{L}$  de tampón de reacción 10X, 10  $\mu\text{L}$  de ADNasa I (Sigma-Aldrich) y completar con agua destilada libre de ARNasas, hasta 100  $\mu\text{L}$ .
- ▶ Mezclar con suavidad (no emplear vórtex) e incubar a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 45 min.

#### Segundo tratamiento con ADNasa I (Qiagen) en columna

- ▶ Completado el tratamiento con ADNasa I (Sigma-Aldrich), proceder a un tratamiento con ADNasa libre de ARNasa (Qiagen) usando *RNeasy Mini Kit* (Qiagen). Añadir 350  $\mu\text{L}$  de tampón RLT y mezclar.
- ▶ Añadir 250  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto a la solución de ADN y mezclar mediante pipeteo suave. No centrifugar.
- ▶ Transferir la muestra (700  $\mu\text{L}$ ) a una columna *RNeasy Mini Spin*, colocada en un tubo colector de 2 mL, incluido en el *kit*. Cerrar la tapa y centrifugar durante 15 s a  $\geq 8.000 \times g$ . Desechar el sobrenadante.
- ▶ Añadir 350  $\mu\text{L}$  de tampón RW1 sobre la columna *RNeasy Mini Spin*. Cerrar la tapa y centrifugar durante 15 s a  $\geq 8.000 \times g$ , para lavar la membrana de la columna. Desechar el sobrenadante.

- ▶ Añadir 10  $\mu\text{L}$  de solución de ADNasa libre de ARNasa sobre 70  $\mu\text{L}$  de tampón RDD. Mezclar por inversión y dar un pulso de centrifuga para recuperar el líquido que quede en las paredes del tubo.
- ▶ Añadir la mezcla de ADNasa I (80  $\mu\text{L}$ ) directamente sobre la membrana de la columna RNeasy Mini Spin, asegurándose de que toda la muestra está uniformemente en la membrana y nada queda en las paredes del tubo. Incubar a 28-30  $^{\circ}\text{C}$ , durante 30  $^{\circ}\text{C}$ .
- ▶ Añadir 350  $\mu\text{L}$  de tampón RW1 sobre la columna. Cerrar la tapa y centrifugar durante 15 s a  $\geq 8.000 \times g$ . Desechar el sobrenadante.
- ▶ Añadir 500  $\mu\text{L}$  de tampón RPE sobre la columna. Cerrar la tapa y centrifugar durante 2 min a  $\geq 8.000 \times g$ , para lavar la membrana. Desechar el sobrenadante.
- ▶ Añadir 500  $\mu\text{L}$  de tampón RPE sobre la columna. Cerrar la tapa y centrifugar durante 15 s a  $\geq 8.000 \times g$ , para lavar la membrana. Desechar el sobrenadante. El tampón RPE contiene etanol, que puede interferir con los experimentos que se realicen empleando la muestra con posterioridad. Para eliminar el etanol, colocar la columna en un nuevo tubo colector y centrifugar a velocidad máxima, durante 1 min.
- ▶ Colocar la columna en un nuevo tubo colector de 1,5 mL, incluido en el *kit*. Añadir 30  $\mu\text{L}$  de agua libre de ARNasas directamente sobre la membrana de la columna. Cerrar la tapa y centrifugar durante 1 min a  $\geq 8.000 \times g$ , para eluir el ARN.
- ▶ Para recuperar una mayor cantidad de ARN, repetir el paso anterior nuevamente, añadiendo otros 30  $\mu\text{L}$  de agua libre de ARNasas sobre la membrana y centrifugando según el paso anterior.

La eficacia de digestión con ADNasas y la ausencia de ADN contaminante se comprobó realizando reacciones de PCR en paralelo a las de RT-PCR. El resultado esperable tras un tratamiento con ADNasa adecuado es la ausencia de productos de amplificación.

#### **2.17.4. Transcripción inversa de ARN (RT-PCR)**

La reacción de RT-PCR se realizó mediante el *kit SuperScript<sup>®</sup> III One-Step*, con ADN polimerasa *Platinum<sup>®</sup> Taq* (Invitrogen). Este sistema contiene una mezcla de dos enzimas en un tampón adecuado: i) la **transcriptasa inversa SuperScript<sup>®</sup> III**, que es activa a 45-60  $^{\circ}\text{C}$  y da lugar a la síntesis de ADNc, a partir de un molde de ARN, y ii) **la ADN polimerasa de alta fidelidad Platinum<sup>®</sup> Taq**, que incluye un anticuerpo que bloquea su actividad a temperatura ambiente, activándose al tener lugar la primera desnaturalización de la PCR. Los componentes y el programa de una reacción básica de RT-PCR se recogen en la Tabla 2.6 y 2.7, respectivamente.

El producto de las reacciones de RT-PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa (ver apartado 2.10.4) y la ausencia de ADN contaminante en las muestras de ARN empleadas como molde se analizó según se indica al final del apartado 2.17.3.

**Tabla 2.6.** Componentes básicos de una reacción de RT-PCR (cantidades para una reacción de 50  $\mu$ L).

<b>Tampón de reacción 2X</b>	25 $\mu$ L
<b>ARN molde</b>	200-400 ng de ARN (el kit indica que pueden emplearse desde 0,01 $\mu$ g hasta 1 $\mu$ g)
<b>Oligonucleótido directo (10 <math>\mu</math>M)</b>	1 $\mu$ L
<b>Oligonucleótido inverso (10 <math>\mu</math>M)</b>	1 $\mu$ L
<b>SuperScript™ III RT/Platinum® Taq Mix</b>	1-2 U/ $\mu$ g de ADN
<b>Agua destilada libre de ARNasas</b>	Completar volumen hasta 50 $\mu$ L

**Tabla 2.7.** Programa estándar de RT-PCR empleado.

<b>Síntesis de ADNc y predesnaturalización</b>		30 min a 55 °C	1 ciclo
<b>Desnaturalización inicial</b>		2 min a 94 °C	1 ciclo
<b>Amplificación</b>	Desnaturalización	15 s a 94 °C	40 ciclos
	Anillamiento	30 s a temperatura según cebadores	
	Extensión	X s a 68 °C (1 min/1 kpb)	
<b>Extensión final</b>		5 min a 68 °C	1 ciclo

## 2.18. Valoración de la actividad FAE mediante ensayo en placa

La actividad FAE se determinó cualitativamente en placas, mediante la relación entre el diámetro del halo de degradación de un sustrato y el de la colonia (Donaghy y McKay, 1994).

El protocolo para **hongos filamentosos** se detalla a continuación.

- ▶ Sembrar en placas de Petri con medio PW2 las cepas o aislados de hongos filamentosos a analizar mediante bioensayo. Incubar durante 120-168 h a 25-28 °C, según las condiciones óptimas de cultivo, hasta conseguir placas con micelio esporulado.
- ▶ Preparar placas con medio EF, sobre una superficie lisa y nivelada.

- ▶ Emplear un sacabocados estéril para hacer agujeros de 10 mm de diámetro en una placa de medio EF. Obtener tacos del mismo diámetro, procedentes de placas con micelio esporulado de los hongos a analizar. Transferir dichos tacos a los agujeros preparados en la placa con medio EF, manteniendo el micelio hacia arriba y teniendo cuidado para evitar la dispersión de conidios. Como control, se emplean placas con medio EF sin etil ferulato. Utilizar, como mínimo, tres réplicas biológicas por cada cepa.
- ▶ Incubar las placas a 25-28 °C, manteniendo el medio en la base (sin dar la vuelta a la placa), durante 24-288 h, en función de la cepa.
- ▶ Pasado el tiempo de incubación, analizar la actividad FAE. Para ello, añadir sobre la placa una solución con el indicador de pH verde de bromocresol<sup>(80)</sup> y teñir durante 15 min. Hacer dos lavados de la superficie de la placa de 5 min con NaCl al 0,9 % (p/v) en solución acuosa. La presencia de actividad FAE da lugar a la formación de halos de degradación de etil ferulato hacia ácido ferúlico, con una bajada de pH en el medio que se observa mediante el viraje del indicador de pH, de color azulado a amarillo.
- ▶ Expresar la actividad FAE, mediante la fórmula del Índice Enzimático (IE) (Braga *et al.*, 2014), indicada a continuación:

$$IE = \frac{\varnothing \text{ de la colonia} + \varnothing \text{ del halo de degradación}}{\varnothing \text{ de la colonia}}$$

<sup>(80)</sup> **Solución de verde de bromocresol:** 0,04 % (p/v) verde de bromocresol, en agua destilada. Preparar disolviendo 40 mg de verde de bromocresol en 5 mL de etanol y completando con 95 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 4,6.

Para la determinación cualitativa de actividad FAE en transformantes de **levaduras**, se realizaron modificaciones al protocolo anterior. El cultivo inicial se llevó a cabo mediante siembra de parches/gotas de una suspensión de células a partir de cada transformante en placas con medio YPD, incubadas a 30 °C, durante 24-48 h. Posteriormente, el ensayo se realizó en placas de medio EF, en este caso incluyendo en el propio medio el indicador de pH púrpura de bromocresol<sup>(81)</sup>. Esto permite una visualización más rápida de la actividad FAE, midiéndose los halos amarillos frente a un fondo morado a las 5-6 h. El protocolo completo se encuentra desarrollado en el apartado 3.3.3.2.

<sup>(81)</sup> **Medio EF con púrpura de bromocresol:** añadir 1,5 mL de solución concentrada de púrpura de bromocresol, por cada L de medio EF. El color del medio debe ser púrpura; si es anaranjado, ajustar el pH con 7,5-15 µL de NaOH 2 N por cada 100 mL de medio. **Solución concentrada de púrpura de bromocresol:** 0,4 % (p/v) púrpura de bromocresol en agua destilada.



## 2.19. Preparación de extractos enzimáticos

Los extractos enzimáticos procedentes de caldos de fermentación de microorganismos cultivados en condiciones de expresión de enzimas lignocelulolíticas se obtuvieron a partir de la precipitación de las enzimas extracelulares. Todos los pasos se realizaron en hielo, o bien en una cámara fría a 4 °C, para minimizar los procesos de proteólisis.

- ▶ Recuperar el sobrenadante de la fermentación o la muestra de interés. Filtrar todo el volumen a través de una membrana de *nylon* NYTAL de 30 µm de diámetro de poro, recogiendo el caldo filtrado en una botella de vidrio estéril, en hielo.
- ▶ Transferir el caldo filtrado a tubos Falcon de 50 mL, repartiendo en alícuotas de 45 mL por tubo. Centrifugar a 4 °C y 3.220 x *g*, durante 15 min. Transferir el sobrenadante a tubos limpios nuevos y repetir la centrifugación.
- ▶ Filtrar el sobrenadante a través de membranas de PES de 0,22 µm de diámetro de poro (Millipore), aplicando vacío mediante una bomba. Medir y tomar nota del volumen de filtrado.
- ▶ Transferir el filtrado a vasos de precipitado estériles, con una barra de agitación magnética. Añadir sulfato de amonio para un porcentaje de saturación del 100 % a 4 °C, calculado mediante la herramienta *online EnCorBio* (Wingfield, 1998). Incubar durante un mínimo de 12-14 h a 4 °C, con agitación moderada.
- ▶ Tras la precipitación, transferir todo el volumen a tubos GSA estériles fríos, procurando no tomar el exceso de sal. Recuperar el precipitado proteico centrifugando a 4 °C y 10.400 x *g*, durante 1 h.
- ▶ Desechar el sobrenadante y dejar secar el precipitado ligeramente, colocando los tubos GSA boca abajo sobre un papel de filtro, durante 15 min.
- ▶ Colocar los tubos GSA en hielo. Disolver el precipitado en el mínimo volumen posible de tampón acetato 0,02 N pH 5,0<sup>(82)</sup>, con cuidado y ayuda de una micropipeta. Tomar nota del volumen empleado para calcular el factor de concentración del extracto enzimático (habitualmente, 100X).
- ▶ Repartir el volumen de extracto enzimático en alícuotas de poco volumen (500-750 µL) en microtubos de 1,5 mL estériles. Almacenar a -20 °C, hasta su uso.
- ▶ El desalado de los extractos enzimáticos, en su caso, se llevó a cabo mediante diálisis, empleando columnas Amicon® Ultra-4 con membrana de 10 kDa de diámetro de poro (Millipore).

<sup>(82)</sup> **Tampón acetato 0,02 N pH 5,0** preparar una solución de 223 µL de ácido acético glacial en 200 mL de agua destilada (solución A) y una solución de 0,328 g de acetato de sodio en 200 mL de agua destilada (solución B). Mezclar la solución A y solución B en una proporción 4:10. Medir el pH y ajustar con dichas soluciones hasta un pH de 5,0. Esterilizar por filtración.

## 2.20. Determinación cuantitativa de la actividad FAE

La determinación cuantitativa de la actividad FAE se realizó mediante la medida por HPLC de los AHC liberados a partir de la hidrólisis de sustratos. La actividad FAE se expresó en unidades (U), definidas como la cantidad de enzima requerida para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de producto por min, bajo las condiciones analizadas. Los sustratos empleados se describen en el apartado 2.1.1.

### 2.20.1. Ensayo FAE frente a sustratos sintéticos (ésteres de ácidos hidroxicinámicos)

El protocolo detallado a continuación fue el método estándar para realización de reacciones FAE (Sakamoto et al., 2005). El protocolo se adaptó en función de la variable a analizar.

- ▶ Preparar microtubos de 1,5 mL con 190  $\mu\text{L}$  de solución de MFA <sup>(83)</sup>. Añadir 10  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático. Mezclar con cuidado, con ayuda de una pipeta o agitador de tipo vórtex.
- ▶ Incubar a 37 °C, durante 30 min y sin agitación.
- ▶ Dar un pulso de centrifuga para recuperar todo el volumen de reacción en el fondo del tubo. Detener las reacciones hirviendo los microtubos durante 5 min.
- ▶ Centrifugar durante 5 min, a temperatura ambiente y 16.168 x g, de modo que todas las partículas en suspensión precipiten en el fondo del tubo. Filtrar las muestras a través de filtros de jeringa de politetrafluoroetileno (PTFE) 0,22 o 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Fisherbrand).
- ▶ Transferir 150  $\mu\text{L}$  de la reacción a viales de HPLC para la determinación de ácido férulico. La actividad se expresó en U/g de proteína total en el extracto enzimático.
- ▶ Para asegurar la representatividad de los resultados, todos los ensayos se realizaron, como mínimo, por triplicado. Se utilizaron, asimismo, controles negativos realizando reacciones con tampón acetato 0,02 N pH 5,0 en lugar de extracto enzimático, y con medio de cultivo sin inocular.

<sup>(83)</sup> **Solución de MFA:** 0,05 % (p/v) MFA en tampón acetato 0,1 N pH 5,0. Pesar 5 mg de MFA en un tubo de 10 mL y disolver en 500  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto. Completar el volumen hasta 10 mL con tampón acetato 0,1 N, pH 5,0. **Tampón acetato 0,1 N, pH 5,0:** preparar una solución de 1115  $\mu\text{L}$  de ácido acético glacial en 200 mL de agua destilada (solución A) y una solución de 1,64 g de acetato de sodio en 200 mL de agua destilada (solución B). Mezclar la solución A y solución B en una proporción 4:10. Medir el pH y ajustar con dichas soluciones hasta pH 5,0. Esterilizar por filtración.

## 2.20.2. Ensayo FAE frente a sustratos lignocelulósicos naturales

Para analizar el potencial hidrolítico de los extractos enzimáticos frente a paredes celulares vegetales, se emplearon sustratos naturales (pulpa de remolacha y fibra de avena de molienda).

- ▶ Añadir a tubos Falcon de 50 mL un 2 % (p/v) del sustrato natural (para 5 mL de reacción, 100 mg) y esterilizar en autoclave.
- ▶ Añadir a los tubos con sustrato natural el volumen necesario de tampón acetato 0,1 N pH 5,0 para un volumen final de 5 mL, tras la adición del extracto enzimático.
- ▶ Añadir volúmenes diferentes de extracto enzimático a los tubos, en un rango desde 15,625 µg de proteína total de extracto enzimático, hasta 2,5 mg, en función de la potencia de la actividad FAE.
- ▶ Incubar las reacciones durante 24 h, a 50 °C y 175 rpm en un agitador orbital.
- ▶ Transferir el sobrenadante a tubos limpios, filtrando las muestras a través de filtros de jeringa de 0,22 µm de diámetro de poro (Fisherbrand).
- ▶ Detener las reacciones hirviendo las muestras durante 5 min, para inactivar la actividad enzimática.
- ▶ Analizar la presencia y cantidad de ácido ferúlico liberado, mediante HPLC (apartado 2.20.3). La actividad FAE se expresó como g de ácido ferúlico liberados por kg de sustrato lignocelulósico, referido a la cantidad de proteínas totales procedentes del extracto enzimático que se añadieron.
- ▶ Todas las reacciones se llevaron a cabo, como mínimo, por triplicado. Se incluyeron controles negativos, añadiendo tampón acetato 0,02 N pH 5,0, en lugar de extracto enzimático.

## 2.20.3. Cuantificación de ácidos hidroxicinámicos y sus ésteres mediante HPLC

Debido a la distinta disponibilidad en el tiempo de los equipos de HPLC presentes en INBIOTEC, se desarrollaron diferentes métodos de detección de AHC y sus ésteres, optimizados para los equipos Waters y Agilent (apartado 2.4.4).

Se emplearon dos columnas analíticas de cromatografía de fase reversa: i) columna *Mediterranea*<sup>™</sup> Sea 18 3 µm (150 x 4,6 mm. Teknokroma) y ii) columna *Kinetex*<sup>®</sup> 2,6 µm EVO C18 100 Å (150 x 4,6 mm. Phenomenex).

La detección de los AHC se realizó espectrofotométricamente a las longitudes de onda de 243 y 324 nm, a las cuales el ácido ferúlico presenta máximos de absorción. La cuantificación se llevó a cabo a partir de la determinación a 324 nm, mediante la técnica del estándar externo, a partir de rectas de calibración elaboradas por triplicado, en las mismas condiciones de análisis que las muestras. Las rectas sólo se aceptaron cuando mostraron coeficientes de regresión lineal ( $R^2 \geq 0,99$ , en el rango analizado, y desviaciones relativas estándar (RSD) inferiores al 20 %.

Los picos de sustratos y productos fueron evaluados en base a un método de elución con gradiente, a una velocidad de flujo de 0,8 mL/min. Los instrumentos empleados en cada uno de los dos equipos de análisis cromatográfico se detallan en el apartado 2.4.4 (los detectores empleados en el equipo Waters fueron el detector de luz UV-visible *Waters 2487* y el detector PDA *Waters 996*). Como fase móvil, se empleó una mezcla de agua Milli-Q, acidificada con ácido trifluoroacético (TFA) a una concentración final de 0,01% (v/v) (solución A) y metanol (solución B). La concentración relativa de ambas soluciones varió a lo largo del método analítico, según un gradiente (Tabla 2.8). Todas las soluciones empleadas se filtraron mediante portafiltras de vidrio con filtros desechables de membrana (discos de PTFE de 47 mm, con poro 0,45  $\mu\text{m}$ . Millipore).

**Tabla 2.8.** Métodos cromatográficos para la determinación HPLC de AHC. Solución A: TFA 0,01 % (v/v) en agua Milli-Q; solución B: metanol.

Equipo Waters / Agilent		
Tiempo	% solución A	% solución B
0	60	40
15	10	90
16	0	100
21	0	100
22	60	40
27	60	40

## 2.21. Determinación de actividad celulolítica

La hidrólisis de la celulosa (actividad celulasa) tiene lugar mediante la acción sinérgica de tres grupos de enzimas:  $\beta$ -glucosidasas, exoglucanasas (celobiohidrolasas) y endoglucanasas. Los sustratos y reactivos empleados se recogen en el apartado 2.1.1.

### 2.21.1. Determinación de actividad $\beta$ -glucosidasa

El método se basa en la liberación de 4-nitrofenol a partir de pNPG que presenta color amarillo a pH alcalino, detectable espectrofotométricamente a 405 nm (Li *et al.*, 2016). Los valores de actividad  $\beta$ -glucosidasa se determinaron a partir de una recta de calibración para el 4-nitrofenol y se expresaron como actividad específica, en unidades (U) por gramo de proteína total en el extracto enzimático (1 U definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol de 4-nitrofenol por min, bajo las condiciones empleadas en el ensayo).

- ▶ Preparar microtubos de 1,5 mL. Transferir a cada microtubo 540  $\mu$ L de una solución de pNPG 4 mM en tampón acetato 0,1 N pH 5,0.
- ▶ Añadir 10  $\mu$ L de extracto enzimático a cada microtubo de reacción. Mezclar e incubar a 50 °C en bloque térmico. El tiempo de reacción depende de la actividad del extracto y se estableció de modo que los valores de absorbancia de la muestra permanecieran en el rango comprendido en la curva de calibración.
- ▶ Detener las reacciones mediante la adición de un volumen (550  $\mu$ L) de 2 % (p/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , en solución acuosa. Mezclar mediante agitador de tipo vórtex. Medir inmediatamente la absorbancia de las muestras a 405 nm en un espectrofotómetro de luz UV-visible.
- ▶ Para el cálculo de la concentración de 4-nitrofenol, los valores de absorbancia se compararon con los de una curva de calibración previamente preparada, por triplicado y en las mismas condiciones de reacción.

**Nota:** si las reacciones se llevan a cabo con caldo de fermentación en lugar de extracto enzimático, añadir 100  $\mu$ L de caldo filtrado a 450  $\mu$ L de la solución de pNPG.

### 2.21.2. Determinación de actividad celobiohidrolasa

La actividad celobiohidrolasa se determinó de forma similar al protocolo descrito anteriormente para la actividad  $\beta$ -glucosidasa, con la salvedad de que el sustrato empleado en este caso fue una solución de pNPC 4 mM en tampón acetato 0,1 N pH 5,0, suplementada con 1 mg/mL D-glucono-1,5- $\delta$ -lactona (Li *et al.*, 2016). Los valores de actividad celobiohidrolasa se determinaron y expresaron en U/g proteína total en el extracto enzimático, de forma similar a lo expuesto en el apartado 2.21.1.

### 2.21.3. Determinación de actividad endoglucanasa

La actividad endoglucanasa se analizó **cuantitativamente** a través de la medida de la liberación de azúcares reductores mediante la adición de DNS y análisis espectrofotométrico a 540 nm (Xiao *et al.*, 2005). Los valores se presentaron como actividad específica, expresada en unidades (U) por gramo de proteína total en el extracto enzimático (una unidad definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar un  $\mu\text{mol}$  de producto –glucosa– por min, bajo las condiciones estándar de ensayo).

- ▶ Preparar microtubos de 1,5 mL. Transferir a cada microtubo 240  $\mu\text{L}$  de tampón acetato 0,1 N pH 5,0 y 250  $\mu\text{L}$  de una solución de CMC al 2 % (p/v), en tampón acetato 0,1 N pH 5,0.
- ▶ Añadir a cada microtubo de reacción 10  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático. Incubar las reacciones durante 15 min a 50 °C, en un bloque térmico.
- ▶ Pasado el tiempo de incubación, añadir 500  $\mu\text{L}$  de reactivo DNS<sup>(84)</sup>. Revelar el color incubando los microtubos a 99 °C, durante 5 min. Enfriar 5 min en un baño de agua-hielo, para estabilizar el color.
- ▶ Determinar la absorbancia de las muestras a 540 nm en un espectrofotómetro. La cantidad de azúcares reductores liberados se calcula a partir de una curva de calibración preparada por triplicado y en las mismas condiciones de reacción, con concentraciones conocidas de glucosa.

<sup>(84)</sup> **Reactivo DNS:** 1,4 % (p/v) DNS; 0,28 % (v/v) fenol; 0,07 % (p/v) sulfito de sodio; 28 % (p/v) tartrato sódico potásico (sal de Rochelle); 1,4 % (p/v) NaOH.

Además del método anterior, en algunos casos se llevó a cabo un **ensayo cualitativo** (Den Haan *et al.*, 2007). Se prepararon placas de agar al 1 % (p/v), suplementadas con 1 % (p/v) de CMC. Se practicaron orificios en la placa con un sacabocados, donde se depositaron 100  $\mu\text{L}$  de muestra de caldo de cultivo, repartiendo en dos veces la mitad del volumen y dejando reposar 15 min a 4 °C tras cada adición. Las placas se incubaron durante 24 h a 28 °C y, posteriormente, se tiñeron con 5 mL /placa de una solución 0,1 % (p/v) de rojo Congo durante 15 min, eliminando el exceso de colorante mediante dos lavados de 15 min con NaCl 1 % (p/v). La actividad endoglucanasa se relacionó con el halo de clarificación alrededor de los pocillos.

## 2.22. Determinación de actividad xilanolítica

Las xilanasas son un complejo de enzimas capaces de catalizar la hidrólisis de los polímeros del xilano de la pared celular vegetal. En el presente trabajo, para caracterizar la actividad xilanolítica de los extractos enzimáticos, se determinaron las actividades  $\beta$ -xilosidasa y endoxilanasas. Los sustratos y reactivos utilizados se recogen en el apartado 2.1.1.

### 2.22.1. Determinación de actividad $\beta$ -xilosidasa

La actividad  $\beta$ -xilosidasa se cuantificó de forma similar al método indicado para la  $\beta$ -glucosidasa en el apartado 2.21.1 pero empleando como sustrato una solución de pNPX 4 mM en tampón acetato 0,1 N pH 5,0, en lugar de pNPG (Terrasan *et al.*, 2016). La actividad  $\beta$ -xilosidasa se expresó en U/g proteína total en el extracto enzimático.

### 2.22.2. Determinación de actividad endoxilanasas

La actividad endoxilanasas se analizó mediante la determinación de azúcares reductores liberados enzimáticamente, a través de la adición de DNS y análisis espectrofotométrico a 540 nm (Mattéotti *et al.*, 2012). Los valores se presentaron como actividad específica, expresada en unidades por gramo de proteína total en el extracto enzimático (U= cantidad de enzima necesaria para liberar un  $\mu$ mol de producto –xilosa– por min, bajo las condiciones estándar de ensayo).

- ▶ Preparar microtubos de 1,5 mL. Añadir a cada uno 90  $\mu$ L de tampón acetato 0,1 N pH 5,0 y 400  $\mu$ L de una solución de xilano de madera de abedul<sup>(85)</sup> (Sigma-Aldrich) al 1,25 % (p/v), en tampón acetato 0,1 N pH 5,0.
- ▶ Añadir a cada microtubo de reacción 10  $\mu$ L de extracto enzimático e incubar en un bloque térmico a 50 °C, durante 3 min.
- ▶ Pasado el tiempo de incubación, añadir 500  $\mu$ L de reactivo DNS (ver apartado 2.21.3). Incubar durante 5 min a 99 °C, para revelar el color. Estabilizar el color incubando 5 min en un baño de agua-hielo.
- ▶ Determinar la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro de luz UV-visible, a 540 nm. La cantidad de azúcares reductores liberados se determina por estimación a partir de una curva de calibración de xilosa preparada por triplicado y en las mismas condiciones de reacción.

<sup>(85)</sup> **Solución de xilano:** añadir 1,4 % (p/v) de xilano de madera de abedul (Sigma-Aldrich) a tampón acetato 0,1 N pH 5,0. Hervir la mezcla durante 30 min y agitar durante 12-14 h a 25 °C. Centrifugar la solución para eliminar partículas en suspensión y ajustar las pérdidas de volumen por evaporación con agua Milli-Q.

## 2.23. Análisis de la capacidad de sacarificación

---

El potencial lignocelulolítico de los extractos proteicos se evaluó frente a sustratos naturales, determinando su capacidad de sacarificación (liberación de azúcares sencillos a partir de la estructura compleja de la pared celular).

- ▶ Preparar tubos Falcon de 50 mL, conteniendo una solución de pulpa de remolacha molida, o bien fibra de avena de molienda en polvo, al 2 % en tampón acetato 0,1 N pH 5,0. Ajustar el volumen final a 5 mL por tubo, teniendo en cuenta el volumen de extracto enzimático a añadir en el paso siguiente.
- ▶ Calcular la cantidad óptima de extracto enzimático a añadir por unidad de masa de sustrato natural, de acuerdo al apartado 2.20.2. Añadir dicha cantidad a los tubos Falcon con la solución de sustrato natural. Realizar las reacciones, como mínimo, por triplicado. Incluir controles negativos, sustituyendo el extracto enzimático añadido por el mismo volumen de tampón acetato 0,02 N pH 5,0.
- ▶ Incubar las reacciones durante 24 h, a 50 °C y 175 rpm, en un agitador orbital.
- ▶ Transferir el sobrenadante a tubos limpios, filtrando las muestras con ayuda de filtros de jeringa de PTFE 0,22 µm de diámetro de poro (Fisherbrand).
- ▶ Hervir las muestras para detener la reacción, durante 5 min.
- ▶ Analizar la presencia de azúcares en la muestra, mediante HPLC.

El **método cromatográfico** empleado se basó en un protocolo de elución isocrática para la determinación de azúcares sencillos (Gorinstein *et al.*, 1992; Ferreira *et al.*, 1998; Chávez-Servín *et al.*, 2004; de Sá *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2014). Se empleó equipo de HPLC Waters, con detector de índice de refracción Waters 2410 (apartado 2.4.4), termostaticando el inyector a 7 °C. Se utilizó la columna cromatográfica CARBOSEP COREGEL 87P 8µm (300 x 7,8 mm. Transgenomic), termostaticada a 90 °C. La fase móvil empleada fue agua Milli-Q, a una velocidad de flujo de 0,8 mL/min. Para el análisis se inyectaron 20 µL de muestra y cada carrera tuvo una duración de 20 min. Los tiempos de retención esperados se recogen en la Tabla 2.9.



**Tabla 2.9.** Tiempos de retención esperados de los azúcares simples analizados mediante HPLC.

Compuesto	Tiempo de retención
Sacarosa	7,44 min
Celobiosa	7,76 min
Maltosa	8,06 min
Lactosa	8,28 min
Glucosa	9,04 min
Xilosa	9,96 min
Galactosa	10,84 min
Arabinosa	12,14 min
Manosa	12,30 min
Fructosa	13,53 min

La cuantificación de los azúcares sencillos se llevó a cabo mediante la técnica del estándar externo a partir de rectas de calibración, empleando concentraciones conocidas de estándares comerciales para cada uno de los azúcares. Todas las rectas presentaron coeficiente  $R^2 \geq 0,999$ .

## 2.24. Análisis proteómico de los extractos enzimáticos

Uno de los objetivos del presente trabajo fue llevar a cabo un análisis de las proteínas de secreción (secretoma) de los hongos con mayor actividad FAE, capaces de degradar la pared vegetal. Para ello, se recogieron muestras de caldo de cultivo que se precipitaron y fueron posteriormente tratadas para limpiarlas de impurezas que pudieran interferir en los análisis proteómicos. Seguidamente, dichas muestras se cuantificaron y desarrollaron en geles mono y bidimensionales de poliacrilamida. Los geles se sometieron a tinción y los puntos de proteínas presentes fueron localizados y analizados, con vistas a identificar las proteínas existentes.

Todos los reactivos específicos para Proteómica empleados se recogen en el apartado 2.3 y el equipo se detalla en el apartado 2.4.3.

## 2.24.1. Preparación de las muestras

Los extractos enzimáticos obtenidos fueron sometidos a lavados y precipitación, con vistas a eliminar impurezas y contaminantes que puedan interferir con las técnicas de Proteómica (Fernández-Acero *et al.*, 2006; Jami *et al.*, 2010b).

- ▶ Preparar extractos enzimáticos según el método detallado en el apartado 2.19. Una vez obtenida la mezcla de proteínas extracelulares en tampón acetato 0,02 N pH 5,0, continuar con este protocolo.
- ▶ Precipitar las proteínas añadiendo un volumen de solución TCA (ácido tricloroacético)-DTT en acetona<sup>(86)</sup> por cada volumen de muestra de extracto enzimático, en un tubo de 10 mL o tubo Falcon de 50 mL. Mezclar por inversión e incubar durante, al menos, 30 min a -20 °C (preferiblemente, 12-14 h).
- ▶ Centrifugar durante 10 min, a 3.220 x *g* y 4 °C. Eliminar el sobrenadante, con cuidado.
- ▶ Realizar **dos lavados** con una solución de DTT al 0,07 % (p/v) en acetona, añadiendo el mismo volumen que el empleado para precipitar en el segundo paso. Homogeneizar con ayuda de un agitador de tipo vórtex. Recoger el precipitado mediante centrifugación, a 4 °C y 3.220 x *g*, durante 10 min.
- ▶ Desechar el sobrenadante y añadir 10 mL de acetona al 80% (v/v) para eliminar los restos de TCA. Homogeneizar la muestra (no se llegará a resuspender por completo, quedarán partículas en suspensión correspondientes a proteínas) y transferir a un tubo de 10 mL.
- ▶ Recuperar el precipitado mediante centrifugación, durante 10 min, a 4 °C y 3.220 x *g*. Desechar el sobrenadante y eliminar los restos de acetona mediante un pulso de centrifuga y la ayuda de una micropipeta, empleando una punta blanca conectada a una amarilla (la acetona interfiere con la solubilización y resuspensión de las proteínas). Dejar secar ligeramente (1-2 min). Resuspender el precipitado en 100-300 µL de tampón de rehidratación<sup>(87)</sup>, en función de la cantidad de precipitado.
- ▶ Agitar la muestra colocando los tubos en vertical alrededor de un bloque térmico, a máximas revoluciones (1.400 rpm), hasta la resuspensión del precipitado proteico (aprox., 1-2 h).
- ▶ Transferir las muestras a microtubos limpios de 1,5 mL. Centrifugar durante 5 min a 16.000 x *g* y transferir la muestra a un microtubo nuevo, sin tomar el precipitado, si lo hubiere. Cuantificar el contenido en proteínas de la muestra mediante el método de Bradford y almacenar a -20 o -80 °C.
- ▶ Aquellas muestras destinadas a ser analizadas mediante electroforesis bidimensional que, una vez procesadas, mantuvieron altas concentraciones de sales, detergentes, lípidos u otros contaminantes que pudieran interferir en la electroforesis, se limpiaron empleando el sistema comercial *2-D Clean-Up Kit* (GE Healthcare Life Sciences), de acuerdo a las instrucciones suministradas por el fabricante.

<sup>(86)</sup> **Solución TCA-DTT:** 20 % (p/v) ácido tricloroacético (TCA); 0,14 % (p/v) DTT; en acetona. <sup>(87)</sup> **Tampón de rehidratación:** urea 8 M; 2 % (p/v) CHAPS; 0,002 % (p/v) azul de bromofenol; suplementado antes de su empleo con DTT 60-100 mM y 0,5-1 % (v/v) IPG buffer 3-11 NL (GE Healthcare Life Sciences).

## 2.24.2. Cuantificación de proteínas

La cuantificación proteica se realizó por medio del método de Bradford (Bradford, 1976), empleando el reactivo *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad), mediante la representación de la absorbancia a 595 nm en una recta de calibración elaborada con concentraciones conocidas de BSA (MBI Fermentas) (Tabla 2.10).

**Tabla 2.10.** Concentraciones de BSA empleadas para preparar la recta de calibración. Se detallan los volúmenes necesarios de solución maestra de BSA y agua, para cada uno de los diez puntos de calibración.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>µg de proteínas</b>	<b>0</b>	<b>0,50</b>	<b>1,25</b>	<b>2,50</b>	<b>3,75</b>	<b>5,00</b>	<b>6,25</b>	<b>7,50</b>	<b>8,75</b>	<b>10,00</b>
µL solución BSA 0,25 mg/mL	0	2	5	10	15	20	25	30	35	40
µL agua	800	798	795	790	785	780	775	770	765	760

El método utilizado fue el siguiente:

- ▶ Preparar una solución maestra de BSA a una concentración de 0,25 mg/mL. Distribuir, por duplicado, los volúmenes indicados en la Tabla 2.10 en microtubos de 1,5 mL.
- ▶ Distribuir la muestra a cuantificar en microtubos de 1,5 mL, por duplicado. Añadir 1, 2, 5 o 10 µL de muestra y completar hasta un volumen de 800 µL con agua destilada. Si la muestra está muy concentrada, preparar una dilución 1:2000 en volumen final de 800 µL.
- ▶ Añadir 200 µL de reactivo de Bradford concentrado a los microtubos de la curva de equilibrio y a los de las muestras problema. Cerrar los tubos cuidadosamente y mezclar con ayuda de un agitador de tipo vórtex. Dar un pulso de centrifuga y dejar reposar los viales en oscuridad, durante 5 min.
- ▶ Mezclar los viales con ayuda de un agitador de tipo vórtex y medir la absorbancia a 595 nm.
- ▶ La concentración de proteínas en las muestras se calcula mediante estimación a partir de la recta de calibración, expresándolo en µg de proteínas totales por µL. En el caso de haber cuantificado una dilución 1:2000, para expresar la concentración por µL, multiplicar el valor obtenido por el factor 2,5.

Para verificar la cuantificación y observar la limpieza e integridad de las muestras, se desarrolló una cantidad conocida de cada muestra (20 µg de proteína total) en geles monodimensionales SDS-PAGE, de acuerdo al método indicado a continuación.

### 2.24.3. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes y reductoras (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

Los geles de poliacrilamida empleados incluyen dos zonas diferenciadas, por una parte, una fase superior **concentradora** (Tabla 2.11) y, por otra, una inferior **separadora** (Tabla 2.12).

**Tabla 2.11.** Composición para 10 mL de fase concentradora de geles SDS-PAGE (4 %).

<b>Acrilamida/bis-acrilamida 37,5:1</b> <sup>(88)</sup>	1,3 mL
<b>Tris-HCl 0,5 M pH 6,8</b>	2,5 mL
<b>20 % (p/v) SDS</b>	50 µL
<b>10 % (p/v) persulfato de amonio</b>	50 µL
<b>TEMED</b>	10 µL
<b>Agua Milli-Q</b>	6,09 mL

**Tabla 2.12.** Composición para 10 mL de fase separadora de geles SDS-PAGE. Se detallan las cantidades para diferentes porcentajes de acrilamida/bis-acrilamida, según del peso molecular de las proteínas de interés: 7 % entre 50 y 250 kDa; 10 % entre 37 y 150 kDa; 12 % entre 20 y 100 kDa; 15 % entre 10 y 60 kDa.

	<b>Concentración final de poliacrilamida</b>			
	<b>7,5 %</b>	<b>10 %</b>	<b>12 %</b>	<b>15 %</b>
<b>Acrilamida/bis-acrilamida 37,5:1</b>	2,5 mL	3,33 mL	4,0 mL	5,0 mL
<b>Tris-HCl 1,5 M pH 8,8</b>	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
<b>20 % (p/v) SDS</b>	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
<b>10 % (p/v) persulfato de amonio</b>	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
<b>TEMED</b>	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
<b>Agua Milli-Q</b>	4,9 mL	4,02 mL	3,4 mL	2,4 mL

<sup>(88)</sup> **Acrilamida/bis-acrilamida:** solución comercial ProtoGel® (National Diagnostics), que contiene 30 % (p/v) acrilamida: 0,8 % (p/v) bis-acrilamida (37,5:1). Almacenar a 4 °C y manejar con precaución, eliminando con seguridad el material que entre en contacto con la poliacrilamida.

El protocolo de electroforesis monodimensional en geles desnaturizantes de poliacrilamida se detalla a continuación.

- ▶ Montar la cubeta para la polimerización de los geles en una superficie plana y nivelada, empleando el sistema *Mini-Protean II* (Bio-Rad) para geles de 7 x 8 cm, según las indicaciones del fabricante. Limpiar todos los cristales, separadores y resto del sistema con agua destilada y etanol absoluto. Una vez montado el sistema, colocar el peine y hacer una marca con rotulador a aprox. 0,5 cm por debajo de la base de los pocillos. Por defecto, se utilizaron geles con un grosor de 0,75 mm, excepto casos particulares en los que se emplearon grosores de 1,5 mm, para poder cargar mayor volumen de muestra.
- ▶ Preparar la mezcla para el gel separador, según la Tabla 2.12 (10 mL son suficientes para dos fases separadoras de 0,75 mm de grosor). Añadir por último el TEMED y el persulfato de amonio, que catalizan la reacción de polimerización.
- ▶ Mezclar despacio y depositar entre los dos cristales. Añadir inmediatamente sobre la mezcla, entre los cristales, isopropanol (2-propanol) y dejar polimerizar el tiempo necesario (30-45 min).
- ▶ Preparar la fase concentradora, de acuerdo a la Tabla 2.11 (5 mL son suficientes para dos geles de 0,75 mm de grosor). Colocar el peine para formar los pocillos entre los dos cristales y añadir la mezcla de fase concentradora, dejándolo polimerizar durante 15 min, aprox.
- ▶ Diluir las muestras con, al menos, 2 volúmenes de tampón de muestra desnaturizante<sup>(89)</sup>. Incubar la mezcla durante 5 min a 96-99 °C, para desnaturizar las proteínas. Transferir a hielo inmediatamente.
- ▶ Retirar el peine, colocar los geles dentro de la cámara de electroforesis y llenarla con tampón de electroforesis 1X<sup>(90)</sup>. Cargar las muestras en los pocillos. Incluir como referencia de tamaño el marcador de peso molecular para proteínas *Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards* (Bio-Rad).
- ▶ Llevar a cabo la electroforesis a una tensión de 100-150 V hasta que el frente correspondiente al colorante del tampón de muestra desnaturizante comience a salir del gel (110 V, hasta que toda la muestra se encuentre en la parte separadora; 140 V desde este momento y hasta que el frente comience a salir).
- ▶ Transferir el gel a una placa con solución de fijación<sup>(91)</sup>. Fijar durante 30 min, en agitación (50 oscilaciones/min, en un agitador de vaivén).
- ▶ Sustituir la solución de fijación por agua Milli-Q. Realizar tres lavados de 10 min cada uno.
- ▶ Teñir el gel con solución de tinción<sup>(92)</sup>, durante toda la noche (12-14 h).
- ▶ Eliminar la solución de tinción y hacer lavados de 15-30 min con agua Milli-Q, hasta que se aclare el color de fondo.

<sup>(89)</sup> **Tampón de muestra desnaturizante:** Tris-HCl 350 mM, pH 6,8; 10 % (v/v) SDS; 30 % (v/v) glicerol; 0,02 % (p/v) azul de bromofenol y DTT 0,6 M. <sup>(90)</sup> **Tampón de electroforesis de Laemmli 10X:** Tris base 250 mM; glicina 2 M y 1 % (p/v) SDS. El pH debe ser de 8,3 (± 0,2). <sup>(91)</sup> **Solución de fijación:** 7 % (v/v) ácido acético glacial; 7 % (v/v) metanol; en agua Milli-Q. <sup>(92)</sup> **Solución de tinción Coomassie coloidal (método Blue Silver):** 10 % (v/v) ácido fosfórico; 10 % sulfato de amonio; 0,12 % Coomassie Brilliant Blue G-250; 20 % metanol.

## 2.24.4. Electroforesis bidimensional (O'Farrell, 1975; Klose, 1975)

La electroforesis bidimensional (2-D) permite analizar mezclas proteicas complejas, mediante su separación en función de su pI y, a continuación, en función de su masa molecular.

### 2.24.4.1. Primera dimensión o isoelectroenfoque (IEF)

El IEF se desarrolló bajo condiciones desnaturalizantes, de acuerdo al Manual *2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients. Principles and Methods* (Amersham Biosciences). Para desarrollar la primera dimensión, se empleó el sistema de separación de proteínas *Ettan IPGphor II* (GE Healthcare Life Sciences) y tiras *Immobiline™ DryStrip* de 18 cm, con gradiente de pH inmovilizado de 3,0 a 10,0 NL (GE Healthcare Life Sciences).

- ▶ Preparar los sarcófagos (*strip holders*) de longitud apropiada para el tamaño de las tiras.
- ▶ Preparar un microtubo de 1,5 mL con 350-400 µg de la muestra proteica de interés, 0,5-1 % (v/v) de IPG-buffer 3-11 NL<sup>(93)</sup> y DTT 20-60 mM. Completar con tampón de rehidratación<sup>(94)</sup> hasta un volumen de 350 µL. Mezclar y dar un pulso de centrifuga.
- ▶ Depositar y distribuir homogéneamente los 350 µL de muestra en un sarcófago limpio y seco, evitando la formación de burbujas.
- ▶ Tomar la tira *Immobiline™ DryStrip* de 18 cm, con gradiente de pH inmovilizado de 3,0 a 10,0 NL, retirar el plástico protector y colocarla sobre el sarcófago, poniendo en contacto el gel con la muestra.
- ▶ Cubrir la tira con 2-2,5 mL de aceite de cobertura para tiras *Immobiline™ DryStrip*.
- ▶ Comenzar el **programa de IEF**, a 20 °C y un máximo de 75 µA/tira (en tiras de 7 cm, la máxima corriente es 50 µA/tira). El programa empleado fue: 1h a 0 V y 12 h a 30 V (rehidratación); 2 h a 60 V; 1 h a 500 V; 1 h a 1000 V; un gradiente de 30 min hasta 8000 V y, aprox., 7 h a 8000 V, hasta alcanzar a los 50 kVh (kV/h totales acumulados).
- ▶ Tras el IEF, tomar las tiras y retirar el exceso de aceite contra un papel de filtro. Colocar cada tira dentro de un tubo de vidrio de tamaño apropiado. Si se va a proseguir directamente con la segunda dimensión, continuar con la fase de equilibrado, según se describe en el apartado siguiente. En caso contrario, los tubos de vidrio conteniendo las tiras pueden taparse con Parafilm® y almacenarse a -80 °C hasta su uso.

<sup>(93)</sup> **IPG-buffer** (GE Healthcare Life Sciences): mezcla comercial de anfolitos en el rango de pH indicado, que potencian la migración de las proteínas y producen una conductividad uniforme a través del gradiente de pH de la tira. Además, contribuyen a aclarar el fondo en la tinción de los geles y mejoran la sensibilidad en la detección de proteínas.

<sup>(94)</sup> **Tampón de hidratación**: urea 8 M; 2 % (p/v) CHAPS; 0,01 % (p/v) azul de bromofenol. Filtrar a través de filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Millipore). Almacenar en alícuotas de poco volumen, congelado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.24.4.2. Segunda dimensión (SDS-PAGE)

Los componentes y cantidades necesarias para la preparación del gel de poliacrilamida al 12,5 % para SDS-PAGE se recogen en la Tabla 2.13.

**Tabla 2.13.** Composición de geles desnaturalizantes de proteínas: segunda dimensión. Se indican las cantidades para 6 geles (400 mL), empleando el sistema Ettan DALTSix (GE Healthcare Life Sciences).

	Geles 12,5% poliacrilamida
<b>Acrilamida/bis-acrilamida 37,5:1</b>	166,8 mL
<b>Tris-HCl 1,5 M pH 8,8</b>	100 mL
<b>20 % (p/v) SDS</b> (filtrado, 0,45 $\mu\text{m}$ )	4 mL
<b>10 % (p/v) persulfato de amonio</b>	2 mL
<b>TEMED</b>	132 $\mu\text{L}$
<b>Agua Milli-Q</b>	129,2 mL

El protocolo que se siguió para desarrollar la segunda dimensión fue el siguiente:

- ▶ Preparar la mezcla para seis geles, de acuerdo a la Tabla 2.13, añadiendo todos los componentes en un matraz kitasato, excepto el persulfato de amonio.
- ▶ Desgasificar la mezcla conectando el kitasato a una bomba de vacío, durante unos 10 min, para eliminar burbujas que puedan interferir en la migración electroforética.
- ▶ Montar el molde vertical para la preparación y polimerización de geles del sistema Ettan DALTSix. Este sistema permite la preparación de 6 geles de 1 mm de grosor cada uno.
- ▶ Añadir el persulfato de amonio a la mezcla y agitar unos segundos, con cuidado de no formar burbujas. Dispensar la mezcla entre los cristales hasta una altura de 5-10 mm del borde de los cristales. Cubrir inmediatamente con 2-propanol y dejar que polimerice durante toda la noche.
- ▶ Eliminar el 2-propanol. Lavar con agua Milli-Q el frente del gel y rellenar con tampón de electroforesis 1X<sup>(95)</sup>. Es posible almacenar el gel durante un máximo de 48 h, en una cámara fría a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

- ▶ Tomar las tiras que fueron sometidas a IEF (si fueron almacenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , dejar descongelar a temperatura ambiente unos min, antes de proceder a su equilibrado).
- ▶ Hacer un primer paso de equilibrado, añadiendo al tubo con la tira 4,87 mL de tampón de equilibrado<sup>(96)</sup>, suplementado inmediatamente antes de su uso con 130  $\mu\text{L}$  de DTT 2,5 M (volumen final de 5 mL/tubo con tira de 18 cm). Colocar el tubo horizontalmente, asegurándose de que la tira se mueve con libertad y que el lado que tiene el soporte plástico está en contacto con la pared del tubo (y no el lado con la acrilamida). Equilibrar durante 15 min a temperatura ambiente, sobre un agitador de vaivén.
- ▶ Retirar la solución. Añadir 5 mL de tampón de equilibrado, suplementado justo antes de su uso con 200 mg de iodoacetamida. Incubar durante 15 min en las condiciones del paso anterior (Görg *et al.*, 1987).
- ▶ Lavar las tiras, sumergiéndolas en un tubo conteniendo agua Milli-Q. Depositar las tiras sobre un papel Whatman 3MM, apoyando la superficie plástica (poliacrilamida hacia arriba).
- ▶ Eliminar 5 mm de gel de cada extremo de la tira, con unas pinzas limpias. Ayudándose de un par de pinzas, introducir las tiras entre los cristales, atendiendo a la colocación de los polos (positivo a la izq.).
- ▶ Añadir a la cámara de electroforesis 1 L de tampón de electroforesis 5X y 4 L de agua Milli-Q, para una concentración final 1X. Mezclar con ayuda del sistema de la cámara de electroforesis (encender la bomba y el sistema *MultiTemp III* de control de temperatura, fijándolo a  $20\text{-}25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Una vez mezclado, apartar en un vaso de precipitados aprox. 700 mL de tampón de electroforesis 1X, para que al introducir el soporte de los geles el líquido no se desborde por desplazamiento de volumen.
- ▶ Introducir los geles en la cámara de electroforesis del sistema Ettan DALTSix y taparlos con la tapa que incluye el sistema. Añadir en la cámara inferior los 700 mL de tampón de electroforesis 1X que se habían reservado. Añadir 1,4 L de tampón de electroforesis 2X en la cámara superior del sistema.
- ▶ Si se desea incluir marcador de peso molecular, dispensar 5  $\mu\text{L}$  de *Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards* en un trozo de papel Whatman 3MM de 10-15 mm x 2 mm, justo antes del inicio de la electroforesis. Introducir el papel junto al extremo izquierdo de la tira, entre los dos cristales de un gel.
- ▶ Realizar la electroforesis a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , en dos etapas: i) 3-5 W/gel, durante 30 min; ii) 15-20 W/gel (180 W máximo) durante 3,5-4 h (hasta que el frente del colorante esté a 1 mm del final del gel).
- ▶ Finalizada la electroforesis, desmontar el sistema y proceder a la detección de proteínas.

<sup>(95)</sup> **Tampón de electroforesis:** Tris-HCl 250 mM, pH 8,3; glicina 1,92 M; 1 % (p/v) SDS. Para una electroforesis en el sistema Ettan DALTSix, preparar 1 L de tampón de electroforesis 5X para la cámara inferior (15,2 g Tris base; 72 g glicina; 5 g SDS) y 1,4 L de tampón de electroforesis 2X para la cámara superior (8,5 g Tris base; 40,3 g glicina; 2,8 g SDS), cada uno en una probeta limpia, incluyendo una barra de agitación magnética en la del tampón de la cámara superior. <sup>(96)</sup> **Tampón de equilibrado:** urea 6 M; 30 % (v/v) glicerol; 2 % (p/v) SDS; Tris-HCl 50 mM, pH 8,8; 0,002 % (p/v) azul de bromofenol. Filtrar a través de filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Millipore). Conservar a temperatura ambiente.



## 2.24.5. Detección de proteínas

Se emplearon dos métodos colorimétricos de tinción: **i)** tinción con azul Coomassie coloidal, mediante el método *Blue Silver* (Candiano *et al.*, 2004), que es un método de tinción simple, cuantitativo y adecuado como etapa previa a la identificación proteica por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF y **ii)** en aquellos casos particulares en los que se buscó una mayor sensibilidad (hasta 20-50 veces más), se empleó la tinción con nitrato de plata. Pese a que la técnica de Coomassie coloidal tiene menor sensibilidad de detección que la tinción con plata, posee la ventaja de ser más lineal y más cuantitativa.

Los procesos de tinción empleados constan de: i) fijación, para inmovilizar las proteínas en el gel y eliminar el SDS, soluciones tampón y otros contaminantes; ii) tinción del gel con colorantes orgánicos o formulaciones para la deposición de metales (plata); iii) etapa final, con el fin de la reacción de tinción o la realización de lavados para reducir el fondo (Steinberg, 2009).

### 2.24.5.1. Tinción por el método de Coomassie coloidal

Existen dos formas de azul brillante de Coomassie, R-250 (*reddish hue*, tonalidad rojiza) y G-250 (*greenish hue*, tonalidad verdosa) (Chevalier, 2010). Es esta última la empleada en el método empleado en el presente trabajo, que se basa en el método desarrollado por Neuhoff y colaboradores, con las modificaciones incluidas por Candiano y colaboradores (Candiano *et al.*, 2004), encaminadas a mejorar la reproducibilidad y la sensibilidad. El método descrito por Candiano y colaboradores, también denominado *Blue Silver*, supone un aumento del 20 % (p/v) en cuanto a la concentración de colorante y un incremento en el porcentaje de ácido fosfórico.

- ▶ Preparar una bandeja de plástico limpia por cada gel. Preparar 2 L de solución de fijación<sup>(91)</sup> (ver composición en el apartado 2.24.3), en una probeta.
- ▶ Tras la segunda dimensión (apartado 2.24.4.2), desmontar el sistema de electroforesis, extraer los geles de los cristales y eliminar los restos de agarosa (parte del gel fuera de los límites de la tira/marcador de peso molecular). Marcar la esquina superior izquierda con una muesca, a modo de referencia.
- ▶ Transferir los geles a las bandejas de plástico. Añadir a cada una aprox. 300 mL de solución de fijación.
- ▶ Fijar los geles, colocando las bandejas sobre un agitador de vaivén y agitación constante, durante 30 min.
- ▶ Retirar la solución de fijación y hacer tres lavados con agua Milli-Q, de 10 min cada uno.

- ▶ Eliminar la solución de lavado y añadir a cada bandeja 300 mL de solución de tinción Coomassie coloidal<sup>(92)</sup> (ver composición en el apartado 2.24.3). Incubar durante toda la noche, en agitación.
- ▶ Retirar la solución de tinción Coomassie coloidal. Transferir el gel con cuidado sobre la tapa de la bandeja de plástico, de modo que sea posible eliminar los depósitos de colorante en la bandeja con etanol absoluto, para facilitar el proceso de desteñido.
- ▶ Hacer varios lavados de los geles con agua Milli-Q, de 30 min cada uno, para eliminar el exceso de colorante y aclarar el fondo.

### 2.24.5.2. Tinción con nitrato de plata

La tinción de plata (Oakley *et al.*, 1980) se empleó en aquellos casos puntuales en los que la concentración de proteínas fue baja, siendo necesaria la máxima sensibilidad de detección posible. El protocolo se detalla en la Tabla 2.14.

**Tabla 2.14.** Protocolo del método de tinción con nitrato de plata optimizado.

ETAPA	Notas	Solución	Tiempo
<b>Fijación</b>	Puede ser sustituida por la fijación del protocolo de tinción con Coomassie coloidal	Metanol: 25 mL Ácido acético glacial: 20 mL Agua Milli-Q hasta 250 mL	30 min
<b>Sensibilización</b>	Preparar en una probeta, cubrir con Parafilm® y enfriar a 4 °C antes de su uso	Etanol: 75 mL 5 % (p/v) tiosulfato sódico: 10 mL Acetato sódico: 17 g Agua Milli-Q hasta 250 mL	30 min
<b>Lavado</b>		Agua Milli-Q	3 x 5 min
<b>Reacción con plata</b>	Preparar en una probeta, cubrir con Parafilm® y enfriar a 4 °C antes de su uso	2,5 % (p/v) nitrato de plata: 25 mL Agua Milli-Q hasta 250 mL	20 min
<b>Lavado</b>	Importante ceñirse a los tiempos de lavado y cambiar el gel de bandeja	Agua Milli-Q	2 x 30 s
<b>Revelado</b>	Agitar vigorosamente para disolver el carbonato sódico. Añadir el formaldehído justo antes de usar	Carbonato sódico: 6,25 g 37 % (p/v) formaldehído: 200 µL Agua Milli-Q hasta 250 mL	2-5 min
<b>Parada</b>		EDTA-Na <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O: 3,65 g Agua Milli-Q hasta 250 mL	10 min
<b>Lavado</b>		Agua Milli-Q	3 x 5 min

## 2.24.6. Digitalización y análisis de geles

Una vez detectados los puntos proteicos dentro del gel bidimensional de poliacrilamida, se procedió a su digitalización y análisis.

Los geles teñidos fueron escaneados mediante el equipo *ImageScanner III* (GE Healthcare Life Sciences), calibrado previamente con un marcador de escala de grises (Kodak). Las imágenes se digitalizaron en formato TIFF a una resolución de 150 dpi, con el *software Labscan 5.00 v. 1.0.8* (GE Healthcare Life Sciences). Tras la digitalización, los geles fueron analizados con el *software ImageMaster™ 2D Platinum v. 5.0* (GE Healthcare Life Sciences). Para ello, se optimizó la detección automática de puntos proteicos y se eliminaron manualmente los posibles artefactos. Se compararon las tres réplicas biológicas y se llevó a cabo la normalización de los puntos proteicos o *spots*, empleando volúmenes relativos (definidos como el volumen de cada punto dividido entre el volumen total, correspondiente a la suma de todos los puntos presentes en el gel). Se empleó la herramienta *landmarks* incluida en el *software*, para establecer puntos de referencia que faciliten la comparación automática entre las réplicas. Aquellos puntos proteicos comunes a las tres réplicas se seleccionaron para su posterior identificación.

## 2.24.7. Digestión trípica de proteínas

Tras la detección de los *spots* de interés, se llevó a cabo su extracción y digestión trípica para su análisis e identificación mediante MS (Huynh *et al.*, 2009).

Los *spots* de interés se extrajeron del gel, se transfirieron a microtubos de 1,5 mL con agua Milli-Q hasta cubrir el punto (50  $\mu$ L, aprox.) y se almacenaron a 4 °C hasta su procesado (Havliš *et al.*, 2003).

- ▶ Preparar una solución de bicarbonato de amonio 25 mM<sup>(97)</sup>.
- ▶ Eliminar con una micropipeta el agua Milli-Q que cubre los *spots*. Deshidratar los puntos, añadiendo 50  $\mu$ L de acetonitrilo. Agitar en un bloque térmico a 25 °C, durante 5 min, a 1.400 rpm.
- ▶ Dar un pulso de centrifuga y retirar el acetonitrilo. Añadir 50  $\mu$ L de agua Milli-Q e incubar durante 5 min, a 25 °C y 1.400 rpm.
- ▶ Dar un pulso de centrifuga y retirar el agua Milli-Q. Repetir el tratamiento con acetonitrilo-agua dos veces, hasta que se elimine la mayor parte del Coomassie y el gel quede más o menos blanco.

- ▶ Dar un pulso de centrifuga, retirar el acetonitrilo y secar los puntos mediante vacío en una centrifuga evaporadora de solventes (ver apartado 2.4.6.2).
- ▶ Preparar una solución DTT 10 mM en bicarbonato de amonio<sup>(98)</sup>. Una vez bien secos los *spots*, cubrirlos con dicha solución. Incubar durante 30 min, a 56 °C y una agitación de 300 rpm.
- ▶ Recuperar en el fondo del tubo el volumen que se ha evaporado mediante un pulso de centrifuga. Eliminar la solución de DTT y cubrir los *spots* con acetonitrilo, que se retira inmediatamente para incubar con iodoacetamida 55 mM en bicarbonato de amonio 25 mM<sup>(99)</sup>, durante 15 min, en oscuridad.
- ▶ Retirar la solución de iodoacetamida. Cubrir los *spots* con acetonitrilo e incubar durante 2-5 min a temperatura ambiente.
- ▶ Retirar el acetonitrilo. Añadir 50 µL de bicarbonato de amonio 25 mM e incubar durante 5 min. Tras la incubación, **sin retirar la solución**, añadir igual volumen (50 µL) de acetonitrilo e incubar 5-15 min.
- ▶ Retirar el sobrenadante y secar a vacío en una centrifuga evaporadora de solventes, hasta la total deshidratación de los *spots* (15-30 min). Proceder a la digestión triptica.
- ▶ Añadir tripsina en una concentración de 12,5 ng/µL en bicarbonato de amonio 25 mM, en un volumen suficiente para cubrir los puntos (aprox. 7-10 µL/tubo). Dar un pulso de centrifuga y transferir inmediatamente a hielo. Incubar en hielo 45 min para que la solución de tripsina penetre en el gel.
- ▶ Dar un pulso de centrifuga y eliminar el exceso de solución que no se haya introducido en el gel.
- ▶ Cubrir los *spots* con 50 µL de bicarbonato de amonio 25 mM e incubar durante, al menos, 6 h (preferiblemente, 12-14 h), en un bloque térmico a 37 °C. A partir de este momento, emplear una punta por microtubo.
- ▶ Dar un pulso de centrifuga. Transferir el sobrenadante a un microtubo limpio rotulado.
- ▶ Para una mayor recuperación, cubrir los *spots* con 10 µL de 50 % (v/v) acetonitrilo, 0,5 % TFA. Sonicar durante 5 min. Recuperar todo el volumen en el fondo del tubo, mediante un pulso de centrifuga, y transferir al microtubo donde se reservó el sobrenadante de la digestión del mismo punto proteico.
- ▶ Realizar una última extracción, añadiendo sobre los puntos 10 µL de acetonitrilo. Sonicar 5 min y transferir la solución de forma similar al paso anterior.
- ▶ Tomar los microtubos que contienen el sobrenadante de la digestión más las dos extracciones y secar a vacío en centrifuga evaporadora de solventes, a 30 °C (aprox. 2-4 h).
- ▶ Una vez completamente secos, resuspender el precipitado peptídico en 4 µL de una solución 50 % (v/v) acetonitrilo, 0,1 % TFA. Sonicar durante 5 min y recuperar todo el volumen en el fondo del tubo mediante un pulso de centrifuga. Los microtubos pueden almacenarse a 4 °C, bien con los precipitados peptídicos secos o una vez resuspendidos en los 4 µL de solución.
- ▶ Transferir 1 µL de cada muestra a una placa metálica para MALDI-TOF/TOF, estableciendo previamente el orden de las muestras a cargar. Una vez secas las gotas de muestra, añadir sobre cada una

0,5  $\mu\text{L}$  de la solución matriz<sup>(100)</sup>. Dejar secar. Dispensar en la placa la mezcla de calibrantes (una mezcla de 13 péptidos conocidos, empleados como referencia para el análisis).

► Introducir la placa en el equipo MALDI-TOF/TOF y someterlo a análisis.

<sup>(97)</sup> **Bicarbonato de amonio 25 mM:** disolver 160 mg de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  en 80 mL de agua Milli-Q, recién tomada. <sup>(98)</sup> **Solución DTT 10 mM:** añadir 10  $\mu\text{L}$  de DTT 1 M a 990  $\mu\text{L}$  de bicarbonato de amonio 25 mM. <sup>(99)</sup> **Solución iodoacetamida 55 mM:** disolver 10 mg de iodoacetamida en 1 mL de bicarbonato de amonio 25 mM. Proteger de la luz. <sup>(100)</sup> **Solución matriz:** saturar una solución 50 % (v/v) acetonitrilo, 50 % agua Milli-Q y 0,1 % (v/v) TFA, con ácido  $\alpha$ -ciano 4-hidroxicinámico. Proteger de la luz. Puede almacenarse a 4 °C en oscuridad, durante varios días.

Si se pretende extraer y digerir *spots* procedentes de **geles teñidos con tinción de plata**, llevar a cabo un paso previo a los lavados con acetonitrilo-agua, cubriendo los *spots* con una solución de desteñido [ferrocianuro potásico 30 mM (9,9 mg/mL) disuelto en una mezcla de un volumen de agua Milli-Q y un volumen de 5 % (p/v) tiosulfato sódico] e incubando durante 10 min, a 25 °C. Tras la incubación, los puntos deben haber perdido el color parduzco oscuro característico de la tinción de plata. Eliminar la solución de desteñido. Hacer un lavado con agua Milli-Q y continuar con el protocolo de digestión triptica anteriormente detallado.

## 2.24.8. Identificación de proteínas por MS acoplada a un detector MALDI-TOF/TOF

La MS permite obtener información acerca de una muestra de péptidos, que puede emplearse para la identificación de proteínas. Para ello son necesarias tres etapas, la preparación de la muestra, la ionización de la muestra y el análisis de masas (Graves y Haystead, 2002).

Para que sea posible el análisis de muestras biológicas mediante MS, es necesario que las moléculas estén secas y cargadas. Se utilizó el método de MALDI-TOF/TOF. La muestra se incorporó a una matriz de moléculas de baja energía, como AHC. Al producirse la evaporación, matriz y muestra cocrystalizan. Una vez en el equipo MALDI, la matriz absorbe la energía procedente de un láser ultravioleta y la transfiere de forma controlada a los péptidos de la muestra, facilitando su ionización en fase gaseosa.

Para la determinación de la masa de los péptidos, se empleó un analizador de tipo TOF (Wiley y McLaren, 1955), basado en el principio de que, al acelerar los iones en un campo eléctrico, adquieren diferentes velocidades, en función de su relación  $m/z$  (masa/carga)

(Fig. 2.3). Esta distinta velocidad determina el tiempo que tardan en recorrer la distancia hasta un detector, lo que se denomina “tiempo de vuelo” (*time of flight*, TOF) y permite calcular la masa de un determinado péptido. En el presente trabajo, se empleó el sistema de analizador de tiempo de vuelo en tándem (TOF/TOF). En el sistema TOF/TOF, un ion molecular de interés (precursor) es fragmentado tras abandonar la fuente. Las masas e intensidades de los fragmentos resultantes son analizadas en una segunda etapa (Vestal y Campbell, 2005). De este modo, se obtiene información sobre las masas encontradas en la muestra, correspondientes a los precursores (*peptide mass fingerprint* o huella peptídica) y sobre los espectros de fragmentación derivados de la fragmentación de dichos precursores (*peptide fragment fingerprint*). La identificación de las proteínas se lleva a cabo comparando estos datos con los depositados en bases de datos de secuencias proteicas conocidas.

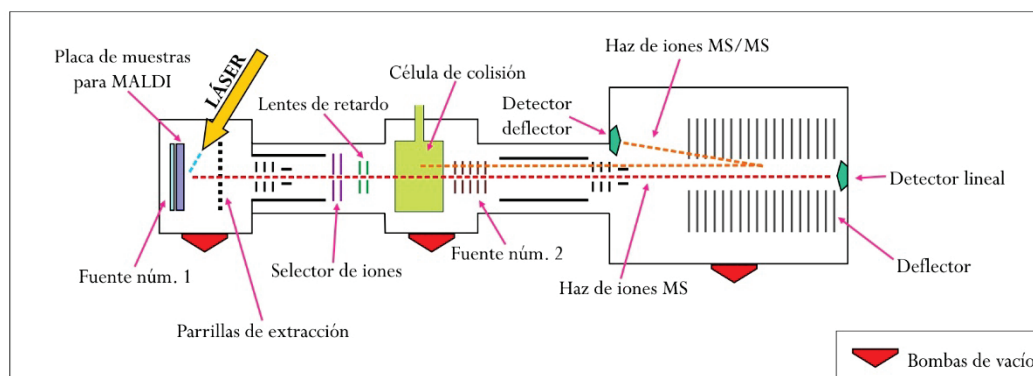


Fig. 2.3. Esquema del funcionamiento de un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF.

En el presente trabajo, tras la detección, análisis, selección y digestión de los puntos proteicos de interés, las muestras se procesaron de acuerdo al protocolo descrito por Jami y colaboradores (Jami *et al.*, 2010a). Para la identificación proteica se empleó el espectrómetro de masas 4800 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF (AB Sciex) y como calibración externa, la mezcla para calibración 4700 (*Cal Mix 5*; AB Sciex). Todos los espectros de MS fueron también calibrados internamente, empleando péptidos derivados de la autodigestión de la tripsina.

Los péptidos observados en cada punto proteico (hasta 65 por punto) fueron recogidos y representados como una lista de masas moleculares monoisotópicas, con una relación señal/ruido (S/N) mayor de 20, empleando el programa 4000 Series Explorer v. 3.5.3 (AB Sciex). Todos los contaminantes conocidos, como péptidos derivados de la digestión de queratinas y tripsina, fueron excluidos en los siguientes análisis MS/MS. A partir de cada espectro, se seleccionaron los

6 precursores más intensos con una relación S/N mayor de 20, para su análisis MS/MS mediante disociación inducida por colisión (CID) empleando gas atmosférico, con el modo reflector de iones de 2 kV y una ventana de masas de precursores de  $\pm 7$  Da.

Para la identificación proteica, se utilizaron archivos genéricos Mascot, creados de forma automática combinando datos de huella peptídica y espectros MS/MS. Estos archivos fueron comparados con una base de datos de proteínas, mediante una licencia local de Mascot v 2.2 (Matrix Science), a través del servidor *Global Protein* v. 3.6 (Applied Biosystems). Los parámetros empleados para las búsquedas fueron: i) se seleccionó la base de datos de secuencias (para *Alternaria* spp., Uniprot taxonomía Ascomycota, a fecha de 03.07.2017 conteniendo 6.766.808 secuencias y 3.023.177.811 residuos. Para *Komagataella* spp., NCBIprot a fecha de 05.12.2017, conteniendo 139.213.787 secuencias y 51.013.024.959 residuos); ii) se incluyeron modificaciones fijas y variables (S-carbamidometilación de las cisteínas y oxidación de la metionina); iii) se permitió la ausencia de un sitio de escisión; iv) se fijó la tolerancia de los precursores en 100 ppm y la tolerancia de fragmentos MS/MS en 0,3 Da; v) se indicó carga de los péptidos 1+ y vi) se fijó la tripsina como enzima empleada para la digestión.

Las identificaciones proteicas obtenidas a partir de la combinación de huella peptídica y MS en tándem sólo se consideraron válidas cuando cumplieron dos criterios: i) una puntuación global de Mascot superior a 83 (con un nivel de significación  $p < 0.05$ ) y ii) un porcentaje de cobertura de la secuencia de la proteína de, al menos, el 15 %. Cuando el segundo criterio no se cumplió, la identificación se aceptó únicamente si se identificaron dos o más péptidos de fragmentación.

En aquellos casos en los que las proteínas no pudieron ser identificadas mediante búsqueda en bases de datos Mascot, se empleó la secuenciación *de novo* y análisis BLAST de identidad, de acuerdo al protocolo descrito por Cobos y colaboradores (Cobos *et al.*, 2010). Los iones de fragmentación de mayor calidad fueron seleccionados manualmente y las 6 mejores secuencias derivadas del análisis MS/MS se combinaron en forma de una cadena de búsqueda formato texto, mediante la aplicación *DeNovo Explorer* v. 3.6, incluida en el programa *GPS Explorer* (Applied Biosystems). Esta cadena de búsqueda se empleó para identificar secuencias homólogas, por medio del algoritmo *BLASTP* v 1.4.0, en una base de datos local conteniendo la información de Uniprot Ascomycota, con los siguientes parámetros: i) modificaciones fijas: S-carbamidometilación de las cisteínas; ii) tolerancia de masas de 0,3 Da; iii) límite de valor E de

20; iv) matriz de puntuación PAM30MS; v) enzima empleada, tripsina. La consideración de las identificaciones se basó en el algoritmo de puntuación de BLASTP, aceptándose únicamente aquellas identificaciones con un *BLAST Score* superior a 67 y con un mínimo de dos secuencias peptídicas con puntuación respectiva superior a 50 (según el programa *DeNovo Explorer*).

Las proteínas identificadas se sometieron a análisis predictivo de la presencia de mecanismos de secreción extracelular, empleando el servidor *SignalP* v. 4.1, para señales de secreción clásica, y el servidor *SecretomeP* v. 2.0, para señales de secreción no clásicas (apartado 2.8).

## 2.25. Electrotransferencia de proteínas (*western blotting*)

---

La transferencia de una mezcla compleja de proteínas (separadas mediante electroforesis SDS-PAGE, según el apartado 2.24.3) a un soporte sólido y posterior inmunodetección con anticuerpos frente a la cola 6xHis de la proteína recombinante, se realizó mediante la técnica de *western blotting* (Towbin *et al.*, 1979).

### 2.25.1. Transferencia de proteínas a soporte sólido

El soporte sólido empleado para la transferencia de proteínas fueron membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF. *Inmobilon-P* 0,45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Millipore), usando un equipo *Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad), para transferencia semiseca, o bien el equipo *Trans-Blot® Turbo™ Transfer System* (Bio Rad), para transferencia rápida.

El protocolo empleado para la **transferencia semiseca** se detalla a continuación.

- ▶ Antes de llevar a cabo la electroforesis monodimensional SDS-PAGE de la muestra, preparar 1 L de tampón de transferencia<sup>(101)</sup> y dejarlo enfriar en una cámara fría a 4 °C.
- ▶ Preparar y llevar a cabo electroforesis SDS-PAGE con las muestras proteicas de interés, en geles de 0,75 mm de grosor, por duplicado (un gel será transferido y el otro se mantiene como control, para su detección con tinción de Coomassie coloidal).
- ▶ Recortar una membrana de PVDF por cada gel a transferir, de acuerdo a sus dimensiones (habitualmente, 5-6 x 8 cm). Recortar también 4 láminas de papel Whatman 3MM, de iguales dimensiones.



- ▶ Finalizada la electroforesis SDS-PAGE, teñir uno de los geles del duplicado para visualización de las bandas, con la tinción de Coomassie coloidal (apartado 2.24.5). El otro gel se someterá a transferencia.
- ▶ Activar la membrana PVDF, reduciendo su elevada hidrofobicidad, humedeciéndola en metanol 1 min.
- ▶ Equilibrar el gel SDS-PAGE a transferir y la membrana, incubándolos en bandejas separadas con tampón de transferencia, durante 15 min. Humedecer con el mismo tampón las láminas de papel Whatman.
- ▶ Preparar el denominado “sándwich de transferencia”. Para ello, colocar, desde el ánodo (polo positivo) hacia el cátodo (polo negativo): 2 láminas de papel Whatman 3 MM, la membrana de PVDF, el gel de poliacrilamida y 2 láminas más de papel Whatman 3 MM. Emplear un tubo de 10 mL limpio a modo de rodillo, para eliminar las posibles burbujas entre capas. La presencia de burbujas afecta a la transferencia.
- ▶ Cerrar el equipo *Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell* y llevar a cabo la electrotransferencia semiseca, aplicando una corriente de 5,5 mA/cm<sup>2</sup>. Para dos geles de 5 x 8 cm, 400 mA, durante 45 min. Si los valores de corriente determinan valores altos de voltaje (superiores a 20 V), limitar el miliamperaje, puesto que el equipo tiene un límite superior de 25 V y por encima pueden producirse daños.
- ▶ El gel transferido puede teñirse con Coomassie coloidal, para determinar la eficacia de la transferencia.

<sup>(101)</sup> **Tampón de transferencia 1X:** Tris 48 mM; glicina 39 mM; 0,037 % (p/v) SDS; ajustar a un 80 % (v/v) del volumen final con agua Milli-Q y añadir el 20 % restante de metanol. Las cantidades para 1 L de tampón 1X son: 5,82 g Tris; 2,93 g de glicina; 1,85 mL de 20 % (p/v) SDS; ajustar el volumen a 800 mL con agua Milli-Q y añadir 200 mL de metanol. Enfriar a 4 °C antes de su uso.

Para realizar la **transferencia rápida** mediante el equipo *Trans-Blot® Turbo™ Transfer System* (Bio Rad), se emplearon los sándwiches de transferencia prehumedecidos *Trans-Blot Transfer Packs Mini Format* (7,0 x 8,5 cm. Bio-Rad). El protocolo de transferencia fue idéntico al detallado para la transferencia semiseca, pero sustituyendo el equipo y parámetros de transferencia por la utilización del protocolo Turbo para un solo gel del *Trans-Blot® Turbo™ Transfer System*, para proteínas de pesos moleculares diversos (5-150 kDa), a 1,3 A, durante 7 min.

## 2.25.2. Inmunodetección

La inmunodetección se realizó mediante uniones específica de anticuerpos a sus correspondientes epítomos antigénicos, reveladas mediante reacciones colorimétricas.

- ▶ Después de la transferencia, humedecer la membrana con metanol. Si la detección se realiza inmediatamente después de la transferencia, evitar este paso.

- ▶ Lavar la membrana con tampón TBST 1X<sup>(102)</sup>, durante 10 min. Todos los lavados deben llevarse a cabo en bandejas, sobre agitadores de vaivén con agitación moderada (45-50 oscilaciones/min).
- ▶ Bloquear los sitios de la membrana a los cuales no se han transferido proteínas, para evitar un exceso de fondo, con 50 mL de solución de bloqueo<sup>(103)</sup>, durante aprox. 45 min.
- ▶ Lavar la membrana con tampón TBST 1X, durante 5 min.
- ▶ Preparar una bolsa de plástico sellada, ajustada al tamaño de la membrana, para llevar a cabo la incubación con el anticuerpo primario. Preparar una dilución 1:3.000 del anticuerpo primario en solución de bloqueo modificada<sup>(104)</sup> (para 20 mL de solución de bloqueo modificada, 6,67 µL de anticuerpo de ratón Anti-His. GE Healthcare Life Sciences). Incubar durante 12-14 h, a 4 °C, con agitación moderada.
- ▶ Abrir la bolsa de hibridación y realizar tres lavados de la membrana de 10 min cada uno, con 50 mL de tampón TBST 1X, a temperatura ambiente.
- ▶ Preparar nuevamente una bolsa de plástico sellada, para realizar la incubación con el anticuerpo secundario. Preparar una dilución 1:5.000 del anticuerpo secundario en solución de bloqueo modificada (para 20 mL de solución de bloqueo modificada, 4 µL de anticuerpo de cabra anti-IgG, conjugado con la enzima fosfatasa alcalina, Sigma-Aldrich). Incubar durante 30 min (volteando la membrana pasados 15 min), a temperatura ambiente con agitación suave.
- ▶ Abrir la bolsa de hibridación. Realizar tres lavados de la membrana con 50 mL de tampón TBST 1X, a temperatura ambiente, de 10 min cada uno.
- ▶ Preparar una nueva bolsa de plástico sellada para realizar el revelado. El revelado se basa en la reacción colorimétrica llevada a cabo por la fosfatasa alcalina, una enzima conjugada al anticuerpo secundario, que actúa sobre un sustrato apropiado y da lugar a sustancias coloreadas que se observan a simple vista.
- ▶ Añadir la solución de revelado<sup>(105)</sup> a la bolsa de plástico con la membrana. Incubar en estático y oscuridad, examinando periódicamente la aparición de color en aquellas bandas con la proteína de interés.
- ▶ Cuando las bandas sean claras y antes de que el fondo sea demasiado intenso o aparezcan interacciones inespecíficas indeseadas, detener la reacción de revelado. Para ello, abrir la bolsa de plástico y lavar la membrana varias veces con agua Milli-Q.

<sup>(102)</sup> **Tampón TBST 10X:** (entre paréntesis, cantidades para preparar 200 mL) Tris-HCl 100 mM, pH 8 (2,42 g Tris); NaCl 1,5 M (17,53 g); 0,5 % (v/v) Tween 20 (1 mL). <sup>(103)</sup> **Solución de bloqueo:** 2 % BSA (p/v) en tampón TBST 1X. Puede emplearse alternativamente 4 % (p/v) leche en polvo desnatada. <sup>(104)</sup> **Solución de bloqueo modificada:** 2 % (p/v) BSA o bien 2 % (p/v) leche en polvo desnatada, en tampón TBST 1X. <sup>(105)</sup> **Solución de revelado:** añadir 50 µL de NBT (solución de azul de nitrotetrazolio 75 mg/mL en 70 % (v/v) dimetilformamida) y 50 µL de BCIP (solución de X-fosfato o 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato 50 mg/mL en dimetilformamida) en 10 mL de tampón de la fosfatasa alcalina. **Tampón de la fosfatasa alcalina con alto contenido en MgCl<sub>2</sub>:** (entre paréntesis, cantidades para preparar 100 mL) Tris 100 mM (1,21 g); NaCl 100 mM (0,58 g); MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 50 mM (1,02 g).

## 2.26. Purificación de proteínas

Para la purificación de proteínas se empleó la columna de cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) *HisTrap™ HP*, de 1 mL (GE Healthcare Life Sciences), llevando a cabo previamente el desalado y limpieza de las muestras con columnas PD-10 (GE Healthcare Life Sciences), de acuerdo al siguiente protocolo:

- ▶ Tras precipitar las proteínas mediante la adición de sulfato de amonio (ver apartado 2.19), o bien someter caldo de cultivo a liofilización, resuspender la muestra de proteínas en el menor volumen posible de tampón de unión<sup>(106)</sup>. Registrar el volumen de tampón empleado, para determinar el factor de concentración, a partir del volumen de partida o el peso del líofilo.
- ▶ Mezclar con ayuda de una micropipeta, manteniendo la muestra en hielo.
- ▶ Montar el sistema de columnas PD-10 en una cámara fría a 4 °C. Equilibrar una columna, añadiendo 25 mL de tampón de unión. Desechar el eluido.
- ▶ Añadir 2,5 mL de muestra sobre la columna (si el volumen de muestra es inferior, completar con tampón de unión). Esperar hasta que gotee completamente. Desechar el eluido.
- ▶ Colocar un tubo limpio bajo la columna. Añadir 3,5 mL de tampón de unión y recoger la muestra desalada. Mantener el tubo en hielo.
- ▶ Si el volumen de la muestra es superior a 2,5 mL, repetir el proceso, incluyendo pasos de equilibrado de la columna con 25 mL de tampón de unión tras cada recuperación de muestra.

<sup>(106)</sup> **Tampón de unión:**  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20mM; NaCl 500 mM; imidazol 20 mM. Ajustar el pH a 7,4 con NaOH. A un pH inferior a 7,0, la His cambia a su forma protonada y no forma complejos con metales. Esterilizar la solución por filtración. Enfriar a 4 °C antes de su empleo.

A continuación, la muestra proteica se sometió a purificación mediante IMAC con el equipo ÄKTA FPLC y la columna *His-Trap™ HP* (GE Healthcare Life Sciences):

- ▶ Conectar la columna *His-Trap™ HP* de 1 mL al equipo ÄKTA FPLC, con sus dos líneas previamente lavadas con agua Milli-Q.
- ▶ Lavar la columna con 10 volúmenes de agua Milli-Q (10 mL).
- ▶ Lavar la bomba con tampón de unión (línea A), y tampón de elución<sup>(107)</sup> (línea B).

- ▶ Ajustar el flujo para un 100 % de línea A, equilibrando la columna en tampón de unión. Antes de inyectar la muestra, hacer un blanco (la línea base del detector UV debe ser cero). Ajustar el método de FPLC para un flujo de 0,25 mL/min durante la etapa de unión a la columna.
- ▶ Conectar al inyector una jeringuilla con el volumen de muestra adecuado para el *loop* elegido (en el caso del presente trabajo, máximo 5 mL). Cambiar el programa a modo de carga e introducir la muestra.
- ▶ Una vez cargada la muestra, cambiar el programa a modo de inyección. Permitir que todo el volumen de muestra pase por la columna y repetir el proceso hasta que toda la muestra se haya cargado. Recoger en un tubo el volumen que ha pasado por la columna, para determinar la eficacia de la unión de la proteína de interés.
- ▶ Una vez cargada toda la muestra, cambiar el flujo a 1 mL/min y dejar pasar 10 mL de tampón de unión por la columna, a modo de lavado. La línea base del detector UV debe volver a cero.
- ▶ Pasar a la etapa de **elución**. Cambiar el porcentaje de flujo a un 100 % de línea B (tampón de elución). Observar la línea de absorbancia UV para monitorizar la elución de la proteína. Cuando la absorbancia comience a aumentar al menos 2 unidades completas por lectura, comenzar a recoger el eluido en fracciones de 500 µL, en microtubos colocados en hielo.
- ▶ Finalizar la recogida cuando se haya recuperado un total de 10 mL.
- ▶ Observar que la absorbancia UV ha vuelto a la línea base del tampón de elución. Cambiar a 100 % de línea A (tampón de unión) y dejar pasar por la columna, al menos 10 mL.
- ▶ Analizar la concentración proteica de las fracciones recogidas (ver apartado 2.24.2) y su actividad FAE (ver apartado 2.20.1).
- ▶ Para su mejor conservación, dializar el tampón de las fracciones eluidas a tampón de elución **sin imidazol**. Si la concentración proteica es baja, incluir BSA como estabilizante a una concentración final del 0,1-0,5 % (p/v). Almacenar la muestra a 4 °C. Los ciclos de congelación-descongelación pueden afectar a la estabilidad de la enzima (incluir crioprotectores en el tampón si se desea congelar).

<sup>(107)</sup> *Tampón de elución: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20mM; NaCl 500 mM; imidazol 500 mM. Ajustar el pH a 7,4 con NaOH. Esterilizar la solución por filtración. Enfriar a 4 °C antes de su empleo.*

---

## 2.27. Análisis metabolómicos

---

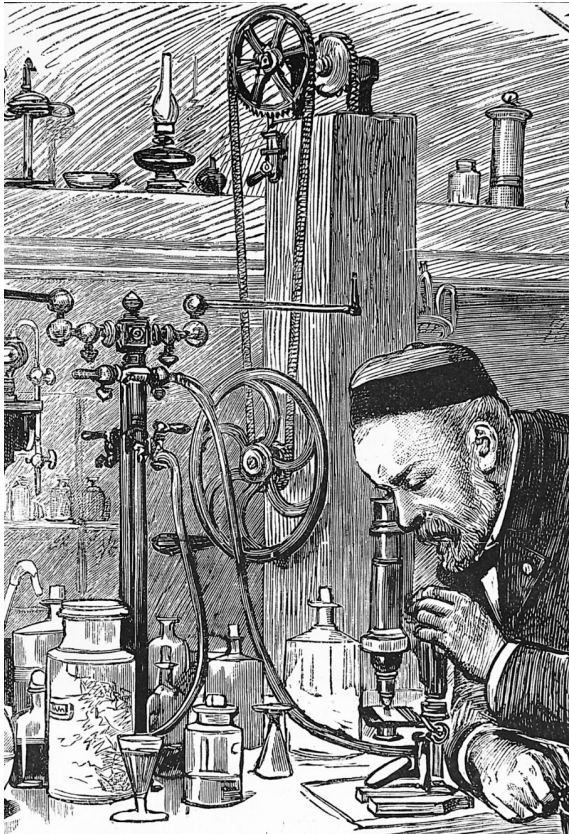
Los análisis metabolómicos se llevaron a cabo empleando el equipamiento presente en las instalaciones de la organización de investigación SINTEF, en Trondheim (Noruega), en el marco de una estancia investigadora internacional.

Se llevaron a cabo fermentaciones sobre medio M-SBP y M-OAT, a partir de un 10 % (v/v) de preinóculo cultivado durante 24 h, a 28 °C y 250 rpm, en medio MPPY. Las fermentaciones se mantuvieron durante 96 h, a 28 °C y 250 rpm.

Se recuperaron dos muestras de 5 mL de caldo de fermentación por cultivo, que fueron centrifugadas dos veces a 3.220 x g, durante 30 min. El sobrenadante fue filtrado a través de filtros de jeringa de 0,22 µm (Millipore). El precipitado se sometió a extracción añadiendo 10 mL de metanol, o bien 10 mL de DMSO, mediante ruptura mecánica con agitador de tipo vórtex durante 1 min y mezclado durante 45 min en un agitador rotativo. Las muestras de sobrenadante, extracción mediante metanol y extracción mediante DMSO se distribuyeron por triplicado en placas de 96 pocillos transparentes (100 µL/pocillo), selladas con una cubierta de silicona.

El análisis de muestras se llevó a cabo mediante un equipo LC-DAD-Q-TOF-MS, a través de análisis MS y MS/MS. La columna empleada fue una *Zorbax bonus RP2*, 1 x 50 mm, 3,5 µm, y la fase móvil fue agua Milli-Q con ácido fórmico 0,1 % y acetonitrilo, a un flujo de 0,3 mL/min y 60 min de tiempo de análisis por muestra. A partir de los datos cromatográficos, se generaron *isoplots* LC-DAD mediante el lenguaje de programación *Python*. Los datos de los centroides LC-MS fueron procesados mediante los programas *MassHunter Qualitative Analysis Software* v. B.04.00 (Agilent Technologies) y *Mass Profiler Professional* v. 2.1.5 (MPP; Agilent Technologies). Se llevó a cabo una búsqueda de compuestos conocidos en las bases de datos *MassHunter METLIN Metabolite* PCD y en una base de datos de compuestos bioactivos con el término anti- (antiviral, antifúngico, antimicrobiano, etc) de PubChem, desarrollada específicamente para el estudio por parte de la organización de investigación SINTEF.





L. Pasteur en su laboratorio, mirando a través de un microscopio (1885). Wellcome Collection, CC BY

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**





# Capítulo 1

## **3.1. Búsqueda de nuevas cepas fúngicas con actividad FAE**



### **3.1.1. Introducción y objetivos del capítulo**

La adopción de métodos biológicos de degradación de la lignocelulosa como alternativa a los métodos físicos-químicos requiere del desarrollo de nuevos sistemas enzimáticos que resulten más eficientes y con una alta aplicabilidad industrial. En este sentido, el descubrimiento de nuevas FAEs puede proporcionar herramientas enzimáticas de utilidad, con distintas condiciones óptimas de actividad y especificidad de sustrato (Mohanram *et al.*, 2013; Najah *et al.*, 2014).

Una de las estrategias empleadas para hallar nuevas enzimas es la bioprospección de microorganismos procedentes de nichos ecológicos extremos o inusuales. Como se ha indicado previamente, se han encontrado cepas fúngicas con potencial lignocelulolítico en muestras tomadas de zonas, *a priori*, con escasa biomasa vegetal, como entornos minerales, zonas de aguas frías o a elevadas profundidades, sobre plásticos y sobre metales (Liu *et al.*, 2014b; Vester *et al.*, 2014; Batista-García *et al.*, 2017). Asimismo, la capacidad de algunos hongos lignocelulolíticos para formar *biofilms* facilita la colonización de ecosistemas extremos (Gutiérrez-Correa *et al.*, 2012).

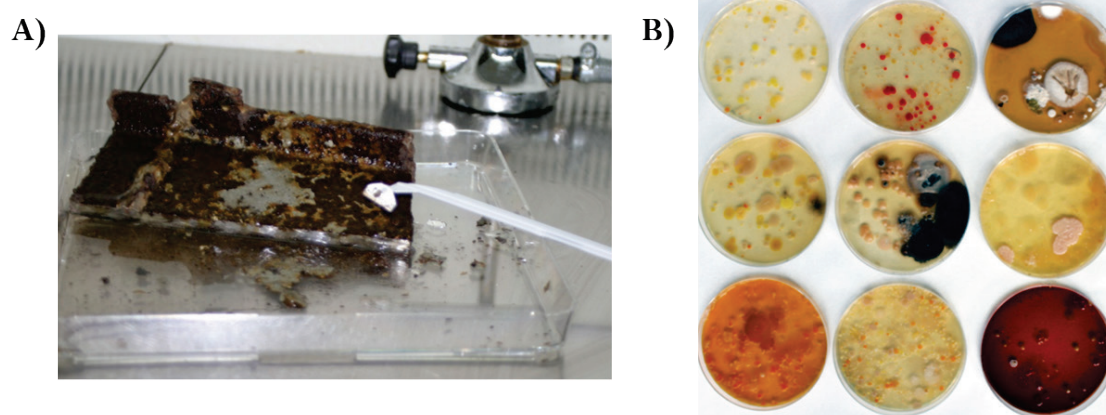
En base a lo expuesto, el primer objetivo de este capítulo fue la búsqueda de nuevas cepas fúngicas con actividad FAE, a partir de muestras procedentes de superficies metálicas y plásticas. Una vez aisladas, se analizó su potencial FAE mediante bioensayo en placa y se procedió a la identificación de las cepas que presentaron esta actividad enzimática. Posteriormente, se pusieron a punto métodos para la determinación cuantitativa de la actividad FAE, a través de la medida de la liberación de AHC mediante HPLC. Además, se analizó la capacidad inductora de la actividad FAE de diferentes sustratos naturales de carácter lignocelulósico, utilizándolos como fuente de carbono en las fermentaciones. En base a ello, se seleccionaron los sustratos más apropiados y la cepa que presentaba una mayor actividad FAE. Por último, se llevó a cabo una primera aproximación a la determinación de la actividad celulasa de los aislados ambientales, tras su cultivo sobre un sustrato inductor de este grupo enzimático.

### **3.1.2. Aislamiento de cepas fúngicas**

La mayor parte de las cepas fúngicas que se analizaron se obtuvieron a partir de muestras ambientales recogidas dentro del proyecto europeo BIOCORIN (*New biocoating for corrosion*

*inhibition in metal surfaces*), perteneciente al Séptimo Programa Marco de la Comunidad Europea para acciones de investigación, desarrollo tecnológico y demostración (FP7). El objetivo principal de BIOCORIN fue desarrollar nuevos recubrimientos para combatir la corrosión de superficies metálicas inducida por microorganismos (MIC), basados en tecnologías sol-gel y el empleo de microorganismos antagonistas frente a los responsables de la corrosión. Dentro de este proyecto, se recogieron muestras ambientales procedentes de **superficies metálicas expuestas a diferentes condiciones climáticas**: clima mediterráneo seco (Madrid, España), clima mediterráneo continental (Nápoles, Italia), superficies metálicas en el océano Atlántico (La Coruña, España) y procedentes del Mar del Norte (Harlingen, Países Bajos).

Para su procesamiento, los cuatro tipos de muestras fueron colocados en placas de Petri de 225 mm x 225 mm, donde se añadieron 50-80 mL de agua Milli-Q. Con ayuda de un raspador de células estéril, se obtuvieron suspensiones de microorganismos que se sembraron en una batería de medios de cultivo. En concreto, para el aislamiento de cepas fúngicas se emplearon placas de medio PDA (*potato dextrose agar*; Difco) y medio SBD (*Sabouraud glucose agar*; Difco) ambos suplementados con 100 mg/mL de benzilpenicilina y 20 mg/mL de rifampicina, para evitar el crecimiento bacteriano. Las placas se incubaron a 30 °C. A partir de las muestras ambientales, pudieron identificarse un total de 15 cepas de levaduras y 27 de hongos filamentosos, teniéndose en consideración estos últimos para la determinación de actividad FAE (Fig. 3.1).



**Fig. 3.1. Material y placas para el aislamiento de cepas fúngicas a partir de muestras ambientales. A)** Placa metálica oxidada de forma natural y raspador para la obtención de suspensiones de microorganismos productores de MIC, a partir de una muestra procedente del océano Atlántico. **B)** Ejemplo de algunas de las placas obtenidas tras la incubación de las suspensiones de microorganismos, antes de su aislamiento. (Fotografías cedidas por el proyecto BIOCORIN).

Dentro de los 27 aislados, se seleccionaron aquellos con características más favorables para su manejo en laboratorio (capacidad para crecer y esporular en cultivo en placa de Petri en estufa; capacidad para crecer en medio para cultivo sumergido MPPY; susceptibilidad a la congelación y posibilidad de mantenimiento de la cepa en condiciones de congelación o liofilización). A los aislados procedentes de BIOCORIN, se añadió una cepa obtenida a partir de una superficie plástica procedente de un clima continental frío (León, España) (Ullán, resultados no publicados). En total, se seleccionaron para su estudio **20 aislados fúngicos ambientales**.

El medio de elección para el crecimiento y esporulación de los hongos fue el **medio PW2**. Este medio es una adaptación del medio Power (PW), que a su vez se prepara mediante la combinación de dos medios: PM1 y Czapek KCl 0,7M (López-nieto *et al.*, 1985). El medio Czapek KCl 0,7 M es una modificación del medio Czapek, desarrollado inicialmente para el cultivo de *A. niger* y *Penicillium camemberti* (Czapek, 1903; Dox, 1910). Actualmente, el medio Czapek se emplea para la propagación de especies fúngicas y para el aislamiento a partir de muestras de ambientes como suelos y aguas (Siqueira *et al.*, 2011; Doriya y Kumar, 2016). Por su parte, el medio PW se ha empleado con éxito previamente para la obtención de micelio y conidios en numerosos estudios sobre *Penicillium* spp. (Fernández *et al.*, 1994; Fierro *et al.*, 1996; Ullán *et al.*, 2007), así como otros ascomicetos, como una cepa extremófila de *Pestalotiopsis palmarum* (Naranjo-Briceño *et al.*, 2013). En otros casos, no obstante, el medio PW no ha sido apropiado para estimular la esporulación, como en cepas del hongo con aplicaciones alimentarias *Monascus purpureus* (Ajdari *et al.*, 2011). En el presente trabajo, el medio PW2 indujo de forma efectiva la esporulación de todos los aislados ambientales. Como condiciones adecuadas para el crecimiento y esporulación de los aislados, se seleccionaron 140 h de cultivo en estufa a 28 °C.

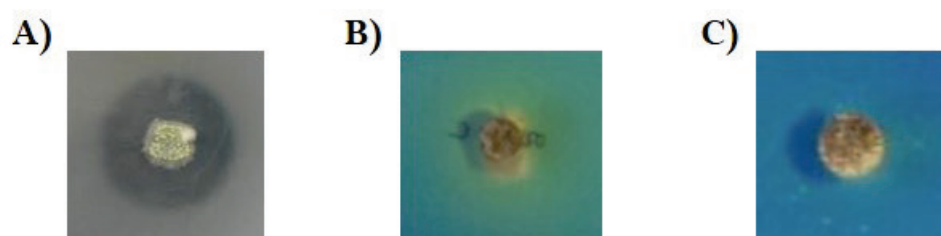
### **3.1.3. Determinación cualitativa de la actividad FAE en placa**

Una vez seleccionados los 20 aislados aptos para cultivo en condiciones de laboratorio, se procedió a determinar la presencia de actividad FAE. Este análisis se llevó a cabo de acuerdo al método de bioensayo en placa descrito en el apartado 2.18.

Los aislados se cultivaron por triplicado en placas con medio PW2, mediante siembra masiva, a partir de suspensiones de esporas en glicerol 40 % almacenadas a -80 °C, o bien a partir de

cultivos puros en placa almacenados a 4 °C. Las placas fueron incubadas hasta conseguir un crecimiento y esporulación homogéneos (140 h, 28 °C). Con ayuda de un sacabocados estéril, se extrajeron tacos de las placas esporuladas, que fueron colocados sobre orificios de igual diámetro practicados en placas con medio EF. Este medio selectivo se caracteriza por contener un 0,075 % (p/v) del sustrato para FAEs etil ferulato. La degradación de dicho sustrato puede identificarse *de visu* mediante la formación de un halo de hidrólisis transparente alrededor de las colonias positivas, sobre fondo blanquecino. Esta visualización puede llevarse a cabo también mediante el empleo de colorantes e indicadores de pH, como el verde de bromocresol.

El verde de bromocresol (3', 3'', 5', 5''-tetrabromo-*m*-cresolsulfonftaleína) es un indicador de tipo ácido con un intervalo de transición entre pH 3,8 y pH 5,4. En su forma ácida presenta color amarillo y en la básica, azul oscuro. Se trata de un indicador adecuado para visualizar compuestos con grupos funcionales cuyo pK<sub>a</sub> es inferior a 5,0, como ácidos carboxílicos o el ácido ferúlico (Kamel y El-Awamry, 1978; Sabnis, 2008). Al teñir las placas de medio EF con una solución de verde de bromocresol, los halos de degradación correspondientes a la presencia de actividad FAE toman color amarillo sobre un fondo azul. El color amarillo se debe a un descenso del pH producido por la liberación de ácido ferúlico tras la hidrólisis del etil ferulato (Fig. 3.2).

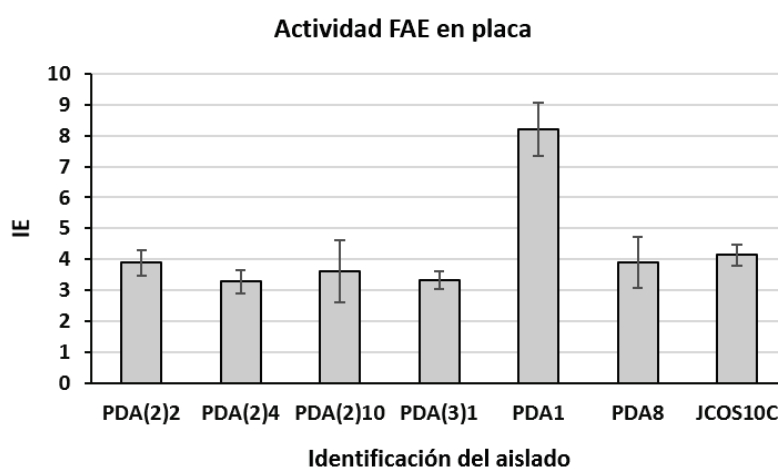


**Fig. 3.2. Halos de hidrólisis debidos a la presencia de actividad FAE. A)** Halo de hidrólisis en placa con el sustrato etil ferulato. **B)** Halo de hidrólisis en placa con etil ferulato, teñida con verde de bromocresol. **C)** Misma cepa que en Fig. 3.2.B, pero en placa control, sin etil ferulato, teñida con verde de bromocresol. Al no existir el sustrato para FAEs, no aparece zona de hidrólisis con descenso de pH (color amarillo).

La actividad FAE se expresó mediante el parámetro Índice Enzimático (IE) (Braga *et al.*, 2014), calculado en base a la expresión matemática indicada en el apartado 2.18. Este valor, si bien no se puede considerar una determinación cuantitativa, permite realizar una primera comparación entre la actividad FAE de diferentes cepas. Para garantizar la representatividad de los valores medios, todas las cepas se analizaron por duplicado en tres experimentos independientes. Además, como control negativo se incluyeron placas de medio EF sin etil

ferulato, es decir, sin sustrato para FAEs, donde pudo verificarse que no aparecían halos de degradación ni descenso del pH. Así pues, la presencia de halos y el viraje del verde de bromocresol hacia amarillo pudo atribuirse a la liberación de ácido ferúlico por la actividad FAE.

Del total de 20 aislados analizados, 7 dieron lugar a la aparición de un halo de hidrólisis. Los valores de IE de los 7 aislados que demostraron actividad FAE se recogen en la Fig. 3.3. El candidato con mayor actividad FAE en este ensayo fue el aislado PDA1, cuyos valores de IE duplicaron los de las otras cepas.



**Fig. 3.3. Determinación cualitativa de la actividad FAE.** Se indican los aislados ambientales con actividad FAE y sus valores de IE. (Modificado de García-Lino, 2014).

Este ensayo en placa se basa en el descrito por Donaghy y McKay (Donaghy y McKay, 1994). Distintas modificaciones del mismo se han empleado para la detección cualitativa de la actividad FAE en estudios tanto en hongos como en bacterias (Donaghy *et al.*, 1998; Donaghy *et al.*, 1999; Mathew y Abraham, 2005; Rashamuse *et al.*, 2007; Kin *et al.*, 2009; Pérez-Morales *et al.*, 2011; Hassan y Hugouvieux-Cotte-Pattat, 2011; Sachan *et al.*, 2014; Dotsenko *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016). A pesar de que el ensayo demostró ser adecuado para la identificación de la actividad FAE en diferentes cepas fúngicas, presentaba algunos inconvenientes, que se indican más adelante. Por ello, el ensayo se modificó para reducir los tiempos de incubación, facilitar el seguimiento y optimizar sus resultados de cara a futuras aplicaciones.

### 3.1.3.1. Optimización del ensayo de actividad FAE en placa

Uno de los principales inconvenientes del método descrito por Donaghy y McKay es que, en ocasiones, los tiempos de incubación resultan ser demasiado largos (hasta 12 días) y varían entre cepas, lo que dificulta el análisis. La distinta velocidad de crecimiento de las cepas dificulta la comparativa entre resultados. Por otro lado, la utilización de la tinción de verde de bromocresol sobre la placa presenta el inconveniente de no ser reversible y supone el final del experimento: una vez teñidas, las placas no pueden regresar a su estado anterior para continuar la incubación. Además, la definición de los halos que se obtienen mediante el empleo de este indicador es limitada, tendiendo a perder intensidad de color y a difuminarse.

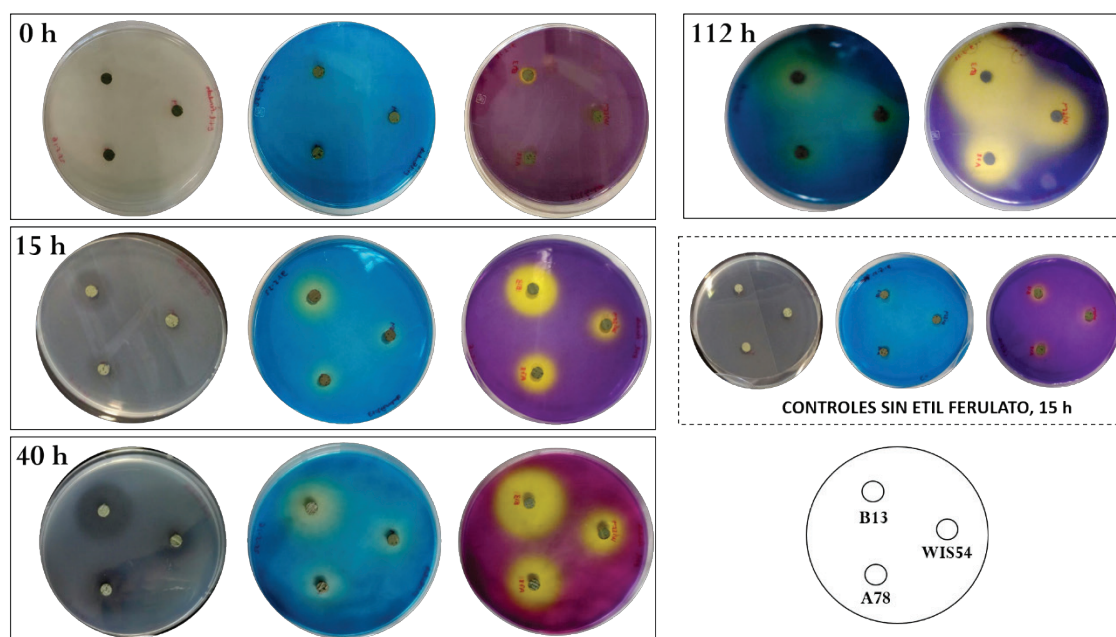
Con el objetivo de tratar de facilitar el establecimiento del tiempo de incubación para comparar la actividad FAE entre cepas, así como para evitar la finalización del ensayo al teñir las placas, se desarrolló un nuevo método. En este caso, se sustituyó el indicador de pH verde de bromocresol por otro perteneciente a la misma familia de colorantes, concretamente, el púrpura de bromocresol.

El púrpura de bromocresol (5',5"-dibromo-*o*-cresolsulfonftaleína) presenta un intervalo de transición entre pH 5,2 y pH 6,8. En su forma ácida es de color amarillo y en la básica, púrpura (Sabnis, 2008). Mediante la realización de los ensayos, pudo comprobarse que el viraje de color es más fácil de detectar empleando este indicador que el verde de bromocresol. Asimismo, el color demostró ser más estable y tardar más en difuminarse (Fig. 3.4).

Otra de las modificaciones que se realizaron para optimizar el ensayo fue incluir el indicador de pH en el medio de cultivo, en lugar de añadir una solución concentrada a las placas para revelarlas a tiempo final. Esto permite realizar un seguimiento en tiempo real de la hidrólisis del etil ferulato. Se verificó que la inclusión del indicador de pH en el medio no afecta negativamente al crecimiento del hongo.

Para validar el nuevo método, se empleó el hongo *P. rubens* Wisconsin 54-1255 (WIS54) y dos cepas sobreproductoras de FAEs obtenidas a partir de él (A78 y B13), que forman parte del trabajo de Tesis Doctoral de la Dra. R. Rodríguez Castro (Rodríguez-Castro, 2017). La evolución de los halos de hidrólisis se determinó a tiempo 0, 15, 40 y 112 h (Fig. 3.4).





**Fig. 3.4. Ensayo para determinación cualitativa de actividad FAE en placa.** Las cepas utilizadas en el ensayo fueron *P. rubens* B13 (B13), *P. rubens* A78 (A78) y *P. rubens* Wisconsin 54-1255 (WIS54). Se indican los halos de hidrólisis correspondientes a cada tiempo de observación (de izq. a dcha., medio sin indicador de pH, medio con verde de bromocresol y medio con púrpura de bromocresol), en cada una de las tres cepas.

Las tres cepas analizadas presentan diferente potencia de actividad FAE (Rodríguez-Castro, 2017). El orden en cuanto a potencia de actividad FAE coincide con el demostrado en el ensayo en placa (B13>A78>WIS54). En base a los ensayos por triplicado en placa, pudo establecerse como tiempo óptimo de análisis **15 h** y, como indicador de pH más adecuado para la identificación de actividad FAE, el **púrpura de bromocresol**.

El púrpura de bromocresol se ha empleado tradicionalmente para usos diversos. Así, se ha utilizado para la determinación de proteínas séricas, como la albúmina (Tel *et al.*, 1979; Harff, 1983; Ueno *et al.*, 2013), en medios selectivos para el aislamiento de bacterias productoras de ácido láctico (Bujalance *et al.*, 2006; Lee y Lee, 2008), en medios para la diferenciación de estafilococos y micrococos, en función de sus características fermentativas (Evans y Kloos, 1972) o en análisis metabólicos en hongos entomopatógenos (St Leger *et al.*, 1999). En cuanto a su inclusión como indicador de pH en ensayos enzimáticos, se ha empleado en ensayos de actividad lisina descarboxilasa (Kim *et al.*, 2015), en zimogramas para detectar actividad descarboxilasa de AHC (Prim *et al.*, 2002) y en una patente, para detectar actividad esterasa (Breuer *et al.*, 2015). A pesar de que se han desarrollado ensayos para identificar actividad esterasa y FAE empleando otros indicadores de pH, como el verde de bromocresol (Donaghy y McKay, 1994), el azul de

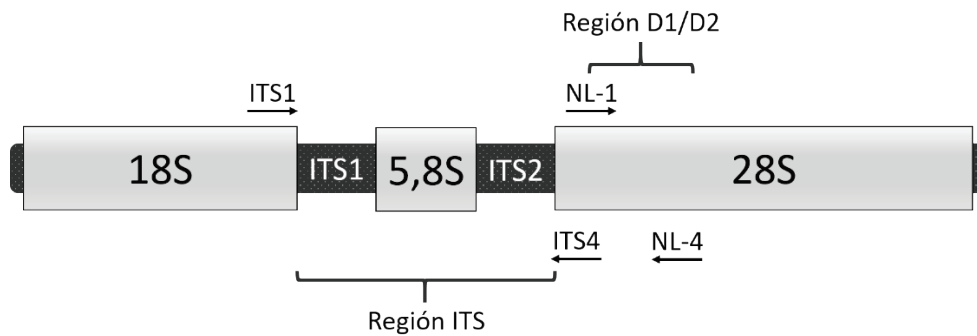
bromotimol (Lisboa *et al.*, 2013) o el 4-nitrofenol (Janes *et al.*, 1998; Ramírez *et al.*, 2008; Jiao *et al.*, 2014), no se han hallado publicaciones en las que se describan ensayos de actividad FAE empleando el indicador púrpura de bromocresol, por lo que el ensayo desarrollado en el presente trabajo constituye una alternativa a los ensayos de actividad que se emplean actualmente.

### **3.1.4. Identificación de los aislados ambientales con actividad FAE**

Las cepas fúngicas que mostraron actividad FAE en los ensayos cualitativos fueron identificadas mediante **secuenciación de ADN ribosómico nuclear (ADNr) y espaciadores transcritos internos (ITS)**. Para ello, se llevó a cabo la extracción de ADN<sub>g</sub> por medio de las técnicas descritas en el apartado 2.9.4. Este ADN se empleó como molde para llevar a cabo reacciones de PCR empleando dos parejas de oligonucleótidos cebadores universales, específicos para hongos, cuya secuencia se indica en el apartado 2.2.4: ITS1 y ITS4 (White *et al.*, 1990); NL-1 y NL-4 (Kurtzman y Robnett, 1997).

La pareja **ITS1-ITS4** permite la amplificación de la región de los ITS, en la que se encuentran ITS1 e ITS2, que son regiones variables no codificantes localizadas entre genes conservados que codifican para el ARNr 18S, 5,8S y 28S de hongos filamentosos. La región ITS es una de las más empleadas como “código de barras genético” para la identificación de cepas fúngicas (Iwen *et al.*, 2002; Aslam *et al.*, 2017). Por su parte, la pareja de cebadores **NL-1-NL-4** da lugar a la amplificación de los dominios divergentes D1/D2, que se localizan próximos al extremo 5' del gen que codifica para el ARNr 28S (Wang *et al.*, 2014b) (Fig.3.5). La región D1/D2 presenta, generalmente, menos variabilidad que la región ITS, aunque existen excepciones (Kwiatkowski *et al.*, 2012).

El carácter conservado de los extremos que flanquean las regiones ITS y D1/D2 determina que puedan emplearse como sitios de unión para cebadores universales, mientras que la variabilidad de las regiones internas permite la diferenciación interespecífica (Romanelli *et al.*, 2014). Además de los cebadores empleados, existen otros que se han diseñado en estudios previos para una identificación más eficaz de grupos particularmente complicados (Toju *et al.*, 2012).



**Fig. 3.5. Representación esquemática de la agrupación génica que codifica para el ARNr de las diferentes subunidades ribosomales de hongos filamentosos.** Se indican los sitios de unión de las dos parejas de oligonucleótidos cebadores empleadas para la identificación de cepas.

Las reacciones de PCR para amplificación de las regiones ITS y D1/D2 se llevaron a cabo a partir de 7 ng/ $\mu$ L de ADN molde, empleando los siguientes componentes: 0,2 mM de dNTPs; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,3  $\mu$ M de cada uno de los cebadores; DMSO 4 %; tampón 1X *Green GoTaq<sup>®</sup> Flexi* (Promega) y 0,025 U/ $\mu$ L de polimerasa *GoTaq<sup>®</sup> Flexi DNA* (Promega). Se programaron 30 ciclos de 40 s a 94 °C, 40 s a 52 °C y 1 min a 72 °C, con una desnaturalización inicial y amplificación final de 10 min cada una (apartado 2.10.3).

Los productos de amplificación se purificaron mediante los dos *kits* comerciales para recuperación de fragmentos de ADN que se recogen en el apartado 2.10.5. Seguidamente, se procedió a la secuenciación por medio de un secuenciador *ABI PRISM 3130* (Applied Biosystems), según se indica en el apartado 2.13. Las secuencias obtenidas se cotejaron con las depositadas en las bases de datos GeneBank, EMBL, DDBJ, PDB y RefSeq, a través del programa informático BLASTn (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1994; Boratyn *et al.*, 2013).

Los resultados obtenidos tras la búsqueda en bases de datos permitieron llevar a cabo la identificación de los aislados ambientales hasta el nivel de especie (Tabla. 3.1).

Todas las cepas fueron identificadas como especies pertenecientes al filo **Ascomycota**, subfilo **Pezizomycotina**. Las características en cuanto a nutrición, forma de vida y hábitat de cada una de las especies justifican la presencia de enzimas FAEs. Al tratarse de hongos fitopatógenos y hongos saprófitos capaces de crecer sobre biomasa vegetal en descomposición, la disponibilidad de una maquinaria enzimática lignocelulolítica facilita su nutrición y su capacidad para colonizar plantas. En este sentido, se han descrito un gran número de enzimas CAZy capaces

de degradar la pared celular vegetal en especies fúngicas saprófitas y, sobre todo, en patógenos de plantas (Zhao *et al.*, 2013; Kubicek *et al.*, 2014).

**Tabla 3.1. Identificación de los aislados fúngicos ambientales.** Se indica el origen, código de identificación de la cepa, mejor coincidencia según BLASTn (BLASTn), número de acceso (Acc. No.), porcentaje de cobertura (Cob), porcentaje de identidad (Ident) e identificación final.

Origen	Código aislado	BLASTn	Acc. No.	Cob	Ident	Identificación final
La Coruña, España	PDA(2)2	<i>Fusarium oxysporum</i> aislado 41	EU839 392.1	99 %	100 %	<i>F. oxysporum</i> PDA(2)2
	PDA(2)4	<i>Fusarium oxysporum</i> cepa G405	KR094 464.1	99 %	99 %	<i>F. oxysporum</i> PDA(2)4
	PDA(2)10	<i>Penicillium roseopurpureum</i>	AF0344 62.1	98 %	100 %	<i>P. roseopurpureum</i> PDA(2)10
Madrid, España	PDA1	<i>Alternaria alternata</i> aislado HMY 2-1	KJ7398 80.1	100 %	100 %	<i>A. alternata</i> PDA1
	PDA8	<i>Alternaria alternata</i> cepa IFM 41348	AB1006 75.1	99 %	99 %	<i>A. alternata</i> PDA8
Nápoles, Italia	PDA(3)1	<i>Pleospora herbarum</i> aislado IT_1785B	KU561 878.1	99 %	99 %	<i>P. herbarum</i> PDA(3)1
León, España	JCOS10C	<i>Penicillium verrucosum</i> cepa CBS 603.74	AB4792 85.1	100 %	99 %	<i>P. verrucosum</i> JCOS10C

*F. oxysporum* es una especie fúngica ubicua, que constituye uno de los hongos saprófitos más importantes del suelo y la rizosfera, donde puede permanecer latente durante décadas. Es también un patógeno de plantas capaz de afectar a flores ornamentales, frutas, vegetales, cultivos de extensivo y cultivos de plantación (Gordon y Martyn, 1997). La especie *P. roseopurpureum* ha sido previamente aislada a partir de muestras obtenidas de suelos con presencia de especies vegetales, muestras de aire tomadas dentro de casas (Houbraken *et al.*, 2011b) barro de estuarios (Shang *et al.*, 2016) y materiales orgánicos presentes en ambientes particulares, como piezas textiles en criptas funerarias de varios siglos de antigüedad (Pangallo *et al.*, 2013). En este último caso, la presencia de restos vegetales en la cripta, así como la madera de los ataúdes, podría explicar el hallazgo de este hongo. Una de las cepas aisladas por Pangallo y colaboradores demostró poseer actividad celulolítica. *P. herbarum* es un hongo cosmopolita saprófito que puede producir enfermedades en plantas (mancha negra, manchas foliares). *Pleospora* sp. constituye la forma teleomorfa del hongo *Stemphylium* sp. Este género está considerado, junto con *Alternaria* spp., como uno de los principales hongos alergénicos (Köhl *et al.*, 2009; Inderbitzin

*et al.*, 2009; Levetin *et al.*, 2016). *P. verrucosum* es capaz de crecer sobre cereales, semillas y materia vegetal en descomposición y tiene importantes implicaciones económicas, al ser productor de micotoxinas (ocratoxinas A y B, citrinina) y otros metabolitos (Cabañes *et al.*, 2010; Reis *et al.*, 2015; Limay-Rios *et al.*, 2017; Hautbergue *et al.*, 2017; Dhungana *et al.*, 2018).

La identificación del primer y tercer aislado fúngico con mayor actividad, PDA1 y PDA8, fue especialmente compleja, puesto que entre los resultados de la búsqueda empleando la herramienta BLASTn se obtuvieron varias coincidencias dentro del género *Alternaria* spp., con porcentajes de similitud similares. El proceso de identificación de estos aislados se explica con mayor detalle en el apartado siguiente.

#### *3.1.4.1. Identificación de los aislados pertenecientes al género Alternaria spp.*

Conseguir la identificación a nivel de especie de aislados ambientales encuadrados en el género *Alternaria* spp. no resultó ser un proceso sencillo. Para llevar a cabo la determinación de la especie de los aislados referidos como PDA1 y PDA8, se analizaron en primer lugar sus características morfológicas macroscópicas y microscópicas. Para la descripción de la morfología se tomaron como referencia las escalas de color y términos para la descripción de texturas recogidas en la literatura (Ridgway, 1912; Nobles, 1948). El aspecto de las colonias de ambos aislados tras cuatro días de cultivo a 28 °C, en oscuridad y en medio PDA fue el de un micelio con colonias circulares o irregulares, planas, lanosas, de color blanco-gris neutro pálido, oscureciéndose con el tiempo hacia gris neutro o gris neutro oscuro. El reverso de la placa presentó color gris neutro oscuro uniforme en el aislado PDA 8, mientras que en el aislado PDA1 se observaron zonas pigmentadas de color gris neutro oscuro, gris neutro, gris violáceo y blanco. En el aislado PDA1, tras la esporulación, fue habitual la aparición de hifas aéreas de color blanco o gris neutro pálido. Estas áreas blanquecinas no aparecieron en el aislado PDA8.

Además de la observación del aspecto macroscópico, se llevó a cabo la visualización de los conidióforos al microscopio óptico. Tanto en PDA1 como en PDA8, se observaron conidióforos simples, tabicados, de forma alargada y color marrón o marrón-oliváceo. Los conidios apicales, a veces unidos en cadenas longitudinales, presentaron aspecto piriforme, con septos muriformes (principalmente transversales y, en menor medida, verticales) dispuestos irregularmente (Fig. 3.6). Los conidios mostraron constricciones en los extremos de los septos. Tanto esta

descripción como el aspecto macroscópico de las colonias se corresponden con especies de *Alternaria* spp. encuadradas dentro de la sección *Alternata* (Woudenberg *et al.*, 2013).



**Fig. 3.6.** Imágenes de conidios de *A. alternata* PDA1, observados al microscopio óptico. Barra de escala = 25  $\mu$ M. (Modificado de García-Calvo *et al.*, 2018).

A pesar de que las características macro y microscópicas sitúan taxonómicamente los aislados, la clasificación basada únicamente en caracteres morfológicos se desaconseja en este género, dado que presenta una gran plasticidad (Andrew *et al.*, 2009; Ozkilinc y Sevinc, 2018). La morfología es variable en función de parámetros como el tipo de cultivo, el sustrato, la temperatura, las condiciones de luz y humedad e, incluso, puede existir variedad en cuanto a aspecto dentro del mismo cultivo (Pryor y Michailides, 2002). Por ello, la información morfológica macro y microscópica se combinó con la obtenida mediante técnicas moleculares para facilitar la identificación.

Las técnicas moleculares arrojaron resultados de alta similitud con tres especies de *Alternaria* spp. (Tabla 3.2). Las tres especies pertenecen a la sección *Alternata*, según la clasificación propuesta por Woudenberg y colaboradores (Woudenberg *et al.*, 2013).

**Tabla 3.2. Porcentajes de similitud de los aislados ambientales PDA1 y PDA8 con especies de *Alternaria* spp.** Se indican los valores correspondientes a las coincidencias con mayor similitud.

	Parámetro BLASTn	<i>A. alternata</i>	<i>A. burnsii</i>	<i>A. tenuissima</i>
<b>Aislado PDA1</b>	Porcentaje de identidad	100 %	100 %	99 %
	BLASTn Score	1029	1027	1020
<b>Aislado PDA8</b>	Porcentaje de identidad	99 %	99 %	99 %
	BLASTn Score	1101	1079	1085

La complejidad de la identificación de las cepas pertenecientes a este género es un hecho reseñado previamente en estudios de identificación de aislados ambientales. Kwiatkowski y colaboradores secuenciaron las regiones ITS y D1/D2 del ADNr para clasificar 146 aislados fúngicos, procedentes de pacientes humanos. En este estudio, los autores únicamente fueron capaces de identificar los aislados de *Alternaria* spp. hasta nivel de género, debido a la gran interespecificidad de la identidad de los fragmentos de ADN (Kwiatkowski *et al.*, 2012). La dificultad para identificar especies de *Alternaria* spp. es particularmente importante en las denominadas especies de esporas pequeñas, entre ellas *A. alternata* y *A. tenuissima* (Pryor y Michailides, 2002). Un estudio extenso de filogenia multilocus no pudo diferenciar varias de las especies incluidas dentro de este grupo (Andrew *et al.*, 2009). En este sentido, algunos autores indican que se han llevado a cabo identificaciones erróneas de especies de *Alternaria* spp. debido a la dificultad para diferenciar y la plasticidad de las especies de este género y otros, como *Ulocladium* spp. (de Hoog y Horré, 2002; Thomma, 2003).

En el presente trabajo, la identificación empleando técnicas moleculares se basó en las secuencias de la región ITS y D1/D2 del ADNr nuclear. Pryor y Gilbertson secuenciaron la región ITS del ADNr nuclear y el fragmento SSU mitocondrial del ADNr, para determinar relaciones filogenéticas dentro del género *Alternaria* spp. y otros próximos, como *Pleospora*, *Ulocladium*, y *Macrosporium*. El estudio concluyó que el fragmento ITS es de más utilidad para la identificación de especies, mientras que las secuencias SSU mitocondriales indican diferencias entre miembros de clados diferentes (Pryor y Gilbertson, 2000).

Teniendo en cuenta la información morfológica macro y microscópica, así como la obtenida mediante técnicas moleculares, los aislados PDA1 y PDA8 fueron identificados como cepas de la especie *Alternaria alternata*, puesto que se trató de la primera entrada en la lista de resultados BLASTn (mejor *Score*), la morfología macro y microscópica era concordante y se trata de la especie representativa dentro de la sección *Alternata*, a la que pertenecen los aislados.

Para comparar *A. alternata* PDA1 y PDA8, se llevó a cabo un análisis de similitud mediante alineamiento con el programa SeqMan (*DNA STAR Lasergene v. 7.1.0*) y con la herramienta Clustal Omega. Pudo verificarse que, si bien la similitud entre ambas cepas era muy alta, existían divergencias en, a menos, cuatro nucleótidos de la región amplificada (Fig. 3.7).

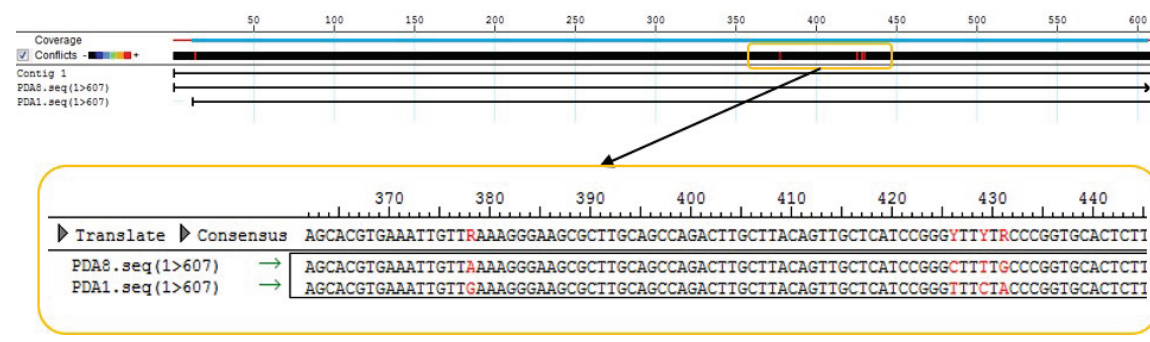


Fig. 3.7. Análisis de similitud de ADNr entre *A. alternata* PDA1 y PDA8. Los nucleótidos que no coinciden aparecen resaltados en color rojo.

### 3.1.5. Selección de sustrato lignocelulósico

Una vez identificados los aislados fúngicos con actividad FAE, se procedió a la selección del **sustrato natural lignocelulósico** a utilizar como inductor y fuente de carbono en cultivo sumergido. La selección se llevó a cabo mediante la realización de fermentaciones empleando diferentes sustratos naturales, para posteriormente determinar la actividad FAE del caldo de cultivo a tres tiempos de recogida (48, 72 y 96 h tras la inoculación).

Los sustratos naturales que se evaluaron proceden de tres especies de monocotiledóneas pertenecientes a la familia Poaceae (trigo, maíz y avena) y una dicotiledónea de la familia Amaranthaceae (remolacha). En el caso del **trigo y maíz**, se emplearon granos enteros molidos hasta conseguir un polvo fino. La avena que se utilizó fue **fibra de avena de molienda** en polvo, un subproducto de la industria harinera obtenido a partir de las cascarillas, que es rico en la denominada “fibra insoluble”. Bajo este término se incluyen principalmente tres polímeros vegetales: la celulosa, la hemicelulosa y la lignina (Dhingra *et al.*, 2012). Igualmente, la cascarilla de avena es rica en ácido ferúlico (Rasane *et al.*, 2015). Por último, se empleó **pulpa de remolacha**, un subproducto de la industria azucarera con alto contenido en pectinas y en ácidos fenólicos, principalmente ácido ferúlico (Micard *et al.*, 1996; Saulnier y Thibault, 1999).

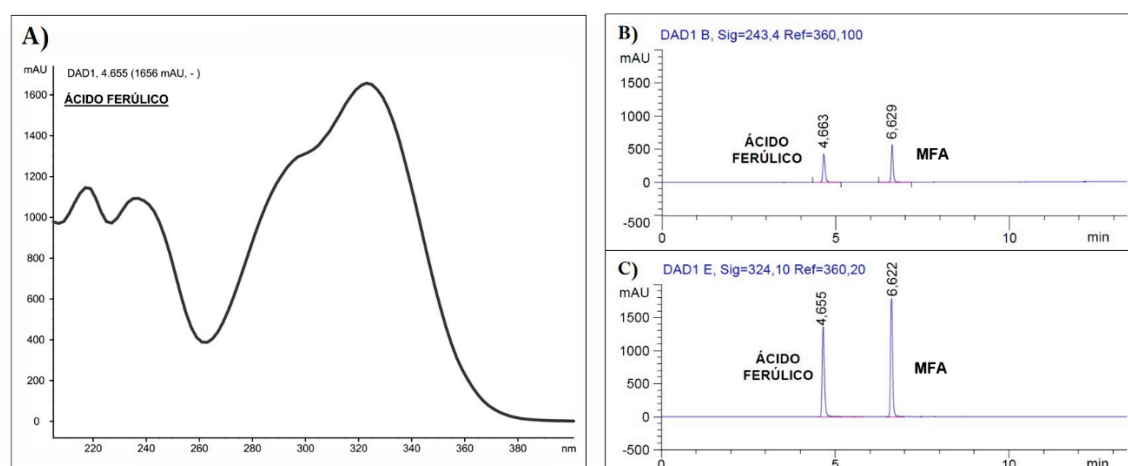
La determinación de la actividad FAE se llevó a cabo a través de la medida de la liberación de ácido ferúlico a partir del sustrato sintético MFA, cuantificada mediante HPLC (apartado 2.20.3).



### 3.1.5.1. Optimización del método de determinación de ácido ferúlico mediante HPLC

Para la determinación de ácido ferúlico mediante HPLC se desarrolló un método a partir de protocolos anteriormente publicados (Rodríguez-Castro, 2017). Se utilizaron indistintamente dos equipos Agilent y Waters y dos columnas cromatográficas de fase reversa, cuyos modelos y casas comerciales se detallan en el apartado 2.4.4. La determinación se llevó a cabo de acuerdo al método de elución con gradiente detallado en el apartado 2.20.3.

La detección y cuantificación de ácido ferúlico se llevó a cabo empleando detectores de luz UV-Vis PDA de longitud de onda variable (Swartz, 2010) y, en el caso del equipo Waters, también un detector UV-Vis de doble longitud de onda. En primer lugar, se prepararon patrones de ácido ferúlico y MFA a partir de reactivos comerciales. Se analizó su espectro de absorción UV mediante los detectores PDA, encontrándose máximos de absorción a longitudes de onda en torno a 215, 243 y 324 nm (Fig. 3.8.A).



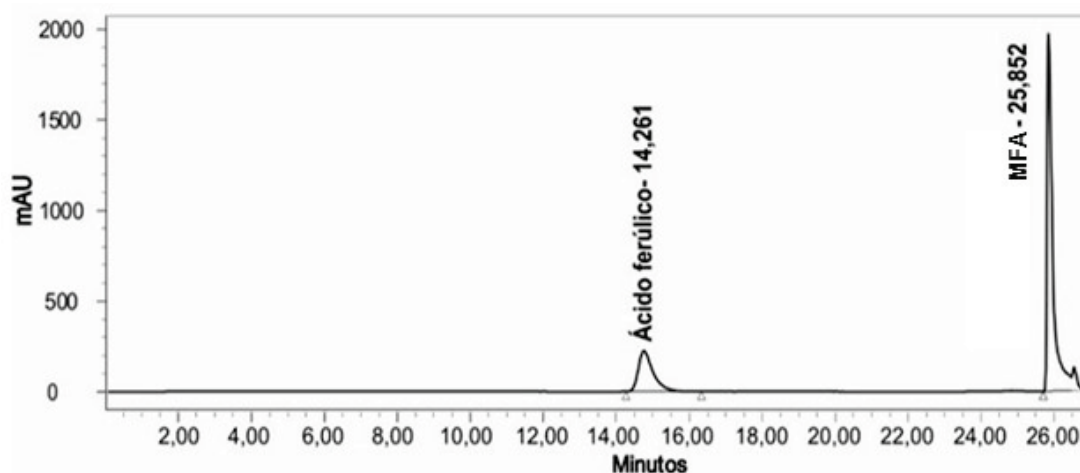
**Fig. 3.8. Espectro de absorción UV del ácido ferúlico y cromatogramas de HPLC de 1 mg/mL de ácido ferúlico y de MFA (equipo Agilent). A)** Espectro de absorción UV del ácido ferúlico. **B)** Cromatograma a 243 nm. **C)** Cromatograma a 324 nm.

Debido a la mayor intensidad de la señal de los picos, que facilita la detección, la cuantificación de ácido ferúlico se llevó a cabo a 324 nm (Fig. 3.8.B y C), como se ha descrito en otros estudios (Lai *et al.*, 2012; Kareparamban *et al.*, 2013; Gong *et al.*, 2013; Rashamuse *et al.*, 2014; Zeng *et al.*, 2014; Kelle *et al.*, 2016; Rodríguez-Castro, 2017; Chi *et al.*, 2017).

El análisis mediante el equipo HPLC Waters se llevó a cabo inyectando 10  $\mu$ L de muestra, mientras que para análisis mediante el equipo Agilent se inyectaron 10  $\mu$ L (columna *Kinetex*), o

bien 20  $\mu\text{L}$  (columna *Mediterranea*). Esta diferencia en cuanto al volumen de inyección se debe a la mayor capacidad de separación de compuestos de la columna *Kinetex* y a la mayor sensibilidad del detector acoplado al equipo Waters (un detector UV-Vis dual que, al analizar únicamente dos longitudes de onda, consigue captar señales que estarían por debajo del límite de detección en los PDA, que analizan prácticamente todo el espectro UV-Vis).

Tras el análisis de cada muestra en el equipo Waters, fue necesario incluir un paso de 5 min de lavado y reequilibrado con la fase móvil, para asegurar la correcta separación de compuestos y la repetibilidad del tiempo de retención (Fig. 3.9). Este paso no fue necesario en el equipo Agilent (Fig. 3.8.B y C), por lo que se suprimió para acortar el tiempo de análisis total. Se comprobó que el tiempo de análisis por muestra de 27 min era suficiente para obtener tanto el pico correspondiente al ácido ferúlico (producto de la reacción) como al MFA (sustrato de la reacción), incluso empleando el equipo y columna con tiempos de retención más largos (Fig. 3.9).



**Fig. 3.9. Cromatograma de HPLC para el ácido ferúlico y MFA.** Cromatograma tras una reacción de actividad FAE con extracto enzimático de la cepa *A. alternata* PDA1, a 45 °C y pH 5,0, obtenido a una longitud de onda de 324 nm, mediante el equipo Waters.

Debido a la distinta disponibilidad del equipamiento a lo largo del desarrollo de los experimentos, se emplearon dos equipos HPLC y dos columnas cromatográficas (apartado 2.4.4). No obstante, los resultados obtenidos fueron comparables entre sí, dado que la cuantificación se llevó a cabo a partir de rectas patrón con concentraciones crecientes de ácido ferúlico, preparadas por triplicado en cada una de las condiciones de análisis (Tabla 3.3). Asimismo, la diferencia en cuanto al volumen de muestra inyectado en el equipo tampoco afectó

a la comparabilidad de los resultados, al expresarse la actividad FAE en relación a unidades de volumen, realizando el ajuste pertinente.

**Tabla 3.3. Información relativa a las rectas patrón utilizadas para la cuantificación en cada equipo,** empleando la columna *Mediterranea*<sup>TM</sup> *Sea 18 3 μm* (equipos Waters, Agilent) y la columna *Kinetex*<sup>®</sup> *2,6 μm EVO C18 100 Å* (equipo Agilent).

	Equipo Waters	Equipo Agilent
Ecuación de la recta de calibrado	$y=7,451521 \cdot 10^7 x - 6,400606 \cdot 10^4$	<i>Mediterranea</i> : $y=1,224125 \cdot 10^5 x + 2,8004256 \cdot 10^2$
		<i>Kinetex</i> : $y=5,09711618 \cdot 10^4 x + 1,3800396 \cdot 10$
R <sup>2</sup>	0,9996	<i>Mediterranea</i> : 0,9993. <i>Kinetex</i> : 0,9991
Duración método	27 min + 5 min de equilibrado	27 min
Tiempo de retención	14,2 min	<i>Mediterranea</i> : 8,00 min
		<i>Kinetex</i> : 4,66 min

### 3.1.5.2. Selección de sustrato natural lignocelulósico para la inducción de FAEs

Una vez puesto a punto el método de detección de ácido ferúlico mediante HPLC, se estudió cuáles de los sustratos naturales disponibles (maíz, trigo, avena y pulpa de remolacha) eran más apropiados como inductores de la actividad FAE y fuentes de carbono para fermentación.

Para el desarrollo experimental de las fermentaciones, se prepararon preinóculos en cultivo sumergido, empleando un medio rico en nutrientes (100 mL de medio MPPY en matraz liso de 500 mL), de acuerdo al protocolo detallado en el apartado 2.7.3. Tras la germinación de las esporas y obtención de una masa micelial joven y homogénea, se añadió un 5 % (v/v) de preinóculo a matraces lisos de 250 mL con 50 mL de medio de producción de FAEs (medio SL, con cada uno de los cuatro sustratos naturales), por duplicado (dos réplicas biológicas).

El medio SL es un medio complejo que contiene glucosa a baja concentración como primera fuente de carbono, lo que permite la germinación de las esporas fúngicas y el inicio del crecimiento del micelio. Una vez que la glucosa se agota, la cepa fúngica pasa a emplear como fuente de carbono el sustrato natural lignocelulósico (avena, maíz, trigo o pulpa de remolacha). La composición química de estos sustratos naturales es capaz de inducir la producción de una serie de enzimas extracelulares lignocelulolíticas, encaminadas a hidrolizar los polisacáridos complejos de la pared y transformarlos en azúcares fermentables (Amore *et al.*, 2013; Dilokpimol *et al.*, 2016; Benocci *et al.*, 2017).

Las fermentaciones en medio SL se llevaron a cabo durante 96 h, recogándose muestras de 2 mL a las 48, 72 y 96 h. Las muestras de caldo de fermentación fueron centrifugadas dos veces y clarificadas a través de filtros de jeringa de 0,45  $\mu\text{m}$ , para retirar el micelio, esporas e impurezas procedentes del medio de cultivo.

La actividad FAE se analizó mediante una modificación del ensayo descrito en el apartado 2.20.1. Se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de caldo de fermentación filtrado a 150  $\mu\text{L}$  de una solución de MFA 0,05 % (p/v) en tampón acetato 0,1 N pH 5,0 y se llevaron a cabo reacciones durante 30 min, a 37 °C. Posteriormente, las muestras fueron hervidas durante 5 min para detener la reacción. La actividad FAE se expresó como unidades (U: cantidad de enzima requerida para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de ácido ferúlico/min, bajo las condiciones analizadas) por L de caldo de fermentación. Se realizaron dos reacciones (dos réplicas técnicas) a partir de cada réplica biológica.

Para confirmar que la actividad FAE detectada se debió a las cepas fúngicas, se incluyeron controles negativos sustituyendo el caldo de fermentación por el medio de cultivo sin inocular, por triplicado. Pudo comprobarse de este modo que el medio SL con cada uno de los cuatro sustratos naturales presentaba valores de liberación de ácido ferúlico similares al control negativo con agua Milli-Q, es decir, que toda actividad FAE detectada era atribuible a las enzimas secretadas por los microorganismos.

Se determinó y comparó la actividad FAE expresada en U/L de caldo de fermentación de cada uno de los siete aislados ambientales, en los cuatro medios lignocelulósicos y a los tres tiempos de recogida (Tabla 3.4).

En el caso de la cepa PDA(2)4 de *F. oxysporum*, no se detectó la presencia de ácido ferúlico mediante HPLC, tras las reacciones. El análisis de los cromatogramas reveló que, pese a que no se obtuvo ninguna señal correspondiente con el ácido ferúlico, aparecieron numerosos picos compatibles con productos de su degradación (Fig. 3.10). La capacidad de esta *F. oxysporum* PDA(2)4 para degradar el ácido ferúlico se confirmó mediante la sustitución del MFA por ácido ferúlico como sustrato en las reacciones. Con el fin de identificar los compuestos producidos mediante dicha degradación, se compararon sus tiempos de retención y espectros de absorción UV con patrones conocidos. Sin embargo, no fue posible determinar su naturaleza. En todo caso, pese a que se detectó actividad FAE por parte de dicha cepa en el ensayo en placa y se observó

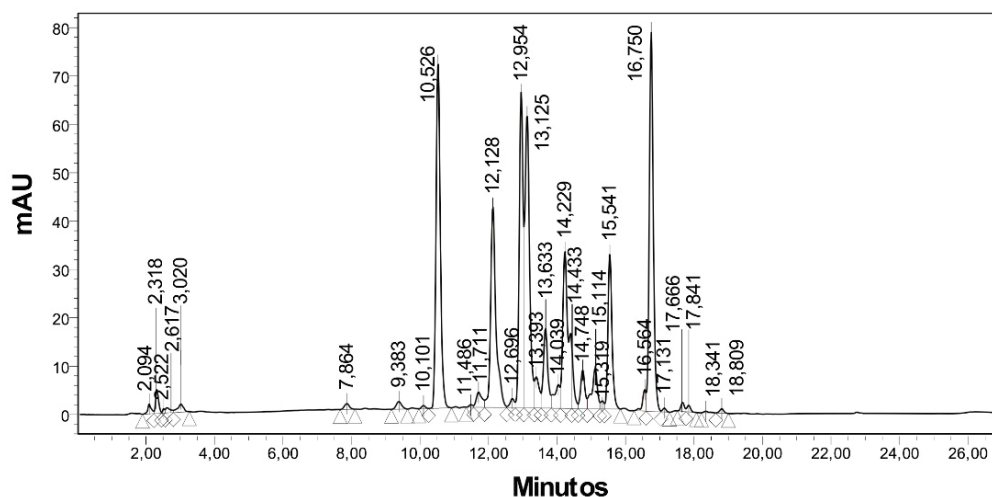
una disminución en la cantidad de MFA en las reacciones, debido a la capacidad de esta cepa para degradar el ácido ferúlico se optó por excluirla del resto de ensayos.

**Tabla 3.4. Actividad FAE a lo largo del cultivo sobre los cuatro sustratos lignocelulósicos utilizados** (M-CORN: grano de maíz molido; M-WHEAT: grano de trigo molido; M-OAT: fibra de avena de molienda en polvo; M-SBP: pulpa de remolacha molida). Actividad a partir de caldo de cultivo, en reacciones a 37 °C y pH 5,0, sobre MFA. Unidad (U): cantidad de enzima que libera 1  $\mu$ mol de ácido ferúlico/min.

Código del aislado	M-CORN			M-WHEAT			M-OAT			M-SBP		
	Tiempo											
	48h	72h	96h	48h	72h	96h	48h	72h	96h	48h	72h	96h
PDA1	+++	+++	++	-	+++	++	++	+++++	+++++	++	++	+++++
PDA8	-	-	-	-	-	-	-	++++	+++++	-	+	+
JCOS10C	-	-	++	++	+++	+++++	-	++	+	-	++	+++++
PDA(3)1	-	-	-	-	-	-	-	++++	+++++	-	+	+
PDA(2)2	-	-	-	-	++	++	++	+	+	-	++++	+++
PDA(2)4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PDA(2)10	-	-	-	-	-	-	+	++	-	-	++++	++++

a. La actividad FAE expresada en U/L de caldo de cultivo se indica mediante el siguiente código: -, actividad por debajo del límite de detección; +, actividad entre 0,1-0,2 U/L; ++, actividad entre 0,2-0,5 U/L; +++, actividad entre 0,5-1 U/L; ++++, actividad entre 1-7,5 U/L; +++++, actividad >7,5 U/L.

La capacidad de especies del género *Fusarium* spp. para degradar el ácido ferúlico y otros ácidos fenólicos es una característica que se ha observado en estudios previos. *F. solani* es capaz de degradar el ácido ferúlico hacia 4-vinil guayacol, así como el ácido *p*-cumárico (Nazareth y Mavinkurve, 1986). Una investigación sobre la especie fitopatógena *F. graminearum* Schwabe, que afecta a múltiples especies vegetales de climas templados (como el maíz, el trigo y la cebada), determinó que este hongo era capaz de liberar ácido ferúlico a partir de la pared vegetal de la seda de maíz, por la acción de xilanasas y FAEs. Sin embargo, no se encontró un aumento en el contenido de ácido ferúlico libre, por lo que se sugirió que podría ser capaz de llevar a cabo una degradación compleja del ácido ferúlico tras su liberación (Cao *et al.*, 2011). Asimismo, se ha descrito la capacidad de *F. culmorum* y *F. graminearum* para degradar otros ácidos fenólicos, como el ácido *trans*-cinámico hacia los ácidos cafeico y ferúlico, o el ácido clorogénico hacia el ácido cafeico (Kulik *et al.*, 2017). *F. graminearum* es también capaz de degradar el ácido clorogénico hacia los ácidos hidroxiclorigénico y protocatéquico, así como el ácido cafeico hacia los ácidos protocatéquico e hidroxicafeico (Gauthier *et al.*, 2016).



**Fig. 3.10. Degradación del ácido ferúlico por parte de *F. oxysporum* PDA(2)4.** Cromatograma tras una reacción de actividad FAE con la cepa PDA(2)4, a 37 °C y pH 5,0, obtenido a una longitud de onda de 324 nm, en el equipo Waters. Se observan numerosos picos, cuyos tiempos de retención y espectros UV no se correspondieron con los del ácido ferúlico.

Según se indica en la Tabla 3.4, los únicos sustratos naturales capaces de inducir la actividad FAE en todas las cepas -excepto en el caso especial de *F. oxysporum* PDA(2)4, ya mencionado- fueron la fibra de avena de molienda en polvo (**M-OAT**) y la pulpa de remolacha molida (**M SBP**). A la vista de estos resultados, se decidió seleccionar estos dos sustratos para los siguientes ensayos.

Si bien tanto la avena como la pulpa de remolacha fueron empleados en diferentes experimentos del presente trabajo, se optó por priorizar el uso esta última, por tres razones: **i)** se trata de un subproducto de una industria importante (la azucarera), que se genera en altas cantidades cada año y que, desde el punto de vista de la Economía Circular, es necesario explotar para mejorar los rendimientos y reducir los residuos; **ii)** como se indicó en el apartado 1.4.3 de la Introducción, es una materia de origen vegetal muy abundante en Castilla y León, que constituye una de las áreas más importantes de producción de remolacha azucarera en nuestro país, por lo que sería especialmente interesante estudiar alternativas para su explotación en los Centros Tecnológicos de la región [razón por la que también ha sido escogido como sustrato de referencia en otros estudios (Rodríguez-Castro, 2017)] y **iii)** se trata de un subproducto sin aplicación directa en alimentación humana, a diferencia de la fibra de avena de molienda, y uno de los pilares fundamentales del concepto de biorrefinería es evitar emplear como sustratos aquellos productos que forman parte de la alimentación humana.

La distinta actividad FAE al cultivar las cepas fúngicas en los cuatro medios pudo deberse a la diferente composición de las paredes celulares vegetales de cada uno de los sustratos naturales. Varios estudios han demostrado que factores derivados de los sustratos de crecimiento, como ciertos carbohidratos, actúan como inductores de las FAEs fúngicas (Williamson *et al.*, 1998; de Vries y Visser, 1999). El contenido en ácido ferúlico dentro de la estructura química de las paredes celulares vegetales está relacionado con la inducción o desrepresión de FAEs y, si bien no es necesario para que se produzca, un mayor contenido en ácido ferúlico estimula la producción de estas enzimas (Faulds *et al.*, 1997). Estudios han demostrado que varios compuestos que contienen un anillo bencénico con un grupo metoxilo en C-3, un grupo hidroxilo en C-4 y sin sustituyentes en C-5 (por ejemplo, el ácido ferúlico o el vanílico) están implicados en los mecanismos de inducción de FAEs. Además, existen mecanismos de regulación, como la represión por catabolitos, que se activan ante la presencia de fuentes de carbono fácilmente metabolizables, como la fructosa o la glucosa (de Vries y Visser, 1999). A pesar de que el salvado de maíz y el de trigo son ricos en ácido ferúlico (Mathew y Abraham, 2006) y se han empleado como inductores de la expresión de FAEs fúngicas (Koseki *et al.*, 1998; Crepin *et al.*, 2003a; Kumar *et al.*, 2011; Dilokpimol *et al.*, 2016), en el presente trabajo se emplearon granos de maíz y trigo completos, que están compuestos en gran parte por polisacáridos no lignocelulósicos del endospermo, como el almidón, y otros constituyentes, como proteínas (Shewry *et al.*, 2013; Beloshapka *et al.*, 2016). Por el contrario, la pulpa de remolacha y la fibra de avena, que también son ricas en ácido ferúlico (Micard *et al.*, 1996; Saulnier y Thibault, 1999; Yu *et al.*, 2002), se componen en su mayor parte de polisacáridos lignocelulósicos, sobre todo heteroxilanos en la avena y polisacáridos pécticos en la pulpa de remolacha (Hutnan *et al.*, 2000; Kühnel *et al.*, 2011). Este mayor contenido en celulosas y polisacáridos de matriz presentes en las paredes celulares vegetales puede explicar la mayor actividad FAE de los caldos de cultivo en medios con fibra de avena y pulpa de remolacha.

### **3.1.6. Selección de la cepa con mayor actividad FAE**

La determinación de la actividad FAE mediante bioensayo descrita en el apartado 3.1.3 permitió identificar aquellos aislados ambientales que presentaran esta actividad enzimática. Sin embargo, al tratarse de un ensayo cualitativo, la información que aportó no fue suficiente como para llevar a cabo la selección de las mejores cepas productoras. Para obtener datos cuantitativos

de actividad FAE que permitieran dicha selección, se realizó un ensayo según el protocolo descrito en el apartado 2.20.1.

Las reacciones se desarrollaron según las condiciones estándar de 37 °C y pH 5,0, añadiendo 10 µL de extracto enzimático de cada una de las cepas a 190 µL de solución de MFA. Para la recuperación del extracto enzimático de cada aislado ambiental, se llevaron a cabo fermentaciones en medio M-SBP, de acuerdo al método descrito en el apartado 2.19, a partir de un 5 % (v/v) de preinóculo en medio MPPY, cultivado durante 24 h. En base a los datos preliminares de actividad FAE en el caldo de fermentación, indicados en el apartado 3.1.5.2, se realizaron recogidas de muestras para los extractos enzimáticos a las 96 h, por triplicado.

La liberación de ácido ferúlico por parte de los extractos enzimáticos fue analizada mediante el método de HPLC descrito en el apartado 3.1.5.1, expresando la actividad FAE en unidades (U: cantidad de enzima requerida para liberar 1 µmol de ácido ferúlico/min, en las condiciones de reacción) por g de proteína total en el extracto enzimático. La concentración proteica total de los extractos se analizó de acuerdo al método de Bradford, detallado en el apartado 2.24.2. Esta técnica se basa en el cambio de color del colorante azul brillante de Coomassie (Coomassie brilliant blue G-250 dye), en respuesta a la presencia de concentraciones diferentes de proteínas. El colorante reacciona con residuos de los aminoácidos, de forma que el color vira de anaranjado-pardo hacia azul intenso. La unión del colorante a la proteína causa un cambio en el máximo de absorción del compuesto, de 465 a 595 nm, y el incremento de absorción a 595 nm es monitorizado.

Los valores medios de actividad FAE de cada aislado ambiental se indican en la Tabla 3.5.

**Tabla 3.5. Análisis comparativo de la actividad FAE de los diferentes aislados.** Los extractos enzimáticos empleados se obtuvieron a partir de fermentaciones en medio M-SBP, recogidos a las 96 h de cultivo. Reacciones a 37 °C y pH 5,0.

Cepa	Actividad FAE (U/ g proteína)	Potencia de actividad FAE (orden, de mayor a menor)
<i>A. alternata</i> PDA1	72,93 ± 1,33	1°
<i>A. alternata</i> PDA8	15,21 ± 0,77	5°
<i>P. verrucosum</i> JCOS10C	16,48 ± 1,25	4°
<i>P. herbarum</i> PDA(3)1	9,43 ± 1,26	6°
<i>F. oxysporum</i> PDA(2)2	23,68 ± 0,34	3°
<i>P. roseopurpureum</i> PDA(2)10	32,41 ± 2,76	2°



El orden de potencia de actividad FAE concuerda con el obtenido en los ensayos preliminares para selección de sustrato lignocelulósico. En cuanto a la cepa de mayor actividad FAE, se confirmó que el mejor candidato era *A. alternata* PDA1, que ya había demostrado ser la cepa con mayor IE en el ensayo cualitativo. Sus valores de actividad FAE suponen más del doble que el siguiente mejor candidato. Por este motivo, esta cepa fue seleccionada para la realización de estudios de caracterización de su actividad FAE y lignocelulolítica en mayor profundidad, que se detallan en el segundo capítulo de Resultados y Discusión.

### **3.1.7. Análisis de la actividad celulolítica de los aislados ambientales**

El candidato con mayor actividad FAE fue *A. alternata* PDA1. La actividad FAE de esta cepa fue caracterizada en profundidad, determinando óptimos de temperatura y pH, cinética enzimática y otras actividades lignocelulolíticas (capítulo 2 de Resultados y Discusión).

No obstante, dado el carácter de las FAEs como enzimas auxiliares en los procesos de degradación de la pared celular vegetal y considerando su acción sinérgica con otras enzimas lignocelulolíticas, se decidió determinar la actividad celulasa de los siete aislados ambientales, mediante ensayos de actividad  **$\beta$ -glucosidasa, celobiohidrolasa y endoglucanasa**.

Para ello, se prepararon fermentaciones inoculando un 10 % (v/v) de preinóculo cultivado durante 24 h en medio MPPY (apartado 2.7.3) en matraces lisos de 500 mL con 100 mL de medio SL suplementado con un 2 % (p/v) de Avicel PH-101 (Chemiker-Biochemika Fluka). En este caso, una vez agotada la glucosa como fuente de carbono inicial del medio SL, las cepas fúngicas pasarían a emplear Avicel. Este sustrato está constituido por celulosa microcristalina insoluble, obtenida a partir de madera blanda (procedente de coníferas), en forma de un polvo fino de unos 50  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula. Este tipo de celulosa microcristalina se prepara mediante el tratamiento de la pulpa de madera con ácidos inorgánicos diluidos, para hidrolizar y retirar las regiones amorfas de la celulosa, junto con los polisacáridos de matriz y la lignina (Hassan *et al.*, 2017). El Avicel ha demostrado ser especialmente adecuado para la inducción de los sistemas de celulasas (Mes-Hartree *et al.*, 1988; Lynd *et al.*, 2002; Dashtban *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2016).

Para asegurar la representatividad de los resultados, las fermentaciones fueron llevadas a cabo empleando tres réplicas biológicas y se incluyeron controles negativos correspondientes al medio

de cultivo sin inocular. Se realizaron recogidas de 2 mL de caldo de fermentación a los tiempos 0, 24, 72, 120 y 168 h (Fig. 3.11). Las muestras se centrifugaron dos veces, retirándose las partículas insolubles y los restos biológicos mediante filtros de jeringa de 0,45  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 3.11. Fermentaciones de los aislados ambientales, tras 168 h de cultivo en medio SL suplementado con Avicel PH-101.** De izq. a dcha., los matraces corresponden a las cepas *F. oxysporum* PDA(2)2, *A. alternata* PDA1, *P. roseopurpureum* PDA(2)10, *P. verrucosum* JCOS10C y *P. herbarum* PDA(3)1.

Dado que la degradación de la celulosa se lleva a cabo mediante tres grupos enzimáticos principales [ $\beta$ -glucosidasas, exoglucanasas (celobiohidrolasas) y endoglucanasas], la actividad celulolítica se analizó empleando tres tipos de ensayos.

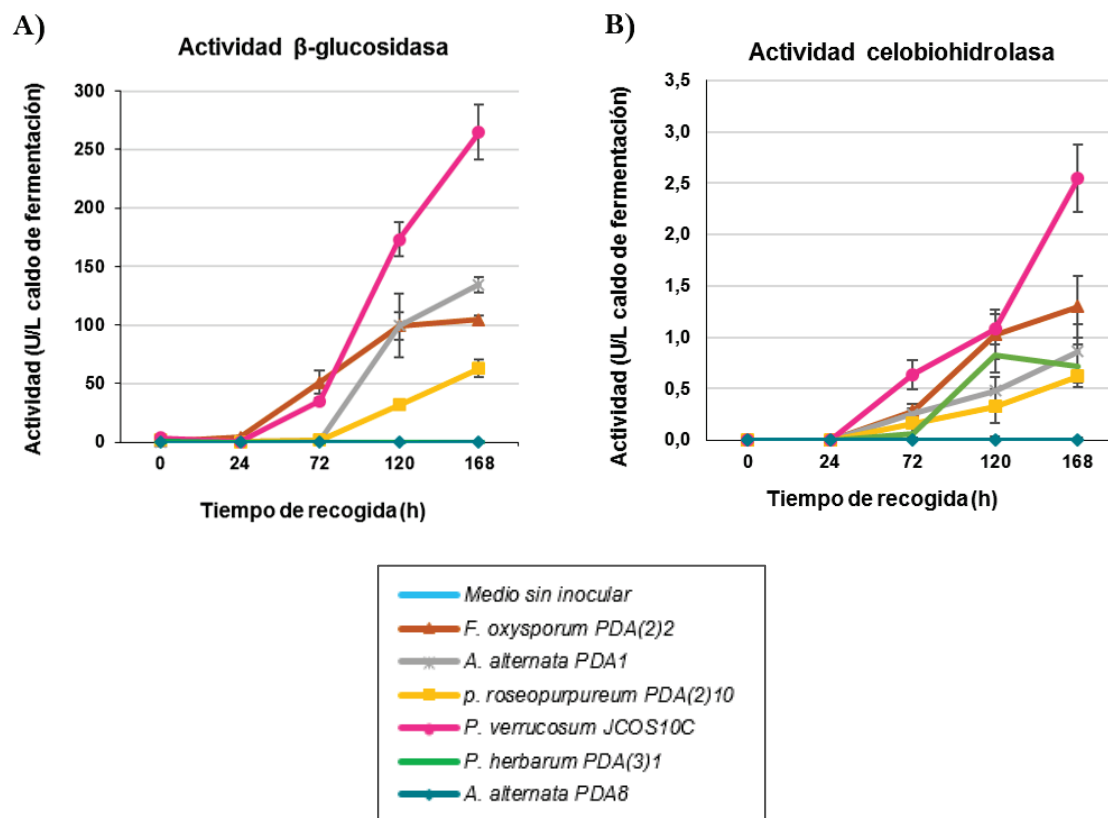
#### 3.1.7.1. Determinación de las actividades $\beta$ -glucosidasa y celobiohidrolasa

La actividad  **$\beta$ -glucosidasa** se determinó cuantitativamente a 50 °C, según una modificación del método espectrofotométrico descrito en el apartado 2.21.1. Se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de caldo de fermentación filtrado a 50  $\mu\text{L}$  de agua Milli-Q y 450  $\mu\text{L}$  de una solución de pNPG 4 mM en tampón acetato 0,1 N pH 5,0. La reacción se detuvo mediante la adición de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , el cual, además, al aumentar el pH de la muestra, permitió el desarrollo del color, dado que el 4-nitrofenol es incoloro por debajo de pH 5,4. En cuanto a la actividad **celobiohidrolasa**, el ensayo fue similar, empleándose en este caso 100  $\mu\text{L}$  de muestra en el mismo volumen final (eliminando los 50  $\mu\text{L}$  de agua Milli-Q) y utilizando como sustrato una solución de pNPC 4 mM en tampón acetato 0,1 N pH 5,0, suplementada con 1 mg/mL de D-glucono-1,5- $\delta$ -lactona.

La recta patrón ( $R^2=0,999$ ) se elaboró empleando concentraciones crecientes conocidas de 4-nitrofenol, en las mismas condiciones de reacción, y determinando su absorbancia espectrofotométricamente a 405 nm. Se llevaron a cabo dos réplicas técnicas de cada muestra. Además, se analizaron los valores de absorbancia del medio de cultivo sin el sustrato de reacción,

comprobandose que eran inferiores a cero y que, por tanto, a la longitud de onda a la que se realizaron las mediciones, el propio medio no aportaba ningún valor de absorbancia de fondo.

Las diferencias en cuanto al volumen de muestra y los tiempos de incubación de uno y otro ensayo se deben a la diferente potencia de las actividades  $\beta$ -glucosidasa y celobiohidrolasa, que obligó a ajustar las condiciones para conseguir valores de liberación del producto (4-nitrofenol) dentro del rango de linealidad de la recta patrón. Los valores de actividad en ambos casos fueron expresados en U/L de caldo de fermentación (U: unidad, definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol de 4-nitrofenol/min, bajo las condiciones del ensayo) (Fig. 3.12).



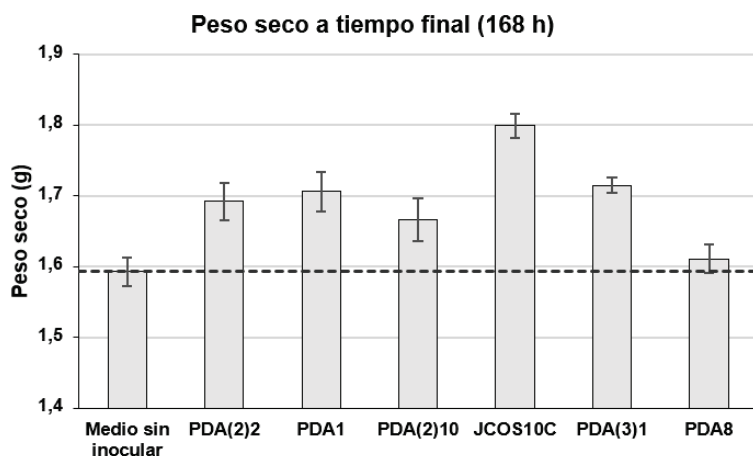
**Fig. 3.12. Evolución de la actividad celulolítica de los aislados ambientales. A)** Actividad  $\beta$ -glucosidasa. **B)** Actividad celobiohidrolasa. Unidades (U): cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol de 4 nitrofenol/min, bajo las condiciones del ensayo.

La cepa que mostró mayor actividad  $\beta$ -glucosidasa y celobiohidrolasa fue *P. verrucosum* JCOS10C (Fig. 3.12). A pesar de que la mayor parte de las publicaciones dedicadas a esta especie se centran en su producción de micotoxinas (ocratoxina A y citrinina) (Cabañes *et al.*, 2010; Wawrzyniak y Waśkiewicz, 2014), su capacidad de crecer sobre productos vegetales, como cosechas de cereal, justifica la presencia de actividad celulasa (Elmholt y Hestbjerg, 1999; Pitt,

2002; Magan y Aldred, 2007). Un estudio ha encontrado actividad  $\beta$ -glucosidasa en particular y celulasa en general en dos cepas de esta especie fúngica, aisladas a partir de ambientes marinos (Burtseva *et al.*, 2003) y se ha patentado una cepa de *P. verrucosum* con alta actividad celulasa y xilanasas (Kim y Kim, 2011). El hecho de que *P. verrucosum* JCOS10C proceda de un ambiente pobre en materia vegetal (superficie plástica) y mostrara actividad celulasa confirma el interés de la búsqueda de cepas con actividad lignocelulolítica en ecosistemas, *a priori*, poco favorables.

En general, los valores de actividad celobiohidrolasa fueron considerablemente menores que los de  $\beta$ -glucosidasa. Este hallazgo se ha encontrado en otros sistemas de celulasas fúngicas (Pointing, 1999; Zoglowek *et al.*, 2015). Un estudio en el que se indican genes presumiblemente relacionados con la degradación de polisacáridos de plantas en 13 genomas fúngicos, puso de manifiesto que, en todos los casos, el número de genes que codifican para celobiohidrolasas fue mucho menor que el de endoglucanasas y el de  $\beta$ -glucosidasas (van den Brink y de Vries, 2011). Además, en varias especies fúngicas con capacidad para degradar la celulosa de la madera no se ha detectado actividad celobiohidrolasa (Eaton y Hale, 1993). Trabajos previos han conseguido incrementar la actividad celobiohidrolasa mediante la expresión heteróloga de genes que codifican para dicha enzima, lo que constituye una estrategia prometedora para la producción de cócteles lignocelulolíticos más equilibrados (Miettinen-Oinonen *et al.*, 2005; Zoglowek *et al.*, 2015).

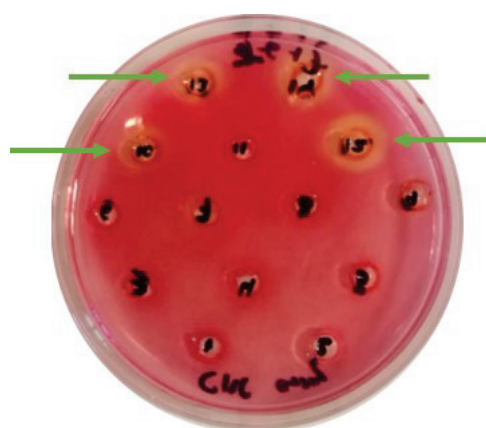
No se detectó actividad  $\beta$ -glucosidasa, ni celobiohidrolasa, en *A. alternata* PDA8. Este hecho, unido a su menor crecimiento en el medio LS con Avicel, respecto al resto de cepas (Fig. 3.13), pareció indicar que *A. alternata* PDA8 no presenta un sistema celulolítico inducible por Avicel y, por lo tanto, no es capaz de emplearlo eficazmente como fuente de carbono.



**Fig. 3.13. Análisis comparativo del peso seco de las cepas tras 168 h de fermentación.** El valor de peso seco corresponde a micelio procedente de 80 mL de fermentación, secado durante 7 días a 80 °C.

### 3.1.7.2. Determinación cualitativa de actividad endoglucanasa

Para la determinación de la actividad endoglucanasa se utilizó el ensayo cualitativo detallado en el apartado 2.21.3, basado en el empleo del sustrato CMC, un derivado de la celulosa que, a diferencia de esta, es soluble en agua y se degrada con mayor rapidez que la celulosa cristalina (Johnsen y Krause, 2014). Para visualizar la actividad endoglucanasa, se emplea la tinción con rojo Congo (Teather y Wood, 1982; Sazci *et al.*, 1986). Este colorante interacciona de forma no covalente con polisacáridos constituidos por residuos de  $\beta$ -D-glucopiranosos unidos mediante enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glucosídicos, como la celulosa y la CMC, de modo que en las zonas de hidrólisis aparece un halo que no se tiñe, de color amarillento frente a fondo rojo (Fig. 3.14) (Rahman *et al.*, 2018). El ensayo se llevó a cabo empleando muestras de todas las cepas y tiempos de recogida, así como muestras de los matraces de medio LS-Avicel sin inocular, por triplicado.



**Fig. 3.14. Ensayo en placa para la determinación cualitativa de actividad endoglucanasa.** Tras 24 h de reacción, la placa se tiñe con rojo Congo. Las flechas indican los halos sin teñir, correspondientes con zonas de degradación de CMC (actividad endoglucanasa).

Cinco de las seis cepas analizadas mostraron actividad endoglucanasa, principalmente en las recogidas a tiempos de fermentación largos (120 y 168 h) (Tabla 3.6). *P. herbarum* PDA(3)1 fue el aislado con mayor actividad, pudiendo ser detectada desde la recogida a las 24h. Curiosamente, esta cepa, aunque mostró actividad celobiohidrolasa, no presentó valores detectables de actividad  $\beta$ -glucosidasa. Dado que las enzimas endoglucanasas, exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas actúan de manera sinérgica, es posible que una mayor actividad endoglucanasa facilite el proceso de degradación de la celulosa en cepas con alguna de las otras actividades complementarias reducidas. La ausencia de actividad  $\beta$ -glucosidasa en el caldo de fermentación de una cepa capaz de crecer sobre Avicel puede explicarse por la posible presencia de  $\beta$ -glucosidasas asociadas a la membrana y la pared celular del hongo, que se han descrito en otras especies fúngicas, y que no se encontrarían en el sobrenadante (Eberhart y Beck, 1970; Tiwari *et al.*, 2013). Asimismo, pese a

que la degradación extracelular de la celobiosa es el proceso más habitual, se han descrito mecanismos de transporte en especies fúngicas que permiten la incorporación de este disacárido por parte de la célula (Fritscher *et al.*, 1990; Kubicek *et al.*, 1993; Parisutham *et al.*, 2017).

**Tabla 3.6. Presencia de actividad endoglucanasa.** Las condiciones en las cuales se identificó halo de hidrólisis aparecen sombreadas en color gris.

Cepa	Tiempo de recogida				
	0h	24h	72h	120h	168h
Medio LS-Avicel sin inocular					
<i>A. alternata</i> PDA1					
<i>A. alternata</i> PDA8					
<i>P. verrucosum</i> JCOS10C					
<i>P. herbarum</i> PDA(3)1		Dudoso			
<i>F. oxysporum</i> PDA(2)2					
<i>P. roseopurpureum</i> PDA(2)10					

La cepa *A. alternata* PDA8 no produjo halo de degradación a ninguno de los tiempos de recogida. La ausencia de actividad endoglucanasa en el ensayo cualitativo, así como de actividad  $\beta$ -glucosidasa y celobiohidrolasa en los ensayos cuantitativos, junto con la reducida actividad FAE de este aislado (de las seis cepas analizadas, *A. alternata* PDA8 fue la quinta en cuanto a actividad FAE) indican su limitado potencial lignocelulolítico para la degradación de la pulpa de remolacha.

El ensayo cualitativo empleando la tinción con rojo Congo constituye una primera aproximación muy útil para la identificación de actividad endoglucanasa. Sin embargo, los resultados positivos han de ser considerados con cautela, puesto que se han identificado casos de falta de especificidad, al aparecer halos de hidrólisis debidos a otras actividades enzimáticas, como agarasa o amilasa (Johnsen y Krause, 2014). En el caso del ensayo llevado a cabo en el presente trabajo, donde la fuente de carbono empleada como sustrato en las fermentaciones es Avicel (un reconocido inductor de celulasas), cabe considerar que los halos de degradación se deben a la acción de enzimas celulolíticas (Rao *et al.*, 1988; Dashtban *et al.*, 2011; Glass *et al.*, 2013). Por otro lado, al tratarse de un ensayo en placa sobre medio sólido con agar, no es posible llevar a cabo la incubación a temperaturas altas, que podrían ser más adecuadas al estar más próximas a los valores óptimos de la mayoría de endoglucanasas fúngicas (Payne *et al.*, 2015). Al realizar los ensayos a una temperatura de incubación de 28 °C, es posible que algunas cepas productoras de endoglucanasas no presenten actividad suficiente como para dar lugar a halo de hidrólisis.

# Capítulo 2

## **3.2. Estudio de la capacidad del aislado ambiental**

*A. alternata* PDA1 para la degradación de la  
biomasa vegetal





### 3.2.1. Introducción y objetivos del capítulo

Los ensayos descritos en el capítulo 1 de Resultados y Discusión permitieron identificar una nueva cepa fúngica, *A. alternata* PDA1, con un interesante potencial lignocelulolítico.

*A. alternata* PDA1 (filo Ascomycota, orden Pleosporales) pertenece a un género que engloba microorganismos saprófitos, endófitos y patógenos de plantas (Woudenberg *et al.*, 2013). *Alternaria* spp. puede afectar a un amplio número de especies vegetales, previa o posteriormente a la cosecha, incluyendo crucíferas de hoja verde, tomates, pimientos, cucurbitáceas y cereales (sorgo, trigo, etc.). Además, es capaz de producir micotoxinas citotóxicas y ocasionar enfermedades en pacientes humanos inmunocomprometidos, como micosis cutáneas, onicomycosis, queratomycosis e infecciones de los senos paranasales y las fosas nasales (De Lucca, 2007). Por otra parte, *Alternaria* spp. es uno de los principales hongos alergénicos y está relacionado con la aparición de afecciones respiratorias relativamente frecuentes, por ejemplo asma, rinosinusitis alérgica o neumonía por hipersensibilidad (Kustrzeba-Wójcicka *et al.*, 2014; Skóra *et al.*, 2015; Gabriel *et al.*, 2016).

La aplicabilidad industrial del arsenal de enzimas extracelulares de *A. alternata* PDA1 requiere de una caracterización en profundidad de la actividad FAE, así como de otras actividades lignocelulolíticas. Para ello, en primer lugar, se llevó a cabo un estudio para determinar el tiempo óptimo de recogida del extracto enzimático, para una mayor actividad FAE. Seguidamente, se analizaron los óptimos de actividad FAE (pH y temperatura), así como la estabilidad térmica del extracto enzimático. Se investigó, también, la especificidad frente a los cuatro sustratos sintéticos más habituales (MFA, MCA, MpCA y MSA) y las cinéticas enzimáticas para cada uno.

Los ensayos de actividad FAE se complementaron con estudios adicionales de actividad celulolítica ( $\beta$ -glucosidasa, celobiohidrolasa y endoglucanasa) y hemicelulolítica (en concreto  $\beta$ -xilosidasa y endoxilanasas) de *A. alternata* PDA1, dado que se trata de actividades enzimáticas complementarias a la actividad FAE, encaminadas a la hidrólisis de la pared celular vegetal.

Por otro lado, dada la importancia de *A. alternata* debido a sus implicaciones socioeconómicas (impacto en el sistema sanitario; pérdidas por enfermedades y deterioro de las cosechas, etc.) y la interesante actividad lignocelulolítica determinada en el primer capítulo de Resultados y

Discusión, se decidió llevar a cabo un estudio del secretoma parcial de *A. alternata* PDA1, en condiciones de cultivo sumergido, empleando medio M-SBP.

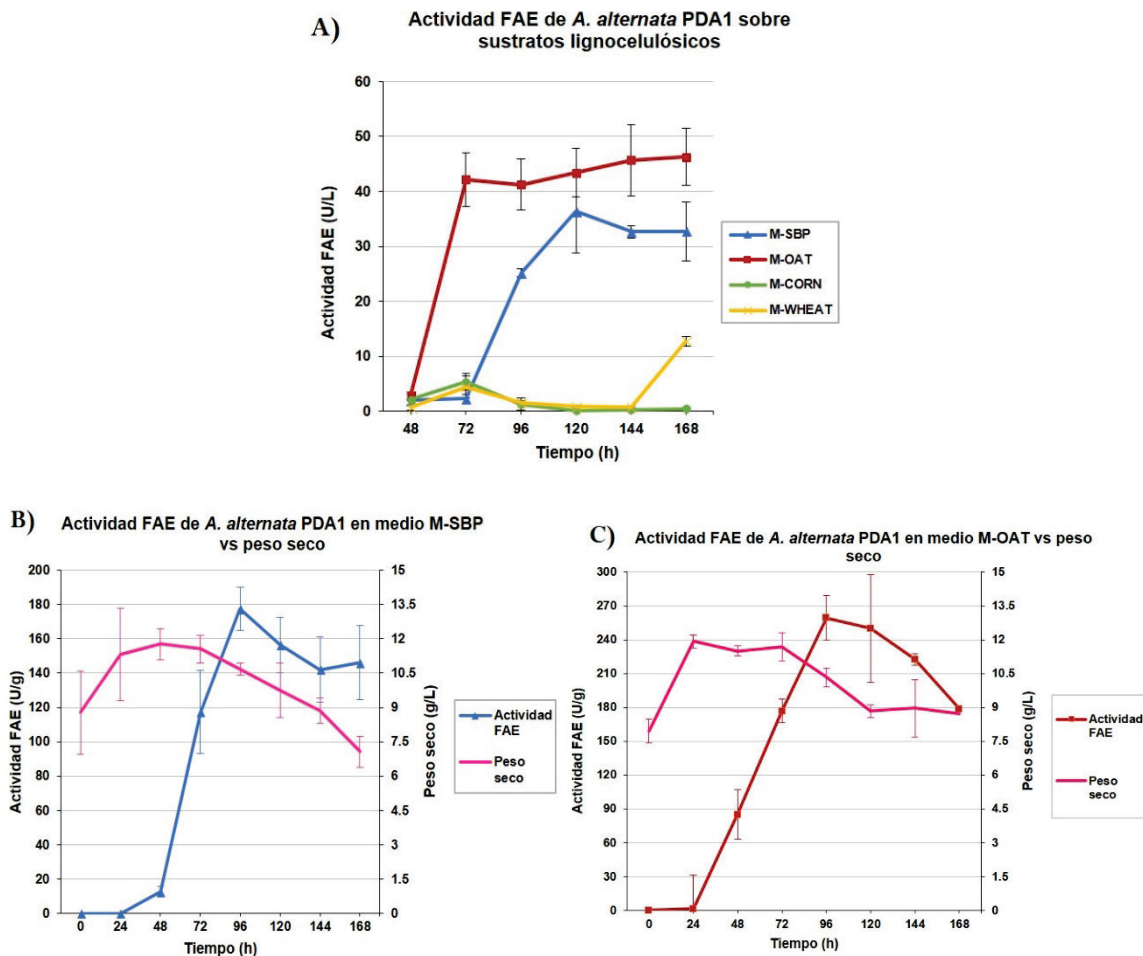
El uso industrial de los extractos enzimáticos de *A. alternata* PDA1 requiere que se conozcan las posibles sustancias perjudiciales producidas por dicha cepa. Para ello, se llevó a cabo un análisis no dirigido de su metaboloma, realizado tras el cultivo de la cepa en las condiciones para producción de FAEs.

Por último, *A. alternata* PDA1 se cultivó en biorreactor de 5 L, controlando las variables de pH, temperatura, aireación y OD, con objeto de analizar un posible escalado de la producción de FAEs a mayores volúmenes.

### **3.2.2. Determinación del tiempo óptimo de recogida**

Es habitual que los preparados comerciales para la hidrólisis de biomasa vegetal estén constituidos por una mezcla de enzimas lignocelulolíticas, en lugar de una única enzima purificada (Fazary y Ju, 2008b; Mäkelä *et al.*, 2014). La presencia de una variedad de enzimas que actúan sinérgicamente facilita los procesos degradativos de la pared celular vegetal (van den Brink y de Vries, 2011). Por ello, y dado que el presente trabajo pretende elucidar el arsenal de enzimas lignocelulolíticas extracelulares de la cepa estudiada, todos los ensayos se llevaron a cabo empleando extractos enzimáticos obtenidos a partir de caldos de fermentación (apartado 2.19), que contienen una mezcla compleja de hidrolasas. Previamente al análisis de las condiciones óptimas de actividad FAE del extracto enzimático de *A. alternata* PDA1, fue necesario determinar el tiempo óptimo de recogida de dicho extracto.

Para ello, en primer lugar, se llevaron a cabo fermentaciones similares a las detalladas en el apartado 3.1.5.2. Sin embargo, en este caso, la medida de actividad FAE en el caldo de fermentación se realizó a 50 °C y no a 37 °C, puesto que pudo comprobarse que a una temperatura mayor aumentaba la actividad FAE y, con ello, se facilitaba la comparación entre condiciones. La actividad se expresó en unidades (U) (1 U = cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol de ácido ferúlico/min, en las condiciones de reacción) por L de caldo de cultivo. Los resultados de actividad FAE en dichas fermentaciones confirmaron que los dos medios de cultivo más efectivos para la inducción de la actividad FAE en esta cepa fúngica fueron M-SBP y M-OAT (Fig. 3.15.A).



**Fig. 3.15. Determinación del tiempo óptimo de recogida de extractos enzimáticos de *A. alternata* PDA1. A)** Actividad FAE (U/L de caldo de fermentación en fermentaciones sobre sustratos naturales lignocelulósicos). **B)** Actividad FAE (U/g de proteína total en el extracto enzimático) y peso seco (g/L caldo de fermentación) en fermentaciones sobre pulpa de remolacha (M-SBP). **C)** Actividad FAE y peso seco en fermentaciones sobre fibra de avena (M-OAT). (Modificado de García-Calvo et al., 2018).

El seguimiento de la actividad FAE empleando muestras de caldo de fermentación constituye una primera aproximación muy útil para obtener información general sobre su evolución. Sin embargo, para determinar con exactitud el momento óptimo de recogida es preferible considerar también datos acerca del crecimiento de la cepa durante la fermentación y de sus niveles de producción de proteínas extracelulares. Esto atiende a la necesidad de evitar los procesos de lisis celular que tienen lugar a medida que avanza la fermentación, debido a dos razones: i) identificar el abanico de proteínas extracelulares producidas por *A. alternata* PDA1 al ser cultivada sobre sustratos lignocelulósicos, para lo cual no es deseable que existan proteínas intracelulares en las muestras y ii) evitar que los procesos de lisis celular puedan dar lugar a la liberación de proteasas intracelulares, capaces de actuar sobre las enzimas lignocelulolíticas presentes en el extracto

enzimático, afectando de forma negativa a su estabilidad y al mantenimiento de su actividad durante el almacenamiento.

Para analizar la evolución del crecimiento fúngico durante la fermentación y la producción de proteínas extracelulares, se prepararon nuevas fermentaciones en 500 mL de medio M-SBP y M-OAT, en matraces lisos de 2 L, por triplicado. A partir de ellos, se realizaron recogidas de 40 mL de caldo de fermentación cada 24 h, desde 0 hasta 168 h. Las muestras de caldo se centrifugaron y prepararon para la recuperación de extractos enzimáticos, de acuerdo al protocolo detallado en el apartado 2.19. El precipitado obtenido tras la filtración y centrifugación, correspondiente a la masa micelial, se sometió durante una semana a 80 °C, para determinar los valores de peso seco y realizar la medida del crecimiento del cultivo (apartado 2.7.3). Los extractos enzimáticos obtenidos a los distintos tiempos de recogida se emplearon en reacciones FAE a 50 °C y pH 5,0, en base al método descrito en el apartado 2.20.1. La cuantificación proteica de cada extracto enzimático fue realizada mediante el método de Bradford (apartado 2.24.2) y la actividad FAE se expresó en U por g de proteína total en el extracto enzimático. Los valores de peso seco (g/L) y la actividad FAE (U/g de proteína total) se representaron gráficamente (Fig. 3.15.B y C). Teniendo en cuenta los valores de peso seco, los cultivos se encontraron en fase de crecimiento exponencial hasta las 24 h, momento tras el cual pasaron a fase estacionaria hasta, aproximadamente, las 72 h.

Además, se realizaron observaciones micro y macroscópicas de la morfología de la cepa. Pudo comprobarse que a partir de las 120 h de fermentación en M-SBP y las 96 h en M-OAT tuvieron lugar fenómenos de lisis celular, identificables al microscopio mediante la presencia de hifas dañadas, más cortas, y el aumento del contenido celular de fondo en las preparaciones microscópicas. A nivel macroscópico se observaron cambios a partir de las 120 h en M-SBP y las 96 h en M-OAT, cuando la masa micelial pasó de presentar un aspecto homogéneo, gomoso y elástico, a tomar una consistencia oscura, disgregada y con aspecto de posos de café (Fig. 3.16).



---

**Fig. 3.16. Aspecto del micelio de *A. alternata* PDA1 tras filtración y centrifugación de las muestras.** Recogida de medio M-SBP a las 120 h de fermentación. De izq. a dcha.: muestra del medio de cultivo M-SBP sin inocular; muestra procedente de cultivo de *A. alternata* PDA1.

Para la determinación del momento óptimo de recogida, se tuvieron en cuenta los valores de peso seco, la actividad FAE en el caldo de fermentación respecto a la cantidad de proteína total en caldo de cultivo y el aspecto macro y microscópico del micelio. La determinación del momento óptimo de recogida no se basó únicamente en los valores de peso seco porque los sustratos lignocelulósicos empleados (fibra de avena y pulpa de remolacha) presentaban partículas insolubles de un tamaño lo suficientemente grande como para ser retenidas junto con el micelio a la hora de su recuperación para ser sometido a secado, lo que pudo dar lugar a variaciones (Fig. 3.16, izquierda) (Holwerda *et al.*, 2013). En este sentido, pese a que en las gráficas que representan el peso seco a lo largo de la fermentación (Fig. 3.15.B y C) puede apreciarse cómo se produce una disminución a partir de las 72 h, dicha disminución pudo deberse a una mayor degradación del sustrato lignocelulósico por parte del hongo, en lugar de a procesos de lisis celular. Recientemente, se ha publicado un estudio que propone un nuevo método de determinación del aumento de la biomasa de *Aspergillus sp.* mediante colorimetría, adecuado para fermentaciones en medios con sustratos insolubles (Abdul Manan y Webb, 2018). La adopción de métodos de determinación del crecimiento fúngico como éste puede constituir una alternativa interesante a la determinación de peso seco.

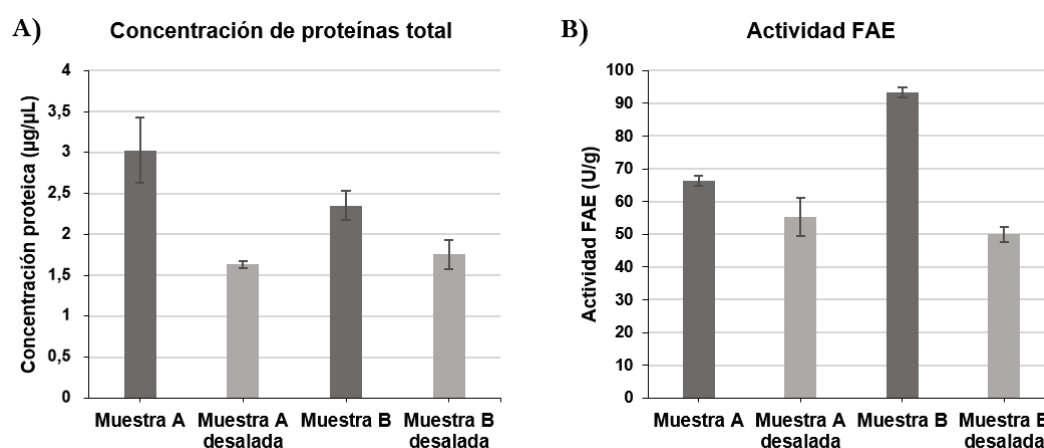
En base a los resultados de actividad FAE respecto a volumen de caldo de fermentación (Fig. 3.15.A), actividad FAE respecto a proteína total en el extracto enzimático y peso seco (Fig. 3.15.B y C), así como la observación micro y macroscópica del micelio (Fig. 3.16), el tiempo óptimo de recogida del extracto enzimático se estableció en **72 h para M-OAT y 96 h para M-SBP**, respectivamente.

### **3.2.3. Estudio de la influencia del desalado de los extractos enzimáticos en la actividad FAE**

El método de obtención de los extractos enzimáticos, basado en la precipitación proteica mediante la adición de sulfato de amonio, dio lugar a la presencia de esta sal en los extractos. La influencia del sulfato de amonio en la actividad FAE se estudió por medio de la comparación de la concentración proteica y actividad FAE de extractos enzimáticos desalados mediante diálisis, y sin desalar. El objetivo de esta comparación fue determinar si era preferible someter a los extractos enzimáticos a desalado, o no, desde el punto de vista de su actividad y estabilidad.

Se recogieron duplicados de extractos enzimáticos de *A. alternata* PDA1 tras 96 h de cultivo en medio M-SBP. La mitad del volumen de los extractos (2,5 mL de extracto enzimático en cada uno de los duplicados) fue sometido a diálisis, empleando columnas Amicon® Ultra-4 10 kDa, a 4 °C, para minimizar los procesos de proteólisis. A los 2,5 mL de muestra de extracto, se añadieron 1,5 mL de tampón ácido acético/acetato sódico 0,02 N pH 5,0. Tras mezclar mediante pipeteo, se centrifugaron los tubos con las membranas a 3.373 x *g*, hasta que el volumen descendió a 2 mL. El proceso se repitió, eliminando el filtrado y añadiendo nuevos volúmenes de tampón acetato sobre la muestra, hasta un total de 15 mL de tampón (6 veces el volumen de partida). Tras su desalado, se recuperaron los 2,5 mL de muestra, su contenido en proteínas se cuantificó mediante el método de Bradford (apartado 2.24.2) y se determinó la actividad FAE a 37 °C y pH 5,0 (apartado 2.20.1). La actividad FAE se expresó respecto a la cantidad de proteínas (U/g de proteína total en el extracto enzimático). Estos ensayos se llevaron a cabo, igualmente, con la muestra de extracto enzimático que no fue sometida a desalado. Tanto las determinaciones mediante el método de Bradford, como los ensayos de actividad FAE, se realizaron por duplicado.

El proceso de desalado dio lugar a un descenso tanto de la concentración proteica, del 25-46 % (Fig. 3.17.A) como de la actividad FAE, que se estimó en un 16-46 % (Fig. 3.17.B). Además, produjo la formación de agregados proteicos insolubles, por lo que en subsiguientes ensayos se emplearon extractos enzimáticos de *A. alternata* PDA1 sin desalar.



**Fig. 3.17. Estudio de la influencia del desalado en la actividad FAE y concentración proteica de los extractos enzimáticos.** La concentración proteica y la actividad FAE se analizaron empleando 3 réplicas técnicas, a partir de muestras de extracto enzimático correspondientes a 2 réplicas biológicas (muestras A y B). **A)** Concentración proteica en los extractos enzimáticos sometidos, o no, a diálisis. **B)** Actividad FAE de los extractos enzimáticos sometidos, o no, a diálisis, a 37 °C y pH 5,0. U: la cantidad de enzima requerida para liberar 1 µmol de ácido ferúlico/min, en las condiciones de reacción.

La precipitación de proteínas con sulfato de amonio presenta varias cualidades: i) se trata de una sal relativamente asequible, disponible en forma pura, efectivo para llevar a cabo la precipitación y con una solubilidad mucho mayor que cualquier otra de las sales de fosfato; ii) el sulfato de amonio estabiliza la estructura de las proteínas y su plegamiento, lo que puede repercutir de forma positiva en el mantenimiento de la actividad enzimática tras la precipitación (Burgess, 2009; Duong-Ly y Gabelli, 2014) y iii) el sulfato de amonio es habitualmente empleado en soluciones de proteínas, puesto que también inhibe el crecimiento de bacterias y actividades proteolíticas contaminantes (Wingfield, 1998).

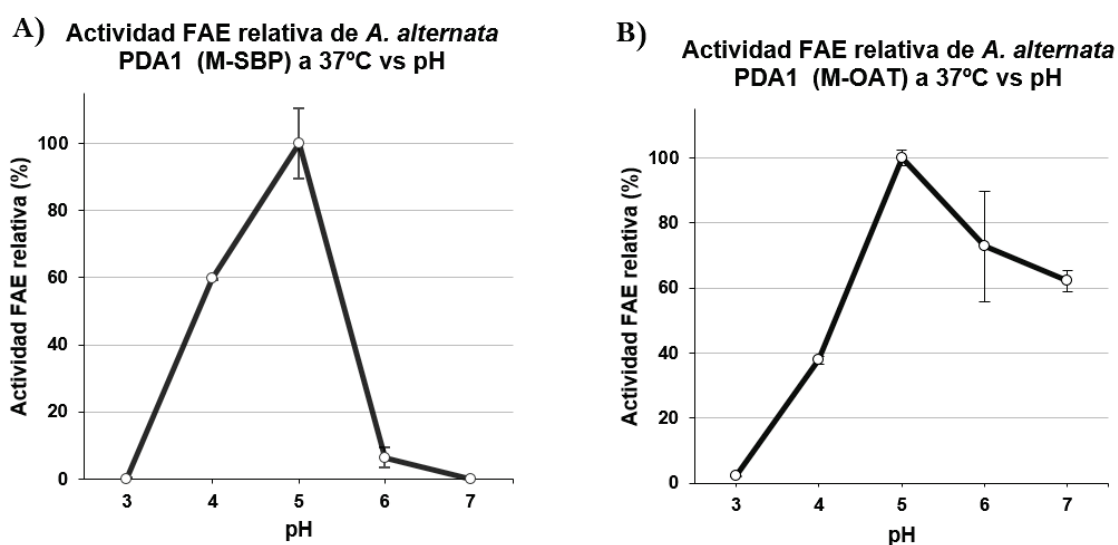
### **3.2.4. Caracterización de la actividad FAE del extracto enzimático**

La valoración de las posibles aplicaciones del extracto enzimático de *A. alternata* PDA1 desde el punto de vista de su actividad FAE, requiere de la caracterización de la misma. Con este objetivo, se realizaron ensayos para la determinación de su pH y temperatura óptimos, de acuerdo a modificaciones del método descrito en el apartado 2.20.1 (García-Calvo *et al.*, 2018). En todos los casos, las reacciones se llevaron a cabo, como mínimo, por triplicado. Además, se incluyeron controles negativos, sustituyendo el extracto enzimático por tampón de resuspensión (tampón acetato 0,02 N pH 5,0) y extractos procedentes del medio de cultivo sin inocular.

#### *3.2.4.1. Determinación del pH óptimo*

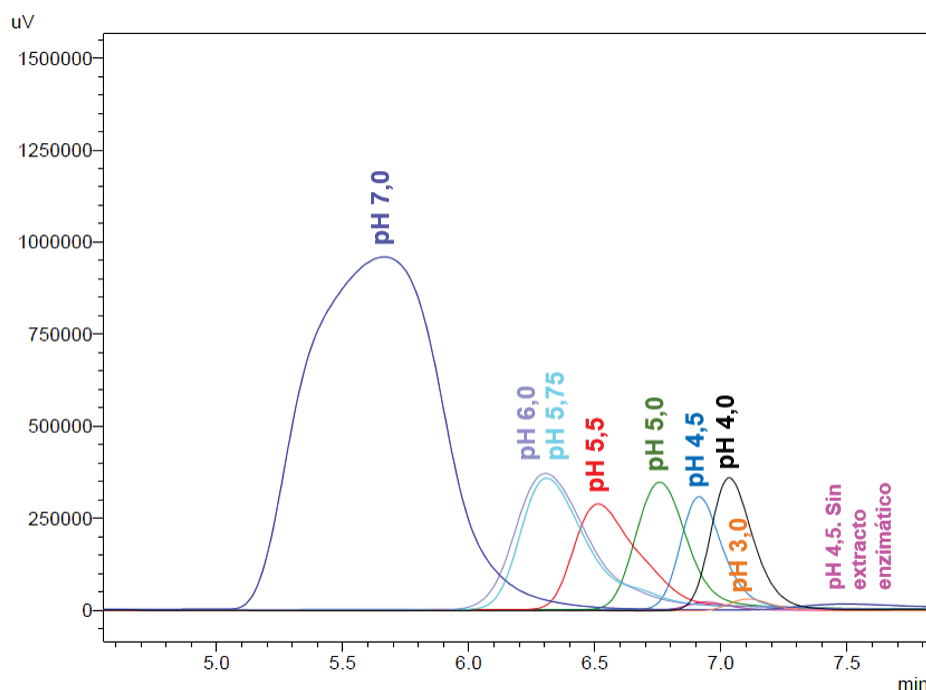
Para la determinación del pH óptimo, se analizó la actividad FAE sobre el sustrato sintético MFA 0,05 % (p/v) (apartado 2.20.1), empleando extractos enzimáticos obtenidos a partir de fermentaciones en medio M-SBP y M-OAT, recogidos a tiempo óptimo (72 h para M-OAT y 96 h para M-SBP). Se realizaron reacciones a 37 °C, modificando el pH del tampón de disolución de MFA para alcanzar valores comprendidos entre pH 3,0 y 7,0. Se comprobó que la adición de los extractos enzimáticos, a pesar de contener sulfato de amonio, que puede acidificar el medio (Wingfield, 1998), no alteró el pH de la reacción.

La actividad FAE se representó gráficamente de forma relativa, asignando al valor máximo de actividad el porcentaje del 100 % y calculando en función de ello los porcentajes relativos del resto de valores (Fig. 3.18).



**Fig. 3.18.** Efecto del pH sobre la actividad FAE de extractos enzimáticos de *A. alternata* PDA1. **A)** Valores relativos de actividad FAE del extracto recuperado de medio M-SBP (Modificado de García-Calvo et al., 2018). **B)** Valores relativos de actividad FAE del extracto recuperado de medio M-OAT.

El extracto enzimático obtenido a partir de medio M-SBP fue activo a un rango más restringido de pH (pH 4,0 a pH 6,0), con respecto al extracto obtenido a partir de M-OAT, cuyo rango de actividad fue más amplio hacia valores de pH más alcalinos (pH 4,0 a 7,0). En ambos casos, el óptimo de actividad FAE se encontró a pH 5,0.

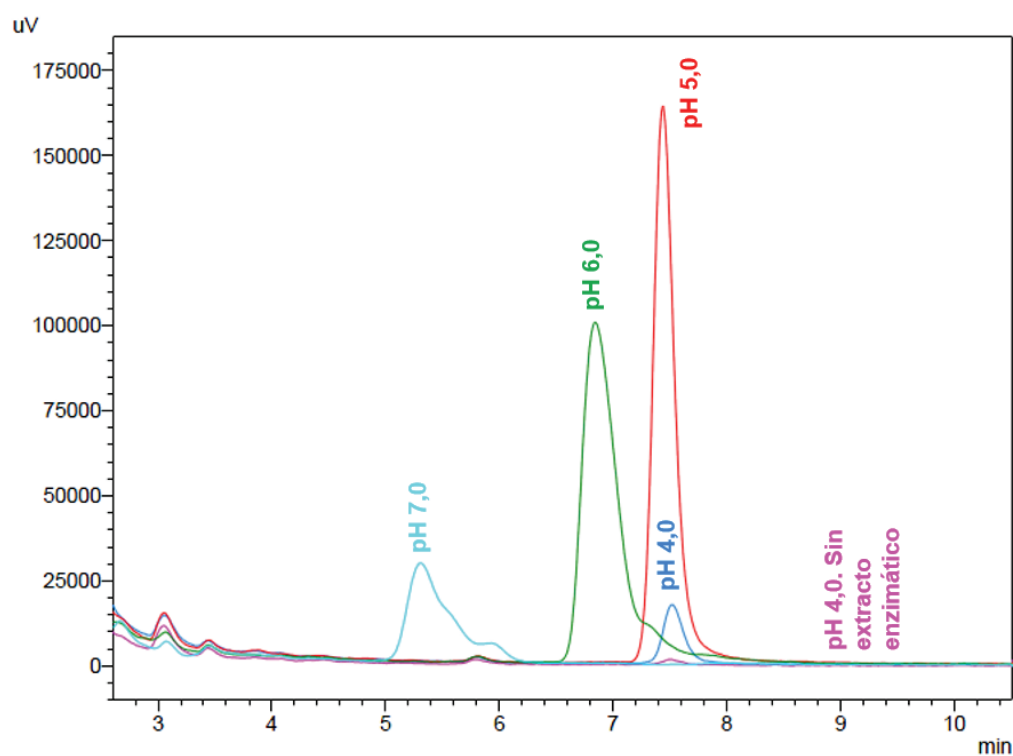


**Fig. 3.19.** Comparación de cromatogramas de HPLC a diferentes valores de pH, tras reacciones sobre el sustrato sintético MFA. (Modificado de García-Calvo et al., 2018).



Pudo observarse que en las reacciones FAE con ambos extractos enzimáticos, por encima de pH 5,0, aparecieron picos cromatográficos cuyo tiempo de retención no correspondía con el ácido ferúlico, cada vez más adelantados, a medida que aumentaba el pH. Hasta pH 5,0, el espectro de absorción UV de dichos picos correspondía con el del ácido ferúlico, sin embargo, a valores de pH más básicos los espectros diferían. Estos picos adelantados pueden deberse a la degradación del MFA y ácido ferúlico hacia otros compuestos (Fig. 3.19). Este hallazgo apuntó al pH 5,0 como óptimo, siendo recomendable evitar valores de pH superiores en las siguientes reacciones.

La capacidad de los extractos enzimáticos para degradar el ácido ferúlico y el MFA por encima de pH 5,0 se analizó también mediante reacciones sobre el sustrato natural pulpa de remolacha (apartado 2.20.2). Dichas reacciones se llevaron a cabo sobre un 2 % (p/v) de pulpa de remolacha en tampón acetato 0,1 N, a valores de pH entre 4,0 y 7,0, durante 24 h, a 50 °C y con una agitación de 125 rpm. Los cromatogramas obtenidos evidenciaron que, también frente al sustrato natural, aparecían picos adelantados cuyo espectro de absorción UV y tiempo de retención no coincidía con el del ácido ferúlico (Fig. 3.20).



**Fig. 3.20.** Comparación de cromatogramas de HPLC a diferentes valores de pH, tras reacciones sobre el sustrato natural pulpa de remolacha molida. (Modificado de García-Calvo et al., 2018).

A la vista de estos resultados, se concluyó que **el valor óptimo de pH fue 5,0**. En las últimas décadas, se han purificado y caracterizado varias FAEs fúngicas. En general, sus valores óptimos de pH oscilan entre 3,0 y 10,0, si bien la mayoría son activas entre pH 4,0 y 7,0 (Fazary y Ju, 2007; Topakas *et al.*, 2007; Dilokpimol *et al.*, 2016). Este rango se asemeja a los observados en el presente trabajo. En trabajos previos, se han descrito otras FAEs de ascomicetos con pH óptimo 5,0, procedentes de cepas de *A. awamori* (Koseki *et al.*, 2005), *A. terreus* (Kumar *et al.*, 2013), *A. niger*, *A. tubingensis* (de Vries *et al.*, 1997) y *A. oryzae* (Zeng *et al.*, 2014).

En cuanto a FAEs de especies más próximas filogenéticamente a la cepa objeto de estudio, como *Ulocladium* spp. o *Pleospora* spp., el número de investigaciones publicadas es muy reducido. Una FAE purificada y caracterizada a partir de una cepa de *A. tenuissima* presentó un óptimo de pH comprendido entre 6,0 y 7,0 (Chi *et al.*, 2017), mientras que el extracto enzimático producido por una cepa de *A. alternata* demostró valores óptimos de actividad entre pH 5,5 y 6,0 (Xiao *et al.*, 2012). El valor de pH óptimo de la actividad FAE de *A. alternata* PDA1, más ácido, puede determinar que el extracto enzimático analizado en el presente trabajo presente aplicaciones en procesos industriales que tienen lugar tras pretratamientos de hidrólisis ácida.

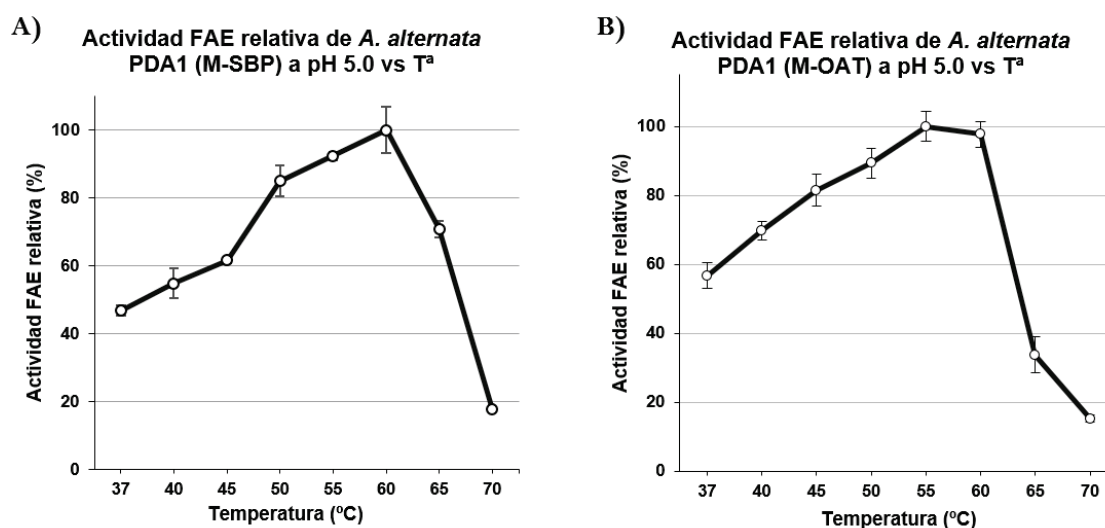
Por otra parte, los picos cromatográficos detectados a valores de pH por encima de 5,0 pudieron ser consecuencia de otras actividades enzimáticas del extracto, al incluir este una mezcla de diversas enzimas hidrolíticas extracelulares. Este fenómeno pudo deberse, también, a la hidrólisis alcalina del sustrato a medida que aumentó el pH de la reacción (Aarabi *et al.*, 2016).

#### *3.2.4.2. Determinación de la temperatura óptima y estudio de la estabilidad térmica*

Una vez determinado el valor óptimo de pH, se procedió a estudiar el óptimo de temperatura de la actividad FAE de *A. alternata* PDA1.

Con este objetivo, se determinó la actividad FAE utilizando el sustrato sintético MFA, según una modificación del protocolo detallado en el apartado 2.20.1. Las reacciones se llevaron con MFA al 0,05 % (p/v) en tampón acetato 0,1 N pH 5,0, en un rango de temperaturas comprendido entre 37 y 70 °C. La actividad se expresó en U/g de proteína total procedente del extracto enzimático. Los valores de actividad FAE (U/g de proteína total) se refirieron a porcentajes relativos de actividad con respecto al máximo alcanzado (100 %) (Fig. 3.21).

Tanto el extracto enzimático obtenido a partir de cultivos en medio con pulpa de remolacha como el de fibra de avena de molienda presentaron un comportamiento similar. En ambos casos, la actividad FAE fue aumentando paulatinamente con la temperatura, en el rango entre los 37 °C y los 60 °C. Los extractos enzimáticos presentaron óptimos de actividad FAE a una temperatura comprendida entre 50 y 60 °C. Por encima de estas temperaturas, la actividad disminuyó rápidamente, hasta valores por debajo de un 20 % del máximo de actividad, a 70 °C.

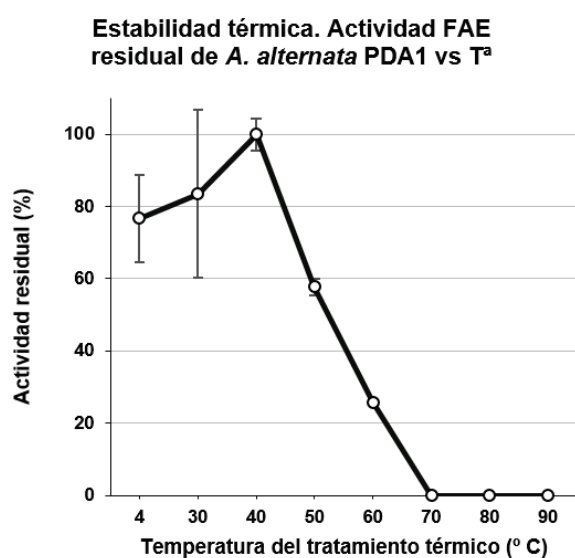


**Fig. 3.21. Efecto de la temperatura sobre la actividad FAE de extractos enzimáticos de *A. alternata* PDA1. A)** Valores relativos de actividad FAE del extracto recuperado de medio M-SBP (Modificado de García-Calvo et al., 2018). **B)** Valores relativos de actividad FAE del extracto recuperado de medio M-OAT.

Los óptimos de temperatura recogidos en la literatura para otras FAEs se encuentran entre 20 y 75 °C, siendo en la mayor parte de los casos menores de 50 °C (Topakas *et al.*, 2007; Koseki *et al.*, 2009a; Dilokpimol *et al.*, 2016). Las FAEs previamente mencionadas, caracterizadas por Chi y colaboradores y Xiao y colaboradores, a partir de cepas de *A. alternata* y *A. tenuissima*, mostraron óptimos de temperatura a 55 °C y 45-50 °C, respectivamente (Xiao *et al.*, 2012; Chi *et al.*, 2017). El comportamiento de la actividad FAE del extracto enzimático de *A. alternata* PDA1 en función de la temperatura, se asemeja al definido para la cepa de *A. alternata* estudiada por Xiao y colaboradores. En este caso, también se produjo un incremento gradual de la actividad entre 30 y 55 °C, descendiendo a temperaturas superiores (Xiao *et al.*, 2012). La principal diferencia entre el perfil de actividad FAE frente a temperatura de *A. alternata* PDA1 y de las dos cepas anteriores es que el descenso de la actividad por encima de los valores óptimos de temperatura es mucho

más brusco en el caso de *A. alternata* PDA1. Este hecho puede estar relacionado con una limitada estabilidad térmica, por lo que se procedió a su análisis.

Para la determinación de la termoestabilidad de las FAEs del extracto enzimático de *A. alternata* PDA1 se llevó a cabo un tratamiento térmico de los extractos enzimáticos, sometiéndolos a temperaturas entre 30 y 90 °C durante 1 h, antes de medir su actividad en las condiciones anteriormente descritas (apartado 2.20.1). La representación de la actividad residual FAE tras el tratamiento térmico (%) frente a la temperatura, permitió observar la influencia de dicho tratamiento de los extractos enzimáticos (Fig. 3.22).



**Fig. 3.22. Estabilidad térmica de los extractos enzimáticos de *A. alternata* PDA1 procedente de M-SBP.** Valores de actividad FAE residual, tras una incubación durante 1 h a la temperatura indicada y subsiguiente reacción FAE a pH 5,0 y 50 °C. (Modificado de García-Calvo et al., 2018).

Según se aprecia en la Fig. 3.22, pareció existir un efecto de activación enzimática a medida que la temperatura se fue incrementando hasta 40 °C, aunque la desviación estándar en ese rango hace difícil realizar una afirmación categórica al respecto. Por otro lado, las temperaturas superiores a 40 °C afectaron negativamente a la actividad FAE. Por encima de 50 °C, los valores de actividad descendieron a menos de la mitad del máximo, desapareciendo por completo a temperaturas superiores a 70 °C, lo que fue compatible con la inactivación térmica de las enzimas.

Uno de los rasgos más interesantes de cara a la utilización de enzimas en aplicaciones industriales es la estabilidad térmica, estabilidad frente a cambios en el pH y resistencia ante distintas sustancias químicas (Yeoman *et al.*, 2010). Sin embargo, la presencia de una estabilidad térmica limitada y la disminución de la actividad a temperaturas elevadas es un rasgo común a diversas FAEs descritas (Koseki *et al.*, 2009a; Dilokpimol *et al.*, 2016). La FAE Est1 de *P. sapidus*,

cuyo óptimo de actividad se encontró a 50 °C, presentó cierta estabilidad térmica entre 20 y 40 °C, disminuyendo la actividad en más del 50 % por encima de dicha temperatura (Kelle *et al.*, 2016). Un comportamiento similar se observó en una FAE halotolerante tipo A de *Pleurotus eryngii*, cuyo óptimo de temperatura se encontró a 50 °C. El tratamiento térmico de dicha enzima durante 1 h a 50 °C provocó un descenso en la actividad FAE del 50 %, mientras que el tratamiento a 40 °C permitió el mantenimiento del 90 % de la actividad inicial (Nieter *et al.*, 2014). La AnFaeA recombinante de *A. niger*, expresada en *Komagataella* sp., presentó un óptimo de temperatura a 50 °C y una termoestabilidad muy limitada, manteniéndose únicamente un 15 % de la actividad máxima tras un tratamiento de 10 min a 55 °C (Zhou *et al.*, 2015).

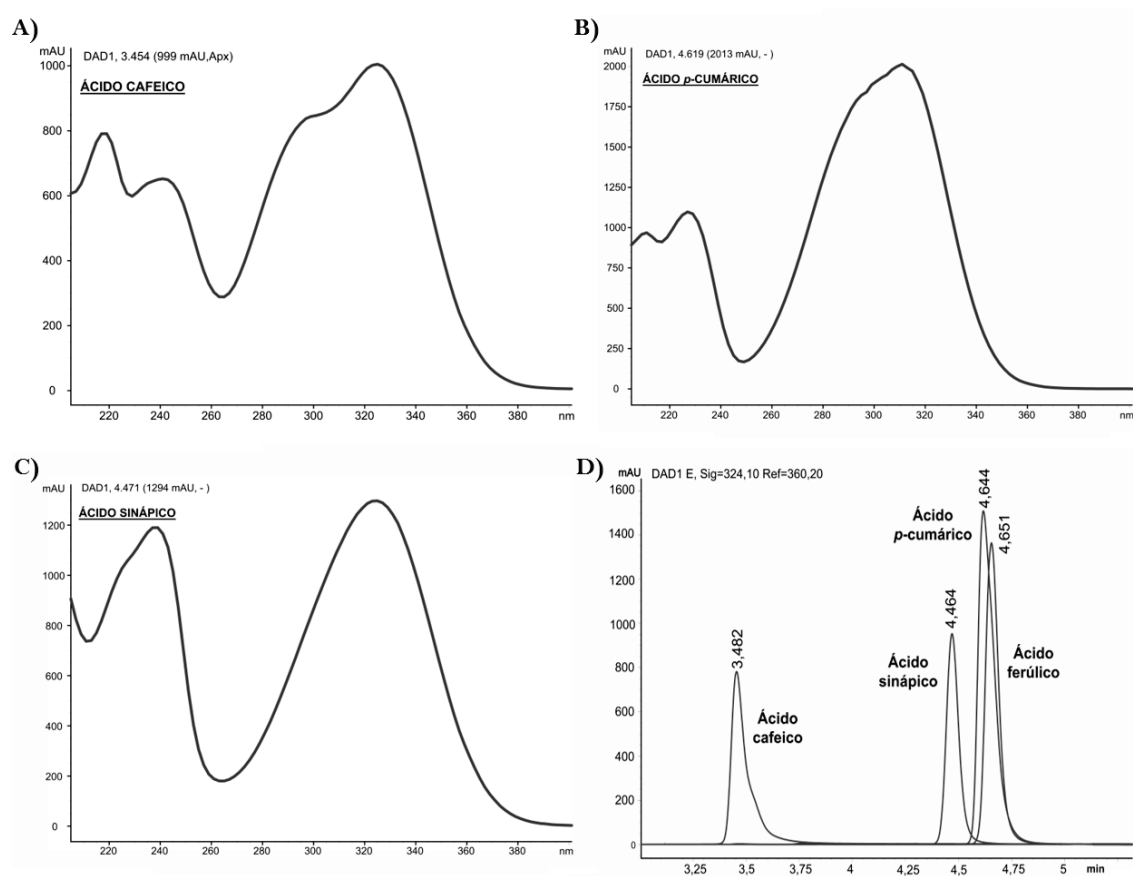
La reducida estabilidad térmica de las FAEs y otras enzimas lignocelulolíticas es uno de los retos a solucionar de cara al desarrollo de sistemas enzimáticos con aplicabilidad industrial (Yeoman *et al.*, 2010). En este sentido, se están llevando a cabo investigaciones para comprender los factores determinantes de la estabilidad térmica (Benoit *et al.*, 2006a; Koseki *et al.*, 2006; Yin *et al.*, 2015a). Asimismo, están aplicándose técnicas de ingeniería genética y evolución enzimática para aumentar la estabilidad. Este es el caso de la mejora de la termoestabilidad de AuFaeA de *A. usamii*, mediante mutagénesis por saturación iterativa (Yin *et al.*, 2015b). La FAE EstF27, que forma parte de una librería metagenómica procedente de muestras de suelos próximos a una falla geológica en China, fue sometida a evolución dirigida para mejorar considerablemente su estabilidad térmica (Sang *et al.*, 2011; Cao *et al.*, 2015). Además, se han llevado a cabo cuatro sustituciones aminoácidas, siendo dos efectivas (Zhang y Wu, 2011), y, posteriormente, otras doce que han permitido aumentar la termoestabilidad de AnFaeA de *A. niger*, consiguiendo un mutante que mantuvo un 80 % de actividad residual tras un tratamiento de 15 min a 90 °C (Zhang *et al.*, 2012a). Además de la mejora de la estabilidad térmica de FAEs conocidas, se está llevando a cabo la búsqueda de nuevas FAEs fúngicas termoestables, mediante técnicas de bioprospección y análisis de nuevos microorganismos (Ghatora *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2014a).

A la vista de los valores de actividad FAE a diferentes temperaturas, así como de la limitada termoestabilidad de los extractos enzimáticos, el resto de los ensayos enzimáticos recogidos en el presente capítulo se llevaron a cabo a una temperatura de 50 °C. Esta temperatura está próxima al mayor valor de actividad FAE (55-60 °C) y, al mismo tiempo, se evita el empleo de temperaturas más altas, a las que la estabilidad del extracto se ve comprometida.

Por otra parte, dado que los valores óptimos de pH y temperatura de los extractos obtenidos a partir de medio M-SBP y M-OAT fueron similares, el resto de ensayos se llevaron a cabo únicamente con extractos enzimáticos recuperados de fermentaciones en M-SBP. La selección de la pulpa de remolacha frente a la fibra de avena de molienda responde a las razones previamente mencionadas: i) se trata de un subproducto agroindustrial que es interesante explotar desde el punto de vista de la economía circular, ii) es muy abundante en Castilla y León y iii) a diferencia de la fibra de avena, no constituye un producto con aplicación directa en alimentación humana.

### 3.2.4.3. Especificidad de sustrato

Además de caracterizar los óptimos de actividad FAE del extracto enzimático frente a MFA, se llevaron a cabo reacciones frente a otros tres sustratos sintéticos: MCA, MpCA y MSA.



**Fig. 3.23.** Espectros de absorción UV de AHC y análisis comparativo de sus cromatogramas a 324 nm (equipo Agilent). **A)** Espectro de absorción UV del ácido cafeico. **B)** Espectro de absorción UV del ácido p-cumárico. **C)** Espectro de absorción UV del ácido sinápico. **D)** Análisis comparativo de los picos cromatográficos para cada AHC, a 324 nm.

Para el análisis de la especificidad de sustrato, se llevaron a cabo ensayos de actividad FAE frente a los cuatro sustratos sintéticos mencionados, a pH 5,0 y 50 °C, por triplicado e incluyendo controles negativos con extractos obtenidos a partir del medio de cultivo sin inocular. Las reacciones se prepararon de acuerdo al método descrito en el apartado 2.20.1, analizando la liberación de producto (ácido ferúlico para MFA, ácido cafeico para MCA, ácido *p*-cumárico para MpCA y ácido sinápico para MSA), mediante HPLC. El protocolo de HPLC empleado se corresponde con el descrito en el apartado 3.1.5.1 del primer capítulo de Resultados y Discusión. Se analizaron los espectros de absorción UV y el tiempo de retención de cada uno de los sustratos y productos, para la identificación de estos últimos (Fig. 3.23). La cuantificación de los productos de reacción (ácidos ferúlico, cafeico, *p*-cumárico y sinápico) se llevó a cabo por medio de rectas de calibrado, preparadas por triplicado [apartado 3.1.5.1 (ácido ferúlico) y Tabla 3.7].

**Tabla 3.7. Información relativa a las rectas patrón utilizadas para la cuantificación**, empleando la columna *Mediterranea*<sup>TM</sup> Sea 18 3 μm y la columna *Kinetex*<sup>®</sup> 2,6 μm EVO C18 100 Å (equipo Agilent).

ÁCIDO CAFEICO	Ecuación de la recta de calibrado	<i>Mediterranea</i> : $y=111444416.10^5x-5,341915$
		<i>Kinetex</i> : $y=4,39371537.10^3x-1,977585.10$
	R <sup>2</sup>	<i>Mediterranea</i> : 0,9998. <i>Kinetex</i> : 0,9995
	Duración del método	27 min
	Tiempo de retención	<i>Mediterranea</i> : 6,20 min
<i>Kinetex</i> : 3,46 min		
ÁCIDO <i>p</i> -CUMÁRICO	Ecuación de la recta de calibrado	<i>Mediterranea</i> : $y=1,41908491.10^5+3,4463693.10^2$
		<i>Kinetex</i> : $y=8,23008221.10^3+2,21788.10$
	R <sup>2</sup>	<i>Mediterranea</i> : 0,9992. <i>Kinetex</i> : 0,9999
	Duración del método	27 min
	Tiempo de retención	<i>Mediterranea</i> : 7,56 min
<i>Kinetex</i> : 4,62 min		
ÁCIDO SINÁPICO	Ecuación de la recta de calibrado	<i>Mediterranea</i> : $y=9,02401173.10^4x+2,3265077.10^2$
		<i>Kinetex</i> : no aplicable
	R <sup>2</sup>	0,9989
	Duración del método	27 min
	Tiempo de retención	<i>Mediterranea</i> : 8,11 min
<i>Kinetex</i> : 4,46 min		

Del mismo modo que para el resto de ensayos cuantitativos de actividad FAE indicados, la actividad se expresó en U/g de proteína total en el extracto enzimático. El extracto enzimático demostró tener una mayor actividad específica frente al sustrato MpCA, seguido por MCA y MFA. La actividad específica frente a MSA fue considerablemente más baja (Tabla 3.8).

**Tabla 3.8. Actividad específica y parámetros cinéticos del extracto enzimático de *A. alternata* PDA1 recuperado de medio M-SBP.** Reacciones a 50 °C y pH 5,0. Se indican los valores medios y la desviación estándar para MFA, MCA, MpCA y MSA. (Modificado de García-Calvo et al., 2018)

Sustrato	Actividad FAE específica (U/ g proteína total en el extracto)	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (µmoles/min.g proteína total en el extracto)
MFA	88,93 ± 0,67	0,43 ± 0,05	104,01 ± 2,38
MCA	96,29 ± 3,54	0,36 ± 0,05	155,04 ± 4,32
MpCA	168,53 ± 1,60	0,47 ± 0,05	218,01 ± 5,28
MSA	7,60 ± 0,32	N/A <sup>a</sup>	N/A

<sup>a</sup>N/A: no aplicable

La especificidad de sustrato frente a estos cuatro compuestos ha sido uno de los criterios tradicionalmente empleados para situar las FAEs en una de las cuatro categorías (A, B, C y D) de la clasificación clásica propuesta por Crepin y colaboradores (Crepin *et al.*, 2004a). El patrón de especificidad del extracto enzimático de *A. alternata* PDA1 se corresponde con aquellas FAEs tradicionalmente clasificadas dentro de la categoría B. Las FAEs de tipo B se caracterizan por actuar preferentemente sobre la fracción fenólica de los sustratos que presentan uno (*p*-cumárico) o dos (cafeico) sustituyentes hidroxilo. Sin embargo, las tasas de hidrólisis se ven reducidas al actuar frente a sustratos que contienen grupos metoxilo, como el MFA, y no presentan actividad frente a MSA (Crepin *et al.*, 2004a; Gopalan *et al.*, 2015; Dilokpimol *et al.*, 2016). Estas características concuerdan con las observadas en el presente trabajo. La expresión de FAEs de tipo B se ve inducida principalmente al cultivar los microorganismos productores sobre pulpa de remolacha, que es el sustrato inductor empleado en este caso (Fazary y Ju, 2007).

Xiao y colaboradores determinaron las actividades FAE específicas a partir de muestras de una cepa de *A. alternata* cultivada sobre salvado de trigo y triticale, encontrando valores 5 veces, 2,8 veces y 7,3 veces mayores que el extracto objeto de estudio en el presente trabajo, para MFA, MpCA y MCA, respectivamente (Xiao *et al.*, 2012). La menor actividad específica del extracto enzimático de *A. alternata* PDA1 puede deberse a una menor concentración relativa de FAEs respecto al contenido de proteína total.



#### 3.2.4.4. Cinética enzimática

Los parámetros cinéticos (constante de Michaelis-Menten,  $K_m$ , y velocidad máxima  $V_{max}$ ) de la actividad FAE del extracto enzimático se determinaron a pH 5,0 y 50 °C, empleando concentraciones variables de los sustratos sintéticos, en un rango comprendido entre 0 y 5 mM. Dado que los valores de actividad específica FAE frente a MSA fueron residuales, no se determinaron los parámetros cinéticos para este compuesto.

La representación gráfica de los valores de velocidad inicial frente a la concentración de sustrato se realizó mediante un ajuste no lineal por el método de mínimos cuadrados, utilizando el paquete informático estadístico *SigmaPlot*® 12 y el complemento “*Solver*” de Microsoft Excel (Kemmer y Keller, 2010). En los tres sustratos sintéticos analizados, los valores se ajustaron a cinéticas de Michaelis-Menten (Fig. 3.24). Como se recoge en la Tabla 3.8, el extracto enzimático presentó mayor afinidad por el sustrato MCA, seguido por MFA y MpCA.

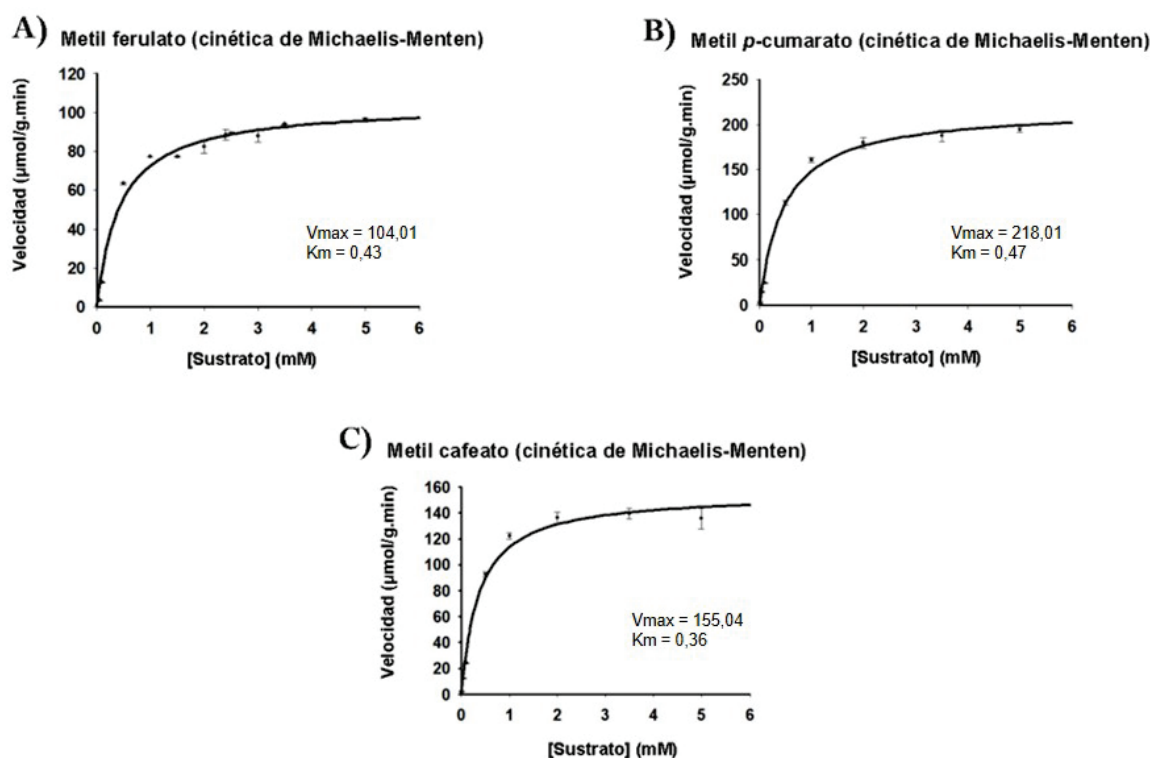


Fig. 3.24. Cinéticas de Michaelis-Menten, representadas mediante *SigmaPlot*® 12, a pH 5,0 y 50 °C. A) Cinética para MFA. B) Cinética para MpCA. C) Cinética para MCA. (Modificado de García-Calvo et al., 2018).

En general, los valores de  $V_{max}$  del extracto enzimático de *A. alternata* PDA1 fueron considerablemente menores que los indicados en estudios previos sobre otras FAEs. Mientras que en el presente trabajo la  $V_{max}$  osciló entre 100 y 220  $\mu\text{moles}/\text{min}\cdot\text{g}$  proteína total, para los tres sustratos sintéticos analizados, se han publicado estudios de cinética enzimática de FAEs con  $V_{max}$  hasta 100 veces mayores (Wong, 2006). Este fue el caso de una FAE de tipo B de *N. crassa*, con alta  $V_{max}$  para MpCA (Crepin *et al.*, 2003a) y una FAE de *P. expansum*, para MFA y MpCA (Donaghy y McKay, 1997).

En lo que respecta a la constante de afinidad, se han hallado en la literatura FAEs con afinidad variable. Los valores de  $K_m$  para MFA, MCA y MpCA del extracto enzimático objeto de estudio fueron inferiores que los de la FAE-II de *F. oxysporum*, por lo que su afinidad hacia esos sustratos fue mayor (Topakas *et al.*, 2003a). Una FAE de *P. expansum* presentó valores de  $K_m$  5 veces mayores que el extracto de *A. alternata* PDA1 (Donaghy y McKay, 1997). Finalmente, la FAE recombinante Fae-1 de *N. crassa* mostró valores de  $K_m$  para MFA de alrededor de la mitad que el extracto analizado en el presente trabajo y 20 veces menor para MCA y MpCA, lo que indica una muy alta afinidad de la Fae-1 hacia estos dos sustratos (Crepin *et al.*, 2003a). Los valores de  $K_m$  del extracto enzimático de *A. alternata* PDA1, superiores a los de otras FAEs de tipo B descritas en la literatura, denotan una menor afinidad frente a MFA, MpCA y MCA. Este hecho puede deberse a una baja representación de FAEs dentro del total de proteínas del extracto enzimático.

#### *3.2.4.5. Actividad FAE frente a sustratos vegetales naturales*

Los ensayos detallados previamente, llevados a cabo sobre sustratos sintéticos, presentan mucha utilidad desde el punto de vista de la caracterización de la actividad FAE. Sin embargo, el objetivo industrial de un cóctel enzimático de estas características es actuar frente a sustratos lignocelulósicos naturales y sus derivados (Escamilla-Alvarado *et al.*, 2017; Tousehik *et al.*, 2017). La respuesta de un cóctel enzimático ante un sustrato sintético puede no ser igual a la presentada frente a un sustrato natural, debido a su diferente composición química. Pese a que los sustratos sintéticos poseen los residuos fenólicos apropiados, carecen de un sustituyente alcohólico que se asemeje a los que se encuentran en las plantas (habitualmente, L-arabinosa). Por esta razón, los sustratos sintéticos presentan una accesibilidad para la enzima y un tipo de enlace éster diferente, que no permiten inferir la actividad FAE de una muestra frente a un sustrato natural (Ramírez-

Velasco *et al.*, 2016). Por otra parte, la heterogeneidad de los sustratos naturales determina que los resultados de actividad FAE frente a uno de ellos no sean extrapolables directamente a otros. Así, es necesario analizar la actividad FAE frente al sustrato natural concreto de interés.

Los sustratos naturales utilizados en este ensayo fueron la pulpa de remolacha molida y la fibra de avena de molienda en polvo, previamente descritos (apartado 2.1.1). La composición química de la pulpa de remolacha determina que, además de ser un buen inductor de FAEs (Bonnin *et al.*, 2002; Gopalan *et al.*, 2015), sea un sustrato adecuado para la extracción de ácido ferúlico, ya que su contenido en este AHC es relativamente elevado [0,5-1 % (p/p)] (Micard *et al.*, 1996; Saulnier y Thibault, 1999; Benoit *et al.*, 2006b). Por su parte, la fibra de avena de molienda también constituye un sustrato adecuado para la extracción de ácido ferúlico, puesto que contiene alrededor de un 0,21-0,38 % (p/p) de ácido ferúlico (Yu *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2003).

Para analizar la capacidad del extracto enzimático de *A. alternata* PDA1 para liberar ácido ferúlico a partir de pulpa de remolacha y fibra de avena, se llevaron a cabo reacciones FAE sobre los mismos, de acuerdo al método detallado en el apartado 2.20.2. Se añadieron cantidades crecientes de extracto enzimático sobre un 2 % (p/v) de sustrato natural en polvo, en un volumen final de 5 mL de tampón acetato 0,02 N pH 5,0. Las reacciones se incubaron durante 24 h a 50 °C y con una agitación orbital de 175 rpm, tras lo cual se detuvieron hirviendo durante 5 min, recuperándose los sobrenadantes mediante filtración. La cantidad de ácido ferúlico liberado se determinó mediante HPLC, de acuerdo al método que se indica en el apartado 3.1.5.1 del primer capítulo de Resultados y Discusión.

La capacidad de liberación de ácido ferúlico se expresó respecto a unidades de masa de sustrato natural. Se llevó a cabo una representación gráfica de la liberación de ácido ferúlico por cada kg de sustrato natural (g ácido ferúlico/kg sustrato natural), frente a la cantidad de proteína de extracto enzimático añadida por kg de sustrato (g proteína del extracto enzimático/kg de sustrato). Esta representación permitió determinar la cantidad óptima de extracto enzimático a añadir por kg de sustrato, es decir, la mínima cantidad de extracto enzimático a añadir para conseguir la máxima liberación de ácido ferúlico (Fig. 3.25).

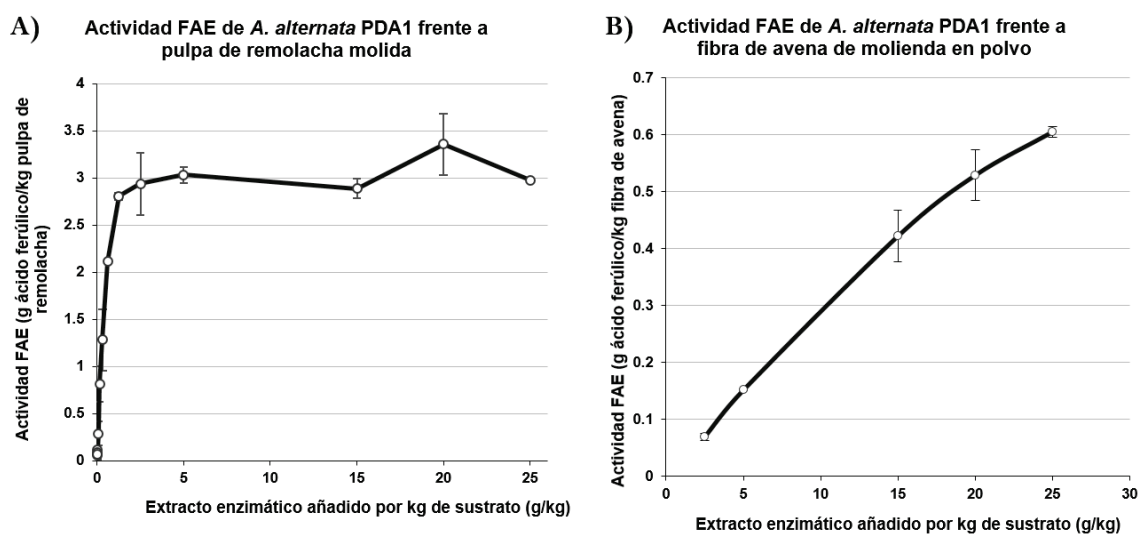


Fig. 3.25. Capacidad del extracto enzimático de *A. alternata* PDA1, procedente de medio M-SBP, para la liberación de ácido ferúlico a partir de sustratos naturales. Reacciones a 50 °C, en tampón acetato 0,1 N pH 5,0, durante 24 h. **A)** Liberación de ácido ferúlico a partir de pulpa de remolacha (García-Calvo *et al.*, 2018). **B)** Liberación de ácido ferúlico a partir de fibra de avena de molienda.

Según se aprecia en la Fig. 3.25, incluso añadiendo bajas concentraciones de extracto enzimático, este fue capaz de liberar ácido ferúlico a partir de **pulpa de remolacha**, hasta un máximo de aproximadamente 3 g de ácido ferúlico por cada kg de pulpa de remolacha [0,3 % (p/v)]. En el rango de 0 a 1,25 g de extracto enzimático añadidos por kg de sustrato, la liberación de ácido ferúlico respecto a kg de sustrato se fue incrementando a medida que aumentaba la cantidad de extracto enzimático. Sin embargo, a partir de 1,25 g de extracto enzimático, una mayor cantidad de extracto no aumentó la liberación de ácido ferúlico, sino que se mantuvo en torno a los 3 g de ácido ferúlico por kg de sustrato. En base a estos resultados, se determinó que la concentración de extracto enzimático para conseguir una liberación óptima de ácido ferúlico a partir de pulpa de remolacha fue de 1,25 g de extracto por cada kg de sustrato.

Teniendo en cuenta el contenido en ácido ferúlico (%) de la pulpa de remolacha descrito en la literatura (Ralet *et al.*, 1994a; Micard *et al.*, 1996; Benoit *et al.*, 2006b; Mathew y Abraham, 2006; Kühnel *et al.*, 2011) y el de un estudio que analizó la composición de pulpa de remolacha procedente de la misma fuente que la empleada en el presente trabajo de Tesis Doctoral [0,6-1,1 % (p/p) de ácido ferúlico] (López Alonso *et al.*, 2011), el extracto enzimático de *A. alternata* PDA1 fue capaz de extraer aproximadamente un 27-50 % del ácido ferúlico total existente en el sustrato. Estos son valores interesantes, teniendo en cuenta que se trata únicamente de la acción

del extracto enzimático, sin ayuda de pretratamientos y otros cócteles enzimáticos. La capacidad de otra cepa de *A. alternata* para extraer elevados porcentajes de ácido ferúlico a partir de sustratos naturales, como salvado de trigo y de triticale, se ha reseñado previamente (Xiao *et al.*, 2012), por lo que *Alternaria* spp. puede constituir un género con interés industrial.

En cuanto a la acción del extracto enzimático de *A. alternata* PDA1 sobre **la fibra de avena de molienda**, los valores de liberación de ácido ferúlico fueron mucho menores (Fig. 3.25). Además, a pesar de que se añadió una cantidad considerablemente elevada de extracto enzimático (hasta 25 g de extracto enzimático por kg de sustrato), no fue posible alcanzar un máximo de liberación, como sí que ocurrió en el caso de la pulpa de remolacha. Estos valores inferiores de liberación de ácido ferúlico pueden deberse al menor contenido de este AHC en la fibra de avena, o bien a una baja especificidad del extracto enzimático frente a este sustrato, lo que determinaría una menor eficiencia de la hidrólisis de sus paredes celulares vegetales y, por consiguiente, menor liberación de ácido ferúlico. La causa de una baja especificidad pudo ser la utilización de un extracto enzimático obtenido a partir de fermentaciones en medio M-SBP (donde el inductor de FAEs fue la pulpa de remolacha) sobre un sustrato vegetal diferente (fibra de avena). Para comprobar esta hipótesis, se llevaron a cabo reacciones sobre fibra de avena de molienda, añadiendo 2,5 y 5 g de extracto enzimático por kg de sustrato. Los valores se compararon con los previamente indicados para el extracto obtenido a partir de cultivos en medio M-SBP (Fig. 3.26).

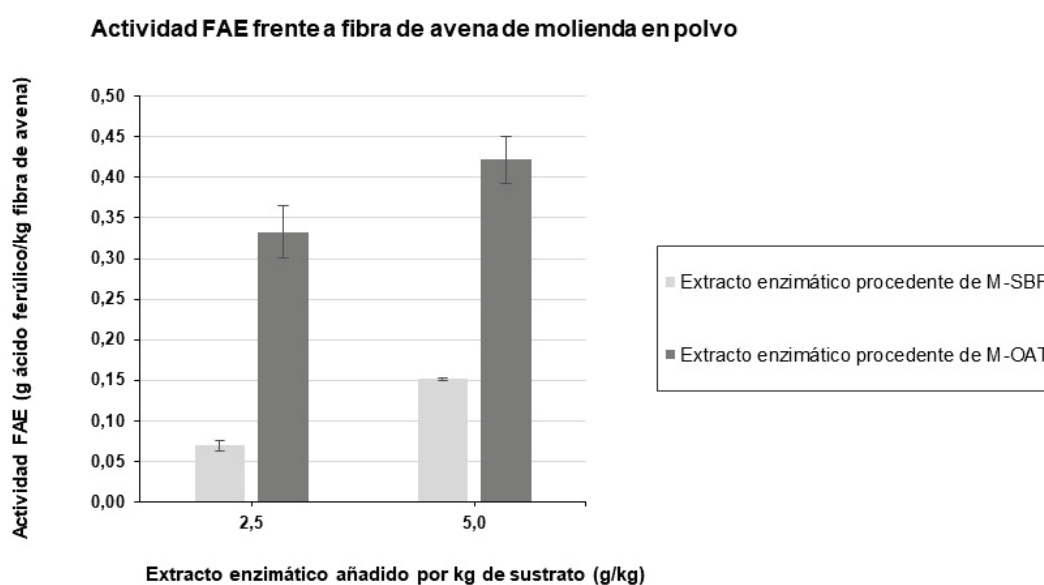


Fig. 3.26. Capacidad del extracto enzimático de *A. alternata* PDA1, procedente de medio M-SBP y medio M-OAT, para la liberación de ácido ferúlico a partir de fibra de avena de molienda en polvo. Reacciones a 50 °C, en tampón acetato 0,1 N pH 5,0, 175 rpm, durante 24 h.

Los valores de liberación de ácido ferúlico a partir de fibra de avena fueron de 3 a 5 veces mayores al emplear un extracto enzimático obtenido a partir de cultivos de *A. alternata* PDA1 en el medio que contiene dicho sustrato (M-OAT), en comparación con los valores del extracto obtenido a partir del medio que contiene pulpa de remolacha (M-SBP). Esto pone de manifiesto las ventajas de producir cócteles enzimáticos adaptados a la hidrólisis de las paredes vegetales de un sustrato natural en concreto (Rosgaard *et al.*, 2007; van den Brink y de Vries, 2011).

### **3.2.5. Análisis de otras actividades lignocelulolíticas presentes en el extracto enzimático**

Todos los ensayos indicados previamente se centraron en la caracterización de la actividad FAE del extracto enzimático producido por *A. alternata* PDA1, determinando su pH y temperatura óptimos, estabilidad térmica, especificidad de sustrato y cinética enzimática. Asimismo, se analizó su capacidad para extraer ácido ferúlico a partir de sustratos naturales.

Sin embargo, el extracto enzimático no constituye una muestra purificada de FAEs, sino que se trata de una mezcla compleja de proteínas hidrolíticas secretadas por el hongo, al llevar a cabo fermentaciones en cultivo sumergido empleando pulpa de remolacha como fuente de carbono. La degradación de la compleja estructura de la pared celular vegetal hacia azúcares fermentables requiere de la acción sinérgica de un gran número de enzimas (Manisha y Yadav, 2017). Existen hongos filamentosos que poseen una potente maquinaria enzimática capaz de llevar a cabo dicha degradación, gracias a todo el abanico de hidrolasas que producen al ser cultivados sobre sustratos como paja de trigo, salvado de trigo y madera blanda (Oda *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2008; Ravalason *et al.*, 2008; Ravalason *et al.*, 2012; de Souza, 2013).

Teniendo en consideración lo anterior, se llevaron a cabo ensayos orientados a analizar dos de las actividades lignocelulolíticas más importantes (actividad celulolítica y xilanolítica -hemicelulolítica-) en el extracto enzimático de *A. alternata* PDA1, recogido en condiciones de óptima actividad FAE. Todas las reacciones se realizaron a 50 °C y a pH 5,0.

#### *3.2.5.1 Análisis de la actividad celulolítica del extracto enzimático*

El potencial celulolítico de *A. alternata* PDA1 se estudió por medio de tres tipos de ensayos cuantitativos para determinar las tres actividades enzimáticas que conforman el complejo celulasas:

$\beta$ -glucosidasa, exoglucanasa (celobiohidrolasa) y endoglucanasa. Los métodos empleados se detallan en el apartado 2.21.

Las actividades  $\beta$ -glucosidasa y celobiohidrolasa se determinaron espectrofotométricamente, midiendo la liberación de 4-nitrofenol tras la hidrólisis de un sustrato sintético cromogénico, de modo similar al indicado en el apartado 3.1.7.1 del primer capítulo de Resultados y Discusión. En el caso de la actividad  $\beta$ -glucosidasa, el sustrato empleado fue pNPG, mientras que para la determinación de actividad celobiohidrolasa se utilizó pNPC suplementado con D-glucono-1,5- $\delta$ -lactona. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Seguidamente, se llevó a cabo la medida de la absorbancia de las muestras a 405 nm.

La cantidad de producto liberado enzimáticamente se calculó comparando los valores de absorbancia con los obtenidos en una recta patrón construida con concentraciones crecientes de 4-nitrofenol. Las actividades  $\beta$ -glucosidasa y celobiohidrolasa se expresaron en unidades (U) por g de proteína total en el extracto enzimático (1 U = cantidad de enzima necesaria para la liberación de 1  $\mu\text{mol}$  de 4-nitrofenol/min, bajo las condiciones del ensayo). Todas las reacciones se llevaron a cabo por triplicado e incluyendo controles negativos con extractos de medio M-SBP sin inocular.

El extracto enzimático obtenido tras el cultivo de *A. alternata* en medio M-SBP mostró actividad  $\beta$ -glucosidasa y celobiohidrolasa, siendo esta última marcadamente menor (Tabla 3.9).

**Tabla 3.9. Actividad celulolítica del extracto enzimático de *A. alternata* PDA1, obtenido a partir de medio M-SBP.** Reacciones llevadas a cabo a 50 °C, con 10  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático y una concentración de sustrato de 4 mM (pNPG, para  $\beta$ -glucosidasa; pNPC, para celobiohidrolasa) o 1 % (p/v) (CMC, para endoglucanasa) en tampón acetato 0,1 N pH 5,0. (Modificado de García-Calvo et al., 2018).

Actividad enzimática	Actividad específica (U/ g proteína total en el extracto)
$\beta$ -glucosidasa	1147,07 $\pm$ 126,40
Celobiohidrolasa	9,99 $\pm$ 0,52
Endoglucanasa	547,03 $\pm$ 49,29

En la literatura, se ha descrito previamente una marcada actividad  $\beta$ -glucosidasa en la cepa *Alternaria* sp. DR45, cultivada sobre salvado de soja y bagazo de caña de azúcar deslignificado y sometido a explosión por vapor (Robl et al., 2013). Asimismo, se ha identificado esta actividad, junto a actividad endoglucanasa, en cepas silvestres y mutantes de *A. alternata* (Macris, 1984).

Estos resultados apuntan a *Alternaria* spp. como un género interesante desde el punto de vista de la producción y secreción de este tipo de enzimas hidrolíticas.

La presencia de valores de actividad celobiohidrolasa considerablemente menores que los de actividad  $\beta$ -glucosidasa se ha indicado en estudios previos, como se ha detallado en el apartado 3.1.7.1 (Eaton y Hale, 1993; Pointing, 1999; van den Brink y de Vries, 2011; Robl *et al.*, 2013; Zoglowek *et al.*, 2015). Además, en dicho apartado se recogen datos de actividad celobiohidrolasa de los distintos aislados fúngicos ambientales estudiados en el presente trabajo, los cuales fueron marcadamente inferiores que los de  $\beta$ -glucosidasa.

La actividad **endoglucanasa** se determinó cuantitativamente por el método del DNS, basado en un cambio de color producido por la liberación enzimática de azúcares reductores, a partir de un derivado soluble de la celulosa (CMC). El cambio de color se debe a la interacción del DNS en solución alcalina con los azúcares reductores, lo que provoca su reducción hacia ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, que presenta un color anaranjado-marrón con un máximo de absorción a 540 nm. La cuantificación de la actividad endoglucanasa se realizó interpolando los valores de absorbancia a 540 nm en rectas patrón realizadas con concentraciones crecientes de glucosa en presencia de DNS. Los valores de actividad endoglucanasa se expresaron en unidades (U) por g de proteína total en el extracto enzimático (1 U = cantidad de enzima necesaria para la liberación de 1  $\mu$ mol de glucosa/min, bajo las condiciones del ensayo). El extracto enzimático de *A. alternata* PDA1 obtenido a partir del medio M-SBP presentó actividad endoglucanasa (Tabla 3.9). Se incluyeron controles negativos con extracto obtenido a partir de medio M-SBP sin inocular.

Pese a que la CMC es un sustrato sintético y la capacidad de degradarlo no es signo inequívoco de actividad endoglucanasa frente a celulosa cristalina natural, el ensayo DNS es una aproximación muy útil para la caracterización de dicha actividad (Wood y Bhat, 1988). Entre sus inconvenientes a tener en cuenta están que puede ser menos sensible que otros métodos, como el de Nelson-Somogyi, y que tiende a mostrar valores de azúcares reductores hasta un 50 % mayores que dicho método (Gusakov *et al.*, 2011). Una de las ventajas del método DNS frente al de Nelson-Somogyi es que se evita el empleo de sustancias altamente tóxicas y contaminantes, como el cobre y el arsenomolibdato (Hatanaka y Kobara, 1980). De acuerdo con estas premisas, los valores exactos de actividad deben considerarse cuidadosamente a la hora de compararlos con aquellos determinados mediante otros métodos; no obstante, al margen de los valores numéricos,



se pudo concluir que el extracto enzimático presentó considerable actividad endoglucanasa (Tabla 3.9). Pese a sus limitaciones, el ensayo DNS es el recomendado por la comisión de la IUPAC sobre Biotecnología, para la medición de la actividad endoglucanasa sobre CMC (Ghose, 1987) y se trata de uno de los métodos de medida de la actividad endoglucanasa más extendidos.

La actividad endoglucanasa se ha identificado en otras cepas de *Alternaria* spp., como es el caso de la mencionada previamente *Alternaria* sp. DR45 (Robl *et al.*, 2013).

### 3.2.5.2 Análisis de la actividad xilanolítica del extracto enzimático

Dentro de la categoría compleja de constituyentes de la pared celular vegetal conocidos como hemicelulosas, se encuentran tres tipos de cadenas (xilanos, xiloglucanos y mananos), siendo necesarios varios grupos enzimáticos para llevar a cabo su degradación (de Souza, 2013). En la degradación de los xilanos, participan dos grupos de enzimas importantes:  $\beta$ -xilosidasas y endoxilasas (Chávez *et al.*, 2006). Para la caracterización del potencial hemicelulasa de los extractos enzimáticos de *A. alternata* PDA1 cultivado sobre medio M-SBP, se determinaron cuantitativamente sus actividades  $\beta$ -xilosidasa y endoxilasa.

La actividad  **$\beta$ -xilosidasa** (apartado 2.22.1) se determinó espectrofotométricamente mediante la liberación de 4-nitrofenol a partir de un sustrato cromogénico, de modo similar a los ensayos de actividad  $\beta$ -glucosidasa y celobiohidrolasa indicados en el apartado 3.2.5.1.

El sustrato empleado fue pNPX, a una concentración 4 mM en tampón acetato 0,1 N pH 5,0. Las reacciones se llevaron a cabo a 50 °C y se detuvieron mediante la adición de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, tras lo cual fue determinada la absorbancia de las muestras a 405 nm. La concentración de 4-nitrofenol liberado a partir de la hidrólisis de pNPX por medio de la acción de las  $\beta$ -xilosidasas se calculó a partir de una recta patrón de 4-nitrofenol, preparada por triplicado, en las condiciones de reacción. La actividad  $\beta$ -xilosidasa se expresó en unidades (U) por g de proteína total.

El extracto enzimático de *A. alternata* PDA1 presentó actividad  $\beta$ -xilosidasa (Tabla 3.10). Este tipo de actividad se ha identificado también en la cepa *Alternaria* sp. DR45 (Robl *et al.*, 2013). No es posible comparar directamente estos valores y los determinados en el presente trabajo para el extracto enzimático de *A. alternata* PDA1, debido a que las unidades de actividad empleadas para *Alternaria* sp. DR45 se refieren a volumen de caldo de cultivo y no a cantidad de proteína.

Sin embargo, comparando de forma relativa los valores de actividad  $\beta$ -glucosidasa, celobiohidrolasa y  $\beta$ -xilosidasa del trabajo de Robl y colaboradores (Robl *et al.*, 2013) y los del presente trabajo, la actividad  $\beta$ -xilosidasa de *A. alternata* PDA1 fue relativamente mayor.

**Tabla 3.10. Actividad xilanólítica del extracto enzimático de *A. alternata* PDA1, obtenido a partir de medio M-SBP.** Reacciones llevadas a cabo a 50 °C, a una concentración de 4 mM (pNPX, para la actividad  $\beta$ -xilosidasa) o 1 % (p/v) (xilano, para la actividad endoxilanasas) en tampón acetato 0,1 N pH 5,0. Una unidad (U) corresponde a la cantidad de enzima necesaria para la liberación de 1  $\mu$ mol de producto/min, bajo las condiciones del ensayo. (Modificado de García-Calvo *et al.*, 2018).

Actividad enzimática	Actividad específica (U/ g proteína total en el extracto)
$\beta$ -xilosidasa	250,98 $\pm$ 10,57
Endoxilanasas	280,48 $\pm$ 16,77

La actividad **endoxilanasas** se determinó espectrofotométricamente, a partir de la liberación de azúcares reductores con el reactivo DNS, de forma similar al ensayo empleado para la determinación de actividad endoglucanasa (apartado 2.22.2). En este caso, el sustrato empleado fue xilano de madera de abedul (Sigma-Aldrich). Los valores de absorbancia se interpolaron en una recta patrón preparada con concentraciones crecientes de xilosa, en las mismas condiciones de reacción, por triplicado. La actividad endoxilanasas se expresó en unidades (U) por g de proteína total en el extracto (1 U = cantidad de enzima necesaria para la liberación de 1  $\mu$ mol de xilosa/min, bajo las condiciones del ensayo).

El extracto enzimático de *A. alternata* PDA1 presentó actividad endoxilanasas (Tabla 3.10). Estudios previos han determinado la actividad endoxilanasas de cepas de *Alternaria* spp., mediante el método de DNS. Mao y colaboradores purificaron y caracterizaron una endoxilanasas de *Alternaria* sp. HB186, llevando a cabo reacciones sobre xilano de madera de abedul y otros sustratos lignocelulósicos (Mao *et al.*, 2012). Los valores de actividad que obtuvieron son mayores que los obtenidos para el extracto enzimático de *A. alternata* PDA1. Sin embargo, hay que tener en cuenta que dicho estudio analizó una muestra purificada de xilanasas que, por lo tanto, presenta mucha mayor actividad específica respecto a cantidad de proteína. Otros estudios que han hallado actividad endoxilanasas en cepas de *Alternaria* spp. son: i) el llevado a cabo sobre la cepa *Alternaria mali* ND-16, aislada a partir de muestras de suelo de un jardín con manzanos, mediante reacciones sobre xilano de cascarilla de avena, (Li *et al.*, 2009); ii) el estudio acerca de *A. alternata* DR45, sobre xilano de madera de abedul y de haya (Robl *et al.*, 2013) y iii) una cepa de *A. alternata* aislada

a partir de suelos de la Antártida, caracterizada mediante reacciones de actividad endoxilanasas sobre madera de abedul y goma garrofín (Bradner *et al.*, 1999).

### **3.2.6. Estudio de la capacidad de sacarificación del extracto enzimático**

Las aplicaciones industriales de los extractos enzimáticos obtenidos a partir de cepas fúngicas están relacionadas con su capacidad para hidrolizar los componentes de la pared celular vegetal, liberando azúcares sencillos (Jimenez-Flores *et al.*, 2010; Menon y Rao, 2012). El proceso de liberación de azúcares reductores a partir de un sustrato constituido por carbohidratos complejos, como la biomasa vegetal, se conoce como sacarificación (Micard *et al.*, 1996; Ravalason *et al.*, 2012). Para lograr la sacarificación de sustratos lignocelulósicos son necesarias múltiples actividades enzimáticas, que actúan de forma sinérgica para conseguir la deslignificación y apertura de la estructura de la pared celular vegetal.

La capacidad de sacarificación del extracto enzimático de *A. alternata* PDA1 obtenido a partir de cultivos en medio M-SBP se analizó frente a dos sustratos lignocelulósicos naturales: **pulpa de remolacha molida y fibra de avena de molienda en polvo.**

Se llevaron a cabo reacciones sobre un 2 % (p/v) de cada uno de los sustratos naturales en tampón acetato 0,1 N pH 5,0, durante 24 h, a 50 °C y con una agitación constante de 175 rpm. La cantidad de extracto enzimático a añadir se determinó a partir de los resultados de los ensayos frente al sustrato natural detallados en el apartado 3.2.4.5, eligiendo el valor de liberación óptima de ácido ferúlico respecto a cantidad de extracto añadido. Para pulpa de remolacha, se añadió 1,25 g de proteína del extracto enzimático por kg de sustrato. En cuanto a la fibra de avena de molienda, puesto que el valor óptimo de liberación de ácido ferúlico se encontró por encima de valores ya muy elevados de cantidad de extracto a añadir (más de 25 g de proteína del extracto por kg de sustrato natural), se llevaron a cabo reacciones añadiendo distintas cantidades de extracto enzimático, comprendidas entre  $4,88 \times 10^{-3}$  y 5 g de proteína del extracto por kg de fibra de avena de molienda.

Una vez finalizadas las reacciones, se detuvieron, hirviendo los tubos durante 5 min, tras lo cual las muestras fueron centrifugadas para eliminar el precipitado. Las impurezas de los sobrenadantes se clarificaron a través de filtros de jeringa de 0,22 µm de diámetro de poro. Las

muestras filtradas fueron analizadas mediante HPLC-UV, empleando una columna *CARBOSEP COREGEL 87P 8 $\mu$ m* (300 x 7,8 mm. Transgenomic), de acuerdo al protocolo detallado en el apartado 2.23. Se cuantificó la presencia de varios mono y disacáridos (sacarosa, glucosa, galactosa, fructosa y arabinosa), mediante la técnica del estándar externo, preparando rectas patrón por triplicado con concentraciones crecientes de cada uno. Se incluyeron controles negativos con extractos obtenidos a partir del medio M-SBP sin inocular, así como con tampón de resuspensión del extracto. Todas las reacciones se llevaron a cabo por triplicado. La adición de extracto enzimático dio lugar a la liberación de cantidades limitadas de glucosa, fructosa y arabinosa (Tabla 3.11).

**Tabla 3.11. Capacidad de sacarificación del extracto enzimático de *A. alternata* PDA1.** Reacciones llevadas a cabo sobre los sustratos naturales pulpa de remolacha y fibra de avena de molienda, a 50 °C, en tampón acetato 0,1 N pH 5,0. Se indican los valores medios y la desviación estándar. (Modificado de García-Calvo et al., 2018).

Muestra (g proteína extracto enzimático/kg sustrato)	Cantidad liberada (g/L de reacción)				
	Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Arabinosa	Galactosa
1,25 g/kg de pulpa de remolacha	N/D <sup>a</sup>	1,57 ± 0,10	1,35 ± 0,03	2,18 ± 0,12	N/D
5 g/kg de fibra de avena	N/D	7,39 ± 2,41	0,09 ± 0,02	0,18 ± 0,03	N/D
2,5 g/kg de fibra de avena	N/D	6,29 ± 0,52	0,10 ± 0,01	0,21 ± 0,07	N/D
1,25 g/kg de fibra de avena	0,14 ± 0,15	5,31 ± 0,15	0,08 ± 0,00	0,13 ± 0,46	N/D
625 mg/kg de fibra de avena	0,18 ± 0,08	4,11 ± 0,11	0,06 ± 0,02	N/D	N/D
312,5 mg/kg de fibra de avena	0,19 ± 0,02	2,72 ± 0,10	0,05 ± 0,01	N/D	N/D
156,3 mg/kg de fibra de avena	0,09 ± 0,02	1,66 ± 0,09	N/D	N/D	N/D
78,1 mg/kg de fibra de avena	N/D	0,82 ± 0,12	N/D	N/D	N/D
39,1 mg/kg de fibra de avena	N/D	0,46 ± 0,11	N/D	N/D	N/D
19,5 mg/kg de fibra de avena	N/D	0,18 ± 0,02	N/D	N/D	N/D
9,8 mg/kg de fibra de avena	N/D	0,10 ± 0,01	N/D	N/D	N/D
4,9 mg/kg de fibra de avena	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D

<sup>a</sup> N/D: valores por debajo del límite de detección del equipo

Respecto a la sacarificación de la **fibra de avena de molienda**, donde se analizó la adición de distintas cantidades de proteína del extracto enzimático, se observó que cuanto mayor era la cantidad de extracto añadida, mayor fue la liberación de glucosa, fructosa y arabinosa. Los niveles de glucosa, fructosa y arabinosa se encontraron por debajo de los niveles de detección al emplear cantidades de extracto enzimático (g de proteína total/kg de sustrato) inferiores a 4,9 mg, 156,3

mg y 625 mg, respectivamente. La composición en cuanto a monosacáridos y disacáridos de cada uno de los dos sustratos naturales sometidos a sacarificación puede estar relacionada con la cantidad liberada de cada uno de los azúcares (Tablas 3.12 y 3.13).

**Tabla 3.12. Composición de la pulpa de remolacha.** Los valores corresponden a porcentajes respecto a materia seca (p/p).

Componente	Contenido [% (p/p)]	Referencia
Sacarosa	1-4	Kühnel et al., 2011; Michel et al., 1988
Glucosa	19,99-23,3	Bonnin et al., 2000; Kühnel et al., 2011; Micard et al., 1996; Michel et al., 1988; Ralet et al., 1994b; Thibault y Rouau, 1990
Arabinosa	16,3-23,5	Bonnin et al., 2000; Kühnel et al., 2011; Micard et al., 1996; Michel et al., 1988; Ralet et al., 1994b; Thibault y Rouau, 1990
Galactosa	3,9-5,8	Bonnin et al., 2000; Kühnel et al., 2011; Micard et al., 1996; Michel et al., 1988; Ralet et al., 1994b; Thibault y Rouau, 1990
Xilosa	1,46-2	Bonnin et al., 2000; Kühnel et al., 2011; Micard et al., 1996; Michel et al., 1988; Ralet et al., 1994b; Thibault y Rouau, 1990
Ramnosa	0,8-2,31	Bonnin et al., 2000; Kühnel et al., 2011; Micard et al., 1996; Michel et al., 1988; Ralet et al., 1994b; Thibault y Rouau, 1990
Fucosa	0-0,2	Micard et al., 1996; Ralet et al., 1994b; Thibault y Rouau, 1990
Manosa	0,3-1,5	Bonnin et al., 2000; Kühnel et al., 2011; Micard et al., 1996; Michel et al., 1988; Ralet et al., 1994b; Thibault y Rouau, 1990
Ácidos urónicos	18-21,1	Bonnin et al., 2000; Kühnel et al., 2011; Micard et al., 1996; Michel et al., 1988; Ralet et al., 1994b; Thibault y Rouau, 1990

**Tabla 3.13. Composición de la cascarilla (fibra) de avena.** Los valores corresponden a porcentajes respecto a materia seca (p/p).

Componente	Contenido [% (p/p)]	Referencia
Glucosa	19,36-32	Garleb et al., 1991; Rovio et al., 2008
Arabinosa	1,9-2,8	Garleb et al., 1991; Rovio et al., 2008
Galactosa	0,8-1,3	Garleb et al., 1991; Rovio et al., 2008
Xilosa	22,29-30	Garleb et al., 1991; Rovio et al., 2008
Ramnosa	<0,1	Rovio et al., 2008
Manosa	<0,5	Rovio et al., 2008

Los datos recogidos en las Tablas 3.12 y 3.13 ponen de manifiesto dos diferencias principales en cuanto a la composición de monosacáridos y disacáridos de la pulpa de remolacha y la fibra de avena: el mayor contenido en arabinosa de la pulpa de remolacha (16,3-23,5 %, frente al 1,9-2,8 % de la fibra de avena) y el elevado contenido en xilosa de la fibra de avena (22,29-30 %, frente al 1,46-2 % de la pulpa de remolacha). A pesar de que la xilosa no pudo ser determinada

mediante el método empleado, la liberación de arabinosa fue mayor en el caso de la pulpa de remolacha, lo que se corresponde con la distribución de su contenido en azúcares sencillos (Tabla 3.12). El elevado contenido en arabinosa de la pulpa de remolacha coincide con la composición de sus paredes celulares vegetales, ricas en hemicelulosas y pectinas, estas últimas constituidas principalmente por arabinosa y ácido galacturónico (Hutnan *et al.*, 2000; Tousehik *et al.*, 2017).

La mayor liberación de glucosa a partir de fibra de avena puede ser consecuencia de la hidrólisis de la celulosa. En lo que respecta a la sacarosa, pudo observarse su presencia en aquellas reacciones en las que se añadieron cantidades intermedias de proteína del extracto. Sin embargo, no se detectó a los valores máximos y mínimos de extracto enzimático añadido. Este hecho pudo deberse a la presencia de enzimas en el extracto capaces de degradar la sacarosa hacia sus dos monómeros constituyentes, glucosa y fructosa. Al añadir una concentración de extracto enzimático más baja, dicha actividad enzimática sería menor, pudiendo detectarse sacarosa.

### **3.2.7. Estudio del proteoma extracelular de *A. alternata* PDA1 tras su cultivo sobre pulpa de remolacha**

Los ensayos previamente descritos en el presente capítulo permitieron caracterizar la actividad FAE del extracto enzimático de *A. alternata* PDA1, obtenido a partir de caldo de fermentación en medio (M-SBP). Asimismo, se llevó a cabo la determinación de dos de los grupos de actividades lignocelulolíticas más importantes: celulasas y hemicelulasas (enzimas xilanolíticas). La acción sinérgica de celulasas, hemicelulasas y enzimas pectinolíticas, incluidas enzimas accesorias como las FAEs, produce la hidrólisis de la pared vegetal celular, con liberación de monosacáridos y otras moléculas sencillas. La capacidad de extracción de azúcares fermentables a partir de sustratos naturales vegetales se evaluó mediante ensayos de sacarificación.

Con el fin de complementar y ampliar los resultados obtenidos en estos ensayos, se llevaron a cabo técnicas proteómicas para el estudio del secretoma de *A. alternata* PDA1. El secretoma, o proteoma extracelular, se define como el conjunto de proteínas secretadas hacia el espacio extracelular por parte de una célula o tejido en un momento dado, bajo condiciones concretas, a través de distintos mecanismos de secreción (Agrawal *et al.*, 2010).

El secretoma parcial de *A. alternata* PDA1, correspondiente al extracto enzimático recogido en condiciones de óptima actividad FAE (96 h de cultivo a 28 °C, 250 rpm, en medio M-SBP),

se analizó por medio de electroforesis bidimensional e identificación proteica mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF.

### *3.2.7.1. Preparación de las muestras*

En primer lugar, se recuperó el extracto enzimático, de acuerdo al protocolo del apartado 2.19. El caldo de fermentación en medio M-SBP fue recogido a las 96 h, centrifugado, filtrado y precipitado mediante la adición de sulfato de amonio. El precipitado se recuperó mediante centrifugación y fue resuspendido en tampón acetato 0,02 N pH 5,0, constituyendo el extracto enzimático. Se recogieron tres muestras de extracto procedentes de tres réplicas biológicas.

Una vez obtenidos los extractos enzimáticos y verificada su actividad FAE, se llevó a cabo su lavado y precipitación, con vistas a conseguir muestras más concentradas y libres de sustancias que pudieran interferir con los subsiguientes análisis proteómicos, como una alta concentración de sales. Esta segunda precipitación se desarrolló de acuerdo al método descrito en el apartado 2.24.1. En primer lugar, se añadió un volumen de una solución de TCA-DTT en acetona. Tras recuperar el precipitado, se realizaron dos lavados con DTT al 0,07 % (p/v) en acetona. A continuación, se llevó a cabo una nueva precipitación con acetona al 80 % (v/v), para eliminar los restos de TCA. Se centrifugaron las muestras, retirando la acetona y dejando secar ligeramente, puesto que la presencia de acetona afecta a la solubilización del precipitado proteico. Por último, los extractos lavados y concentrados se resuspendieron en tampón de rehidratación.

Previamente a la realización de la electroforesis bidimensional, fue necesario cuantificar las muestras a analizar, para ajustar las cantidades de proteínas a emplear en subsiguientes ensayos. La cuantificación de las muestras de proteínas se llevó a cabo por medio del método de Bradford (apartado 2.24.2). Dada la importancia de una adecuada cuantificación de las muestras a la hora de comparar entre réplicas, la cuantificación se verificó mediante el desarrollo de una cantidad conocida de las mismas (20 µg de proteína total) en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) monodimensionales (apartado 2.24.3). Además de verificar la concentración proteica, la electroforesis monodimensional permitió observar el aspecto de las muestras, en cuanto a integridad y definición de las bandas, presencia de impurezas, etc.

### 3.2.7.2. Electroforesis bidimensional

Una vez comprobada la cuantificación e integridad de las muestras, se realizó la electroforesis 2-D, de acuerdo al protocolo detallado en el apartado 2.24.4.

Para desarrollar la primera dimensión (IEF), se empleó el sistema *Ettan IPGphor II* (GE Healthcare Life Sciences) y tiras *Immobiline™ DryStrip* de 18 cm, con gradiente de pH inmovilizado de 3,0 a 10,0 NL (GE Healthcare Life Sciences). Este rango de pH se escogió frente a otras opciones más restringidas, como gradiente de pH 4,0-7,0, para estudiar un mayor rango de pI.

Una vez finalizado el IEF, las tiras fueron tratadas con el agente reductor DTT, que disocia los puentes disulfuro de las proteínas, y con iodoacetamida, que alquila los grupos sulfhidrilo, previniendo su reoxidación durante la electroforesis. Además, la iodoacetamida alquila también el exceso de DTT, evitando que se produzcan artefactos visibles tras la tinción del gel (Görg et al., 1987). A continuación, se llevó a cabo la segunda dimensión, consistente en la separación de las proteínas de las tiras de IEF mediante electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 12,5 %, de acuerdo al protocolo detallado en el apartado 2.24.4.2.

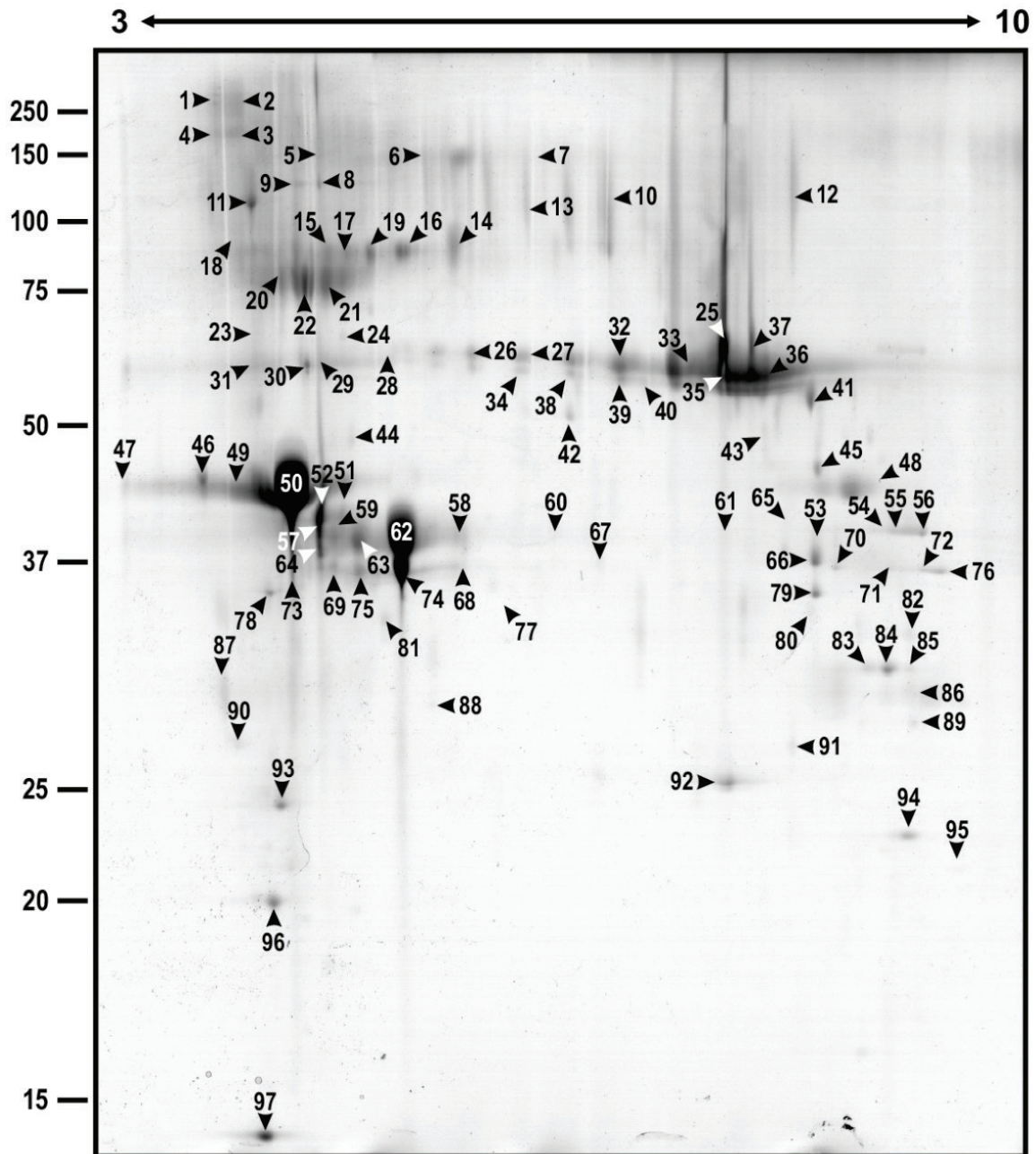
Las proteínas presentes en los geles fueron detectadas como manchas circulares (puntos proteicos o *spots*), mediante tinción con azul Coomassie coloidal (apartado 2.24.5.1). La técnica se basó en el denominado *Blue Silver* (Candiano et al., 2004), que es un método de tinción simple, cuantitativo, con alta reproducibilidad y adecuado como etapa previa a la identificación proteica por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF (Jami et al., 2010a). Las formulaciones de Coomassie coloidal previenen la entrada del colorante en la matriz del gel y la unión inespecífica al mismo, lo que permite obtener geles con menos fondo y mayor sensibilidad (Steinberg, 2009).

### 3.2.7.3. Análisis de geles, digestión triptica e identificación proteica

Una vez teñidos, los geles con los diferentes puntos proteicos se digitalizaron y analizaron mediante el programa informático *ImageMaster™ 2D Platinum* v. 5.0 (GE Healthcare Life Sciences), de acuerdo al método descrito en el apartado 2.24.6. Dicho programa permitió llevar a cabo la comparación de los geles correspondientes a cada una de las tres réplicas biológicas, mediante el establecimiento de puntos de referencia. De esta forma, pudo obtenerse el mapa de referencia



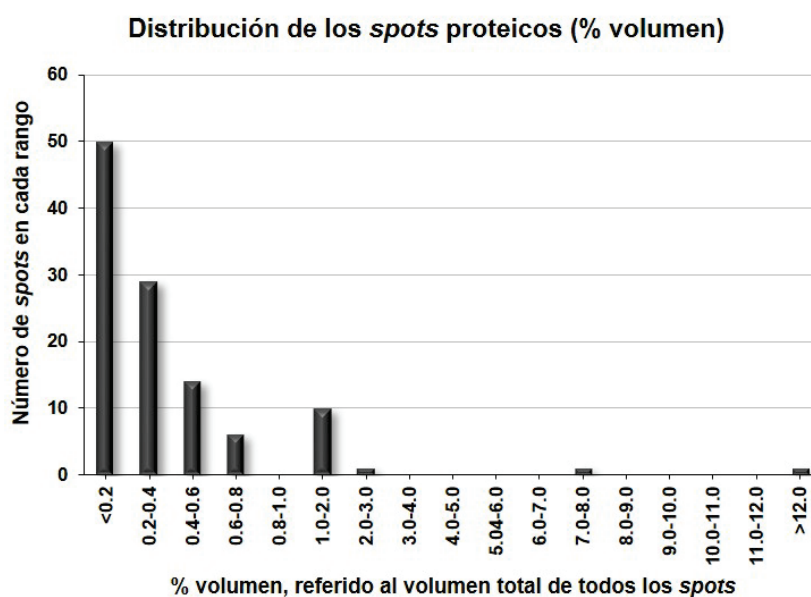
2-D del extracto enzimático, con 112 puntos proteicos presentes en las tres réplicas y un 18 % de variabilidad en cuanto al número de puntos por gel (Fig. 3.27).



**Fig. 3.27. Mapa de referencia del secretoma parcial de *A. alternata* PDA1.** Un total de 112 puntos proteicos se visualizaron en un rango de pH 3,0-10,0 (indicado en la parte superior), 97 de los cuales (numerados en la figura) fueron identificados. El peso molecular (kDa) se indica a la izquierda. Los números de spot corresponden con los de las Tablas 3.14, 3.15, 3.16 y 3.17. (Modificado de García-Calvo et al., 2018).

Se llevó a cabo la normalización de los puntos proteicos, determinando el volumen relativo de cada uno, atendiendo a su intensidad relativa respecto al total de todos los puntos presentes en

el gel. De los 112 puntos proteicos presentes en las tres réplicas, 109 mostraron volúmenes relativos menores al 2 % del total (Fig. 3.28).



**Fig. 3.28. Volumen relativo de los spots.** Spots proteicos, ordenados según su volumen relativo, que se relaciona con su intensidad. Únicamente 13 de los 112 spots totales mostraron valores de volumen relativo superiores al 1 %. (Modificado de García-Calvo et al., 2018).

Los 112 puntos proteicos comunes fueron recuperados y sometidos a digestión triptica, según la técnica descrita en el apartado 2.24.7. La digestión triptica produce la descomposición de la proteína en múltiples péptidos, que pueden ser analizados mediante MS para identificar proteínas dentro de una mezcla compleja (Huynh *et al.*, 2009).

Las muestras sometidas a digestión triptica fueron identificadas por medio de espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF y comparación de los datos de huella peptídica y MS en tándem con una base de datos de proteínas, mediante una licencia local de Mascot v 2.2 (Matrix Science), a través del servidor *Global Protein v. 3.6* (Applied Biosystems). El método se detalla en el apartado 2.24.8. Este método permitió la identificación de 97 de los 112 puntos proteicos incluidos en el mapa de referencia, obteniéndose 125 identificaciones. La obtención de más de una identificación en el mismo punto es un hallazgo previamente recogido en publicaciones anteriores de nuestro grupo (Jami *et al.*, 2010b). De las 125 identificaciones obtenidas, 98 correspondieron a isoformas de 17 proteínas diferentes, tratándose las 27 proteínas restantes de especies proteicas únicas.

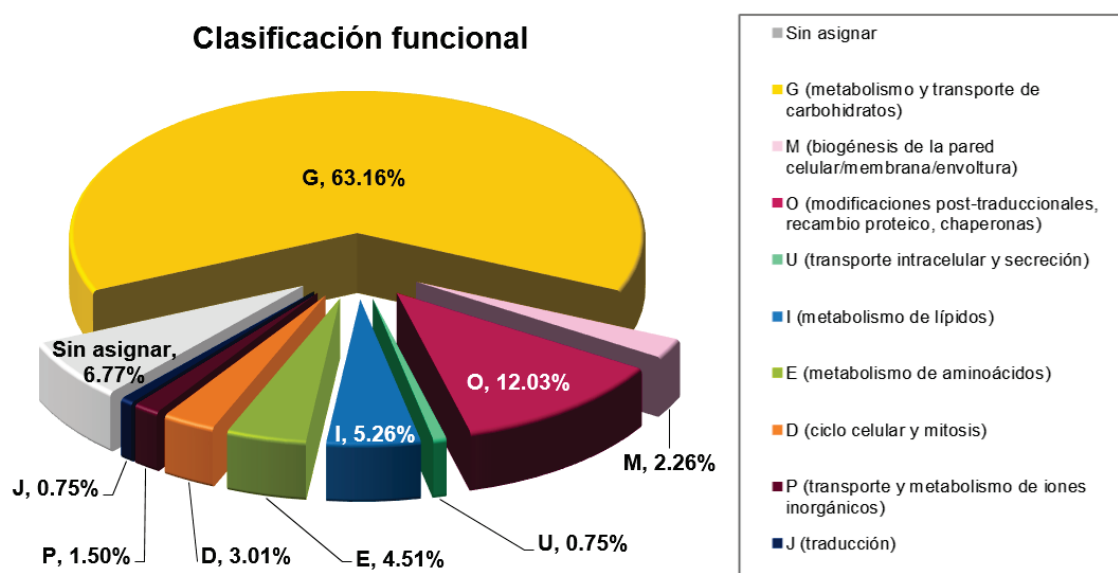
Con el fin de comprobar que las proteínas presentes en el extracto enzimático se correspondieron con proteínas de secreción, y no se trató de proteínas procedentes del medio

intracelular, todas las proteínas identificadas fueron sometidas a análisis predictivo de la presencia de péptidos señal (apartado 2.8), relacionados con mecanismos de secreción extracelular. La presencia de señales de secreción clásicas se evaluó mediante el servidor *SignalP v. 4.1*, siendo posible predecir la presencia de secuencias correspondientes con péptidos señal clásicos en 38 de las 44 proteínas distintas que se identificaron. Las 6 proteínas restantes se estudiaron por medio del servidor *SecretomeP v. 2.0*, que es capaz de detectar señales de secreción no clásicas. En 3 de las 6 se detectó la posible presencia de una señal de secreción no clásica. Las vías de secreción no clásicas son importantes en algunos grupos fúngicos, como ciertos hongos fitopatógenos (Liu *et al.*, 2014c) y la levadura *S. cerevisiae*, donde estudios previos han indicado que la mayoría de las proteínas de su secretoma no contienen un péptido señal en el extremo N-terminal (Stein *et al.*, 2014). El hecho de que, de 125 identificaciones totales, únicamente en 3 no se pudiera predecir la presencia de señales de secreción indica una existencia muy reducida de proteínas intracelulares en el extracto enzimático (2,4 % de proteínas intracelulares). Dicho hallazgo confirma que el tiempo de recogida de los cultivos (96 h) fue el adecuado para evitar la contaminación del extracto con proteínas intracelulares liberadas tras procesos de lisis celular (Barreiro *et al.*, 2012b).

Además del análisis predictivo de rutas de secreción, se llevó a cabo una anotación funcional de las proteínas identificadas en el extracto enzimático, por medio del sistema de los COG (*Clusters of Orthologous Groups*, es decir, agrupaciones de proteínas ortólogas), cuya última versión incluye también genomas de organismos eucariotas (KOG) (Tatusov *et al.*, 2003). Este sistema no es tan completo en el caso de eucariotas como lo es en el de procariotas (contiene únicamente 7 genomas eucariotas, frente a 711 procariotas), por lo que solamente un 50 % de las proteínas identificadas pudieron asignarse directamente a categorías COG. El resto de proteínas fueron analizadas con respecto a la presencia de dominios conservados, mediante las bases de datos InterPro y *Conserved Domain Database* del NCBI (CDD) (Finn *et al.*, 2017; Marchler-Bauer *et al.*, 2017). Tras el análisis de dominios conservados, de las 44 proteínas distintas identificadas, 38 pudieron ser clasificadas en 9 de las categorías funcionales COG (Fig. 3.29).

Del total de 125 identificaciones totales (incluyendo isoformas), el 63,16 % (22 proteínas, con 84 isoformas) fueron identificadas como proteínas involucradas en el metabolismo y transporte de carbohidratos. El 12,03 % (6 proteínas, con 16 isoformas) fueron clasificadas como proteínas relacionadas con modificaciones postraduccionales, recambio proteico y chaperonas. La siguiente categoría en cuanto a representación fue la del metabolismo de lípidos, con un 5,26 %

del total (4 proteínas, con 7 isoformas, dos de ellas adscritas también a la categoría de metabolismo de aminoácidos y una a la categoría de transporte intracelular y secreción). El 4,51 % correspondieron a proteínas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos (3 proteínas, con 6 isoformas). Las categorías con menor representación fueron proteínas con funciones en el ciclo celular y mitosis (3,01 %; 1 proteína, con 4 isoformas), biogénesis de la pared celular/membrana/envoltura (2,26 %; tres proteínas únicas, dos de ellas también adscritas a la categoría de transporte y metabolismo de iones inorgánicos), transporte y metabolismo de iones inorgánicos (1,5 %; 2 proteínas únicas), traducción (0,75 %; 1 proteína única) y transporte intracelular y secreción (0,75 %; 1 proteína única). El 6,77 % del total (6 proteínas, con 9 isoformas en total) no pudieron ser asignadas a ninguna categoría funcional (Fig. 3.29).



**Fig. 3.29. Clasificación funcional de las proteínas identificadas a partir del extracto enzimático de *A. alternata* PDA1 cultivada en M-SBP.** Se indica la clasificación funcional en COGs de las 125 identificaciones proteicas obtenidas. (Modificado de García-Calvo et al., 2018).

De las 125 identificaciones obtenidas, 122 (el 97,6 %) correspondieron a proteínas de cepas de *A. alternata*. Las 3 identificaciones restantes, obtenidas a partir de los puntos 41,78 y 93, se adscribieron a la especie *Stemphylium lycopersici*, un hongo dematiáceo que está próximo filogenéticamente a *Alternaria* spp. Ambos pertenecen a la familia Pleosporaceae. *Stemphylium* spp. se ha asociado con enfermedades que afectan a la remolacha azucarera (Woudenberg *et al.*, 2017).

Para la identificación proteica, los resultados de huella peptídica y MS en tándem obtenidos mediante la espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF se compararon con los depositados en

bases de datos. En el caso de aquellos organismos cuyo genoma no se ha secuenciado, depositado y anotado, las identificaciones se basaron en coincidencias con alto porcentaje de similitud, pertenecientes a especies próximas a la que es objeto de estudio. La obtención de una gran mayoría de coincidencias correspondientes a la especie a la que pertenece el aislado ambiental estudiado (*A. alternata*), constituye otro hallazgo que apoya la identificación de *A. alternata* PDA1 como una cepa adscrita a dicha especie. En los últimos años, se han realizado esfuerzos encaminados a incrementar el conocimiento en lo que respecta a los genomas de especies pertenecientes a *Alternaria* spp., como es el caso del proyecto “*The Alternaria genomes database*” (<http://alternaria.biol.vt.edu/index.html>). Este proyecto gestiona un recurso en línea que incluye datos correspondientes a secuencias genómicas de 25 especies pertenecientes a este género (Dang *et al.*, 2015). La disponibilidad de estas secuencias en bases de datos facilitó la identificación proteica.

El total de proteínas identificadas y los hallazgos más interesantes se detallan a continuación, agrupados en las distintas categorías funcionales del sistema de los COG.

#### ○ CATEGORÍA G: METABOLISMO Y TRANSPORTE DE CARBOHIDRATOS

Al ser cultivadas sobre sustratos lignocelulósicos naturales, constituidos por una mezcla compleja de biopolímeros, existen hongos capaces de secretar todo un abanico de hidrolasas extracelulares, incluyendo celulasas, hemicelulasas, y enzimas accesorias, como FAEs (van den Brink y de Vries, 2011; Ravalason *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013; de Souza, 2013; Guerriero *et al.*, 2015). Dentro del total de proteínas identificadas en el extracto enzimático de *A. alternata* PDA1 bajo las condiciones analizadas, la mayoría (el 63,16 %) pudieron ser clasificadas como proteínas involucradas en el metabolismo y transporte de carbohidratos (Tabla. 3.14).

La proteína con mayor intensidad y área en los geles, con un volumen relativo del 12,73 % del total, fue una posible **endopoligalacturonasa** (EPG), correspondiente al punto proteico 50. Las EPG constituyen uno de los grupos más importantes dentro de las pectinasas. Otras EPG fueron identificadas a partir de los puntos 51, 65, 71, 74 y 91, denotando una presencia importante de dicho grupo enzimático.

**Tabla 3.14. Puntos proteicos identificados por medio de su huella peptídica y MS en tándem, presentes en el extracto enzimático de *A. alternata* PDA1; categoría G del sistema de los COG.** Se indica el número de punto proteico, correspondiente a la Fig. 3.27, y una letra en caso de más de una identificación por punto (ID); la puntuación MOWSE de la búsqueda mediante Mascot (*Score*); el peso molecular (MW) y pI teóricos y experimentales (estimados); la presencia de señales de secreción (Sec) determinadas mediante SignalP, indicándose con “NC” la presencia de vías de secreción no clásicas y la clasificación funcional mediante el sistema de los COG. (Modificado de García-Calvo et al., 2018).

ID	Nombre de entrada (UniProt)	Descripción de la proteína <sup>a</sup>	Score	Teóricos		Estimados		Sec	COG
				MW (kDa)	pI	MW (kDa)	pI		
1a	A0A177DVF3_ALTAL	Proteína sin caracterizar ( <i>β</i> -glucosidasa/ <i>β</i> -xilosidasa)	267	94,8	4,44	212,2	3,92	SI	G
2a	A0A177DVF3_ALTAL	Proteína sin caracterizar ( <i>β</i> -glucosidasa/ <i>β</i> -xilosidasa)	565	94,8	4,44	211,0	4,12	SI	G
3c	A0A177DVF3_ALTAL	Proteína sin caracterizar ( <i>β</i> -glucosidasa/ <i>β</i> -xilosidasa)	150	94,8	4,44	177,9	4,10	SI	G
6b	A0A177DB39_ALTAL	Proteína sin caracterizar ( <i>ramnogalacturonano</i> liasa)	127	63,5	5,73	151,6	5,32	SI	G
7	A0A177DB39_ALTAL	Proteína sin caracterizar ( <i>ramnogalacturonano</i> liasa)	87	63,5	5,73	150,8	5,67	SI	G
8b	A0A177DPL2_ALTAL	Proteína sin caracterizar (proteína de la familia 31 de GHs)	237	114,9	4,65	129,9	4,87	NC	G
9b	A0A177DPL2_ALTAL	Proteína sin caracterizar (proteína de la familia 31 de GHs)	185	114,9	4,65	129,9	4,67	NC	G
10a	A0A177DB39_ALTAL	Proteína sin caracterizar ( <i>ramnogalacturonano</i> liasa)	398	63,5	5,73	116,7	5,95	SI	G
11	A0A177DZ08_ALTAL	Sacarosa-6-fosfato hidrolasa	574	71,0	4,53	116,1	4,25	SI	G
13a	A0A177DB39_ALTAL	Proteína sin caracterizar ( <i>ramnogalacturonano</i> liasa)	284	63,5	5,73	111,3	5,67	SI	G
20b	A0A177D4C3_ALTAL	Poligalacturonasa	145	48,7	5,49	82,5	4,53	SI	G
21b	A0A177D4C3_ALTAL	Poligalacturonasa	152	48,7	5,49	80,9	4,93	SI	G
22b	A0A177D4C3_ALTAL	Poligalacturonasa	111	48,7	5,49	80,3	4,74	SI	G
23a	A0A177DZ08_ALTAL	Sacarosa-6-fosfato hidrolasa	260	71,0	4,53	75,0	4,28	SI	G
23b	A0A177DE80_ALTAL	Proteína sin caracterizar (proteína de la familia 79 de GHs, <i>β</i> -glucuronidasa)	94	61,7	4,55	75,0	4,28	SI	G
24	Q9UVP4_ALTAL	Glucanasa	112	46,5	5,02	67,1	5,03	NO	G
25	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ <i>β</i> -xilosidasa	957	52,1	6,24	64,9	6,66	SI	G
26	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ <i>β</i> -xilosidasa	952	52,1	6,24	63,4	5,48	SI	G
27	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ <i>β</i> -xilosidasa	732	52,1	6,24	62,9	5,65	SI	G
28	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ <i>β</i> -xilosidasa	545	52,1	6,24	62,0	5,26	SI	G
29	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ <i>β</i> -xilosidasa	513	52,1	6,24	61,4	4,89	SI	G
30a	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ <i>β</i> -xilosidasa	647	52,1	6,24	61,4	4,76	SI	G
30b	A0A177DKY7_ALTAL	Glucanasa	241	49,6	5,02	61,4	4,76	SI	G
31	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ <i>β</i> -xilosidasa	931	52,1	6,24	61,2	4,28	SI	G
32	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ <i>β</i> -xilosidasa	997	52,1	6,24	61,0	6,00	SI	G

Tabla 3.14 (continuación)

ID	Nombre de entrada (UniProt)	Descripción de la proteína <sup>a</sup>	Score	Teóricos		Estimados		Sec	COG
				MW (kDa)	pI	MW (kDa)	pI		
33	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ $\beta$ -xilosidasa	888	52,1	6,24	60,3	6,42	SÍ	G
34	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ $\beta$ -xilosidasa	664	52,1	6,24	60,2	5,65	SÍ	G
35	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ $\beta$ -xilosidasa	849	52,1	6,24	59,7	6,65	SÍ	G
36	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ $\beta$ -xilosidasa	995	52,1	6,24	59,2	6,88	SÍ	G
37a	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ $\beta$ -xilosidasa	529	52,1	6,24	59,2	6,80	SÍ	G
37b	A0A177DUN7_ALTAL	Proteína de la familia 43 de GHs	396	60,9	6,96	59,2	6,80	SÍ	G
38	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ $\beta$ -xilosidasa	666	52,1	6,24	59,0	5,83	SÍ	G
39	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ $\beta$ -xilosidasa	877	52,1	6,24	58,4	6,00	SÍ	G
40	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ $\beta$ -xilosidasa	746	52,1	6,24	58,0	6,14	SÍ	G
41c	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ $\beta$ -xilosidasa	143	52,1	6,2	54,9	7,31	SÍ	G
43	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ $\beta$ -xilosidasa	414	52,1	6,24	49,6	6,87	SÍ	G
45a	A0A177D1Q5_ALTAL	Proteína similar a pectina liasas	476	41,7	6,24	45,1	7,40	SÍ	G
45b	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ $\beta$ -xilosidasa	196	52,1	6,24	45,1	7,40	SÍ	G
47	A0A177DXD0_ALTAL	Endopoligalacturonasa	100	39,3	4,85	43,4	3,16	SÍ	G
48	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ $\beta$ -xilosidasa	703	52,1	6,24	43,3	8,00	SÍ	G
49	A0A177DXD0_ALTAL	Endopoligalacturonasa	496	39,3	4,85	43,0	4,10	SÍ	G
50	A0A177DXD0_ALTAL	Endopoligalacturonasa	610	39,3	4,85	42,8	4,62	SÍ	G
53	A0A177D4F4_ALTAL	Proteína similar a pectina liasas	142	32,9	6,75	39,6	7,38	SÍ	G
54	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ $\beta$ -xilosidasa	94	52,1	6,24	39,4	8,07	SÍ	G
55	A0A177DR40_ALTAL	Pectina liasa A	165	40,2	8,7	39,3	8,3	SÍ	G
56	A0A177DR40_ALTAL	Pectina liasa A	494	40,2	8,7	39,2	8,8	SÍ	G
57b	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ $\beta$ -xilosidasa	100	52,1	6,24	39,1	4,87	SÍ	G
58	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ $\beta$ -xilosidasa	512	52,1	6,24	39,0	5,43	SÍ	G
59	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ $\beta$ -xilosidasa	333	52,1	6,24	38,8	5,00	SÍ	G
60	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ $\beta$ -xilosidasa	86	52,1	6,24	38,8	5,77	SÍ	G
61	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ $\beta$ -xilosidasa	577	52,1	6,24	38,7	6,63	SÍ	G
62	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ $\beta$ -xilosidasa	370	52,1	6,24	38,6	5,23	SÍ	G
63	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ $\beta$ -xilosidasa	313	52,1	6,24	38,5	5,08	SÍ	G
64b	A0A177DXD0_ALTAL	Endopoligalacturonasa	301	39,3	4,85	37,7	4,87	SÍ	G
65	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ $\beta$ -xilosidasa	89	52,1	6,24	37,6	7,00	SÍ	G
66	A0A177D4F4_ALTAL	Proteína similar a pectina liasas	546	32,9	6,75	36,9	7,36	SÍ	G

Tabla 3.14 (continuación)

ID	Nombre de entrada (UniProt)	Descripción de la proteína <sup>a</sup>	Score	Teóricos		Estimados		Sec	COG
				MW (kDa)	pI	MW (kDa)	pI		
67	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ <i>β</i> -xilosidasa	586	52,1	6,24	36,8	5,92	SÍ	G
68	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ <i>β</i> -xilosidasa	392	52,1	6,24	36,3	5,42	SÍ	G
69	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ <i>β</i> -xilosidasa	487	52,1	6,24	36,3	5,00	SÍ	G
70	A0A177D5G1_ALTAL	Endopoligalacturonasa	325	40,1	7,54	36,3	7,61	SÍ	G
71	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ <i>β</i> -xilosidasa	107	52,1	6,24	36,3	8,33	SÍ	G
72a	A0A177DTI8_ALTAL	Arabinogalactano endo- <i>β</i> - 1,4-galactanasa	149	38,5	8,76	36,1	8,76	SÍ	G
72b	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ <i>β</i> -xilosidasa	115	52,1	6,24	36,1	8,76	SÍ	G
73a	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ <i>β</i> -xilosidasa	274	52,1	6,24	36,1	4,62	SÍ	G
73b	A0A177DXD0_ALTAL	Endopoligalacturonasa	166	39,3	4,85	36,1	4,62	SÍ	G
74	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ <i>β</i> -xilosidasa	373	52,1	6,24	36,0	5,23	SÍ	G
75	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ <i>β</i> -xilosidasa	503	52,1	6,24	36,0	5,09	SÍ	G
76	A0A177DTI8_ALTAL	Arabinogalactano endo- <i>β</i> - 1,4-galactanasa	220	38,5	8,76	36,0	9,00	SÍ	G
79	A0A177D4F4_ALTAL	Proteína similar a pectina liasas	514	32,9	6,75	34,6	7,38	SÍ	G
80	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ <i>β</i> -xilosidasa	178	52,1	6,24	33,5	7,32	SÍ	G
81	A0A177D3Z9_ALTAL	Glucósido hidrolasa	570	40,9	6,1	33,1	5,2	SÍ	G
82	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ <i>β</i> -xilosidasa	630	52,1	6,24	32,2	8,57	SÍ	G
83	A0A177E3J2_ALTAL	Arabinano endo-1,5- <i>α</i> -L- arabinosidasa	528	34,7	8,36	30,5	8,00	SÍ	G
84	A0A177E3J2_ALTAL	Arabinano endo-1,5- <i>α</i> -L- arabinosidasa	560	34,7	8,36	30,4	8,27	SÍ	G
85b	A0A177E3J2_ALTAL	Arabinano endo-1,5- <i>α</i> -L- arabinosidasa	153	34,7	8,36	30,4	8,58	SÍ	G
87	A0A177DZE3_ALTAL	Lectina similar a concanavalina A/glucanasa (fragmento)	304	30,6	4,32	29,0	4,00	SÍ	G
88	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ <i>β</i> -xilosidasa	146	52,1	6,24	28,5	5,35	SÍ	G
89	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ <i>β</i> -xilosidasa	658	52,1	6,24	27,7	8,63	SÍ	G
90a	A0A177DXD0_ALTAL	Endopoligalacturonasa	441	39,3	4,85	26,7	4,13	SÍ	G
90b	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ <i>β</i> -xilosidasa	159	52,1	6,24	26,7	4,13	SÍ	G
91	A0A177D5S3_ALTAL	Arabinofuranosidasa/ <i>β</i> -xilosidasa	877	52,1	6,24	26,6	7,09	SÍ	G
92	A0A177DH30_ALTAL	Endoglucanasa A	500	26,1	8,42	24,9	6,66	SÍ	G
94	A0A177D761_ALTAL	Cutinasa	150	23,8	8,49	22,6	8,55	SÍ	G
95	A0A177E449_ALTAL	Endo-1,4- <i>β</i> -xilanasa	167	24,8	6,73	21,3	9,30	SÍ	G

<sup>a</sup> La función biológica o enzimática asignada a las proteínas hipotéticas (basada en análisis mediante BLASTP) se muestra entre paréntesis, en cursiva.



Las EPG no fueron las únicas pectinasas identificadas a partir del extracto enzimático de *A. alternata* PDA1. También se hallaron hidrolasas, como **exopoligalacturonasas**, **endoarabinasas**, **arabinogalactanasas**, y  **$\alpha$ -L-arabinofuranosidasas**. Este último grupo estuvo fuertemente representado, pudiendo identificarse hasta en 43 de los puntos proteicos, incluyendo los puntos 62 y 74, que fueron el segundo y tercero con mayor volumen relativo, respectivamente. La importante presencia de estos grupos enzimáticos puede explicar la elevada liberación de arabinosa detectada en los ensayos de sacarificación de la pulpa de remolacha empleando el extracto enzimático de *A. alternata* PDA1 (apartado 3.2.6).

Además de hidrolasas, se identificaron otras pectinasas pertenecientes al grupo de las liasas, como **pectina liasas** y **ramnogalacturonano endoliasas**. Estos hallazgos indicaron una importante presencia de pectinasas en el extracto enzimático de *A. alternata* PDA1, atribuible al elevado contenido en pectinas de la pulpa de remolacha, donde constituye uno de los polisacáridos más importantes, con un 15-32 % del total de peso seco (Micard *et al.*, 1996; Hutnan *et al.*, 2000). Las pectinasas ácidas fúngicas presentan múltiples aplicaciones y están siendo utilizadas en la actualidad en industrias como: i) producción de zumos de frutas, vino, té y café; ii) alimentación humana y animal, incluyendo procesos de extracción de aceite vegetal; iii) industria papelera, durante el blanqueado y reciclaje de papel; iv) maceración de tejidos vegetales en industria textil y v) sacarificación de la biomasa, para la producción de biocombustibles (Kashyap *et al.*, 2001; Garg *et al.*, 2016; Latarullo *et al.*, 2016; Escamilla-Alvarado *et al.*, 2017). Las EPG y otras hidrolasas se han identificado como factores de virulencia en hongos fitopatógenos, como *Alternaria* sp., puesto que colaboran en la penetración de los tejidos de la planta durante la colonización y se trata de uno de los primeros grupos enzimáticos producidos por el patógeno en el proceso de infección (Isshiki *et al.*, 1997; Isshiki *et al.*, 2001; Kubicek *et al.*, 2014).

Por otra parte, además de pectinasas, otras enzimas CAZy fueron identificadas. Una de las proteínas identificadas en el extracto de *A. alternata* PDA1 mostró homología con una **sacarosa-6-fosfato hidrolasa** (EC 3.1.3.24; puntos proteicos 11 y 23). La sacarosa es la molécula más importante para la distribución del carbono y energía derivados de la fotosíntesis, en plantas superiores, desde los tejidos productores a los receptores (Bogs y Geider, 2000; Kim *et al.*, 2004). La actividad enzimática sacarosa-6-fosfato hidrolasa se ha identificado en hongos, donde la actividad GH tiene importancia en las asociaciones simbióticas entre plantas y hongos endófitos, así como en el crecimiento invasivo de los fitopatógenos (Parrent *et al.*, 2009; Liao *et al.*, 2013).

A partir de los puntos proteicos 1, 2 y 3, pudieron identificarse posibles  **$\beta$ -glucosidasas**, las cuales intervienen en la degradación de la celulosa, al actuar de forma sinérgica con endoglucanasas y exoglucanasas (van den Brink y de Vries, 2011; Couturier *et al.*, 2016). Las  $\beta$ -glucosidasas tienen aplicaciones industriales importantes en las últimas etapas de la conversión enzimática de la celulosa a monómeros de glucosa. Actualmente, este proceso constituye uno de los principales cuellos de botella en las industrias de producción de biocombustibles, precursores y químicos de base (Sørensen *et al.*, 2013). Otra GH hallada en el extracto enzimático fue una posible **GH de la familia 43**, identificada a partir del punto 37, que estaría relacionada con los procesos de hidrólisis de las pectinas y hemicelulosas.

Relacionada con la actividad hemicelulasas está la proteína identificada a partir del punto proteico 95, con homología con una **endo-1,4- $\beta$ -xilanasas**. Las endoxilanasas se comercializan en alimentación animal, alimentación humana y otras industrias como las productoras de bebidas, farmacéuticas, químicas, textiles y papeleras (Polizeli *et al.*, 2005). Pudieron identificarse, también, posibles  **$\beta$ -D-xilosidasas**, implicadas en etapas finales de la degradación de los xilanos.

En los puntos proteicos 8 y 9 se identificaron proteínas de la familia de GH 31, cuya principal actividad CAZy es la  **$\alpha$ -glucosidasa** (EC 3.2.1.20). Estas hidrolasas son importantes en las rutas metabólicas amilolíticas, presentes en la mayoría de los organismos, sobre todo aquellos que dependen del almidón procedente de plantas como fuente de energía (Okuyama *et al.*, 2016). Su presencia en el extracto enzimático es un hallazgo curioso, puesto que el contenido en almidón de la pulpa de remolacha es reducido (Karlsson *et al.*, 2002; Evans y Messerschmidt, 2017).

Las **cutinasas** (EC 3.1.1.74), como la identificada a partir del punto proteico 94, son serín esterases que catalizan la hidrólisis de los enlaces de la cutina, un poliéster lipídico insoluble y el principal componente de la cutícula de las plantas. La cutícula constituye una película protectora que evita la deshidratación de la planta a través de las hojas y sirve como mecanismo de protección ante patógenos foliares. De este modo, la capacidad de producir y secretar cutinasas está relacionada con la virulencia de los hongos fitopatógenos, habiéndose descrito varias cutinasas en especies fitopatógenas de *Alternaria* spp. (Fan y Köller, 1998; Koschorreck *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013). En trabajos previos se ha indicado una posible actividad FAE en cutinasas (Andersen *et al.*, 2002).

Por último, entre las enzimas CAZy halladas en el extracto enzimático de *A. alternata* PDA1 cultivada sobre pulpa de remolacha, se identificaron 4 **endoglucanasas** (puntos proteicos 24, 30, 87 y 92). Según se ha descrito en la literatura, las endoglucanasas podrían desempeñar un papel importante en los procesos de infección de las plantas por parte de *Alternaria* spp., dada su implicación en la degradación de la pared celular vegetal (Eshel *et al.*, 2002).

#### ○ CATEGORÍA O: MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES, RECAMBIO PROTEICO, CHAPERONAS

El análisis proteómico del extracto enzimático de *A. alternata* PDA1 cultivada sobre medio M-SBP, permitió identificar 6 proteasas distintas, las cuales se adscribieron a la categoría funcional O del sistema de los COG (Tabla 3.15). En 3 de dichas proteínas se hallaron dominios peptidasa S53, siendo identificadas como serina proteasas pertenecientes a la familia de las subtilasas (puntos proteicos 3-6, 8-10, 12, 13 y 85). Las subtilasas son un grupo muy extendido de proteasas de amplio espectro, representadas en prácticamente todos los grupos de hongos. La producción de distintas subtilasas supone una adaptación evolutiva que ha permitido la colonización de nuevos nichos ecológicos, siendo importante en el caso de hongos saprófitos, donde llevan a cabo funciones relacionadas con la adquisición de nutrientes (Hu y Leger, 2004; Li *et al.*, 2017). Algunos autores sugieren que dichas proteasas tiene un papel importante en la invasión de la planta por fitopatógenos, debido al hecho de que las plantas han desarrollado mecanismos de producción de inhibidores de proteasas, como respuesta a la infección (Valueva y Mosolov, 2004; Müller *et al.*, 2017). Además, las serina proteasas, sobre todo las subtilisinas, son una de las familias de proteínas alergénicas más importantes (Gabriel *et al.*, 2016).

Las otras 3 proteasas halladas en el extracto enzimático de *A. alternata* PDA1 fueron 2 proteínas identificadas como aspartil proteasas (puntos proteicos 46, 51, 52, 57 y 64) y una metaloproteasa de la familia de las deuterolisinas (punto 96). Las 2 primeras se adscribieron al grupo de las ácido aspártico endopeptidasas (EC 3.4.23), que también se conocen como proteasas ácidas y desarrollan funciones relacionadas con la obtención de nutrientes. Estas peptidasas tienen, además, múltiples aplicaciones en industrias como alimentación, producción de bebidas, industria médica e industria farmacéutica (Theron y Divol, 2014). La última enzima proteolítica que pudo ser identificada fue la mencionada metaloproteasa, perteneciente a la familia de las deuterolisinas. Esta familia está constituida, en general, por proteasas neutras con óptimos de actividad por

encima de pH 6,0 (Monod *et al.*, 2002). Recientemente, una metaloproteasa se ha aislado y caracterizado a partir de una cepa de *Alternaria solani* (Chandrasekaran *et al.*, 2016).

**Tabla 3.15. Puntos proteicos identificados por medio de su huella peptídica y MS en tándem, presentes en el extracto enzimático de *A. alternata* PDA1; categoría O del sistema de los COG.** Se indica el número de punto proteico, correspondiente a la Fig.3.27, y una letra en caso de más de una identificación por punto (ID); la puntuación MOWSE de la búsqueda mediante Mascot (Score); el peso molecular (MW) y pI teóricos y experimentales (estimados); la presencia de señales de secreción (Sec) determinadas mediante SignalP, indicándose con “NC” la presencia de vías de secreción no clásicas y la clasificación funcional mediante el sistema de los COG. (Modificado de García-Calvo *et al.*, 2018)

ID	Nombre de entrada (UniProt)	Descripción de la proteína <sup>a</sup>	Score	Teóricos		Estimados		Sec	COG
				MW (kDa)	pI	MW (kDa)	pI		
3a	A0A177D675_ALTAL	Proteína similar a subtilisina	267	64,9	5,19	177,9	4,10	SÍ	O
4a	A0A177D675_ALTAL	Proteína similar a subtilisina	168	64,9	5,19	177,0	3,93	SÍ	O
5	A0A177D675_ALTAL	Proteína similar a subtilisina	298	64,9	5,19	154,1	4,87	SÍ	O
6a	A0A177D675_ALTAL	Proteína similar a subtilisina	264	64,9	5,19	151,6	5,32	SÍ	O
8a	A0A177D675_ALTAL	Proteína similar a subtilisina	320	64,9	5,19	129,9	4,87	SÍ	O
9a	A0A177D675_ALTAL	Proteína similar a subtilisina	209	64,9	5,19	129,9	4,67	SÍ	O
10b	A0A177D4E0_ALTAL	Tripeptidil-peptidasa 1	257	68,3	5,90	116,7	5,95	SÍ	O
12a	A0A177D4E0_ALTAL	Tripeptidil-peptidasa 1	504	68,3	5,9	115,5	7,10	SÍ	O
13b	A0A177D675_ALTAL	Proteína similar a subtilisina	214	64,9	5,19	111,3	5,67	SÍ	O
46	A0A177DSP2_ALTAL	Proteasa ácida	612	48,5	4,69	43,8	3,78	NC	O
51	A0A177DWS3_ALTAL	Proteasa ácida	591	42,6	6,51	40,6	5,03	SÍ	O
52	A0A177DWS3_ALTAL	Proteasa ácida	774	42,6	6,51	40,6	4,87	SÍ	O
57a	A0A177DWS3_ALTAL	Proteasa ácida	616	42,6	6,51	39,1	4,87	SÍ	O
64a	A0A177DWS3_ALTAL	Proteasa ácida	487	42,6	6,51	37,7	4,87	SÍ	O
85a	A0A177DGQ5_ALTAL	Proteína PR1A similar a serina proteasas similares a subtilisina	157	40,4	8,26	30,4	8,58	SÍ	O
96	A0A177D506_ALTAL	Metaloproteasa deuterolisina	483	37,8	5,6	20,0	4,45	SÍ	O

## ○ CATEGORÍA I: METABOLISMO DE LÍPIDOS

Dentro de las proteínas identificadas a partir del extracto enzimático de *A. alternata* PDA1 que se clasificaron dentro de la categoría I del sistema de los COG, se encontraron cuatro hidrolasas distintas, capaces de actuar sobre los enlaces éster de los ácidos carboxílicos y estructuras derivadas (puntos proteicos 1-4, 12, 18 y 77. Tabla 3.16). Las lipasas tienen funciones ecológicas importantes en los procesos de colonización de las plantas o empleo de las mismas como fuentes de carbono, por parte de endófitos y fitopatógenos. En este sentido, la actividad

lipasa permite iniciar la hidrólisis de las ceras y la cutícula que protegen tejidos de la planta, facilitando el acceso a la pared celular vegetal y su degradación (Barriuso *et al.*, 2013). La detección de actividad lipasa en cepas de *Alternaria* spp. es un hallazgo reseñado previamente en la literatura. Así, cepas endófitas de *Alternaria* spp., aisladas a partir de semillas de oleaginosas, presentaron capacidad lipolítica (Venkatesagowda *et al.*, 2012). Por otro lado, se ha identificado una lipasa unida a la pared de las esporas del hongo fitopatógeno *A. brassicicola*, implicada en la colonización de las hojas de la coliflor, mediante adhesión y penetración de los propágulos fúngicos durante las etapas iniciales de la interacción parásito-hospedador (Berto *et al.*, 1999).

**Tabla 3.16. Puntos proteicos identificados por medio de su huella peptídica y MS en tándem, presentes en el extracto enzimático de *A. alternata* PDA1; categoría I del sistema de los COG.**

Se indica el número de punto proteico, correspondiente a la Fig.3.27, y una letra en caso de más de una identificación por punto (ID); la puntuación MOWSE de la búsqueda mediante Mascot (Score); el peso molecular (MW) y pI teóricos y experimentales (estimados); la presencia de señales de secreción (Sec) determinadas mediante SignalP, indicándose con “NC” la presencia de vías de secreción no clásicas y la clasificación funcional mediante el sistema de los COG. (Modificado de García-Calvo *et al.*, 2018).

ID	Nombre de entrada (UniProt)	Descripción de la proteína <sup>a</sup>	Score	Teóricos		Estimados		Sec	COG
				MW (kDa)	pI	MW (kDa)	pI		
1b	A0A177E3B6_ALTAL	Hidrolasa de ésteres carboxílicos	244	59,9	5,49	212,2	3,92	SI	I/E
2b	A0A177E3B6_ALTAL	Hidrolasa de ésteres carboxílicos	202	59,9	5,49	211,0	4,12	SI	I/E
3b	A0A177E3B6_ALTAL	Hidrolasa de ésteres carboxílicos	232	59,9	5,49	177,9	4,10	SI	I/E
4c	A0A177E3B6_ALTAL	Hidrolasa de ésteres carboxílicos	137	59,9	5,49	177,0	3,93	SI	I/E
12b	A0A177DNT5_ALTAL	Hidrolasa de ésteres carboxílicos	193	74,2	6,7	115,5	7,10	SI	I
18	A0A177DI60_ALTAL	Hidrolasa de ésteres carboxílicos	254	55,0	4,42	90,4	4,13	SI	I/E
77	A0A177DIB2_ALTAL	Hidrolasa $\alpha/\beta$	261	32,7	5,75	35,1	5,55	SI	U/I

### ○ CATEGORÍAS CON MENOR REPRESENTACIÓN Y PROTEÍNAS SIN ASIGNAR

Además de las categorías del sistema de los COG indicadas previamente, se identificaron proteínas pertenecientes a otras categorías (Tabla 3.17). Algunas de las proteínas identificadas a partir del extracto enzimático de *A. alternata* PDA1 adscritas a la categoría de las lipasas (categoría I) presentaron dominios conservados con posible actividad enzimática relacionada con el metabolismo de aminoácidos (**categoría E**), concretamente en los puntos proteicos 1-4 y 18, así como una hidrolasa con un dominio conservado perteneciente a la familia de las hidrolasas SGNH (punto 86). Esta familia, pese a haberse descubierto hace más de 20 años, está aún poco

caracterizada. Dentro de ella se incluyen enzimas diversas, con actividad lipasa, proteasa, tioesterasa, acetiltransferasa, lisofosfolipasa, CE y acetiltransferasa (Akoh *et al.*, 2004; Aşler *et al.*, 2010).

Otras categorías minoritariamente representadas fueron: i) la **categoría D** (ciclo celular y mitosis), con una proteína con dominios conservados relacionados con la división celular (puntos proteicos 15-17 y 19); ii) la **categoría M** (biogénesis de la pared celular/membrana/envoltura), con tres especies proteicas únicas: una proteína con un dominio fosfoesterasa (punto proteico 41), una posible fosfatasa ácida (punto 41) y una proteína intracelular con un dominio conservado asociado a GHs (punto 42); iii) la **categoría P** (transporte y metabolismo de iones orgánicos), a la que también se adscribieron dos de las proteínas identificadas a partir del punto proteico 41 y clasificadas en la categoría M; iv) **categoría J** (traducción), representada por una ribonucleasa con un posible mecanismo no clásico de secreción (punto proteico 44) y **categoría U** (transporte intracelular y secreción), categoría en la que se clasificó una proteína con un dominio conservado  $\alpha/\beta$  hidrolasa, identificada a partir del punto proteico 77 y también adscrita a la categoría I.

Entre las 9 isoformas de 6 proteínas distintas que no pudieron clasificarse en ninguna de las categorías del sistema de los COG, fue especialmente interesante la identificación obtenida a partir del punto proteico 97, correspondiente con la subunidad del alérgeno mayor Alt a 1 de *A. alternata*. Este alérgeno es una molécula de naturaleza proteica que presenta una disposición característica y única, con una estructura dimérica de barriles  $\beta$ , dispuestos en forma de mariposa (Chruszcz *et al.*, 2012). Los barriles  $\beta$  son, a su vez, estructuras cerradas formadas por láminas  $\beta$ , orientadas de forma antiparalela, de modo que los residuos hidrófobos se dirigen hacia el interior. Esta nueva estructura tridimensional podría definir una nueva familia, cuya función es desconocida (Kustrzeba-Wójcicka *et al.*, 2014). Sin embargo, existen estudios que han aportado información que apoya un rol hipotético de estas proteínas en los procesos de germinación de las esporas, en relación con la virulencia y patogenicidad de fitopatógenos fúngicos (Gabriel *et al.*, 2016). Un estudio llevado a cabo por Skóra y colaboradores indicó que, al ser cultivados en un medio con componentes lignocelulolíticos, los aislados ambientales de *Alternaria* spp. producen mayores niveles de este alérgeno que las cepas de colección (Skóra *et al.*, 2015). Esto explicaría el hallazgo de este alérgeno en el extracto enzimático del aislado ambiental *A. alternata* PDA1.

**Tabla 3.17. Puntos proteicos identificados por medio de su huella peptídica y MS en tándem, presentes en el extracto enzimático de *A. alternata* PDA1; otras categorías COG/proteínas sin asignar.** Se indica el número de punto proteico, correspondiente a la Fig. 3.27, y una letra en caso de más de una identificación por punto (ID); la puntuación MOWSE de la búsqueda mediante Mascot (Score); el peso molecular (MW) y pI teóricos y experimentales (estimados); la presencia de señales de secreción (Sec) determinadas mediante SignalP, indicándose con “NC” la presencia de vías de secreción no clásicas y la clasificación funcional mediante el sistema de los COG. (Modificado de García-Calvo et al., 2018).

ID	Nombre de entrada (UniProt)	Descripción de la proteína <sup>a</sup>	Score	Teóricos		Estimados		Sec	COG
				MW (kDa)	pI	MW (kDa)	pI		
1b	A0A177E3B6_ALTAL	Hidrolasa de ésteres carboxílicos	244	59,9	5,49	212,2	3,92	SÍ	I/E
2b	A0A177E3B6_ALTAL	Hidrolasa de ésteres carboxílicos	202	59,9	5,49	211,0	4,12	SÍ	I/E
3b	A0A177E3B6_ALTAL	Hidrolasa de ésteres carboxílicos	232	59,9	5,49	177,9	4,10	SÍ	I/E
4c	A0A177E3B6_ALTAL	Hidrolasa de ésteres carboxílicos	137	59,9	5,49	177,0	3,93	SÍ	I/E
14	A0A177DCA7_ALTAL	Proteína sin caracterizar (sin dominios conservados)	386	35,8	5,31	93,1	5,42	SÍ	-
15	A0A177D4W2_ALTAL	Proteína sin caracterizar (proteína de unión ubiquitina 3, dominio C-terminal But2; proteína de división celular DedD)	273	45,5	5,46	90,7	4,94	SÍ	D
16	A0A177D4W2_ALTAL	Proteína sin caracterizar (proteína de unión ubiquitina 3, dominio C-terminal But2; proteína de división celular DedD)	137	45,5	5,46	90,7	5,23	SÍ	D
17	A0A177D4W2_ALTAL	Proteína sin caracterizar (proteína de unión ubiquitina 3, dominio C-terminal But2; proteína de división celular DedD)	158	45,5	5,46	90,4	5,05	SÍ	D
18	A0A177DI60_ALTAL	Hidrolasa de ésteres carboxílicos	254	55,0	4,42	90,4	4,13	SÍ	I/E
19	A0A177D4W2_ALTAL	Proteína sin caracterizar (proteína de unión ubiquitina 3, dominio C-terminal But2; proteína de división celular DedD)	462	45,5	5,46	90,1	5,13	SÍ	D
20a	A0A177DCA7_ALTAL	Proteína sin caracterizar (sin dominios conservados)	202	35,8	5,31	82,5	4,53	SÍ	-
21a	A0A177DCA7_ALTAL	Proteína sin caracterizar (sin dominios conservados)	153	35,8	5,31	80,9	4,93	SÍ	-
22a	A0A177DCA7_ALTAL	Proteína sin caracterizar (sin dominios conservados)	169	35,8	5,31	80,3	4,74	SÍ	-
41a	A0A177DQV8_ALTAL	Proteína con un dominio fosfoesterasa	413	41,4	6,5	54,9	7,31	SÍ	M/P
41b	A0A0L1HZ20_9PLEO	Fosfatasa ácida	240	57,3	6,7	54,9	7,31	SÍ	M/P
42	A0A177DUC6_ALTAL	Glucósido hidrolasa	370	35,3	5,84	51,9	5,82	NO	M
44	A0A177DVG9_ALTAL	Ribonucleasa T2	215	43,6	5,25	48,0	5,06	NC	J
77	A0A177DIB2_ALTAL	Hidrolasa $\alpha/\beta$	261	32,7	5,75	35,1	5,55	SÍ	U/I
78	A0A0L1IHD6_9PLEO	Proteína sin caracterizar (sin dominios conservados)	91	58,2	4,9	34,7	4,42	SÍ	-
86	A0A177DAL9_ALTAL	Hidrolasa SGNH	130	28,0	8,79	29,2	8,58	SÍ	E

Tabla 3.17 (continuación)

ID	Nombre de entrada (UniProt)	Descripción de la proteína <sup>a</sup>	Score	Teóricos		Estimados		Sec	COG
				MW (kDa)	pI	MW (kDa)	pI		
93a	A0A0L1HTJ6_9PLEO	Proteína de la pared celular	284	22,7	4,72	24,0	4,52	SÍ	-
93b	A0A177D114_ALTAL	Proteína sin caracterizar (sin dominios conservados)	255	15,4	4,73	24,0	4,52	NO	-
97	Q71SP0_ALTAL	Alt a 1	686	17,3	4,75	12,0	4,38	SÍ	-

<sup>a</sup> La función biológica o enzimática asignada a las proteínas hipotéticas (basada en análisis mediante BLASTP) se muestra entre paréntesis, en cursiva.

### 3.2.8. Estudio del metaboloma parcial de *A. alternata* PDA1 tras su cultivo sobre avena y pulpa de remolacha

A la hora de valorar las posibles aplicaciones industriales de los extractos enzimáticos obtenidos a partir de cultivos de *A. alternata* PDA1, es necesario conocer los metabolitos que acompañan a las enzimas lignocelulolíticas, puesto que pueden afectar a su seguridad.

El extracto enzimático está formado por una mezcla de **enzimas**. En general, las enzimas constituyen productos seguros para su aplicación en la industria, como demuestra la gran cantidad de estudios de toxicidad oral y genotoxicidad de mezclas enzimáticas en los que no se han detectado efectos adversos (Sewalt *et al.*, 2016). Las enzimas incluidas en alimentos o bebidas para alimentación humana o animal son fácilmente degradadas en el sistema digestivo. Las únicas enzimas potencialmente peligrosas se adscriben a grupos muy concretos, como las presentes en el veneno de serpientes o insectos, así como algunas toxinas microbianas con actividad enzimática, siendo ambas categorías inocuas por vía oral, en general (Pariza y Cook, 2010). Desde el punto de vista de la contaminación y toxicidad medioambiental, las enzimas también son seguras, siendo fácilmente degradadas hacia aminoácidos (Sewalt *et al.*, 2016).

Dado que la presencia de enzimas no supone, *a priori*, un inconveniente en cuanto a su seguridad, las principales objeciones al empleo del extracto enzimático de *A. alternata* PDA1 dependen de las siguientes cuestiones: i) ¿son seguros los aditivos empleados en la preparación y recuperación del extracto? y ii) ¿es seguro el microorganismo productor del extracto?

En lo que respecta a la primera cuestión, el principal **aditivo** empleado para obtener el extracto fue sulfato de amonio, utilizado para la precipitación proteica a partir del caldo de



fermentación. En base al Reglamento de la UE n° 1130/2011 de la Comisión, el sulfato de amonio es un aditivo (identificado con el número E517) aprobado en la Unión Europea para su uso como vehículo en las formulaciones de otros aditivos, principalmente saborizantes, y en preparados enzimáticos para la industria alimentaria (Comisión Europea, 2011; Saltmarsh, 2013). En este sentido, su empleo en la preparación del extracto enzimático de *A. alternata* PDA1 no constituiría un obstáculo importante frente a una posible aplicación comercial.

Teniendo en cuenta lo anterior, la principal cuestión a atender fue la **seguridad del uso del microorganismo productor**. La especie *A. alternata* se ha descrito como fitopatógeno y patógeno oportunista humano, por lo que el paso inicial debe ser demostrar que la cepa *A. alternata* PDA1 no produce enfermedad en individuos sanos (Sewalt *et al.*, 2016). Sin embargo, durante el proceso de recuperación de los extractos enzimáticos se llevó a cabo la filtración de las muestras del caldo de fermentación a través de filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro. Teniendo en cuenta que el diámetro de los conidios de esta cepa fue de varias micras (Fig. 3.6), el proceso de filtración permitió retirar de los extractos enzimáticos los conidios y el micelio.

*A. alternata* es un hongo capaz de producir **alérgenos y metabolitos tóxicos**. La posible presencia de dichos metabolitos en el extracto enzimático es el mayor inconveniente de cara a las aplicaciones industriales del extracto enzimático en la industria (Pariza y Johnson, 2001). Hasta la fecha, se han identificado 17 proteínas de *A. alternata* que reaccionan con inmunoglobulinas E, 12 de ellas oficialmente reconocidas como alérgenos (Kustrzeba-Wójcicka *et al.*, 2014; Gabriel *et al.*, 2016). Dos de ellos fueron detectados en el extracto enzimático de *A. alternata* PDA1 (apartado 3.2.7): el alérgeno mayor Alt a 1 y una posible subtilisina.

En cuanto a su toxigenicidad, las especies del género *Alternaria* spp. son capaces de producir más de 70 metabolitos secundarios (Tölgyesi *et al.*, 2015). De entre todos ellos, más de 30 se han identificado como posibles micotoxinas, relacionadas con su carácter fitopatógeno, incluyendo tanto toxinas específicas de hospedador (HST) como toxinas no específicas o no selectivas (NHST) (Thomma, 2003). Dentro de las HST, se encuadran metabolitos secundarios de bajo peso molecular capaces de unirse únicamente a receptores de la planta a la que afecta una determinada cepa fitopatógena (Hu *et al.*, 2017). La mayoría de HST son factores de patogenicidad (indispensables para que tenga lugar la invasión de los tejidos de la planta y la aparición de la enfermedad), mientras que la mayoría de NHST actúan como factores de virulencia (determinan

la gravedad de la infección en la planta por parte del patógeno) (Tsuge *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2017). Entre las HST más importantes se encuentran las pertenecientes a la familia del ácido epoxi-decatrienoico (toxina AK, toxina AF y toxina ACT), el depsipéptido cíclico toxina AM y los policétidos toxina AAL y toxina ACR (también conocida como ACRL) (Tsuge *et al.*, 2013).

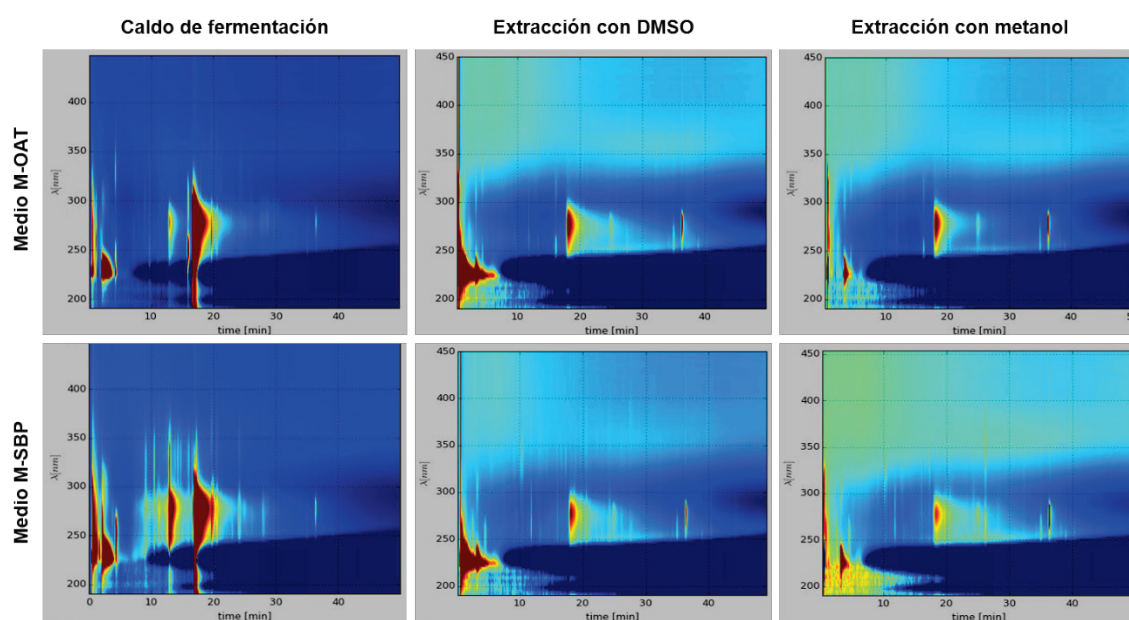
Desde el punto de vista de la seguridad de los productos derivados de *A. alternata*, como el extracto enzimático estudiado en el presente capítulo, las únicas toxinas contempladas como un posible riesgo toxicológico son siete metabolitos secundarios pertenecientes al grupo de las NHST: i) los derivados de la dibenzopirona, alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME) y altenueno (ALT); ii) el derivado del ácido tetrámico, ácido tenuazónico (TeA) y iii) las toxinas derivadas del perileno, altertoxina I, II y III (ATX-I, ATX-II y ATX-III) (Tölgyesi *et al.*, 2015). De entre ellas, AOH y AME son las más tóxicas, pudiendo actuar como mutágenos, carcinógenos, citotóxicos y genotóxicos, según estudios llevados a cabo en cultivos bacterianos y de líneas celulares de mamíferos (Schade y King, 1984; Noser *et al.*, 2011; Sivagnanam *et al.*, 2017). Además de estas 7 micotoxinas con posible riesgo toxicológico para mamíferos, otro de los metabolitos NHST más frecuentes es la tentoxina (TEN), una toxina que afecta a varias especies de vegetales, por medio de la inhibición de la producción de clorofila (Bottalico y Logrieco, 1998).

Con vistas a determinar la posible presencia de sustancias tóxicas en el extracto enzimático de *A. alternata* PDA1, se llevó a cabo un análisis del metaboloma de dicha cepa, cultivada en los medios M-SBP y M-OAT. Dicho análisis se basó en la realización de una caracterización metabolómica no dirigida, por medio de LC-qTOF-MS (cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con un analizador de cuadrupolo-tiempo de vuelo).

Para la caracterización metabolómica no dirigida mediante LC-qTOF-MS, se llevaron a cabo fermentaciones de *A. alternata* PDA1 sobre medio M-OAT y M-SBP, de acuerdo al protocolo detallado en el apartado 2.27. A partir de cada una de las fermentaciones, se tomaron muestras de caldo fermentación al tiempo de recogida determinado para actividad FAE óptima: 96 horas de cultivo, a 28 °C y 250 rpm. El volumen de caldo de fermentación recuperado fue filtrado y separado en tres tipos de muestras: caldo de fermentación sin tratar, extracción mediante DMSO y extracción mediante metanol. Los tres tipos de muestra fueron dispensados en placas de 96 pocillos transparentes, selladas con una tapa de silicona para evitar la evaporación y contaminación

de las muestras, y sometidos a análisis LC-DAD y qTOF-MS. Se empleó una columna *Zorbax bonus* RP2,1 x 50 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ , con agua Milli-Q acidificada con 0,1 % (v/v) de ácido fórmico y acetonitrilo como fase móvil. Se incluyeron blancos y controles negativos. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente.

A partir de cada muestra, se obtuvieron *isoplots* LC-DAD, mediante *Python* (apartado 2.27). Dichos *isoplots* constituyen representaciones gráficas realizadas a partir de datos obtenidos sobre los espectros UV-Vis de cada muestra, en un rango de longitudes de onda comprendido entre 200 y 600 nm (Fig. 3.30). Estas representaciones gráficas se emplearon como una primera aproximación para comparar las diferencias entre las muestras. La distribución de los picos de intensidad respecto a longitudes de onda fue similar en las muestras obtenidas de M-OAT y de M-SBP, con una mayor intensidad entre 200 y 350 nm. Según se aprecia en la Fig. 3.30, el número de picos presentes en la muestra de sobrenadante procedente de medio M-SBP fue mayor que en la muestra de M-OAT. En cuanto a las extracciones llevadas a cabo con DMSO y metanol, el comportamiento fue similar, con más señales en las muestras obtenidas a partir de medio M-SBP. Esto indicó que, de acuerdo al análisis cromatográfico, el número de metabolitos presentes en el extracto enzimático de *A. alternata* PDA1 fue mayor en el medio M-SBP.



**Fig. 3.30.** *Isoplots* LC-DAD de las muestras de *A. alternata* PDA1, generados mediante *Python*. Los colores cálidos representan una mayor intensidad de la señal, correspondiente con un pico. El eje de abscisas representa el tiempo de carrera (min) y el de ordenadas la longitud de onda (nm). Se muestran *isoplots* representativos de las muestras de sobrenadante sin tratar y extracciones con DMSO y metanol, a partir de medio M-OAT y medio M-SBP.

Los datos de los centroides LC-MS se procesaron por medio de los programas *MassHunter Qualitative Analysis Software* v. B.04.00 (Agilent Technologies) y *Mass Profiler Professional* v. 2.1.5 (MPP; Agilent Technologies), obteniéndose 208 masas no presentes en el control. Dichos datos se emplearon para llevar a cabo búsquedas frente a la base de datos *MassHunter METLIN Metabolite PCD* y a bases de datos de compuestos bioactivos desarrolladas por la organización de investigación SINTEF (Trondheim, Noruega). Por medio de esta búsqueda, fue posible llevar anotar las posibles identidades de más de 20 metabolitos secundarios en las muestras de *A. alternata* PDA1 (Tabla 3.18). Las coincidencias encontradas fueron examinadas en las bases de datos PubChem (Kim *et al.*, 2016) y ChemSpider (Williams y Tkachenko, 2014), para obtener información adicional sobre sus números de identificación, estructura, literatura relacionada, etc.

Para cada anotación, el programa informático determinó un valor de puntuación (*Database Score*, entre 0 y 100), en base a dos parámetros: i) el error entre la masa experimental y la masa teórica de la coincidencia en bases de datos, medido en ppm y ii) la distribución isotópica de cada compuesto. Cuanto más próximo a 100 fue el valor de puntuación de la anotación, más fiable fue la misma. Únicamente se aceptaron las anotaciones cuya puntuación fue mayor de 70.

Entre los grupos de compuestos que se hallaron, se incluyen péptidos, ácidos grasos y compuestos derivados, glicerofosfolípidos, compuestos relacionados con el complejo de la vitamina D y otros metabolitos secundarios.

Entre los **derivados de ácidos grasos** posiblemente presentes en cultivos de *A. alternata* PDA1 sobre medio M-SBP, se encontró la oleamida. Esta amida de ácidos grasos se ha hallado previamente en otros ascomicetos, como *Botryodiplodia theobromae*, un endófito capaz de producir sustancias antibacterianas, asociado a plantas como el drago (Zaher *et al.*, 2015). La oleamida se ha descrito como molécula bioactiva, sobre todo por sus capacidades en la señalización celular, con potenciales aplicaciones en la prevención de la enfermedad de Alzheimer, tratamiento de trastornos del sueño y depresión, como antiinflamatorio, etc. (Farrell y Merkle, 2008; Nam *et al.*, 2017). También se han identificado oleamidas en un producto lácteo fermentado por *Penicillium candidum*, en un estudio que ha relacionado estos compuestos con un posible efecto preventivo de enfermedades neurodegenerativas, como la demencia (Ano *et al.*, 2015).

**Tabla 3.18. Posibles metabolitos en el caldo de fermentación de *A. alternata* PDA1.** Se indica compuesto; puntuación de la coincidencia con la base de datos (*Score*); masa (g/mol); tiempo de retención (min); condiciones en las que se halló el compuesto (sombreado si se encontró. Muestras: 1 y 4: caldo fermentación; 2 y 5: extracción DMSO; 3 y 6: extracción metanol. 1, 2 y 3: M-OAT; 4, 5 y 6: M-SBP); fórmula del compuesto e identificadores (número CAS; ML: identificador de METLIN; CID de PubChem).

Compuesto	Score	Masa	TR	1	2	3	4	5	6	Fórmula	CAS	ML	CID
<b>PÉPTIDOS</b>													
Asp Trp Ala	76,94	412,136	7,46	■			■			C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>		16386	
Trp Gly Asp	90,28	376,138	9,01	■						C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>		18481	
	83,76	376,139	9,06										
Met Trp Trp	75,91	521,211	10,57				■			C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> S		16017	
His Met	90,93	308,091	10,58					■		C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S		23706	
Met His Lys	86,29	414,204	27,80	■	■	■	■	■	■	C <sub>17</sub> H <sub>30</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S		18880	
<b>ÁCIDOS GRASOS Y DERIVADOS</b>													
Ácido 12-oxo-9-octadecenoico	73,55	294,219	21,40	■						C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	68396-17-8	35849	349300
	82,00	294,220	23,78	■									
Oleamida	76,23	281,272	40,38					■		C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> NO	301-02-0	4115	5283387
Ácido 13E,17-octadecadienoico	91,81	280,240	43,43						■	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>		34967	5312454
Ácido 2,4,6-trimetil-2,15-tetracosadienoico	87,22	428,364	50,35					■		C <sub>27</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>		35339	9543646
<b>GLICEROFOSFOLÍPIDOS</b>													
GPEtn(9:0/9:0)[U]	80,50	495,294	17,36	■						C <sub>23</sub> H <sub>46</sub> NO <sub>8</sub> P		40682	
	98,07	495,297	17,85	■									
GPEtn(14:0/10:0)[U]	90,89	579,391	39,50					■		C <sub>29</sub> H <sub>58</sub> NO <sub>8</sub> P		40460	9546766
	80,65	579,391	54,03					■					
GPEtn(16:0/18:2(9Z,12Z))	97,99	737,497	48,88						■	C <sub>39</sub> H <sub>74</sub> NO <sub>8</sub> P		40441	52925127
GPEtn(16:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	97,64	739,514	51,74						■	C <sub>41</sub> H <sub>74</sub> NO <sub>8</sub> P		40495	52925126
	88,57	739,511	51,87					■					
<b>COMPUESTOS RELACIONADOS CON LA VITAMINA D</b>													
5(E)-1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-24-epivitamina D2	97,21	428,329	45,31					■		C <sub>28</sub> H <sub>44</sub> O <sub>3</sub>		41920	9547244
	89,87	428,330	45,31					■					
	73,43	428,328	54,01	■	■								
(22E,24E)-1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-22,23,24,24a-tetradehidro-24a-homovitamina D3	83,79	426,314	52,00					■		C <sub>28</sub> H <sub>42</sub> O <sub>3</sub>		42249	9547461
(24R)-1 $\alpha$ ,24,25-trihidroxivitamina D2	86,35	444,324	54,02	■	■			■		C <sub>28</sub> H <sub>44</sub> O <sub>4</sub>	100496-04-6	41928	9547253
Vitamina D2	81,49	396,339	54,03	■	■			■		C <sub>28</sub> H <sub>44</sub> O	50-14-6	216	5280793
<b>TOXINAS</b>													
Aflatoxina B1	90,27	312,064	21,29					■	■	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	1162-65-8	41030	186907
<b>OTROS METABOLITOS E INTERMEDIARIOS</b>													
Succiniladenosina	81,37	383,108	3,99	■				■		C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub>	4542-23-8	5867	126969142
d-Canforsulfonato	85,78	254,059	20,98					■		C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub> S	3144-16-9	2955	65617
3,3',5,5'-Tetra-tert-butil-4,4'-dihidroxibifenilo	81,60	410,319	40,16						■	C <sub>28</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	128-38-1	2100	67185
	82,14	410,318	44,26		■								
	85,05	410,319	44,30					■					
Ergosta-5,7,22,24(28)-tetraen-3 $\beta$ -ol	92,74	394,323	45,31						■	C <sub>28</sub> H <sub>42</sub> O	29560-24-5	3510	11090531
	91,46	394,323	54,02			■		■					

Se identificaron también posibles **glicerofosfolípidos**, que son lípidos complejos muy abundantes en las membranas celulares (Weete, 1980). Esto explica su presencia, principalmente, en las muestras correspondientes a las extracciones con DMSO y metanol, las cuales se llevaron a cabo incluyendo también masa micelial.

Varios de los metabolitos posibles que fueron identificados se correspondieron con **compuestos relacionados con la vitamina D**. En concreto, uno de los compuestos hallados fue la 5(E)-1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-24-epivitamina D2, un derivado de la vitamina D2 o ergocalciferol, con actividad frente al raquitismo y capaz de producir la diferenciación celular en la línea HL-60 de promielocitos humanos (Milne y Delander, 2007). Otros metabolitos bioactivos fueron el derivado de la vitamina D3 o colecalciferol (22E,24E)-1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-22,23,24,24a-tetradehidro-24a-homovitamin D3, el cual posee efecto calciúrico, inhibe la proliferación de la línea celular de leucemia mielomonoblástica U937 e induce su diferenciación (Rots *et al.*, 1999; Milne y Delander, 2007). Por último, se identificó la posible presencia del derivado de la vitamina D2 (24R)-1 $\alpha$ ,24,25-trihidroxivitamin D2 y de la propia vitamina D2. La vitamina D2 se emplea como agroquímico, rodenticida y en el tratamiento del raquitismo (Milne y Delander, 2007). Esta vitamina está implicada en la homeostasis del calcio y el fosfato (Geller y Adams, 2008). La vitamina D2 puede ser producida por hongos pertenecientes a grupos diversos, incluyendo basidiomicetos (*Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes*, etc.) y ascomicetos (levaduras, hongos filamentosos endófitos, especies parásitas como *Cordyceps militaris*, etc.), a través de la irradiación UVB del ergosterol (Hohman *et al.*, 2011; Keegan *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2015; Sławińska *et al.*, 2016).

Además de los anteriormente descritos, los análisis LC-qTOF-MS a partir de cultivos de *A. alternata* PDA1 permitieron identificar **otros posibles metabolitos e intermediarios metabólicos**. Entre ellos, destacaron el intermediario de la síntesis de biotina d-canforsulfonato (Wolf y Sternbach, 1949) y el ergosta-5,7,22,24(28)-tetraen-3 $\beta$ -ol, que participa en la ruta de biosíntesis del ergosterol (Alcazar-Fuoli y Mellado, 2013). Por último, se identificó el 3,3',5,5'-tetra-tert-butil-4,4'-dihidroxibifenilo, un polifenol con capacidad antioxidante y neuroprotectora. Sustancias procedentes de cianobacterias relacionadas con este polifenol han demostrado actividad antifúngica, antialgal y antibacteriana, lo que las convierte en compuestos prometedores a emplear en tratamientos contra la corrosión inducida por microorganismos (Volk y Furkert, 2006).

En lo que respecta a la presencia de **toxinas**, la única micotoxina cuya posible presencia se identificó fue la aflatoxina B1, que se halló en todas las muestras procedentes de medio M-SBP. La detección de esta micotoxina también en el análisis del medio M-SBP sin inocular indicó que su posible origen fue el propio sustrato lignocelulósico (la pulpa de remolacha). Los principales productores de aflatoxinas son hongos pertenecientes al género *Aspergillus* spp. (Frisvad *et al.*, 2005; Tola y Kebede, 2016). La aflatoxina B1 es el carcinógeno de origen natural más potente que se conoce y, además, posee actividad inmunosupresora (Roze *et al.*, 2013). Las aflatoxinas se encuentran entre las principales micotoxinas que contaminan alimentos y cosechas con importancia económica, suponiendo un riesgo para la salud. Su presencia en la pulpa de remolacha es posible y ha sido indicada en estudios previos (Skrinjar *et al.*, 1992; Hashemi, 2016). Teniendo en cuenta el riesgo sanitario que puede suponer que esta micotoxina se encuentre en un producto con aplicaciones comerciales, se llevó a cabo un nuevo análisis LC-qTOF-MS, para evaluar su presencia en el extracto enzimático. Dicho análisis confirmó la presencia de aflatoxinas en el medio de cultivo, no hallándose en una dilución 1:10 del extracto enzimático. No obstante, se detectó aflatoxina B1 en la dilución 1:100, si bien no apareció en todas las réplicas analizadas, y la intensidad del pico correspondiente fue mucho menor que en la muestra de sobrenadante de la fermentación. Estos resultados indican que el tratamiento realizado para obtener el extracto enzimático, que incluye precipitación, centrifugaciones y lavados, fue capaz de eliminar dicha micotoxina en gran parte del producto final, por lo que la incorporación de nuevos lavados y diálisis de las muestras de extracto enzimático podría conseguir la completa eliminación de la presencia de estas toxinas fúngicas.

Ninguna de las diferentes micotoxinas producidas por *Alternaria* spp. que se conocen fue identificada en las muestras analizadas. Dado que la búsqueda automática frente a bases de datos no devolvió ninguna coincidencia, se llevó a cabo una búsqueda manual entre los compuestos sin anotar, para encontrar masas próximas a las de dichos metabolitos tóxicos (Tabla 3.19).

La búsqueda manual reflejó la presencia de masas que, si bien no fueron coincidencias exactas, se encuentran próximas a las de micotoxinas de *Alternaria* spp., por lo que no pudo descartarse su presencia, a pesar de no haberse hallado coincidencias automáticas. En este sentido, sería necesario realizar nuevos análisis LC-qTOF-MS empleando patrones conocidos de dichas micotoxinas, o bien análisis MS-MS, dirigidos específicamente a la determinación de micotoxinas de *A. alternata*.

**Tabla 3.19. Toxinas más importantes producidas por *A. alternata*.** Se indican las toxinas, su masa teórica (g/mol), de acuerdo a la base de datos PubChem, y la masa determinada o empleada para el análisis en varias publicaciones. En la última columna, se indican masas sin anotar encontradas en el presente trabajo, próximas a dichos valores, incluyendo entre paréntesis el tiempo de retención (min).

Toxina	Masa teórica	(Tölgyesi <i>et al.</i> , 2015)	(Sivagnanam <i>et al.</i> , 2017)		(Hu <i>et al.</i> , 2017)	(Noser <i>et al.</i> , 2011)	(Zwickel <i>et al.</i> , 2016)	Masas sin anotar obtenidas en el presente trabajo
			Patrón	Trigo + patrón				
TeA	197,234	376,4			196,1	198,10	196,0	199,115 (16,97)
AOH	258,229	257,1	259,065	259,051	257,05	256,96	257,0	260,1195 (3,78)
AME	272,256	271,1	273,074	273,079	271,06	271,04	270,9	271,107 (5,42); 272,086 (21,30)
ALT	292,287	291,2			291,09	291,00	291,0	
ATX-I	352,342					351,06	351,0	352,096 (19,75); 352,114 (22,96); 352,262 (46,29)
ATX-II	350,326						349,0	
ATX-III	348,310							348,065 (26,23)
TEN	414,506	413,5	415,248	415,253		415,19	413,0	414,227 (20,16); 415,236 (22,12); 415,236 (22,36); 415,237 (22,80); 415,236 (23,98); 413,221 (24,05); 415,237 (29,71)

En resumen, el análisis metabolómico no dirigido mediante LC-qTOF-MS aportó información útil acerca de algunos de los posibles metabolitos presentes. Sin embargo, ha de tenerse en cuenta que para conseguir identificaciones completamente verificadas sería necesario complementar estos estudios con un análisis MS en tándem, o llevar a cabo los análisis empleando patrones de los compuestos concretos a analizar (Zhu *et al.*, 2013; Creek *et al.*, 2014).

### 3.2.9. Escalado del proceso fermentativo de *A. alternata* PDA1 para la producción de FAEs

La detección de un producto de interés producido por un microorganismo constituye únicamente el primer paso para la obtención de un cóctel enzimático a nivel industrial. Con vistas a caracterizar el proceso productivo, es necesario estudiar las condiciones del escalado del proceso fermentativo a mayores volúmenes, con el fin de obtener niveles de producción compatibles con la comercialización (Burke, 2008).



### 3.2.9.1. Tipo de fermentación

Las fermentaciones pueden llevarse a cabo de acuerdo a un diseño de tipo *batch* (discontinuo o en lote), *fed-batch* (en lote alimentado) o continuo. En los procesos productivos en la industria, lo habitual es optar por alguno de los dos sistemas tipo *batch*, debido a que la producción de tipo continuo no permite identificar lotes individuales, de cara a los controles de calidad y seguridad del producto. Además, la producción de tipo continuo supone la sucesión de múltiples generaciones del organismo productor dentro del mismo biorreactor, durante un tiempo prolongado, por lo que aumenta el riesgo de que se puedan producir mutaciones no deseadas y de que se contaminen los cultivos (Thiry y Cingolani, 2002).

Cada una de las dos variantes de fermentación en lotes (*batch* y *fed-batch*) posee ventajas e inconvenientes. La fermentación de tipo ***batch*** constituye el proceso más sencillo, consistente en la preparación del biorreactor conteniendo la carga total del medio de cultivo y el inóculo en un sistema cerrado, sin que tenga lugar la aportación posterior de nutrientes ni la adición del microorganismo productor (únicamente pueden añadirse soluciones de mantenimiento del pH o antiespumantes). El proceso fermentativo finaliza cuando el crecimiento del microorganismo se detiene, debido al agotamiento de nutrientes o la acumulación de productos de desecho derivados del metabolismo, o bien tras un periodo de tiempo fijo, o cuando se alcanza un determinado nivel de concentración de producto. Las ventajas de este sistema son varias: i) se trata del sistema más sencillo y requiere de poco equipamiento; ii) al ser el método con tiempos de fermentación más cortos, es menos probable que se produzca un fallo del sistema, por lo que es robusto y fiable; iii) al constituir un sistema cerrado, se reduce el riesgo de contaminación y iv) al realizarse en lotes separados, es fácil llevar a cabo la trazabilidad del producto. Sin embargo, el sistema en *batch* también presenta inconvenientes: i) es menos eficiente si el producto de interés es un metabolito primario, asociado al crecimiento del microorganismo productor, puesto que las densidades ópticas que se alcanzan son menores que en el tipo *fed-batch*; ii) puede existir variabilidad entre lotes; iii) pueden aparecer procesos de lisis celular en las últimas etapas de la fase estacionaria, cuando se produce el agotamiento de nutrientes, lo que puede afectar al rendimiento productivo y la calidad del producto y iv) el tiempo de limpieza de los fermentadores, esterilización y preparación del nuevo lote puede dar lugar a periodos en los que no tenga lugar la producción, que no son deseables en la industria (Macauley-Patrick y Finn, 2008).

A diferencia del sistema *batch*, el cultivo *fed-batch* es un sistema abierto, en el que se lleva a cabo la adición de sustratos, nutrientes o inductores dentro del biorreactor, una vez comenzada la fermentación. Las ventajas de este sistema son: i) es posible evitar la represión por catabolitos; ii) puede controlarse la tasa de crecimiento y la demanda de oxígeno; iii) puede conseguirse más biomasa y iv) permite reducir la viscosidad del caldo de cultivo (Macauley-Patrick y Finn, 2008).

Teniendo en cuenta que el objetivo del presente estudio fue determinar la morfología del hongo y la influencia del control del pH durante el cultivo en fermentador de *A. alternata* PDA1, y no mayores niveles de biomasa, en el presente trabajo se optó por un sistema de tipo *batch*.

Las fermentaciones se llevaron a cabo en biorreactores Braun Biostat® B, que tienen una capacidad de 5 L, empleando un volumen de trabajo de 3 L (apartado 2.4.1.3). Este fermentador incluye sistemas de monitorización y control del pH, temperatura, OD, aireación y agitación.

### *3.2.9.2. Influencia del control del pH durante la fermentación*

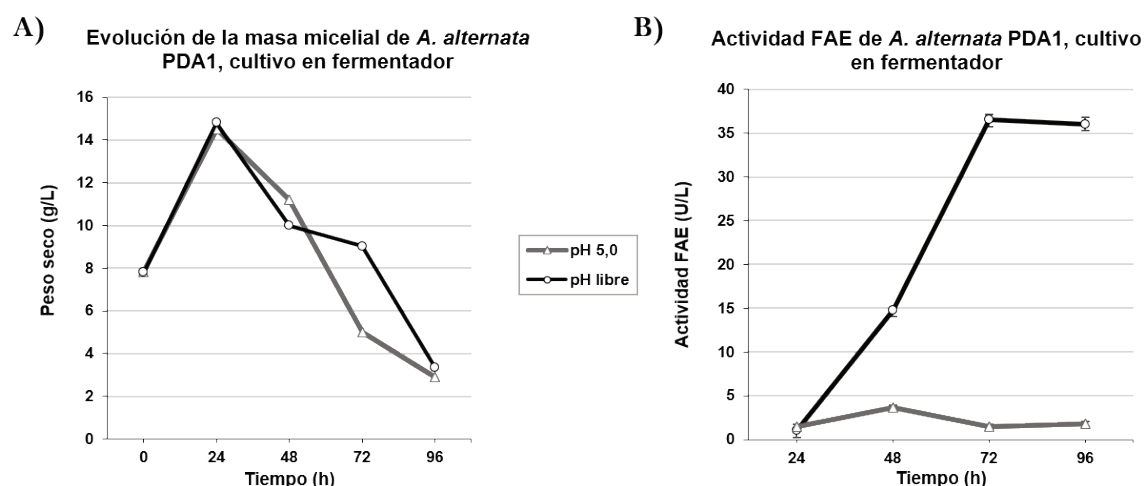
Al llevar a cabo el escalado de una fermentación, es necesario tener en cuenta una serie de variables: la aireación y agitación, el volumen de preinóculo, la morfología macro y microscópica (en el caso de microorganismos filamentosos), las presiones parciales en el fermentador, los cambios genéticos en el microorganismo productor, la temperatura y la disponibilidad de nutrientes (Couto y Toca-Herrera, 2007; Burke, 2008; Papagianni, 2014; Lu *et al.*, 2015).

Dada la gran cantidad de parámetros a optimizar en un proceso de escalado productivo, en el presente trabajo se decidió estudiar la influencia del control de una de las variables más importantes: **el pH**. El pH de una fermentación depende de factores tan diversos como la fuente de carbono empleada y su concentración, los procesos de proteólisis, la metabolización y el agotamiento de nutrientes, la lisis celular, etc. Además, el pH tiene una influencia directa en el crecimiento del microorganismo productor y en el rendimiento productivo (Burke, 2008).

Para el desarrollo de las fermentaciones, se llevó a cabo una estrategia basada en tres etapas consecutivas (apartado 2.7.3):

- 1) Etapa de reactivación. Durante esta primera fase, se llevó a cabo el cultivo de *A. alternata* PDA1 en placas de medio PW2, a partir de soluciones de esporas en glicerol al 20 % (v/v), almacenadas a -80 °C. Las placas se cultivaron durante 120 h a 28 °C.

- 2) Etapa de propagación o preparación del preinóculo. Las esporas presentes en las placas de la fase anterior se emplearon para llevar a cabo cultivos sumergidos, en medio MPPY, durante 24 h, a 28 °C y 250 rpm. En esta fase se consiguió una masa micelial uniforme y suficiente para ser empleada como preinóculo de las fermentaciones en biorreactor.
- 3) Etapa de fermentación. Se llevó a cabo la fermentación en biorreactores Braun Biostat® B, empleando un volumen de trabajo de 3 L de medio M-SBP por fermentador, en los que se incluyó un 5 % (v/v) de preinóculo cultivado durante 24 h. Las fermentaciones se llevaron a cabo a 28 °C, con una agitación inicial de 350 rpm, que se fue ajustando hasta 500 rpm para mantener el OD por encima del 70 %. La aireación fue constante, con una velocidad de 2,5 L/min, que equivalen a 0,83 vvm (volumen de aire/volumen de medio x min).



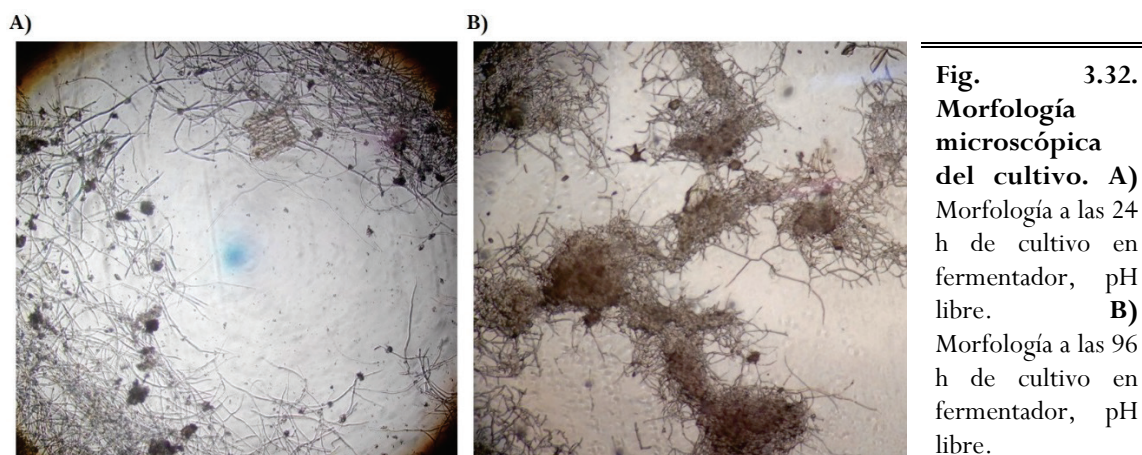
**Fig. 3.31. Curva de crecimiento y actividad FAE durante el cultivo en fermentador.** A) El crecimiento de *A. alternata* PDA1 se determinó por medio de la medida de peso seco. B) La actividad FAE se determinó de forma cuantitativa mediante la liberación de ácido ferúlico a partir de MFA (una unidad, U: cantidad de enzima requerida para liberar 1  $\mu$ mol de ácido ferúlico/min, bajo las condiciones analizadas).

Se hicieron recogidas de muestra cada 24 h, desde el inicio de la fermentación. Para ello, se extrajeron 20 mL de caldo de cultivo en cada tiempo de recogida, que fueron centrifugados dos veces a  $2.880 \times g$ , durante 5 min. El precipitado se empleó para la determinación de cantidad biomasa mediante la medida de peso seco a cada tiempo de recogida (apartado 2.7.3). Por su parte, el sobrenadante se filtró a través de filtros de  $0,22 \mu\text{m}$  de diámetro de poro y fue utilizado para determinar la actividad FAE frente a MFA (apartado 2.20.1) (Fig. 3.31). Además de la determinación del crecimiento y la actividad FAE, se registraron los valores de pH y OD en el

fermentador. Los valores se determinaron en dos tipos de fermentaciones: fermentaciones a pH libre y a pH regulado con NaOH 1M y HCl 1M, para mantenerse en un valor de pH 5,0.

Según se aprecia en la Fig. 3.31.A, tanto en la fermentación a pH libre como a pH regulado, se produjo un incremento de biomasa fúngica durante las primeras 24 h de cultivo, descendiendo paulatinamente a partir de este momento. Los niveles de crecimiento microbiano fueron muy similares entre una y otra condición de cultivo. Si se compara el crecimiento en fermentador con el crecimiento en matraz (Fig. 3.15.B), donde el valor máximo no superó los 12 g/L, frente a los más de 14 g/L de este caso, se pudo observar que el crecimiento del hongo fue mayor al llevar a cabo el escalado a mayores volúmenes. Además, el valor máximo de peso seco en fermentador se alcanzó a las 24 h, en lugar de a las 48 h, como ocurrió en el cultivo en matraz a menor volumen (Fig. 3.15.B). Así, el escalado también aumentó la velocidad de crecimiento del cultivo.

El descenso en los valores de peso seco a partir de las 24 h de cultivo en fermentador fue más brusco y más marcado que en el caso de cultivo en matraz (Fig. 3.15.B). Una posible explicación para este hecho pudo ser una mayor lisis celular, motivada por el sistema de agitadores y deflectores del fermentador, que podrían dar lugar a estrés mecánico que afecta el micelio (Couto y Toca-Herrera, 2007). Otra explicación podría venir dada por el modo de recogida de muestra, en el cual el volumen requerido se obtuvo a partir de tubos flexibles de diámetro estrecho. La morfología de un cultivo fúngico puede ser diversa, pudiendo presentar estructuras miceliales filamentosas dispersas, bolas o *pellets*, grumos, etc. (Couto y Toca-Herrera, 2007; Papagianni, 2014; Lu *et al.*, 2015). En el caso particular de este trabajo, una morfología macroscópica con bolas o agrupaciones podría determinar que únicamente aquella parte del cultivo que presentó una morfología filamentososa dispersa fuera capaz de atravesar el tubo de recogida. Esta hipótesis se verificó mediante la observación de las imágenes macro y microscópicas de las muestras recogidas y del cultivo a tiempo final. Según se aprecia en la Fig.3.32, la morfología del cultivo fue variando a lo largo de la fermentación, lo que también fue evidente a nivel macroscópico, pudiendo identificarse bolas y aglomeraciones. En un principio, se observó una morfología filamentososa dispersa, con pocas agrupaciones, mientras que dichas estructuras se fueron incrementando a medida que avanzó la fermentación. Este cambio en la morfología pudo determinar que, en las muestras recogidas a tiempo avanzado de fermentación, las agrupaciones de micelio no atravesaran el tubo de recogida. La observación al microscopio permitió determinar que, hasta las 72 h de cultivo, los fenómenos de lisis celular no tuvieron una presencia importante.



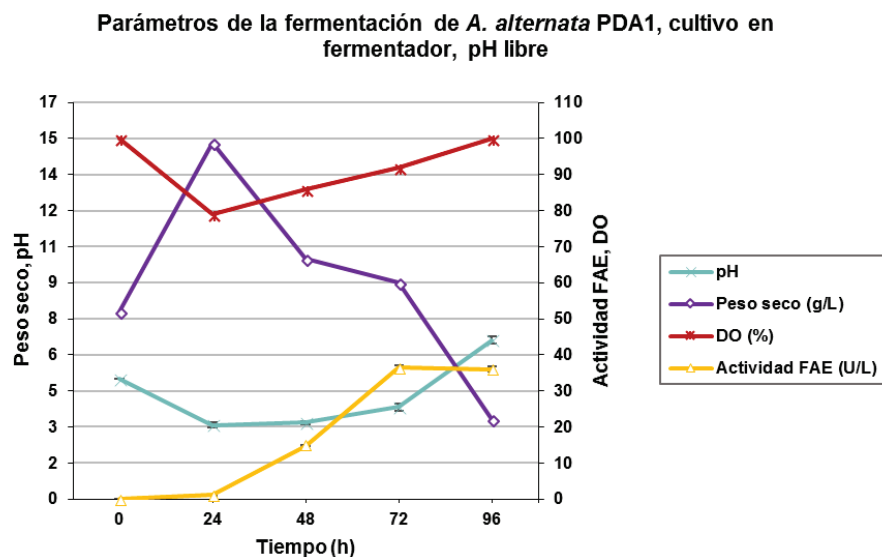
**Fig. 3.32. Morfología microscópica del cultivo. A)** Morfología a las 24 h de cultivo en fermentador, pH libre. **B)** Morfología a las 96 h de cultivo en fermentador, pH libre.

En cuanto a la actividad FAE del caldo de cultivo (Fig. 3.31.B), en la fermentación a pH libre se observó un aumento desde las 24 hasta las 72 h de fermentación, momento en el cual se estabilizó. Sin embargo, en el fermentador a pH regulado a 5,0, apenas se detectó actividad, lo que indicó que el control del pH fue negativo para la actividad FAE. Estudios previos han hallado condiciones óptimas para la producción de enzimas en especies de *Alternaria* sp. distintos a los valores óptimos de actividad de la enzima (Jönsson, 1967; Chandrasekaran y Sathiyabama, 2013).

### 3.2.9.3. Análisis de los parámetros de la fermentación y determinación del tiempo óptimo de recogida

El biorreactor empleado, Braun Biostat<sup>®</sup> B, permitió llevar a cabo la monitorización de los parámetros de fermentación y su análisis, junto con el crecimiento microbiano y la actividad FAE (Fig. 3.33), con vistas a determinar el momento óptimo de recogida del caldo de fermentación para la recuperación de extractos enzimáticos lignocelulolíticos de *A. alternata* PDA1.

La monitorización de los parámetros del cultivo permitió obtener información valiosa acerca del proceso fermentativo (Fig. 3.33). Tras las primeras 24 h de fermentación, se produjo una disminución del pH, hasta valores de 3,1-3,2. Esta disminución coincidió con el aumento de la biomasa y con un mayor consumo de oxígeno por parte del cultivo (menor valor de OD). La acidificación del medio pudo deberse a la utilización de las fuentes de carbono, con producción de metabolitos ácidos (Burke, 2008), aunque las fluctuaciones de pH en el medio de cultivo a lo largo de una fermentación dependen de varios factores (Coote y Kirsop, 1976; Papagianni, 2004).



**Fig. 3.33.**  
Evolución de los parámetros de la fermentación. Fermentación a pH libre, medio M-SBP.

Hacia las 96 h de fermentación, se observó una alcalinización importante del medio, que pasó de un valor de pH de 3,8 a las 72 h, hasta pH 6,6, a las 96h. Asimismo, se apreció una disminución del consumo de oxígeno, aumentando el valor de OD (Fig. 3.33). Estos parámetros, junto con la disminución de peso seco, pudieron ser indicativos de muerte celular del cultivo.

Atendiendo a la relación entre la curva de crecimiento y la actividad FAE en el fermentador a pH libre (Fig. 3.33), el modo de formación de producto se ajustó a un tipo de producción no acoplado al crecimiento, en el cual el pico productivo tiene lugar cuando no se está produciendo aumento de la biomasa microbiana, durante la fase estacionaria o idiofase (Macauley-Patrick y Finn, 2008). Sin embargo, los bajos niveles de actividad FAE en la primera recogida (24 h) pueden deberse a que, inicialmente, el hongo utilizó como fuente de carbono la glucosa presente en el medio, más fácilmente metabolizable y, una vez se agotó, pasó a emplear el sustrato lignocelulósico (pulpa de remolacha), induciéndose la expresión de enzimas lignocelulolíticas.

Teniendo en cuenta la curva de crecimiento y la actividad FAE (Fig. 3.33), las condiciones óptimas para la producción de FAEs en biorreactor, fueron el cultivo en fermentador en medio con pH inicial 5,0, sin control posterior, con una agitación de 350-450 rpm y realizando la recogida del caldo de cultivo a las 72 h de fermentación (Burke, 2008). Considerando que en el cultivo en matraz con 500 mL de medio se determinó un tiempo óptimo de recogida a las 96 h (apartado 3.2.2), el escalado a mayores volúmenes permitió reducir el tiempo de fermentación, lo que puede reducir los costes de producción, de cara a una posible aplicación industrial.

# Capítulo 3

## 3.3. Expresión heteróloga de la enzima PrFaeB de *P. rubens* en levaduras del género *Komagataella* spp.





### 3.3.1. Introducción y objetivos del capítulo

*P. rubens* es una especie de hongos ascomicetos conocida por incluir cepas que producen antibióticos  $\beta$ -lactámicos, como la penicilina. Anteriormente, estas cepas productoras de antibióticos, como es el caso de *P. rubens* Wisconsin 54-1255, se englobaban dentro de la especie *P. chrysogenum* (Houbraken *et al.*, 2011a).

Además de su interés como productor de antibióticos, *P. rubens* es un hongo quimiorganótrofo, con una nutrición de tipo heterótrofa y absorbitiva, por lo que es capaz de producir y secretar un gran número de hidrolasas (McLaughlin *et al.*, 2009). Entre dichas hidrolasas se encuentran enzimas lignocelulolíticas capaces de degradar componentes de la pared celular vegetal, incluidas FAEs (van den Brink y de Vries, 2011). Trabajos previos del grupo de investigación han analizado este tipo de actividad enzimática en la cepa *P. rubens* Wisconsin 54-1255, construyendo transformantes que sobreexpresan PrFaeA y PrFaeB (Rodríguez-Castro, 2017). Dichas enzimas fueron designadas como PcFaeA y PcFaeB en la Tesis Doctoral de la Dra. R. Rodríguez Castro; sin embargo, en el presente trabajo se actualizó la nomenclatura al nombre específico de la cepa productora (*P. rubens* Wisconsin 54-1255), sustituyendo Pc- por Pr-, dado que el término Pr- ya se está empleando en publicaciones (Faulds, 2010; Mäkelä *et al.*, 2018).

En el trabajo de Tesis Doctoral de la Dra. R. Rodríguez Castro, se realizaron estudios para determinar los valores de pH y temperatura óptimos para la actividad FAE de dichas enzimas, resultando ser de pH 5,0 y 50-55 °C, respectivamente. Sin embargo, los ensayos de actividad FAE llevados a cabo en dicho trabajo se centraron en el extracto enzimático producido por la cepa, es decir, una mezcla compleja de diferentes hidrolasas secretadas por el hongo para degradar biomasa vegetal. Puesto que se han identificado hasta 5 posibles FAEs producidas por *P. rubens* Wisconsin 54-1255 (Dilokpimol *et al.*, 2016), los óptimos de actividad FAE en el extracto enzimático pueden deberse a la acción sinérgica de varias FAEs.

Para llevar a cabo la caracterización enzimática de las enzimas PrFaeA y PrFaeB, así como para conseguir preparados puros con posibles aplicaciones industriales, uno de los objetivos de la presente Tesis Doctoral fue conseguir su expresión heteróloga en cepas de la levadura metilotrófica *Komagataella* spp. Las enzimas recombinantes fueron, posteriormente, purificadas y sometidas a ensayos para determinar sus óptimos de actividad en cuanto a pH y temperatura, su

estabilidad térmica, la respuesta a inhibidores, sus cinéticas enzimáticas y otras características, como son el peso molecular, el grado de glicosilación y el pI.

### **3.3.2. Expresión inducible de FAEs de *P. rubens* Wisconsin 54-1255 en *Komagataella* spp.**

Para la caracterización de las FAEs PrFaeA (CAP86030; nombre de entrada en UniProt B6HDC6\_PENRW) y PrFaeB (CAP80457; nombre de entrada de UniProt: B6GXZ9\_PENRW) de *P. rubens* Wisconsin 54-1255, se llevó a cabo su expresión heteróloga en *Komagataella* spp.

Debido a las dificultades encontradas durante el proceso de clonación y expresión, en el presente trabajo se emplearon tres cepas de *K. phaffii* (X-33, SMD1168H y GS115) y tres vectores plasmídicos (pPICZ $\alpha$ A, pPIC9K y pGAPZ $\alpha$ A). *Komagataella* spp. no dispone de vectores episomales estables, por lo que los tres utilizados son de tipo integrativo y bifuncional, permitiendo llevar a cabo la selección tanto en *E. coli* como en la levadura, sin necesidad de emplear otro plásmido (Cregg, 2007). Estos vectores contienen secuencias homólogas a regiones del genoma de la levadura, lo que permite su integración en el ADN cromosómico, mediante recombinación, inserciones o sustituciones. Los tres vectores utilizados incluyen una señal de secreción y sus características concretas se describen en el apartado 2.2.3.

#### *3.3.2.1. Estrategia de clonación de PrFaeA y PrFaeB en plásmidos de expresión inducible en levaduras*

La secuencia nucleotídica del gen *faeA* (Pc12g08300) presenta 933 pb e incluye un intrón de 90 pb. Por su parte, la secuencia del gen *faeB* (Pc20g07010) presenta 1643 pb y un intrón de 59 pb. En trabajos publicados anteriormente, la clonación de genes de hongos filamentosos que codifican para FAEs en *Komagataella* spp. se ha llevado a cabo partiendo de ADNc, obtenido a partir de reacciones de PCR de extensión solapada, o bien a partir de RT-PCR (Juge *et al.*, 2001; Crepin *et al.*, 2003a; Koseki *et al.*, 2005; Topakas *et al.*, 2012; Udatha *et al.*, 2012; Gong *et al.*, 2013; Zeng *et al.*, 2014; Oleas *et al.*, 2016; Kelle *et al.*, 2016; Oleas *et al.*, 2017). El ADNc se sintetiza a partir de una hebra simple de ARNm maduro y, por lo tanto, carece de intrones (regiones no codificantes de un gen). Teniendo este hecho en consideración, en el presente trabajo se decidió emplear ADNc para llevar a cabo las construcciones para levaduras.

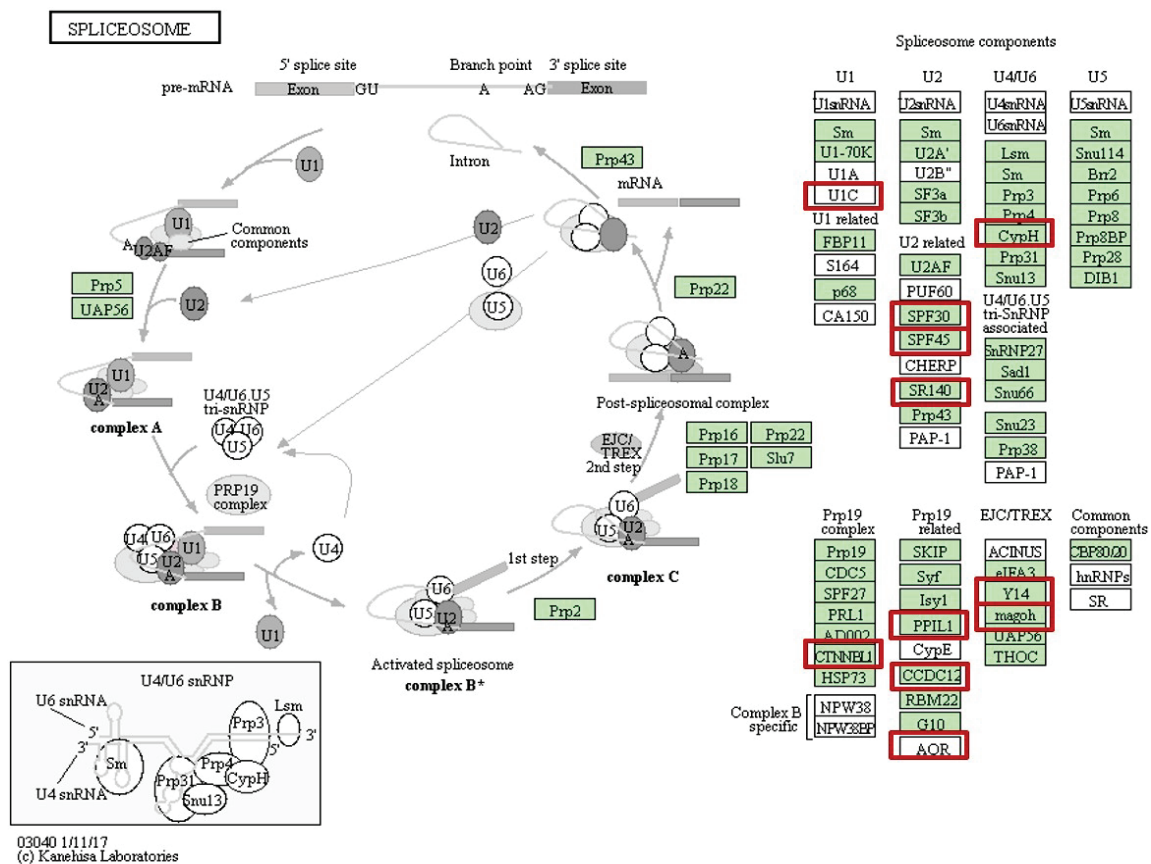
Además, se consideró la posibilidad de realizar construcciones a partir de ADN con intrones. Existen indicios que apuntan a que ciertas levaduras son capaces de procesar intrones de otras especies, incluyendo especies alejadas filogenéticamente (Woudt *et al.*, 1985; Trachtulec y Forejt, 1999). Para que esto sea posible, es necesario que estén presentes una serie de elementos conservados interespecíficos dentro la secuencia del intrón: entre otros, en el sitio 5' (donador), en el sitio 3' (aceptor) y en una secuencia interna, denominada sitio de ramificación. Estos elementos se han identificado previamente en intrones de *K. phaffii* (De Schutter *et al.*, 2009; comunicación personal Dr. K. De Schutter).

Para que los intrones sean eliminados, además de reconocerse sus secuencias, debe existir similitud en la maquinaria celular que se encarga de procesarlos: El espliceosoma, ayustosoma o complejo de corte y empalme es un complejo presente en organismos eucariotas, formado por proteínas y ARNpn (ARN pequeño nuclear). Su función es eliminar los intrones presentes en ciertos transcritos primarios (pre-ARNm) y empalmar los fragmentos exónicos, de modo que se obtengan ARNm maduros (Kaufer, 2000; Nilsen, 2003).

El grado de similitud entre los espliceosomas de *P. rubens* y *K. phaffii* se analizó por medio de la base de datos KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*. <http://www.genome.jp/kegg/>). De acuerdo a los diagramas de sus espliceosomas, *K. phaffii* no posee 10 de los 63 elementos del espliceosoma de *P. rubens* (Fig. 3.34), mientras que presenta 2 que *P. rubens* no tiene (U1C y AQR). Dentro de los elementos comunes, se llevó a cabo un análisis de homología, determinando el porcentaje de similitud mediante el programa de alineamiento de secuencias proteicas BLASTP (apartado 2.8). La mayor parte de los componentes del espliceosoma de *P. rubens* se hallaron también en el de *K. phaffii* (Tabla suplementaria 1), aunque los porcentajes de similitud entre algunos de los componentes no fueron muy elevados (21-76 %).

Para la **clonación de los genes *faeA* y *faeB***, se llevó a cabo la amplificación de sus secuencias génicas mediante reacciones de PCR, utilizando como ADN molde construcciones plasmídicas desarrolladas en trabajos previos del grupo de investigación (Rodríguez-Castro, 2017). En concreto, se emplearon los plásmidos pS*faeA* y pS*faeB*, contruidos a partir del vector pIBRC43-BglII, para *faeA* y *faeB*, respectivamente. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo mediante la ADN polimerasa de alta fidelidad *Hybrid* (EurX) (apartado 2.10.3), con una concentración final de 0,4  $\mu$ M de las parejas de nucleótidos cebadores PP-A-F/PP-N-A-R y

PP-B-F/PP-N-B-R, para *faeA* y para *faeB*, respectivamente. Ambas parejas se diseñaron con un sitio de corte para EcoRI en el extremo 5' y un sitio de corte para NotI en el 3' (apartado 2.2.4).



**Fig. 3.34. Diagrama del espliceosoma de *P. rubens* y comparativa con *K. phaffii*.** El sombreado verde indica que la proteína forma parte del espliceosoma de *P. rubens*. El recuadro rojo identifica aquellos elementos diferenciales entre ambos organismos. (Modificado a partir de la base de datos KEGG).

La **amplificación de las secuencias ADNc de los genes *faeA* y *faeB***, se llevó a cabo mediante RT-PCR, según el procedimiento que se indica en el apartado 2.17.4, con el sistema comercial *SuperScript® III One-Step* (Invitrogen). Este sistema permite llevar a cabo la retrotranscripción de ARN, obteniendo ADNc, a partir del cual se amplifican las secuencias génicas de interés, mediante PCR de alta fidelidad. Como molde para las reacciones de RT-PCR, se utilizó ARN total de *P. rubens* Wisconsin 54-1255, obtenido de acuerdo al apartado 2.17.1, a partir de cultivos en medio M-SBP recogidos a las 50 h de fermentación. Previamente a su empleo, el ARN total fue tratado con ADNasas para eliminar el posible ADNg contaminante (apartado 2.17.3). La integridad de muestras de ARN se analizó mediante el equipo *Bioanalyzer 2100* (Agilent). La ausencia de ADNg contaminante se verificó mediante reacciones de PCR sin transcripción inversa, a partir de las muestras empleadas como molde. Los cebadores

empleados para la amplificación de *faeA* y *faeB* ADNc fueron los indicados previamente para las construcciones con intrones (PP-A-F/PP-N-A-R y PP-B-F/PP-N-B-R).

Una vez amplificadas las secuencias de interés, **el producto de PCR o RT-PCR se digirió** con EcoRI y NotI, dando lugar a extremos cohesivos. Dichas endonucleasas se emplearon, igualmente, para digerir el vector plasmídico integrativo bifuncional pPICZ $\alpha$ A. Este plásmido presenta sitios de corte únicos para ambas enzimas de restricción, así como una señal de secreción que la levadura puede reconocer (el factor  $\alpha$  de *S. cerevisiae*). Además, pPICZ $\alpha$ A presenta el promotor de la alcohol oxidasa 1 (*AOX1*), un promotor fuerte inducible por metanol, y el gen *Sh ble*, que confiere resistencia al antibiótico Zeo (Cereghino y Cregg, 2000), como marcador de selección (apartado 2.2.3).

Las secuencias de los genes *faeA* y *faeB*, digeridos mediante enzimas de restricción, se sometieron a clonación dirigida en el vector pPICZ $\alpha$ A, de acuerdo al protocolo de **ligación** (apartado 2.10.7). Así, se obtuvieron los plásmidos de expresión heteróloga pPICZ $\alpha$ A-*faeA*, pPICZ $\alpha$ A-*faeB*, pPICZ $\alpha$ A-*faeA\_c* y pPICZ $\alpha$ A-*faeB\_c*, respectivamente, construcciones con los genes *faeA* y *faeB* con y sin intrones (Fig. 2.2, en el apartado 2.2.3.1) (Fig. 3.35).

Los plásmidos obtenidos a partir de las ligaciones fueron transformados de forma individual en células competentes de *E. coli* XL1-Blue **mediante choque térmico** (apartados 2.5.1, 2.14 y 2.15). De este modo, fue posible amplificar el ADN plasmídico y llevar a cabo la selección de transformantes, mediante el cultivo de las células bacterianas en medio LB bajo en sales suplementado con 25  $\mu$ g/mL de Zeo. Se tomaron aquellos clones bacterianos capaces de crecer en presencia de Zeo y su ADN plasmídico se extrajo por medio del protocolo de *minipreps*, detallado en el apartado 2.9.2.

El ADN plasmídico de hasta 20 clones por cada construcción fue digerido con EcoRI. El producto de la digestión se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % (p/v) (apartado 2.10.4), para determinar si la ligación había tenido lugar correctamente (Fig. 3.36).

En aquellas ligaciones correctas, el tamaño aproximado de la banda única fue de 4,26 kpb; 4,93 kpb; 4,17 kpb; 4,87 kpb, para las construcciones *faeA* y *faeB* ADN y *faeA* y *faeB* ADNc, respectivamente, frente a las 3,33 kpb del plásmido pPICZ $\alpha$ A vacío. Se seleccionaron 3 clones por construcción con un tamaño de banda compatible. Dichos clones fueron cultivados para obtener ADN plasmídico a gran escala, por medio del protocolo de lisis alcalina (apartado 2.9.1).

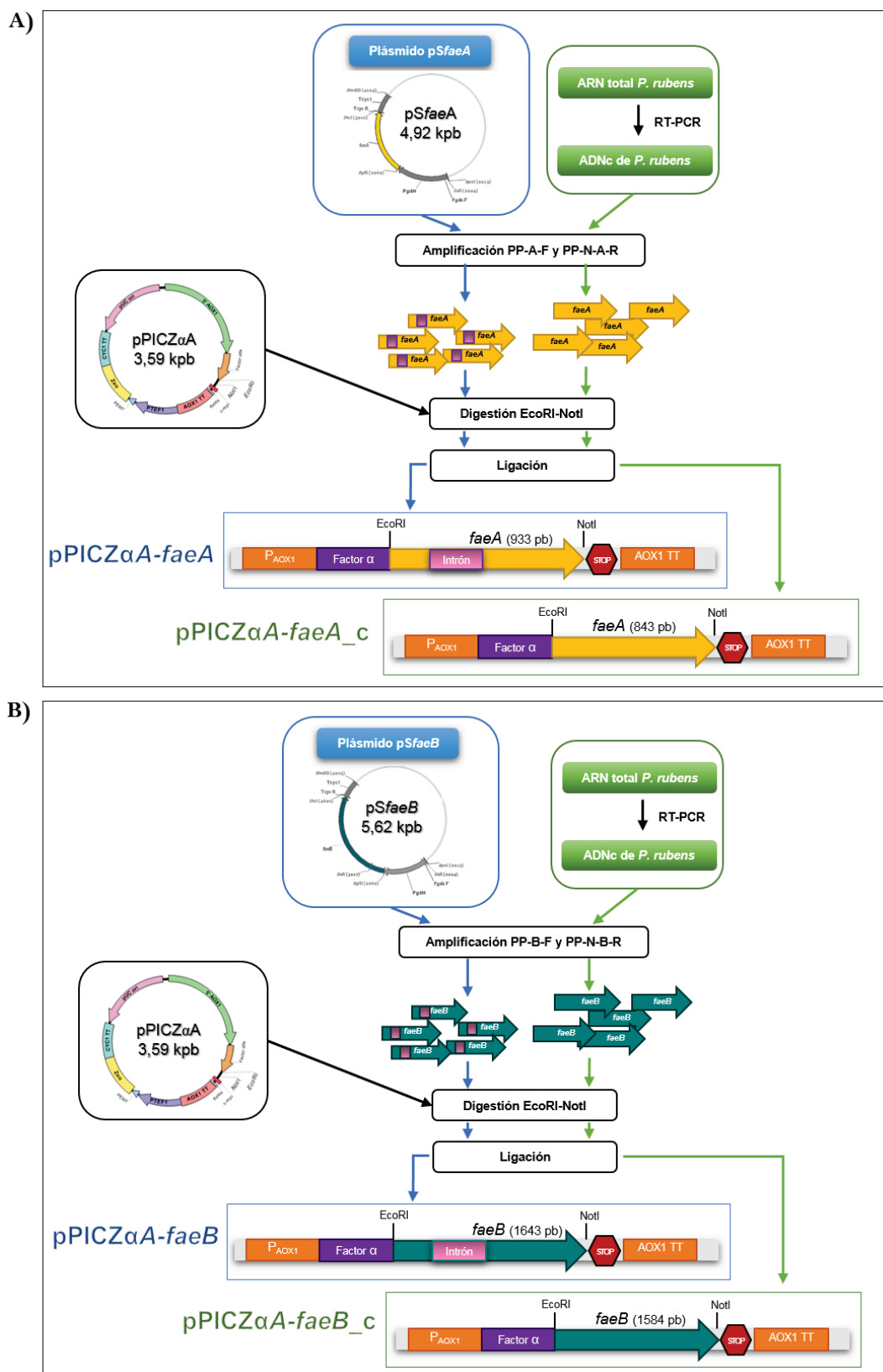
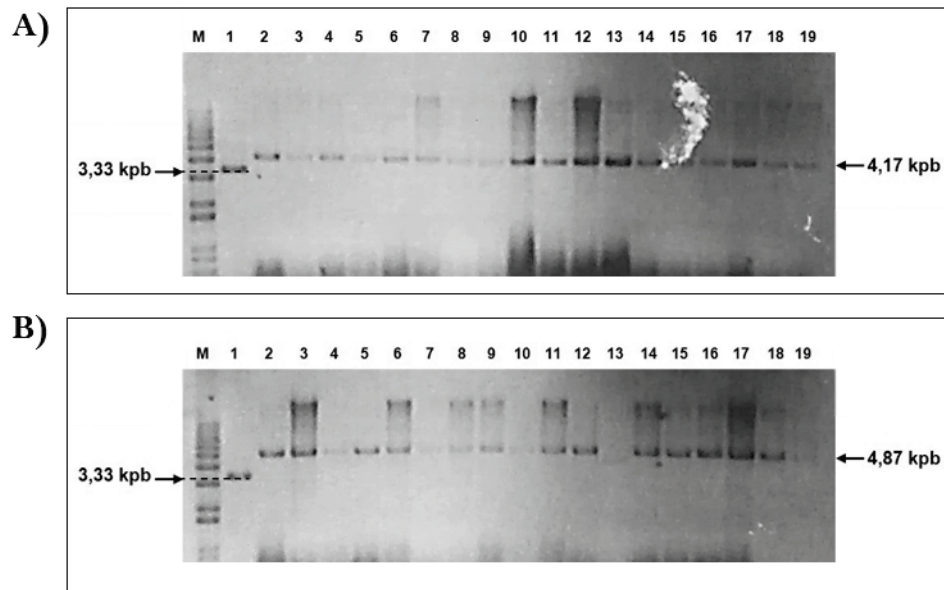


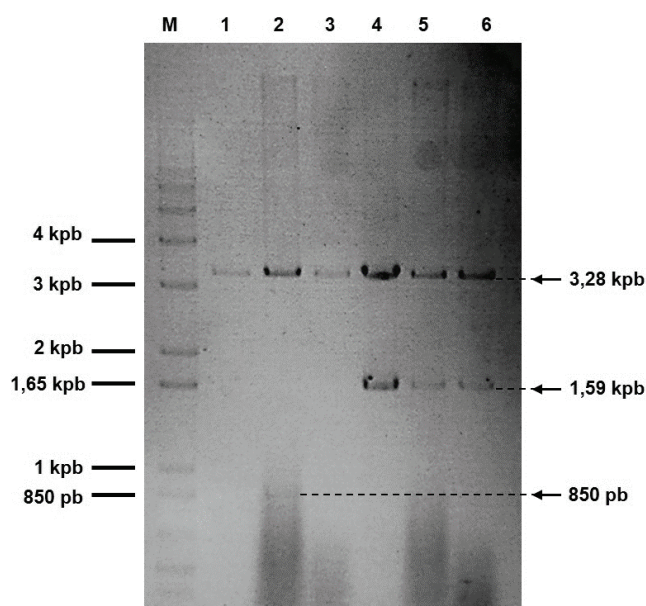
Fig. 3.35. Esquema de la clonación para obtención de las construcciones plasmídicas de expresión inducible en levaduras. A) Obtención de *pPICZαA-faeA* y *pPICZαA-faeA\_c*. B) Obtención de *pPICZαA-faeB* y *pPICZαA-faeB\_c*.



**Fig. 3.36. Productos de la digestión del ADN plasmídico con EcoRI, para comprobar la clonación de los insertos (*faeA* y *faeB*) en el plásmido pPICZ $\alpha$ A.** A la dcha. e izq. se indican los tamaños de las bandas. Geles de agarosa al 0,8 % (p/v). **A)** Digestión EcoRI de la construcción pPICZ $\alpha$ A-*faeA\_c*. **A)** Digestión EcoRI de la construcción pPICZ $\alpha$ A-*faeB\_c*. **M:** marcador de peso molecular 1kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen). **Carril 1:** vector pPICZ $\alpha$ A sin el gen de interés. **Carriles 2-19:** ADN plasmídico de transformantes de *E.coli* XL1-Blue. Se consideraron positivos todos, excepto el carril 13 de pPICZ $\alpha$ A-*faeB\_c*.

Previamente a su transformación en levaduras, los productos de lisis alcalina fueron sometidos a una nueva digestión de comprobación, en este caso con las enzimas EcoRI y NotI. En el caso de una correcta ligación, el producto de dicha digestión fueron dos bandas: i) una correspondiente al plásmido pPICZ $\alpha$ A, de 3,28 kpb; ii) otra correspondiente al inserto (en su caso, 940 pb; 1,65 kpb; 850 pb o 1,59 kpb, para las construcciones *faeA* y *faeB* ADN, *faeA* y *faeB* ADNc, respectivamente) (Fig. 3.37).

Tras la comprobación mediante la digestión doble, el ADN plasmídico de los clones positivos se analizó mediante secuenciación (apartado 2.13), empleando los cebadores PP-A-F, PP-N-A-R, *LfaeA* y *RfaeA*, para las construcciones *faeA*, y PP-B-F, PP-N-B-R, *LfaeB*, *RfaeB*, 1-*faeB*-F, 3-*faeB*-F, 5-*faeB*-F, 1-*faeB*-R, 3-*faeB*-R y 5-*faeB*-R, para las construcciones *faeB*. El ADN plasmídico correspondiente a cada una de las cuatro construcciones verificadas (pPICZ $\alpha$ A-*faeA*, pPICZ $\alpha$ A-*faeB*, pPICZ $\alpha$ A-*faeA\_c* y pPICZ $\alpha$ A-*faeB\_c*) fueron transformados en levaduras.



**Fig. 3.37. Comprobación de la correcta clonación de los insertos en el plásmido pPICZαA.** A la izq. se indica el tamaño de las bandas del marcador; a la derecha, de los productos de digestión. Gel de agarosa al 0,8 % (p/v). **M:** marcador de peso molecular 1kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen); **Carril 1:** vector pPICZαA vacío. **Carriles 2 y 3:** Digestión EcoRI y NotI de la construcción pPICZαA-*faeA\_c*. **Carriles 4 a 6:** Digestión EcoRI y NotI de la construcción pPICZαA-*faeB\_c*. Se consideraron positivos los carriles 2, 4, 5 y 6.

### 3.3.2.2. Transformación de construcciones plasmídicas para expresión inducible en cepas de levaduras del género *Komagataella spp.*

Las construcciones plasmídicas anteriores sirvieron para transformar las cepas de *K. phaffii* X-33 y SMD1168H (apartado 2.5.2.1). La cepa X-33 presenta fenotipo silvestre, mientras que SMD1168H presenta una actividad proteolítica reducida (genotipo *pep4*), gracias a que carece de la peptidasa vacuolar A, responsable de activar la proteasa B1 y la carboxipeptidasa Y, lo que puede incrementar la estabilidad de las proteínas recombinantes que produzca (Spohner *et al.*, 2015). En cuanto a la cepa X-33, pese a que su actividad proteolítica es la correspondiente al fenotipo silvestre, se incluyó debido a que las cepas de *K. phaffii* con genotipo *pep4* son menos robustas que las silvestres: crecen más despacio, su inducción mediante metanol es más difícil y su viabilidad durante el almacenamiento en placa de Petri es menor (Cregg *et al.*, 2009).

Los métodos de transformación de levaduras se basan en la preparación de células competentes mediante métodos que permitan superar las barreras de la célula (pared celular y membrana plasmática) e introducir ADN exógeno (Gietz y Woods, 2001; Cregg, 2007).

## ○ TRANSFORMACIÓN QUÍMICA DE LEVADURAS

En primer lugar, se utilizó el método de transformación química *Pichia EasyComp*<sup>™</sup> (Invitrogen), cuyo protocolo se detalla en el apartado 2.16.1. Este método rápido se basa en el



empleo de soluciones que contienen DMSO, etilenglicol y sorbitol para preparar levaduras competentes, que pueden almacenarse a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , hasta durante varios meses. Las células competentes son transformadas mediante soluciones que contienen PEG (Dohmen *et al.*, 1991). Según el manual *Pichia EasyComp*<sup>™</sup> (Invitrogen), la transformación de 50  $\mu\text{L}$  de células competentes (a una  $\text{DO}_{600}$  final de 6-10 en los viales de células competentes) con 3  $\mu\text{g}$  de ADN origina, aproximadamente, 50 colonias.

El método *Pichia EasyComp*<sup>™</sup> se empleó para transformar las construcciones pPICZ $\alpha$ A-*faeA*, pPICZ $\alpha$ A-*faeB*, pPICZ $\alpha$ A-*faeA\_c* y pPICZ $\alpha$ A-*faeB\_c*. El ADN plasmídico se linealizó con SacI, que presenta un único punto de corte en el plásmido pPICZ $\alpha$ A. Se incluyeron controles sin ADN y con el plásmido vacío. El método de selección se basó en la resistencia a Zeo, en placas de medio YPDS suplementado con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del antibiótico.

El empleo del sistema *Pichia EasyComp*<sup>™</sup> no originó colonias transformantes. Para tratar de mejorar la eficiencia, se prolongó la duración de la incubación para la expresión de la resistencia a Zeo (3 h en lugar de 1 h), que se realizó a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  y a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Por otro lado, el ADN plasmídico empleado se sometió a limpieza con el *kit illustra*<sup>™</sup> *GFX*<sup>™</sup> *PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare Life Sciences). Además, se prepararon nuevas células competentes, con mayor densidad celular por alícuota. Dichas modificaciones no dieron lugar a la obtención de colonias.

## ○ ELECTROPORACIÓN

A la vista de los resultados desfavorables, se optó por emplear uno de los métodos de transformación de levaduras más extendidos, como es la **electroporación**. Dicho método consiste en la aplicación de un pulso eléctrico de alta tensión a una mezcla de células y ADN plasmídico, de modo que se produce una reorganización de la pared celular y membrana plasmática, con la aparición de poros temporales. La corriente eléctrica también facilita la difusión de macromoléculas con carga, como material genético, a través de dichos poros (Weaver, 1995; Lurquin, 1997; Gietz y Woods, 2001; Nickoloff, 2010). Este sistema presenta la ventaja de que es menos laborioso que otros métodos muy utilizados, como el método de esferoplastos, puesto que en la electroporación las células permanecen intactas y no pierden su pared, con lo que son más estables al daño mecánico y osmótico (Gietz y Woods, 2001; Cregg, 2007).

El método de electroporación utilizado se describe detalladamente en el apartado 2.16.2. Se utilizó ADN plasmídico linealizado con SacI, que fue desalado previamente a su empleo, de

acuerdo al método de diálisis en gota (apartado 2.10.1). La selección de transformantes positivos se basó en la resistencia a Zeo. Se incluyeron controles, realizando el proceso de electroporación sin ADN plasmídico y con el plásmido pPICZ $\alpha$ A vacío. Se prestó especial atención a la eliminación de los restos de humedad alrededor de la cubeta de electroporación, antes de su colocación en el electroporador, así como al mantenimiento de temperaturas de 0-4 °C durante todo el proceso.

Tras los primeros intentos, la electroporación no dio lugar a la obtención de colonias, por lo que se llevaron a cabo modificaciones al protocolo para tratar de mejorar su eficiencia.

El primer factor a considerar fue la viabilidad de las levaduras tras la electroporación, ya que un pulso eléctrico demasiado intenso puede dar lugar a daños irreversibles en la membrana de la levadura. Las condiciones iniciales que se emplearon fueron las recomendadas para *K. phaffii* en el manual del sistema *Gene Pulser Xcell*<sup>TM</sup> (Bio-Rad): 2,0 kV; 25  $\mu$ F y 200  $\Omega$ . Además, también se probaron unas condiciones menos intensas, recomendadas para *S. cerevisiae*: 1,5 kV; 25  $\mu$ F y 200  $\Omega$ . Para descartar que el voltaje y duración del pulso estuviera produciendo muerte celular, se incluyeron placas control de YPDS sin Zeo, donde pudo verificarse la viabilidad de las levaduras tras el tratamiento, al observarse crecimiento en tapiz.

La cantidad de ADN plasmídico empleada pudo ser otro de los factores que afectaron a la eficacia de la electroporación. Como se ha indicado en trabajos publicados anteriormente, el empleo de cantidades muy bajas de ADN (del orden de ng o pg) puede dar lugar a la disminución de la eficiencia del proceso (Wu y Letchworth, 2004; Schlaak *et al.*, 2005), por lo que se usaron 5-20  $\mu$ g de ADN plasmídico por transformación, de acuerdo al manual *Pichia Expression Kit for expression of recombinant proteins in Pichia pastoris* (Invitrogen). Además, también se llevó a cabo la electroporación con 1  $\mu$ g de ADN plasmídico (Wu y Letchworth, 2004). La correcta linealización de las construcciones plasmídicas se verificó por electroforesis en gel de agarosa.

Otra de las modificaciones analizadas fue incluir un paso previo al inicio de los lavados de las células con sorbitol 1 M, consistente en una incubación durante 30 min en una solución de acetato de litio 100 mM, DTT 10 mM, sorbitol 0,6 M y Tris-HCl 10 mM, pH 7,5. En trabajos previos, se ha descrito que este tratamiento puede dar lugar a un aumento de la eficiencia de la electroporación de hasta 150 veces (Wu y Letchworth, 2004). Por último, se intentó mejorar la eficiencia de la electroporación prolongando a 4 h la incubación para la expresión de la resistencia a Zeo. La incubación de las placas de selección con Zeo se mantuvo hasta 2 semanas.

A pesar de las diferentes modificaciones al protocolo analizadas, no fue posible la obtención de colonias positivas en las placas para selección. Teniendo en cuenta las dificultades encontradas en el presente trabajo de Tesis Doctoral para obtener colonias positivas mediante el método de electroporación, se decidió emplear otro de los métodos de transformación de levaduras clásicos, que es también uno de los más utilizados y con mayor eficiencia: el método de esferoplastos.

### ○ TRANSFORMACIÓN DE ESFEROPLASTOS

El método de esferoplastos consiste en el tratamiento enzimático de las células de levaduras para retirar parcialmente su pared celular, de modo que permita la entrada de material genético extracelular (Gietz y Woods, 2001).

Una de las consideraciones a tener en cuenta es que este método no es apropiado para la selección de transformantes mediante resistencia a Zeo directamente, puesto que las levaduras deben regenerar la pared celular antes de expresar la resistencia. Como las construcciones empleadas previamente incluían como marcador de selección un gen de resistencia a Zeo, tuvieron que realizarse nuevas construcciones empleando el vector integrativo bifuncional pPIC9K. Este vector contiene el gen que codifica para la histidinol deshidrogenasa (*HIS4*), lo que permite llevar a cabo la selección basada en la reversión de la auxotrofia para His en cepas *his4* de *Komagataella* sp. Las cepas empleadas anteriormente (X-33 y SMD1168H) no son auxótrofas para His, por lo que en este caso se utilizó la cepa de genotipo *his4 K. phaffii* GS115.

El método de obtención de las construcciones plasmídicas fue similar al explicado previamente para el plásmido pPICZ $\alpha$ A. En primer lugar, el vector pPIC9K y los genes *faeA* y *faeB* (ADN y ADNc) fueron digeridos con EcoRI y NotI. A continuación, se llevaron a cabo ligaciones dirigidas, cuyos productos se transformaron por choque térmico en *E. coli*. La selección en *E. coli* se llevó a cabo mediante el gen de resistencia al antibiótico Amp (*Amp<sup>R</sup>*), que forma parte del plásmido, empleando placas de medio LB suplementado con 100  $\mu$ g/mL de Amp. Los transformantes positivos fueron sometidos a métodos de obtención de ADN plasmídico (*miniprep*, seguida de digestión de comprobación con las endonucleasas EcoRI y EcoRI-NotI y lisis alcalina) y su secuencia se verificó mediante secuenciación (apartado 2.13). Este proceso permitió obtener ADN plasmídico verificado para cada una de las cuatro construcciones con los insertos *faeA* y *faeB*, ADN y ADNc (respectivamente, pPIC9K-*faeA*, pPIC9K-*faeB*, pPIC9K-*faeA\_c* y pPIC9K-*faeB\_c*).

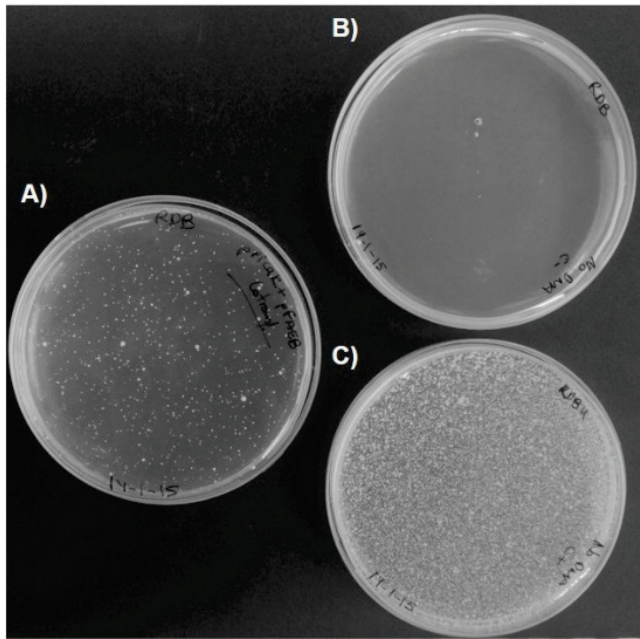
Las cuatro construcciones se transformaron por separado en *K. phaffii* GS115, mediante el método descrito en el apartado 2.16.3, basado en el protocolo recogido en el manual *Pichia Expression Kit for expression of recombinant proteins in Pichia pastoris* (Invitrogen). La enzima zimoliasa (un complejo enzimático con actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa, entre otras, capaz de llevar a cabo la lisis del polímero lineal de glucosa de la pared celular de las levaduras) empleada en dicho protocolo se sustituyó por enzimas líticas de *T. harzianum* (Glucanex<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich). Glucanex<sup>®</sup> ha sido utilizado previamente para la obtención de esferoplastos en métodos de transformación de *S. cerevisiae*, sin embargo, no se han hallado publicaciones que indiquen su uso en *K. phaffii*, por lo que el presente trabajo constituye la primera descripción de un protocolo adaptado a esta especie (Petit *et al.*, 1994; Narayanan *et al.*, 2010).

En el método de esferoplastos es importante no digerir en exceso la pared celular, lo cual se monitoriza determinando la sensibilidad de las células a SDS. Una alícuota de células tratadas enzimáticamente se añade a una solución de SDS, cuantificándose la lisis celular por medio de la disminución en la densidad óptica respecto al valor inicial. Se ha determinado empíricamente que la digestión es óptima cuando existe un porcentaje del 70 % de esferoplastos (manual *Pichia Expression Kit for expression of recombinant proteins in Pichia pastoris*, Invitrogen), el cual se alcanzó en el presente trabajo con aprox. 45  $\mu$ g de Glucanex<sup>®</sup>/mL de células y 30-50 min de tratamiento.

Dada la sensibilidad de los esferoplastos al daño osmótico y mecánico, los esferoplastos transformados se sembraron en placa embebidos en la capa cobertera de medio selectivo RD top agar (apartado 2.6.2). Este medio definido no contiene His, por lo que únicamente los transformantes que incorporaron la construcción plasmídica con el gen *his4* crecieron.

### *3.3.2.3. Comprobación de la correcta inserción del casete de expresión e inducción de la expresión heteróloga de FAEs en K. phaffii GS115*

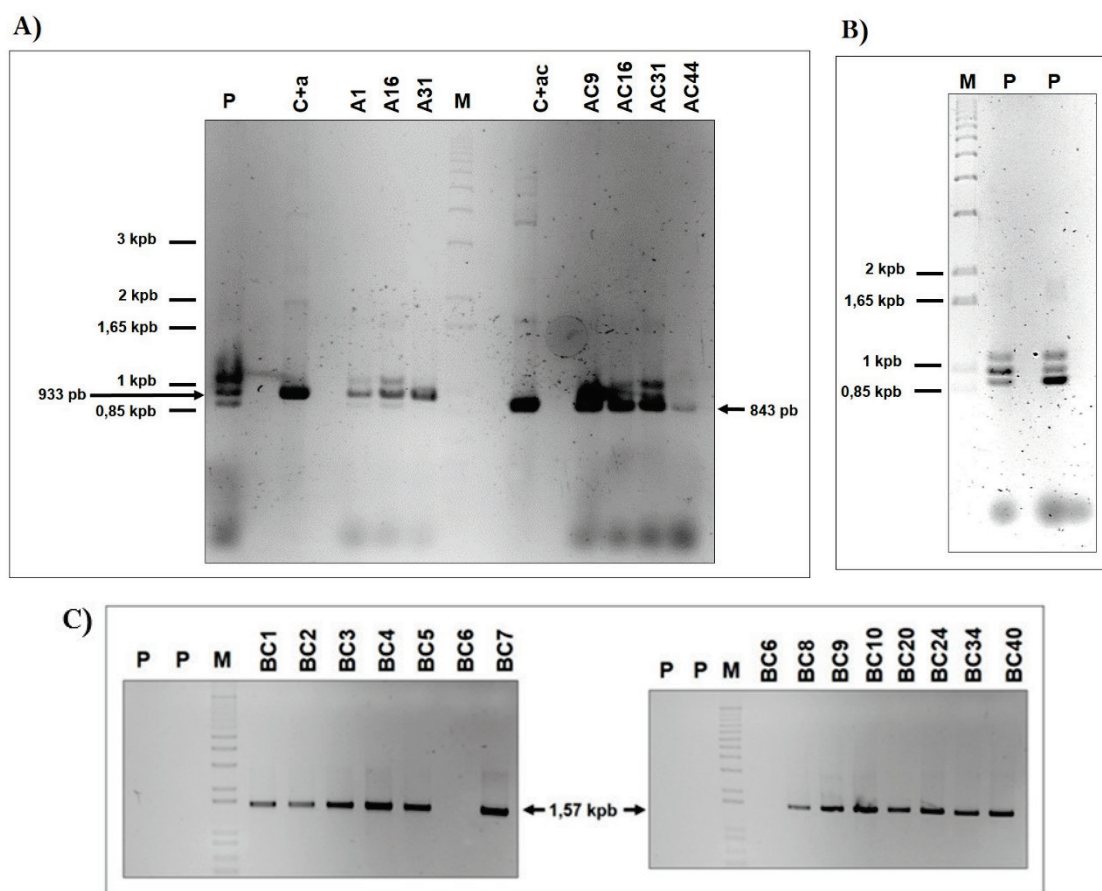
La transformación de esferoplastos de *K. phaffii* GS115 dio lugar a múltiples transformantes, que se recuperaron de la capa cobertera de medio RD con ayuda de un palillo estéril (Fig. 3.38).



**Fig. 3.38. Placas para la selección de clones tras la transformación de esferoplastos de *K. phaffii* GS115.** **A)** Placa de medio RDB (sin His) para la selección de transformantes con reversión de la auxotrofia para la His. **B)** Placa control negativo, con medio RDB y levaduras sometidas al proceso de transformación, sin añadir el ADN plasmídico. **C)** Placa control de viabilidad de las levaduras, con medio RDBH (con His), donde son capaces de crecer tanto los esferoplastos que han integrado las construcciones plasmídicas como los que no.

A continuación, se procedió a comprobar su fenotipo mediante resiembra en placas de medio selectivo RBD, hasta un máximo de 100 clones por construcción. La correcta inserción del casete de expresión se analizó mediante la extracción de ADN total (apartado 2.9.3.1), que fue empleado como molde para la realización de **reacciones de PCR** con los cebadores PP-A-F/PP-N-A-R para las construcciones *faeA* y 1-FA-F/1-FA-R para las construcciones *faeB* (apartado 2.2.4) y la ADN polimerasa de alta fidelidad *Hybrid* (EurX). Se incluyeron controles positivos, utilizando como molde ADN plasmídico de las construcciones empleadas en las transformaciones, y controles negativos, con ADN total de la cepa parental *K. phaffii* GS115.

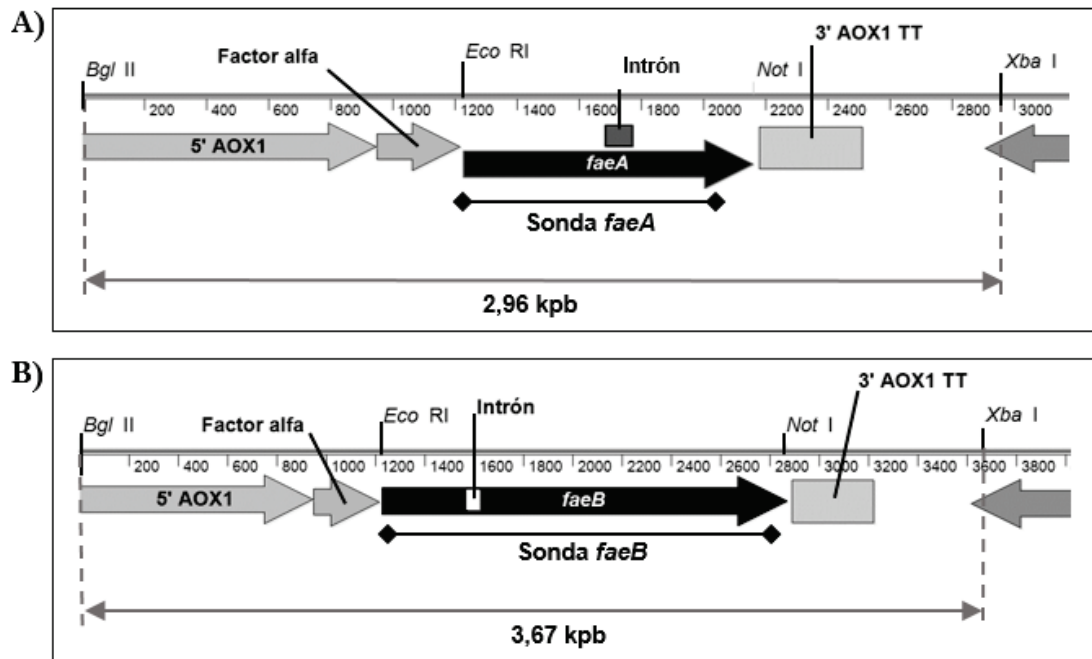
Las reacciones de PCR dieron lugar a amplificaciones inespecíficas en los controles negativos (Fig. 3.39.A), por lo que se llevaron a cabo gradientes de temperatura de anillamiento (64,5 °C-74,5 °C para *faeA* y 53-65 °C para *faeB*), con vistas a emplear condiciones más restrictivas. Asimismo, se extrajo nuevo ADN total y se utilizaron nuevos reactivos para PCR y muestras de los cebadores. Pudo observarse que, en el caso de *faeB*, una temperatura de anillamiento de 63,6 °C fue óptima (Fig. 3.39.C). Sin embargo, en el caso de *faeA* continuaron apareciendo bandas inespecíficas, incluso a la temperatura de anillamiento más elevada (Fig. 3.39.B).



**Fig. 3.39. Análisis de la integración de los genes *faeA* y *faeB* de *P. rubens* Wisconsin 54-1255 en transformantes de levaduras, mediante PCR. M:** marcador de peso molecular 1kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen). **P:** controles negativos, cepa parental GS115. **A)** Productos de PCR a una temperatura de anillamiento de 64,8 °C, empleando los oligonucleótidos cebadores PP-A-F y PP-N-A-R. **C+a:** Control positivo, ADN plasmídico de la construcción pPIC9K-*faeA*. En la parte superior se indican las identificaciones de transformantes que portan la construcción pPIC9K-*faeA* (A-) y pPIC9K-*faeA\_c* (AC-). **B)** Productos de PCR a una temperatura de anillamiento de 74,5 °C, empleando los oligonucleótidos cebadores PP-A-F y PP-N-A-R. **C)** Productos de PCR a una temperatura de anillamiento de 63,6 °C, empleando los oligonucleótidos cebadores 1-FA-F y 1-FA-R. En la parte superior se indican las identificaciones de transformantes que portan la construcción pPIC9K-*faeB\_c* (BC1 a BC40).

A la vista de estos resultados, se decidió verificar la correcta integración del casete de expresión de los genes *faeA* y *faeB* por **hibridación Southern** (apartado 2.12). Para ello, se seleccionaron aquellos transformantes de levaduras en los cuales se detectaron bandas correspondientes a amplicones de PCR compatibles con la correcta integración del casete de expresión. En concreto, se analizaron 28 transformantes de la línea *faeA* (14 de la construcción pPIC9K-*faeA* y 14 de pPIC9K-*faeA\_c*) y 28 transformantes de la línea *faeB* (14 de la construcción pPIC9K-*faeB* y 14 de pPIC9K-*faeB\_c*). En primer lugar, el ADNg (apartado 2.9.3.1) libre de proteínas fue digerido con las enzimas de restricción BglII y XbaI. En el caso de los clones

transformados con el gen *faeA* de *P. rubens* Wisconsin 54-1255 (construcciones pPIC9K-*faeA* y pPIC9K-*faeA\_c*), la banda de interés correspondió a un tamaño de 2,96-2,87 kpb; por su parte, en los clones transformados con el gen *faeB* (construcciones pPIC9K-*faeB* y pPIC9K-*faeB\_c*), la banda que incluía el casete de expresión presentó un tamaño de 3,67-3,61 kpb (Fig. 3.40).

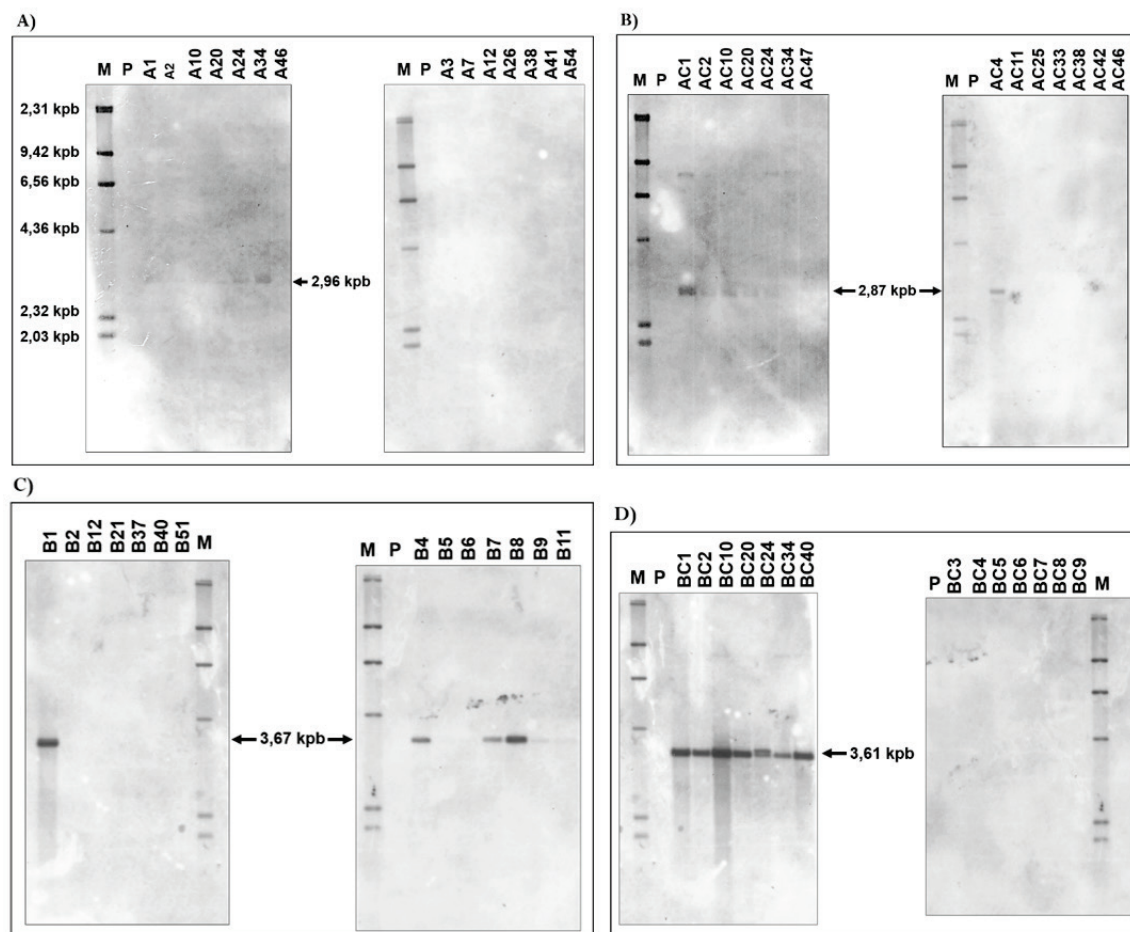


**Fig. 3.40.** Esquema del diseño de las sondas específicas para *faeA* y *faeB*, para ensayos de Southern. **A)** Mapa físico lineal de los sitios de corte de las endonucleasas empleadas (BglII-XbaI) y el sitio de unión de la sonda *faeA* marcada con digoxigenina, para las construcciones pPIC9K-*faeA* y pPIC9K-*faeA\_c*. **B)** Mapa físico lineal de los sitios de corte de las endonucleasas empleadas (BglII-XbaI) y el sitio de unión de la sonda *faeB* marcada con digoxigenina, para las construcciones pPIC9K-*faeB* y pPIC9K-*faeB\_c*.

Los productos de la digestión con BglII y XbaI se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8 % (p/v). Como referencia, se incluyó en los geles el marcador de peso molecular marcado con digoxigenina *DNA Molecular Weight Marker II, Digoxigenin-labeled* (Roche). Además, se incluyeron controles negativos con ADNg de la cepa parental (*K. phaffii* GS115). El ADN fue transferido mediante un sistema de vacío desde los geles de agarosa a membranas de *nylon Amersham Hybond-N+* (GE Healthcare Life Sciences) y se fijó a las mismas con pulsos de luz UV. Las membranas se hibridaron con sondas marcadas para los genes *faeA* y *faeB*, preparadas mediante digestión de los plásmidos pPIC9K-*faeA\_c* y pPIC9K-*faeB\_c* con EcoRI y NotI y marcaje no radiactivo con digoxigenina-11-dUTP (apartado 2.12.2) (Fig. 3.40). La detección inmunológica no radiactiva consistió en la visualización de la unión de la sonda con los fragmentos de ADN, mediante una reacción de quimioluminiscencia registrada en una película de autorradiografía. Se



observaron bandas compatibles con la integración del casete de expresión de los genes FAE en los transformantes A1, A2, A10, A20, A24, A34 (banda de 2,96 kpb), AC1, AC2, AC4, AC10, AC20, AC24 (banda de 2,87 kpb), B1, B4, B7, B8 (banda de 3,67 kpb), BC1, BC2, BC10, BC20, BC24, BC34 y BC40 (banda de 3,61 kpb) (Fig. 3.41).



**Fig. 3.41. Análisis de transformantes de levaduras mediante hibridación Southern.** A) Hibridación Southern del ADNg de 14 transformantes pPIC9K-*faeA*, con una sonda marcada correspondiente a la secuencia ADNc de *faeA*. B) Hibridación Southern del ADNg de 14 transformantes pPIC9K-*faeA\_c*, con una sonda marcada correspondiente a la secuencia ADNc de *faeA*. C) Hibridación Southern del ADNg de 14 transformantes pPIC9K-*faeB*, con una sonda marcada correspondiente a la secuencia ADNc de *faeB*. D) Hibridación Southern del ADNg de 14 transformantes pPIC9K-*faeB\_c*, con una sonda marcada correspondiente a la secuencia ADNc de *faeB*. **M:** Marcador *DNA Molecular Weight Marker II, Digoxigenin-labeled* (Roche). **P:** Cepa parental *K. phaffii* GS115. El código de identificación de los transformantes se indica sobre las imágenes.

Se seleccionaron varios de los transformantes positivos (A1, A2, A24, A34, AC1, AC2, AC20, AC24, B1, B4, B7, B8, BC1, BC2, BC10, BC20, BC24 y BC34), para proceder a la realización de fermentaciones para la inducción de la expresión de los genes *faeA* y *faeB*. En primer lugar, se analizó el fenotipo de dichos transformantes con respecto a la capacidad para metabolizar



el metanol (fenotipo Mut). Existen tres fenotipos Mut, que condicionan las condiciones de cultivo e inducción: i) las cepas que conservan intactos los genes que codifican para AOX1 y AOX2 (fenotipo Mut<sup>+</sup>) se corresponden con un crecimiento rápido en metanol; ii) las cepas mutantes con el gen *AOX1* inactivado (fenotipo Mut<sup>S</sup>) presentan crecimiento lento en metanol y iii) las cepas mutantes con ambos genes inactivados (fenotipo Mut<sup>-</sup>) no metabolizan el metanol, que sólo actúa como inductor para la producción de proteínas recombinantes (Looser *et al.*, 2014). En el presente trabajo, el fenotipo Mut fue analizado por medio del método de réplica en placa, sembrando parches de cada transformante por triplicado sobre el medio MD/MDH y MM/MMH (apartado 2.6.2). Todos los transformantes seleccionados mostraron un crecimiento similar a los controles Mut<sup>+</sup> (Fig. 3.42), por lo que se adscribieron a dicho fenotipo.

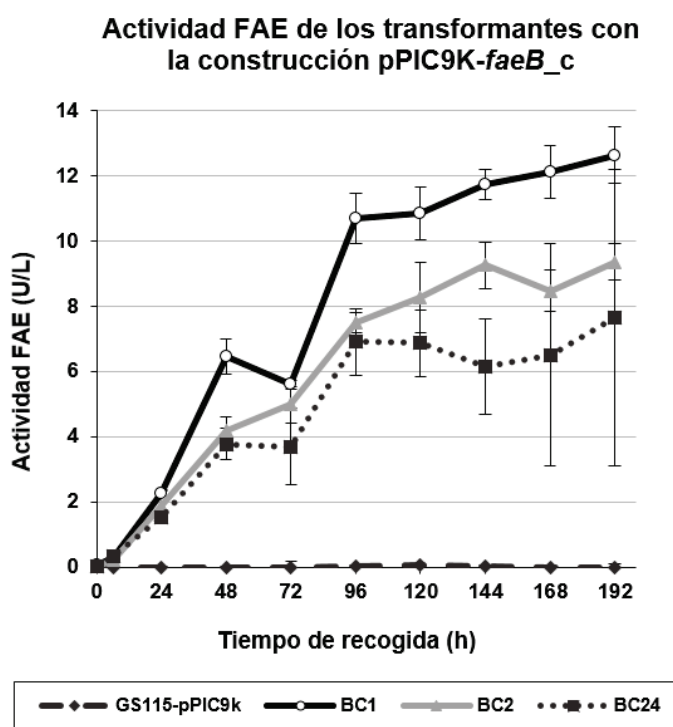


**Fig. 3.42. Análisis del fenotipo Mut de cepas de levaduras.** Placa de medio mínimo con metanol e His MMH, sobre la que se han sembrado parches de tres cepas representativas de *K. phaffii*: de izq. a dcha., GS115 (cepa silvestre, Mut<sup>+</sup>), GS115/pPICZ/lacZ (cepa Mut<sup>+</sup>) y GS115 Albumin (cepa Mut<sup>S</sup>). Tras 48 h de cultivo, se aprecia un menor crecimiento en la cepa Mut<sup>S</sup>.

La inducción de la expresión se realizó de acuerdo al manual *Pichia Expression Kit for expression of recombinant proteins in Pichia pastoris* (Invitrogen), empleando el promotor del gen *AOX1* ( $P_{AOX1}$ ), mediante una estrategia de fermentación basada en dos etapas: una primera etapa donde se utilizó una fuente de carbono represora (glicerol) como sustrato para obtener biomasa microbiana, seguida de una segunda etapa en la que se indujo la expresión con metanol (Bollok *et al.*, 2009).

Se prepararon preinóculos por duplicado de cada uno de los clones seleccionados, más la cepa parental GS115 transformada con el plásmido vacío (sin genes *fae*) como control negativo. Para ello, los transformantes se cultivaron durante 48 h en placas de medio RBD, tras lo cual se emplearon para inocular matraces de 250 mL con deflectores, conteniendo 25 mL de medio BMGH, que incluye glicerol como fuente de carbono. La aireación es importante a la hora de inducir con metanol, por lo que se emplearon tapones de algodón y no se superó el 10-20 % de la capacidad total del matraz (Rosenfeld, 1999; Cregg, 2007). Los preinóculos en medio BMGY se cultivaron durante 16-24 h a 30 °C y 250 rpm, hasta una  $DO_{600}$  de 2-6, correspondiente con la fase de crecimiento exponencial. Alcanzado este rango, se tomó el volumen de cultivo necesario para conseguir una  $DO_{600}$  de 1 en 90 mL, recogiendo las células mediante

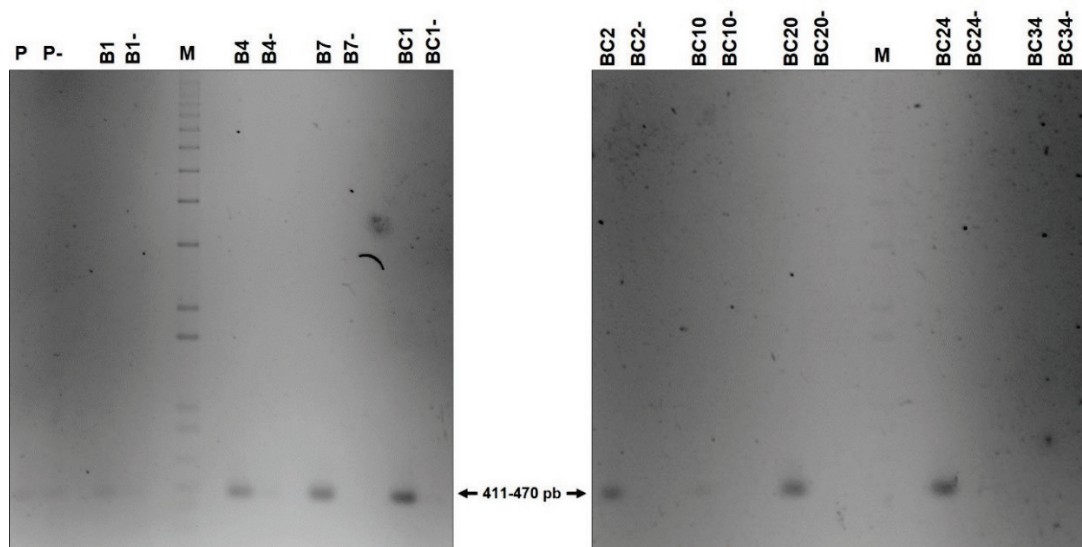
centrifugación a  $3.000 \times g$  durante 5 min, tras lo cual fueron resuspendidas en 90 mL de medio BMMY y cultivadas en matraces de 500 mL con deflectores, durante 192 h, a  $28^\circ\text{C}$  y 250 rpm. Una vez iniciada la fermentación, se añadió metanol al 100 % para conseguir un volumen final del 0,5 % (v/v) en el medio de cultivo y mantener la inducción, corrigiendo las pérdidas por metabolización y evaporación. Además, cada 24 h se realizaron recogidas de 1 mL de cultivo, en las cuales se separaron células y sobrenadante mediante centrifugación. Las muestras de caldo de fermentación correspondientes a las recogidas se filtraron a través de membranas de PES de  $0,22 \mu\text{m}$  de diámetro de poro y se analizó su actividad FAE frente a MFA, añadiendo 100  $\mu\text{L}$  de caldo de fermentación en un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ , a pH 5,0 y  $50^\circ\text{C}$  (apartado 2.20.1). La liberación de ácido ferúlico se determinó por medio de HPLC (apartado 2.20.3). Únicamente se detectó actividad FAE en los transformantes BC1, BC2 y BC24 (Fig. 3.43).



**Fig. 3.43.** Actividad FAE del caldo de fermentación de *K. phaffii* GS115 transformada con la construcción pPIC9K-*faeB\_c*. Se indican los valores de actividad FAE detectados en los clones BC1, BC2 y BC24, expresados en U/L de caldo de fermentación.

Ante la ausencia de actividad en la mayoría de los clones, se decidió llevar a cabo un análisis transcripcional de los transformantes de la línea B. Para ello, se extrajo ARN total a partir de precipitados celulares de cultivos en medio BMMY recogidos a las 96 h, de acuerdo al apartado 2.17.2.1. El ARN total fue tratado con ADNasas y su calidad se evaluó tanto en geles de agarosa al 0,8 % (p/v) como mediante el equipo *Bioanalyzer 2100* (apartados 2.11 y 2.17.3). Las muestras de ARN total extraídas de los transformantes sirvieron de molde para las reacciones

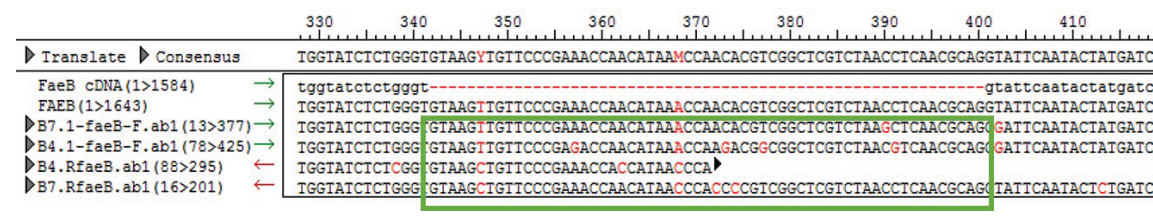
de RT-PCR, llevadas a cabo utilizando el kit *SuperScript<sup>®</sup> III One-Step*, con ADN polimerasa *Platinum<sup>®</sup> Taq* (Invitrogen), de acuerdo al apartado 2.17.4. Para las reacciones de RT-PCR se empleó una temperatura de anillamiento de 60 °C y los cebadores 1-*faeB*-F y *RfaeB* (apartado 2.2.4), puesto que su proximidad al intrón del gen *faeB* de *P. rubens* Wisconsin 54-1255 permitiría, además de detectar la inducción, analizar la capacidad de procesamiento de intrones exógenos por parte de *K. phaffii* GS115. El tamaño del producto de amplificación sería de 470 pb en el caso de la secuencia génica de *faeB* con intrón y de 411 pb en el caso de la secuencia sin intrón. Se incluyeron controles para comprobar la ausencia de ADN<sub>g</sub> contaminante, que fueron sometidos a PCR. El producto de la RT-PCR se desarrolló en geles de agarosa al 0,8 % (p/v), detectándose amplicones compatibles con una correcta inducción incluso en transformantes en los cuales no se había detectado actividad FAE, como B4, B7 y BC20 (Fig. 3.44).



**Fig. 3.44. Análisis de la transcripción del gen *faeB* de *P. rubens* Wisconsin 54-1255 mediante RT-PCR.** En la zona superior se indican las identificaciones de los transformantes analizados; las identificaciones que aparecen seguidas por un guion corresponden a los controles para confirmar la ausencia de ADN<sub>g</sub> contaminante. **P:** cepa parental GS115 transformada con el plásmido pPIC9K, sin genes *fae*. **M:** marcador de peso molecular 1kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen). Se consideró que la inducción de la expresión tuvo lugar en los transformantes B4, B7, BC1, BC2, BC20 y BC24.

Para analizar la capacidad de procesamiento de intrones exógenos de *K. phaffii*, se secuenciaron las bandas de amplificación obtenidas a partir de los transformantes B4 y B7, que portaban la construcción plasmídica con intrón (pPIC9K-*faeB*). La secuenciación demostró la presencia del intrón en el ADN<sub>c</sub> obtenido a partir de ARN, lo que fue indicativo de que *K. phaffii* no fue capaz de reconocer y procesar intrones de *P. rubens* Wisconsin 54-1255 (Fig. 3.45). Una

alteración o falta de procesamiento del intrón daría lugar a un cambio en el marco de lectura, produciéndose además la terminación temprana de la transcripción, lo que explicaría la ausencia de actividad FAE en los transformantes que portaban las construcciones *faeA* y *faeB* con intrón.



**Fig. 3.45. Estudio de la capacidad de *K. phaffii* para procesar el intrón del gen *faeB* de *P. rubens* Wisconsin 54-1255.** Se indican los resultados de la secuenciación de las bandas recuperadas del gel con los productos de RT-PCR a partir de los transformantes B4 y B7 (Fig. 3.44). Las dos secuencias por encima del recuadro verde corresponden al gen *faeB* sin intrón (superior) y con intrón (inferior). El recuadro verde indica la posición del intrón, lo que denota que la levadura no fue capaz de procesar y eliminarlo.

La ausencia de actividad FAE en los transformantes que portaban las construcciones sin intrón (ADNc), en los que se detectó una banda de RT-PCR compatible con una correcta inducción de la expresión, pero no se detectó actividad FAE, pudo deberse a los procesos posteriores a la transcripción del ADN, como son la traducción, las modificaciones postraduccionales y la secreción extracelular de la proteína recombinante. La determinación de la actividad FAE de los transformantes se llevó a cabo empleando el caldo de fermentación, por lo que únicamente se analizó la actividad FAE extracelular. De existir un problema en la secreción de la proteína, esta se habría acumulado en el interior de las células. Para descartar esta hipótesis, se determinó la actividad FAE de extractos intracelulares de las levaduras. Todo el proceso se realizó en una cámara fría a 4 °C, para minimizar los procesos de proteólisis. Para la obtención de extractos intracelulares, se recogieron 25 mL de cultivo de los transformantes a las 96 h del inicio de la inducción, recuperando el precipitado celular mediante centrifugación durante 5 min a 3.220 x g. El precipitado celular se congeló con N<sub>2</sub> líquido, siendo posteriormente pulverizado mecánicamente con un mortero y, nuevamente, N<sub>2</sub> líquido. Una cantidad de polvo de precipitado correspondiente a un volumen aproximado de 50 µL en un microtubo de 2,2 mL fue resuspendida en 1 mL de tampón acetato 0,02 N pH 5,0. Estas muestras se emplearon en reacciones FAE frente a MFA, a 50 °C durante 30 min, añadiendo 100 µL de extracto intracelular en un volumen final de 200 µL de solución de MFA a pH 5,0, de acuerdo al método cuantitativo del apartado 2.20.1. No se detectó actividad FAE en ninguno de los extractos intracelulares.

### 3.3.3. Expresión constitutiva de FAEs de *P. rubens* Wisconsin 54-1255 en *Komagataella* spp.

Ante la escasa actividad FAE detectada en los clones analizados, se decidió modificar la estrategia de clonación y llevar a cabo la expresión constitutiva.

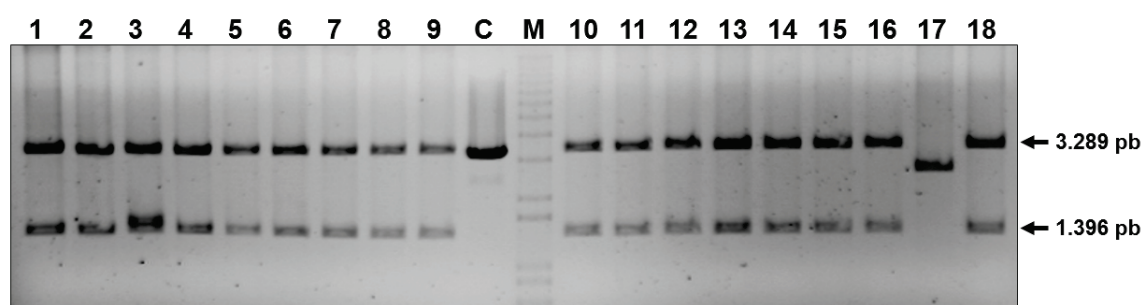
#### 3.3.3.1. Estrategia de clonación y transformación de PrFaeB en el plásmido de expresión constitutiva en levaduras pGAPZ $\alpha$ A

Como se ha indicado anteriormente, el empleo de una estrategia de clonación basada en la utilización de plásmidos con el promotor inducible P<sub>AOX1</sub> no fue sencillo y no arrojó resultados satisfactorios. Para evitar estas dificultades, se decidió utilizar el **promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (P<sub>GAP</sub>)**, un promotor constitutivo fuerte que presenta ventajas como la simplificación y acortamiento del tiempo de procesado, al no ser necesaria la etapa de inducción. Los títulos de producción que pueden conseguirse empleando este promotor constitutivo pueden alcanzar valores similares o superiores a los de P<sub>AOX1</sub>. Aunque P<sub>GAP</sub> es un promotor fuerte, el nivel de expresión es dependiente de la fuente de carbono empleada (glucosa > glicerol > ácido oleico > metanol) (Waterham *et al.*, 1997).

A la vista de los resultados previamente indicados y de la complejidad de la producción heteróloga, se decidió centrar el trabajo en la expresión, purificación y caracterización de la enzima **PrFaeB sin intrón**. Las construcciones plasmídicas se diseñaron empleando el vector integrativo bifuncional pGAPZ $\alpha$ A, que contiene el promotor constitutivo P<sub>GAP</sub>. Este vector, además incluye un epítipo 6xHis en el extremo C-terminal, tras la región de clonación múltiple, lo que facilita la purificación de la proteína recombinante. El cebador inverso utilizado para la amplificación de *faeB* ADNc se diseñó de modo que omitiera el codón de terminación del extremo 3' del gen, para mantener la región codificante para el epítipo 6xHis del plásmido.

Las construcciones con el plásmido pGAPZ $\alpha$ A se realizaron de modo similar al método descrito para pPIC9K en el apartado 3.3.2.1. La amplificación de la secuencia del gen *faeB* sin intrón fue obtenida utilizando la ADN polimerasa de alta fidelidad *Hybrid* (EurX), a una temperatura de anillamiento de 68,6 °C, la construcción pPIC9K-*faeB\_c* como ADN molde, y los cebadores PP-B-F e HispGAPZ-R (apartado 2.2.4). Se crearon extremos cohesivos en el

vector pGAPZ $\alpha$ A y el gen *faeB* ADNc, mediante digestión enzimática con EcoRI y NotI, y, finalmente, se procedió a la ligación dirigida de ambos productos, cuyo producto sirvió para transformar *E. coli* XL1-Blue. La selección de clones en *E. coli* se llevó a cabo en placas de medio LB bajo en sales suplementadas con Zeo 25  $\mu$ g/mL. Los clones se analizaron llevando a cabo *minipreps* y digestión con Sall (Fig. 3.46). Los clones positivos se secuenciaron, para confirmar la correcta integración del gen *faeB* ADNc y la integridad del marco de lectura. El ADN plasmídico verificado correspondiente a la construcción plasmídica pGAPZ $\alpha$ A con el gen *faeB* sin intrón (pGAPZ $\alpha$ A-*faeB*\_c) fue empleado para la transformación de esferoplastos de *K. phaffii* GS115.



**Fig. 3.46. Comprobación de la clonación de los insertos en el plásmido pGAPZ $\alpha$ A.** A la dcha. se indica el tamaño de los productos de digestión. Gel de agarosa al 0,8 % (p/v). **M:** marcador de peso molecular 1kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen). **C:** Control con el plásmido pGAPZ $\alpha$ A digerido con Sall (banda de 3.147 pb). **Carriles 1-18:** digestión Sall de la construcción pGAPZ $\alpha$ A *faeB*\_c. Los clones positivos mostraron dos bandas de 3.289 y 1.396 pb. Se consideraron positivos los carriles 1, 2, 4-16 y 18.

En este caso y dado que la resistencia a antibióticos no era un método apropiado para la selección directa de transformantes a partir de esferoplastos, se empleó la estrategia de cotransformación, consistente en el empleo de dos plásmidos de forma simultánea: i) el plásmido pPIC9K, linealizado con SacI, para llevar a cabo una primera selección de clones por medio de la reversión de la auxotrofia para la His, y ii) la construcción pGAPZ $\alpha$ A-*faeB*\_c, linealizada con BglII, que contiene la secuencia génica de interés y un casete de resistencia a Zeo (Fig. 3.47). Aquellos transformantes capaces de crecer en placas de medio selectivo RBD durante la primera etapa de selección (reversión de la auxotrofia para la His,) fueron sometidos a una segunda selección en placas de medio YPD suplementadas con 100  $\mu$ g/mL de Zeo. Esta estrategia de selección doble permitió identificar 37 transformantes positivos. Dichos transformantes fueron sometidos a determinación de la actividad FAE para seleccionar aquellos que podrían haber incorporado el gen para expresión constitutiva.



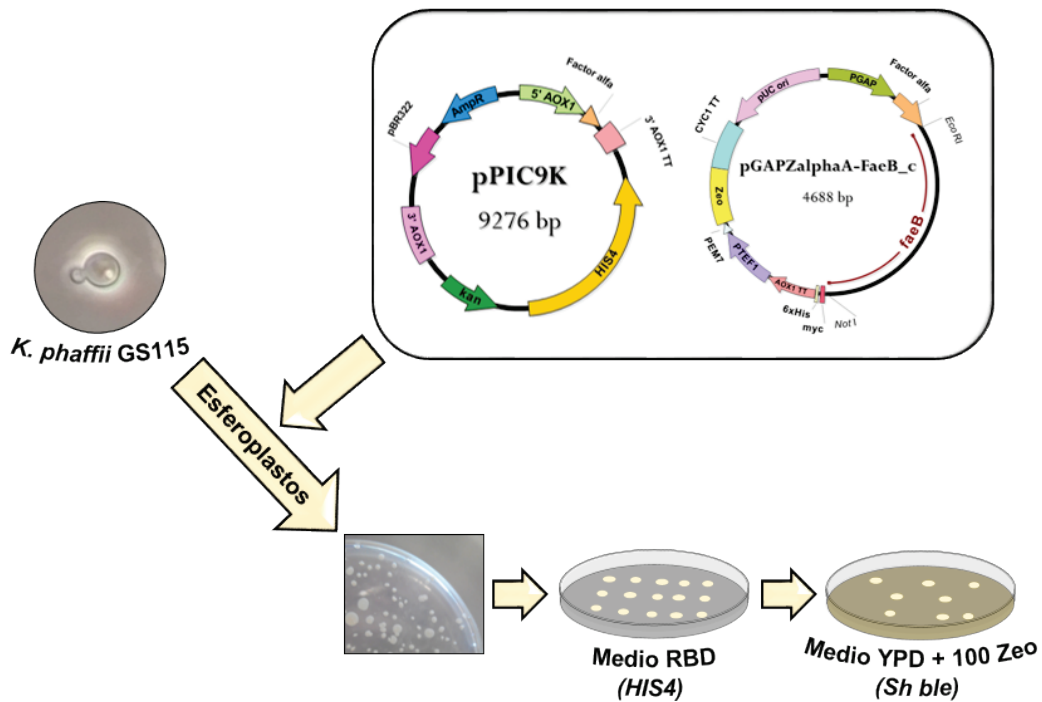


Fig. 3.47. Esquema del proceso de clonación y transformación de la construcción plasmídica para expresión constitutiva en levaduras pGAPZ $\alpha$ A-*faeB\_c*.

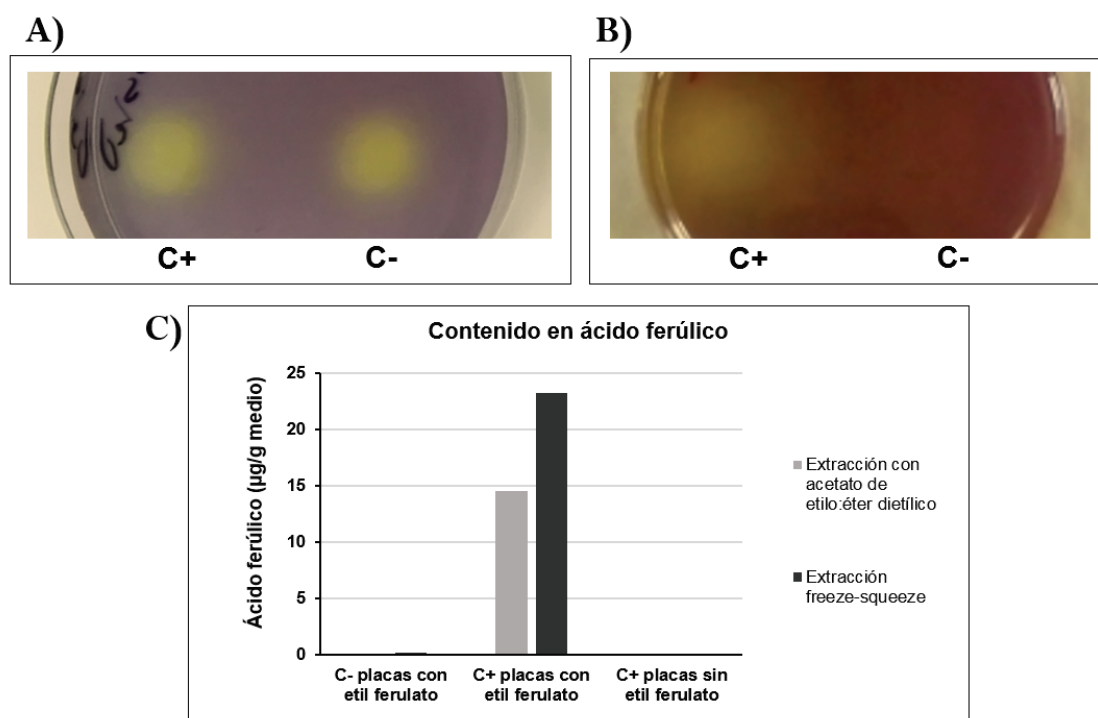
### 3.3.3.2. Medida de la actividad FAE en transformantes de levaduras

Una de las ventajas de la expresión constitutiva con pGAPZ $\alpha$ A fue la posibilidad de realizar ensayos rápidos de actividad FAE de forma directa, gracias a que no fue necesaria la inducción.

#### ○ ENSAYO DE ACTIVIDAD FAE EN PLACA

La actividad FAE de transformantes de levaduras se detectó mediante ensayo en placa, de acuerdo a una modificación de la técnica que se indica en el apartado 3.1.3.1.

En primer lugar, se determinó la capacidad del ensayo para detectar transformantes con actividad FAE, empleando un control negativo (*K. phaffii* GS115 transformada con el plásmido pGAPZ $\alpha$ A vacío) y un control positivo (una dilución 1:50 de caldo de fermentación de *A. alternata* PDA1, recogido tras 96 h de cultivo en medio M-SBP), que se sembraron sobre placas de medio EF con púrpura de bromocresol (apartado 2.18) (Sabnis, 2008). Inicialmente, se observó un descenso de pH con viraje hacia color amarillo tanto en el control negativo como en el control positivo, incluso en las placas que no incluyeron etil ferulato. Según avanzó la incubación, el halo desapareció en el control negativo y se intensificó en el positivo (Fig. 3.48.A y Fig. 3.48.B).



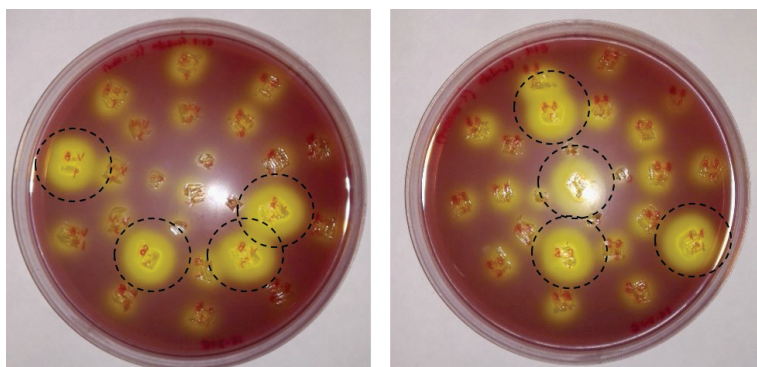
**Fig. 3.48. Análisis de la capacidad del ensayo en placa para la identificación de transformantes de levaduras con actividad FAE.** **A)** Placa de medio EF con púrpura de bromocresol, sin sustrato etil ferulato. Se observa un descenso inicial de pH, tanto en el control positivo (C+) como en el negativo (C-). **B)** Placa de medio EF con púrpura de bromocresol, con sustrato etil ferulato, tras 20 h de incubación. Únicamente se observa un halo de descenso de pH en el control positivo. **C)** Análisis de la liberación de ácido ferúlico mediante HPLC. La extracción se llevó a cabo mediante dos métodos distintos: adición de acetato de etilo-éter dietílico y método *freeze-squeeze*. En ambos tipos de extracción, únicamente se detectó ácido ferúlico a partir del halo de hidrólisis de C+ en el medio con etil ferulato.

Con el objetivo de confirmar que el descenso de pH alrededor del control positivo se debió a la liberación de ácido ferúlico por la actividad FAE, se recuperaron porciones de 1 g de medio en la zona con viraje amarillo y se sometieron a extracción mediante dos métodos: **i)** adición de 5 mL de solución de acetato de etilo-éter 1:1, sonicación durante 30 s, centrifugación a  $2.880 \times g$  durante 10 min, transferencia del sobrenadante a un tubo limpio, evaporación centrífuga y resuspensión en metanol-agua Milli-Q 1:1, mediante sonicación; **ii)** extracción en microtubos perforados, de acuerdo al protocolo de *freeze-squeeze* empleado para la recuperación de ADN (apartado 2.10.5.1), añadiendo al volumen recuperado la misma cantidad de metanol, de modo que quedara resuspendido en una solución de metanol-agua Milli-Q 1:1. Las muestras extraídas mediante ambos métodos se sometieron a filtración a través de membranas de PTFE de  $0,22 \mu\text{m}$  y su contenido en ácido ferúlico se determinó mediante HPLC, pudiendo confirmarse su presencia únicamente en el control positivo (apartado 2.20.3) (Fig. 3.48.C).



Una vez confirmado que el método fue capaz de identificar muestras positivas, se realizó un análisis de varias condiciones, con vistas a la optimización. Las condiciones analizadas fueron: i) la utilización de metil ferulato o etil ferulato como sustrato, ii) el grosor del medio dentro de la placa (50 o 100 mL de medio en una placa de Petri de 16 cm de diámetro) y iii) la cantidad de indicador de pH a emplear. Las condiciones que permitieron una mejor visualización fueron la utilización de etil ferulato, 100 mL de medio en placa de 16 cm y una cantidad de indicador de pH 2,5 veces mayor que la empleada anteriormente para hongos filamentosos [3,75 mL de la solución de púrpura de bromocresol 0,4 % (p/v) por L de medio, en lugar de 1,5 mL].

A pesar de que se comprobó que el ensayo fue efectivo cultivando directamente parches de los transformantes a analizar (Fig. 3.49), se decidió incluir una etapa previa de cultivo en microtubo, para estandarizar el volumen a emplear y facilitar la comparación entre candidatos.



**Fig. 3.49. Ensayo para la determinación cualitativa de actividad FAE de transformantes de levaduras, a partir de crecimiento en parche.** Los transformantes positivos dieron lugar a una disminución del pH más intensa, debido a la degradación del etil ferulato hacia ácido ferúlico. Los 8 transformantes más activos se indican con un círculo.

En primer lugar, se llevaron a cabo cultivos en medio YPD para determinar el tiempo óptimo de recogida de caldo de fermentación para el ensayo en placa, en base al crecimiento celular analizado por medio de la  $DO_{600}$  y a la concentración proteica en el caldo (Fig. 3.50).

Los cultivos se prepararon a partir de preinóculos en medio YPD crecidos durante 17 h a 30 °C y 250 rpm, para una  $DO_{600}$  inicial de 0,5, y se incubaron durante 96 h a 28 °C y 250 rpm. Se analizaron cuatro réplicas biológicas del control negativo (*K. phaffii* GS115 transformada con el plásmido pGAPZ $\alpha$ A, sin el gen *faeB*) y cuatro de uno de los transformantes identificados como positivos en el ensayo en placa a partir de parches.

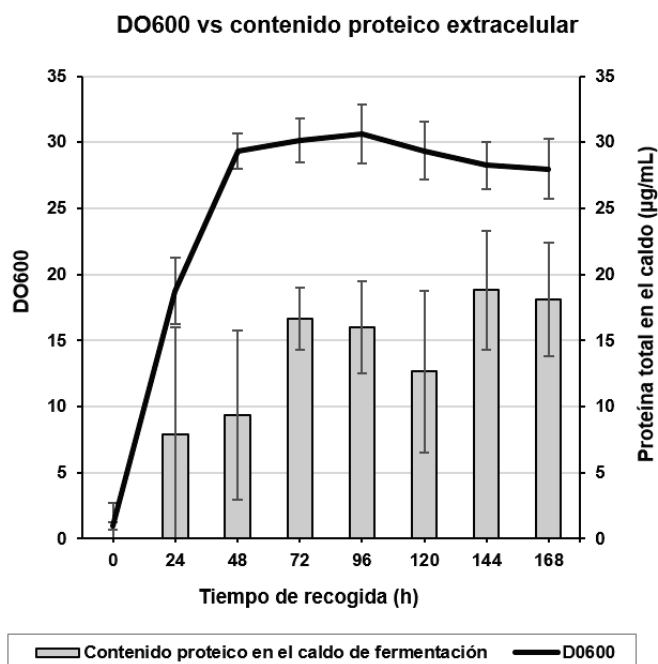


Fig. 3.50. Determinación del tiempo óptimo de recogida de caldo de fermentación para ensayo rápido de actividad FAE en placa. Se indican el crecimiento celular ( $DO_{600}$ ) y la concentración proteica en el caldo de cultivo, a lo largo de la fermentación en medio YPD.

Teniendo en cuenta que en la expresión constitutiva la producción de la proteína recombinante se correlaciona con el crecimiento celular (Çalık *et al.*, 2015), el tiempo óptimo de recogida se estableció a las 48 h, que fue cuando se detectó el inicio de la fase estacionaria.

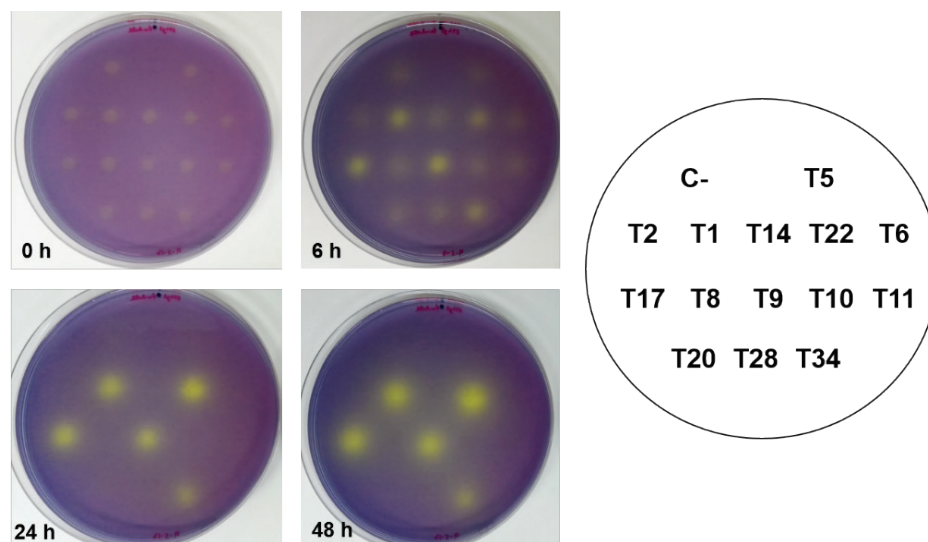


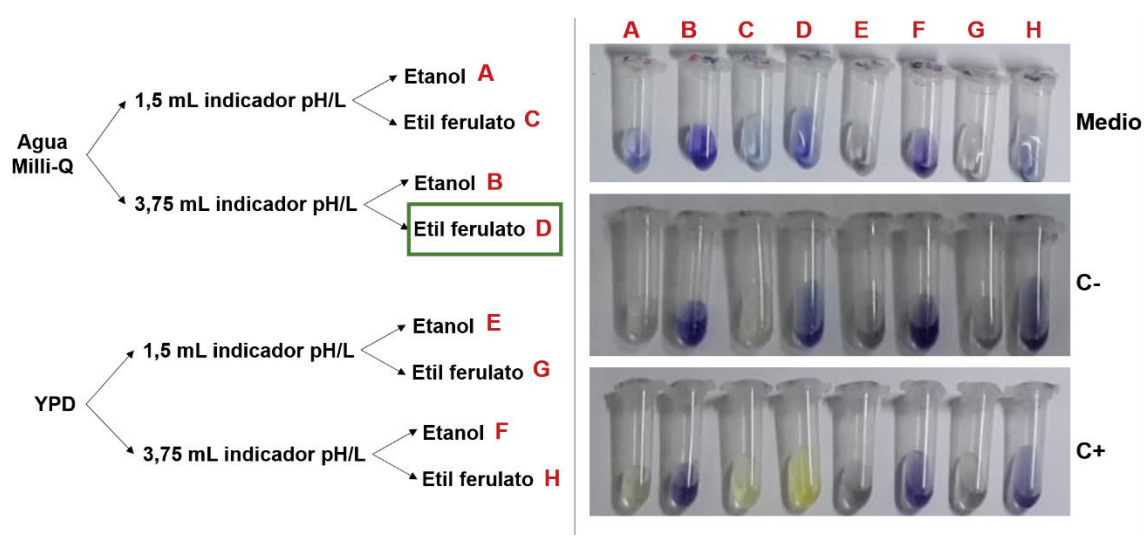
Fig. 3.51. Ensayo para la determinación cualitativa de actividad FAE de transformantes de levaduras en placa, a partir de caldo de cultivo en microtubo. Se añadieron 5 µL de cultivo en microtubo a la placa, por punto. Las placas de medio EF con púrpura de bromocresol se incubaron a 30 °C. La disminución del pH más intensa en los transformantes positivos comenzó a ser visible a las 6 h.

Una vez determinado el momento óptimo de recogida de los cultivos en medio YPD, se prepararon cultivos de los transformantes a analizar en microtubos de 2,2 mL con 500 µL de

medio YPD y una colonia procedente de placa. Los microtubos se incubaron durante 48 h a 28 °C y 250 rpm, tras lo cual se tomaron 5 µL del cultivo, que fueron añadidos sobre la placa de medio EF con púrpura de bromocresol, que se incubó a 30 °C. Los halos de actividad FAE se estudiaron desde 0 hasta 48 h de incubación, detectándose candidatos positivos a partir de las 6 h (Fig. 3.51). Dado que es preferible el empleo de ensayos que aporten información en el menor tiempo posible, se establecieron las 6 h de incubación como momento óptimo de análisis de los halos.

### ○ ENSAYO DE ACTIVIDAD FAE EN MICROTUBO

Además del ensayo en placa, se llevó a cabo una variación del protocolo para análisis en medio líquido, que pudiera ser susceptible de ser adaptado a métodos HTS en placas de microtitulación. En este caso, se llevó a cabo el cultivo directo en microtubos, a partir de colonias de los transformantes crecidos durante 48 h en placas de medio YPD. Se tomó una pequeña cantidad de un parche de cada transformante con un palillo estéril, que se introdujo en microtubos de 2,2 mL con 500 µL de medio para determinación de la actividad FAE. Se analizaron diferentes composiciones del medio de ensayo (Fig. 3.52).



**Fig. 3.52. Ensayo para la determinación cualitativa de actividad FAE de transformantes de levaduras en microtubo.** Se indican las diferentes composiciones del medio para ensayo. Los microtubos corresponden a una incubación de 5 h a 30 °C. **Medio:** medio sin inocular. **C-:** control negativo (*K. phaffii* GS115 transformada con el plásmido pGAPZαA vacío). **C+:** transformante con actividad comprobada. Se resalta con un recuadro verde el medio más adecuado para la selección de transformantes con actividad FAE.

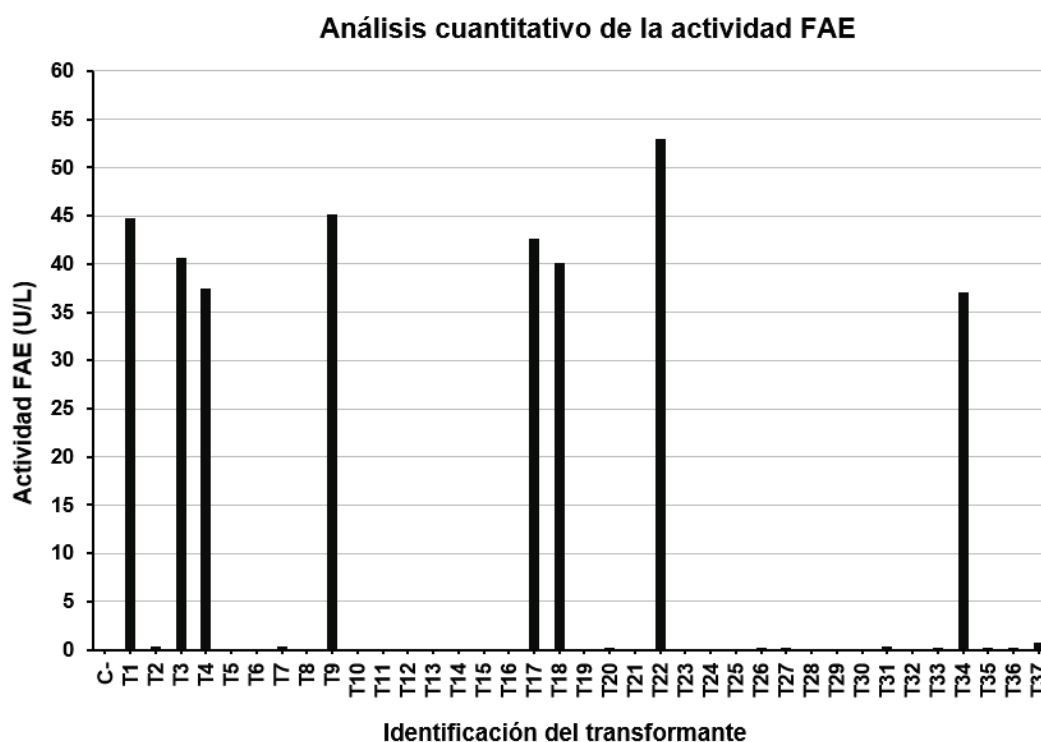
Los ensayos de actividad FAE se visualizaron tras 5 y 24 h de incubación a 30 C y 250 rpm. Puesto que la actividad se detectó de forma clara a las 5 h y es preferible que los ensayos se desarrollen en el menor tiempo posible, se establecieron como condiciones óptimas: i) la

observación de los ensayos a las 5 h y ii) la utilización del medio con 3,75 mL de indicador de pH [0,4 % (p/v) de púrpura de bromocresol] y 15 mL de solución de etil ferulato [solución 5 % (p/v) de etil ferulato en etanol absoluto] por L de agua Milli-Q estéril (medio D de la Fig. 3.52). Según nuestro conocimiento hasta la fecha, se trata del primer ensayo desarrollado específicamente para la selección de transformantes positivos de *K. phaffii* capaces de secretar de forma constitutiva FAEs heterólogas. El ensayo podría ser aplicado a otras FAEs, con la posibilidad de adaptarse a menores volúmenes para su uso en microplacas. Además, podría llevarse a cabo su estandarización mediante lecturas de absorbancia para la determinación cuantitativa de actividad FAE, de modo similar al método propuesto por Marešová y Sychrová para la monitorización de la acidificación del medio en investigaciones de la fisiología de levaduras (Marešová y Sychrová, 2007).

### *3.3.3.3. Selección de los transformantes con mayor actividad FAE*

Los ensayos cualitativos de actividad FAE previamente indicados permitieron la selección de 8 transformantes de levaduras con actividad FAE, a partir del análisis de un total de 37 transformantes. La actividad FAE de los 8 transformantes positivos se verificó de forma cuantitativa mediante ensayos de actividad FAE frente a MFA (apartado 2.20.1).

Se prepararon preinóculos en 15 mL de medio YPD, a partir de colonias aisladas en placa de cada uno de los transformantes. Tras 11-15 h de incubación a 30 °C y 250 rpm, 100 µL de preinóculo se inocularon en matraces de 250 mL con 50 mL de medio YPD, que fueron incubados a 28 °C y 250 rpm. Se realizaron recogidas de 1 mL de caldo de fermentación a las 48 h de fermentación. Las muestras se sometieron a centrifugación, durante 5 min a 16.168 x *g*, empleándose 100 µL de sobrenadante filtrado en reacciones FAE frente a MFA, en un volumen final de 200 µL. Tras 30 min de reacción a 50 °C y pH 5,0 (Rodríguez-Castro, 2017), las reacciones se detuvieron, hirviéndolas durante 5 min. La cantidad de ácido ferúlico liberado a partir de MFA se determinó por medio de HPLC, expresando la actividad FAE en U/L de caldo de cultivo. Se comprobó que los transformantes positivos en los ensayos cualitativos detallados en el apartado 3.3.3.2 tenían actividad FAE en el ensayo cuantitativo (Fig. 3.53). Pudo observarse que, además, el transformante que dio lugar al mayor halo de hidrólisis en placa (T22) fue también el que presentó mayor actividad FAE en el ensayo cuantitativo (Fig. 3.51 y Fig. 3.53).



**Fig. 3.53. Determinación cuantitativa de actividad FAE de transformantes de levaduras para expresión constitutiva de PrFaeB recombinante.** Reacciones frente a MFA a pH 5,0 y 50 °C Se indican los valores de actividad FAE expresados en U/L de caldo de cultivo. C-: control negativo (*K. phaffii* GS115 transformada con el plásmido pGAPZαA vacío). T1 a T37: transformantes pGAPZαA\_ *faeB\_c*.

Los transformantes positivos con la construcción para expresión constitutiva de PrFaeB (pGAPZαA\_ *faeB\_c*) mostraron hasta 10 veces más actividad FAE en el ensayo cuantitativo que los transformantes positivos con la construcción para expresión inducible (Fig. 3.43).

Los 8 transformantes con actividad FAE fueron renombrados para facilitar su manejo, pasando de T1, T3, T4, T9, T17, T18, T22 y T34 a C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 y C8, respectivamente. La correcta integración del casete de expresión, el marco de lectura y la integridad de la cola de 6xHis se comprobaron mediante extracción de ADN total de los transformantes (apartado 2.9.3.2) y reacciones de PCR, empleando los cebadores pGAP\_F y 3'\_AOX1 (apartado 2.2.4). Los fragmentos amplificados se verificaron mediante secuenciación.

Una vez confirmada la actividad FAE y la correcta integración del casete de expresión en los 8 transformantes, se determinaron los más productores mediante fermentaciones a pequeña escala (Fig. 3.54). En primer lugar, se realizaron preinóculos en 50 mL de medio YPD con cada uno de los 8 transformantes positivos, más el control negativo (*K. phaffii* GS115 transformada con pGAPZαA), que se incubaron durante 16 h a 30 °C y 250 rpm. 20 μL de los preinóculos se

emplearon para inocular los pocillos correspondientes (volumen final de 1200  $\mu\text{L}$ /pocillo). Las fermentaciones se llevaron a cabo por triplicado en placas de 48 pocillos en forma de flor, para una mejor oxigenación, empleando el microbiorreactor *BioLector*<sup>®</sup> (apartado 2.4.1.3) (Funke *et al.*, 2009; Kensy *et al.*, 2009; Back *et al.*, 2016). La plataforma *BioLector*<sup>®</sup> permitió monitorizar el cultivo en tiempo real, determinando DO, OD ( $\text{pO}_2$ ) y pH, en cada uno de los pocillos por separado, realizando mediciones cada 25 min (Fig. 3.54). Las condiciones de la cámara de cultivo se establecieron en 30 °C, humedad relativa del 80-90 % y agitación de 1250 rpm.

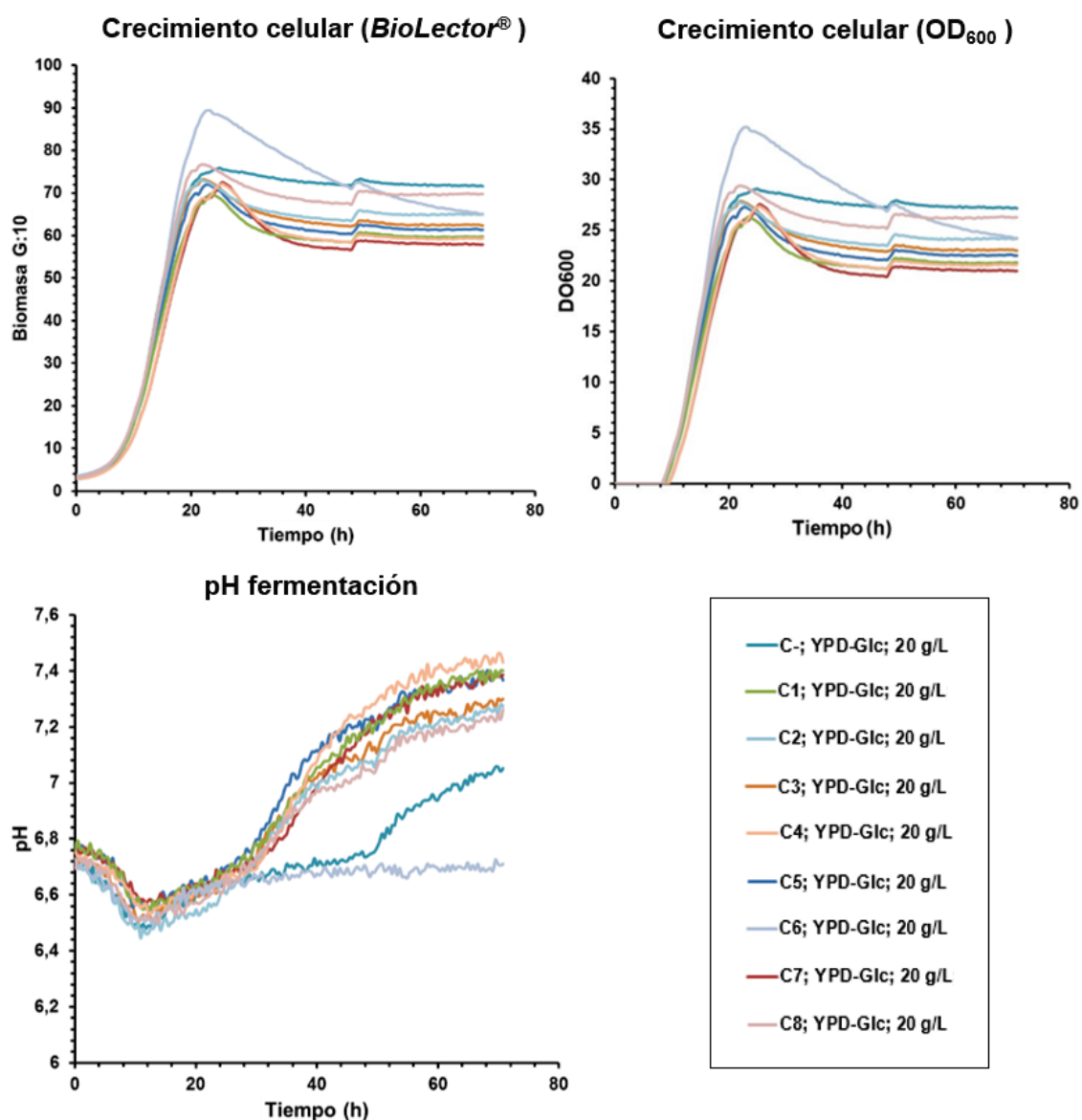
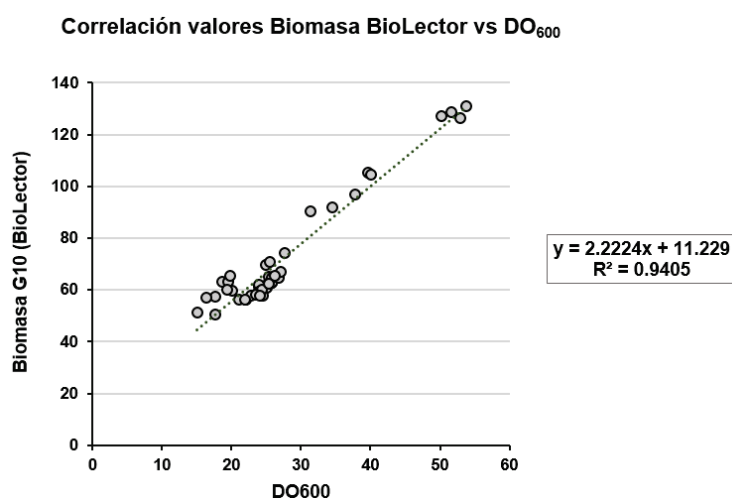


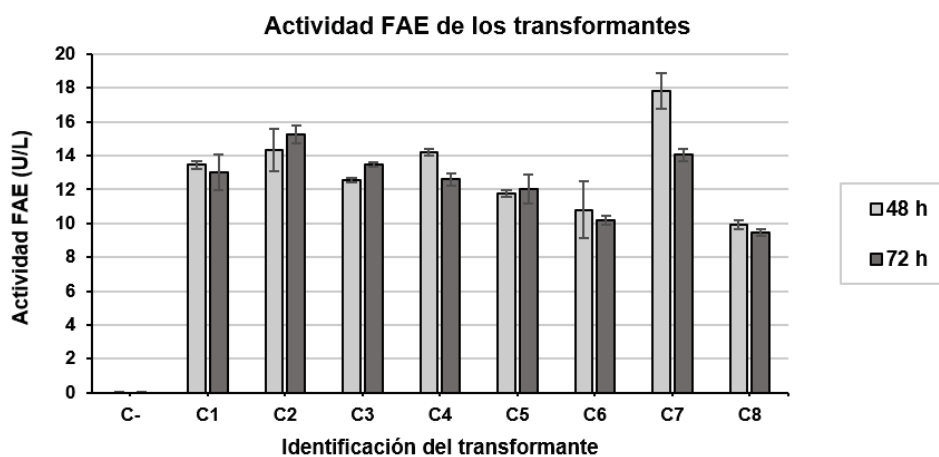
Fig. 3.54. Parámetros de la fermentación de los transformantes seleccionados, cultivados en el microbiorreactor *BioLector*<sup>®</sup>. Los transformantes se cultivaron por triplicado en medio YPD, a 30 °C, 80-90 % de humedad relativa y 1250 rpm. Se indican los valores de biomasa obtenida con una ganancia de valor 10, el valor corregido de DO<sub>600</sub> y el pH en los pocillos de cada uno de los transformantes.

Los valores de biomasa tomados por el *BioLector*<sup>®</sup> no son directamente comparables a la  $DO_{600}$  de los cultivos determinada en espectrofotómetro, por lo que se analizó la correlación entre unos y otros valores a las 48 h de cultivo. El factor de corrección se aplicó a los valores de biomasa en el *BioLector*<sup>®</sup>, para obtener la gráfica de  $DO_{600}$  que se recoge en la Fig. 3.54. Debido a la ausencia de datos de baja DO para llevar a cabo los cálculos, el factor de corrección fue poco adecuado para valores de  $DO_{600}$  inferiores a 15 (Fig. 3.55), lo que explica los valores negativos de  $DO_{600}$  corregida a tiempo inferior a 10 h en la Fig. 3.54.



**Fig. 3.55. Correlación entre los valores de Biomasa determinados en *BioLector*<sup>®</sup> y la  $DO_{600}$ .**

En cuanto a la actividad FAE de los transformantes, se llevaron a cabo reacciones frente a MFA, empleando 100  $\mu$ L de caldo de fermentación, recogido a las 48 y 72 h de fermentación, en un volumen final de 200  $\mu$ L de reacción, a 50 °C y pH 5,0 (apartado 2.20.1) (Fig. 3.56).



**Fig. 3.56. Actividad FAE de los transformantes tras 48 y 72 h de cultivo.** La actividad FAE de los diferentes transformantes se valoró mediante la liberación de ácido ferúlico a partir de MFA en reacciones a pH 5,0 y 50 °C, determinada en HPLC, y se expresó en U/L de caldo de cultivo.

**Los transformantes con mayor actividad FAE fueron C2 y C7**, observándose, en general, valores más altos a 48 que a 72 h de fermentación. La actividad FAE tras el cultivo en *BioLector*<sup>®</sup> (volumen de cultivo de 1,2 mL) fue menor que la determinada previamente tras el cultivo en matraz (volumen de cultivo de 50 mL. Fig. 3.53). Este hecho pudo deberse a las diferentes condiciones de cultivo al pasar a volúmenes menores, empleando placas con pocillos con una geometría distinta, diferente oxigenación, etc. (Eck *et al.*, 2018).

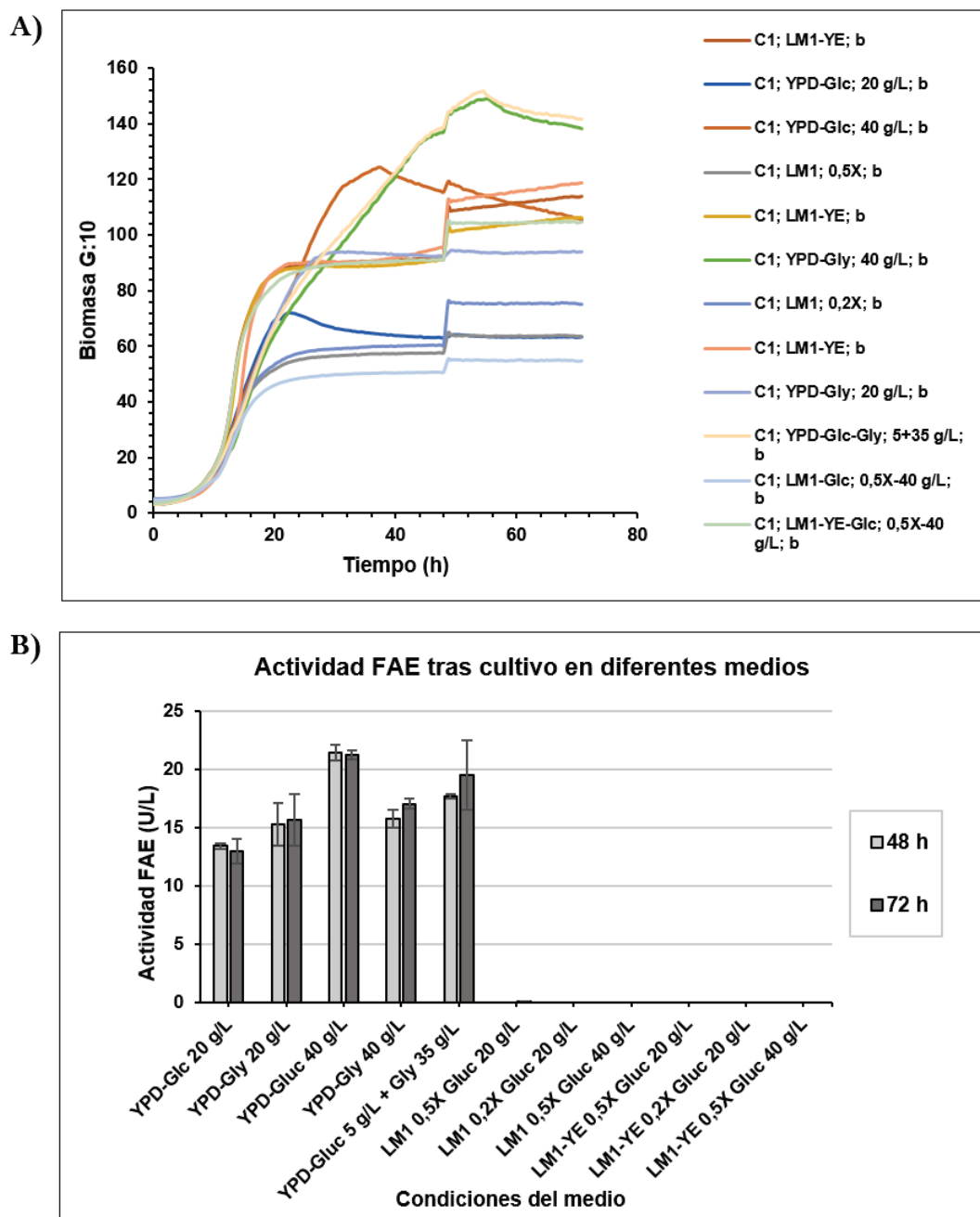
#### *3.3.3.4. Optimización del medio de cultivo para la expresión de la enzima PrFaeB recombinante*

Además de para analizar la actividad FAE de los transformantes, el microbiorreactor *BioLector*<sup>®</sup> se empleó para comparar el crecimiento y la actividad en diferentes medios de cultivo: **i)** medio YPD, con diferentes fuentes de carbono (20 g/L de glucosa o glicerol; 40 g/L de glucosa o glicerol; 5 g/L glucosa + 35 g/L glicerol), **ii)** medio definido LM1 (diluido 0,5X o 0,2X; suplementado, o no, con extracto de levadura; con 20 o 40 g/L de glucosa como fuente de carbono). Se incluyeron, al menos, dos réplicas biológicas de cada una de las condiciones. La actividad FAE en cada condición se determinó en reacciones frente a MFA (apartado 2.20.1), empleando 100 µL de caldo de cultivo filtrado, durante 30 min a 50 °C y pH 5,0 (Fig. 3.57).

De acuerdo a los resultados que se indican en la Fig. 3.57, las levaduras fueron capaces de crecer en todas las condiciones analizadas, alcanzándose los mayores valores de biomasa en los cultivos en medio YPD con 5 g/L de glucosa y 35 g/L de glicerol como fuentes de carbono y en medio YPD con 40 g/L de glucosa (YPDm). El cultivo en los citados medios permitió alcanzar una DO<sub>600</sub> próxima a 50-60 y, además, se apreció que el crecimiento exponencial del cultivo se prolongó hasta aproximadamente las 48 h, a diferencia del resto de condiciones analizadas, donde la fase estacionaria se alcanzó a las 24 h. La menor biomasa se produjo en las fermentaciones en los medios definidos, donde se redujo aprox. a la mitad del máximo. Sin embargo, en todos ellos se apreció crecimiento celular. En todos los casos, el pH del cultivo se mantuvo entre 6 y 7.

En cuanto a la actividad FAE, el medio en el que se detectaron mayores valores fue YPDm. Las diferencias entre el glicerol y la glucosa demostraron que el primero fue una mejor fuente de carbono a menor concentración (20 g/L), mientras que la glucosa fue preferible a concentraciones mayores (40 g/L).

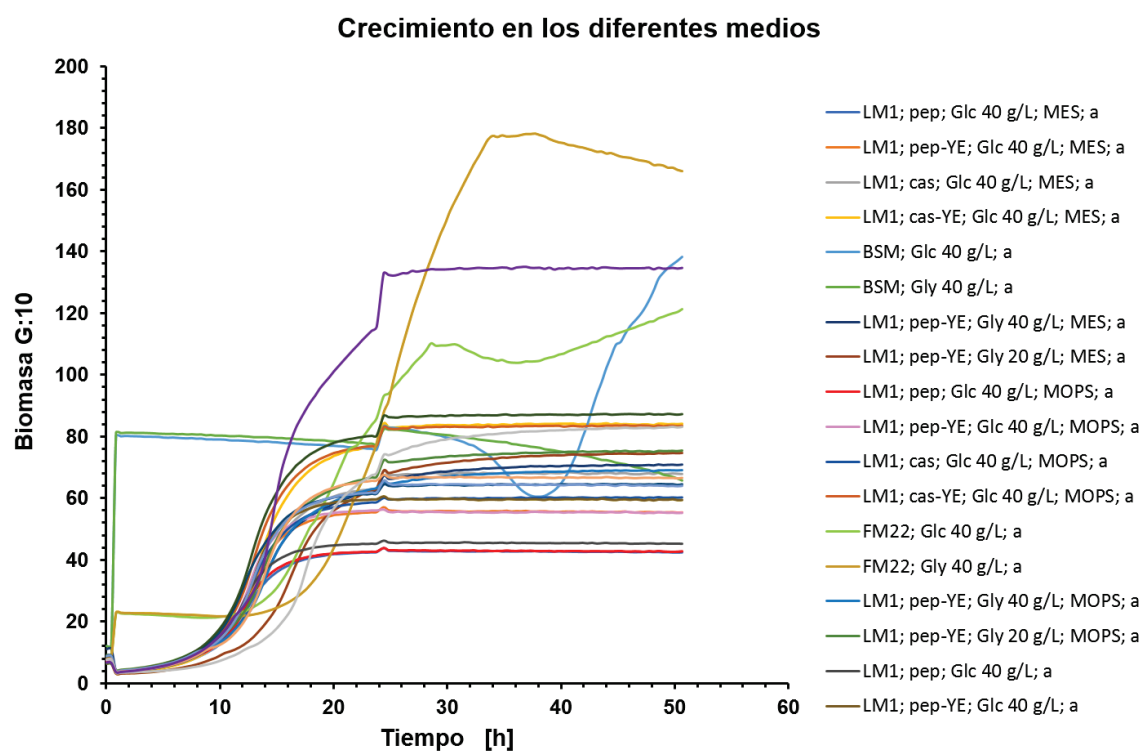




**Fig. 3.57. Curvas de crecimiento y actividad FAE en los medios analizados. A)** Curva de crecimiento del transformante C1 en cada una de las condiciones. Glc: glucosa. Gly: glicerol. **B)** Actividad FAE del transformante C1 en cada una de las condiciones. Reacciones FAE llevadas a cabo por duplicado frente a MFA, a 50 °C y pH 5,0, en 30 min. La actividad FAE se expresó en U/L de caldo de fermentación.

No se detectó actividad FAE en ninguna de las condiciones de crecimiento en medio definido, por lo que se prepararon nuevos experimentos en *BioLector*<sup>®</sup>, analizando en este caso las siguientes variaciones del medio LM1: **i)** con/sin extracto de levadura; **ii)** con/sin casaminoácidos; **iii)** con/sin peptona; **iv)** con tampón MES/MOPS/pH sin regular; **v)** 20 o

40 g/L de glucosa o de glicerol, como fuente de carbono. Además, se incluyeron dos nuevos medios definidos para expresión en levaduras: BSM y FM22 (Stratton *et al.*, 1998) (Fig. 3.58).

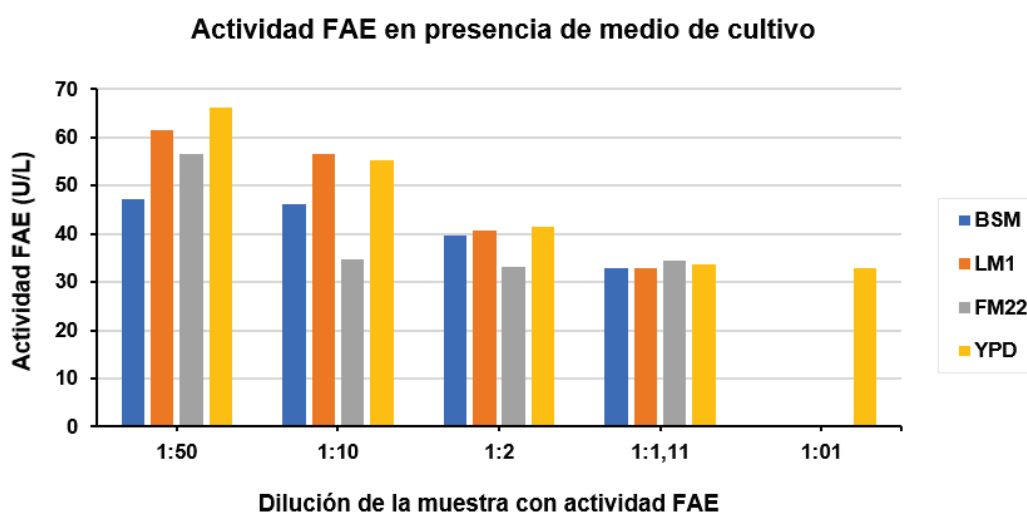


**Fig. 3.58. Curvas de crecimiento en los diferentes medios analizados. A)** Curva de crecimiento del transformante C1 en cada una de las condiciones de medio LM1, FM22 y BSM analizadas por medio del sistema de microbiorreactor *BioLector*<sup>®</sup>. **Glc:** glucosa. **Gly:** glicerol. **cas:** casaminoácidos. **pep:** peptona bacteriológica. **YE:** extracto de levadura.

Se observó crecimiento celular en todas las condiciones analizadas, siendo mayor en el medio FM22 con 40 g/L de glicerol como fuente de carbono (Fig. 3.58). En el caso del medio BSM, no fue posible controlar el crecimiento del cultivo, debido a que presentó un aspecto turbio, con la aparición de precipitados (Cos *et al.*, 2006). Dicho medio se excluyó de análisis posteriores.

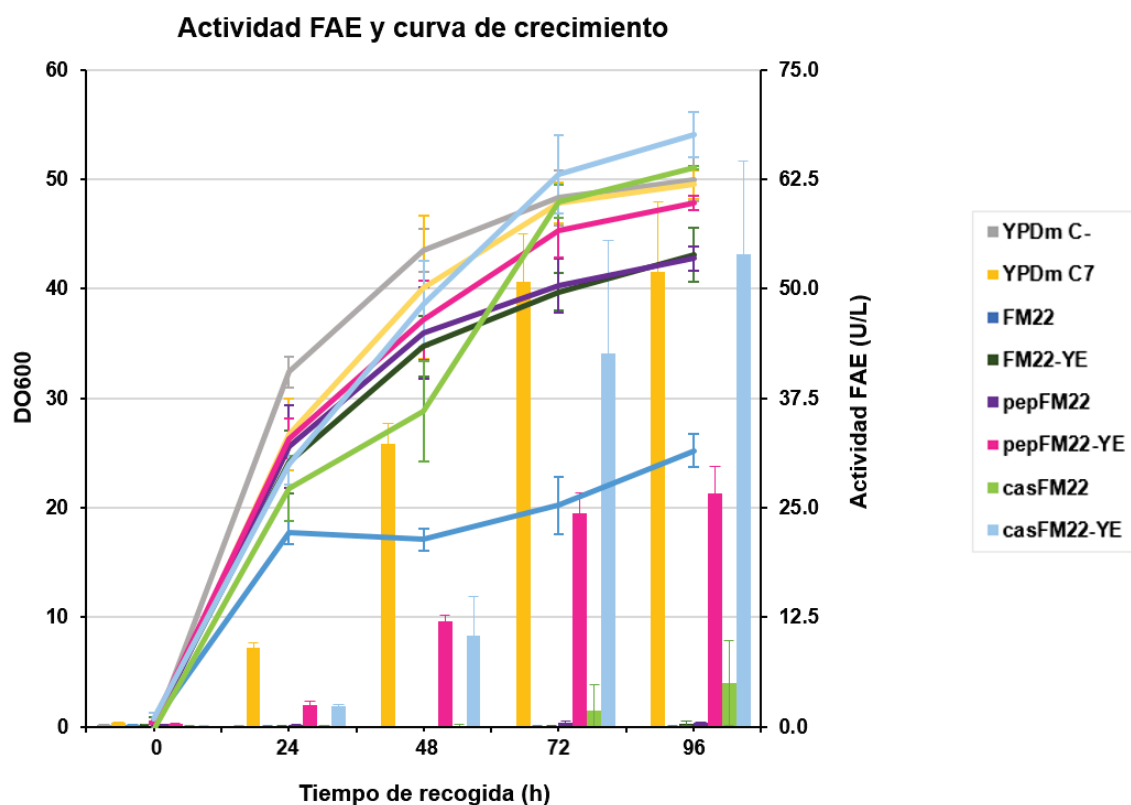
De nuevo, no se detectó actividad FAE en ninguno de los medios definidos analizados. La ausencia de actividad FAE a partir de cultivos en medio definido pudo deberse a varios motivos, como son: **i)** un problema en la transcripción, traducción, procesamiento o secreción de PrFaeB recombinante, **ii)** bajos niveles de producción de la proteína recombinante o reducida estabilidad de PrFaeB en el caldo de cultivo o **iii)** la presencia de compuestos en el medio que actuaran como inhibidores de FAEs y estuvieran presentes en las reacciones. Este último motivo se descartó mediante la realización de reacciones FAE frente a MFA en presencia de concentraciones

crecientes de los medios de cultivo. Se prepararon reacciones en un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ , con 100  $\mu\text{L}$  de solución de MFA (apartado 2.20.1) y 100  $\mu\text{L}$  de una dilución 1:1; 1:1,11; 1:2; 1:10 y 1:50 de una muestra de caldo de fermentación en YPD con actividad FAE confirmada, diluida en cada uno de los medios. Se observó que la actividad FAE, si bien se vio ligeramente reducida en presencia de medio BSM y FM22, fue detectable en todas las condiciones (Fig. 3.59).



**Fig. 3.59. Actividad FAE en presencia de diferentes concentraciones de los medios definidos.** Las reacciones FAE se llevaron a cabo frente a 100  $\mu\text{L}$  de solución de MFA, en un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ , añadiendo 100  $\mu\text{L}$  de una muestra de caldo de cultivo con actividad FAE diluida en los medios LM1, FM22 y BSM. Las reacciones se realizaron a 50  $^{\circ}\text{C}$  y pH 5,0, durante 30 min, y la actividad FAE se expresó en U/L de caldo de fermentación.

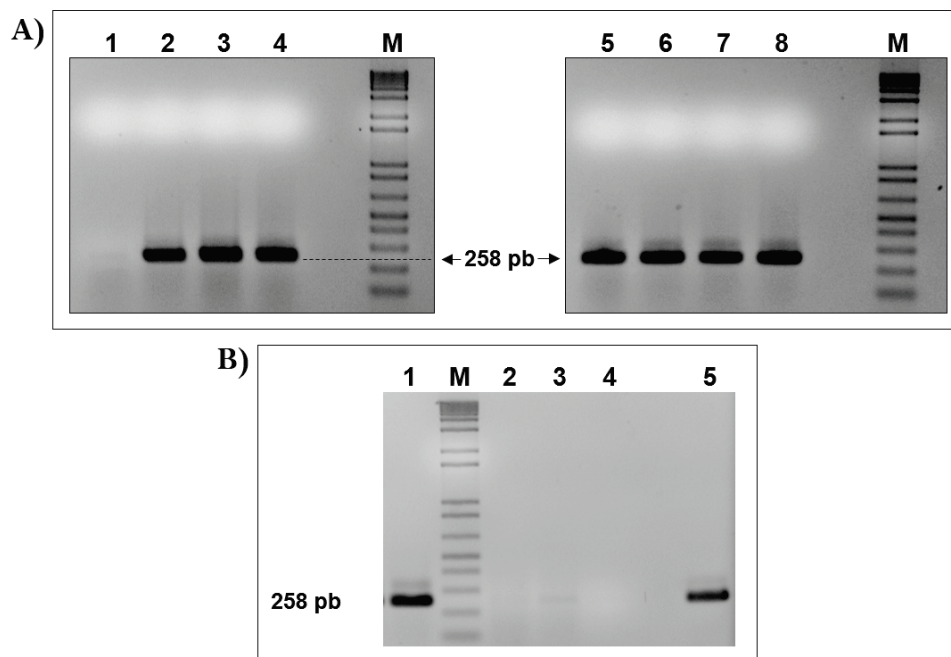
En cuanto a los otros posibles motivos por los cuales no se detectó actividad FAE en los caldos de cultivo en medios definidos (un problema en la expresión de PrFaeB recombinante, o bien una menor concentración/estabilidad de PrFaeB en el caldo de cultivo), estos se analizaron por medio de fermentaciones preparadas por triplicado en matraces de 100 mL con 20 mL de medio, inoculados con un preinóculo crecido durante 16 h a 30  $^{\circ}\text{C}$  y 250 rpm en medio YPD, para una  $\text{DO}_{600}$  de partida de 0,5. Las fermentaciones se incubaron durante 96 h a 28  $^{\circ}\text{C}$  y 250 rpm, tomándose muestras para determinación del crecimiento del cultivo y la actividad FAE cada 24 h (Fig. 3.60). Los medios de cultivo empleados en el estudio fueron YPDm y modificaciones del medio FM22 (suplementación con peptona, casaminoácidos y/o extracto de levadura). El transformante empleado en las fermentaciones fue C7, que fue el de mayor actividad FAE en el experimento inicial en la plataforma *BioLector*<sup>®</sup>. Se incluyó, además, como control negativo, la cepa parental *K. phaffii* GS115 transformada con el plásmido pGAPZ $\alpha$ A vacío (C-).



**Fig. 3.60. Curva de crecimiento y actividad FAE tras fermentación en diferentes medios de cultivo.** Las fermentaciones se desarrollaron por triplicado, a 28 °C y 250 rpm. Las reacciones FAE se realizaron frente a MFA, añadiendo 100 µL de caldo de cultivo filtrado en un volumen final de 200 µL, a 50 °C y pH 5,0, durante 30 min. La actividad FAE se expresó en U/L de caldo de fermentación. Las líneas indican valores de DO<sub>600</sub>; las columnas, de actividad FAE.

Se observó crecimiento celular similar en todas las condiciones analizadas, excepto en el medio FM22 sin suplementar, en el que únicamente se alcanzó la mitad de DO<sub>600</sub>. Respecto a la actividad FAE, esta fue detectada en los cultivos en medio YPDm y en medio FM22 suplementado con: i) casaminoácidos y extracto de levadura, ii) peptona y extracto de levadura y iii) en los últimos tiempos de recogida (a partir de 72 h de cultivo), en el medio FM22 suplementado únicamente con casaminoácidos. No se detectó actividad FAE en el medio FM22 únicamente suplementado con peptona y sólo con extracto de levadura. Estos resultados demostraron el efecto positivo de la adición de compuestos de naturaleza proteica en el medio de cultivo, para detectar actividad FAE en el caldo de fermentación, lo que apunta a una posible acción estabilizadora de estas sustancias sobre la proteína recombinante. En trabajos previos, se ha indicado que la adición de casaminoácidos puede reducir el grado de degradación del producto recombinante por parte de proteasas extracelulares (Clare *et al.*, 1991; Byrne *et al.*, 2005).

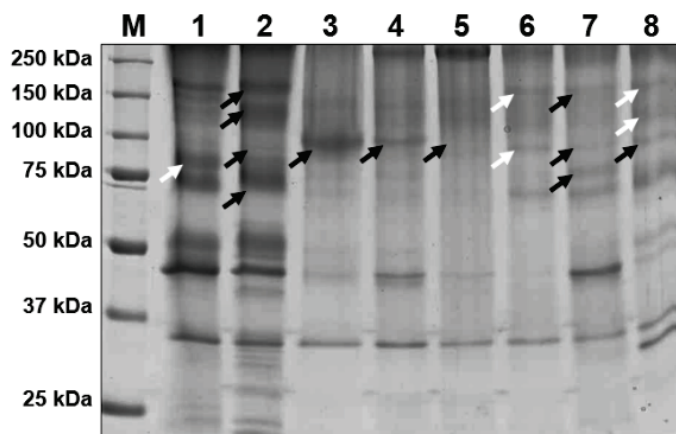
Por último, para analizar si la ausencia de actividad FAE pudo deberse a problemas en la expresión en los medios de cultivo que resultaron negativos, se extrajo ARN total a partir de células del transformante productor C7 y un control negativo (C-, correspondiente a la cepa parental transformada con el plásmido pGAPZ $\alpha$ A vacío), cultivado en las mismas condiciones del ensayo indicado en la Fig. 3.60 y recogidas a las 72 h (apartado 2.17.2.2). El ARN total se empleó en reacciones de RT-PCR mediante el sistema comercial *SuperScript<sup>®</sup> III One-Step*, con ADN polimerasa *Platinum<sup>®</sup> Taq* (Invitrogen) y los oligonucleótidos cebadores 5-*FaeB*-F y 1-*FaeB*-R, a una temperatura de anillamiento de 60 °C. El producto de amplificación dio lugar a una banda de 258 pb, que se identificó en todas las condiciones analizadas para C7, mientras que no se detectó en el control negativo C- (Fig. 3.61.A). La ausencia de contaminación con ADNg se verificó por medio de reacciones de PCR empleando como molde las muestras de ARN total (Fig. 3.61.B).



**Fig. 3.61. Análisis de la transcripción de *faeB* de *P. rubens* en transformantes de levaduras para expresión constitutiva.** Se realizó RT-PCR (cebadores 5-*FaeB*-F/1-*FaeB*-R), empleando como molde ARN total del transformante C7 y la cepa parental transformada con pGAPZ $\alpha$ A vacío (C-). **A)** Análisis RT-PCR de muestras procedentes de diferentes medios de cultivo. **1:** C-, YPD. **2:** C7, YPD. **3:** C7, FM22. **4:** C7, FM22. **5:** C7, pepFM22. **6:** C7, pepFM22-YE. **7:** C7, casFM22. **8:** C7, casFM22-YE. **M:** marcador de peso molecular 1kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen). **B)** Reacciones para verificar la ausencia de ADNg contaminante. **1:** RT-PCR C7, YPD. **2:** C7, PCR YPD. **3:** PCR control ADNg C7, pepFM22-YE. **4:** RT-PCR control mezcla de reacción, sin ARN molde. **5:** control positivo PCR, ADNg C7.

Los resultados de las reacciones de RT-PCR indicaron que la transcripción del gen heterólogo *faeB* se produjo en todas las condiciones de cultivo. Una vez verificada la transcripción,

se analizó la capacidad del transformante C7 para producir la enzima PrFaeB en los diferentes medios de cultivo, mediante técnicas proteómicas, empleando geles monodimensionales SDS-PAGE. Para ello, se tomaron muestras de caldo de fermentación recogidas a las 96 h, que fueron filtradas a través de filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro y precipitadas con TCA-DTT en acetona, de acuerdo al apartado 2.24.1. Las muestras proteicas obtenidas mediante precipitación se cuantificaron y 20  $\mu\text{g}$  de proteína total fueron cargados en cada pocillo de los geles monodimensionales SDS-PAGE. Tras la tinción por el método de Coomassie coloidal, las bandas proteicas obtenidas se recuperaron y sometieron a digestión triptica, para proceder a su identificación mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF (apartados 2.24.7 y 2.24.8). Esta técnica permitió detectar la presencia de PrFaeB de *P. rubens* Wisconsin 54-1255 en todas las condiciones de cultivo analizadas, excepto en el medio pepFM22-YE (Fig. 3.62).



**Fig. 3.62. Análisis de la producción de PrFaeB recombinante en diferentes medios de cultivo, a partir del transformante C7 (*K. phaffii* GS115).** Gel SDS-PAGE teñido con Coomassie coloidal. Se analizaron muestras de caldo de fermentación 96 h, precipitadas con TCA-DTT en acetona. La identificación de cada condición de cultivo se indica en la parte superior; a la izq., se indica el peso molecular de las bandas del marcador *Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards* (Bio-Rad) (**M**). Se indican con una flecha negra aquellas bandas proteicas en las que se identificó la enzima PrFaeB de *P. rubens* Wisconsin 54-1255, mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF. Una flecha blanca indica que no fue posible obtener ninguna identificación proteica a partir de dicha banda. **1:** C-, YPDm. **2:** C7, YPDm. **3:** C7, FM22. **4:** C7, FM22-YE. **5:** C7, pepFM22. **6:** C7, pepFM22-YE. **7:** C7, casFM22. **8:** C7, casFM22-YE.

A pesar de que no se identificó PrFaeB en la muestra obtenida del medio pepFM22-YE (a partir del cual sí que se detectó actividad FAE en el caldo de cultivo), su presencia no se descartó, puesto que la banda existente entre 75 y 100 kDa, compatible con el tamaño de otras de las bandas donde se identificó PrFaeB, presentó baja concentración y contaminación con otras proteínas, por lo que no fue posible su identificación. En general, la intensidad de las bandas proteicas en los medios de cultivo en los que no se detectó actividad FAE fue menor.

Los resultados obtenidos en los análisis mediante RT-PCR y en los geles monodimensionales SDS-PAGE respaldan la hipótesis que explica la ausencia de actividad en algunas condiciones debido a la baja concentración de proteína recombinante secretada, junto con inestabilidad o degradación, más que a problemas en la expresión y secreción de la proteína.

A la vista de los resultados obtenidos, el medio de cultivo en el cual se detectó mayor actividad FAE fue **YPD con 40 g/L de glucosa como fuente de carbono (YPDm)** (Fig. 3.57.B y Fig. 3.60).

### 3.3.3.5. Optimización de la temperatura de cultivo para la expresión de la enzima *PrFaeB* recombinante

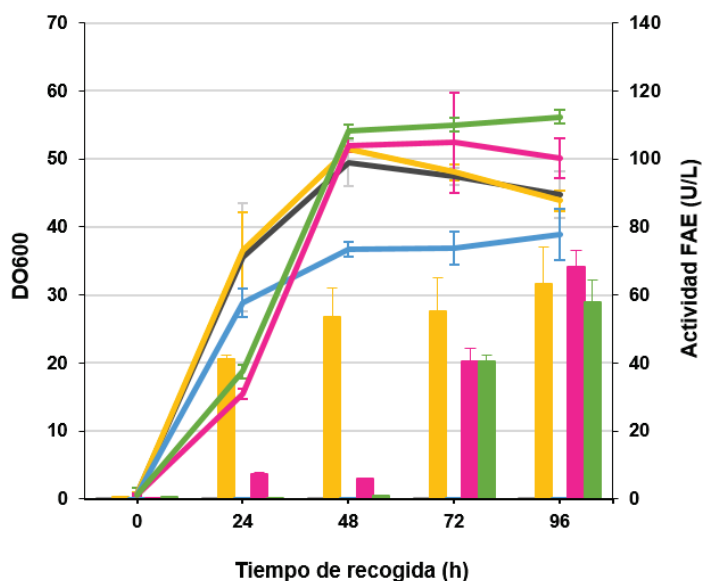
Una vez determinado el medio óptimo de cultivo, se procedió a analizar la influencia de la temperatura en la expresión del producto recombinante.

Para ello, se realizaron fermentaciones en 50 mL de medio de cultivo en matraces de 250 mL con deflectores. Las fermentaciones se inocularon para una  $DO_{600}$  inicial de 0,5, a partir de preinóculos en medio YPD cultivados durante 16 h a 30 °C y 250 rpm. Se prepararon 3 réplicas biológicas de cada condición, con el transformante C7, y se incluyó como control negativo un transformante portando el plásmido pGAPZ $\alpha$ A sin el gen *faeB* de *P. rubens*.

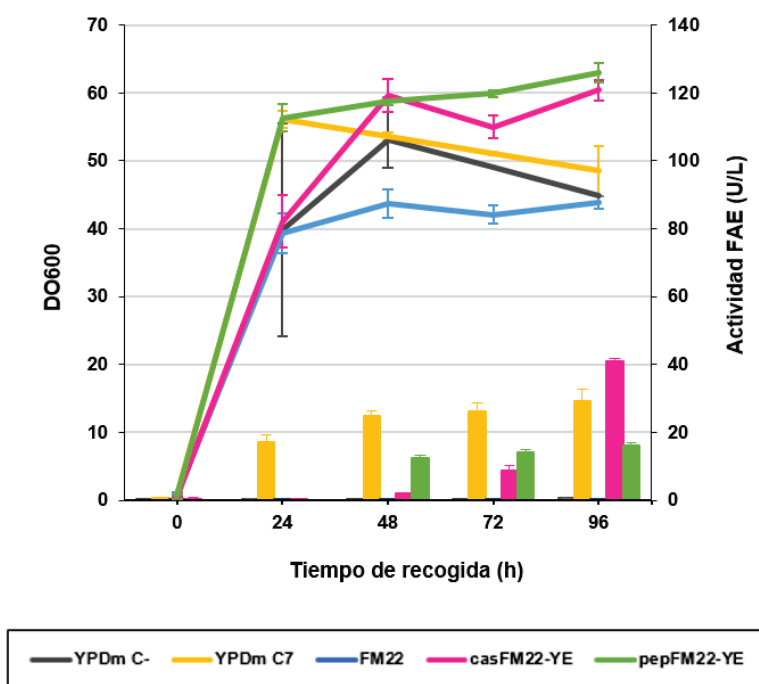
Las fermentaciones se llevaron a cabo a temperaturas de 23 y 30 °C, empleando tres de los medios complejos en los que se detectó actividad FAE (Fig. 3.60): YPDm, casFM22-YE y pepFM22-YE. Asimismo, se incluyó el medio definido FM22. Se recogieron muestras de la fermentación cada 24 h, desde 0 hasta 96 h de cultivo, que se emplearon para estudiar el crecimiento celular y para determinar la actividad FAE, de acuerdo al apartado 2.20.1.

Los resultados de las fermentaciones demostraron la presencia de actividad FAE en todos los medios de cultivo seleccionados (YPDm, casFM22-YE y pepFM22-YE), a excepción del medio FM22 y el transformante empleado como control negativo. La actividad FAE fue mayor en las fermentaciones a 23 °C que a 30 °C, en todas las condiciones, a pesar de que el crecimiento celular fue mayor a 30 °C (Fig. 3.63).

**A) Actividad FAE y curva de crecimiento (cultivo a 23 °C)**



**B) Actividad FAE y curva de crecimiento (cultivo a 30 °C)**



**Fig. 3.63. Curvas de crecimiento y actividad FAE tras fermentación en diferentes medios de cultivo y temperaturas.**

Las fermentaciones se desarrollaron por triplicado, con una agitación de 250 rpm. Las reacciones FAE se llevaron a cabo frente a MFA, añadiendo 100 µL de caldo de cultivo filtrado en un volumen final de 200 µL, a 50 °C y pH 5,0, durante 30 min, y la actividad FAE se expresó en U/L de caldo de fermentación. Las líneas indican valores de DO<sub>600</sub>; las columnas, de actividad FAE **A)** Valores de las fermentaciones a 23 °C. **B)** Valores de las fermentaciones a 30 °C.

La mejora en la expresión constitutiva de proteínas recombinantes en *K. phaffii* a temperaturas menores de cultivo es un hallazgo indicado en estudios anteriores (Daly y Hearn, 2005; Cos *et al.*, 2006). Li y colaboradores analizaron los niveles de producción heteróloga de una proteína procedente del arenque en *K. phaffii*, a 23 y 30 °C, observándose una mejora en la producción y la estabilidad de la proteína en el cultivo a 23 °C (Li *et al.*, 2001). La mejora en la



producción puede deberse a una mayor viabilidad celular y a un mejor plegamiento del producto recombinante. Esta hipótesis está respaldada por un estudio en el que se encontraron menores niveles de proteínas relacionadas con el estrés oxidativo y chaperonas moleculares a temperaturas de cultivo de 20-25 °C, lo que es indicativo de un menor estrés en el proceso de plegamiento, siendo esperable una mejora de la eficiencia de la secreción heteróloga (Dragosits et al., 2009). Sin embargo, Várnai y colaboradores no encontraron diferencias significativas en la producción de endoglucanasas fúngicas en *K. phaffii*, al ser cultivada a 25 o a 30 °C (Várnai et al., 2014).

### 3.3.3.6. Escalado del proceso fermentativo de *K. phaffii* GS115 para la producción de PrFaeB recombinante

Los dos transformantes más productivos en cuanto a actividad FAE (C2 y C7) fueron sometidos a fermentación a mayores volúmenes en biorreactor, para analizar la influencia del escalado en el crecimiento celular y la producción enzimática. Con este fin, se emplearon fermentaciones de tipo *batch* en biorreactores Applikon 3 L (Applikon Biotechnology, Delft, Países Bajos), utilizando un volumen de trabajo de 1,5 L de medio YPDm, a 30 °C, pH inicial de 6,5 sin control posterior y una agitación comprendida entre 350 y 900 rpm, que permitiera que los valores de OD no descendieran por debajo del 35 %. Las fermentaciones se iniciaron a partir de preinóculos en medio YPD, durante 16 h, a 30 °C y 250 rpm, para una DO<sub>600</sub> inicial de 0,5.

Según se indica en la Tabla 3.20, el desarrollo de la fermentación fue muy similar para ambos transformantes. El pH se redujo progresivamente, hasta valores próximos a pH 4,5, a las 24 h. Por otra parte, el OD descendió bruscamente a las pocas horas de comenzar la fermentación, hasta valores próximos al 35 %, lo que indicó un intenso metabolismo respiratorio asociado al crecimiento de la levadura (Fig. 3.64). Como levadura Crabtree negativa, *Komagataella* spp. posee un metabolismo preferentemente respiratorio, incluso en presencia de altas concentraciones de glucosa, a diferencia de *S. cerevisiae*. (Shahidan et al., 2011; Vieira Gomes et al., 2018).

El alto contenido en sustancias de naturaleza proteica en el medio (extracto de levadura y peptona), así como las condiciones de cultivo, dieron lugar a una formación intensa de espuma, que se corrigió mediante la adición puntual de 1,5 mL de una solución de Clerol FBA 622 (Diamond Shamrock Scandinavia) al 10 % (v/v), a las 4 h de cultivo (Etoc et al., 2006). En cuanto a la agitación, dado que se estableció en base al mantenimiento de valores de OD superiores al

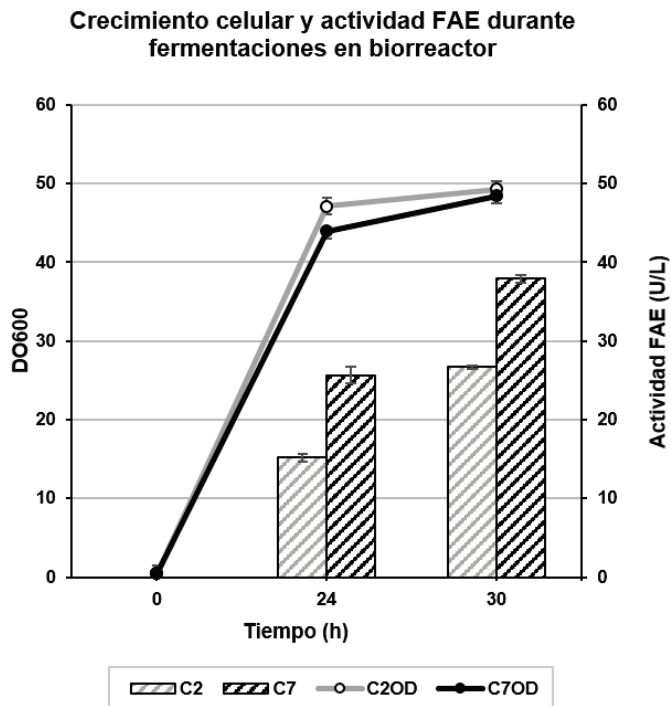
35 %, el descenso en el valor de rpm en torno a las 30 h indicó una menor tasa de respiración de la levadura, lo que se asoció a agotamiento de la fuente de carbono. En base a los valores de actividad FAE frente a crecimiento celular previamente indicadas (Fig. 3.60 y Fig. 3.63), así como para evitar la contaminación del caldo de cultivo con enzimas procedentes del medio intracelular de la levadura debido a procesos de autólisis, se decidió recoger los cultivos a las 30 h.

**Tabla 3.20. Parámetros de la fermentación en biorreactor para la producción de PrFaeB en *K. phaffii* GS115.** Se indican los valores de pH, agitación y OD para los transformantes C2 y C7.

Parámetros	0 h		4 h		24 h		26 h		30 h	
	C2	C7	C2	C7	C2	C7	C2	C7	C2	C7
pH	6,4	6,5	6,2	6,2	4,4	4,4	4,5	4,4	5,80	5,4
Agitación (rpm)	359	331	432	433	871	807	910	808	661	674
OD (%)	96,80	98,8	35,30	35,40	37,90	35,10	33,80	35,50	34,90	34,40

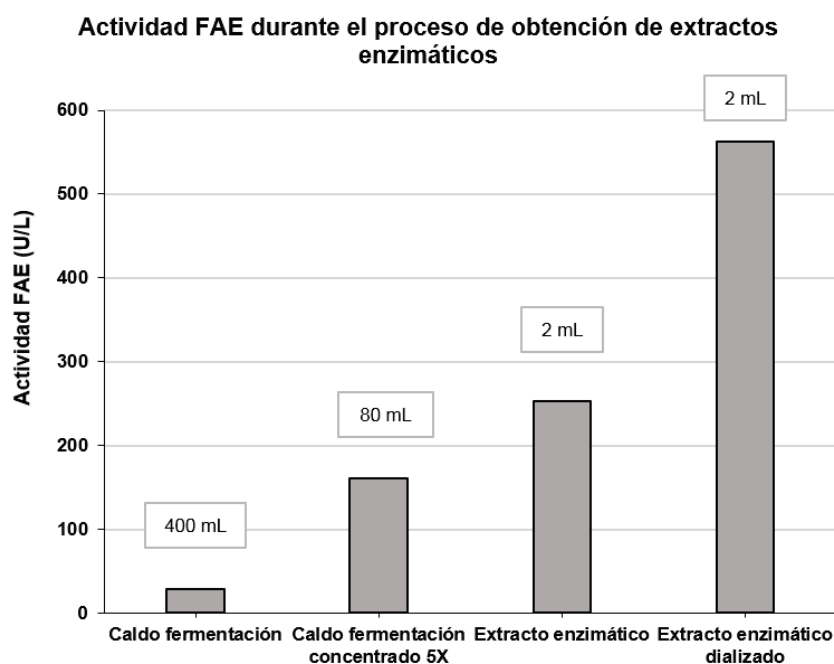
Tras la recogida de los cultivos, el caldo de fermentación se recuperó mediante dos centrifugaciones sucesivas a 2.500 x g, durante 10 min, a 4 °C. Seguidamente, el sobrenadante fue filtrado a través de membranas de PES de 0,22 µm de diámetro de poro. Para determinar la producción de PrFaeB, se llevaron a cabo reacciones de actividad FAE frente a MFA a pH 5,0 y 50 °, añadiendo 100 µL de caldo de fermentación filtrado en un volumen final de 200 µL de reacción (apartados 2.20.1 y 2.20.3). La evolución de la actividad FAE y el crecimiento celular a lo largo de la fermentación se indican en la Fig. 3.64.

De acuerdo a los resultados representados en la Fig. 3.64, se observó que, en las fermentaciones de ambos transformantes, la fase estacionaria se alcanzó en torno a las 24 h, lo que apoya la recogida a 30 h de cultivo como tiempo óptimo para la recuperación de extractos enzimáticos. Comparando el crecimiento en fermentador (volumen final de 1,5 L de cultivo) y en matraz (volumen final de 50 mL de cultivo), este último analizado en el apartado 3.3.3.5, no se observó una mayor tasa de crecimiento al llevar a cabo el escalado del cultivo a mayores volúmenes.



**Fig. 3.64. Crecimiento celular y actividad FAE durante la fermentación en biorreactor para la producción de PrFaeB en *K. phaffii* GS115.** Las fermentaciones se desarrollaron a 30 °C, pH no regulado y una agitación para asegurar valores de OD superiores al 35 %. Las reacciones FAE se llevaron a cabo frente a MFA, añadiendo 100  $\mu$ L de caldo de cultivo filtrado en un volumen final de 200  $\mu$ L. Las reacciones se realizaron a 50 °C y pH 5,0, durante 30 min, y la actividad FAE se expresó en U/L de caldo de fermentación.

Por último, se llevó a cabo una comparación de la actividad FAE relativa en cada uno de los procesos empleados para obtener el extracto enzimático con actividad FAE. El caldo de fermentación se pasó a través de filtros de poros de 0,22  $\mu$ m y fue concentrado 5 veces, mediante ultrafiltración con una membrana *Pellicon XL* de PES (Millipore), de 10 kDa de tamaño de exclusión y 0,005 m<sup>2</sup> de área de membrana, a 4 °C. A continuación, el caldo concentrado se precipitó con sulfato de amonio, de acuerdo al protocolo descrito en el apartado 2.19. El extracto enzimático fue resuspendido y dializado frente a tampón acetato 0,02 N, pH 5,0. Se determinó la actividad FAE en cada una de las etapas, mediante reacciones frente a MFA, añadiendo 20  $\mu$ L de muestra en un volumen final de 200  $\mu$ L de solución de MFA (apartado 2.20.1). Los resultados indicaron que la actividad relativa fue mayor en el caso del extracto enzimático sometido a precipitación y diálisis (Fig. 3.65), por lo que se seleccionaron estas características para la obtención de muestras en los ensayos subsiguientes.



**Fig. 3.65. Actividad FAE durante la obtención de extractos enzimáticos.** Las reacciones FAE se llevaron a cabo en un volumen final de 200  $\mu$ L de solución de MFA, con 20  $\mu$ L de muestra de caldo de cultivo filtrado, a 50 °C y pH 5,0, durante 30 min. La actividad FAE se expresó en U/L de caldo de fermentación. Se indican los volúmenes recuperados de cada tipo de muestra. Valores correspondientes al transformante C7.

# Capítulo 4

## 3.4. Caracterización de la PrFaeB recombinante de *P. rubens* Wisconsin 54-1255, expresada en *K. phaffii* GS115



### 3.4.1. Introducción y objetivos del capítulo

La expresión heteróloga en plataformas como la levadura metilotrófica *Komagataella* spp. constituye una primera etapa para la obtención de muestras enriquecidas en una enzima, en cantidades suficientes como para llevar a cabo su caracterización. En el presente trabajo de Tesis Doctoral se llevó a cabo la expresión en *K. phaffii* GS115 de la enzima PrFaeB de *P. rubens* Wisconsin 54-1255, cuya actividad FAE ha sido confirmada en trabajos previos (Rodríguez-Castro, 2017). Los ensayos que se incluyen en el tercer capítulo de Resultados y Discusión permitieron seleccionar los transformantes que dieron lugar a mayor actividad FAE extracelular (transformantes C2 y C7), así como determinar las condiciones de cultivo óptimas para la producción heteróloga de PrFaeB por parte de las levaduras.

La expresión heteróloga es especialmente interesante en casos como el de las FAEs de *P. rubens* Wisconsin 54-1255. Teniendo en cuenta que en dicho organismo se ha descrito la presencia de, al menos, 5 posibles genes que codifican para FAEs (Dilokpimol *et al.*, 2016), para la caracterización de una de ellas en particular es imprescindible obtener muestras en las que únicamente se encuentre dicha FAE, de modo que se evite la interferencia del resto.

Por otra parte, la expresión heteróloga es de utilidad para la producción de enzimas procedentes de especies que, además, sintetizan sustancias que dificultan su empleo en industrias como la alimentaria o la farmacéutica. Este es el caso de *P. rubens*, que es un conocido productor de antibióticos y, además, puede secretar diferentes micotoxinas (García-Estrada *et al.*, 2011), por lo que la expresión heteróloga de sus enzimas lignocelulolíticas en microorganismos considerados GRAS puede facilitar una posible aplicación comercial (Sewalt *et al.*, 2016). Las diferentes aplicaciones comerciales están condicionadas, también, por las cualidades particulares de cada enzima, que pueden determinarse mediante caracterización enzimática.

En este sentido, el objetivo que se desarrolló en el último capítulo de Resultados y Discusión fue la caracterización de la enzima PrFaeB recombinante, atendiendo a sus óptimos de actividad en cuanto a pH y temperatura, estabilidad térmica, respuesta a inhibidores e iones metálicos y su cinética enzimática.

Además de la caracterización enzimática, se realizó un estudio metabolómico de muestras obtenidas a partir de fermentaciones de *P. rubens* en medios de cultivo para la producción de FAEs.

El objetivo de dicho estudio fue identificar metabolitos, incluyendo metabolitos tóxicos cuya producción se evitaría gracias a la producción heteróloga de PrFaeB en microorganismos GRAS, como es el caso de *K. phaffii* GS115.

### **3.4.2. Purificación de la enzima PrFaeB recombinante**

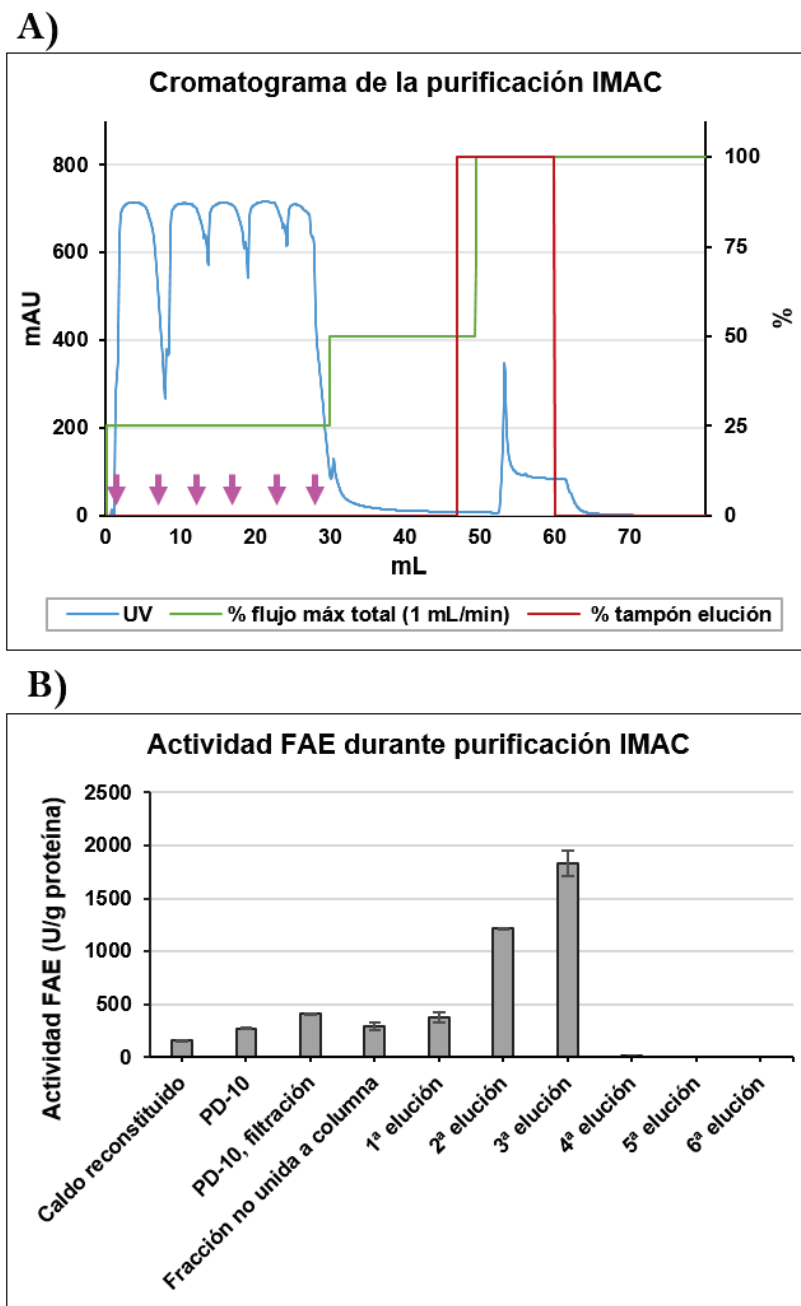
Para la obtención de muestras enriquecidas en la enzima PrFaeB de *P. rubens* Wisconsin 54-1255, el caldo recuperado a partir de fermentaciones con los transformantes de levaduras más productores (C2 y C7) fue sometido a purificación.

Todos los pasos se llevaron a cabo a 4 °C, para minimizar la aparición de procesos de proteólisis. El caldo de fermentación centrifugado, filtrado y concentrado con membranas *Pellicon XL* de 10 kDa (Millipore) fue liofilizado y reconstituido. Estas muestras se sometieron a desalado y limpieza empleando columnas PD-10 (GE Healthcare Life Sciences), de acuerdo al apartado 2.26. A continuación, se llevó a cabo la purificación de PrFaeB mediante cromatografía **IMAC** con la columna *His-Trap™ HP* (GE Healthcare Life Sciences), gracias al epítipo 6xHis presente en el extremo C-terminal de la proteína.

La Fig. 3.66.A recoge el cromatograma del proceso de purificación, en el que se apreció un pico de absorbancia a 280 nm hacia los 52 mL, compatible con la elución de la enzima purificada. Durante la fase de elución, se recogieron 10 fracciones de 500 µL, en las cuales se analizó la concentración proteica (apartado 2.24.2) y la actividad FAE. Las fracciones purificadas que demostraron mayor actividad FAE respecto a cantidad de proteína fueron la segunda y tercera, no detectándose actividad a partir de la 4ª fracción (Fig.3.66.B). Por otra parte, fue posible detectar niveles importantes de actividad FAE en el eluido recogido durante la fase de unión proteica a la columna, lo que indicó que la eficiencia de dicha unión no fue óptima.

Pese a que la actividad en el caldo de cultivo de C7 fue más elevada, el proceso de purificación de PrFaeB recombinante a partir de las muestras del transformante C2 demostró una eficiencia mayor. Así, los valores de actividad FAE respecto a cantidad de proteína detectados en las fracciones con actividad purificadas a partir de C7 correspondieron únicamente al 10-18 % de los valores de C2.





**Fig. 3.66. Purificación de PrFaeB mediante IMAC.** Purificación a partir del transformante C2. **A)** Cromatograma de la purificación. Las flechas color rosa corresponden a los momentos de inyección en el sistema de la muestra a purificar. Los picos de absorbancia UV a 280 nm se corresponden con el paso de proteínas a través del detector. **B)** Actividad FAE de las muestras recuperadas en cada paso de la purificación. Las reacciones FAE se llevaron a cabo en un volumen final de 200  $\mu$ L de solución de MFA, a 50  $^{\circ}$ C y pH 5,0, durante 30 min. La actividad FAE se expresó en U/g de proteína total.

El método de purificación basado en el empleo de colas de His y cromatografía IMAC es uno de los más extendidos para purificar proteínas recombinantes (Loughran y Walls, 2011). Shin y Chen lo utilizaron para purificar FAEs fúngicas expresadas en *S. cerevisiae* (Shin y Chen, 2007). Asimismo, se ha utilizado para purificar una FAE de *P. purpurogenum* expresada en *K. phaffii* GS115 (Oleas *et al.*, 2017). Por el contrario, Kelle y colaboradores, tras conseguir la expresión recombinante de una FAE de *Pleurotus* sp. en *Komagataella* spp. no obtuvieron resultados satisfactorios a la hora de llevar a cabo la purificación mediante esta técnica, ni incluyendo una

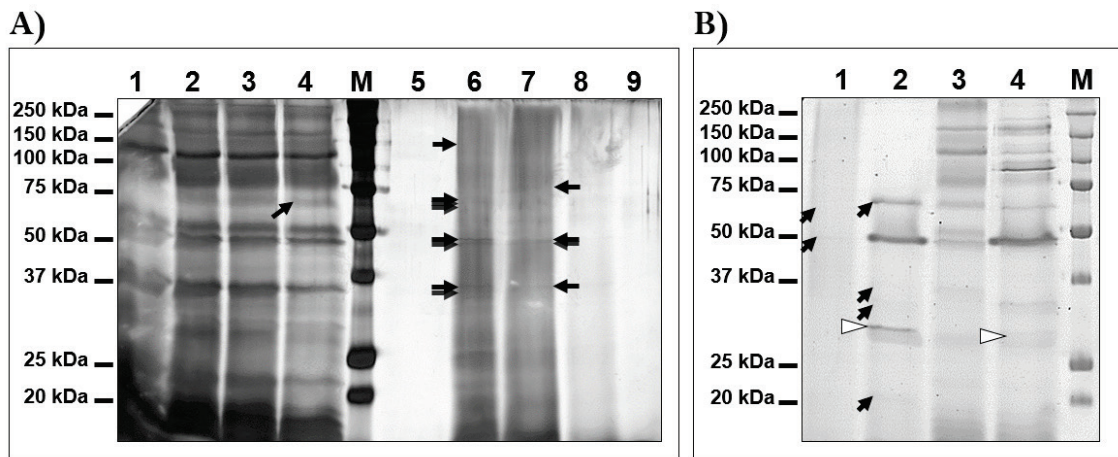
cola de His en el extremo N-terminal, ni incluyendo una cola Strep en el C-terminal (Kelle *et al.*, 2016). En dicho estudio, la desnaturalización de la proteína recombinante sí permitió la purificación, por lo que las dificultades se atribuyeron a que los epítomos a emplear no estuvieron accesibles, debido a impedimentos estéricos en la proteína en su conformación nativa.

Las muestras purificadas mediante cromatografía IMAC se analizaron en geles monodimensionales SDS-PAGE 10 % (apartado 2.24.3). Las bandas proteicas se visualizaron mediante tinción de Coomassie coloidal y, en aquellos casos en los que la concentración de proteínas en la muestra fue menor, se empleó la tinción con nitrato de plata (apartado 2.24.5). La tinción con nitrato de plata presenta mayor sensibilidad (hasta 20-50 veces más), sin embargo, es menos lineal y cuantitativa que la tinción con Coomassie coloidal. Además, la compatibilidad de la tinción con nitrato de plata con la espectrometría es limitada, por lo que la tinción de Coomassie fue la técnica de elección por defecto (Oakley *et al.*, 1980; Graves y Haystead, 2002; Rabilloud y Lelong, 2011).

Las bandas proteicas detectadas fueron escindidas e identificadas mediante digestión triptica y espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF (apartados 2.24.7 y 2.24.8). En el caso de los geles teñidos con nitrato de plata, las bandas escindidas fueron tratadas antes de la digestión, de acuerdo al protocolo que se detalla al final del apartado 2.24.7.

La espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF permitió determinar la presencia de la enzima PrFaeB recombinante en varias de las bandas de los geles SDS-PAGE (Fig. 3.67.A).

De acuerdo a una estimación basada en la secuencia aminoacídica de PrFaeB, realizada mediante la herramienta informática ExPASy *ProtParam tool* (<https://web.expasy.org/protparam/>), PrFaeB presenta un peso molecular estimado de 57,8 kDa y un pI estimado de 5,4. Sin embargo, el peso molecular y pI determinados de forma experimental en trabajos previos fueron de 71-77 kDa y 5,1-5,3, respectivamente (Rodríguez-Castro, 2017). Este mayor peso molecular experimental pudo deberse a que PrFaeB presentara modificaciones postraduccionales. En este sentido, se analizó la presencia de sitios de N-glicosilación y O-glicosilación, por medio de los servidores *NetNGlyc 1.0* y *NetOGlyc 4.0*, respectivamente (apartado 2.8), hallándose 6 sitios potenciales de N-glicosilación y 7 de O-glicosilación.



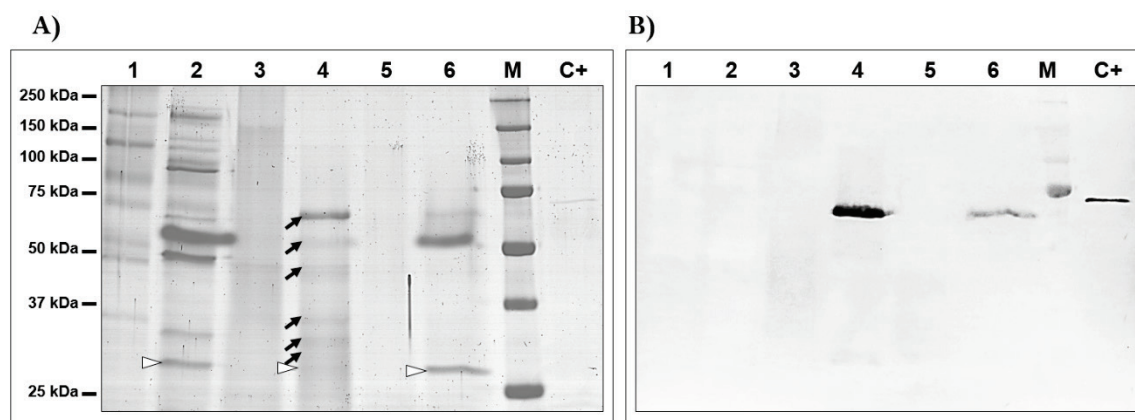
**Fig. 3.67. Análisis mediante geles SDS-PAGE de las muestras purificadas mediante IMAC.** Purificación a partir del transformante C2. A la izq., se indica el peso molecular de las bandas del marcador *Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards* (Bio-Rad) (M). Las flechas indican bandas proteicas donde se identificó PrFaeB. **A)** Muestras de la purificación IMAC, en gel SDS-PAGE 10 % teñido con nitrato de plata. **1:** Caldo de fermentación reconstituido. **2:** Caldo reconstituido, desalado por PD-10. **3:** Caldo desalado y filtrado (0,22 μm). **4:** Fracción no unida a la columna de afinidad. **5:** 1ª elución. **6:** 2ª elución. **7:** 3ª elución. **8:** 4ª elución. **9:** 5ª elución. Todas las bandas proteicas se sometieron a identificación. **B)** Análisis de muestras antes y después del tratamiento con Endo H. **1:** 2ª, 3ª y 4ª elución. **2:** 2ª, 3ª y 4ª elución, tratadas con Endo H. **3:** Fracción no unida a la columna de afinidad. **4:** Fracción no unida a la columna de afinidad, tratada con Endo H. Únicamente se sometieron a identificación las bandas proteicas de los carriles 1 y 2. Los triángulos señalan la banda correspondiente a la enzima Endo H.

En el presente trabajo, la presencia de modificaciones postraduccionales como la glicosilación pudo explicar la identificación de PrFaeB en múltiples bandas proteicas de los geles SDS-PAGE, correspondientes a diferentes tamaños (Fig. 3.67). Esta hipótesis se analizó mediante el tratamiento de las muestras recuperadas durante la purificación, previamente desnaturalizadas, con la enzima Endo H (New England Biolabs), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Endo H es una endo-β-N-acetilglucosaminidasa, capaz de catalizar la hidrólisis de N-glicanos entre dos residuos de N-acetilglucosamina, en la región interna de la cadena de los glicanos ricos en manosa y los glicanos híbridos. Endo H no es capaz de actuar sobre los glicanos complejos, por lo que su empleo no da lugar a la eliminación de la totalidad de la N-glicosilación; sin embargo, es una herramienta muy útil para identificar la presencia de este tipo de modificación postraduccionales en una proteína (Freeze y Kranz, 2010; Kobata, 2013). Según se indica en la Fig. 3.67.B, el tratamiento de las muestras con Endo H dio lugar a un menor número de bandas proteicas que, además, fueron más intensas, identificándose la enzima PrFaeB en una banda de tamaño cercano al estimado en base a su secuencia aminoacídica. Este resultado apoya la existencia de glicosilación en la enzima PrFaeB recombinante (Nielsen *et al.*, 2004). Se identificaron también

dos bandas de menor tamaño (en torno a 20-30 kDa), patrón compatible con la degradación de la proteína.

Por último, se llevó a cabo un ensayo de electrotransferencia de proteínas e inmunodetección (*western blotting*), basado en el empleo de anticuerpos específicos frente al epítipo 6xHis (apartado 2.25). Como control positivo se utilizó una dilución de una muestra pura de una proteína conocida con una cola de 6xHis (H-AfsRΔTRP, cuyo peso molecular es de 68 kDa) (Santos-Beneit *et al.*, 2011). Tras el proceso de revelado, se detectó una banda positiva en la muestra correspondiente a las fracciones eluidas durante la purificación que presentaron actividad FAE (2ª y 3ª elución), así como, en menor medida, en la muestra de la 4ª elución, todas ellas tratadas con Endo H (Fig. 3.68.B). La banda presentó un peso molecular aparente de 60 kDa, que estuvo próximo al peso molecular estimado en base a la secuencia aminoacídica de la PrFaeB recombinante, incluyendo la cola de 6xHis (60,8 kDa). La ausencia de bandas positivas en muestras en las que se confirmó la presencia de FAEs mediante ensayos de actividad e identificación proteica MALDI-TOF/TOF (carriles 1, 2 y 3 de la Fig. 3.68.A) pudo deberse a la combinación de dos factores: **i)** la concentración de PrFaeB recombinante en dichas muestras fue baja y se vio repartida en múltiples bandas correspondientes a los diferentes patrones de glicosilación, de modo que al realizar el tratamiento con Endo H varias de dichas proteínas se acumularon en menor número de bandas, aumentando la concentración lo suficiente como para que se establecieran complejos Ag-Ac detectables; **ii)** la glicosilación de la PrFaeB podría estar ocultando la cola de 6xHis, reduciendo el acceso de los anticuerpos, que se vería facilitado al tratar las muestras con Endo H. Esta última razón pudo explicar también la reducida eficiencia de la purificación IMAC en el transformante C7 y en la llevada a cabo en publicaciones anteriores (Puxbaum *et al.*, 2015; Kelle *et al.*, 2016).

Algunas de las bandas proteicas presentes en los geles empleados en la electrotransferencia fueron identificadas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF (bandas de los carriles 2 y 4 de la Fig. 3.68.A), encontrándose PrFaeB en múltiples bandas de un tamaño menor al esperado, lo que fue compatible con la degradación de la proteína. Este fenómeno se observó también en las muestras purificadas y analizadas en geles SDS-PAGE previamente (Fig. 3.67.B), indicando una reducida estabilidad de las muestras purificadas (Carruthers *et al.*, 2015).



**Fig. 3.68. Western blotting de muestras obtenidas durante la purificación IMAC de PrFaeB recombinante.** 1: Fracción no unida a la columna de afinidad. 2: Fracción no unida a la columna de afinidad, tratada con Endo H. 3: Fracciones activas purificadas (2<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup> elución). 4: Fracciones activas purificadas, tratadas con EndoH. 5: 4<sup>a</sup> elución. 6: 4<sup>a</sup> elución, tratada con EndoH. M: Marcador de peso molecular *Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards* (Bio-Rad). C+: Proteína H-AfsRΔTRP, como control positivo de *western blotting*. **A:** Réplica del gel que fue transferido, teñido con Coomassie coloidal. Se llevó a cabo la identificación proteica MALDI-TOF/TOF en los carriles 2 y 4. Las bandas en las que se identificó PrFaeB se indican con flechas. Los triángulos señalan la banda correspondiente a Endo H. **B:** Membrana de PVDF empleada para electrotransferencia, hibridación y detección de PrFaeB. Se observaron bandas positivas en el control positivo (C+) y en las muestras 4 y 6, correspondientes a un peso molecular de, aprox., 60 kDa.

### 3.4.3. Caracterización bioquímica y enzimática de PrFaeB recombinante

En consonancia con los resultados de los geles SDS-PAGE, donde se observaron múltiples bandas de menor tamaño que apuntaban a una baja estabilidad de la enzima purificada (Fig. 3.67.B y Fig. 3.68.A), se observó que la actividad FAE de las muestras se redujo drásticamente durante el almacenamiento. La congelación de dichas muestras dio lugar a la pérdida total de actividad FAE, incluso en presencia de un 50 % (v/v) de glicerol, por lo que se optó por mantenerlas refrigeradas a 4 °C. Incluso en estas condiciones, la actividad FAE disminuyó hasta valores por debajo del límite de detección en menos de 24 h. Una de las razones que se consideraron para explicar esta baja estabilidad fue la reducida concentración proteica de las muestras, que pudiera dar lugar a la aparición de interacciones hidrofóbicas con el material plástico de los microtubos de almacenamiento, favoreciendo su degradación (Warne y Mahler, 2018). Para solucionar la baja concentración proteica en las muestras, se añadió BSA como estabilizante (*protein carrier* o *protein filler*), de acuerdo al apartado 2.26 (manual *Protein stability and storage*, Pierce). En estas

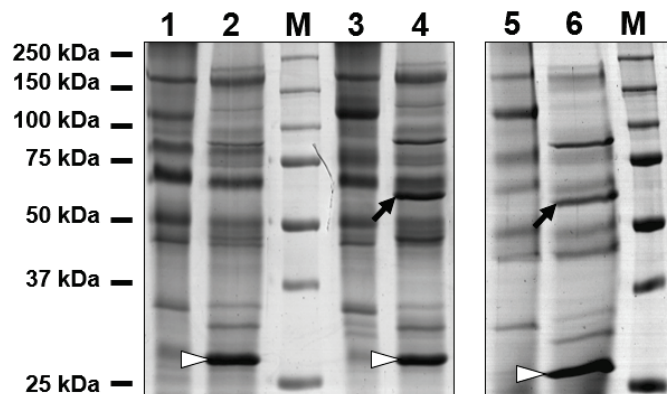
condiciones, la actividad FAE de las muestras se prolongó varias horas, pero no lo suficiente como para llevar a cabo los ensayos de caracterización enzimática con fiabilidad.

A la vista de la reducida estabilidad de las muestras purificadas, y teniendo en cuenta que la cepa parental no produce FAEs endógenas, se decidió llevar a cabo la caracterización enzimática empleando muestras de caldo de fermentación del transformante *K. phaffii* GS115 C2, obtenidas en condiciones óptimas (medio YPDm, a una temperatura de 23 °C, cultivo en matraz y recogida de las muestras a las 48-72 h, al alcanzar una  $DO_{600}$  cercana a 50, de acuerdo a los apartados 3.3.3.4 y 3.3.3.5). Las muestras fueron filtradas, precipitadas con sulfato de amonio, desaladas mediante columnas PD-10 y cuantificadas.

Dado que las muestras que se emplearon para la caracterización de PrFaeB presentaron una mezcla de varias proteínas extracelulares secretadas por la levadura, fue necesario determinar la cantidad relativa de PrFaeB recombinante. Para ello, se prepararon geles monodimensionales SDS-PAGE, que fueron analizados por medio de densitometría con el programa informático *ImageQuant TL* (GE Healthcare Life Sciences). Se analizaron muestras correspondientes al caldo de fermentación precipitado con TCA-DTT en acetona (apartado 2.24.1) y al extracto enzimático precipitado con sulfato de amonio, siendo esta última muestra la empleada en las reacciones de caracterización. Las bandas que aparecieron diferencialmente entre el control con la cepa parental *K. phaffii* GS115 y el transformante C2 productor de PrFaeB recombinante, fueron identificadas mediante digestión triptica y espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF (Fig. 3.69).

Mediante este método, se halló una banda de 59,8 kDa en el extracto enzimático del transformante C2 tratado con Endo H, en la que únicamente se identificó la enzima recombinante PrFaeB. De acuerdo al análisis densitométrico, la cantidad relativa de proteínas en dicha banda fue de un 13,42 % del total. El porcentaje relativo de PrFaeB respecto a cantidad de proteína total en el extracto enzimático desalado con PD-10 se empleó para calcular algunos de los parámetros cinéticos ( $V_{max}$  específica y  $k_{cat}$ ), que se recogen en el apartado 3.4.3.2.

El peso molecular de dicha banda (**59,8 kDa**) resultó ser muy próximo al valor estimado por medio de la herramienta informática ExPASy *ProtParam tool* para la enzima PrFaeB con la cola de 6xHis (60,8 kDa). Estos resultados apuntan a que las bandas proteicas de mayor peso molecular en las que se identificó PrFaeB antes del tratamiento con EndoH pudieron deberse a diferentes grados de N-glicosilación (de Vries *et al.*, 2002).



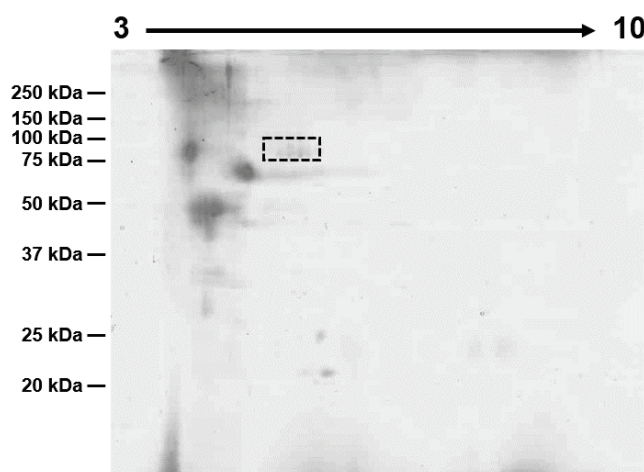
**Fig. 3.69. Estudio de la concentración relativa de PrFaeB recombinante en el extracto enzimático obtenido mediante la levadura *K. phaffii* GS115.** Las muestras se obtuvieron a partir de caldo de cultivo 72 h de fermentaciones del transformante C2 (o bien la cepa parental *K. phaffii* GS115, como control negativo), en medio YPDm, a 23 °C y 250 rpm. Las bandas presentes de forma diferencial entre los carriles 1-2 y 3-4 fueron identificadas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF. Las flechas indican bandas en las que se identificó PrFaeB. Los triángulos señalan la banda correspondiente a la enzima Endo H. **M:** Marcador de peso molecular *Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards* (Bio-Rad). **1:** Caldo de fermentación de la cepa parental, precipitado con TCA-DTT acetona. **2:** Caldo de fermentación de la cepa parental, precipitado con TCA-DTT acetona, tratado con EndoH. **3:** Caldo de fermentación de C2, precipitado con TCA-DTT acetona. **4:** Caldo de fermentación de C2, precipitado con TCA-DTT acetona, tratado con EndoH. **5:** Extracto enzimático de C2, precipitado con sulfato de amonio. **6:** Extracto enzimático de C2, precipitado con sulfato de amonio, tratado con EndoH.

Por otra parte, el peso molecular de 59,8 kDa de la banda donde se identificó PrFaeB apuntó a que el transformante fue capaz de eliminar la señal de secreción para levaduras (el factor  $\alpha$ ), puesto que de no haberse procesado correctamente tras la traducción proteica, el peso molecular estimado habría sido de 70,4 kDa (Daly y Hearn, 2005; Lin-Cereghino *et al.*, 2013).

En cuanto al **pI** de la proteína recombinante, se llevó a cabo una estimación del mismo mediante electroforesis bidimensional (apartado 2.24.4), empleando tiras *Immobiline™ DryStrip* de 7 cm con gradiente de pH inmovilizado de 3,0 a 10,0 NL (GE Healthcare Life Sciences) y geles SDS-PAGE 10 %. Se emplearon muestras de caldo de fermentación del control negativo (cepa parental *K. phaffii* GS115) y del transformante C7. Todos los puntos proteicos detectados tras la tinción con Coomassie coloidal fueron identificados por medio de espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF (apartados 2.24.5, 2.24.7 y 2.24.8) (Fig. 3.70). Esta técnica permitió identificar PrFaeB en cinco puntos proteicos no presentes en el control negativo, con **pI comprendido entre 5,4 y 5,6**. Dichos valores fueron compatibles con el pI estimado para PrFaeB con la cola de 6xHis, de acuerdo a la herramienta informática ExPASy *ProtParam tool* (pI 5,5). A la hora de considerar el pI, hay que tener en cuenta que el ensayo se llevó a cabo



empleando muestras con la enzima presuntamente glicosilada, lo que puede modificar el valor de pI al añadir grupos con carga a la proteína, si bien este fenómeno no tiene lugar en todos los casos (Packer *et al.*, 1998; Kleinert *et al.*, 2007; Löster y Kannicht, 2008; Pergande y Cologna, 2017).



**Fig. 3.70. Estudio del pI de PrFaeB recombinante mediante electroforesis bidimensional.** Las muestras se obtuvieron a partir de caldo de cultivo 72 h de fermentaciones del transformante C7, en medio YPDm, a 23 °C y 250 rpm. Los puntos proteicos fueron identificados mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF. El recuadro indica los puntos en los que se identificó PrFaeB. En la parte superior se indica el gradiente de pH; a la izq., el peso molecular [marcador *Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards* (Bio-Rad)].

#### 3.4.3.1. Determinación del pH óptimo, temperatura óptima y estabilidad térmica

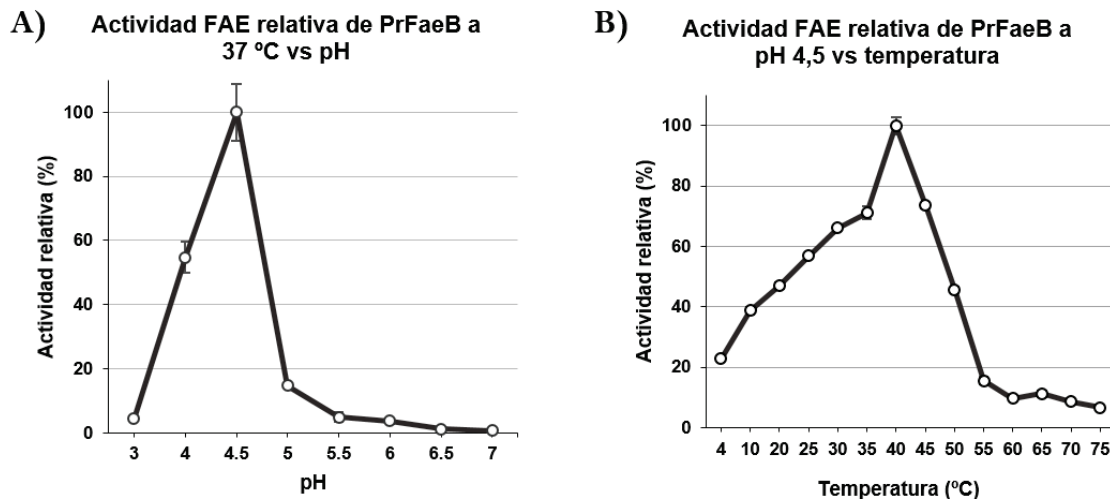
En primer lugar, se determinaron los valores óptimos de pH y temperatura. Todas las reacciones se realizaron, como mínimo, por triplicado, añadiendo 10 µL de la muestra de PrFaeB en un volumen final de 200 µL de solución de MFA 0,05 % (p/v) en tampón acetato 0,1 N. Se incluyeron dos tipos de controles negativos: i) extracto de caldo de fermentación del medio sin inocular y ii) extracto enzimático de caldo de fermentación de la cepa parental *K. phaffii* GS115.

Para determinar el **pH óptimo** de la PrFaeB recombinante de *P. rubens*, se midió la actividad FAE modificando el pH del tampón de reacción entre 3,0 y 7,0, a una temperatura estándar de 37 °C (apartados 2.20.1 y 3.1.5.1). Los valores de actividad FAE se expresaron de forma relativa, asignando un valor del 100 % a la máxima actividad y calculando el resto proporcionalmente. De acuerdo a los resultados representados en la Fig. 3.71.A, la actividad FAE se detectó en un rango restringido de pH, entre valores de 4,0 y 6,5, encontrándose óptimo a pH 4,5. Por encima de este pH, la actividad disminuyó marcadamente, descendiendo por debajo del 20 % a pH 5,0.

La **temperatura óptima** de la PrFaeB recombinante de *P. rubens* fue analizada a dicho pH óptimo y a temperaturas comprendidas entre 4 y 75 °C. Se detectó actividad FAE en un amplio rango de temperaturas, desde 4 °C hasta 60 °C, si bien esta se redujo rápidamente por encima de



40 °C, que fue el valor de temperatura óptima (Fig. 3.71.B). A una temperatura de 50 °C, el porcentaje de actividad disminuyó a valores por debajo del 50 %.



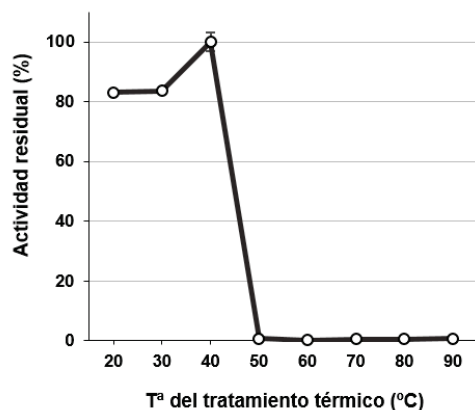
**Fig. 3.71. Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad FAE de PrFaeB recombinante.** A) Valores relativos de actividad FAE frente a diferentes pH, a 37 °C. B) Valores relativos de actividad FAE frente a diferentes temperaturas, a pH 4,5.

Los rangos y óptimos de actividad de la enzima PrFaeB recombinante fueron comparados con los de la enzima nativa producida por *P. rubens* Wisconsin 54-1255 (Rodríguez-Castro, 2017). El rango de actividad FAE frente a pH registrado en el presente trabajo fue similar al descrito en la Tesis Doctoral de la Dra. R. Rodríguez Castro (actividad entre pH 3,0 y 6,0). En cuanto al óptimo de pH, en el presente trabajo se encontró a pH 4,5, frente al pH 5,0 de la tesis de la Dra. R. Rodríguez Castro, por lo que los valores óptimos fueron similares, puesto que en dicho trabajo de Tesis se analizaron valores de pH correspondientes a números enteros (pH 4,0; pH 5,0, etc.). Por otra parte, la temperatura óptima difirió entre dicho estudio y el presente trabajo. En la presente Tesis Doctoral, se apreció un aumento de actividad entre los 4 y los 40 °C, temperatura a la que se observaron los valores máximos y tras la cual la actividad se redujo bruscamente. Sin embargo, en el trabajo que estudió la enzima nativa se observó un aumento ligero de actividad entre los 37 y los 55 °C, siendo 50-55 °C la temperatura óptima. Esta diferencia en cuanto a la influencia de la temperatura sobre la actividad FAE pudo deberse al tipo de muestras empleadas para la caracterización. Así, mientras que en la Tesis Doctoral de la Dra. R. Rodríguez Castro se utilizaron extractos enzimáticos obtenidos a partir del caldo de fermentación completo de *P. rubens*, cultivado en presencia de sustratos lignocelulósicos, en el presente trabajo se emplearon extractos enzimáticos obtenidos a partir de transformantes de levaduras, los cuales carecieron de

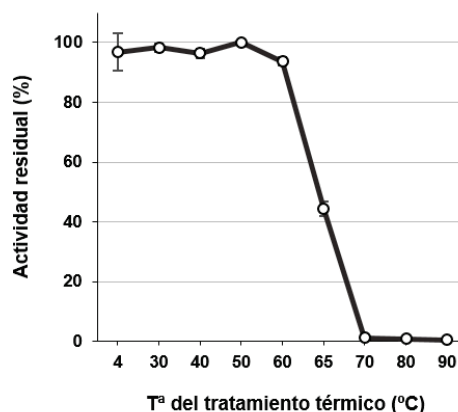
actividad FAE endógena. Dado que se han descrito al menos 5 FAEs en el genoma de *P. rubens* (Dilokpimol *et al.*, 2016), los óptimos de actividad empleando muestras de caldo de fermentación de este hongo podrían ser atribuibles a la acción de varias de estas enzimas, a diferencia de las muestras analizadas en el presente trabajo, donde la única FAE presente fue la PrFaeB recombinante. Otras explicaciones posibles para la variación en los óptimos de temperatura fueron las diferencias estructurales entre la enzima nativa y la enzima recombinante, debidas a modificaciones en la secuencia (como la presencia de la cola de 6xHis), así como las distintas modificaciones postraduccionales llevadas a cabo por la levadura.

Por último, dado que la disminución de actividad FAE fue intensa superados los 40 °C, se decidió estudiar la **estabilidad térmica** de la enzima PrFaeB recombinante. Para ello, los extractos enzimáticos se sometieron a un tratamiento térmico a temperaturas entre 20 y 90 °C, durante 1 h, tras el cual se mantuvieron a temperatura ambiente durante 5 min y se midió su actividad FAE, en las condiciones óptimas establecidas anteriormente (pH 4,5 y 40 °C). Los valores de actividad residual tras el tratamiento fueron calculados asignando el valor del 100 % de actividad al valor más alto, que fue el obtenido tras el tratamiento del extracto a 40 °C. Como puede observarse en la Fig. 3.72.A, la actividad FAE se incrementó ligeramente con el aumento de temperatura de tratamiento entre los 20 y 40 °C, indicando cierta activación térmica de la enzima. A temperaturas superiores a 50 °C se observó la pérdida total de actividad FAE. La estabilidad térmica de PrFaeB recombinante se comparó con la de la enzima nativa producida por *P. rubens* Wisconsin 54-1255, mediante la realización de los mismos ensayos empleando extractos enzimáticos obtenidos de fermentaciones de dicho hongo en medio M-SBP. Según se indica en la Fig. 3.72.B, la estabilidad térmica de PrFaeB nativa fue mayor que en la enzima recombinante, puesto que el descenso pronunciado en la actividad FAE se comenzó a observar a partir de 60 °C, en lugar de 40 °C. Sin embargo, dado que las muestras procedentes de *P. rubens* Wisconsin 54-1255 no correspondieron a una sola FAE, si no que fue esperable la presencia de varias (Dilokpimol *et al.*, 2016; Rodríguez-Castro, 2017), no fue posible afirmar categóricamente que la PrFaeB recombinante presentara menor estabilidad térmica que la enzima nativa producida por *P. rubens* Wisconsin 54-1255.

A) Actividad FAE residual tras tratamiento térmico de PrFaeB recombinante



B) Actividad FAE residual tras tratamiento térmico de PrFaeB endógena



**Fig. 3.72. Estabilidad térmica de PrFaeB recombinante.** Valores de actividad FAE residual, tras una incubación durante 1 h a la temperatura indicada y subsiguiente reacción FAE en las condiciones óptimas (pH 4,5 y 40 °C, durante 30 min). **A)** Estabilidad térmica de la enzima recombinante, producida mediante *K. phaffii* GS115. **B)** Estabilidad térmica de la enzima nativa, producida por *P. rubens* Wisconsin 54-1255.

### 3.4.3.2. Especificidad de sustrato y cinética enzimática

En primer lugar se determinó la actividad frente a los cuatro sustratos tradicionalmente empleados para situar las FAEs en una de las cuatro categorías de la clasificación clásica (Crepin *et al.*, 2004a): MFA, MCA, MpCA y MSA (apartado 2.1.1). Se observó actividad FAE en los tres primeros, mientras que la actividad FAE frente al sustrato MSA estuvo por debajo del límite de detección. Como se ha indicado previamente, la ausencia de actividad frente al sustrato sintético MSA es una de las características de las FAEs tradicionalmente clasificadas en la categoría B, a la que se adscribe la PrFaeB (Wong, 2006; Aurilia *et al.*, 2008).

Una vez se hubo establecido frente a cuáles de los cuatro sustratos sintéticos demostró actividad PrFaeB, se determinaron los valores aparentes de  $K_m$ ,  $V_{max}$  específica,  $k_{cat}$  y constante de especificidad ( $k_{cat}/K_m$ ). Para ello, se llevaron a cabo reacciones FAE a las condiciones óptimas (pH 4,5 y 40 °C), empleando concentraciones crecientes de los sustratos sintéticos, en un rango entre 0 y 15 mM (10 mM en el caso de MCA, debido a problemas de solubilidad). Puesto que no se detectó actividad FAE específica frente a MSA, este sustrato no se incluyó en los estudios.

Para el cálculo de los parámetros cinéticos, los valores de velocidad inicial se representaron gráficamente frente a la concentración de sustrato empleada, por medio del paquete informático estadístico *SigmaPlot*® 12. Para todos los sustratos analizados (MFA, MCA y MpCA), el

comportamiento de la enzima se ajustó a cinéticas de Michaelis-Menten (Fig. 3.73). Los valores de cada uno de los parámetros enzimáticos determinados se recogen en la Tabla 3.21.

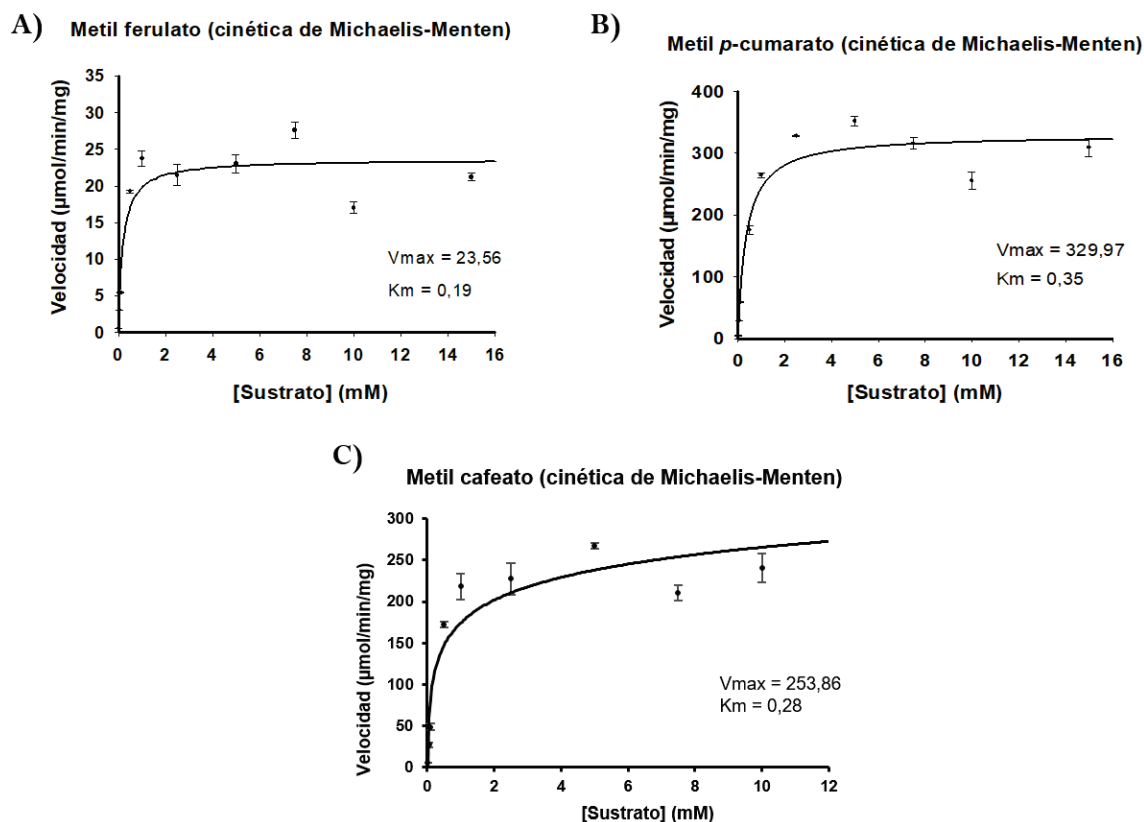


Fig. 3.73. Cinéticas de Michaelis-Menten, representadas mediante SigmaPlot® 12, a pH 4,5 y 40 °C. A) Cinética para MFA. B) Cinética para MpCA. C) Cinética para MCA.

Tabla 3.21. Parámetros cinéticos de la enzima PrFaeB recombinante. Reacciones a 40 °C y pH 4,5, durante 2-5 min. Se indican los valores medios y la desviación estándar para MFA, MCA y MpCA.

Sustrato	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (µmoles/min.mg proteína)	$K_{cat}$ (1/s)	$K_{cat}/K_m$ (1/s.mM)
MFA	0,19 ± 0,05	23,56 ± 0,96	23,89	124,69
MCA	0,28 ± 0,04	253,86 ± 7,19	257,42	919,34
MpCA	0,35 ± 0,07	329,97 ± 10,51	334,61	952,48

La constante de especificidad ( $k_{cat}/K_m$ ) es un valor muy útil para comparar la eficiencia catalítica de una enzima frente a diferentes sustratos (Eisenthal *et al.*, 2007). En este caso, se observó que la enzima PrFaeB demostró una mayor eficiencia catalítica frente al sustrato MpCA, seguido por MCA y, por último, MFA. De nuevo, este perfil coincide con el propio de las enzimas tradicionalmente clasificadas en la categoría B, cuya eficiencia catalítica es mayor frente a sustratos

con sustituyentes hidroxilo (como MpCA y MCA), que frente a aquellos con grupos metoxilo, como el MFA (Crepin *et al.*, 2004a; Gopalan *et al.*, 2015; Dilokpimol *et al.*, 2016).

En cuanto a la cinética enzimática de otras FAEs descritas en la literatura, la PrFaeB recombinante de *P. rubens* mostró mayor afinidad que la mayoría de FAEs fúngicas consultadas en la bibliografía. Así, la  $K_m$  calculada para **MFA** en el presente trabajo fue menor que las calculadas para FAEs de varias cepas de hongos ascomicetos, como *F. oxysporum*, (Topakas *et al.*, 2003a; Topakas *et al.*, 2003b), *A. awamori* (McCrae *et al.*, 1994), dos FAEs de *A. niger* (de Vries *et al.*, 2002), *A. oryzae* (Zeng *et al.*, 2014), *A. usarii* (Gong *et al.*, 2013) y *Sporotrichum thermophile* (Topakas *et al.*, 2004), así como FAEs de basidiomicetos, como *P. sapidus* (Linke *et al.*, 2013) y *Lactarius hatsudake* (Wang *et al.*, 2016b). En cuanto a las FAEs producidas por especies del género *Penicillium* spp., se halló una FAE de *P. expansum* con menor afinidad por el sustrato MFA (Donaghy y McKay, 1997) y dos con mayor afinidad, de *P. pinophilum* (Castanares *et al.*, 1992) y de *P. funiculosum* (Kroon *et al.*, 2000). Otras FAEs fúngicas descritas en la literatura con mayor afinidad por el sustrato MFA que la enzima PrFaeB recombinante de *P. rubens* pertenecieron a las especies *P. eryngii*, *Talaromyces cellulolyticus* y *Anaeromyces mucronatus* (Qi *et al.*, 2011; Nieter *et al.*, 2014; Watanabe *et al.*, 2015). En cuanto al sustrato **MCA**, la enzima PrFaeB recombinante de *P. rubens* demostró mayor afinidad que la FAE producidas por una cepa de *F. oxysporum* (Topakas *et al.*, 2003a). Por último, varias de las FAEs y enzimas relacionadas (*p*-cumaroil esterasas) fúngicas descritas en la literatura mostraron mayor afinidad por **MpCA** que la enzima PrFaeB recombinante (Borneman *et al.*, 1991; Castanares *et al.*, 1992; Topakas *et al.*, 2003b; Topakas *et al.*, 2004; Qi *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2013), mientras que se detectó menor afinidad en dos FAEs producidas por *F. oxysporum* y *P. expansum* (Donaghy y McKay, 1997; Topakas *et al.*, 2003a).

Por último, la constante  $k_{cat}$  o número de recambio, que se refiere al número de moléculas de sustrato transformadas por molécula de enzima y por unidad de tiempo, en condiciones de saturación de sustrato, fue mayor en el caso de PrFaeB de *P. rubens* que en el de las FAEs fúngicas indicadas en los párrafos previos, para todos los sustratos ensayados.

### 3.4.3.3. Influencia de la presencia de iones metálicos e inhibidores en la actividad enzimática

Por último, se determinó el efecto de la presencia de iones metálicos e inhibidores sobre la actividad FAE de la PrFaeB recombinante de *P. rubens*. En primer lugar, se incubó la muestra de enzima durante 1 h a 4 °C, en presencia de cada uno de los iones metálicos o inhibidores a analizar, a una concentración final de 5 mM. Tras este tratamiento, se llevaron a cabo reacciones FAE frente a MFA, en presencia de 0,5 mM de cada catión o inhibidor, en las condiciones óptimas de actividad (pH 4,5 y temperatura de 40 °C), según el apartado 2.20.1. Los valores de actividad, determinados mediante la liberación de ácido ferúlico cuantificada por HPLC, fueron referidos a la actividad en ausencia de inhibidores y expresados como actividad residual (Tabla 3.22).

**Tabla 3.22. Efecto de iones metálicos e inhibidores en la actividad FAE de PrFaeB.** Reacciones a 40 °C y pH 4,5. Se indican los valores medios y la desviación estándar de la actividad residual.

Ion metálico/inhibidor	Compuesto (5 mM)	Actividad residual (%)
No iones/inhibidores	-	100 ± 4,29
Mg <sup>2+</sup>	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	92 ± 8,50
Mn <sup>2+</sup>	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	95 ± 4,38
Co <sup>2+</sup>	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	83 ± 24,97
Ni <sup>2+</sup>	NiSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	83 ± 20,28
Zn <sup>2+</sup>	ZnCl <sub>2</sub>	93 ± 2,96
Cu <sup>2+</sup>	CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	79 ± 1,83
Ca <sup>2+</sup>	CaCl <sub>2</sub>	101 ± 2,90
Fe <sup>2+</sup>	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	90 ± 5,38
Fe <sup>3+</sup>	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	85 ± 1,28
Hg <sup>2+</sup>	HgCl <sub>2</sub>	89 ± 1,17
Cd <sup>2+</sup>	CdCl <sub>2</sub> ·xH <sub>2</sub> O	93 ± 0,40
Li <sup>+</sup>	LiCl	98 ± 4,45
K <sup>+</sup>	KCl	97 ± 1,64
Al <sup>3+</sup>	AlCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	88 ± 0,82
EDTA	EDTA	91 ± 1,60
PMSF	PMSF	0,1 ± 0,21
Etanol	Etanol	0,1 ± 0,17
SDS	SDS	0,0 ± 0,02

De acuerdo a los datos mostrados en la tabla 3.22, la actividad FAE de la enzima PrFaeB recombinante se mantuvo en presencia de iones metálicos a la concentración analizada, con valores de actividad residual por encima del 80 % en prácticamente todos los casos. El mayor

descenso en la actividad FAE se registró en presencia de iones  $\text{Cu}^{2+}$ , donde se detectó un 79 % de actividad residual, seguido de  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$ , con un 83 %, si bien la desviación estándar en estos dos últimos casos fue pronunciada. En trabajos previos, se ha descrito el efecto inhibitorio de los iones  $\text{Cu}^{2+}$  sobre la actividad de FAEs fúngicas, reduciendo drásticamente la actividad residual (Castanares *et al.*, 1992; McCrae *et al.*, 1994; Donaghy y McKay, 1997; Kumar *et al.*, 2013), o bien de forma moderada (Kanauchi *et al.*, 2008; Zeng *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016b).

Los iones  $\text{Fe}^{3+}$  provocaron un descenso de la actividad FAE hasta el 85 % de actividad residual, mientras que el resto de metales analizados apenas modificaron los valores, dando lugar a actividades residuales próximas o superiores al 90 %. Si bien el efecto de los iones  $\text{Fe}^{3+}$  fue muy reducido sobre la actividad de la PrFaeB recombinante,  $\text{Fe}^{3+}$ , junto con  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$ , son algunos de los cationes metálicos que con mayor frecuencia se ha descrito que muestran una acción inhibitoria sobre FAEs fúngicas (Castanares *et al.*, 1992; Donaghy y McKay, 1997; Kanauchi *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2013; Nieter *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016b)

Además de los cationes metálicos indicados, se analizaron el inhibidor de proteasas PMSF, etanol al 100 % (v/v), SDS y EDTA. El compuesto PMSF ha sido descrito como inhibidor de FAEs, dado que es capaz de unirse a los residuos de serina del centro activo (Nieter *et al.*, 2014). En el presente trabajo, el compuesto PMSF dio lugar a la pérdida total de actividad FAE, lo que es coherente con la existencia de una tríada catalítica Ser-His-Asp, previamente predicha en base a la secuencia aminoacídica de PrFaeB (Oleas *et al.*, 2017; Rodríguez-Castro, 2017). En trabajos anteriores, se ha descrito una inhibición intensa de la actividad de otras FAEs fúngicas, al ser expuestas a PMSF (Kanauchi *et al.*, 2008; Qi *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2013; Nieter *et al.*, 2014). La presencia de EDTA apenas afectó a las reacciones FAE, hallazgo común en la mayoría de las FAEs fúngicas descritas en la literatura (Castanares *et al.*, 1992; McCrae *et al.*, 1994; Donaghy y McKay, 1997; Kanauchi *et al.*, 2008; Qi *et al.*, 2011; Nieter *et al.*, 2014; Zeng *et al.*, 2014). La adición de SDS en el presente trabajo determinó la pérdida completa de la actividad FAE, de acuerdo con las observaciones de algunos estudios previos (Nieter *et al.*, 2014) y a diferencia de otros (Kanauchi *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2013).

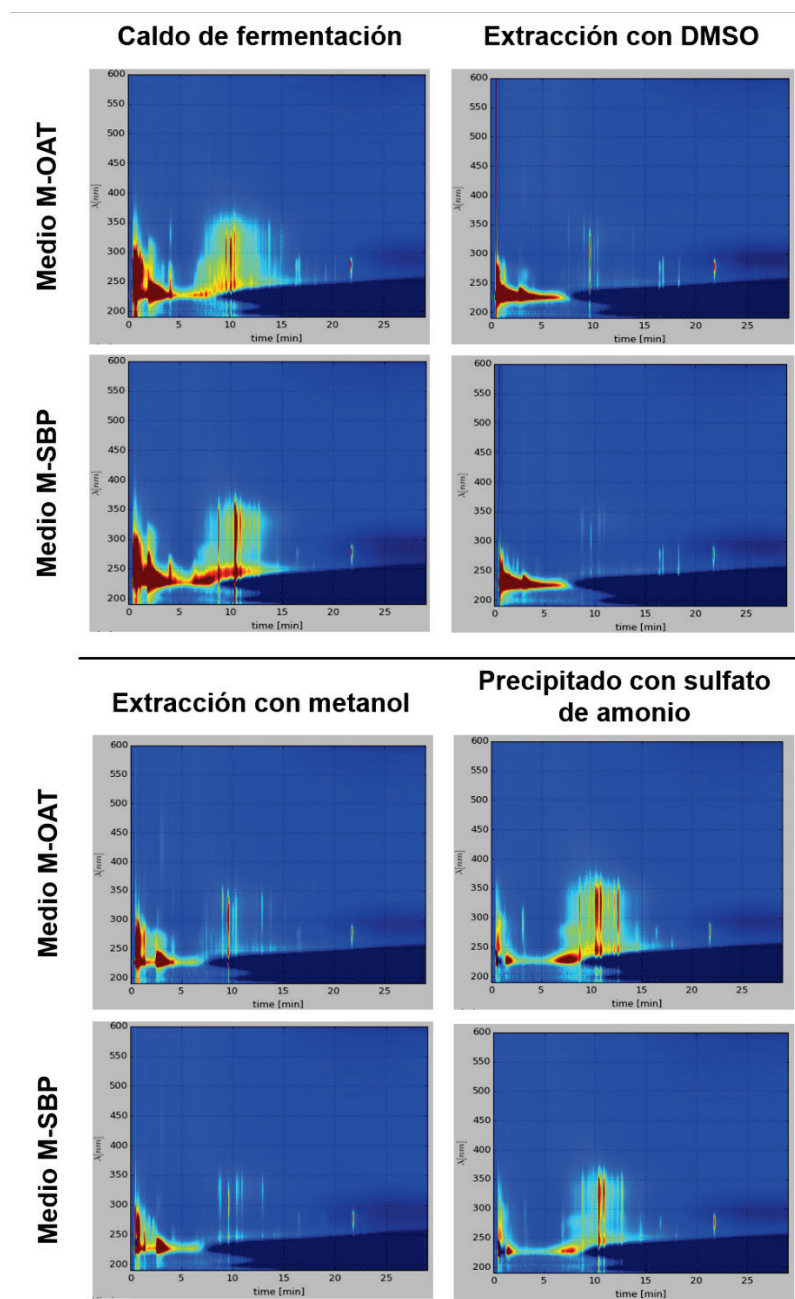
### **3.4.4. Estudio del metaboloma parcial de *P. rubens* Wisconsin 54-1255 tras su cultivo sobre avena y pulpa de remolacha**

Los ensayos descritos en los epígrafes anteriores permitieron caracterizar la enzima PrFaeB recombinante de *P. rubens*, expresada de forma heteróloga en la levadura *K. phaffii* GS115. Dicha plataforma de expresión ha sido considerada microorganismo GRAS (Ramchuran *et al.*, 2005; Vogl *et al.*, 2013; Spohner *et al.*, 2015), por lo que se trata de una alternativa atractiva a la hora de producir enzimas propias de microorganismos que pueden suponer un riesgo sanitario. En este sentido, *P. rubens* es un conocido productor de antibióticos y otras sustancias bioactivas, como micotoxinas (Jami *et al.*, 2010b; García-Estrada *et al.*, 2011; Fernández-Aguado *et al.*, 2014), por lo que la expresión heteróloga de sus enzimas es especialmente interesante.

En el presente trabajo se llevó a cabo un estudio del abanico de metabolitos presente en muestras con actividad FAE producidas por *P. rubens*, con vistas a conocer el tipo de sustancias que fue posible evitar gracias a la producción heteróloga de PrFaeB en *K. phaffii*. El estudio se basó en un análisis metabolómico no dirigido, mediante LC-qTOF-MS, empleando muestras de fermentaciones de *P. rubens* Wisconsin 54-1255 sobre medio M-OAT y M-SBP, recogidas tras 96 h de cultivo a 28 °C y 250 rpm. Se analizaron muestras de caldo de fermentación filtrado, así como muestras extraídas con metanol o DMSO, de modo similar al descrito en el apartado 3.2.8. Además, en este caso se incluyeron en el análisis extractos enzimáticos obtenidos mediante la precipitación del caldo de fermentación con sulfato de amonio. Los análisis se llevaron a cabo por triplicado y a temperatura ambiente, incluyendo controles.

Para llevar a cabo una primera comparación entre muestras, se crearon representaciones gráficas de las masas identificadas, elaborando *isoplots* LC-DAD, mediante *Python* (apartado 2.27). Los patrones de los *isoplots* entre réplicas de una misma condición fueron muy similares. La mayor intensidad de picos se apreció entre las longitudes de onda de 250 y 400 nm. Los *isoplots* correspondientes al caldo de fermentación mostraron un mayor número de picos en el medio M-SBP; por el contrario, en las extracciones con metanol, DMSO y el precipitado con sulfato de amonio, se observaron más picos en el medio M-OAT (Fig. 3.74).





**Fig. 3.74. Isoplots LC-DAD de las muestras de *P. rubens* Wisconsin 54-1255, generados mediante *Python*. Los colores cálidos representan una mayor intensidad de la señal, correspondiente con un pico. El eje de abscisas representa el tiempo de carrera (min) y el de ordenadas la longitud de onda (nm). Se muestran isoplots representativos de las muestras de sobrenadante sin tratar y extracciones con DMSO y metanol, a partir de medio M-OAT y medio M-SBP, así como la dilución 1:100 del extracto enzimático, obtenido mediante precipitación con sulfato de amonio.**

Para determinar el número e identidad de las masas halladas, los centroides LC-MS fueron analizados con los programas *MassHunter Qualitative Analysis Software* v. B.04.00 (Agilent Technologies) y *Mass Profiler Professional* v. 2.1.5 (MPP; Agilent Technologies). El experimento se llevó a cabo dos veces. En la primera de ellas, en la que también se incluyeron otros hongos (*A. alternata* PDA1, entre ellos), se detectaron 1.120 masas no presentes en el control. En el segundo experimento, se observaron 15.300 masas no presentes en el control, de las cuales únicamente se consideraron las existentes, al menos, en dos de las tres réplicas para cada condición (545 masas). Las masas que cumplieron este criterio se compararon con los resultados

depositados en las bases de datos *MassHunter* METLIN *Metabolite* PCD y una base de datos de compuestos bioactivos desarrollada por SINTEF, con vistas a su identificación. Únicamente se aceptaron aquellas identificaciones que presentaron una puntuación de *Database Score* superior a 70. En total, fue posible identificar un total de 84 compuestos, 28 de ellos detectados en las muestras de los medios M-OAT y M-SBP, 27 únicamente presentes en M-OAT y 29 en M-SBP.

Entre los compuestos identificados se hallaron 24 péptidos, 15 ácidos grasos y derivados, 12 glicerofosfolípidos y esfingolípidos, 20 compuestos relacionados con la vitamina D, 2 compuestos relacionados con la vitamina E, 4 esteroides y derivados, 1 micotoxina, 2 antibióticos y 4 metabolitos pertenecientes a otras categorías. La gran mayoría de ellos estuvieron ausentes en los extractos enzimáticos (muestra obtenidas tras la precipitación del caldo de cultivo con sulfato de amonio), donde únicamente se identificaron 9 péptidos, 1 ácido graso, 4 glicerofosfolípidos, 1 compuesto relacionado con la vitamina E y 1 micotoxina. Dentro de los 84 compuestos identificados en total, se encontraron varios compuestos bioactivos que podrían suponer un obstáculo a la hora de emplear en la industria la enzima PrFaeB obtenida directamente a partir de fermentaciones del hongo productor, *P. rubens*.

En primer lugar, se identificaron dos antibióticos, las penicilinas hidrofóbicas **penicilina G** (benzilpenicilina) y **penicilina V** (fenoxiacetilpenicilina), a partir de los caldos de fermentación, tanto en medio M-OAT como M-SBP. Ambos son metabolitos que el hongo es capaz de producir de manera natural, a partir de los precursores adecuados (ácido fenilacético y ácido fenoxiacético, respectivamente) (Martín *et al.*, 2010; Barreiro *et al.*, 2012b; Fernández-Aguado *et al.*, 2013). Aunque dichos antibióticos no fueron detectados en los extractos enzimáticos obtenidos mediante precipitación con sulfato de amonio, su posible presencia constituye un riesgo sanitario de cara a una de las aplicaciones más interesantes de las FAEs, como es la industria alimentaria. La existencia de antibióticos en productos para consumo humano o animal puede dar lugar a alergias y favorecer la aparición de resistencias bacterianas (Laich *et al.*, 2002; Franco *et al.*, 2009).

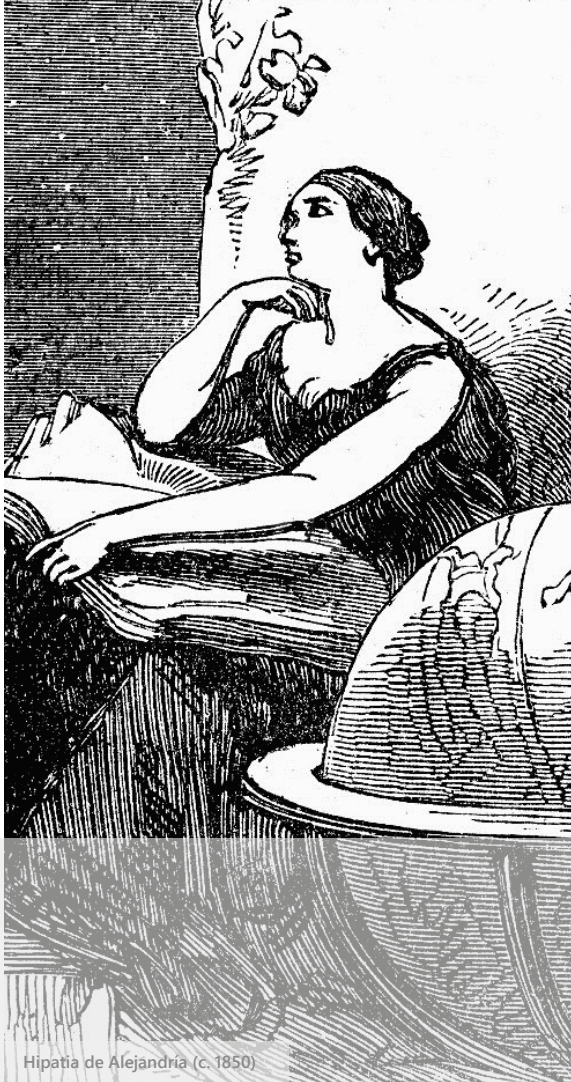
La posible presencia de penicilinas se determinó también mediante un ensayo automático MS-MS y el establecimiento de interconexiones o redes moleculares, empleando las bases de datos METLIN y la herramienta GNPS (Wang *et al.*, 2016c). El análisis de redes moleculares es una herramienta que permite agrupar datos de MS-MS en base a su similitud química, de modo que es posible identificar masas no anotadas análogas de compuestos conocidos, o pertenecientes

a la misma clase general de moléculas (Yang *et al.*, 2013a). Esta estrategia permitió la detección de tres masas no anotadas, aparentemente relacionadas con la penicilina G.

Por otra parte, además de antibióticos, se detectó una micotoxina: la **aflatoxina B1**. Esta micotoxina constituye un riesgo sanitario importante, dado que se trata de un compuesto hepatotóxico, carcinógeno e inmunosupresor (Bhatnagar *et al.*, 2002; De Lucca, 2007; Coppock y Jacobsen, 2009). Si bien *Penicillium* spp. no se encuentra entre los hongos productores de aflatoxina B1, que es sintetizada por especies de *Aspergillus* spp. (Frisvad *et al.*, 2005; Tola y Kebede, 2016), su detección en el análisis metabolómico pudo deberse a su presencia en el medio de cultivo. La aflatoxina B1 se detectó únicamente en muestras procedentes del medio M-SBP. También se detectó en el extracto enzimático precipitado con sulfato de amonio tras cultivos en medio M-SBP, aunque sus niveles fueron menores que en el caldo de fermentación. La identificación de aflatoxina B1 en muestras obtenidas a partir de cultivos de *P. rubens* en medio M-SBP coincide con los resultados obtenidos durante el análisis metabolómico de la cepa *A. alternata* PDA1, al ser cultivada sobre el mismo medio (apartado 3.2.8). Esto confirma la posible presencia de esta micotoxina en la pulpa de remolacha seca empleada como sustrato.

Teniendo en cuenta que se detectó la presencia de **antibióticos y micotoxinas** en las muestras procedentes del organismo productor de la enzima PrFaeB (*P. rubens*), la disponibilidad de esta enzima expresada de forma heteróloga en *K. phaffii* GS115, un microorganismo considerado GRAS, supone una alternativa segura a considerar para usos futuros.





Hipatia de Alejandria (c. 1850)

## **DISCUSIÓN GENERAL**



## 4.1. Nuevas cepas fúngicas con actividad FAE

---

### 4.1.1. Búsqueda y selección de cepas fúngicas con actividad FAE

Los organismos fotosintéticos, como las plantas, constituyen el mayor reservorio energético del planeta disponible para los seres vivos (Lynd *et al.*, 2002). Desde el punto de vista industrial, la biomasa vegetal lignocelulósica es la fuente de carbono orgánico más abundante del planeta, lo que la convierte en una materia prima de gran interés para su uso en biorrefinería (Guerriero *et al.*, 2015; Guerriero *et al.*, 2016). Además de sus aplicaciones en los procesos de obtención de energía, los polímeros lignocelulósicos contienen compuestos interesantes, susceptibles de ser comercializados, como es el caso del ácido ferúlico (Cherubini, 2010; El-Seedi *et al.*, 2012; Tuck *et al.*, 2012; Menon y Rao, 2012; Guerriero *et al.*, 2016; García-Calvo *et al.*, 2018).

Sin embargo, la obtención de biopolímeros, azúcares fermentables y compuestos de valor añadido a partir de la biomasa requiere de la hidrólisis de la pared celular vegetal, que es una estructura dinámica, compleja y refractaria a la degradación (Wei *et al.*, 2009; Gilbert, 2010). La heterogeneidad de las paredes celulares determina que su degradación industrial se realice combinando métodos físico-químicos y enzimáticos. No obstante, los tratamientos físico-químicos son más contaminantes y pueden modificar algunos de los componentes de la pared celular (Mathew y Abraham, 2004). La lignocelulosa se recicla por completo en la naturaleza, lo que sugiere que existen organismos que poseen toda la maquinaria enzimática necesaria (Lynd *et al.*, 2002; de Souza, 2013; Kubicek y Kubicek, 2016).

En la actualidad, se conocen cepas microbianas capaces de producir enzimas lignocelulolíticas que degradan la biomasa vegetal hacia azúcares sencillos. Sin embargo, los costes del proceso son muy elevados y, además, la eficiencia de dichas enzimas es limitada (Wei *et al.*, 2009; Kubicek y Kubicek, 2016). Ante esto, es necesario continuar los esfuerzos encaminados a descubrir nuevas enzimas con capacidad lignocelulolítica y continuar con la mejora de las actividades de las ya descritas. Los hongos constituyen el grupo de microorganismos con mayor capacidad para degradar la biomasa vegetal (de Souza, 2013), por lo que son especialmente interesantes a la hora de llevar a cabo la búsqueda de nuevas enzimas lignocelulolíticas.

Dentro de la variedad de enzimas lignocelulolíticas implicadas en la degradación de la materia vegetal se encuentran las FAEs, en torno a las cuales gira el presente trabajo de Tesis Doctoral. Como se ha indicado anteriormente, las FAEs son un grupo de enzimas capaces de catalizar la liberación de AHC a partir de las paredes celulares vegetales. Esta acción tiene una doble vertiente beneficiosa desde el punto de vista biotecnológico: i) por un lado, la hidrólisis de los enlaces éster que unen los AHC con los polímeros de la pared vegetal facilita el acceso a otras enzimas lignocelulolíticas y contribuye a la desestabilización de la compleja red que forma las paredes vegetales; ii) por otro lado, permite la liberación de compuestos de alto valor añadido (AHC), que presentan efecto antiinflamatorio, antibacteriano, antitumoral y antienvjecimiento, entre otros, gracias a su capacidad antioxidante (Mathew y Abraham, 2004; Srinivasan *et al.*, 2007; Kumar y Pruthi, 2014; de Oliveira *et al.*, 2015; Gopalan *et al.*, 2015; Dilokpimol *et al.*, 2016).

En el presente trabajo se llevó a cabo una búsqueda de nuevas cepas fúngicas con actividad FAE a partir de ecosistemas extremos o inusuales, como son las superficies metálicas en contacto con el medio acuático y las superficies plásticas en un clima continental frío. El aislamiento de microorganismos con actividad lignocelulolítica a partir de nichos ecológicos extremos se ha recogido en estudios previos (Vester *et al.*, 2014; Martorell *et al.*, 2017; Duarte *et al.*, 2018). La capacidad de algunos hongos para producir *biofilms* facilita la colonización de ambientes poco favorables, incluidos metales y plásticos, como es el caso de las superficies estudiadas en el presente trabajo (Villena y Gutiérrez-Correa, 2007; Liu *et al.*, 2014b). La bioprospección de nuevas enzimas en ecosistemas en los que, *a priori*, las condiciones ambientales son menos favorables, es una estrategia que permite descubrir nuevos sistemas enzimáticos con diferentes óptimos de actividad y características particulares, lo que resulta beneficioso desde el punto de vista de la necesidad de diversificar el abanico de enzimas lignocelulolíticas disponibles (Upadhyay *et al.*, 2016; da Silva *et al.*, 2017; Tiwari *et al.*, 2018; Duarte *et al.*, 2018).

Uno de los requisitos para llevar a cabo la búsqueda de nuevas cepas con una actividad enzimática concreta es disponer de ensayos rápidos y fiables que permitan detectar las cepas productoras de forma efectiva. En el presente trabajo se optimizó un ensayo en placa que permitió detectar la actividad FAE de aislados ambientales en tan solo 5 h. Este método ha demostrado ser una alternativa interesante para la detección de actividad FAE en ascomicetos.



Entre algunos de los ascomicetos con posibles aplicaciones industriales para la degradación de la biomasa vegetal se encuentran los géneros *Penicillium* spp., (Song *et al.*, 2016), *Aspergillus* spp. (Batista-García *et al.*, 2014), *Trichoderma* spp. y *Neurospora* spp. Otro gran grupo a tener en cuenta son los hongos fitopatógenos, puesto que su mecanismo de infección se basa en una potente maquinaria enzimática orientada a degradar y penetrar los tejidos de especies vegetales. Entre los hongos aislados e identificados en el presente trabajo a partir de superficies metálicas y plásticas, se hallaron hongos fitopatógenos y hongos saprófitos capaces de desarrollarse sobre materia vegetal, incluidas cepas del género *Aspergillus* spp., que es un hongo cuya presencia se ha descrito dentro de *biofilms* (Gutiérrez-Correa *et al.*, 2012). Además, se identificaron cepas de *F. oxysporum* y de *P. herbarum*, ambas especies capaces de producir enfermedades en plantas. Una de dichas cepas [*F. oxysporum* PDA(2)4] degradó el ácido ferúlico hacia múltiples compuestos. Esta característica fue indicativa de la presencia en su secretoma de otro tipo de enzimas relacionadas con el metabolismo del ácido ferúlico que podrían ser de utilidad, por lo que se prevé continuar la investigación en esta cepa para elucidar las enzimas responsables de dicho proceso degradativo.

#### 4.1.2. *Alternaria* sp. como hongo lignocelulolítico

Dentro de las 7 cepas fúngicas aisladas, la que demostró mayores niveles de actividad FAE fue *A. alternata* PDA1. *Alternaria* spp. es un género de hongos ascomicetos que engloba especies saprófitas, fitopatógenas y patógenas humanas facultativas (Thomma, 2003). Al tratarse de un género con una distribución ubicua, es posible encontrarlo en ecosistemas muy variados. En este sentido, se han aislado cepas de *Alternaria* spp. en sustratos como tejidos y subproductos animales y vegetales, el suelo, la atmósfera y ecosistemas acuáticos (Woudenberg *et al.*, 2013), en climas extremos de la región antártica (McKelvey y Murphy, 2017) así como ambientes pobres en nutrientes, como materiales de construcción y efluentes del lavado de coches (Sibanda *et al.*, 2017). Dicha ubicuidad explica que en el presente trabajo se identificaran dos cepas distintas de *A. alternata* (PDA1 y PDA8), a partir de las muestras analizadas.

Como se ha indicado previamente, el carácter fitopatógeno de *A. alternata* está directamente ligado a su capacidad lignocelulolítica. *Alternaria* spp. se ha estudiado en trabajos anteriores desde el punto de vista de su potencial como microorganismo capaz de degradar biomasa vegetal. Una especie perteneciente a este género, aislada a partir de libros deteriorados, demostró actividad FAE sobre sustratos sintéticos, tras ser cultivada sobre sustratos lignocelulósicos como el bagazo

de caña de azúcar pretratado, salvado de soja, xilano y pectina (Robl *et al.*, 2013). Por otra parte, Xiao y colaboradores analizaron muestras de enzimas procedentes de una cepa de *A. alternata* aislada a partir de madera, que produjo la liberación de ácido ferúlico a partir de salvado de triticale y de trigo (Xiao *et al.*, 2012). Otra cepa de *Alternaria* sp. demostró actividad lignocelulolítica sobre un sustrato natural constituido por hojarasca procedente de un bosque subtropical, rico en biomasa de la fagácea *Quercus variabilis* (Hao *et al.*, 2006). Recientemente se ha descrito una FAE de un aislado de *A. tenuissima* obtenido a partir de hojas de berenjena (Chi *et al.*, 2017). Dicha FAE fue purificada y caracterizada, comprobándose que presentó actividad frente al sustrato sintético MFA y frente a un sustrato natural derivado de un árbol tropical.

En el presente trabajo se analizaron varios sustratos naturales como fuentes de carbono e inductores de la producción de FAEs, resultando la fibra de avena de molienda y la pulpa de remolacha seca los más adecuados. La diferencia en los valores de actividad FAE detectados tras el cultivo sobre diferentes sustratos pudieron deberse a su diferente composición química (Williamson *et al.*, 1998; de Vries y Visser, 1999; de Vries *et al.*, 2002; Hassan y Hugouvieux-Cotte-Pattat, 2011; Amore *et al.*, 2013; Dilokpimol *et al.*, 2016). La expresión de genes que codifican para enzimas lignocelulolíticas en hongos es un proceso controlado por múltiples reguladores, gran parte de los cuales aún se desconocen. Los sistemas de regulación de este tipo de enzimas están poco conservados entre hongos, probablemente como consecuencia de la necesidad de adaptarse a biotopos y formas de vida. Entre los inductores descritos en la literatura se encuentran productos de bajo peso molecular procedentes de la degradación de la pared celular vegetal, por lo que las diferencias en la composición de los sustratos determinarían diferentes niveles de inducción (Benocci *et al.*, 2017). En el caso concreto de las FAEs, uno de los inductores descritos es el ácido ferúlico (Dilokpimol *et al.*, 2016). El sustrato que indujo mayores valores de actividad FAE en el presente trabajo fue la fibra de avena, sustrato obtenido a partir de la molienda de cáscara de avena, que es rica en compuestos fenólicos como el ácido ferúlico (Yu *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2013b; Rasane *et al.*, 2015). Los valores de actividad FAE detectados tras el cultivo sobre la pulpa de remolacha, un subproducto de la industria azucarera, también fueron elevados. La pulpa de remolacha es una materia lignocelulósica compleja con un alto contenido en ácido ferúlico y polímeros hemicelulósicos, lo que lo convierte en un buen inductor de FAEs, así como un sustrato interesante para la obtención de este ácido hidroxicinámico (Gopalan *et al.*, 2015). Además, su reducido contenido en lignina facilita su hidrólisis enzimática, por lo que es un

subproducto industrial interesante de cara a su utilización en biorrefinería (Thibault y Rouau, 1990; Kühnel *et al.*, 2011). Trabajos previos han empleado la pulpa de remolacha como sustrato o inductor de FAEs (Brézillon *et al.*, 1996; Sakamoto *et al.*, 2005; Rodríguez-Castro, 2017). Además de ácido ferúlico, a partir de la pulpa de remolacha es posible obtener otros compuestos de utilidad, como la ramnosa, arabinosa y el ácido galacturónico (Bonnin *et al.*, 2000). Como se ha indicado en el apartado 3.2.4.5, el extracto enzimático obtenido de la cepa *A. alternata* PDA1 fue capaz de liberar un 27-50 % del total de ácido ferúlico de la pulpa de remolacha, que es un valor interesante, teniendo en cuenta que se trató de la acción del extracto enzimático, sin ayuda de pretratamientos y otros cócteles de enzimas. Los extractos enzimáticos constituidos por una mezcla de enzimas lignocelulolíticas, como es el caso del analizado en el presente trabajo, han demostrado mayor eficacia para producir la liberación de ácido ferúlico que las FAEs purificadas, dado que las diferentes enzimas lignocelulolíticas presentes actúan de forma sinérgica para abrir la estructura de la pared celular vegetal y facilitar la acción de las FAEs (Benoit *et al.*, 2006b).

Un estudio que analizó la presencia de diferentes enzimas en el secretoma de la cepa *A. alternata* SRC1lrK2f (aislada a partir de sistemas de tratamiento biológico pasivo de residuos de una mina de carbón), identificó 6 posibles FAEs, por lo que la existencia de varias de estas enzimas en *A. alternata* PDA1 es posible. Asimismo, mediante una búsqueda de las palabras clave “*feruloyl esterase*” en el servidor del proyecto “*The Alternaria genomes database*” se encontraron genes correspondientes a varias posibles FAEs (Dang *et al.*, 2015). La especificidad de sustrato demostrada por el extracto enzimático obtenido a partir de *A. alternata* PDA1 coincidió con el patrón de actividad propio de las FAEs de tipo B, de acuerdo a la clasificación funcional clásica propuesta por Crepin y colaboradores (Crepin *et al.*, 2004a). El sustrato lignocelulósico pulpa de remolacha induce principalmente FAEs de tipo B, lo que es coherente con los resultados obtenidos (Fazary y Ju, 2007). A pesar de que la clasificación de Crepin y colaboradores ha sido muy empleada durante los últimos años, presenta limitaciones, como el hecho de que no refleja la filogenia y las relaciones evolutivas entre diferentes FAEs. La clasificación propuesta por Dilokpimol y colaboradores corrige dichas limitaciones, incluyendo datos de estudios filogenéticos para definir 13 subfamilias de FAEs, las cuales habrían evolucionado a partir de grupos enzimáticos diversos (tanases, acetilxilano esterases, xilanasas, lipasas, colinesterases y  $\alpha$ -L-ramnosidasas), lo que puede explicar las diferencias en cuanto a su especificidad de sustrato (Dilokpimol *et al.*, 2016).

El análisis metabolómico de las muestras obtenidas a partir de fermentaciones en medio con pulpa de remolacha indicó la presencia probable de aflatoxina B1 en dicho sustrato natural. La aflatoxina B1 es un potente carcinógeno y hepatotóxico, por lo que su aparición en el extracto enzimático podría suponer un problema de seguridad. Para confirmar la presencia de esta micotoxina, dos estrategias posibles serían la incorporación a los análisis LC-QTOF-MS de un patrón conocido de dicha micotoxina, o bien la realización de análisis mediante espectrometría de masas en tándem LC-MS/MS. La confirmación de la presencia de micotoxinas y su cuantificación en el extracto enzimático es importante de cara a determinar las posibles aplicaciones del mismo (Pariza y Johnson, 2001; Pariza y Cook, 2010). A la vista de la identificación de aflatoxina B1 mediante el análisis metabolómico no dirigido, sería recomendable seleccionar como sustrato natural pulpa de remolacha procedente de otro proveedor, o bien verificar que los niveles existentes se encontraron por debajo de los límites permitidos (Comisión Europea, 2006; Tola y Kebede, 2016). El establecimiento de buenas prácticas de manejo puede limitar el contenido de dicha micotoxina en productos lignocelulósicos como la pulpa de remolacha, dado que su producción por parte de especies de *Aspergillus* spp. depende de factores como la temperatura, la actividad de agua, los daños producidos por insectos y otras plagas, etc. (Paterson y Lima, 2010). Además de controlar dichos factores, se están desarrollando tratamientos innovadores para limitar el contenido en aflatoxinas mediante control biológico, radiación o métodos químicos, entre otros (Udomkun *et al.*, 2017).

La degradación enzimática de la pared celular vegetal es un proceso complejo en el que intervienen múltiples enzimas, que actúan de forma sinérgica y secuencial (Wei *et al.*, 2009). Por ello, pese a que el principal grupo enzimático de interés fueron las FAEs, en el presente trabajo también se llevó a cabo la determinación de otras dos de las principales actividades implicadas: la actividad celulasa y la actividad hemicelulasa (xilanolítica). *A. alternata* PDA1 demostró actividades  $\beta$ -glucosidasa, exoglucanasa, endoglucanasa,  $\beta$ -xilosidasa y endoxilanasas. Los valores de actividad fueron especialmente elevados en el caso de la actividad  $\beta$ -glucosidasa, lo que la convierte en una cepa de interés desde el punto de vista de la Biotecnología Blanca, puesto que uno de los mayores cuellos de botella en los procesos industriales de degradación de la biomasa vegetal es la inhibición por producto final de endo y exoglucanasas, debido a la acumulación de celobiosa. Las  $\beta$ -glucosidasas son capaces de catalizar la hidrólisis de la celobiosa hacia glucosa, reduciendo de este modo la inhibición por producto final (Sørensen *et al.*, 2013). Comparando la

actividad celulasa y xilanolítica de *A. alternata* PDA1 con la de tres cócteles enzimáticos comerciales descritos en la literatura [SP (*Penicillium oxalicum*), ST (*T. reesei*) y Celluclast® (*T. reesei*; Sigma-Aldrich)], *A. alternata* PDA1 presentó valores de actividad  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -xilosidasa mayores que dichas preparaciones comerciales (Song *et al.*, 2016).

La presencia de actividad celulasa en *A. alternata* PDA1 es un hallazgo relevante, dado que otras cepas de *A. alternata* descritas en la literatura aisladas a partir de ambientes inusuales o extremos carecieron de dicha actividad. Así, ni en una cepa de *Alternaria* sp. aislada a partir de muestras corneales de pacientes con queratomycosis (Mythili *et al.*, 2014), ni en otra aislada de efluentes del lavado de coches (Sibanda *et al.*, 2017) se detectó actividad celulasa. La presencia de actividad celulasa en el caso de la cepa *A. alternata* PDA1 puede responder a la diferente disponibilidad de materia vegetal en uno y otro ambiente, puesto que las superficies metálicas analizadas estuvieron en contacto con masas de agua con presencia de vegetación. En este sentido, se ha descrito actividad celulasa en cepas de *Alternaria* sp. aisladas a partir de ambientes con presencia de materia vegetal, como muestras de suelo (Hao *et al.*, 2006), paja de arroz (El-Metwally *et al.*, 2014) y diferentes tipos de papel enmohecido (Das *et al.*, 1997).

Los análisis proteómicos de la cepa *A. alternata* PDA1 llevados a cabo en el presente trabajo arrojan luz sobre la complejidad de su secretoma. En la mayoría de las proteínas identificadas se predijo la existencia de péptidos señal y no se detectaron proteínas intracelulares que apuntaran a procesos de lisis celular (Barreiro *et al.*, 2012a). La mayoría de las proteínas identificadas se adscribieron a la categoría funcional de metabolismo y transporte de carbohidratos. La fuerte representación de pectinasas y hemicelulasas pudo ser consecuencia del elevado contenido en pectinas de la pulpa de remolacha (Saulnier y Thibault, 1999). Se identificaron, también, enzimas relacionadas con la fitopatogenicidad, como son, además de las pectinasas, las endopoligalacturonasas y cutinasas (Isshiki *et al.*, 2001; Eshel *et al.*, 2002). Por otra parte, se identificaron enzimas xilanolíticas y celulolíticas, lo que justifica la presencia de dichas actividades en los ensayos realizados. El potencial lignocelulolítico de la especie *A. alternata* pudo observarse también en el estudio del secretoma de la cepa *A. alternata* SRC11rK2f, en el cual se hallaron varias enzimas CAZy, incluida una FAE (Zeiner *et al.*, 2016). En cuanto a análisis de secretomas de hongos crecidos sobre pulpa de remolacha, como en el caso del presente trabajo, Navarrete y colaboradores llevaron a cabo un análisis proteómico comparativo del secretoma de *P. purpurogenum* tras su cultivo sobre acetilxilano y sobre pulpa de remolacha (Navarrete *et al.*,

2012). Dicho estudio identificó varios de los grupos enzimáticos que se hallaron en el presente trabajo para *A. alternata* PDA1, como son poligalacturonasas, gran cantidad de arabinofuranosidasas, glucanasas, pectato liasas y celulasas, como  $\beta$ -glucosidasas. La presencia de grupos enzimáticos similares en dos ascomicetos distintos cultivados sobre pulpa de remolacha indica la importancia del sustrato lignocelulósico en cuanto a la producción de enzimas CAZy.

Sería recomendable, en una posible aplicación industrial del extracto enzimático obtenido a partir de *A. alternata* PDA1, sería recomendable llevar a cabo más estudios encaminados a garantizar la seguridad de esta cepa, dado que se confirmó la presencia de dos alérgenos proteicos importantes: el alérgeno mayor Alt a 1 y la proteína subtilisina (Kustrzeba-Wójcicka *et al.*, 2014; Gabriel *et al.*, 2016). Una estrategia para evitar la posible patogenicidad, toxigenicidad o alergenicidad de los extractos enzimáticos sería el empleo de técnicas de biología molecular para expresar las enzimas lignocelulolíticas de interés en cepas de otros organismos considerados seguros (Sewalt *et al.*, 2016). Asimismo, otra alternativa sería aplicar técnicas de biología molecular que permitieran evitar la expresión de los genes codificantes para dichos alérgenos (De Vouge *et al.*, 1996). En este sentido, puede ser de utilidad el sistema CRISPR/Cas9, recientemente adaptado con éxito para su empleo en *A. alternata* (Wenderoth *et al.*, 2017).

## 4.2. Actividad FAE en organismos seleccionados para aplicaciones biotecnológicas

---

### 4.2.1. *K. phaffii* como sistema de expresión heteróloga de FAEs fúngicas

En el presente trabajo, se llevó a cabo la expresión heteróloga de genes que codifican para FAEs de *P. rubens* Wisconsin 54-1255, para su posterior caracterización. La plataforma de expresión seleccionada para ello fue la levadura metilotrófica *K. phaffii*, debido a varias **ventajas**.

Al tratarse de organismos eucariotas, las levaduras son especialmente adecuadas para la expresión de proteínas procedentes de otros organismos eucariotas, debido a una serie de características: i) capacidad para realizar modificaciones postraduccionales (plegamiento correcto de la proteína, formación de puentes disulfuro, O-glicosilación, N glicosilación y procesamiento

de péptidos señal); ii) son cultivables alcanzando altas densidades de células, empleando una gran variedad de fuentes de carbono; iii) pueden compartimentalizar reacciones químicas en orgánulos; iv) poseen una potente maquinaria de secreción y v) son resistentes a agentes infecciosos como los bacteriófagos (Macauley-Patrick *et al.*, 2005; Wagner y Alper, 2016). Las levaduras también constituyen una alternativa interesante a otros sistemas de expresión eucariotas, como insectos, plantas o líneas celulares de mamíferos, puesto que son organismos unicelulares, más sencillos de manejar y con menores requerimientos nutricionales.

Dentro de las levaduras, *Komagataella* spp. se seleccionó frente a otras especies utilizadas en expresión heteróloga, como *S. cerevisiae*, porque presenta una serie de características interesantes. En primer lugar, a diferencia de *S. cerevisiae*, se trata de una levadura Crabtree negativa, es decir, con un metabolismo preferentemente respiratorio y una producción baja de etanol al ser sometida a condiciones de cultivo aerobias. Esto determina que no se produzcan pérdidas de carbono destinadas a producir etanol, lo que permite que se forme gran cantidad de biomasa y, consecuentemente, mejores rendimientos de producción de enzimas recombinantes (Hartner y Glieder, 2006; Mattanovich *et al.*, 2009; Mattanovich *et al.*, 2016; Vieira Gomes *et al.*, 2018). Además, *Komagataella* sp. mantiene un metabolismo respiratorio incluso en condiciones de exceso de glucosa y, a diferencia de *S. cerevisiae*, su tasa de crecimiento y cinética de absorción de sustratos es similar, ya sean cultivadas sobre glucosa o glicerol (Prielhofer *et al.*, 2015). Por otra parte, se ha descrito que muchas de las proteínas secretadas en *S. cerevisiae* no se encuentran de forma libre en el medio, sino que quedan en el espacio periplásmico, lo que origina problemas de purificación que reducen el rendimiento del proceso; dicho problema no es frecuente en *Komagataella* spp. (Spohner *et al.*, 2015). Otra ventaja de *Komagataella* sp. frente a *S. cerevisiae* es que produce un menor número de proteínas extracelulares, lo que facilita la recuperación de la proteína recombinante secretada. Además, *Komagataella* sp. introduce modificaciones postraduccionales más favorables que *S. cerevisiae*, que tiende a hiperglicosilar con residuos de manosa unidos por enlace enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3), lo que puede afectar a la funcionalidad de la proteína recombinante (Löbs *et al.*, 2017). Muchas de las técnicas de manipulación genética desarrolladas para *S. cerevisiae*, que es uno de los sistemas experimentales de la Biología moderna mejor conocidos, son aplicables para *Komagataella* sp. (Cregg *et al.*, 2000). Por otro lado, varios productos derivados de *Komagataella* sp. han sido reconocidos también como GRAS (Ramchuran *et al.*, 2005; Vogl *et al.*, 2013; Ahmad *et al.*, 2014; Spohner *et al.*, 2015; Juturu y Wu, 2018).

Otra característica por la que se seleccionó en lugar de *S. cerevisiae* es que las cepas de uso biotecnológico de *K. phaffii* no presentan actividad lignocelulolítica (Banerjee *et al.*, 2010; Mellitzer *et al.*, 2012; Haon *et al.*, 2015), mientras que un estudio encontró indicios de actividad FAE en cepas de *S. cerevisiae* empleadas en la fabricación de cerveza (Coghe *et al.*, 2004). Por el contrario, en otro estudio llevado a cabo empleando una cepa de *S. cerevisiae* utilizada en la industria del sake japonés no se detectó actividad FAE (Hashizume *et al.*, 2013). A pesar de que no se identificara actividad FAE en este último ensayo, la existencia de indicios que apuntan a una posible actividad FAE por parte de *S. cerevisiae* convierten a *Komagataella* spp. en una plataforma de expresión heteróloga más apropiada para FAEs, dado que la ausencia de actividad lignocelulolítica endógena facilita la determinación de la actividad enzimática recombinante.

La proximidad filogenética entre hongos filamentosos y levaduras determina que plataformas de expresión como *Komagataella* spp. sean especialmente indicadas para la producción de enzimas lignocelulolíticas fúngicas (Haon *et al.*, 2015). En este sentido, se ha conseguido expresar con éxito un gran número de enzimas lignocelulolíticas fúngicas en *Komagataella* spp., en algunos casos consiguiéndose altos niveles de producción. Entre las enzimas lignocelulolíticas fúngicas expresadas de forma heteróloga en *Komagataella* spp. se encuentran **celulasas** (Salinas *et al.*, 2011; Várnai *et al.*, 2014; Lambertz *et al.*, 2014; de Amorim Araújo *et al.*, 2015; Woon *et al.*, 2017; Kickenweiz *et al.*, 2018; Kamal *et al.*, 2018), **hemicelulasas** (Berrin *et al.*, 2000; Ahmed *et al.*, 2009; Vasu *et al.*, 2012; Mao *et al.*, 2012; Rabert *et al.*, 2013), **pectinasas** (Jiang *et al.*, 2013; Pérez-Fuentes *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014a; Li *et al.*, 2015a; Abdulrachman *et al.*, 2017) y **enzimas ligninolíticas** (Colao *et al.*, 2006; Piscitelli *et al.*, 2010; Gu *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016a; Gündüz Ergün y Çalık, 2016; Lambertz *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2018). En lo que se refiere a **FAEs**, *K. phaffii* ha demostrado ser una plataforma de expresión muy interesante, como demuestra la gran variedad de FAEs fúngicas producidas (Tabla 4.1).

**Tabla 4.1. Principales FAEs fúngicas producidas empleando la plataforma de expresión de proteínas recombinantes *Komagataella* spp.**

FAE <sup>a</sup>	Microorganismo de origen	Cepa	Promotor	Referencia
FAEA [AnFaeA]	<i>A. niger</i>	GS115	P <sub>AOXI</sub>	Juge <i>et al.</i> , 2001
FAEC [TsFaeC]	<i>Talaromyces stipitatus</i>	GS115	P <sub>AOXI</sub>	Crepin <i>et al.</i> , 2003a
fae-1 [NcFaeB]	<i>Neurospora crassa</i>	GS115	P <sub>AOXI</sub>	Crepin <i>et al.</i> , 2003b
NcFaeD-3.544	<i>N. crassa</i>	GS115	P <sub>AOXI</sub>	Crepin <i>et al.</i> , 2004b
AnFaeA (silvestre y mutante)	<i>A. niger</i>	GS115	P <sub>AOXI</sub>	Hermoso <i>et al.</i> , 2004



Tabla 4.1 (continuación)

FAE <sup>a</sup>	Microorganismo de origen	Cepa	Promotor	Referencia
AnFaeA (mutantes)	<i>A. niger</i>	GS115	P <sub>AOX1</sub>	Faulds et al., 2005
AwFaeA (mutantes)	<i>A. awamori</i>	GS115	P <sub>AOX1</sub>	Koseki et al., 2005
FoFaeC-12213	<i>F. oxysporum</i>	X-33	P <sub>AOX1</sub>	Moukouli et al., 2008
AoFaeB y AoFaeC	<i>A. oryzae</i>	GS115	P <sub>AOX1</sub>	Koseki et al., 2009b
AwFaeA- CBM42	<i>A. awamori</i>	GS115	P <sub>AOX1</sub>	Koseki et al., 2010
[MtFaeB]	<i>Myceliophthora thermophila</i>	X-33	P <sub>AOX1</sub>	Topakas et al., 2012
A.O.2, A.O.8 y A.O.10	<i>A. oryzae</i>	SMD1168 H	P <sub>AOX1</sub>	Udatha et al., 2012
AnFaeA (librería de mutantes)	<i>A. niger</i>	KM71	P <sub>GAP</sub>	Zhang et al., 2012a
AuFaeA	<i>Aspergillus usamii E001</i>	GS115	P <sub>AOX1</sub>	Gong et al., 2013
AfFaeA	<i>Aspergillus flavus</i>	X-33	P <sub>GAP</sub>	Zhang et al., 2013
AoFaeB	<i>A. oryzae</i>	KM71H	P <sub>AOX1</sub>	Suzuki et al., 2014
AoFaeA	<i>A. oryzae</i>	GS115	P <sub>AOX1</sub>	Zeng et al., 2014
AuFaeA (librería de mutantes)	<i>A. usamii</i>	GS115	P <sub>AOX1</sub>	Yin et al., 2015
AtFaeA	<i>A. terreus</i>	X-33	P <sub>GAP</sub>	Zhang et al., 2015
AnFaeA (dos copias)	<i>A. niger</i>	GS115	P <sub>AOX1</sub>	Zhou et al., 2015
AnFaeA (codones optimizados)	<i>A. niger</i>	X-33	P <sub>AOX1</sub>	Chen et al., 2016
Est1 [PsFae?]	<i>Pleurotus sapidus</i>	GS115 y SMD1168	P <sub>AOX1</sub> y P <sub>GAP</sub>	Kelle et al., 2016
FAET [PpFaeB?]	<i>Penicillium purpurogenum</i>	GS115	P <sub>AOX1</sub>	Oleas et al., 2016
FaeC [AnFaeC]	<i>A. niger</i> N402	X-33	P <sub>AOX1</sub>	Dilokpimol et al., 2017
FAEA [PpFaeA?]	<i>P. purpurogenum</i>	GS115	P <sub>AOX1</sub>	Oleas et al., 2017
27 FAEs hipotéticas y 6 FAEs conocidas	<i>Aspergillus</i> spp., <i>F. oxysporum</i> , <i>Gymnopus luxurians</i> , <i>Setosphaeria turcica</i> , <i>M. thermophila</i> , <i>Stagonospora nodorum</i> , <i>Coprinopsis cinerea</i> , <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> , <i>Galerina marginata</i> , <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> <i>Orpinomyces</i> sp., <i>Dichomitus squalens</i> , <i>Stereum hirsutum</i> , <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> .	GS115	P <sub>AOX1</sub>	Dilokpimol et al., 2018

<sup>a</sup> Entre corchetes se indica el nombre adaptado al sistema de nomenclatura de FAEs propuesto por Faulds, 2010.

En la mayor parte de los casos, la expresión de genes que codifican para FAEs fúngicas en *Komagataella* sp. se ha llevado a cabo empleando el promotor P<sub>AOX1</sub>. El uso de dicho promotor está ampliamente extendido y es aquel con el que se han obtenido mayores niveles de expresión

(hasta 22 g de proteína intracelular/L y 15 g de proteína secretada/L) (Vogl y Glieder, 2013). En el caso de las FAEs, también se ha empleado el promotor constitutivo fuerte  $P_{GAP}$  (Tabla 4.1).

En el presente trabajo, pese a que se utilizaron ambos promotores, se obtuvieron mejores resultados con  $P_{GAP}$ . En la literatura se han descrito varios inconvenientes del empleo de  $P_{AOX1}$ : i) la dificultad de monitorización de los niveles de metanol durante la fermentación; ii) el carácter inflamable del metanol, que hace que almacenarlo en grandes cantidades sea peligroso; iii) el empleo de dos fuentes de carbono distintas (glucosa/glicerol en la fase de crecimiento y metanol en la de inducción), que dificulta el manejo, siendo complicado realizar el cambio de una a otra en un momento preciso y iv) el metanol es un derivado petroquímico, por lo que su uso en industria alimentaria es desaconsejable (Juturu y Wu, 2018). Teniendo en cuenta análisis proteómicos de *Komagataella* sp. cultivada empleando glucosa o metanol como fuerte de carbono, el cultivo sobre metanol da lugar a una mayor lisis celular, lo que repercute en la liberación al medio de proteínas intracelulares. Este hecho es desfavorable, puesto que contamina las muestras de cara a la identificación de proteínas y compromete la estabilidad, dado que algunas de dichas proteínas son proteasas intracelulares (Jahic *et al.*, 2003; Mattanovich *et al.*, 2009). Atendiendo a todos estos hechos, parece más aconsejable el uso de los sistemas de expresión basados en el empleo de promotores como  $P_{GAP}$  como plataforma biotecnológica.

En el presente trabajo se consiguió la producción de PrFaeB recombinante en *K. phaffii* GS115. Publicaciones previas han indicado que la mayor dificultad a la hora del empleo de esta plataforma de expresión es conseguir expresar una proteína en cualquier cantidad. Una vez se ha conseguido la expresión del producto de interés, es posible optimizar las condiciones para mejorar los niveles de recuperación de la proteína recombinante (Cregg *et al.*, 2000). Existen múltiples estrategias mediante las cuales sería posible mejorar la expresión heteróloga de PrFaeB, como la optimización del uso de codones, el empleo de otros promotores (Mellitzer *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2016), la modificación de la señal de secreción (Lin-Cereghino *et al.*, 2013), la coexpresión de genes implicados en el procesamiento de proteínas extracelulares (Yu *et al.*, 2017) y la optimización de los cultivos (Cos *et al.*, 2006; Looser *et al.*, 2014).

La fuente de carbono con la que se detectaron mayores niveles de actividad FAE tras la producción de la proteína PrFaeB recombinante empleando el promotor  $P_{GAP}$  fue la glucosa, lo que coincide con estudios previos donde estuvo por delante de otras menos favorables, como el

glicerol, el ácido oleico o el metanol (Daly y Hearn, 2005). La mayor parte de los trabajos publicados en el campo de la producción de proteínas recombinantes se basan en el empleo de medios complejos, tanto durante el crecimiento como durante la inducción de la expresión proteica (Macauley-Patrick *et al.*, 2005). Desde el punto de vista de la optimización del proceso productivo, sería preferible emplear medios definidos, puesto que la incorporación de sustancias complejas de composición variable introduce diferencias entre lotes. Por esta razón, en el presente trabajo se analizó la expresión a partir de diversos medios definidos. No obstante, el medio que demostró ser más adecuado para la producción proteica fue el medio complejo YPDm.

Los diferentes transformantes de *K. phaffii* GS115 capaces de producir PrFaeB recombinante dieron lugar a distintos valores de actividad FAE. La variación entre clones en cuanto a la producción recombinante de proteínas recombinantes mediante *K. phaffii* es un hecho previamente reseñado en la literatura (Gong *et al.*, 2013).

La purificación de la PrFaeB recombinante por IMAC basada en el empleo de colas de 6xHis demostró una efectividad limitada. En este sentido, se deben considerar otras alternativas para mejorar la purificación, como sería el uso de epítomos alternativos, como colas Strep (Young *et al.*, 2012), o bien técnicas de purificación clásicas, basadas en intercambio catiónico/aniónico, exclusión molecular o interacciones hidrofóbicas, (Juge *et al.*, 2001; Crepin *et al.*, 2003b; Crepin *et al.*, 2003a; Sakamoto *et al.*, 2005; Fazary y Ju, 2008a; Koseki *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2014; Nieter *et al.*, 2014; Yin *et al.*, 2015b; Zhang *et al.*, 2015; Kelle *et al.*, 2016).

#### 4.2.1. FAEs de *P. rubens* Wisconsin 54-1255

Uno de los objetivos del presente trabajo fue la expresión heteróloga en *K. phaffii* de genes que codifican para FAEs de *P. rubens* Wisconsin 54-1255, en concreto los genes *faeA* (que codifica para PrFaeA) y *faeB* (que codifica para PrFaeB). Dichos genes ya habían sido objeto de estudio en un trabajo de Tesis Doctoral llevado a cabo anteriormente en el grupo de investigación (Rodríguez-Castro, 2017). Tanto PrFaeA como PrFaeB presentan el pentapéptido GX SXG, cuyo residuo de serina pertenece a la tríada catalítica Ser-His-Asp, descrita en esterasas y serina proteasas, así como en otras FAEs fúngicas (Crepin *et al.*, 2003b; Hermoso *et al.*, 2004; Wong, 2006; Fazary y Ju, 2007; Fazary *et al.*, 2010; Udatha *et al.*, 2011; Udatha *et al.*, 2012; Chen *et al.*,

2012; Zeng *et al.*, 2014; Watanabe *et al.*, 2015; Dilokpimol *et al.*, 2016), incluyendo FAEs producidas por especies del género *Penicillium* spp. (Kroon *et al.*, 2000; Oleas *et al.*, 2017).

En el presente trabajo, debido a la complejidad del proceso de transformación e inducción de la expresión heteróloga, únicamente fue posible llevar a cabo la expresión del gen *faeB* que codifica para la proteína PrFaeB. PrFaeB es una proteína de 527 aminoácidos, cuyos primeros 19 corresponden a un péptido señal para su secreción extracelular (Rodríguez-Castro, 2017).

De acuerdo a la clasificación filogenética en 13 subfamilias propuesta por Dilokpimol y colaboradores, la enzima PrFaeB pertenece a la subfamilia SF1, en la que se engloban FAEs estrechamente relacionadas con tanasas (Dilokpimol *et al.*, 2016). Las tanasas, al igual que las FAEs, constituyen un grupo enzimático de hidrolasas que catalizan la ruptura de los enlaces éster de distintas moléculas, como taninos complejos y ésteres del ácido gálico (Beniwal *et al.*, 2013).

Por otro lado, de acuerdo a la clasificación funcional clásica en las cuatro categorías ABCD, los resultados del presente trabajo indicaron la pertenencia de PrFaeB a la categoría B (Crepin *et al.*, 2004a), puesto que se observó una mayor especificidad y eficiencia catalítica frente a los sustratos sintéticos MCA y MpCA (que presentan sustituyentes hidroxilo), que frente a MFA (que presenta grupos metoxilo). Además, no se observó actividad catalítica frente a MSA (Gopalan *et al.*, 2015; Dilokpimol *et al.*, 2016). La producción de esta enzima por parte de *P. rubens* se vio favorecida al emplear como sustrato inductor la pulpa de remolacha, lo que también es característico de las FAEs adscritas a la categoría B. Además, la comparación de la secuencia aminoacídica de PrFaeB con bases de datos devolvió altos porcentajes de identidad con varias FAEs de tipo B de especies del género *Aspergillus* spp. (Rodríguez-Castro, 2017).

La actividad FAE de cepas filogenéticamente próximas a *P. rubens* Wisconsin 54-1255 se ha constatado de forma práctica en un estudio que identificó dicha actividad en *P. chrysogenum* 31B, una cepa aislada a partir de pulpa de remolacha en descomposición (Sakamoto *et al.*, 2005).

La producción heteróloga de PrFaeB permitió llevar a cabo su caracterización. El peso molecular calculado experimentalmente fue de 59,8 kDa, que se encuentra en el rango de la mayoría de las FAEs fúngicas caracterizadas (30-70 kDa, si bien se han descrito FAEs con pesos moleculares de 11 y 210 kDa) (Koseki *et al.*, 2009a; Wang *et al.*, 2016b). En el presente trabajo, se visualizaron bandas de diferentes pesos moleculares a partir de las cuales se identificó la proteína PrFaeB, lo que fue compatible con la presencia de modificaciones postraduccionales. En

este sentido, se ha descrito en publicaciones previas que la existencia de distintos patrones de glicosilación de una proteína puede afectar a su movilidad electroforética (Quiza *et al.*, 1997; Nielsen *et al.*, 2004; Unal *et al.*, 2008; Löster y Kannicht, 2008). En el caso concreto de FAEs expresadas de forma heteróloga en cepas de *Komagataella* spp., también se han reseñado diferencias en cuanto a la movilidad electroforética en función del grado de glicosilación (Shin y Chen, 2007; Koseki *et al.*, 2009b; Gong *et al.*, 2013; Zeng *et al.*, 2014; Mizuno *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2015; Oleas *et al.*, 2017). La glicosilación presenta diferencias entre hongos filamentosos y levaduras, lo que puede explicar diferencias en cuanto a peso molecular aparente, actividad enzimática o estabilidad térmica (Deshpande *et al.*, 2008).

El análisis del secretoma parcial del transformante C7 de *K. phaffii* GS115 mediante electroforesis bidimensional permitió detectar y someter a identificación un total de 27 puntos proteicos, obteniéndose 29 identificaciones, dos de las cuales se correspondieron con FAEs de *P. rubens*. El reducido número de proteínas extracelulares detectadas coincide con los hallazgos de un estudio del secretoma de la especie tipo *K. pastoris* CBS704, donde únicamente se detectaron 28 proteínas extracelulares (Mattanovich *et al.*, 2009). El reducido número de proteínas en el secretoma de *Komagataella* spp. constituye una de sus ventajas como sistema de expresión heteróloga de enzimas extracelulares.

Los valores óptimos de actividad de PrFaeB determinados en el presente trabajo fueron pH 4,5 y 40 °C de temperatura. Las FAEs fúngicas que se han caracterizado y descrito en la literatura presentan óptimos de pH entre 3,0 y 10,0 y óptimos de temperatura entre 20 y 75 °C (Topakas *et al.*, 2007; Koseki *et al.*, 2009a; Dilokpimol *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016b). Dentro de dichos rangos, la mayoría de FAEs demostraron óptimos a pH 4,0-7,0 y temperaturas inferiores a 50-55 °C. En cuanto a FAEs producidas por cepas de *Penicillium* spp., se han descrito óptimos de pH 6-7 y 50 °C (Sakamoto *et al.*, 2005), pH 5,6 y 37 °C (Donaghy y McKay, 1997), pH 6,0 y 55 °C (Castanares *et al.*, 1992), pH 6,0 y 50 °C (Panagiotou *et al.*, 2007) y pH 8,0 y 38 °C (Oleas *et al.*, 2016), por lo que el valor óptimo de pH de PrFaeB fue ligeramente inferior.

En el presente trabajo se detectó una estabilidad térmica limitada en la enzima PrFaeB recombinante. Diversos estudios han intentado mejorar la estabilidad térmica de FAEs producidas por organismos como *A. usamii* y *A. niger*, por medio de técnicas de ingeniería genética y evolución enzimática (Zhang y Wu, 2011; Zhang *et al.*, 2012a; Yin *et al.*, 2015b). En el caso de la enzima

PrFaeB recombinante, una estrategia para mejorar la estabilidad térmica podría ser el control de la glicosilación. La glicosilación de enzimas en las regiones que conectan el dominio catalítico y el dominio de unión a carbohidratos aporta protección frente a proteasas y puede facilitar la unión de los polímeros de la pared vegetal al dominio de unión a carbohidratos (Lambertz *et al.*, 2014). Se ha demostrado que la glicosilación contribuye a la estabilidad térmica de FAEs, como es el caso de AnFaeA (Benoit *et al.*, 2006a), por lo que la evolución enzimática y el control de la glicosilación puede contribuir a mejorar la estabilidad térmica de PrFaeB recombinante.

En cuanto a los ensayos de cinética enzimática, debido a la limitada estabilidad de las muestras de PrFaeB purificada, se llevaron a cabo empleando extractos que contenían otras proteínas endógenas secretadas por *K. phaffii* GS115. Dado que la concentración relativa de PrFaeB en dichas muestras fue conocida y no estuvo presente ninguna otra enzima con actividad FAE, el principal inconveniente del empleo de este tipo de muestras no purificadas fue la posible presencia de activadores o inhibidores. Se contempla evaluar la presencia de este tipo de efectores en ensayos futuros, mediante la comparación de los parámetros de cinética enzimática obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral y los de muestras purificadas.

El mantenimiento de la actividad FAE en presencia de cationes metálicos y a pH ácido (pH 4,0-5,0), apuntan a una posible aplicación comercial de la enzima PrFaeB recombinante como suplemento para alimentación animal (Wang *et al.*, 2016b). Para ello, sería necesario llevar a cabo futuros ensayos para determinar la estabilidad de la enzima a valores de pH bajo.

Por último, el análisis metabolómico de muestras procedentes de fermentaciones de *P. rubens* Wisconsin 54-1255 indicó la probable presencia de sustancias bioactivas en los extractos enzimáticos recuperados a partir de cultivos de dicho hongo, como es el caso de los antibióticos penicilina G y penicilina V. Por ello, la expresión de las FAEs producidas por este ascomiceto en plataformas de expresión heteróloga como *K. phaffii* puede ser beneficiosa. Preparados obtenidos a partir de esta levadura han obtenido la consideración de GRAS y se han aprobado para su comercialización, de forma que más de 500 compuestos farmacéuticos y proteínas recombinantes están siendo producidos en esta especie, incluidas proteínas aplicadas al sector de la alimentación (Ramchuran *et al.*, 2005; Ciofalo *et al.*, 2006; Bourdichon *et al.*, 2012; Vogl *et al.*, 2013; Spohner *et al.*, 2015).

### 4.3. FAEs fúngicas como recurso para la Biotecnología Blanca

---

De los 247 genomas fúngicos publicados hacia principios del año 2015, 155 contuvieron genes codificantes para posibles FAEs. Además, en un 25 % de los casos se hallaron más de 10 posibles ORFs de FAEs por genoma (Dilokpimol *et al.*, 2016). Esta elevada prevalencia de FAEs apunta a los organismos pertenecientes al reino Fungi, sobre todo ascomicetos y basidiomicetos, como candidatos prometedores para la búsqueda y caracterización de nuevas FAEs. Gracias al descubrimiento de nuevas FAEs y la mejora de las ya conocidas, será posible disponer de un mayor abanico de enzimas a disposición de las industrias basadas en procesos de hidrólisis de las paredes celulares vegetales. La Biotecnología Blanca desempeñará un papel fundamental en el desarrollo de tecnologías más sostenibles, en el marco de la Bioeconomía Circular, que cada vez cobra más importancia como modelo productivo para el futuro (Mohanram *et al.*, 2013; Venkata Mohan *et al.*, 2016; Winans *et al.*, 2017; Dupont-Inglis y Borg, 2018; Zuin y Ramin, 2018; Lainez *et al.*, 2018).

De acuerdo a los resultados de la presente Tesis Doctoral, la existencia de actividad FAE en aislados ambientales, así como en cepas biotecnológicas clásicas seleccionadas para la producción de otros metabolitos, remarca el interés de los organismos pertenecientes al reino Fungi como factorías de enzimas lignocelulolíticas.







Un erudito se sienta en su biblioteca, leyendo junto a globos, por Denon y Longhi (1784). Wellcome Collection CC BY

## CONCLUSIONES



---

## Conclusiones

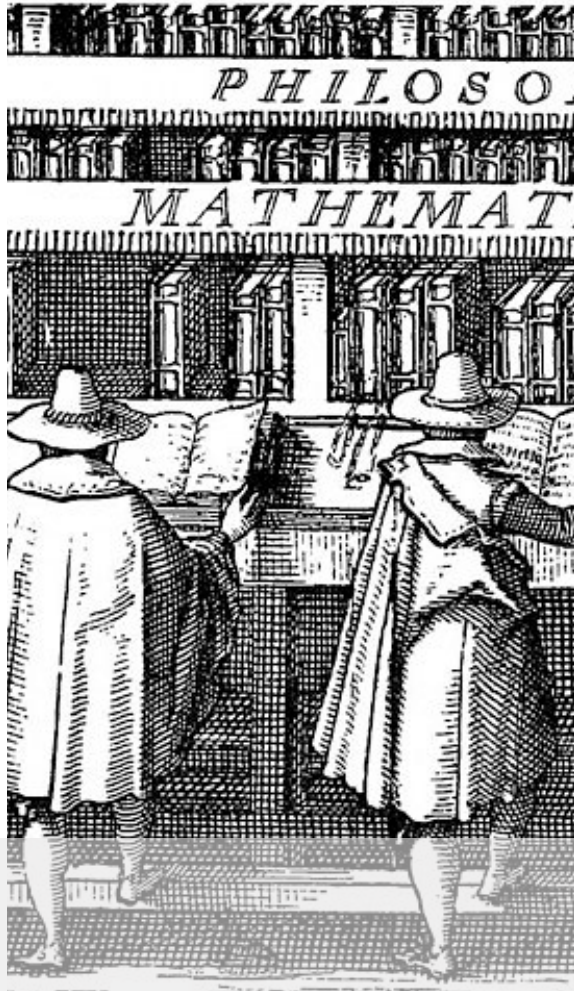
---

1. Los ecosistemas pobres en biomasa vegetal son un nicho ecológico adecuado para la búsqueda de nuevas FAEs fúngicas, como demuestra el aislamiento de siete cepas de ascomicetos con actividad FAE a partir de muestras ambientales de superficies metálicas y plásticas.
2. Los sustratos lignocelulósicos fibra de avena de molienda y pulpa de remolacha inducen de forma efectiva la expresión y secreción de enzimas lignocelulolíticas en hongos ascomicetos, incluyendo FAEs, celulasas y hemicelulasas.
3. El aislado ambiental *A. alternata* PDA1 es un candidato prometedor como productor de enzimas lignocelulolíticas, capaz de dar lugar a un extracto enzimático con actividades celulasa, xilanolítica y FAE. En dicho extracto, destaca sobre todo la actividad  $\beta$ -glucosidasa, que es similar o superior a la de preparados comerciales descritos en la literatura.
4. El extracto enzimático obtenido a partir de *A. alternata* PDA1 es capaz de liberar ácido ferúlico y azúcares sencillos a partir de la pulpa de remolacha, por lo que se trata de una alternativa para el aprovechamiento de dicho subproducto agroindustrial.
5. Se ha desarrollado un método de detección rápida de actividad FAE en cepas de levaduras modificadas que expresan FAEs de forma constitutiva. Dicho método posibilita la detección de transformantes positivos en 5 h y además puede ser adaptado a otras hidrolasas que den lugar a la liberación de productos con carácter ácido.
6. La enzima PrFaeB de *P. rubens* Wisconsin 54-1255 ha sido sintetizada y caracterizada en *K. phaffii* GS115, presentando un peso molecular aparente de 59,8 kDa, un pI de 5,4-5,6, óptimos de actividad FAE a pH 4,5 y 40 °C y mayor afinidad frente a sustratos sintéticos con sustituyentes hidroxilo (MCA y MpCA), lo que la sitúa en la categoría B de la clasificación funcional de las FAEs propuesta por Crepin y colaboradores.
7. La estabilidad de la enzima PrFaeB frente a cationes metálicos y su actividad a valores de pH ácidos (pH 4,0-5,0) apuntan a esta FAE como un posible suplemento en alimentación animal.

## Conclusions

---

1. Plant biomass-poor ecosystems are promising ecological niches for the discovery of novel fungal FAEs, as shown by the isolation of seven ascomycete strains displaying FAE activity from environmental samples collected from metal and plastic surfaces.
2. Processed lignocellulosic substrates from milling oat fiber and sugar beet pulp effectively induce the expression and secretion of lignocellulolytic enzymes in ascomycetes, including FAEs, cellulases and hemicellulases.
3. The environmental strain *A. alternata* PDA1 is a promising lignocellulolytic enzyme producer that secretes an array of enzymes containing cellulase, xylanolytic and FAE activities. The most interesting activity was  $\beta$ -glucosidase, whose values equaled or surpassed those of commercial enzyme mixtures described in previous works.
4. The enzyme extract obtained from *A. alternata* PDA1 catalyzes the release of ferulic acid and simple sugars from sugar beet pulp, which presents *A. alternata* PDA1 as an alternative enzymatic source to obtain added value compounds from this agro-industrial byproduct.
5. A rapid assay for FAE activity screening in FAE overexpressing yeast transformants has been developed. This method allows the detection of positive transformants in 5 h and it can be adapted in order to screen other hydrolases that release acidic products.
6. The PrFaeB enzyme from *P. rubens* Wisconsin 54-1255 has been produced and characterized in *K. phaffii* GS115, showing an apparent molecular weight of 59.8 kDa, pI of 5.4-5.6, pH optimum at pH 4.5, temperature optimum at 40 °C and a higher affinity towards hydroxylated synthetic substrates (MCA and MpCA), which places this FAE in the B category according to the functional classification proposed by Crepin and coworkers.
7. The stability of PrFaeB in the presence of metal ions and its activity values at acidic pH (pH 4.0-5.0) points to this FAE as a promising feed supplement.



Estanterías en la biblioteca de la Universidad de Leiden, por W. Swanenburgh y J. Woudanus (1610)

## BIBLIOGRAFÍA



## A

- Aarabi A, Mizani M, Honarvar M, Faghihian H y Gerami A. (2016). Extraction of ferulic acid from sugar beet pulp by alkaline hydrolysis and organic solvent methods. *J. Food Meas. Charact.* 10(1): 42-47.
- Abdul Manan M y Webb C. (2018). Estimating fungal growth in submerged fermentation in the presence of solid particles based on colour development. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 32(3): 618-627.
- Abdulrachman D, Thongkred P, Kocharin K, Nakpathom M, Somboon B, Narumol N, Champreda V, Eurwilaichitr L, Suwanto A, Nimchua T y Chantasingh D. (2017). Heterologous expression of *Aspergillus aculeatus* endo-polygalacturonase in *Pichia pastoris* by high cell density fermentation and its application in textile scouring. *BMC Biotechnol.* 17(1): 15.
- Agrawal GK, Jwa N-S, Lebrun M-H, Job D y Rakwal R. (2010). Plant secretome: unlocking secrets of the secreted proteins. *Proteomics* 10(4): 799-827.
- Ahmad M, Hirz M, Pichler H y Schwab H. (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98(12): 5301-5317.
- Ahmed S, Riaz S y Jamil A. (2009). Molecular cloning of fungal xylanases: an overview. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84(1): 19-35.
- Ajdari Z, Ebrahimpour A, Abdul Manan M, Hamid M, Mohamad R y Ariff AB. (2011). Nutritional requirements for the improvement of growth and sporulation of several strains of *Monascus purpureus* on solid state cultivation. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011: ID 487329 1-9.
- Akoh CC, Lee G-C, Liaw Y-C, Huang T-H y Shaw J-F. (2004). GDSL family of serine esterases/lipases. *Prog. Lipid Res.* 43: 534-552.
- Alam MA, Subhan N, Hossain H, Hossain M, Reza HM, Rahman MM y Ullah MO. (2016). Hydroxycinnamic acid derivatives: a potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. *Nutr. Metab.* 13(1): 1-13.
- Alcazar-Fuoli L y Mellado E. (2013). Ergosterol biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: its relevance as an antifungal target and role in antifungal drug resistance. *Front. Microbiol.* 3: 439.
- Altschul SF, Boguski MS, Gish W y Wootton JC. (1994). Issues in searching molecular sequence databases. *Nat. Genet.* 6(2): 119-129.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW y Lipman DJ. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Álvarez C, Reyes-Sosa FM y Díez B. (2016). Enzymatic hydrolysis of biomass from wood. *Microb. Biotechnol.* 9(2): 149-156.
- Amore A, Giacobbe S y Faraco V. (2013). Regulation of cellulase and hemicellulase gene expression in fungi. *Curr. Genomics* 14: 230-249.
- de Amorim Araújo J, Ferreira TC, Rubini MR, Duran AGG, De Marco JL, de Moraes LMP y Torres FAG. (2015). Coexpression of cellulases in *Pichia pastoris* as a self-processing protein fusion. *AMB Express* 5(1): 84.
- Andersen A, Svendsen A, Vind J, Lassen S., Hjort C, Borch K y Patkar S. (2002). Studies on ferulic acid esterase activity in fungal lipases and cutinases. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 26(1-2): 47-55.
- Andersen B, Frisvad JC, Søndergaard I, Rasmussen IS y Larsen LS. (2011). Associations between fungal species and water-damaged building materials. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(12): 4180-4188.
- Andrew M, Peever TL y Pryor BM. (2009). An expanded multilocus phylogeny does not resolve morphological species within the small-spored *Alternaria* species complex. *Mycologia* 101(1): 95-109.
- Anné J. (1977). Somatic hybridization between *Penicillium chrysogenum* species after induced fusion of their protoplasts. *Agricultura* 25: 1-17.
- Ano Y, Ozawa M, Kutsukake T, Sugiyama S, Uchida K, Yoshida A y Nakayama H. (2015). Preventive effects of a fermented dairy product against Alzheimer's disease and identification of a novel oleamide with enhanced microglial phagocytosis and anti-inflammatory activity. *PLoS One* 10(3): e0118512.
- Archer DB. (2000). Filamentous fungi as

- microbial cell factories for food use. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11(5): 478-483.
- Arfi Y, Chevret D, Henrissat B, Berrin J-G, Levasseur A y Record E. (2013). Characterization of salt-adapted secreted lignocellulolytic enzymes from the mangrove fungus *Pestalotiopsis* sp. *Nat. Commun.* 4: 1810.
- Aslam S, Tahir A, Aslam MF, Alam MW, Shedayi AA y Sadia S. (2017). Recent advances in molecular techniques for the identification of phytopathogenic fungi – a mini review. *J. Plant Interact.* 12(1): 493-504.
- Ašler IL, Ivić N, Kovačić F, Schell S, Knorr J, Krauss U, Wilhelm S, Kojić-Prodić B y Jaeger KE. (2010). Probing enzyme promiscuity of SGNH hydrolases. *ChemBioChem* 11: 2158-2167.
- Aurilia V, Parracino A y D'Auria S. (2008). Microbial carbohydrate esterases in cold adapted environments. *Gene* 410(2): 234-240.
- ## B
- Back A, Rossignol T, Krier F, Nicaud J-M y Dhulster P. (2016). High-throughput fermentation screening for the yeast *Yarrowia lipolytica* with real-time monitoring of biomass and lipid production. *Microb. Cell Fact.* 15(1): 147.
- Banerjee G, Car S, Scott-Craig JS, Borrusch MS, Aslam N y Walton JD. (2010). Synthetic enzyme mixtures for biomass deconstruction: production and optimization of a core set. *Biotech* 106(5): 707-720.
- Barbier EB. (2012). The green economy post Rio+20. *Science* (80-. ). 338(6109): 887-888.
- Barceló Coll J, Nicolás Rodrigo G, Sabater García B y Sánchez Tamés R. (1987). *Fisiología Vegetal*. 4.ª ed. Madrid, España: Pirámide.
- Barreiro C, García-Estrada C y Martín JF. (2012a). Proteomics methodology applied to the analysis of filamentous fungi - New trends for an impressive diverse group of organisms. En: Prasain, J. K. (ed.) *Tandem Mass Spectrom. - Appl. Princ.* Rijeka, Croacia: InTech, 159-171.
- Barreiro C, Martín JF y García-Estrada C. (2012b). Proteomics shows new faces for the old penicillin producer *Penicillium chrysogenum*. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012: ID 105109, 1-15.
- Barriuso J, Prieto A y Martínez M. (2013). Fungal genomes mining to discover novel sterol esterases and lipases as catalysts. *BMC Genomics* 14(1): 712.
- Batista-García RA, Balcázar-López E, Miranda-Miranda E, Sánchez-Reyes A, Cuervo-Soto L, Aceves-Zamudio D, Atriztán-Hernández K, Morales-Herrera C, Rodríguez-Hernández R y Folch-Mallol J. (2014). Characterization of lignocellulolytic activities from a moderate halophile strain of *Aspergillus caesiellus* isolated from a sugarcane bagasse fermentation. *PLoS One* 9(8): e105893.
- Batista-García RA, Sutton T, Jackson SA, Tovar-Herrera OE, Balcázar-López E, Sánchez-Carbente MDR, Sánchez-Reyes A, Dobson ADW y Folch-Mallol JL. (2017). Characterization of lignocellulolytic activities from fungi isolated from the deep-sea sponge *Stelletta normani*. *PLoS One* 12(3): e0173750.
- Beloshapka A, Buff P, Fahey G y Swanson K. (2016). Compositional analysis of whole grains, processed grains, grain co-products, and other carbohydrate sources with applicability to pet animal nutrition. *Foods* 5: 23.
- Bendtsen JD, Jensen LJ, Blom N, von Heijne G y Brunak S. (2004). Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Eng. Des. Sel.* 17(4): 349-356.
- Beniwal V, Kumar A, Sharma J y Chhokar V. (2013). Recent advances in industrial application of tannases: A review. *Recent Pat. Biotechnol.* 7(3): 228-233.
- Benocci T, Aguilar-Pontes MV, Zhou M, Seiboth B y De Vries RP. (2017). Regulators of plant biomass degradation in ascomycetous fungi. *Biotechnol. Biofuels* 10(1): 1-25.
- Benoit I, Asther M, Sulzenbacher G, Record E, Marmuse L, Parsieglia G, Gimbert I, Asther M y Bignon C. (2006a). Respective importance of protein folding and glycosylation in the thermal stability of recombinant feruloyl esterase A. *FEBS Lett.* 580(25): 5815-5821.
- Benoit I, Coutard B, Oubelaid R, Asther M y Bignon C. (2007). Expression in *Escherichia coli*, refolding and crystallization of *Aspergillus niger* feruloyl esterase A using a serial factorial approach. *Protein Expr. Purif.* 55(1): 166-174.



- Benoit I, Danchin EGJ, Bleichrodt RJ y De Vries RP. (2008). Biotechnological applications and potential of fungal feruloyl esterases based on prevalence, classification and biochemical diversity. *Biotechnol. Lett.* 30(3): 387-396.
- Benoit I, Navarro D, Marnet N, Rakotomanana N, Lesage-Meessen L, Sigoillot J-C, Asther M y Asther M. (2006b). Feruloyl esterases as a tool for the release of phenolic compounds from agro-industrial by-products. *Carbohydr. Res.* 341(11): 1820-1827.
- van den Berg MA, Albang R, Albermann K, Badger JH, Daran J-M, M Driessen AJ, Garcia-Estrada C, Fedorova ND, Harris DM, Heijne WHM, Joardar V, W Kiel JAK, Kovalchuk A, Martín JF, Nierman WC, *et al.* (2008). Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. *Nat. Biotechnol.* 26(10): 1161-1168.
- Berrin J-G, Williamson G, Puigserver A, Chaix J-C, McLauchlan WR y Juge N. (2000). High-level production of recombinant fungal endo- $\beta$ -1,4-xylanase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 19(1): 179-187.
- Berto P, Comménil P, Belingheri L y Dehorter B. (1999). Occurrence of a lipase in spores of *Alternaria brassicicola* with a crucial role in the infection of cauliflower leaves. *FEMS Microbiol. Lett.* 180(2): 183-189.
- Bhatnagar D, Yu J y Ehrlich KC. (2002). Toxins of filamentous fungi. *Chem. Immunol.* 81: 167-206.
- Bilal M, Asgher M, Iqbal HMN, Hu H y Zhang X. (2017). Biotransformation of lignocellulosic materials into value-added products—A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 98: 447-458.
- Birnboim HC y Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7(6): 1513-1523.
- Blackwell M. (2011). The fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? *Am. J. Bot.* 98(3): 426-438.
- Blackwell M. (2017). Made for each other: Ascomycete yeasts and insects. *Microbiol. Spectr.* 5(3): 1-18.
- Blum DL, Schubot FD, Ljungdahl LG, Rose JP y Wang B-C. (2000). Crystallization and preliminary X-ray analysis of the *Clostridium thermocellum* cellosome xylanase Z feruloyl esterase domain. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 56: 1027-1029.
- Bogs J y Geider K. (2000). Molecular analysis of sucrose metabolism of *Erwinia amylovora* and influence on bacterial virulence. *J. Bacteriol.* 182(19): 5351-5358.
- Bollok M, Resina D, Valero F y Ferrer P. (2009). Recent patents on the *Pichia pastoris* expression system: expanding the toolbox for recombinant protein production. *Recent Pat. Biotechnol.* 3(3): 192-201.
- Bonawitz ND y Chapple C. (2010). The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype. *Annu. Rev. Genet.* 44(1): 337-363.
- Bonnin E, Grangé H, Lesage-Meessen L, Asther M y Thibault JF. (2000). Enzymic release of cellobiose from sugar beet pulp, and its use to favour vanillin production in *Pycnoporus cinnabarinus* from vanillic acid. *Carbohydr. Polym.* 41(2): 143-151.
- Bonnin E, Saulnier L, Brunel M, Marot C, Lesage-Meessen L, Asther M y Thibault J-F. (2002). Release of ferulic acid from agroindustrial by-products by the cell wall-degrading enzymes produced by *Aspergillus niger* I-1472. *Enzyme Microb. Technol.* 31(7): 1000-1005.
- Boratyn GM, Camacho C, Cooper PS, Coulouris G, Fong A, Ma N, Madden TL, Matten WT, McGinnis SD, Merezhuk Y, Raytselis Y, Sayers EW, Tao T, Ye J y Zaretskaya I. (2013). BLAST: a more efficient report with usability improvements. *Nucleic Acids Res.* 41: W29-W33.
- Borneman WS, Ljungdahl LG, Hartley RD y Akin DE. (1991). Purification and partial characterization of p-coumaroyl esterase from the anaerobic fungus *Neocallimastix* strain MC-2. *Appl. Environm. Microbiol.* 58(11): 2337-2344.
- Boruta T. (2018). Uncovering the repertoire of fungal secondary metabolites: From Fleming's laboratory to the International Space Station. *Bioengineered* 9(1): 12-16.
- Bottalico A y Logrieco A. (1998). Toxigenic *Alternaria* species of economic importance. En: Sinha, K. y Bhatnagar, D. (eds.) *Mycotoxins Agric.*

- Food Saf.* Nueva York, EEUU: Marcel Dekker. Inc, 65-108.
- Bourdichon F, Casaregola S, Farrokh C, Frisvad JC, Gerds ML, Hammes WP, Harnett J, Huys G, Laulund S, Ouwehand A, Powell IB, Prajapati JB, Seto Y, Ter E, Boven A Van, *et al.* (2012). Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *Int. J. Food Microbiol.* 154(3): 87-97.
- Boz H. (2016). Ferulic acid in cereals- a review. *Czech J. Food Sci.* 33(1): 1-7.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72(1-2): 248-254.
- Bradner JR, Sidhu RK, Gillings M y Nevalainen KMH. (1999). Hemicellulase activity of antarctic microfungi. *J. Appl. Microbiol.* 87: 366-370.
- Braga CMP, Delabona P da S, Lima DJ da S, Paixão DAA, Pradella JG da C y Farinas CS. (2014). Addition of feruloyl esterase and xylanase produced on-site improves sugarcane bagasse hydrolysis. *Bioresour. Technol.* 170: 316-324.
- Breuer M, Hauer B, Schwaneberg U y Wong TS. (2015). Mutants of a *Pseudomonas glumae* butynol esterase (patente US9187737B2). EEUU.
- Brézillon C, Kroon P, Faulds C, Brett GM y Williamson G. (1996). Novel ferulic acid esterases are induced by growth of *Aspergillus niger* on sugar-beet pulp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45(3): 371-376.
- van den Brink J y de Vries RP. (2011). Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91(6): 1477-1492.
- Bujalance C, Jiménez-Valera M, Moreno E y Ruiz-Bravo A. (2006). A selective differential medium for *Lactobacillus plantarum*. *J. Microbiol. Methods* 66(3): 572-575.
- Bullock WO, Fernandez JM y Short JM. (1987). XL1-Blue—a high-efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with  $\beta$ -galactosidase selection. *Biotechniques* 5(3): 376-379.
- Burgess RR. (2009). Protein precipitation techniques. En: Burgess, R. R. y Deutscher, M. P. (eds.) *Methods Enzymol. Guid. to Protein Purif.* 2.<sup>a</sup> ed. Elsevier Inc., 331-342.
- Burke F. (2008). Scale up and scale down of fermentation processes. En: McNeil, B. y Harvey, L. M. (eds.) *Pract. Ferment. Technol.* Chichester, Reino Unido: John Wiley & Sons, Ltd, 231-269.
- Burton RA y Fincher GB. (2012). Current challenges in cell wall biology in the cereals and grasses. *Front. Plant Sci.* 3: 130.
- Burton RA y Fincher GB. (2014). Evolution and development of cell walls in cereal grains. *Front. Plant Sci.* 5: 456.
- Burtseva YV, Verigina NS, Sova VV, Pivkin MV y Zvyagintseva TN. (2003). Filamentous marine fungi as producers of O-glycosylhydrolases:  $\beta$ -1,3-glucanase from *Chaetomium indicum*. *Mar. Biotechnol.* 5(4): 349-359.
- Byrne LJ, O'Callaghan KJ y Tuite MF. (2005). Heterologous gene expression in yeast. En: Smales, C. M. y James, D. C. (eds.) *Methods Mol. Biol. Ther. Proteins Methods Protoc.* Totowa, NJ, EEUU: Humana Press, 51-64.

---

## C

- Cabañes FJ, Bragulat MR y Castellá G. (2010). Ochratoxin A producing species in the genus *Penicillium*. *Toxins (Basel)*. 2: 1111-1120.
- Caffall KH y Mohnen D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydr. Res.* 344(14): 1879-1900.
- Çalık P, Ata Ö, Güneş H, Massahi A, Boy E, Keskin A, Öztürk S, Zerze GH y Özdamar TH. (2015). Recombinant protein production in *Pichia pastoris* under glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter: from carbon source metabolism to bioreactor operation parameters. *Biochem. Eng. J.* 95: 20-36.
- Calmels T, Parriche M, Durand H y Tiraby G. (1991). High efficiency transformation of *Tolypocladium geodes* conidiospores to phleomycin resistance. *Curr. Genet.* 20(4): 309-314.
- Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L y Righetti PG. (2004). Blue silver: A very

- sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25(9): 1327-1333.
- Cao A, Reid LM, Butrón A, Malvar RA, Souto XC y Santiago R. (2011). Role of hydroxycinnamic acids in the infection of maize silks by *Fusarium graminearum* Schwabe. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24(9): 1020-1026.
- Cao L, Chen R, Xie W y Liu Y. (2015). Enhancing the thermostability of feruloyl esterase EstF27 by directed evolution and the underlying structural basis. *J. Agric. Food Chem.* 63(37): 8225-8233.
- Carnachan SM y Harris PJ. (2000). Ferulic acid is bound to the primary cell walls of all gymnosperm families. *Biochem. Syst. Ecol.* 28(9): 865-879.
- Carruthers NJ, Parker GC, Gratsch T, Caruso JA y Stemmer PM. (2015). Protein mobility shifts contribute to gel electrophoresis liquid chromatography analysis. *J. Biomol. Tech.* 26: 103-112.
- Casqueiro J, Bañuelos O, Gutiérrez S, Hijarrubia MJ y Martín JF. (1999). Intrachromosomal recombination between direct repeats in *Penicillium chrysogenum*: gene conversion and deletion events. *Mol. Gen. Genet. MGG* 261(6): 994-1000.
- Cassab GI. (1998). Plant cell wall proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49(1): 281-309.
- Cassago A, Panepucci R, Baião A y Henrique-Silva F. (2002). Cellophane based mini-prep method for DNA extraction from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *BMC Microbiol.* 2(1): 14.
- Castanares A, McCrae SI y Wood TM. (1992). Purification and properties of a feruloyl/p-coumaroyl esterase from the fungus *Penicillium pinophilum*. *Enzyme Microb. Technol.* 14(11): 875-884.
- Cereghino JL y Cregg JM. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* 24: 45-66.
- Chandrasekaran M, Chandrasekar R, Chun S-C y Sathiyabama M. (2016). Isolation, characterization and molecular three-dimensional structural predictions of metalloprotease from a phytopathogenic fungus, *Alternaria solani* (Ell. and Mart.) Sor. *J. Biosci. Bioeng.* 122(2): 131-139.
- Chandrasekaran M y Sathiyabama M. (2013). Production, partial purification and characterization of protease from a phytopathogenic fungi *Alternaria solani* (Ell. and Mart.) Sorauer. *J. Basic Microbiol.* 54(8): 763-774.
- Chávez-Servín JL, Castellote AI y López-Sabater MC. (2004). Analysis of mono- and disaccharides in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. *J. Chromatogr. A* 1043(2): 211-215.
- Chávez R, Bull P y Eyzaguirre J. (2006). The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. *J. Biotechnol.* 123(4): 413-433.
- Chen S, Su L, Chen J y Wu J. (2013). Cutinase: characteristics, preparation, and application. *Biotechnol. Adv.* 31(8): 1754-1767.
- Chen S, Wang K, Liu Y y Hu X. (2012). Crystallization and preliminary X-ray analysis of a novel halotolerant feruloyl esterase identified from a soil metagenomic library. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 68(7): 767-770.
- Chen X, Zhou M, Huang Z, Jia G, Liu G y Zhao H. (2016). Codon optimization of *Aspergillus niger* feruloyl esterase and its expression in *Pichia pastoris*. *Biologia (Bratisl)*. 71(6): 626-631.
- Cherubini F. (2010). The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Convers. Manag.* 51(7): 1412-1421.
- Chevalier F. (2010). Standard dyes for total protein staining in gel-based proteomic analysis. *Materials (Basel)*. 3(12): 4784-4792.
- Chi DH, Giap VD, Anh LPH y Nghi DH. (2017). Feruloyl esterase from *Alternaria tenuissima* that hydrolyses lignocellulosic material to release hydroxycinnamic acids. *Appl. Biochem. Microbiol.* 53(6): 654-660.
- Choi J y Kim S-H. (2017). A genome Tree of Life for the Fungi kingdom. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114(35): 9391-9396.
- Cholewa JM, Guimarães-Ferreira L y Zanchi NE. (2014). Effects of betaine on performance and

- body composition: a review of recent findings and potential mechanisms. *Amino Acids* 46(8): 1785-1793.
- Chomczynski P y Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162(1): 156-159.
- Chruszcz M, Chapman MD, Osinski T, Solberg R, Demas M, Porebski PJ, Majorek KA, Pomés A y Minor W. (2012). *Alternaria alternata* allergen Alt a 1: a unique  $\beta$ -barrel protein dimer found exclusively in fungi. *J. Allergy Clin. Immunol.* 130(1): 241-247.e9.
- Ciofalo V, Barton N, Kreps J, Coats I y Shanahan D. (2006). Safety evaluation of a lipase enzyme preparation, expressed in *Pichia pastoris*, intended for use in the degumming of edible vegetable oil. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 45: 1-8.
- Clare JJ, Romanes MA, Rayment FB, Rowedder JE, Smith MA, Payne MM, Sreekrishna K y Henwood CA. (1991). Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene* 105: 205-212.
- Cleveland TE, Dowd PF, Desjardins AE, Bhatnagar D y Cotty PJ. (2003). United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service research on pre-harvest prevention of mycotoxins and mycotoxigenic fungi in US crops. *Pest Manag. Sci.* 59(6-7): 629-642.
- Cobos R, Barreiro C, Mateos R y Coque J-JR. (2010). Cytoplasmic- and extracellular-proteome analysis of *Diplodia seriata*: a phytopathogenic fungus involved in grapevine decline. *Proteome Sci.* 8(1): 46.
- Coghe S, Benoot K, Delvaux F, Vanderhaegen B y Delvaux FR. (2004). Ferulic acid release and 4-vinylguaiacol formation during brewing and fermentation: indications for feruloyl esterase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Agric. Food Chem.* 52: 602-608.
- Colao M, Lupino S, Garzillo A, Buonocore V y Ruzzi M. (2006). Heterologous expression of lcc1 gene from *Trametes trogii* in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Microb. Cell Fact.* 5: 31.
- Comisión Europea. (2006). Reglamento (CE) n° 1881/2006 de la Comisión, de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *D. Of. la Unión Eur. Ser. L(364)*: 5-24.
- Comisión Europea. (2011). Reglamento (UE) n° 1130/2011 de la Comisión, de 11 de noviembre de 2011, por el que se modifica el Reglamento (CE) n o 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre aditivos alimentarios, para establecer una lista de aditivos alimentarios... *D. Of. la Unión Eur. Ser. L(295)*: 178-204.
- Consejería de Agricultura y Ganadería. (2018). *Anuario de Estadística Agraria de Castilla y León 2016*. Valladolid.
- Coote N y Kirsop BH. (1976). Factors responsible for the decrease in pH during beer fermentations. *J. Inst. Brew.* 82: 149-153.
- Coppock RW y Jacobsen BJ. (2009). Mycotoxins in animal and human patients. *Toxicol. Ind. Health* 25(9-10): 637-55.
- Cos O, Ramón R, Montesinos JL y Valero F. (2006). Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review. *Microb. Cell Fact.* 5(1): 17.
- Couto SR y Toca-Herrera JL. (2007). Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnol. Adv.* 25(6): 558-569.
- Couturier M, Bennati-Granier C, Urio MB, Ramos LP y Berrin J-G. (2016). Fungal enzymatic degradation of cellulose. En: Soccol, C., Brar, S., Faulds, C., y Ramos, L. (eds.) *Green Fuels Technol. Biofuels*. Suiza: Springer International, 133-146.
- Creek DJ, Dunn WB, Fiehn O, Griffin JL, Hall RD, Lei Z, Mistrik R, Neumann S, Schymanski EL, Sumner LW, Trengove R y Wolfender J-L. (2014). Metabolite identification: are you sure? And how do your peers gauge your confidence? *Metabolomics* 10: 350-353.
- Cregg JM. (2007). DNA-mediated transformation. En: Cregg, J. M. (ed.) *Pichia Protoc. Methods Mol. Biol.* 2.<sup>a</sup> ed. Totowa, NJ, EEUU: Humana Press, 27-42.
- Cregg JM, Barringer KJ, Hessler AY y Madden KR. (1985). *Pichia pastoris* as a host system

for transformations. *Mol. Cell. Biol.* 5(12): 3376-3385.

Cregg JM, Cereghino JL, Shi J y Higgins DR. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.* 16(1): 23-52.

Cregg JM, Tolstorukov I, Kusari A, Sunga J, Madden K y Chappell T. (2009). Expression in the yeast *Pichia pastoris*. En: *Methods Enzymol.* 1.ª ed. Elsevier Inc., 169-189.

Crepin VF, Faulds CB y Connerton IF. (2003a). A non-modular type B feruloyl esterase from *Neurospora crassa* exhibits concentration-dependent substrate inhibition. *Biochem. J.* 370: 417-427.

Crepin VF, Faulds CB y Connerton IF. (2003b). Production and characterization of the *Talaromyces stipitatus* feruloyl esterase FAEC in *Pichia pastoris*: identification of the nucleophilic serine. *Protein Expr. Purif.* 29(2): 176-184.

Crepin VF, Faulds CB y Connerton IF. (2004a). Functional classification of the microbial feruloyl esterases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63(6): 647-652.

Crepin VF, Faulds CB y Connerton IF. (2004b). Identification of a type-D feruloyl esterase from *Neurospora crassa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63(5): 567-570.

Czapek F. (1903). Untersuchungen über die Stickstoffgewinnung und Eiweißbildung der Pflanzen. *Chem. Physiol. Pathol.* 3: 47-66.

## D

D'Amato D, Droste N, Allen B, Kettunen M, Lähtinen K, Korhonen J, Leskinen P, Matthies BD y Toppinen A. (2017). Green, circular, bio economy: a comparative analysis of sustainability avenues. *J. Clean. Prod.* 168: 716-734.

Daly R y Hearn MTW. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J. Mol. Recognit.* 18: 119-138.

Dang HX, Pryor B, Peever T y Lawrence CB. (2015). The *Alternaria* genomes database: a comprehensive resource for a fungal genus comprised of saprophytes, plant pathogens, and allergenic species. *BMC Genomics* 16(1): 239.

Das MKL, Prasad JS y Ahmad SK. (1997). Endoglucanase production by paper-degrading mycoflora. *Lett. Appl. Microbiol.* 25(5): 313-315.

Dashtban M, Buchkowski R y Qin W. (2011). Effect of different carbon sources on cellulase production by *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) strains. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 2(3): 274-286.

Dashtban M, Schraft H y Qin W. (2009). Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. *Int. J. Biol. Sci.* 5(6): 578-595.

Demain AL. (2007). The business of biotechnology. *Ind. Biotechnol.* 3(3): 269-283.

Deshpande N, Wilkins MR, Packer N y Nevalainen H. (2008). Protein glycosylation pathways in filamentous fungi. *Glycobiology* 18(8): 626-637.

Desprez-Loustau ML, Robin C, Buée M, Courtecuisse R, Garbaye J, Suffert F, Sache I y Rizzo DM. (2007). The fungal dimension of biological invasions. *Trends Ecol. Evol.* 22(9): 472-480.

Dhingra D, Michael M, Rajput H y Patil RT. (2012). Dietary fibre in foods: a review. *J. Food Sci. Technol.* 49(3): 255-266.

Dhungana B, Ali S, Byamukama E, Krishnan P y Caffè-Treml M. (2018). Incidence of *Penicillium verrucosum* in grain samples from oat varieties commonly grown in South Dakota. *J. Food Prot.* 81(6): 898-902.

Dilokpimol A, Mäkelä MR, Aguilar-Pontes MV, Benoit-Gelber I, Hildén KS y de Vries RP. (2016). Diversity of fungal feruloyl esterases: updated phylogenetic classification, properties, and industrial applications. *Biotechnol. Biofuels* 9(1): 231.

Dilokpimol A, Mäkelä MR, Mansouri S, Belova O, Waterstraat M, Bunzel M, Vries RP De y Hildén KS. (2017). Expanding the feruloyl esterase gene family of *Aspergillus niger* by characterization of a feruloyl esterase, FaeC. *N. Biotechnol.* 37: 200-209.

Dilokpimol A, Mäkelä MR, Varriale S, Zhou M, Cerullo G, Gidijala L, Hinkka H, Brás JLA, Jütten P, Piechot A, Verhaert R, Hildén KS, Faraco V y de Vries RP. (2018). Fungal feruloyl

esterases: functional validation of genome mining based enzyme discovery including uncharacterized subfamilies. *N. Biotechnol.* 41: 9-14.

Dohm JC, Minoche AE, Holtgräwe D, Capella-Gutiérrez S, Zakrzewski F, Tafer H, Rupp O, Sörensen TR, Stracke R, Reinhardt R, Goesmann A, Kraft T, Schulz B, Stadler PF, Schmidt T, *et al.* (2014). The genome of the recently domesticated crop plant sugar beet (*Beta vulgaris*). *Nature* 505(7484): 546-549.

Dohmen RJ, Strasser AWM, Höner CB y Hollenberg CP. (1991). An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast* 7(7): 691-692.

Doi RH y Kosugi A. (2004). Cellulosomes: plant-cell-wall-degrading enzyme complexes. *Nat. Rev. Microbiol.* 2(7): 541-551.

Donaghy J, Kelly PF y McKay AM. (1998). Detection of ferulic acid esterase production by *Bacillus* spp. and lactobacilli. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 257-260.

Donaghy J y McKay AM. (1997). Purification and characterization of a feruloyl esterase from the fungus *Penicillium expansum*. *J. Appl. Microbiol.* 83(6): 718-726.

Donaghy JA, Kelly PF y McKay A. (1999). Conversion of ferulic acid to 4-vinyl guaiacol by yeasts isolated from unpasteurised apple juice. *J. Sci. Food Agric.* 79(3): 453-456.

Donaghy JA y McKay AM. (1994). Novel screening assay for the detection of phenolic acid esterases. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10(1): 41-44.

Doriya K y Kumar DS. (2016). Isolation and screening of L-asparaginase free of glutaminase and urease from fungal sp. *3 Biotech* 6: 239.

Dotsenko G, Tong X, Pilgaard B, Busk PK y Lange L. (2016). Acidic-alkaline ferulic acid esterase from *Chaetomium thermophilum* var. *dissitum*: Molecular cloning and characterization of recombinant enzyme expressed in *Pichia pastoris*. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 5: 48-55.

Dox AW. (1910). The intracellular enzymes of *Penicillium* and *Aspergillus* with special references to those of *P. camemberti*. *U.S. Dept. Agr. Bur. Anim. Ind. Bull.* 120: 170.

Doyle S. (2011). Fungal proteomics: from identification to function. *FEMS Microbiol. Lett.* 321(1): 1-9.

Dragosits M, Stadlmann J, Albiol J, Baumann K, Maurer M, Gasser B, Sauer M, Altmann F, Ferrer P y Mattanovich D. (2009). The effect of temperature on the proteome of recombinant *Pichia pastoris*. *J. Proteome Res.* 8(3): 1380-1392.

Draycott AP. (2006). *Sugar Beet*. Oxford, Reino Unido: Blackwell Publishing Ltd.

Drocourt D, Calmels T, Reynes J-P, Baron M y Tiraby G. (1990). Cassettes of the *Streptoalloteichus hindustanus ble* gene for transformation of lower and higher eukaryotes to phleomycin resistance. *Nucleic Acids Res.* 18(13): 4009-4009.

Duarte AWF, dos Santos JA, Vianna MV, Vieira JMF, Mallagutti VH, Inforsato FJ, Wentzel LCP, Lario LD, Rodrigues A, Pagnocca FC, Pessoa Junior A y Durães Sette L. (2018). Cold-adapted enzymes produced by fungi from terrestrial and marine Antarctic environments. *Crit. Rev. Biotechnol.* 38(4): 600-619.

Duong-Ly KC y Gabelli SB. (2014). Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. *Methods Enzymol.* 541: 85-94.

Dupont-Inglis J y Borg A. (2018). Destination bioeconomy – The path towards a smarter, more sustainable future. *N. Biotechnol.* 40: 140-143.

## E

Eaton RA y Hale MDC. (1993). *Wood: decay, pests and protection*. Londres, Reino Unido: Chapman and Hall Ltd.

Eberhart BM y Beck RS. (1970). Localization of the beta-glucosidases in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 101(2): 408-417.

Eck A, Schmidt M, Hamer S, Ruff AJ, Förster J, Schwaneberg U, Blank LM, Wiechert W y Oldiges M. (2018). Improved microscale cultivation of *Pichia pastoris* for clonal screening. *Fungal Biol. Biotechnol.* 5: 8.

Eddy AA y Williamson DH. (1957). A method of isolating protoplasts from yeast. *Nature* 179(4572): 1252-1253.

Eisenthal R, Danson MJ y Hough DW. (2007). Catalytic efficiency and  $k_{cat}/K_M$ : a useful comparator? *Trends Biotechnol.* 25(6): 247-249.

El-Metwally MM, Ghoneem KM y Saber WE-DIA. (2014). Mycobiota variation in stored rice straw and its cellulolytic profile. *Pakistan J. Biol. Sci. PJS* 17(9): 1037-1045.

El-Seedi HR, El-Said AMA, Khalifa SAM, Göransson U, Bohlin L, Borg-Karlson A-K y Verpoorte R. (2012). Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids. *J. Agric. Food Chem.* 60(44): 10877-10895.

Elander RP. (1983). Strain improvement and preservation of  $\beta$ -lactam-producing microorganisms. En: Demain, A. L. y Solomon, N. A. (eds.) *Antibiot. Contain. Beta-lactam Struct. I.* Nueva York, EEUU: Springer-Verlag, 97-146.

Elmholt S y Hestbjerg H. (1999). Field ecology of the ochratoxin A-producing *Penicillium verrucosum*: survival and resource colonisation in soil. *Mycopathologia* 147: 67-81.

Escamilla-Alvarado C, Pérez-Pimienta JA, Ponce-Noyola T y Poggi-Varaldo HM. (2017). An overview of the enzyme potential in bioenergy-producing biorefineries. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 92(5): 906-924.

Eshel D, Lichter A, Dinooor A y Prusky D. (2002). Characterization of *Alternaria alternata* glucanase genes expressed during infection of resistant and susceptible persimmon fruits. *Mol. Plant Pathol.* 3(5): 347-358.

Etoc A, Delvigne F, Lecomte JP y Thonart P. (2006). Foam control in fermentation bioprocess: from simple aeration tests to bioreactor. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 129-132: 392-404.

Evan GI, Lewis GK, Ramsay G y Bishop JM. (1985). Isolation of monoclonal antibodies specific for human *c-myc* proto-oncogene product. *Mol. Cell. Biol.* 5(12): 3610-3616.

Evans E y Messerschmidt U. (2017). Review: sugar beets as a substitute for grain for lactating dairy cattle. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 8: 25.

Evans JB y Kloos WE. (1972). Use of shake cultures in a semisolid thioglycolate medium for differentiating staphylococci from micrococci.

*Appl. Microbiol.* 23(2): 326-31.

## F

Fan C y Köller W. (1998). Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: differential and sequential expression of cutinolytic esterases by *Alternaria brassicicola*. *FEMS Microbiol. Lett.* 158(1): 33-38.

Farrell EK y Merkle DJ. (2008). Biosynthesis, degradation and pharmacological importance of the fatty acid amides. *Drug Discov. Today* 13(13-14): 558-568.

Faulds CB. (2010). What can feruloyl esterases do for us? *Phytochem. Rev.* 9(1): 121-132.

Faulds CB, Devries RP, Kroon PA, Visser J y Williamson G. (1997). Influence of ferulic acid on the production of feruloyl esterases by *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol. Lett.* 157: 239-244.

Faulds CB, Molina R, Gonzalez R, Husband F, Juge N, Sanz-Aparicio J y Hermoso JA. (2005). Probing the determinants of substrate specificity of a feruloyl esterase, AnFaeA, from *Aspergillus niger*. *FEBS J.* 272(17): 4362-4371.

Faulds CB y Williamson G. (1999). The role of hydroxycinnamates in the plant cell wall. *J. Sci. Food Agric.* 79(3): 393-395.

Fazary AE, Hamad H a, Lee JC, Koskei T, Lee C-K y Ju Y-H. (2010). Expression of feruloyl esterase from *Aspergillus awamori* in *Escherichia coli*: characterization and crystal studies of the recombinant enzyme. *Int. J. Biol. Macromol.* 46(4): 440-444.

Fazary AE y Ju Y-H. (2007). Feruloyl esterases as biotechnological tools: Current and future perspectives. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 39(11): 811-828.

Fazary AE y Ju Y-H. (2008a). Production, partial purification and characterization of feruloyl esterase by *Aspergillus awamori* in submerged fermentation. *Biotechnol. J.* 3(9-10): 1264-1275.

Fazary AE y Ju Y-H. (2008b). The large-scale use of feruloyl esterases in industry. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 3(5): 95-110.

Feinberg AP y Vogelstein B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction

- endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132(1): 6-13.
- Feofilova EP y Mysyakina IS. (2016). Lignin: Chemical structure, biodegradation, and practical application (a review). *Appl. Biochem. Microbiol.* 52(6): 573-581.
- Fernández-Acero FJ, Jorge I, Calvo E, Vallejo I, Carbú M, Camafeita E, López JA, Cantoral JM y Jorrín J. (2006). Two-dimensional electrophoresis protein profile of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Proteomics* 6(S1): S88-S96.
- Fernández-Aguado M, Martín JF, Rodríguez-Castro R, García-Estrada C, Albillos SM, Teijeira F y Ullán RV. (2014). New insights into the isopenicillin N transport in *Penicillium chrysogenum*. *Metab. Eng.* 22: 89-103.
- Fernández-Aguado M, Ullán R V., Teijeira F, Rodríguez-Castro R y Martín JF. (2013). The transport of phenylacetic acid across the peroxisomal membrane is mediated by the PaaT protein in *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97(7): 3073-3084.
- Fernández FJ, Gutierrez S, Velasco J, Montenegro E, Marcos AT y Martín JF. (1994). Molecular characterization of three loss-of-function mutations in the isopenicillin N-acyltransferase gene (penDE) of *Penicillium chrysogenum*. *J. Bacteriol.* 176(16): 4941-4948.
- Ferreira IMPLV., Gomes AM. y Ferreira M. (1998). Determination of sugars, and some other compounds in infant formulae, follow-up milks and human milk by HPLC-UV/RI. *Carbohydr. Polym.* 37(3): 225-229.
- Fierro F, Gutiérrez S, Diez B y Martín JF. (1993). Resolution of four large chromosomes in penicillin-producing filamentous fungi: the penicillin gene cluster is located on chromosome II (9.6 Mb) in *Penicillium notatum* and chromosome I (10.4 Mb) in *Penicillium chrysogenum*. *MGG Mol. Gen. Genet.* 241: 573-578.
- Fierro F, Montenegro E, Gutiérrez S y Martín JF. (1996). Mutants blocked in penicillin biosynthesis show a deletion of the entire penicillin gene cluster at a specific site within a conserved hexanucleotide sequence. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44(5): 597-604.
- Fillingham IJ, Kroon PA, Williamson G, Gilbert HJ y Hazlewood GP. (1999). A modular cinnamoyl ester hydrolase from the anaerobic fungus *Piromyces equi* acts synergistically with xylanase and is part of a multiprotein cellulose-binding cellulase-hemicellulase complex. *Biochem. J.* 343(Pt 1): 215-224.
- Finn RD, Attwood TK, Babbitt PC, Bateman A, Bork P, Bridge AJ, Chang H-Y, Dosztányi Z, El-Gebali S, Fraser M, Gough J, Haft D, Holliday GL, Huang H, Huang X, et al. (2017). InterPro in 2017—beyond protein family and domain annotations. *Nucleic Acids Res.* 45(D1): D190-D199.
- Fisher MC, Henk DA, Briggs CJ, Brownstein JS, Madoff LC, McCraw SL y Gurr SJ. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* 484(7393): 186-194.
- Fraç M, Hannula SE, Belka M y Jędrzycka M. (2018). Fungal biodiversity and their role in soil health. *Front. Microbiol.* 9: 707.
- Franco BE, Martínez MA, Sánchez Rodríguez MA y Wertheimer AI. (2009). The determinants of the antibiotic resistance process. *Infect. Drug Resist.* 2(1): 1-11.
- Frazzetto G. (2003). White biotechnology. *EMBO Rep.* 4(9): 835-837.
- Freeze HH y Kranz C. (2010). Endoglycosidase and glycoamidase release of N-linked glycans. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* Chapter 17: Unit 17.13A.
- Frisvad JC, Skouboe P y Samson RA. (2005). Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 28(5): 442-453.
- Fritscher C, Messner R y Kubicek CP. (1990). Cellobiose metabolism and cellobiohydrolase I biosynthesis by *Trichoderma reesei*. *Exp. Mycol.* 14(4): 405-415.
- Funke M, Diederichs S, Kensy F, Müller C y Büchs J. (2009). The baffled microtiter plate: Increased oxygen transfer and improved online monitoring in small scale fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 103(6): 1118-1128.



## G

- Gabriel MF, Postigo I, Tomaz CT y Martínez J. (2016). *Alternaria alternata* allergens: Markers of exposure, phylogeny and risk of fungi-induced respiratory allergy. *Environ. Int.* 89-90: 71-80.
- Gangopadhyay N, Hossain M, Rai D y Brunton N. (2015). A review of extraction and analysis of bioactives in oat and barley and scope for use of novel food processing technologies. *Molecules* 20(6): 10884-10909.
- García-Calvo L, Ullán RV, Fernández-Aguado M, García-Lino AM, Balaña-Fouce R y Barreiro C. (2018). Secreted protein extract analyses present the plant pathogen *Alternaria alternata* as a suitable industrial enzyme toolbox. *J. Proteomics* 177: 48-64.
- García-Estrada C, Ullán R V., Albillos SM, Fernández-Bodega MÁ, Durek P, Von Döhren H y Martín JF. (2011). A single cluster of coregulated genes encodes the biosynthesis of the mycotoxins roquefortine C and meleagrín in *Penicillium chrysogenum*. *Chem. Biol.* 18(11): 1499-1512.
- García-Lino AM. (2014). *Caracterización de la actividad enzimática feruloyl esterasa en Alternaria tenuissima* (Trabajo de Fin de Grado). Universidad de León.
- García-Moraleja A, Font G, Mañes J y Ferrer E. (2015). Analysis of mycotoxins in coffee and risk assessment in Spanish adolescents and adults. *Food Chem. Toxicol.* 86: 225-233.
- Garg G, Singh A, Kaur A, Singh R, Kaur J y Mahajan R. (2016). Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. *3 Biotech* 6: 47.
- Garleb KA, Bourquin LD, Hsu JT, Wagner GW, Schmidt SJ y Fahey GC. (1991). Isolation and chemical analyses of nonfermented fiber fractions of oat hulls and cottonseed hulls. *J. Anim. Sci.* 69(3): 1255-1271.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD y Bairoch A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. En: Walker, JM. (ed.) *Proteomics Protoc. Handb.* Totowa, NJ, EEUU: Humana Press, 571-607.
- Gatignol A, Durand H y Tiraby G. (1988). Bleomycin resistance conferred by a drug-binding protein. *FEBS Lett.* 230(1-2): 171-175.
- Gauthier L, Bonnin-Verdal M-N, Marchegay G, Pinson-Gadais L, Ducos C, Richard-Forget F y Atanasova-Penichon V. (2016). Fungal biotransformation of chlorogenic and caffeic acids by *Fusarium graminearum*: new insights in the contribution of phenolic acids to resistance to deoxynivalenol accumulation in cereals. *Int. J. Food Microbiol.* 221(856): 61-68.
- Geller JL y Adams JS. (2008). Vitamin D therapy. *Curr. Osteoporos. Rep.* 6(1): 5-11.
- Ghatora SK, Chadha BS, Saini HS, Bhat MK y Faulds CB. (2006). Diversity of plant cell wall esterases in thermophilic and thermotolerant fungi. *J. Biotechnol.* 125: 434-445.
- Ghose TK. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* 59(2): 257-268.
- Gietz RD y Woods RA. (2001). Genetic transformation of yeast. *Biotechniques* 30: 816-831.
- Gifre L, Arís A, Bach À y Garcia-Fruitós E. (2017). Trends in recombinant protein use in animal production. *Microb. Cell Fact.* 16(1): 40.
- Gilbert HJ. (2010). The biochemistry and structural biology of plant cell wall deconstruction. *Plant Physiol.* 153(2): 444-455.
- Giuliani S, Piana C, Setti L, Hochkoeppler A, Pifferi PG, Williamson G y Faulds CB. (2001). Synthesis of pentyferulate by a feruloyl esterase from *Aspergillus niger* using water-in-oil microemulsions. *Biotechnol. Lett.* 23: 325-330.
- Glass NL, Schmoll M, Cate JHD y Coradetti S. (2013). Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 67(1): 477-498.
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, et al. (1996). Life with 6000 genes. *Science* (80- ). 274(5287): 546, 563-7.
- Goldstone DC, Villas-Bôas SG, Till M, Kelly WJ, Attwood GT y Arcus VL. (2010). Structural and functional characterization of a promiscuous feruloyl esterase (Est1E) from the rumen bacterium *Butyrivibrio proteoclasticus*. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 78: 1457-1469.

- Gong YY, Yin X, Zhang HM, Wu MC, Tang CD, Wang JQ y Pang QF. (2013). Cloning, expression of a feruloyl esterase from *Aspergillus usami* E001 and its applicability in generating ferulic acid from wheat bran. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40(12): 1433-1441.
- González-Fernández R, Prats E y Jorrín-Novo J V. (2010). Proteomics of plant pathogenic fungi. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010: ID 932527, 1-36.
- Gopalan N, Rodríguez-Duran LV, Saucedo-Castaneda G y Nampoothiri KM. (2015). Review on technological and scientific aspects of feruloyl esterases: a versatile enzyme for biorefining of biomass. *Bioresour. Technol.* 193: 534-544.
- Gordon TR y Martyn RD. (1997). The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35(1): 111-128.
- Görg A, Postel W, Weser J, Günther S, Strahler JR, Hanash SM y Somerlot L. (1987). Elimination of point streaking on silver stained two-dimensional gels by addition of iodoacetamide to the equilibration buffer. *Electrophoresis* 8(2): 122-124.
- Gorinstein S, Moshe R, Deutsch J, Wolfe FH, Tilis K, Stiller A, Flam I y Gat Y. (1992). Determination of basic components in white wines by HPLC, FT-IR spectroscopy, and electrophoretic techniques. *J. Food Compos. Anal.* 5(3): 236-245.
- Goyanes SN y D'Accorso NB. (2017). *Industrial applications of renewable biomass products*. Nueva York, EEUU: Springer International Publishing.
- Graves PR y Haystead TAJ. (2002). Molecular biologist's guide to Proteomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66(1): 39-63.
- Gravesen S, Nielsen PA, Iversen R y Nielsen KF. (1999). Microfungal contamination of damp buildings-examples of risk constructions and risk materials. *Environ. Health Perspect.* 107(Suppl 3): 505-508.
- Gu C, Zheng F, Long L, Wang J y Ding S. (2014). Engineering the expression and characterization of two novel laccase isoenzymes from *Coprinus comatus* in *Pichia pastoris* by fusing an additional ten amino acids tag at N-terminus. *PLoS One* 9(4): e93912.
- Guerrero G, Hausman J-F, Strauss J, Ertan H y Siddiqui KS. (2015). Deconstructing plant biomass: focus on fungal and extremophilic cell wall hydrolases. *Plant Sci.* 234: 180-193.
- Guerrero G, Hausman J-F, Strauss J, Ertan H y Siddiqui KS. (2016). Lignocellulosic biomass: biosynthesis, degradation, and industrial utilization. *Eng. Life Sci.* 16(1): 1-16.
- Guilliermond A. (1920). *Zygosaccharomyces pastori*, nouvelle espèce de levures copulation hétérogamique. *Bull. Trimest. la Société Mycol. Fr.* 36: 203-211.
- Gündüz Ergün B y Çalık P. (2016). Lignocellulose degrading extremozymes produced by *Pichia pastoris*: Current status and future prospects. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 39(1): 1-36.
- Gusakov A V., Kondratyeva EG y Sinitsyn AP. (2011). Comparison of two methods for assaying reducing sugars in the determination of carbohydrase activities. *Int. J. Anal. Chem.* 2011: 1-4.
- Gutiérrez-Correa M, Ludeña Y, Ramage G y Villena GK. (2012). Recent advances on filamentous fungal biofilms for industrial uses. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167(5): 1235-1253.

---

## H

---

Den Haan R, Rose SH, Lynd LR y van Zyl WH. (2007). Hydrolysis and fermentation of amorphous cellulose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* 9(1): 87-94.

Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166(4): 557-580.

Hanahan D. (1985). Techniques for transformation of *E. coli*. En: Glover, D. M. (ed.) *DNA Cloning a Pract. Approach*. Oxford, Inglaterra: IRL Press, 109-135.

Hao J, Tian X, Song F, He X, Zhang Z y Zhang P. (2006). Involvement of lignocellulolytic enzymes in the decomposition of leaf litter in a subtropical forest. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53(3): 193-198.

Haon M, Grisel S, Navarro D, Gruet A, Berrin J-G y Bignon C. (2015). Recombinant protein production facility for fungal biomass-degrading enzymes using the yeast *Pichia pastoris*.

*Front. Microbiol.* 6: 1-12.

Harff GA. (1983). Albumin determination with bromocresol purple: imprecision, comparison of methods and quality control. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 21(11): 679-82.

Harris PJ. (2006). Primary and secondary plant cell walls: A comparative overview. *New Zeal. J. For. Sci.* 36(1): 36-53.

Harris PJ y Stone BA. (2008). Chemistry and molecular organization of plant cell walls. En: Himmel, M. E. (ed.) *Biomass Recalcitrance deconstructing plant cell wall bioenergy*. Oxford, Reino Unido: Blackwell Publishing Ltd., 61-93.

Hartner FS y Glieder A. (2006). Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. *Microb. Cell Fact.* 5: 39.

Hashemi M. (2016). Aflatoxin B1 levels in feedstuffs from dairy cow farms in south of Iran. *Food Agric. Immunol.* 27(2): 251-258.

Hashizume K, Ito T, Ishizuka T y Takeda N. (2013). Formation of ethyl ferulate by rice koji enzyme in sake and mirin mash conditions. *J. Biosci. Bioeng.* 116(2): 209-213.

Hassan L, Reppke MJ, Thieme N, Schweizer SA, Mueller CW y Benz JP. (2017). Comparing the physiochemical parameters of three celluloses reveals new insights into substrate suitability for fungal enzyme production. *Fungal Biol. Biotechnol.* 4(1): 1-10.

Hassan S y Hugouvieux-Cotte-Pattat N. (2011). Identification of two feruloyl esterases in *Dickeya dadantii* 3937 and induction of the major feruloyl esterase and of pectate lyases by ferulic acid. *J. Bacteriol.* 193(4): 963-970.

Hatanaka C y Kobara Y. (1980). Determination of glucose by a modification of Somogyi-Nelson method. *Agric. Biol. Chem.* 44(12): 2943-2949.

Hautbergue T, Puel O, Tadrast S, Meneghetti L, Péan M, Delaforge M, Debrauwer L, Oswald IP y Jamin EL. (2017). Evidencing 98 secondary metabolites of *Penicillium verrucosum* using substrate isotopic labeling and high-resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 1071: 29-43.

Havliš J, Thomas H, Šebela M y Shevchenko A. (2003). Fast-Response Proteomics by

accelerated in-gel digestion of proteins. *Anal. Chem.* 75(6): 1300-1306.

Hawksworth DL. (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol. Res.* 95(6): 641-655.

Hermoso JA, Sanz-Aparicio J, Molina R, Juge N, González R y Faulds CB. (2004). The crystal structure of feruloyl esterase A from *Aspergillus niger* suggests evolutive functional convergence in feruloyl esterase family. *J. Mol. Biol.* 338(3): 495-506.

Hinnen A, Hicks JB y Fink GR. (1978). Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75(4): 1929-1933.

Hohman EE, Martin BR, Lachcik PJ, Gordon DT, Fleet JC y Weaver CM. (2011). Bioavailability and efficacy of vitamin D2 from UV-irradiated yeast in growing, vitamin D-deficient rats. *J. Agric. Food Chem.* 59(6): 2341-2346.

Holmes DS y Quigley M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114(1): 193-197.

Holwerda EK, Ellis LD y Lynd LR. (2013). Development and evaluation of methods to infer biosynthesis and substrate consumption in cultures of cellulolytic microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.* 110(9): 2380-2388.

de Hoog GS y Horré R. (2002). Molecular taxonomy of the *Alternaria* and *Ulocladium* species from humans and their identification in the routine laboratory. *Mycoses* 45(7-8): 259-276.

Hooke R. (1665). *Micrographia, or some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses with observations and inquiries thereupon*. Londres, Reino Unido: The Royal Society.

Hoondal GS, Tiwari RP, Tewari R, Dahiya N y Beg QK. (2002). Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 409-418.

Houbraken J, Frisvad JC y Samson RA. (2011a). Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. *IMA Fungus* 2(1): 87-95.

Houbraken J, Frisvad JC y Samson RA.

(2011b). Taxonomy of *Penicillium* section *Citrina*. *Stud. Mycol.* 70: 53-138.

Hu D, Fan Y, Tan Y, Tian Y, Liu N, Wang L, Zhao D, Wang C y Wu A. (2017). Metabolic profiling on *Alternaria* toxins and components of xinjiang jujubes incubated with pathogenic *Alternaria alternata* and *Alternaria tenuissima* via Orbitrap High-Resolution Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 65(38): 8466-8474.

Hu G y Leger RJ St. (2004). A phylogenomic approach to reconstructing the diversification of serine proteases in fungi. *J. Evol. Biol.* 17(6): 1204-1214.

Huang S-J, Lin C-P, Mau J-L, Li Y-S y Tsai S-Y. (2015). Effect of UV-B irradiation on physiologically active substance content and antioxidant properties of the medicinal caterpillar fungus *Cordyceps militaris* (Ascomycetes). *Int. J. Med. Mushrooms* 17(3): 241-253.

Hutnan M, Dritl M y Mrfatkova L. (2000). Anaerobic biodegradation of sugar beet pulp. *Biodegradation* 11: 203-211.

Huynh M-L, Russell P y Walsh B. (2009). Tryptic digestion of in-gel proteins for mass spectrometry analysis. En: Tyther, R. y Sheehan, D. (eds.) *Two-Dimensional Electrophor. Protoc. Methods Mol. Biol.* Clifton, Nueva Jersey, EEUU: Humana Press, 507-513.

## I

Ibáñez-Vea M, González-Peñas E, Lizarraga E y López de Cerain A. (2012). Co-occurrence of mycotoxins in Spanish barley: A statistical overview. *Food Control* 28(2): 295-298.

Inderbitzin P, Mehta YR y Berbee ML. (2009). *Pleospora* species with *Stemphylium* anamorphs: a four locus phylogeny resolves new lineages yet does not distinguish among species in the *Pleospora herbarum* clade. *Mycologia* 101(3): 329-339.

Inoue H, Nojima H y Okayama H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96(1): 23-28.

Isshiki A, Akimitsu K, Nishio K, Tsukamoto M y Yamamoto H. (1997). Purification and characterization of an endopolygalacturonase from the rough lemon pathotype of *Alternaria alternata*, the cause of citrus brown spot disease.

*Physiol. Mol. Plant Pathol.* 51(3): 155-167.

Isshiki A, Akimitsu K, Yamamoto M y Yamamoto H. (2001). Endopolygalacturonase is essential for citrus black rot caused by *Alternaria citri* but not brown spot caused by *Alternaria alternata*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14(6): 749-757.

Iwen PC, Hinrichs SH y Rupp ME. (2002). Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Med. Mycol.* 40: 87-109.

## J

Jacobs PP, Geysens S, Vervecken W, Contreras R y Callewaert N. (2009). Engineering complex-type N-glycosylation in *Pichia pastoris* using GlycoSwitch technology. *Nat. Protoc.* 4(1): 58-70.

Jäger G y Büchs J. (2012). Biocatalytic conversion of lignocellulose to platform chemicals. *Biotechnol. J.* 7(9): 1122-1136.

Jahic M, Wallberg F, Bollok M, Garcia P y Enfors SO. (2003). Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in *Pichia pastoris* bioreactor cultures. *Microb. Cell Fact.* 2: 1-11.

Jami M-S, Barreiro C, García-Estrada C y Martín J-F. (2010a). Proteome analysis of the penicillin producer *Penicillium chrysogenum*. *Mol. Cell. Proteomics* 9(6): 1182-1198.

Jami M-S, García-Estrada C, Barreiro C, Cuadrado A-A, Salehi-Najafabadi Z y Martín J-F. (2010b). The *Penicillium chrysogenum* extracellular proteome. Conversion from a food-rotting strain to a versatile cell factory for white biotechnology. *Mol. Cell. Proteomics* 9(12): 2729-2744.

Janes LE, Löwendahl AC y Kazlauskas RJ. (1998). Quantitative screening of hydrolase libraries using pH indicators: identifying active and enantioselective hydrolases. *Chem. - A Eur. J.* 4(11): 2324-2331.

Jiang X, Chen P, Yin M y Yang Q. (2013). Constitutive expression, purification and characterisation of pectin methylesterase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris* for potential application in the fruit juice industry. *J. Sci. Food Agric.* 93(2): 375-381.

- Jiao A, Xu Z, Yang X, Guo Q y Liu X. (2014). Screening and identification of a feruloyl esterase producing bacteria *Burkholderia fungorum* A216. *J. Chem. Pharm. Res.* 6(4): 1040-1046.
- Jimenez-Flores R, Fake G, Carroll J, Hood E y Howard J. (2010). A novel method for evaluating the release of fermentable sugars from cellulosic biomass. *Enzyme Microb. Technol.* 47(5): 206-211.
- Johnsen H y Krause K. (2014). Cellulase activity screening using pure carboxymethylcellulose: application to soluble cellulolytic samples and to plant tissue prints. *Int. J. Mol. Sci.* 15: 830-838.
- Johnson KG, Harrison BA, Schneider H, Mackenzie CR y Fontana JD. (1988). Xylan-hydrolysing enzymes from *Streptomyces* spp. *Enzyme Microb. Technol.* 10: 403-409.
- Jönsson AG. (1967). Pilot-plant production of protease by *Alternaria tenuissima*. *Appl. Microbiol.* 15(2): 319-324.
- Juge N, Williamson G, Puigserver A, Cummings NJ, Connerton IF y Faulds CB. (2001). High-level production of recombinant *Aspergillus niger* cinnamoyl esterase (FAEA) in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Res.* 1(2): 127-132.
- Juturu V y Wu JC. (2018). Heterologous protein expression in *Pichia pastoris*: latest research progress and applications. *ChemBioChem* 19(1): 7-21.
- K**
- Kączkowski J. (2003). Structure, function and metabolism of plant cell wall. *Acta Physiol. Plant.* 25(3): 287-305.
- Kamal S, Khan SU, Muhammad N, Shoaib M, Omar M, Pascal K, Rose MM y Sun FF. (2018). Insights on heterologous expression of fungal cellulases in *Pichia pastoris*. *Biochem. Mol. Biol.* 3(1): 15-35.
- Kamel MY y El-Awamry ZA. (1978). A colorimetric method for the determination of carboxylic acids. *Microchem. J.* 23: 445-452.
- Kamm B y Kamm M. (2004). Principles of biorefineries. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64(2): 137-145.
- Kanauchi M, Watanabe S, Tsukada T, Atta K, Kakuta T y Koizumi T. (2008). Purification and characteristics of feruloyl esterase from *Aspergillus awamori* G-2 strain. *J. Food Sci.* 73(6): 458-463.
- Kareparamban J, Nikam P, Jadhav A y Kadam V. (2013). A validated high-performance liquid chromatography method for estimation of ferulic acid in asafoetida and polyherbal preparation. *Indian J. Pharm. Sci.* 75(4): 493-495.
- Karlsson CP, Jansson A, Essén-Gustavsson B y Lindberg JE. (2002). Effect of molassed sugar beet pulp on nutrient utilisation and metabolic parameters during exercise. *Equine Vet. J.* 34(S34): 44-49.
- Kashyap D., Vohra P., Chopra S y Tewari R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresour. Technol.* 77(3): 215-227.
- Kaufner NF. (2000). Analysis of the splicing machinery in fission yeast: a comparison with budding yeast and mammals. *Nucleic Acids Res.* 28(16): 3003-3010.
- Kayahara H, Miao Z y Fujiwara G. (1999). Synthesis and biological activities of ferulic acid derivatives. *Anticancer Res.* 19(5A): 3763-8.
- Keegan R-JH, Lu Z, Bogusz JM, Williams JE y Holick, F. M. (2013). Photobiology of vitamin D in mushrooms and its bioavailability in humans. *Dermatoendocrinol.* 5(1): 165-176.
- Kelle S, Nieter A, Krings U, Zelena K, Linke D y Berger RG. (2016). Heterologous production of a feruloyl esterase from *Pleurotus sapidus* synthesizing feruloyl-saccharide esters. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 63(6): 852-862.
- Kemmer G y Keller S. (2010). Nonlinear least-squares data fitting in Excel spreadsheets. *Nat. Protoc.* 5(2): 267-281.
- Kendrick B. (2011). Fungi: ecological importance and impact on humans. En: *eLS*. Chichester, Reino Unido: John Wiley & Sons, Ltd.
- Kensy F, Engelbrecht C y Büchs J. (2009). Scale-up from microtiter plate to laboratory fermenter: evaluation by online monitoring techniques of growth and protein expression in *Escherichia coli* and *Hansenula polymorpha* fermentations. *Microb. Cell Fact.* 8: 68.
- Khalikova E, Susi P y Korpela T. (2005).

- Microbial dextran-hydrolyzing enzymes: fundamentals and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69(2): 306-325.
- Kickenweiz T, Glieder A y Wu JC. (2018). Construction of a cellulose-metabolizing *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) by co-expressing glucanases and  $\beta$ -glucosidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102(3): 1297-1306.
- Kim H-S, Park H-J, Heu S y Jung J. (2004). Molecular and functional characterization of a unique sucrose hydrolase from *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. *J. Bacteriol.* 186(2): 411-8.
- Kim S, Thiessen PA, Bolton EE, Chen J, Fu G, Gindulyte A, Han L, He J, He S, Shoemaker BA, Wang J, Yu B, Zhang J y Bryant SH. (2016). PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Res.* 44(D1): D1202-1213.
- Kim SH y Kim CH. (2011). New *Penicillium verrucosum* useful for producing cellulase e.g. xylanase useful for decomposing cellulose used in e.g. paper manufacturing industry (patente KR2012140498-A). Korea.
- Kim Y, Nandakumar MP y Marten MR. (2007). Proteomics of filamentous fungi. *Trends Biotechnol.* 25(9): 395-400.
- Kim YH, Sathiyarayanan G, Kim HJ, Bhatia SK, Seo H-M, Kim J-H, Song H-S, Kim Y-G, Park K y Yang Y-H. (2015). A liquid-based colorimetric assay of lysine decarboxylase and its application to enzymatic assay. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25(12): 2110-2115.
- Kin KL, Lorca GL y Gonzalez CF. (2009). Biochemical properties of two cinnamoyl esterases purified from a *Lactobacillus johnsonii* strain isolated from stool samples of diabetes-resistant rats. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(15): 5018-5024.
- Kirk P, Cannon P, Minter D y Stalpers J. (2008). *Dictionary of the Fungi*. Wallingford, Reino Unido: CABI.
- Kleinert P, Kuster T, Arnold D y Jaeken J. (2007). Effect of glycosylation on the protein pattern in 2-D-gel electrophoresis. *Proteomics* 7: 15-22.
- Klose J. (1975). Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 26(3): 231-43.
- Kobata A. (2013). Exo- and endoglycosidases revisited. *Proc. Japan Acad. Ser. B* 89(3): 97-117.
- Köhl J, Groenenboom-de Haas B, Goossen-van de Geijn H, Speksnijder A, Kastelein P, de Hoog S y Gerrits van den Ende B. (2009). Pathogenicity of *Stemphylium vesicarium* from different hosts causing brown spot in pear. *Eur. J. Plant Pathol.* 124(1): 151-162.
- Koschorreck K, Liu D, Kazenwadel C, Schmid RD y Hauer B. (2010). Heterologous expression, characterization and site-directed mutagenesis of cutinase CUTAB1 from *Alternaria brassicicola*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87(3): 991-997.
- Koseki T, Furuse S, Iwano K y Matsuzawa H. (1998). Purification and characterization of a feruloyl esterase from *Aspergillus awamori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62(10): 2032-2034.
- Koseki T, Fushinobu S, Ardiansyah, Shirakawa H y Komai M. (2009a). Occurrence, properties, and applications of feruloyl esterases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84(5): 803-810.
- Koseki T, Hori A, Seki S, Murayama T y Shiono Y. (2009b). Characterization of two distinct feruloyl esterases, AoFaeB and AoFaeC, from *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83(4): 689-696.
- Koseki T, Mochizuki K, Kisara H, Miyanaga A, Fushinobu S, Murayama T y Shiono Y. (2010). Characterization of a chimeric enzyme comprising feruloyl esterase and family 42 carbohydrate-binding module. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86(1): 155-161.
- Koseki T, Takahashi K, Fushinobu S, Iefuji H, Iwano K, Hashizume K y Matsuzawa H. (2005). Mutational analysis of a feruloyl esterase from *Aspergillus awamori* involved in substrate discrimination and pH dependence. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1722(2): 200-208.
- Koseki T, Takahashi K, Handa T, Yamane Y, Fushinobu S y Hashizume K. (2006). N-linked oligosaccharides of *Aspergillus awamori* feruloyl esterase are important for thermostability and catalysis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70(10): 2476-2480.

- Kroon PA, Williamson G, Fish NM, Archer DB y Belshaw NJ. (2000). A modular esterase from *Penicillium funiculosum* which releases ferulic acid from plant cell walls and binds crystalline cellulose contains a carbohydrate binding module. *Eur. J. Biochem.* 267(23): 6740-6752.
- Küberl A, Schneider J, Thallinger GG, Anderl I, Wibberg D, Hajek T, Jaenicke S, Brinkrolf K, Goesmann A, Szczepanowski R, Pühler A, Schwab H, Glieder A y Pichler H. (2011). High-quality genome sequence of *Pichia pastoris* CBS7435. *J. Biotechnol.* 154(4): 312-320.
- Kubicek CP y Kubicek EM. (2016). Enzymatic deconstruction of plant biomass by fungal enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 35: 51-57.
- Kubicek CP, Messner R, Gruber F, Mandels M y Kubicek-Pranz EM. (1993). Triggering of cellulase biosynthesis by cellulose in *Trichoderma reesei*. Involvement of a constitutive, sophorose-inducible, glucose-inhibited beta-diglucoside permease. *J. Biol. Chem.* 268(26): 19364-8.
- Kubicek CP, Starr TL y Glass NL. (2014). Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52(1): 427-451.
- Kühnel S, Schols HA y Gruppen H. (2011). Aiming for the complete utilization of sugar-beet pulp: examination of the effects of mild acid and hydrothermal pretreatment followed by enzymatic digestion. *Biotechnol. Biofuels* 4: 14.
- Kulik T, Stuper-Szablewska K, Bilaska K, Buśko M, Ostrowska-Kołodziejczak A, Załuski D y Perkowski J. (2017). Trans-cinnamic and chlorogenic acids affect the secondary metabolic profiles and ergosterol biosynthesis by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum sensu stricto*. *Toxins (Basel)*. 9(7): 198.
- Kumar CG, Kamle A y Kamal A. (2013). Purification and biochemical characterization of feruloyl esterases from *Aspergillus terreus* MTCC 11096. *Biotechnol. Prog.* 29(4): 924-932.
- Kumar CG, Kamle A, Mongolla P y Joseph J. (2011). Parametric optimization of feruloyl esterase production from *Aspergillus terreus* strain GA2 isolated from tropical agro-ecosystems cultivating sweet sorghum. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21(9): 947-953.
- Kumar N y Pruthi V. (2014). Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnol. Reports* 4: 86-93.
- Kumar V, Singh D, Sangwan P y Gill prabhjot kaur. (2014). Global market scenario of industrial enzymes. En: Beniwal, V. y Sharma, A. K. (eds.) *Ind. Enzym. Trends, Scope Relev.* Nueva York, EEUU: Nova Science Publishers, 173-196.
- Kumar VP, Kolte AP, Dhali A, Naik C y Sridhar M. (2018). Enhanced delignification of lignocellulosic substrates by *Pichia* GS115 expressed recombinant laccase. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 64(4): 180-189.
- Kurtzman CP. (2005). Description of *Komagataella phaffii* sp. nov. and the transfer of *Pichia pseudopastoris* to the methylotrophic yeast genus *Komagataella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55(2): 973-976.
- Kurtzman CP y Robnett CJ. (1997). Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J. Clin. Microbiol.* 35(5): 1216-1223.
- Kustrzeba-Wójcicka I, Siwak E, Terlecki G, Wolańczyk-Mędrala A y Mędrala W. (2014). *Alternaria alternata* and its allergens: A comprehensive review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 47(3): 354-365.
- Kwiatkowski NP, Babiker WM, Merz WG, Carroll KC y Zhang SX. (2012). Evaluation of nucleic acid sequencing of the D1/D2 region of the large subunit of the 28S rDNA and the internal transcribed spacer region using SmartGene IDNS software for identification of filamentous fungi in a clinical laboratory. *J. Mol. Diagnostics* 14(4): 393-401.

## L

Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.

Lai K, Vu C, B. R, H. A y F. C. (2012). Identification and characterization of feruloyl esterases produced by probiotic bacteria. En: Ahmad, R. (ed.) *Protein Purif.* InTech.

Laich F, Fierro F y Martin JF. (2002). Production of penicillin by fungi growing on food products: Identification of a complete penicillin gene cluster in *Penicillium griseofulvum* and a

- truncated cluster in *Penicillium verrucosum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(3): 1211-1219.
- Lainez M, González JM, Aguilar A y Vela C. (2018). Spanish strategy on bioeconomy: Towards a knowledge based sustainable innovation. *N. Biotechnol.* 40: 87-95.
- Lambertz C, Ece S, Fischer R y Commandeur U. (2016). Progress and obstacles in the production and application of recombinant lignin-degrading peroxidases. *Bioengineered* 7(3): 145-154.
- Lambertz C, Garvey M, Klinger J, Heesel D, Klose H, Fischer R y Commandeur U. (2014). Challenges and advances in the heterologous expression of cellulolytic enzymes: a review. *Biotechnol. Biofuels* 7(1): 1-15.
- Lange L. (2014). The importance of fungi and mycology for addressing major global challenges. *IMA Fungus* 5(2): 463-71.
- Lange L, Bech L, Busk PK, Grell MN, Huang Y, Lange M, Linde T, Pilgaard B, Roth D y Tong X. (2012). The importance of fungi and mycology for a global development of the bioeconomy. *IMA Fungus* 3(1): 87-92.
- Latarullo MBG, Tavares EQP, Maldonado GP, Leite DCC y Buckeridge MS. (2016). Pectins, endopolygalacturonases, and bioenergy. *Front. Plant Sci.* 7: 1401.
- Lee HM y Lee Y. (2008). A differential medium for lactic acid-producing bacteria in a mixed culture. *Lett. Appl. Microbiol.* 46(6): 676-681.
- Levetin E, Horner WE, Scott JA, Barnes C, Baxi S, Chew GL, Grimes C, Horner WE, Kennedy K, Larenas-Linnemann D, Levetin E, Miller JD, Phipatanakul W, Portnoy JM, Scott JA, et al. (2016). Taxonomy of allergenic fungi. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 4(3): 375-385.e1.
- Li C, Lin F, Li Y, Wei W, Wang H, Qin L, Zhou Z, Li B, Wu F y Chen Z. (2016). A  $\beta$ -glucosidase hyper-production *Trichoderma reesei* mutant reveals a potential role of cel3D in cellulase production. *Microb. Cell Fact.* 15(1): 151.
- Li J, Gu F, Wu R, Yang J y Zhang K-Q. (2017). Phylogenomic evolutionary surveys of subtilase superfamily genes in fungi. *Sci. Rep.* 7: 45456.
- Li K, Meng K, Pan X, Ma R, Yang P, Huang H, Yao B y Su X. (2015a). Two thermophilic fungal pectinases from *Neosartorya fischeri* P1: gene cloning, expression, and biochemical characterization. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 118: 70-78.
- Li W, Cowley A, Uludag M, Gur T, McWilliam H, Squizzato S, Park YM, Buso N y Lopez R. (2015b). The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Res.* 43(W1): W580-W584.
- Li Y, Liu Z, Cui F, Ping L, Qiu C, Li G y Yan L. (2009). Isolation and identification of a newly isolated *Alternaria* sp. ND-16 and characterization of xylanase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 157: 36-49.
- Li Z, Xiong F, Lin Q, D'Anjou M, Daugulis a J, Yang DS y Hew CL. (2001). Low-temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 21: 438-445.
- Liao X, Fang W, Lin L, Lu H-L y Leger RJS. (2013). *Metarhizium robertsii* produces an extracellular invertase (MrINV) that plays a pivotal role in rhizospheric interactions and root colonization. *PLoS One* 8(10): e78118.
- Limay-Rios V, Miller JD y Schaafsma AW. (2017). Occurrence of *Penicillium verrucosum*, ochratoxin A, ochratoxin B and citrinin in on-farm stored winter wheat from the Canadian Great Lakes Region. *PLoS One* 12(7): e0181239.
- Lin-Cereghino GP, Stark CM, Kim D, Chang J, Shaheen N, Poerwanto H, Agari K, Moua P, Low LK, Tran N, Huang AD, Nattestad M, Oshiro KT, Chang JW, Chavan A, et al. (2013). The effect of  $\alpha$ -mating factor secretion signal mutations on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Gene* 519(2): 311-317.
- Lindner P, Bauer K, Krebber A, Nieba L, Kremmer E, Krebber C, Honegger A, Klinger B, Mocikat R y Plückthun A. (1997). Specific detection of his-tagged proteins with recombinant anti-His tag scFv-phosphatase or scFv-phage fusions. *Biotechniques* 22(1): 140-149.
- Linke D, Matthes R, Nimtz M, Zorn H, Bunzel M y Berger RG. (2013). An esterase from the basidiomycete *Pleurotus sapidus* hydrolyzes feruloylated saccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97(16): 7241-7251.



- Lisboa HCF, Biasetto CR, de Medeiros JB, Araújo ÂR, Silva DHS, Teles HL y Trevisan HC. (2013). Endophytic fungi producing of esterases: evaluation in vitro of the enzymatic activity using pH indicator. *Brazilian J. Microbiol.* 44(3): 923-926.
- Liu G, Zhang L, Wei X, Zou G, Qin Y, Ma L, Li J, Zheng H, Wang S, Wang C, Xun L, Zhao G-P, Zhou Z y Qu Y. (2013). Genomic and secretomic analyses reveal unique features of the lignocellulolytic enzyme system of *Penicillium decumbens*. *PLoS One* 8(2): e55185.
- Liu M-Q, Dai X-J, Bai L-F y Xu X. (2014a). Cloning, expression of *Aspergillus niger* JL-15 endopolygalacturonase A gene in *Pichia pastoris* and oligo-galacturonates production. *Protein Expr. Purif.* 94: 53-59.
- Liu R, Zhu J, Yu Z, Joshi D, Zhang H, Lin W y Yang M. (2014b). Molecular analysis of long-term biofilm formation on PVC and cast iron surfaces in drinking water distribution system. *J. Environ. Sci.* 26(4): 865-874.
- Liu S, Bischoff KM, Anderson AM y Rich JO. (2016). Novel feruloyl esterase from *Lactobacillus fermentum* NRRL B-1932 and analysis of the recombinant enzyme produced in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 82(17): 5068-5076.
- Liu T, Song T, Zhang X, Yuan H, Su L, Li W, Xu J, Liu S, Chen L, Chen T, Zhang M, Gu L, Zhang B y Dou D. (2014c). Unconventionally secreted effectors of two filamentous pathogens target plant salicylate biosynthesis. *Nat. Commun.* 5: 4686.
- Löbs A-K, Schwartz C y Wheeldon I. (2017). Genome and metabolic engineering in non-conventional yeasts: current advances and applications. *Synth. Syst. Biotechnol.* 2(3): 198-207.
- Lodder J. (1970). *The Yeasts: a taxonomic study*. Amsterdam, Países Bajos: North-Holland Publishing Company Co.
- Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM y Henrissat B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* 42(D1): D490-D495.
- Löoke M, Kristjuhan K y Kristjuhan A. (2017). Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques* 62(1): 325-328.
- Looser V, Bruhlmann B, Bumbak F, Stenger C, Costa M, Camattari A, Fotiadis D y Kovar K. (2014). Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: a review. *Biotechnol. Adv.* 33(6): 1177-1193.
- López-nieto MJ, Ramos FR, Luengo JM y Martín JF. (1985). Characterization of the biosynthesis in vivo of  $\alpha$ -amino adipyl-cysteinyl-valine in *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22: 343-351.
- López Alonso R, Ramírez de Lara C, Rivero L, Ruiz AE, Torres Zapata CT y Ullán R V. (2011). Aplicación de una nueva FAE en la liberación químico-enzimática de ácido ferúlico a partir de pulpa de remolacha. *Ciencias Agronómicas* 19: 21-25.
- Löster K y Kannicht C. (2008). 2-Dimensional electrophoresis: Detection of glycosylation and influence on spot pattern. En: Kannicht, C. (ed.) *Post-translational Modif. proteins. Methods Mol. Biol. vol 446*. Totowa, Nueva Jersey, EEUU: Humana Press, 199-214.
- Loughran ST y Walls D. (2011). Purification of poly-histidine-tagged proteins. En: Walls, D. y Loughran, S. T. (eds.) *Protein Chromatogr. Methods Mol. Biol.* Nueva Jersey, EEUU: Humana Press, 311-335.
- Lovett B y St. Leger RJ. (2017). The insect pathogens. *Microbiol. Spectr.* 5(2): 1-19.
- Lu H, Li C, Tang W, Wang Z, Xia J, Zhang S, Zhuang Y, Chu J y Noorman H. (2015). Dependence of fungal characteristics on seed morphology and shear stress in bioreactors. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 38(5): 917-928.
- De Lucca AJ. (2007). Harmful fungi in both agriculture and medicine. *Rev Iberoam Micol* 24(1): 3-13.
- Lurquin PF. (1997). Gene transfer by electroporation. *Appl. Biochem. Biotechnol. - Part B Mol. Biotechnol.* 7: 5-35.
- Lutzoni F, Kauff F, Cox CJ, McLaughlin D, Celio G, Dentinger C, Padamsee M, Hibbett D, James TY, Baloch E, Grube M, Reeb V, Hofstetter V, Schoch C, Arnold AE, et al. (2004). Assembling the fungal tree of life: Progress, classification, and evolution of subcellular traits. *Am. J. Bot.* 91(10): 1446-1480.

Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH y Pretorius IS. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66(3): 506-577.

## M

Ma J, Hou X, Zhang B, Wang Y y He L. (2014). The analysis of carbohydrates in milk powder by a new «heart-cutting» two-dimensional liquid chromatography method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 91: 24-31.

Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B y Harvey LM. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22(4): 249-270.

Macauley-Patrick S y Finn B. (2008). Modes of fermenter operation. En: McNeil, B. y Harvey, L. M. (eds.) *Pract. Ferment. Technol.* Chichester, Reino Unido: John Wiley & Sons, Ltd, 69-95.

Macheleidt J, Mattern DJ, Fischer J, Netzker T, Weber J, Schroeckh V, Valiante V y Brakhage AA. (2016). Regulation and role of fungal secondary metabolites. *Annu. Rev. Genet.* 50(1): 371-392.

Mackenzie CR y Bilous D. (1988). Ferulic acid esterase activity from *Schizophyllum commune* 54(5): 1170-1173.

Macris BJ. (1984). Enhanced cellulase and  $\beta$ -glucosidase production by a mutant of *Alternaria alternata*. *Biotechnol. Bioeng.* 26: 194-196.

Magan N y Aldred D. (2007). Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *Int. J. Food Microbiol.* 119: 131-139.

Mäkelä MR, Dilokpimol A, Koskela SM, Kuuskeri J, de Vries RP y Hildén K. (2018). Characterization of a feruloyl esterase from *Aspergillus terreus* facilitates the division of fungal enzymes from Carbohydrate Esterase family 1 of the carbohydrate-active enzymes (CAZy) database. *Microb. Biotechnol.* 11(5): 869-880.

Mäkelä MR, Donofrio N y De Vries RP. (2014). Plant biomass degradation by fungi. *Fungal Genet. Biol.* 72: 2-9.

Manisha y Yadav SK. (2017). Technological advances and applications of hydrolytic enzymes for valorization of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 245: 1727-1739.

Manore M, Meeusen R, Roelands B, Moran S, Popple AD, Naylor MJ, Burke LM, Stear SJ y Castell LM. (2011). BJSM reviews: A-Z of nutritional supplements: dietary supplements, sports nutrition foods and ergogenic aids for health and performance-Part 16. *Br. J. Sports Med.* 45(1): 73-74.

Mao L, Meng P, Zhou C, Ma L, Zhang G y Ma Y. (2012). Molecular cloning and heterologous expression of an acid stable xylanase gene from *Alternaria* sp. HB186. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 777-784.

Marchler-Bauer A, Bo Y, Han L, He J, Lanczycki CJ, Lu S, Chitsaz F, Derbyshire MK, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, Hurwitz DI, Lu F, Marchler GH, Song JS, et al. (2017). CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Res.* 45(D1): D200-D203.

Marešová L y Sychrová H. (2007). Applications of a microplate reader in yeast physiology research. *Biotechniques* 43(5): 667-672.

Mariscal R, Maireles-Torres P, Ojeda M, Sádaba I y López Granados M. (2016). Furfural: a renewable and versatile platform molecule for the synthesis of chemicals and fuels. *Energy Environ. Sci.* 9(4): 1144-1189.

Marmuse L, Asther M, Fabre E, Navarro D, Lesage-Meessen L, Asther M, O'Donohue M, Fort S y Driguez H. (2008). New chromogenic substrates for feruloyl esterases. *Org. Biomol. Chem.* 6(7): 1208.

Marmuse L, Asther MM, Navarro D, Lesage-Meessen L, Asther MM, Fort S y Driguez H. (2007). Chromogenic substrates for feruloyl esterases. *Carbohydr. Res.* 342(15): 2316-2321.

Martín JF, Ullán R V. y García-Estrada C. (2010). Regulation and compartmentalization of  $\beta$ -lactam biosynthesis. *Microb. Biotechnol.* 3(3): 285-299.

Martínez AT, Speranza M, Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, Martínez MJ, Gutiérrez A y del Río JC. (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int. Microbiol.* 8(3): 195-204.

Martínez D, Berka RM, Henrissat B, Saloheimo M, Arvas M, Baker SE, Chapman J,

- Chertkov O, Coutinho PM, Cullen D, Danchin EGJ, Grigoriev I V, Harris P, Jackson M, Kubicek CP, *et al.* (2008). Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nat. Biotechnol.* 26(5): 553-560.
- Martorell MM, Ruberto LAM, Fernández PM, Castellanos de Figueroa LI y Mac Cormack WP. (2017). Bioprospection of cold-adapted yeasts with biotechnological potential from Antarctica. *J. Basic Microbiol.* 57(6): 504-516.
- Mateo R, Medina A, Gimeno-Adelantado J V. y Jiménez M. (2004). An overview on the status of toxigenic fungi and mycotoxins in Spain. En: Logrieco, A. y Visconti, A. (eds.) *An Overv. Toxigenic Fungi Mycotoxins Eur.* Dordrecht, Países Bajos: Springer Netherlands, 219-235.
- Mathew S y Abraham TE. (2004). Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 24(2-3): 59-83.
- Mathew S y Abraham TE. (2005). Studies on the production of feruloyl esterase from cereal brans and sugar cane bagasse by microbial fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 36: 565-570.
- Mathew S y Abraham TE. (2006). Bioconversions of ferulic acid, an hydroxycinnamic acid. *Crit. Rev. Microbiol.* 32(3): 115-125.
- Mattanovich D, Graf A, Stadlmann J, Dragosits M, Redl A, Maurer M, Kleinheinz M, Sauer M, Altmann F y Gasser B. (2009). Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*. *Microb. Cell Fact.* 8: 29.
- Mattanovich D, Sauer M y Gasser B. (2016). Industrial microorganisms: *Pichia pastoris*. En: Wittmann, C. y Liao, J. C. (eds.) *Ind. Biotechnol.* Weinheim, Alemania: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 687-714.
- Mattéotti C, Bauwens J, Brasseur C, Tarayre C, Thonart P, Destain J, Francis F, Haubruge E, De Pauw E, Portetelle D y Vandenberg M. (2012). Identification and characterization of a new xylanase from Gram-positive bacteria isolated from termite gut (*Reticulitermes santonensis*). *Protein Expr. Purif.* 83(2): 117-127.
- Mattila P, Pihlava JM y Hellström J. (2005). Contents of phenolic acids, alkyl- and alkenylresorcinols, and avenanthramides in commercial grain products. *J. Agric. Food Chem.* 53(21): 8290-8295.
- McAuley KE, Svendsen A, Patkar SA y Wilson KS. (2004). Structure of a feruloyl esterase from *Aspergillus niger*. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 60(5): 878-887.
- McCallum JA, Taylor IEP y Towers GHN. (1991). Spectrophotometric assay and electrophoretic detection of trans-feruloyl esterase activity. *Anal. Biochem.* 196(2): 360-366.
- McCrae SI, Leith KM, Gordon AH y Wood TM. (1994). Xylan-degrading enzyme system produced by the fungus *Aspergillus awamori*: Isolation and characterization of a feruloyl esterase and a p-coumaroyl esterase. *Enzyme Microb. Technol.* 16(10): 826-834.
- McKelvey SM y Murphy RA. (2017). Biotechnological use of fungal enzymes. En: Kavanagh, K. (ed.) *Fungi Biol. Appl.* Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 201-225.
- McLaughlin DJ, Hibbett DS, Lutzoni F, Spatafora JW y Vilgalys R. (2009). The search for the fungal tree of life. *Trends Microbiol.* 17(11): 488-497.
- McNeill J, Barrie FR, Buck WR, Demoulin V, Greuter W, Hawksworth DL, Herendeen PS, Knapp S, Marhold K, Prado J, Prud Homme Van Reine WF, Smith GF, Wiersema JH y Turland NJ. (2012). *International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code)*. *Regnum Vegetabile 154*. Köeningstein, Alemania: Koeltz Scientific Books.
- McNeill J y Turland NJ. (2011). Major changes to the Code of Nomenclature - Melbourne, July 2011. *Taxon* 60(5): 1495-1497.
- Mellitzer A, Weis R, Glieder A y Flicker K. (2012). Expression of lignocellulolytic enzymes in *Pichia pastoris*. *Microb. Cell Fact.* 11(1): 61.
- Menon V y Rao M. (2012). Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Prog. Energy Combust. Sci.* 38(4): 522-550.
- Mes-Hartree M, Hogan CM y Saddler JN.

- (1988). Influence of growth substrate on production of cellulase enzymes by *Trichoderma harzianum* E58. *Biotechnol. Bioeng.* 31: 725-729.
- Micard V, Renard CMGC y Thibault JF. (1996). Enzymatic saccharification of sugar-beet pulp. *Enzyme Microb. Technol.* 19(3): 162-170.
- Michel F, Thibault J-F, Barry J-L y de Baynast R. (1988). Preparation and characterisation of dietary fibre from sugar beet pulp. *J. Sci. Food Agric.* 42: 77-85.
- Miettinen-Oinonen A, Paloheimo M, Lantto R y Suominen P. (2005). Enhanced production of cellobiohydrolases in *Trichoderma reesei* and evaluation of the new preparations in biofinishing of cotton. *J. Biotechnol.* 116(3): 305-317.
- Miller JH. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Nueva York, EEUU: Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.
- Milne GWA y Delander M. (2007). *Vitamin D Handbook: structures, synonyms, and properties*. Hoboken, Nueva Jersey, Estados Unidos: John Wiley & Sons, Inc.
- Minatel I, Francisqueti F, Corrêa C y Lima G. (2016). Antioxidant activity of  $\gamma$ -oryzanol: a complex network of interactions. *Int. J. Mol. Sci.* 17(8): 1107.
- Ministerio de Agricultura y Pesca Alimentación y Medio Ambiente. (2014). *Remolacha Azucarera*. Disponible en: <http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/cultivos-herbaceos/remolacha-azucarera/> (Accedido: 20 de marzo de 2018).
- Ministerio de Agricultura y Pesca Alimentación y Medio Ambiente. (2017). *Anuario de Estadística Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente 2016*. Madrid.
- Mitchell NJ, Bowers E, Hurburgh C y Wu F. (2016). Potential economic losses to the US corn industry from aflatoxin contamination. *Food Addit. Contam. Part A* 33(3): 540-550.
- Mizuno T, Shiono Y y Koseki T. (2014). Biochemical characterization of *Aspergillus oryzae* native tannase and the recombinant enzyme expressed in *Pichia pastoris*. *J. Biosci. Bioeng.* 118(4): 392-395.
- Mohanram S, Amat D, Choudhary J, Arora A y Nain L. (2013). Novel perspectives for evolving enzyme cocktails for lignocellulose hydrolysis in biorefineries. *Sustain. Chem. Process.* 1: 15.
- Monod M, Capoccia S, Lécenne B, Zaugg C, Holdom M y Jousson O. (2002). Secreted proteases from pathogenic fungi. *Int. J. Med. Microbiol.* 292(5-6): 405-419.
- Morales-Ortega A, Niño-Medina G, Carvajal-Millán E, Gardea-Béjar A, Torres-Chávez P, López-Franco Y, Rascón-Chu A y Lizardi-Mendoza J. (2013). Ferulated arabinoxylans from cereals. A review of their physico-chemical characteristics and gelling capability. *Rev. Fitotec. Mex* 36(4): 439-446.
- Moukoui M, Topakas E y Christakopoulos P. (2008). Cloning, characterization and functional expression of an alkali-tolerant type C feruloyl esterase from *Fusarium oxysporum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79(2): 245-254.
- Mudarri D y Fisk WJ. (2007). Public health and economic impact of dampness and mold. *Indoor Air* 17(3): 226-235.
- Mueller GM, Bills GF y Foster MS. (2004). *Biodiversity of Fungi: inventory and monitoring methods*. Burlington, Massachusetts, EEUU: Elsevier Academic Press.
- Müller V, Bonacci G, Batthyany C, Amé M V., Carrari F, Gioco J y Asis R. (2017). Peanut seed cultivars with contrasting resistance to *Aspergillus parasiticus* colonization display differential temporal response of protease inhibitors. *Phytopathology* 107: 474-482.
- Mullis KB y Faloona FA. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. En: Colowick, S. P. y Kaplan, N. O. (eds.) *Methods Enzymol.* Nueva York, EEUU: Academic Press, Inc., 335-350.
- Muralikrishna G y Subba Rao MVSST. (2007). Cereal non-cellulosic polysaccharides: structure and function relationship—an overview. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 47(6): 599-610.
- Mythili A, Babu Singh YR, Priya R, Shafeeq Hassan A, Manikandan P, Panneerselvam K, Narendran V y Shobana CS. (2014). In vitro and comparative study on the extracellular enzyme activity of molds isolated from keratomycosis and

soil. *Int. J. Ophthalmol.* 7(5): 778-784.

## N

Najah M, Calbrix R, Mahendra-Wijaya IP, Beneyton T, Griffiths AD y Drevelle A. (2014). Droplet-based microfluidics platform for ultra-high-throughput bioprospecting of cellulolytic microorganisms. *Chem. Biol.* 21: 1722-1732.

Nam HY, Na EJ, Lee E, Kwon Y y Kim H-J. (2017). Antiepileptic and neuroprotective effects of oleamide in rat striatum on kainate-induced behavioral seizure and excitotoxic damage via calpain inhibition. *Front. Pharmacol.* 8: 817.

Naranjo-Briceño L, Pernía B, Guerra M, Demey JR, De Sisto Á, Inojosa Y, González M, Fusella E, Freitas M y Yegres F. (2013). Potential role of oxidative exoenzymes of the extremophilic fungus *Pestalotiopsis palmarum* BM-04 in biotransformation of extra-heavy crude oil. *Microb. Biotechnol.* 6: 720-730.

Narayanan R, Vijila K y Kumutha K. (2010). Intergeneric protoplast fusion of yeast for high ethanol production from cheese industry waste – Whey. *Yeast* 1(5): 81-87.

Navarrete M, Callegari E y Eyzaguirre J. (2012). The effect of acetylated xylan and sugar beet pulp on the expression and secretion of enzymes by *Penicillium purpurogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93(2): 723-741.

Nazareth S y Mavinkurve S. (1986). Degradation of ferulic acid via 4-vinylguaiacol by *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. *Can. J. Microbiol.* 32: 494-497.

Nees von Esenbeck CG. (1816). *Das system der pilze und schwämme. Ein versuch von dr. C.G. Nees von Esenbeck.* Würzburg, Alemania: In der Stahelschen buchhandlung.

Nevalainen KMH, Te'o VSJ y Bergquist PL. (2005). Heterologous protein expression in filamentous fungi. *Trends Biotechnol.* 23(9): 468-474.

Nickoloff JA. (2010). Electroporation. En: Maccarrone, M., Clarke, A., Zheng, Y., Tickle, C., Kehrler-Sawatzki, H., Cooper, D. N., Delves, P., Pettis, G., Candi, E., Perkel, D. J., Hetherington, A. M., Bynum, W. F., Valpuesta, J. M., y Harper, D. (eds.) *Encycl. Life Sci.* Chichester, Reino Unido: John Wiley & Sons, Ltd,

1-3.

Nielsen D, Gyllberg H, Östlund P, Bergman T y Bedecs K. (2004). Increased levels of insulin and insulin-like growth factor-1 hybrid receptors and decreased glycosylation of the insulin receptor alpha- and beta-subunits in scrapie-infected neuroblastoma N2a cells. *Biochem. J.* 380: 571-579.

Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S y Heijne G Von. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* 10: 1-6.

Nieter A, Haase-Aschoff P, Linke D, Nimitz M y Berger RG. (2014). A halotolerant type A feruloyl esterase from *Pleurotus eryngii*. *Fungal Biol.* 118(3): 348-357.

Nilsen TW. (2003). The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell? *BioEssays* 25(12): 1147-1149.

Nobles MK. (1948). Studies in forest pathology: VI. Identification of cultures of wood-rotting fungi. *Can. J. Res.* 26c(3): 281-431.

Nordkvist E, Salomonsson A-C y Åman P. (1984). Distribution of insoluble bound phenolic acids in barley grain. *J. Sci. Food Agric.* 35(6): 657-661.

Noser J, Schneider P, Rother M y Schmutz H. (2011). Determination of six *Alternaria* toxins with UPLC-MS/MS and their occurrence in tomatoes and tomato products from the Swiss market. *Mycotoxin Res.* 27(4): 265-271.

## O

O'Farrell PH. (1975). High resolution Two-Dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250(10): 4007-4021.

Oakley BR, Kirsch DR y Morris NR. (1980). A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 105(1): 361-363.

Octave S y Thomas D. (2009). Biorefinery: Toward an industrial metabolism. *Biochimie* 91(6): 659-664.

Oda K, Kakizono D, Yamada O, Iefuji H, Akita O y Iwashita K. (2006). Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae*

- grown under submerged and solid-state culture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(5): 3448-57.
- Okuyama M, Saburi W, Mori H y Kimura A. (2016).  $\alpha$ -Glucosidases and  $\alpha$ -1,4-glucan lyases: structures, functions, and physiological actions. *Cell. Mol. Life Sci.* 73(14): 2727-2751.
- Oleas G, Callegari E, Sepúlveda R y Eyzaguirre J. (2016). Properties of two novel esterases identified from culture supernatant of *Penicillium purpurogenum* grown on sugar beet pulp. *Insights Enzym. Res.* 1(1): 801-10.
- Oleas G, Callegari E, Sepúlveda R y Eyzaguirre J. (2017). Heterologous expression, purification and characterization of three novel esterases secreted by the lignocellulolytic fungus *Penicillium purpurogenum* when grown on sugar beet pulp. *Carbohydr. Res.* 443-444(12): 42-48.
- de Oliveira DM, Finger-Teixeira A, Rodrigues Mota T, Salvador VH, Moreira-Vilar FC, Correa Molinari HB, Craig Mitchell RA, Marchiosi R, Ferrarese-Filho O y Dantas dos Santos W. (2015). Ferulic acid: a key component in grass lignocellulose recalcitrance to hydrolysis. *Plant Biotechnol. J.* 13: 1224-1232.
- de Oliveira JMPF y de Graaff LH. (2011). Proteomics of industrial fungi: trends and insights for biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89(2): 225-237.
- Ou S y Kwok K-C. (2004). Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *J. Sci. Food Agric.* 84(11): 1261-1269.
- Ozkilinc H y Sevinc U. (2018). Molecular phylogenetic species in *Alternaria* pathogens infecting pistachio and wild relatives. *3 Biotech* 8: 250.
- P**
- Packer NH, Lawson MA, Jardine DR, Sanchez J-C y Gooley AA. (1998). Analyzing glycoproteins separated by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 19(6): 981-988.
- Palaniswamy SK y Govindaswamy V. (2017). A zymogram technique for preliminary screening and characterization of feruloyl esterases. *Enzyme Microb. Technol.* 101: 57-59.
- Pallez M, Pasquali M, Bohn T, Hoffmann L y Beyer M. (2014). Validation of a quick PCR method suitable for direct sequencing: identification of *Fusarium* fungal species and chemotypes for preventive approaches in food safety. *Food Technol. Biotechnol.* 52(3): 351-358.
- Panagiotou G, Granouillet P y Olsson L. (2006). Production and partial characterization of arabinoxylan-degrading enzymes by *Penicillium brasilianum* under solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 1117-1124.
- Panagiotou G, Olavarria R y Olsson L. (2007). *Penicillium brasilianum* as an enzyme factory; the essential role of feruloyl esterases for the hydrolysis of the plant cell wall. *J. Biotechnol.* 130(3): 219-228.
- Pangallo D, Kraková L, Chovanová K, Bučková M, Puškarová A y Šimonovičová A. (2013). Disclosing a crypt: Microbial diversity and degradation activity of the microflora isolated from funeral clothes of Cardinal Peter Pázmány. *Microbiol. Res.* 168: 289-299.
- Papagianni M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol. Adv.* 22: 189-259.
- Papagianni M. (2014). Characterization of fungal morphology using digital image analysis techniques. *J. Microb. Biochem. Technol.* 6(4): 189-194.
- Parisutham V, Chandran S-P, Mukhopadhyay A, Lee SK y Keasling JD. (2017). Intracellular cellobiose metabolism and its applications in lignocellulose-based biorefineries. *Bioresour. Technol.* 239: 496-506.
- Pariza MW y Cook M. (2010). Determining the safety of enzymes used in animal feed. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 56: 332-342.
- Pariza MW y Johnson EA. (2001). Evaluating the safety of microbial enzyme preparations used in food processing: Update for a new century. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 33: 173-186.
- Parrent J, James TY, Vasaitis R y Taylor AF. (2009). Friend or foe? Evolutionary history of glycoside hydrolase family 32 genes encoding for sucrolytic activity in fungi and its implications for plant-fungal symbioses. *BMC Evol. Biol.* 9(1): 148.
- Paterson RRM y Lima N. (2010). How will

- climate change affect mycotoxins in food? *Food Res. Int.* 43(7): 1902-1914.
- Payne CM, Knott BC, Mayes HB, Hansson H, Himmel ME, Sandgren M, Ståhlberg J y Beckham GT. (2015). Fungal cellulases. *Chem. Rev.* 115: 1308-1448.
- Peralta RM, da Silva BP, Gomes Côrrea RC, Kato CG, Vicente Seixas FA y Bracht A. (2017). Enzymes from Basidiomycetes—peculiar and efficient tools for biotechnology. En: *Biotechnol. Microb. Enzym.* Elsevier, 119-149.
- Pérez-Fuentes C, Cristina Ravanal M y Eyzaguirre J. (2014). Heterologous expression of a *Penicillium purpurogenum* pectin lyase in *Pichia pastoris* and its characterization. *Fungal Biol.* 118(5-6): 507-515.
- Pérez-Morales GG, Ramírez-Coronel A, Guzmán-López O, Cruz-Sosa F, Perraud-Gaime I, Roussos S y Saucedo-Castañeda G. (2011). Feruloyl esterase activity from coffee pulp in solid-state fermentation. *Food Technol. Biotechnol.* 49(3): 352-358.
- Pérez J, Muñoz-Dorado J, de la Rubia T y Martínez J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiol.* 5(2): 53-63.
- Pergande M y Cologna S. (2017). Isoelectric point separations of peptides and proteins. *Proteomes* 5(1): 4.
- Perkins DN, Pappin DJC, Creasy DM y Cottrell JS. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20(18): 3551-3567.
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G y Nielsen H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* 8(10): 785-786.
- Petit J, Boisseau P y Arveiler B. (1994). Glucanex: a cost-effective yeast lytic enzyme. *Trends Genet.* 10(1): 4-5.
- Piscitelli A, Pezzella C, Giardina P, Faraco V y Sannia G. (2010). Heterologous laccase production and its role in industrial applications. *Bioeng. Bugs* 1(4): 254-264.
- Pitt JI. (2002). Biology and ecology of toxigenic *Penicillium* species. En: DeVries, J. W., Trucksess, M. W., y Jackson, L. S. (eds.) *Mycotoxins Food Saf.* Boston, EEUU: Springer US, 29-41.
- Pointing SB. (1999). Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. *Fungal Divers.* 2: 17-33.
- Polizeli MLTM, Rizzatti ACS, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA y Amorim DS. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67(5): 577-591.
- Prates JA, Tarbouriech N, Charnock SJ, Fontes CM, Ferreira LM y Davies GJ. (2001). The structure of the feruloyl esterase module of xylanase 10B from *Clostridium thermocellum* provides insights into substrate recognition. *Structure* 9: 1183-1190.
- Prielhofer R, Cartwright SP, Graf AB, Valli M, Bill RM, Mattanovich D y Gasser B. (2015). *Pichia pastoris* regulates its gene-specific response to different carbon sources at the transcriptional, rather than the translational, level. *BMC Genomics* 16(1): 167.
- Prim N, Pastor FIJ y Diaz P. (2002). Zymographic detection of cinnamic acid decarboxylase activity. *J. Microbiol. Methods* 51: 417-420.
- Pryor BM y Gilbertson RL. (2000). Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. *Mycol. Res.* 104(11): 1312-1321.
- Pryor BM y Michailides TJ. (2002). Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with *Alternaria* late blight of pistachio. *Phytopathology* 92(4): 406-416.
- Punt PJ, van Biezen N, Conesa A, Albers A, Mangnus J y van den Hondel C. (2002). Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends Biotechnol.* 20(5): 200-206.
- Puxbaum V, Mattanovich D y Gasser B. (2015). Quo vadis? The challenges of recombinant protein folding and secretion in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99(7): 2925-2938.

## Q

Qi M, Wang P, Selinger LB, Yanke LJ, Forster RJ y Mcallister TA. (2011). Isolation and characterization of a ferulic acid esterase (Fae1A) from the rumen fungus *Anaeromyces mucronatus*. *J. Appl. Microbiol.* 110(5): 1341-1350.

Quiza M, Downton M, Perry KJ y Sexton PM. (1997). Electrophoretic mobility and glycosylation characteristics of heterogeneously expressed calcitonin receptors. *Endocrinology* 138(2): 530-539.

## R

Rabert C, Weinacker D, Pessoa Jr A y Fariás JG. (2013). Recombinant proteins for industrial uses: utilization of *Pichia pastoris* expression system. *Brazilian J. Microbiol.* 44(2): 351-356.

Rabilloud T y Lelong C. (2011). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. *J. Proteomics* 74(10): 1829-1841.

Rahman MS, Fernando S, Ross B, Wu J y Qin W. (2018). Endoglucanase (EG) activity assays. En: Lübeck, M. (ed.) *Cell. Methods Mol. Biol.* Nueva York, EEUU: Humana Press, 169-183.

Ralet MC, Faulds CB, Williamson G y Thibault JF. (1994a). Degradation of feruloylated oligosaccharides from sugar-beet pulp and wheat bran by ferulic acid esterases from *Aspergillus niger*. *Carbohydr. Res.* 263(2): 257-269.

Ralet MC, Thibault JF, Faulds CB y Williamson G. (1994b). Isolation and purification of feruloylated oligosaccharides from cell walls of sugar-beet pulp. *Carbohydr. Res.* 263: 227-241.

Ramchuran S, Mateus B, Holst O y Karlsson E. (2005). The methylotrophic yeast *Pichia pastoris* as a host for the expression and production of thermostable xylanase from the bacterium *Rhodothermus marinus*. *FEMS Yeast Res.* 5(9): 839-850.

Ramírez-Velasco L, Armendáriz-Ruiz M, Alberto Rodríguez-González J, Müller-Santos M, Asaff-Torres A y Carlos Mateos-Díaz J. (2016). From classical to high throughput screening methods for feruloyl esterases: a review. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 19(8): 616-626.

Ramírez L, Arrizon J, Sandoval G, Cardador

A, Bello-Mendoza R, Lappe P y Mateos-Díaz JC. (2008). A new microplate screening method for the simultaneous activity quantification of feruloyl esterases, tannases, and chlorogenate esterases. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 151: 711-723.

Ramos-de-la-Peña AM y Contreras-Esquivel JC. (2016). Methods and substrates for feruloyl esterase activity detection, a review. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 130: 74-87.

Rao M, Gaikwad S, Mishra C y Deshpande V. (1988). Induction and catabolite repression of cellulase in *Penicillium funiculosum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 19(2): 129-137.

Raper KB, Alexander DF y Coghill RD. (1944). Penicillin. Natural variation and penicillin production in *Penicillium notatum* and allied species. *J. Bacteriol.* 48(6): 639-59.

Rasane P, Jha A, Sabikhi L, Kumar A y Unnikrishnan VS. (2015). Nutritional advantages of oats and opportunities for its processing as value added foods - a review. *J. Food Sci. Technol.* 52(2): 662-675.

Rashamuse K, Ronneburg T, Sanyika W, Mathiba K, Mmutlane E y Brady D. (2014). Metagenomic mining of feruloyl esterases from termite enteric flora. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98: 727-737.

Rashamuse KJ, Burton SG y Cowan DA. (2007). A novel recombinant ethyl ferulate esterase from *Burkholderia multivorans*. *J. Appl. Microbiol.* 103: 1610-1620.

Ravalason H, Grisel S, Chevret D, Favel A, Berrin JG, Sigoillot JC y Herpoël-Gimbert I. (2012). *Fusarium verticillioides* secretome as a source of auxiliary enzymes to enhance saccharification of wheat straw. *Bioresour. Technol.* 114: 589-596.

Ravalason H, Jan G, Mollé D, Pasco M, Coutinho PM, Lapierre C, Pollet B, Bertaud F, Petit-Conil M, Grisel S, Sigoillot J-C, Asther M y Herpoël-Gimbert I. (2008). Secretome analysis of *Phanerochaete chrysosporium* strain CIRM-BRFM41 grown on softwood. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80(4): 719-33.

Record E, Asther M, Sigoillot C, Pagès S, Punt PJ, Delattre M, Haon M, Van Den Hondel CAMJJ, Sigoillot JC, Lesage-Meessen L y Asther M. (2003). Overproduction of the *Aspergillus niger*



feruloyl esterase for pulp bleaching application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62(4): 349-355.

Reis FS, Ćirić A, Stojković D, Barros L, Ljaljević-Grbić M, Soković M y Ferreira ICFR. (2015). Effects of different culture conditions on biological potential and metabolites production in three *Penicillium* isolates. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 41(2): 253-262.

Revilla G y Zarra I. (2013). Fisiología vegetal. Introducción a las células de las plantas: membranas y pared. En: Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (eds.) *Fundam. Fisiol. Veg.* 2.ª ed. Madrid, España: McGraw-Hill-Interamericana de España SL, 3-24.

Richards TA, Leonard G y Wideman JG. (2017). What Defines the «Kingdom» Fungi? *Microbiol. Spectr.* 5(3): 1-21.

Ridgway R. (1912). *Color standards and color nomenclature*. Washington D. C: EEUU: Publicado por el autor.

Robl D, da Silva Delabona P, Montanari Mergel C, Rojas JD, dos Santos Costa P, Chapaval Pimentel I, Vicente VA, da Cruz Pradella JG y Padilla G. (2013). The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes. *BMC Biotechnol.* 13(1): 94.

Rodríguez-Castro R. (2017). *Identificación y caracterización de las enzimas feruloil esterases PcFaeA y PcFaeB de Penicillium chrysogenum para la valorización de residuos agroindustriales. Escalado y análisis proteómico de la producción de extractos enzimáticos enriquecidos en PcFaeB* (Tesis Doctoral). Universidad de León.

Rodríguez RJ, White Jr JF, Arnold AE y Redman RS. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol.* 182: 314-330.

Romanelli AM, Fu J, Herrera ML y Wickes BL. (2014). A universal DNA extraction and PCR amplification method for fungal rDNA sequence-based identification. *Mycoses* 57(10): 612-622.

Rosenfeld SA. (1999). Use of *Pichia pastoris* for expression of recombinant proteins. *Methods Enzymol.* 306: 154-169.

Rosgaard L, Pedersen S y Meyer AS. (2007). Comparison of different pretreatment strategies for enzymatic hydrolysis of wheat and barley straw. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 143: 284-296.

Rots NY, Iavarone A, Bromleigh V y Freedman LP. (1999). Induced differentiation of U937 cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3 involves cell cycle arrest in G1 that is preceded by a transient proliferative burst and an increase in cyclin expression. *Blood* 93(8): 2721-2729.

Rovio S, Simolin H, Koljonen K y Sirén H. (2008). Determination of monosaccharide composition in plant fiber materials by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 1185: 139-144.

Roze L V., Hong S-Y y Linz JE. (2013). Aflatoxin biosynthesis: current frontiers. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 4(1): 293-311.

Ruiz HA, Rodríguez-Jasso RM, Hernandez-Almanza A, Contreras-Esquivel JC y Aguilar CN. (2017). Pectinolytic enzymes. En: Pandey, A., Negi, S., y Soccol, C. R. (eds.) *Curr. Dev. Biotechnol. Bioeng. Isol. Purif. Ind. Prod.* San Diego, California, EEUU: Elsevier, 47-71.

## S

de Sá LRV, de Oliveira MAL, Cammarota MC, Matos A y Ferreira-Leitão VS. (2011). Simultaneous analysis of carbohydrates and volatile fatty acids by HPLC for monitoring fermentative biohydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* 36(23): 15177-15186.

Sabnis RW. (2008). *Handbook of acid-base indicators*. Nueva York, EEUU: CRC Press.

Sachan A, Mishra S, Singh S y Nigam VK. (2014). Production of ferulic acid esterase from *Trichophyton ajelloi* MTCC 4878. *Int. J. Basic Appl. Biol.* 2(2): 13-17.

Sakamoto T, Nishimura S, Kato T, Sunagawa Y, Tsuchiyama M y Kawasaki H. (2005). Efficient extraction of ferulic acid from sugar beet pulp using the culture supernatant of *Penicillium chrysogenum*. *J. Appl. Glycosci.* 52(2): 115-120.

Salinas A, Vega M, Lienqueo ME, Garcia A, Carmona R y Salazar O. (2011). Cloning of novel cellulases from cellulolytic fungi: heterologous expression of a family 5 glycoside hydrolase from *Trametes versicolor* in *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb. Technol.* 49(6-7): 485-491.

Saltmarsh M. (2013). *Essential guide to food additives*. 4.ª ed. Cambridge, Reino Unido: Royal Society of Chemistry.

- Sambrook J y Russell DW. (2001). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Nueva York, EEUU: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sang SL, Li G, Hu XP y Liu YH. (2011). Molecular cloning, overexpression and characterization of a novel feruloyl esterase from a soil metagenomic library. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 20(4): 196-203.
- Sanger F, Nicklen S y Coulson AR. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74(12): 5463-5467.
- Santiago IF, Gonçalves VN, Gómez-Silva B, Galetovic A y Rosa LH. (2018). Fungal diversity in the Atacama Desert. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1-16.
- Santos-Beneit F, Rodriguez-Garcia A y Martin JF. (2011). Complex transcriptional control of the antibiotic regulator *afsS* in *Streptomyces*: PhoP and AfsR are overlapping, competitive activators. *J. Bacteriol.* 193(9): 2242-2251.
- Saulnier L y Thibault J-F. (1999). Ferulic acid and diferulic acids as components of sugar-beet pectins and maize bran heteroxylans. *J. Sci. Food Agric.* 79(3): 396-402.
- Sazci A, Erenler K y Radford A. (1986). Detection of cellulolytic fungi by using Congo red as an indicator: a comparative study with the dinitrosalicylic acid reagent method. *J. Appl. Bacteriol.* 61: 559-562.
- Schade JE y King AD. (1984). Analysis of the major *Alternaria* toxins. *J. Food Prot.* 47(12): 978-995.
- Scheller HV y Ulvskov P. (2010). Hemicelluloses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61(1): 263-289.
- Schlaak C, Hoffmann P, May K y Weimann A. (2005). Desalting minimal amounts of DNA for electroporation in *E. coli*: a comparison of different physical methods. *Biotechnol. Lett.* 27(14): 1003-1005.
- Schmitt ME, Brown TA y Trumpower BL. (1990). A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 18(10): 3091-3092.
- Schubot FD, Kataeva IA, Blum DL, Shah AK, Ljungdahl LG, Rose JP y Wang B-C. (2001). Structural basis for the substrate specificity of the feruloyl esterase domain of the cellulosomal xylanase Z from *Clostridium thermocellum*. *Biochemistry* 40(42): 12524-12532.
- De Schutter K, Lin Y-C, Tiels P, Van Hecke A, Glinka S, Weber-Lehmann J, Rouzé P, Van de Peer Y y Callewaert N. (2009). Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nat. Biotechnol.* 27(6): 561-566.
- Sewalt V, Shanahan D, Gregg L, La Marta J y Carrillo R. (2016). The generally recognized as safe (GRAS) process for industrial microbial enzymes. *Ind. Biotechnol.* 12(5): 295-302.
- Sgarbossa A, Giacomazza D y di Carlo M. (2015). Ferulic acid: a hope for Alzheimer's disease therapy from plants. *Nutrients* 7(7): 5764-5782.
- Shahidan NH, Rahman RNZA, Leow TC, Rosfarizan M, Basri M y Salleh AB. (2011). The effect of carbon sources on the expression level of thermostable L2 lipase in *Pichia pastoris*. *African J. Biotechnol.* 10(62): 13528-13535.
- Shang Z, Khalil Z, Li L, Salim AA, Quezada M, Kalansuriya P y Capon RJ. (2016). Roseopurpurins: Chemical diversity enhanced by convergent biosynthesis and forward and reverse Michael additions. *Org. Lett.* 18(17): 4340-4343.
- Shearer CA, Descals E, Kohlmeyer B, Kohlmeyer J, Marvanová L, Padgett D, Porter D, Raja HA, Schmit JP, Thorton HA y Voglymayr H. (2007). Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodivers. Conserv.* 16: 49-67.
- Shewry PR, Hawkesford MJ, Piironen V, Lampi AM, Gebruers K, Boros D, Andersson AAM, Åman P, Rakszegi M, Bedo Z y Ward JL. (2013). Natural variation in grain composition of wheat and related cereals. *J. Agric. Food Chem.* 61: 8295-8303.
- Shibuya N. (1984). Phenolic acids and their carbohydrate esters in rice endosperm cell walls. *Phytochemistry* 23(10): 2233-2237.
- Shin HD y Chen RR. (2007). A type B feruloyl esterase from *Aspergillus nidulans* with broad pH applicability. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73: 1323-1330.
- Sibanda T, Selvarajan R, Tekere M, Nyoni H y Meddows-Taylor S. (2017). Potential

- biotechnological capabilities of cultivable mycobiota from carwash effluents. *Microbiologyopen* 6(5): e00498.
- Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Soding J, Thompson JD y Higgins DG. (2014). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7(1): 539.
- da Silva RR, Pedezzi R y Souto TB. (2017). Exploring the bioprospecting and biotechnological potential of white-rot and anaerobic *Neocallimastigomycota* fungi: peptidases, esterases, and lignocellulolytic enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101(8): 3089-3101.
- Singh R, Kumar M, Mittal A y Mehta PK. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech* 6(2): 174.
- Siqueira V, Oliveira H, Santos C, Paterson RR, Gusmão N y Lima N. (2011). Filamentous fungi in drinking water, particularly in relation to biofilm formation. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 8: 456-469.
- Sivagnanam K, Komatsu E, Rampitsch C, Perreault H y Gräfenhan T. (2017). Rapid screening of *Alternaria* mycotoxins using MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.* 97: 357-361.
- Skóra J, Otlewska A, Gutarowska B, Leszczyńska J, Majak I y Stępień Ł. (2015). Production of the allergenic protein Alt a 1 by *Alternaria* isolates from working environments. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 12: 2164-2183.
- Skrinjar M, Stubblefield RD, Vujčić IF y Stojanović E. (1992). Distribution of aflatoxin-producing moulds and aflatoxins in dairy cattle feed and raw milk. *Acta Microbiol. Hung.* 39(2): 175-179.
- Sławińska A, Fornal E, Radzki W, Skrzypczak K, Zalewska-Korona M, Michalak-Majewska M, Parfieniuk E y Stachniuk A. (2016). Study on vitamin D2 stability in dried mushrooms during drying and storage. *Food Chem.* 199: 203-209.
- Smith MM y Hartley RD. (1983). Occurrence and nature of ferulic acid substitution of cell-wall polysaccharides in graminaceous plants. *Carbohydr. Res.* 118: 65-80.
- Sommer A y Lewis MJ. (1971). Effect of dithiothreitol on yeast: sphaeroplast formation and invertase release. *J. Gen. Microbiol.* 68(3): 327-335.
- Song W, Han X, Qian Y, Liu G, Yao G, Zhong Y y Qu Y. (2016). Proteomic analysis of the biomass hydrolytic potentials of *Penicillium oxalicum* lignocellulolytic enzyme system. *Biotechnol. Biofuels* 9(1): 68.
- Sørensen A, Lübeck M, Lübeck P y Ahring B. (2013). Fungal beta-glucosidases: A bottleneck in industrial use of lignocellulosic materials. *Biomolecules* 3: 612-631.
- Southern EM. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98(3): 503-517.
- de Souza Moreira LR, Corrêa CL, Gomes HAR, Midorikawa GEO, Miller RNG y Ximenes Ferreira Filho E. (2017). The role of fungal transcriptome analysis and side-chain hydrolyzing enzymes in sugarcane bagasse breakdown. En: *Adv. Basic Sci. Second Gener. Bioethanol from Sugarcane*. Cham, Suiza: Springer International Publishing, 81-106.
- de Souza WR. (2013). Microbial degradation of lignocellulosic biomass. En: Chandel, A. y da Silvia, S. S. (eds.) *Sustain. Degrad. Lignocellul. Biomass - Tech. Appl. Commer.* Rijeka, Croacia: InTech, 135-152.
- Spatafora JW, Aime MC, Grigoriev I V, Martin F, Stajich JE y Blackwell M. (2017). The fungal tree of life: from molecular systematics to genome-scale phylogenies. *Microbiol. Spectr.* 5(5): 3-34.
- Spohner SC, Müller H, Quitmann H y Czermak P. (2015). Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* 202: 118-134.
- Srinivasan M, Sudheer AR y Menon VP. (2007). Ferulic acid: therapeutic potential through its antioxidant property. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 40: 92-100.
- Srivastava V, McKee LS y Bulone V. (2017). Plant Cell Walls. En: *eLS*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 1-17.
- St Leger RJ, Nelson JO y Screen SE. (1999).

- The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity. *Microbiology* 145: 2691-2699.
- Stein KR, Giardina BJ y Chiang H. (2014). The non-classical pathway is the major pathway to secrete proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Clin. Exp. Pharmacol.* 4(3): 155.
- Steinberg TH. (2009). Protein Gel Staining Methods. En: Burgess, R. R. y Deutscher, M. P. (eds.) *Methods Enzymol.* 1.<sup>a</sup> ed. Elsevier Inc., 541-563.
- Sterflinger K, Tesei D y Zakharova K. (2012). Fungi in hot and cold deserts with particular reference to microcolonial fungi. *Fungal Ecol.* 5: 453-462.
- Stierand K y Rarey M. (2010). Drawing the PDB: Protein–ligand complexes in two dimensions. *ACS Med. Chem. Lett.* 1(9): 540-545.
- Stratton J, Chiruvolu V y Meagher M. (1998). High cell-density fermentation. En: *Pichia Protoc.* Nueva Jersey, EEUU: Humana Press, 107-120.
- Stukenbrock EH y Croll D. (2014). The evolving fungal genome. *Fungal Biol. Rev.* 28(1): 1-12.
- Sturmberger L, Chappell T, Geier M, Krainer F, Day KJ, Vide U, Trstenjak S, Schiefer A, Richardson T, Soriaga L, Darnhofer B, Birner-Gruenberger R, Glick BS, Tolstorukov I, Cregg J, et al. (2016). Refined *Pichia pastoris* reference genome sequence. *J. Biotechnol.* 235: 121-131.
- Suzuki K, Hori A, Kawamoto K, Thangudu RR, Ishida T, Igarashi K, Samejima M, Yamada C, Arakawa T, Wakagi T, Koseki T y Fushinobu S. (2014). Crystal structure of a feruloyl esterase belonging to the tannase family: a disulfide bond near a catalytic triad. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 82(10): 2857-2867.
- Swartz M. (2010). HPLC detectors: a brief review. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 33: 1130-1150.
- Taofiq O, González-Paramás A, Barreiro M y Ferreira I. (2017). Hydroxycinnamic acids and their derivatives: cosmeceutical significance, challenges and future perspectives, a review. *Molecules* 22: 281.
- Tarbouriech N, Prates JAM, Fontes CMGA y Davies GJ. (2005). Molecular determinants of substrate specificity in the feruloyl esterase module of xylanase 10B from *Clostridium thermocellum*. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 61: 194-197.
- Tartof KD y Hobbs CA. (1987). Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Res. Lab. Focus* 9: 12-14.
- Tatusov RL, Fedorova ND, Jackson JD, Jacobs AR, Kiryutin B, Koonin E V, Krylov DM, Mazumder R, Mekhedov SL, Nikolskaya AN, Rao BS, Smirnov S, Sverdlov A V, Vasudevan S, Wolf YI, et al. (2003). The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics* 4(1): 41.
- Tautz D y Renz M. (1983). An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Anal. Biochem.* 132(1): 14-19.
- Teather RM y Wood PJ. (1982). Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 43(4): 777-780.
- Tedersoo L, Bahram M, Polme S, Koljalg U, Yorou NS, Wijesundera R, Ruiz L V., Vasco-Palacios AM, Thu PQ, Suija A, Smith ME, Sharp C, Saluveer E, Saitta A, Rosas M, et al. (2014). Fungal biogeography. Global diversity and geography of soil fungi. *Science* (80-. ). 346(6213): 1256688.
- Teixeira J, Gaspar A, Garrido EM, Garrido J y Borges F. (2013). Hydroxycinnamic acid antioxidants: An electrochemical overview. *Biomed Res. Int.* 2013: 251754.
- Tel RM, de Jong J y Berends GT. (1979). Bromocresol purple, a non-specific colour reagent for the determination of serum albumin. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 17(10): 627-631.

- Terrasan CRF, Guisan JM y Carmona EC. (2016). Xylanase and  $\beta$ -xylosidase from *Penicillium janczewskii*: Purification, characterization and hydrolysis of substrates. *Electron. J. Biotechnol.* 23: 54-62.
- Theron LW y Divol B. (2014). Microbial aspartic proteases: current and potential applications in industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98(21): 8853-8868.
- Thibault J-F y Rouau X. (1990). Studies on enzymic hydrolysis of polysaccharides in sugar beet pulp. *Carbohydr. Polym.* 13: 1-16.
- Thiry M y Cingolani D. (2002). Optimizing scale-up fermentation processes. *Trends Biotechnol.* 20(3): 103-105.
- Thomma BPHJ. (2003). *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Mol. Plant Pathol.* 4(4): 225-236.
- Tiwari P, Misra BN y Sangwan NS. (2013).  $\beta$ -Glucosidases from the fungus *Trichoderma*: an efficient cellulase machinery in biotechnological applications. *Biomed Res. Int.* 2013: 1-10.
- Tiwari R, Nain L, Labrou NE y Shukla P. (2018). Bioprospecting of functional cellulases from metagenome for second generation biofuel production: a review. *Crit. Rev. Microbiol.* 44(2): 244-257.
- Toju H, Tanabe AS, Yamamoto S y Sato H. (2012). High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in environmental samples. *PLoS One* 7(7): e40863.
- Tola M y Kebede B. (2016). Occurrence, importance and control of mycotoxins: A review. *Cogent Food Agric.* 2(1): 1-12.
- Tölgyesi Á, Stroka J, Tamosiunas V y Zwickel T. (2015). Simultaneous analysis of *Alternaria* toxins and citrinin in tomato: an optimised method using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 32(9): 1512-1522.
- Topakas E, Moukouli M, Dimarogona M y Christakopoulos P. (2012). Expression, characterization and structural modelling of a feruloyl esterase from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94(2): 399-411.
- Topakas E, Stamatis H, Biely P y Christakopoulos P. (2004). Purification and characterization of a type B feruloyl esterase (StFAE-A) from the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63(6): 686-690.
- Topakas E, Stamatis H, Biely P, Kekos D, Macris B. y Christakopoulos P. (2003a). Purification and characterization of a feruloyl esterase from *Fusarium oxysporum* catalyzing esterification of phenolic acids in ternary water-organic solvent mixtures. *J. Biotechnol.* 102(1): 33-44.
- Topakas E, Stamatis H, Mastihubova M, Biely P, Kekos D, Macris BJ y Christakopoulos P. (2003b). Purification and characterization of a *Fusarium oxysporum* feruloyl esterase (FoFAE-I) catalysing transesterification of phenolic acid esters. *Enzyme Microb. Technol.* 33: 729-737.
- Topakas E, Vafiadi C y Christakopoulos P. (2007). Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases. *Process Biochem.* 42: 497-509.
- Toushik SH, Lee K-T, Lee J-S y Kim K-S. (2017). Functional applications of lignocellulolytic enzymes in the fruit and vegetable processing industries. *J. Food Sci.* 82(3): 585-593.
- Towbin H, Staehelin T y Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76(9): 4350-4354.
- Trachtulec Z y Forejt J. (1999). Transcription and RNA processing of mammalian genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 27(2): 526-531.
- Tsuchiyama M, Sakamoto T, Fujita T, Murata S y Kawasaki H. (2006). Esterification of ferulic acid with polyols using a ferulic acid esterase from *Aspergillus niger*. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1760: 1071-1079.
- Tsuge T, Harimoto Y, Akimitsu K, Ohtani K, Kodama M, Akagi Y, Egusa M, Yamamoto M y Otani H. (2013). Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. *FEMS Microbiol. Rev.* 37(1): 44-66.

Tuck CO, Perez E, Horvath IT, Sheldon RA y Poliakov M. (2012). Valorization of biomass: deriving more value from waste. *Science* (80-. ). 337(6095): 695-699.

## U

Udatha DBRKG, Kouskoumvekaki I, Olsson L y Panagiotou G. (2011). The interplay of descriptor-based computational analysis with pharmacophore modeling builds the basis for a novel classification scheme for feruloyl esterases. *Biotechnol. Adv.* 29(1): 94-110.

Udatha DBRKG, Mapelli V, Panagiotou G y Olsson L. (2012). Common and distant structural characteristics of feruloyl esterase families from *Aspergillus oryzae*. *PLoS One* 7(6): e39473.

Udomkun P, Wiredu AN, Nagle M, Müller J, Vanlauwe B y Bandyopadhyay R. (2017). Innovative technologies to manage aflatoxins in foods and feeds and the profitability of application – A review. *Food Control* 76: 127-138.

Ueno T, Hirayama S, Ito M, Nishioka E, Fukushima Y, Satoh T, Idei M, Horiuchi Y, Shoji H, Ohmura H, Shimizu T y Miida T. (2013). Albumin concentration determined by the modified bromocresol purple method is superior to that by the bromocresol green method for assessing nutritional status in malnourished patients with inflammation. *Ann. Clin. Biochem.* 50(Pt 6): 576-584.

Ullán R V., Campoy S, Casqueiro J, Fernández FJ y Martín JF. (2007). Deacetylcephalosporin C production in *Penicillium chrysogenum* by expression of the isopenicillin N epimerization, ring expansion, and acetylation genes. *Chem. Biol.* 14: 329-339.

Unal ES, Zhao R, Qiu A y Goldman ID. (2008). N-linked glycosylation and its impact on the electrophoretic mobility and function of the human proton-coupled folate transporter (HsPCFT). *Biochim. Biophys. Acta* 1778(6): 1407-1414.

Upadhyay P, Shrivastava R y Agrawal PK. (2016). Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. *3 Biotech* 6(1): 15.

## V

Valueva TA y Mosolov V V. (2004). Role of

inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochem.* 69(11): 1305-1309.

Várnai A, Tang C, Bengtsson O, Atterton A, Mathiesen G y Eijsink VGH. (2014). Expression of endoglucanases in *Pichia pastoris* under control of the GAP promoter. *Microb. Cell Fact.* 13(1): 57.

Vasu P, Bauer S y Savary BJ. (2012). Cloning and expression of hemicellulases from *Aspergillus nidulans* in *Pichia pastoris*. En: Lorence, A. (ed.) *Recomb. Gene Expression. Methods Mol. Biol. (Methods Protoc.)*. Totowa, Nueva Jersey, EEUU: Humana Press, 393-416.

Venkata Mohan S, Nikhil GN, Chiranjeevi P, Nagendranatha Reddy C, Rohit MV, Kumar AN y Sarkar O. (2016). Waste biorefinery models towards sustainable circular bioeconomy: Critical review and future perspectives. *Bioresour. Technol.* 215: 2-12.

Venkatesagowda B, Ponugupaty E, Barbosa AM y Dekker RFH. (2012). Diversity of plant oil seed-associated fungi isolated from seven oil-bearing seeds and their potential for the production of lipolytic enzymes. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 71-80.

Vestal ML y Campbell JM. (2005). Tandem Time-of-Flight Mass Spectrometry. En: Burlingame, A. L. (ed.) *Methods Enzymol.* Nueva York, EEUU: Elsevier Inc., 79-108.

Vester J, Glaring M y Stougaard P. (2014). Discovery of novel enzymes with industrial potential from a cold and alkaline environment by a combination of functional metagenomics and culturing. *Microb. Cell Fact.* 13(1): 72.

Vieira Gomes A, Souza Carmo T, Silva Carvalho L, Mendonça Bahia F y Parachin N. (2018). Comparison of yeasts as hosts for recombinant protein production. *Microorganisms* 6: 38.

Villena GK y Gutiérrez-Correa M. (2007). Morphological patterns of *Aspergillus niger* biofilms and pellets related to lignocellulolytic enzyme productivities. *Lett. Appl. Microbiol.* 45(3): 231-237.

Vogl T, Hartner FS y Glieder A. (2013). New opportunities by synthetic biology for biopharmaceutical production in *Pichia pastoris*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24(6): 1094-1101.

- Volk R-B y Furkert FH. (2006). Antialgal, antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced and excreted by cyanobacteria during growth. *Microbiol. Res.* 161(2): 180-186.
- De Vouge MW, Thaker AJ, A. Curran IH, Zhang L, Muradia G, Rode H y Vijay HM. (1996). Isolation and expression of a cDNA clone encoding an *Alternaria alternata* Alt a 1 subunit. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 111(4): 385-395.
- de Vries RP, Michelsen B, Poulsen CH, Kroon PA, van den Heuvel RH, Faulds CB, Williamson G, van den Hombergh JP y Visser J. (1997). The faeA genes from *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* encode ferulic acid esterases involved in degradation of complex cell wall polysaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(12): 4638-4644.
- de Vries RP, VanKuyk P a, Kester HCM y Visser J. (2002). The *Aspergillus niger* faeB gene encodes a second feruloyl esterase involved in pectin and xylan degradation and is specifically induced in the presence of aromatic compounds. *Biochem. J.* 363(Pt 2): 377-386.
- de Vries RP y Visser J. (1999). Regulation of the feruloyl esterase (faeA) gene from *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(12): 5500-5503.
- W**
- Wagacha JM y Muthomi JW. (2008). Mycotoxin problem in Africa: Current status, implications to food safety and health and possible management strategies. *Int. J. Food Microbiol.* 124(1): 1-12.
- Wagner JM y Alper HS. (2016). Synthetic biology and molecular genetics in non-conventional yeasts: current tools and future advances. *Fungal Genet. Biol.* 89: 126-136.
- Wang B, Wang X, Tian Y, Li Z, Gao J, Yan Y, Peng R y Yao Q. (2016a). Heterologous expression and characterization of a laccase from *Laccaria bicolor* in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 30(1): 63-68.
- Wang L, Li Z, Zhu M, Meng L, Wang H y Ng TB. (2016b). An acidic feruloyl esterase from the mushroom *Lactarius hatsudake*: A potential animal feed supplement. *Int. J. Biol. Macromol.* 93: 290-295.
- Wang L, Zhang R, Ma Z, Wang H y Ng T. (2014a). A feruloyl esterase (FAE) characterized by relatively high thermostability from the edible mushroom *Russula virescens*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172: 993-1003.
- Wang M, Carver JJ, Phelan V V., Sanchez LM, Garg N, Peng Y, Nguyen DD, Watrous J, Kapon CA, Luzzatto-Knaan T, Porto C, Bouslimani A, Melnik A V., Meehan MJ, Liu WT, et al. (2016c). Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat. Biotechnol.* 34(8): 828-837.
- Wang P. (2007). Nonconventional biocatalysis for production of chemicals and polymers from biomass. En: Yang, S.-T. (ed.) *Bioprocess. Value-Added Prod. from Renew. Resour.* Amsterdam (Países Bajos): Elsevier, 325-350.
- Wang X, Fu Y-F, Wang R-Y, Li L, Cao Y-H, Chen Y-Q, Zhao H-Z, Zhang Q-Q, Wu J-Q, Weng X-H, Cheng X-J y Zhu L-P. (2014b). Identification of clinically relevant fungi and *Prototheca* species by rRNA gene sequencing and multilocus PCR coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *PLoS One* 9(5): e98110.
- Ward OP. (2012). Production of recombinant proteins by filamentous fungi. *Biotechnol. Adv.* 30(5): 1119-1139.
- Warne NW y Mahler H-C. (2018). *Challenges in protein product development*. Cham, Suiza: Springer International Publishing.
- Watanabe M, Yoshida E, Fukada H, Inoue H, Tokura M y Ishikawa K. (2015). Characterization of a feruloyl esterase B from *Talaromyces cellulolyticus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 79(11): 1845-1851.
- Waterham HR, Digan ME, Koutz PJ, Lair S V. y Cregg JM. (1997). Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene* 186(1): 37-44.
- Wawrzyniak J y Waśkiewicz A. (2014). Ochratoxin A and citrinin production by *Penicillium verrucosum* on cereal solid substrates. *Food Addit. Contam. Part A* 31(1): 139-148.
- Weaver JC. (1995). Electroporation theory. En: Nickoloff, J. A. (ed.) *Electroporation Protoc.*

- Microorg.* Nueva Jersey, EEUU: Humana Press, 1-26.
- Webster J y Weber RW. (2007). *Introduction to Fungi*. 3.<sup>a</sup> ed. Nueva York, EEUU: Cambridge University Press.
- Weete JD. (1980). *Lipid Biochemistry of Fungi and other organisms*. Boston, Estados Unidos: Springer US.
- Wei H, Xu Q, Taylor LE, Baker JO, Tucker MP y Ding S-Y. (2009). Natural paradigms of plant cell wall degradation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20(3): 330-338.
- Wenderoth M, Pinecker C, Voß B y Fischer R. (2017). Establishment of CRISPR/Cas9 in *Alternaria alternata*. *Fungal Genet. Biol.* 101: 55-60.
- White TJ, Bruns TD, Lee SB y Taylor JW. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., y White, T. J. (eds.) *PCR Protoc. A Guid. to Methods Appl.* Nueva York, EEUU: Academic Press, Inc., 315-322.
- Wiley WC y McLaren IH. (1955). Time-of-Flight mass spectrometer with improved resolution. *Rev. Sci. Instrum.* 26(12): 1150-1157.
- Williams A y Tkachenko V. (2014). The Royal Society of Chemistry and the delivery of chemistry data repositories for the community. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 28: 1023-1030.
- Williamson G, Kroon PA y Faulds CB. (1998). Hairy plant polysaccharides: a close shave with microbial esterases 144: 2011-2023.
- Winans K, Kendall A y Deng H. (2017). The history and current applications of the circular economy concept. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 68: 825-833.
- Wingfield P. (1998). Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. En: *Curr. Protoc. Protein Sci.* Hoboken, Nueva Jersey, Estados Unidos: John Wiley & Sons, Inc., A.3F.1-A.3F.8.
- Wolf GM y Sternbach LH. (1949). Synthesis of biotin (patente 2489235). Estados Unidos.
- Wong DWS. (2006). Feruloyl esterase: a key enzyme in biomass degradation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 133(2): 87-112.
- Wong DWS, Chan VJ, Batt SB, Sarath G y Liao H. (2011). Engineering *Saccharomyces cerevisiae* to produce feruloyl esterase for the release of ferulic acid from switchgrass. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38(12): 1961-1967.
- Wood TM y Bhat KM. (1988). Methods for measuring cellulase activities. En: *Methods Enzymol.* Academic Press, Inc., 87-112.
- Woon JS-K, Mackeen MM, Ilias RM, Mahadi NM, Broughton WJ, Murad AMA y Abu Bakar FD. (2017). Cellobiohydrolase B of *Aspergillus niger* over-expressed in *Pichia pastoris* stimulates hydrolysis of oil palm empty fruit bunches. *PeerJ* 5: e3909.
- Woudenberg JHC, Groenewald JZ, Binder M y Crous PW. (2013). *Alternaria* redefined. *Stud. Mycol.* 75: 171-212.
- Woudenberg JHC, Hanse B, van Leeuwen GCM, Groenewald JZ y Crous PW. (2017). *Stemphylium* revisited. *Stud. Mycol.* 87: 77-103.
- Woudt LP, van den Heuvel JJ, van Raamsdonk-Duin MM, Mager WH y Planta RJ. (1985). Correct removal by splicing of a *Neurospora* intron in yeast. *Nucleic Acids Res.* 13(21): 7729-7739.
- Wu M, Abokitse K, Grosse S, Leisch H y Lau PCK. (2012). New feruloyl esterases to access phenolic acids from grass biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 168(1): 129-143.
- Wu S y Letchworth GJ. (2004). High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *Biotechniques* 36(1): 152-154.

## X

- Xiao Z, Bergeron H y Lau PCK. (2012). *Alternaria alternata* as a new fungal enzyme system for the release of phenolic acids from wheat and triticale brans. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 101(4): 837-844.
- Xiao Z, Storms R y Tsang A. (2005). Microplate-based carboxymethylcellulose assay for endoglucanase activity. *Anal. Biochem.* 342(1): 176-178.
- Xie C, Gu Z, You X, Liu G, Tan Y y Zhang H. (2010). Screening of edible mushrooms for release of ferulic acid from wheat bran by



fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 46(2): 125-128.

## Y

Yamada Y, Matsuda M, Maeda K y Mikata K. (1995). The phylogenetic relationships of methanol-assimilating yeasts based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs: The proposal of *Komagataella* Gen. Nov. (Saccharomycetaceae). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59(3): 439-444.

Yang JY, Sanchez LM, Rath CM, Liu X, Boudreau PD, Bruns N, Glukhov E, Wodtke A, De Felicio R, Fenner A, Wong WR, Linington RG, Zhang L, Debonsi HM, Gerwick WH, *et al.* (2013a). Molecular networking as a dereplication strategy. *J. Nat. Prod.* 76(9): 1686-1699.

Yang SQ, Tang L, Yan QJ, Zhou P, Xu HB, Jiang ZQ y Zhang P. (2013b). Biochemical characteristics and gene cloning of a novel thermostable feruloyl esterase from *Chaetomium* sp. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 97: 328-336.

Yeoman CJ, Han Y, Dodd D, Schroeder CM, Mackie RI y Cann IKO. (2010). Thermostable enzymes as biocatalysts in the biofuel industry. *Adv. Appl. Microbiol.* 70: 1-55.

Yin X, Hu D, Li J-F, He Y, Zhu T-D y Wu M-C. (2015a). Contribution of disulfide bridges to the thermostability of a type A feruloyl esterase from *Aspergillus usamii*. *PLoS One* 10(5): e0126864.

Yin X, Li JF, Wang CJ, Hu D, Wu Q, Gu Y y Wu MC. (2015b). Improvement in the thermostability of a type A feruloyl esterase, AuFaeA, from *Aspergillus usamii* by iterative saturation mutagenesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99(23): 10047-10056.

Yoon J, Maruyama J y Kitamoto K. (2011). Disruption of ten protease genes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* highly improves production of heterologous proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89: 747-759.

You Y, Park J, Yoon H-G, Lee Y-H, Hwang K, Lee J, Kim K, Lee K-W, Shim S y Jun W. (2009). Stimulatory effects of ferulic acid on endurance exercise capacity in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73(6): 1392-1397.

Young CL, Britton ZT y Robinson AS. (2012). Recombinant protein expression and

purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnol. J.* 7(5): 620-634.

Yu P, Maenz DD, McKinnon JJ, Racz VJ y Christensen DA. (2002). Release of ferulic acid from oat hulls by *Aspergillus* ferulic acid esterase and *Trichoderma* xylanase. *J. Agric. Food Chem.* 50: 1625-1630.

Yu P, McKinnon JJ, Maenz DD, Olkowski AA, Racz VJ y Christensen DA. (2003). Enzymic release of reducing sugars from oat hulls by cellulase, as influenced by *Aspergillus* ferulic acid esterase and *Trichoderma* xylanase. *J. Agric. Food Chem.* 51: 218-223.

Yu XW, Sun WH, Wang YZ y Xu Y. (2017). Identification of novel factors enhancing recombinant protein production in multi-copy *Komagataella phaffii* based on transcriptomic analysis of overexpression effects. *Sci. Rep.* 7(1): 1-12.

## Z

Zaher AM, Moharram AM, Davis R, Panizzi P, Makhoul MA y Calderón AI. (2015). Characterisation of the metabolites of an antibacterial endophyte *Botryodiplodia theobromae* Pat. of *Dracaena draco* L. by LC-MS/MS. *Nat. Prod. Res.* 29(24): 2275-2281.

Zeiner CA, Purvine SO, Zink EM, Pašatolić L, Chaput DL, Haridas S, Wu S, LaButti K, Grigoriev I V., Henrissat B, Santelli CM y Hansel CM. (2016). Comparative analysis of secretome profiles of manganese(II)-oxidizing Ascomycete fungi. *PLoS One* 11(7): e0157844.

Zeng Y, Yin X, Wu MC, Yu T, Feng F, Zhu T Di y Pang QF. (2014). Expression of a novel feruloyl esterase from *Aspergillus oryzae* in *Pichia pastoris* with esterification activity. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 110: 140-146.

Zhang S-B, Wang L, Liu Y, Zhai H-C, Cai J-P y Hu Y-S. (2015). Expression of feruloyl esterase A from *Aspergillus terreus* and its application in biomass degradation. *Protein Expr. Purif.* 115: 153-157.

Zhang S-B y Wu Z-L. (2011). Identification of amino acid residues responsible for increased thermostability of feruloyl esterase A from *Aspergillus niger* using the PoPMuSiC algorithm.

*Bioresour. Technol.* 102(2): 2093-2096.

Zhang S, Pei X y Wu Z. (2012a). Multiple amino acid substitutions significantly improve the thermostability of feruloyl esterase A from *Aspergillus niger*. *Bioresour. Technol.* 117: 140-147.

Zhang SB, Ma XF, Pei XQ, Liu JY, Shao HW y Wu ZL. (2012b). A practical high-throughput screening system for feruloyl esterases: Substrate design and evaluation. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 74(1-2): 36-40.

Zhang SB, Zhai HC, Wang L y Yu GH. (2013). Expression, purification and characterization of a feruloyl esterase A from *Aspergillus flavus*. *Protein Expr. Purif.* 92(1): 36-40.

Zhao Z, Liu H, Wang C y Xu J-R. (2013). Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. *BMC Genomics* 14: 274.

Zhao Z y Moghadasian MH. (2008). Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chem.* 109(4): 691-702.

Zhou M, Huang Z, Zhou B, Luo Y, Jia G, Liu G, Zhao H y Chen X. (2015). Construction and expression of two-copy engineered yeast of feruloyl esterase. *Electron. J. Biotechnol.* 18(5): 338-342.

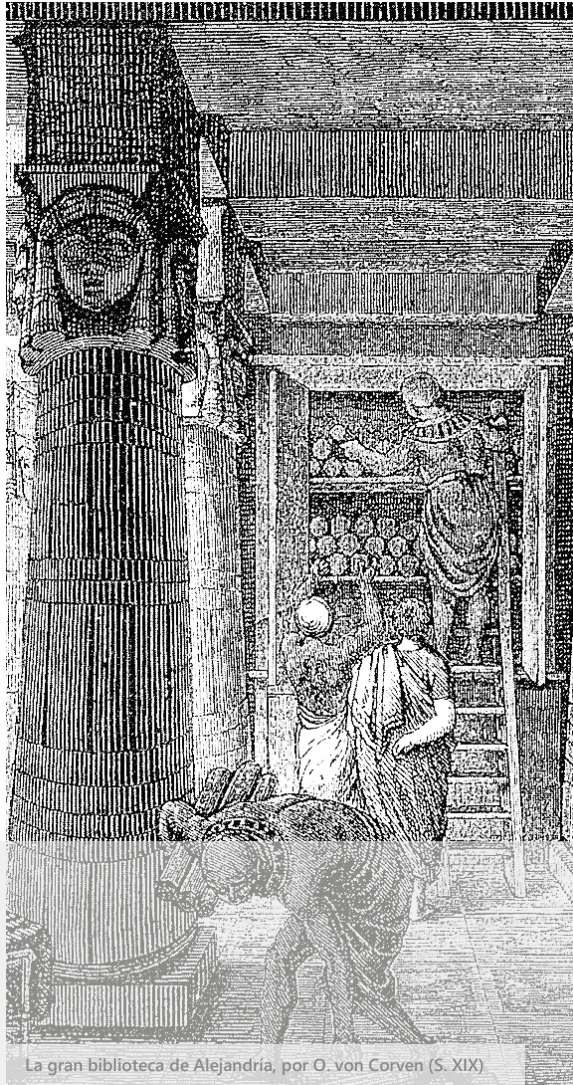
Zhu Z-J, Schultz AW, Wang J, Johnson CH, Yannone SM, Patti GJ y Siuzdak G. (2013). Liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry characterization of metabolites guided by the METLIN database. *Nat. Protoc.* 8(3): 451-460.

Zoglowek M, Lübeck PS, Ahring BK y Lübeck M. (2015). Heterologous expression of cellobiohydrolases in filamentous fungi – an update on the current challenges, achievements and perspectives. *Process Biochem.* 50(2): 211-220.

Zuin VG y Ramin LZ. (2018). Green and sustainable separation of natural products from agro-industrial waste: challenges, potentialities, and perspectives on emerging approaches. *Top. Curr. Chem.* 376(1): 3.

Zwickel T, Klaffke H, Richards K y Rychlik M. (2016). Development of a high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry based analysis for the simultaneous quantification

of various *Alternaria* toxins in wine , vegetable juices and fruit juices. *J. Chromatogr. A* 1455: 74-85.



La gran biblioteca de Alejandría, por O. von Corven (S. XIX)

# ANEXOS



## 7.1 Material suplementario

### Tabla suplementaria 1.2 Análisis comparativo entre el espliceosoma de *P. rubens* y *K. phaffii*.

Se incluyen las proteínas y ribonucleoproteínas (RNP) de cada componente del espliceosoma y su número EC. También se indica la presencia de los componentes en *P. rubens* (Pr) o *K. phaffii* (Kp) y el porcentaje de similitud entre la proteína de *P. rubens* y la de *K. phaffii*, en los casos en los que están presentes en ambos organismos.

Componente del espliceosoma	Proteína/RNP	Número EC	Pr	Kp	% Similitud BLASTP	
	Helicasa ARN dependiente de ATP UAP56/SUB2	3.6.4.13	Sí	Sí	70	
	Helicasa ARN dependiente de ATP DDX46/PRP5	3.6.4.13	Sí	Sí	51	
	Factor de ajuste pre-ARNm helicasa ARN dependiente de ATP DHX15/PRP43	3.6.4.13	Sí	Sí	76	
	Helicasa ARN dependiente de ATP DHX8/PRP22	3.6.4.13	Sí	Sí	54	
	Factor de ajuste pre-ARNm helicasa ARN dependiente de ATP DHX38/PRP16	3.6.4.13	Sí	Sí	61	
	Factor de procesamiento de pre-ARNm 17		Sí	Sí	39	
	Factor de procesamiento de pre-ARNm SLU7		Sí	Sí	26	
	Factor de ajuste pre-ARNm 18		Sí	Sí	29	
	Factor de ajuste pre-ARNm proteína similar a helicasa ARN dependiente de ATP PRP2	3.6.4.13	Sí	Sí	55	
U1	Ribonucleoproteína pequeña nuclear B y B'		Sí	Sí	39	
	Ribonucleoproteína pequeña nuclear D1		Sí	Sí	57	
	Ribonucleoproteína pequeña nuclear D2		Sí	Sí	60	
	Ribonucleoproteína pequeña nuclear D3		Sí	Sí	64	
	Ribonucleoproteína pequeña nuclear E		Sí	Sí	52	
	Ribonucleoproteína pequeña nuclear F		Sí	Sí	41	
	Ribonucleoproteína pequeña nuclear G		Sí	Sí	38	
	Ribonucleoproteína pequeña nuclear U1 70kDa		Sí	Sí	47	
	Ribonucleoproteína pequeña nuclear U1 C		No	Sí	-	
Relacionadas con el U1	Factor de procesamiento de pre-ARNm 40		Sí	Sí	27	
	Helicasa ARN dependiente de ATP DDX5/DBP2	3.6.4.13	Sí	Sí	66	
U2	Ribonucleoproteína pequeña nuclear B y B'		Sí	Sí	39	
	Ribonucleoproteína pequeña nuclear D1		Sí	Sí	57	
	Ribonucleoproteína pequeña nuclear D2		Sí	Sí	60	
	Ribonucleoproteína pequeña nuclear D3		Sí	Sí	64	
	Ribonucleoproteína pequeña nuclear E		Sí	Sí	52	
	Ribonucleoproteína pequeña nuclear F		Sí	Sí	41	
	Ribonucleoproteína pequeña nuclear G		Sí	Sí	38	
		Ribonucleoproteína pequeña nuclear U2 A'		Sí	Sí	39
		Subunidad 1 del factor de ajuste 3A		Sí	Sí	30
		Subunidad 2 del factor de ajuste 3A		Sí	Sí	34
		Subunidad 3 del factor de ajuste 3A		Sí	Sí	32
		Subunidad 1 del factor de ajuste 3B		Sí	Sí	49
		Subunidad 2 del factor de ajuste 3B		Sí	Sí	47
		Subunidad 3 del factor de ajuste 3B		Sí	Sí	38
		Subunidad 4 del factor de ajuste 3B		Sí	Sí	41
		Subunidad 5 del factor de ajuste 3B		Sí	Sí	42
	Proteína 5A que contiene un dominio similar a PHD finger		Sí	Sí	60	
	Proteína p14 del sitio de ramificación pre-ARNm		Sí	Sí	42	
Relacionadas con el U2	Subunidad 65 kDa del factor de ajuste U2AF		Sí	Sí	27	
	Subunidad 35 kDa del factor de ajuste U2AF		Sí	Sí	32	
	Factor de ajuste 30 relacionado con la supervivencia de la motoneurona		Sí	No		
	Factor de ajuste 45		Sí	No		
	Proteína asociada a U2 SR140		Sí	No		
	Factor de ajuste pre-ARNm helicasa ARN dependiente de ATP DHX15/PRP43	3.6.4.13	Sí	Sí	76	

Tabla 3.20 (continuación)

Componente del espliceosoma	Proteína/RNP	Número EC	Pr	Kp	% Similitud BLASTP
U4/U6	Proteína LSm2 similar a Sm asociada a ARN <sup>p</sup> n U6		Sí	Sí	52
	Proteína LSm8 similar a Sm asociada a ARN <sup>p</sup> n U6		Sí	No	-
	Proteína LSm6 similar a Sm asociada a ARN <sup>p</sup> n U6		Sí	Sí	47
	Proteína LSm7 similar a Sm asociada a ARN <sup>p</sup> n U6		Sí	Sí	45
	Proteína LSm4 similar a Sm asociada a ARN <sup>p</sup> n U6		Sí	Sí	44
	Proteína LSm3 similar a Sm asociada a ARN <sup>p</sup> n U6		Sí	Sí	60
	Proteína LSm5 similar a Sm asociada a ARN <sup>p</sup> n U6		Sí	Sí	45
	Ribonucleoproteína pequeña nuclear B y B'		Sí	Sí	39
	Ribonucleoproteína pequeña nuclear D1		Sí	Sí	57
	Ribonucleoproteína pequeña nuclear D2		Sí	Sí	60
	Ribonucleoproteína pequeña nuclear D3		Sí	Sí	64
	Ribonucleoproteína pequeña nuclear E		Sí	Sí	52
	Ribonucleoproteína pequeña nuclear F		Sí	Sí	41
	Ribonucleoproteína pequeña nuclear G		Sí	Sí	38
	Ribonucleoproteína pequeña nuclear PRP3 U4/U6		Sí	Sí	36
	Ribonucleoproteína pequeña nuclear PRP4 U4/U6		Sí	Sí	33
	Peptidil-prolil isomerasa H (ciclofilina H)	5.2.1.8	Sí	No	-
	Ribonucleoproteína pequeña nuclear PRP31 U4/U6		Sí	Sí	33
	Ribonucleoproteína pequeña nuclear SNU13 U4/U6		Sí	Sí	58-65
Asociadas con U4/U6.U5 tri-SnRNP	Proteína 3 asociada a tri-RNP <sup>p</sup> n U4/U6.U5		Sí	Sí	41
	Proteína 2 asociada a tri-RNP <sup>p</sup> n U4/U6.U5		Sí	Sí	34
	Proteína 1 asociada a tri-RNP <sup>p</sup> n U4/U6.U5		Sí	Sí	28
	Componente SNU23 de tri-RNP <sup>p</sup> n U4/U6.U5		Sí	Sí	34
	Factor de ajuste pre-ARN <sup>m</sup> 38A		Sí	Sí	42
U5	Ribonucleoproteína pequeña nuclear B y B'		Sí	Sí	39
	Ribonucleoproteína pequeña nuclear D1		Sí	Sí	57
	Ribonucleoproteína pequeña nuclear D2		Sí	Sí	60
	Ribonucleoproteína pequeña nuclear D3		Sí	Sí	64
	Ribonucleoproteína pequeña nuclear E		Sí	Sí	52
	Ribonucleoproteína pequeña nuclear F		Sí	Sí	41
	Ribonucleoproteína pequeña nuclear G		Sí	Sí	38
	Componente de 116 kDa de RNP <sup>p</sup> n U5		Sí	Sí	43
	Helicasa de ajuste pre-ARN <sup>m</sup> BRR2	3.6.4.13	Sí	Sí	44
	Factor de procesado pre-ARN <sup>m</sup> - 6		Sí	Sí	30
	Factor de procesado pre-ARN <sup>m</sup> - 8		Sí	Sí	66
	Proteína de unión Prp8		Sí	Sí	35
	Helicasa ARN dependiente de ATP DDX23/PRP28	3.6.4.13	Sí	Sí	45
Proteína RNP <sup>p</sup> n U5, familia DIM1		Sí	Sí	75	
Complejo PrP19	Factor de procesado pre-ARN <sup>m</sup> 19	2.3.2.27	Sí	Sí	27
	Factor de ajuste pre-ARN <sup>m</sup> CDC5/CEF1		Sí	Sí	59
Relacionadas con PrP19	Factor de ajuste pre-ARN <sup>m</sup> SPF27		Sí	Sí	24
	Regulador pleiotrópico 1		Sí	Sí	49
	Proteína CWC15		Sí	Sí	29
	Proteína similar a beta-catenina 1		No	Sí	-
	Proteína de choque térmico 70kDa 1/2/6/8		Sí	Sí	60-74
Relacionadas con PrP19	Proteína 1 que contiene un dominio SNW		Sí	Sí	41
	Factor de ajuste pre-ARN <sup>m</sup> SYF1		Sí	Sí	33
	Proteína <i>Crooked neck</i>		Sí	Sí	41
	Factor de ajuste pre-ARN <sup>m</sup> SYF2		Sí	Sí	23
	Factor de ajuste pre-ARN <sup>m</sup> ISY1		Sí	Sí	33
	Proteína 1 similar a peptidil-prolil cis-trans isomerasa	5.2.1.8	Sí	No	-
	Proteína 12 que contiene un dominio enrollado		Sí	No	-
	Factor de ajuste pre-ARN <sup>m</sup> RBM22/SLT11		Sí	Sí	33
	Proteína 31 de selección del sitio de gemación		Sí	Sí	61
	Proteína aquarius de unión de intrones		No	Sí	-

Tabla 3.20 (continuación)

Componente del espliceosoma	Proteína/RNP	Número EC	Pr	Kp	% Id BLASTP
EJC/TREX	Helicasa ARN dependiente de ATP	3.6.4.13	Sí	Sí	70
	Proteína 8A de unión de ARN		Sí	No	
	Proteína <i>mago nashi</i>		Sí	No	
	Helicasa ARN dependiente de ATP UAP56/SUB2	3.6.4.13	Sí	Sí	69
	Subunidad 1 del complejo THO		Sí	No	-
	Subunidad 2 del complejo THO		Sí	Sí	29
	Subunidad 3 del complejo THO		Sí	Sí	21
Componentes comunes	Subunidad 4 del complejo THO		Sí	Sí	29
	Subunidad 1 de la proteína de unión de la caperuza nuclear		Sí	Sí	21
	Subunidad 2 de la proteína de unión de la caperuza nuclear		Sí	Sí	43

## 7.2. Publicaciones científicas

Parte del trabajo de la presente Tesis Doctoral ha dado lugar a la publicación del siguiente artículo científico:

**García-Calvo L**, Ullán RV, Fernández-Aguado M, García-Lino AM, Balaña-Fouce R, Barreiro C. (2018). Secreted protein extract analyses present the plant pathogen *Alternaria alternata* as a suitable industrial enzyme toolbox. *J. Proteomics* 177:48-64.