



Universidad de León.
Dpto. Ciencias Biomédicas
Programa de doctorado en Ciencias de la Salud



Instituto de Biotecnología de León
INBIOTEC

TESIS DOCTORAL

Identificación y caracterización de las enzimas feruloil esterasas 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.

**Raquel Rodríguez Castro
León (España) 2017**

A mis padres,
Tomás y Nelly

*El presente trabajo ha sido realizado en la Asociación de Investigación INBIOTEC, Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC), bajo la dirección de los Doctores Don **Ricardo Vicente Ullán**, Dña. **Silvia M. Albillos García**, Don **Carlos Barreiro Méndez** y Don **Rafael Balaña Fouce**. Asociado al Programa de doctorado en Ciencias de la Salud del Dpto. de Ciencias Biomédicas de la Universidad de León.*

Quiero expresar mi agradecimiento a las siguientes instituciones y personas sin las cuales no hubiera sido posible el desarrollo de esta memoria de Tesis Doctoral:

Al Dr. Ricardo Vicente Ullán, director de esta Tesis, por ofrecerme la oportunidad de incorporarme a su grupo de investigación para realizar este trabajo de doctorado y por su inestimable apoyo a lo largo de los años hasta la finalización del mismo.

Al la Dra. Silvia M. Albillos García, co-directora de esta Tesis, por haber confiado en mí para la realización de este trabajo, por sus enseñanzas y por su gran apoyo y disponibilidad a lo largo de los años.

Al Dr. Carlos Barreiro Méndez, co-director de esta Tesis, por su inestimable ayuda para la realización de los trabajos de proteómica y por su constante apoyo y ayuda en todas las fases de la realización de este trabajo, imprescindibles para la realización de este trabajo.

Al Dr. Rafael Balaña Fouce, co-director de esta Tesis y Director científico de la Asociación de Investigación INBIOTEC, Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC) durante la realización del presente trabajo, por brindarme la oportunidad de desarrollar este trabajo.

Al Programa de formación mediante prácticas en materia de investigación e innovación tecnológica para titulados universitarios y para titulados superiores de formación profesional de la Consejería de Economía y Empleo de la Junta de Castilla y León por la financiación de los seis primeros meses de este trabajo de investigación.

A los ya Dra. Marta Fernandez Aguado y el Dr. Pedro Iván Hidalgo Yanes, Marta y Pedro para mí, mis compañeros de laboratorio, por sus enseñanzas y apoyo, este trabajo no habría sido posible sin su colaboración.

Al resto de compañeros de INBIOTEC: Mafe, Rebeca, Vanesa, Miriam, Alcira y Jose por su gran acogida y hacer de mi etapa en INBIOTEC una de las más felices de mi vida. También quiero expresar mi gratitud al resto de trabajadores del centro que de un modo u otro han contribuido a la realización de esta tesis doctoral.

Y finalmente, pero no menos importante, quiero agradecer a mi familia, mi novio y amigos su apoyo incondicional y sus ánimos en los momentos más difíciles. Pedirles perdón por no haberles podido dedicar todo el tiempo que me hubiera gustado en estos últimos años y darles las gracias por entenderlo, comprenderme y estar siempre a mi lado apoyándome y luchando junto a mí. Vosotros me dais toda la energía necesaria para conseguir mis metas.

“Me enseñaron que el camino del progreso no es ni rápido, ni fácil”

María Salomea Skłodowska-Curie

Varsovia, Polonia 1867-Passy, Francia 1934

Científica. Premio Nobel de Física (1903) y de Química (1911).

“Volar no es un camino de rosas, pero por la diversión vale la pena el precio”

Amelia Mary Earhart

Atchinson, Kansas, EEUU 1897 – Océano pacífico 1937

Aviadora, pionera y aventurera.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMEN.....	IX
ABSTRACT.....	X
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
1. <i>PENICILLIUM CHRYSOGENUM</i>	9
1.1. <i>Taxonomía y nomenclatura</i>	9
1.2. <i>Características principales</i>	9
1.3. <i>Diversidad de cepas</i>	12
2. REMOLACHA.....	14
2.1. <i>Características generales</i>	14
2.2. <i>Cultivo de remolacha en España</i>	15
2.3. <i>Proceso de obtención de la pulpa de remolacha durante el procesado de la remolacha azucarera para la producción de azúcar</i>	16
2.4. <i>La pulpa de remolacha</i>	19
3. PARED CELULAR VEGETAL.....	20
3.1. <i>Características generales</i>	20
3.2. <i>Particularidades de la pared celular de la remolacha</i>	26
3.3. <i>Aplicaciones de la pared celular</i>	27
3.4. <i>Enzimas que degradan la pared celular vegetal</i>	28
4. <i>ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS: EL ÁCIDO FERÚLICO</i>	30
4.1. <i>Obtención de AF</i>	31
4.2. <i>Localización del AF en la pared celular</i>	32
4.3. <i>Papel del AF en la pared celular de las plantas</i>	34
4.4. <i>AF en los distintos sustratos vegetales</i>	35
4.5. <i>Aplicaciones industriales del AF</i>	35
5. FERULOIL ESTERASAS.....	38
5.1. <i>Características generales</i>	38
5.2. <i>Nomenclatura</i>	39
5.3. <i>Clasificación</i>	40
5.4. <i>Reacción catalítica</i>	43
5.5. <i>Análisis de la actividad feruloil esterasa</i>	44
MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
1. MICROORGANISMOS.....	47
1.1. <i>Cepas bacterianas</i>	47
1.2. <i>Cepas fúngicas</i>	47
2. PLÁSMIDOS.....	48
2.1. <i>Vectores plásmidicos</i>	48
2.2. <i>Construcciones plasmídicas: plásmidos pSfaeA y pSfaeB</i>	48

3.	OLIGONUCLEÓTIDOS	49
4.	MEDIOS DE CULTIVO	49
4.1.	<i>Medios de cultivo para bacterias</i>	50
4.2.	<i>Medios de cultivo para Penicillium chrysogenum</i>	50
5.	SOLUCIONES PARA EL MANTENIMIENTO Y MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD FAE	52
6.	REACTIVOS QUÍMICOS.....	53
6.1.	<i>Enzimas comerciales</i>	53
6.2.	<i>Antibióticos:</i>	54
6.3.	<i>Kits comerciales:</i>	54
7.	EQUIPAMIENTO.....	54
7.1.	<i>Centrífugas</i>	54
7.2.	<i>Arcones agitadores</i>	55
7.3.	<i>Bioreactores:</i>	55
7.4.	<i>Otros equipos:</i>	55
8.	HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS.....	56
9.	CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE MICROORGANISMOS. DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO	57
9.1.	<i>Cepas bacterianas</i>	57
9.2.	<i>Cepas fúngicas</i>	57
10.	MANIPULACIÓN DE ADN	58
10.1.	<i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	58
10.2.	<i>Electroforesis de ADN</i>	61
10.3.	<i>Extracción de ADN de geles de agarosa</i>	61
10.4.	<i>Digestión de ADN con enzimas de restricción</i>	62
10.5.	<i>Eliminación de proteínas y otras impurezas en las muestras de ADN mediante extracción con fenol-cloroformo</i>	63
10.6.	<i>Eliminación selectiva de ácidos nucleicoscontaminantes</i>	64
10.7.	<i>Ligación de fragmentos de ADN</i>	64
11.	OBTENCIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE <i>E. COLI</i>	65
12.	TRANSFORMACIÓN DE <i>E. COLI</i>	65
13.	MINIPREPARACIONES DE ADN PLASMÍDICO (MINIPREPS).....	66
14.	OBTENCIÓN DE ADN PLASMÍDICO A GRAN ESCALA: LISIS ALCALINA.....	66
15.	TRANSFORMACIÓN DE <i>P. CHRYSOGENUM</i>	67
15.1.	<i>Obtención de protoplastos</i>	67
15.2.	<i>Transformación de protoplastos</i>	68
15.3.	<i>Sistema de selección positiva de transformantes en P. chrysogenum</i>	69
16.	HIBRIDACIÓN DE ADN: SOUTHERN BLOT	69
16.1.	<i>Obtención de ADN total</i>	70
16.2.	<i>Transferencia de ADN mediante sistema de vacío</i>	70
16.3.	<i>Marcaje de sondas</i>	71
16.4.	<i>Prehibridación</i>	72
16.5.	<i>Hibridación</i>	72
16.6.	<i>Lavado de las membranas</i>	72
16.7.	<i>Detección inmunológica</i>	73
17.	MÉTODOS PARA LA EXTRACCIÓN Y EL ANÁLISIS DE ARN.....	74
17.1.	<i>Obtención de ARN total a gran escala</i>	74
17.2.	<i>Northern blot</i>	75
17.3.	<i>PCR en tiempo real a partir de ADNc</i>	76
18.	VALORACIÓN CUALITATIVA DE ACTIVIDAD FERULOIL ESTERASA: BIOENSAYO.....	78
19.	CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO FERÚLICO Y DE ÁCIDO CAFEICO MEDIANTE HPLC	78
20.	RECUPERACIÓN DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS.....	79

21.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD <i>FAE</i>	80
21.1.	<i>Ensayo frente a sustrato sintético metil-4-hidroxi-3-metoxicinamato (MFA):</i>	80
21.2.	<i>Ensayo frente a los sustratos naturales de interés: pulpa de remolacha y marro del café</i>	80
22.	FERMENTACIÓN A ESCALA PILOTO EN BIORREACTORES	81
23.	ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS PRODUCIDOS POR <i>P. CHRYSOGENUM</i>	82
23.1.	<i>Preparación de las muestras</i>	83
23.2.	<i>Método bradford para la cuantificación de la concentración de proteínas</i>	83
23.3.	<i>Análisis monodimensional de proteínas</i>	84
23.4.	<i>Análisis bidimensional de proteínas</i>	86
23.5.	<i>Detección de proteínas</i>	89
23.6.	<i>Análisis diferencial de la expresión de proteínas</i>	91
23.7.	<i>Digestión triptica de proteínas</i>	91
23.8.	<i>Identificación de proteínas por espectrometría de masas acoplada a un detector MALDI-TOF</i>	93
RESULTADOS		97
I. SELECCIÓN DE LA CEPA Y DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE FERMENTACIÓN		99
1.	SELECCIÓN DE UNA CEPA CON ALTA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA FERULOIL ESTERASA.....	99
2.	DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE FAES POR <i>P. CHRYSOGENUM</i>	102
2.1.	<i>Influencia de la agitación</i>	102
2.2.	<i>Optimización del inóculo</i>	104
2.3.	<i>Optimización de pH y Tª</i>	105
2.4.	<i>Optimización del tipo de sustrato y dosis enzimática</i>	106
II. SOBREEXPRESIÓN DE LOS GENES <i>FAE</i> EN <i>P. CHRYSOGENUM</i> Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO PRODUCIDO POR LOS TRANSFORMANTES		108
1.	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DEL GENOMA DE <i>P. CHRYSOGENUM</i> WISCONSIN 54-1255 PARA IDENTIFICAR LOS GENES <i>FAE</i> Y CARACTERIZAR LAS PROTEÍNAS <i>PcFAE</i>	108
1.1	<i>Análisis bioinformático del gen <i>faeA</i> y la proteína <i>PcFaeA</i></i>	109
1.2	<i>Análisis bioinformático del gen <i>faeB</i> y la proteína <i>PcFaeB</i></i>	111
2.	CLONACIÓN Y SOBREEXPRESIÓN DE LOS GENES <i>FAEA</i> Y <i>FAEB</i> EN <i>P. CHRYSOGENUM</i> WISCONSIN 54-1255 .	114
3.	BIOENSAYO DE LA ACTIVIDAD <i>FAE</i> EN LOS TRANSFORMANTES DE <i>P. CHRYSOGENUM</i> WISCONSIN 54-1255 SOBREEXPRESADOS EN <i>FAEA</i> Y <i>FAEB</i>	118
4.	ANÁLISIS MEDIANTE HIBRIDACIÓN DE <i>SOUTHERN</i> DE LOS TRANSFORMANTES DE LAS LÍNEAS A Y B. COMPROBACIÓN DE LA COMPLETA INSERCIÓN DEL CASETE DE SOBREEXPRESIÓN.....	120
5.	CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA <i>FAE</i> DE VARIAS CEPAS DE <i>P. CHRYSOGENUM</i> WISCONSIN 54-1255 FRENTE A DIFERENTES SUSTRATOS.....	122
5.1.	<i>Actividad enzimática frente a pulpa de remolacha</i>	122
5.2	<i>Actividad enzimática frente a marro de café</i>	123
6.	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>FAEA</i> Y <i>FAEB</i>	125
6.1.	<i>Análisis del ARN mediante HIBRIDACIÓN Northern:</i>	125
6.2.	<i>Análisis de la expresión de ARN mediante RT-qPCR en tiempo real</i>	126
III. ESCALADO DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE ALTOS NIVELES DE FAES A PARTIR DE LA CEPA <i>P. CHRYSOGENUM</i> B13		131
1.	ESCALADO EN BIORREACTORES DE 5 L	132
1.1.	<i>Determinación de la influencia del control de pH durante la fermentación:</i>	133

1.2. Determinación del momento óptimo de recogida del cóctel enzimático en biorreactor de 5 L	137
2. ESCALADO EN BIORREACTORES DE 20 L	139
2.1. Fermentación de 20 L:.....	139
2.2. Calidad de la actividad fae de los extractos enzimáticos obtenidos.....	140
3. COMPARATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE FAES DE <i>P. CHRYSOGENUM</i> CON LA DE LAS ENZIMAS COMERCIALES	141
IV. ANÁLISIS DEL PROTEOMA EXTRACELULAR DE <i>PENICILLIUM CHRYSOGENUM</i> EN CONDICIONES DE PRODUCCIÓN DE FAES	143
1. COMPARATIVA ENTRE EL SECRETOMA DE LA CEPA PARENTAL WISCONSIN 54-1255 Y LA CEPA B13	143
2. ANÁLISIS PROTEÓMICO COMPLETO DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO PRODUCIDO POR LA CEPA <i>P. CHRYSOGENUM</i> B13	148
2.1. Optimización de la precipitación de proteínas	148
2.2. Composición del extracto enzimático de la cepa B13.....	149
DISCUSIÓN.....	159
I. OBTENCIÓN DE UNA CEPA SOBREENPRESADA EN LOS GENES FAE DE <i>P. CHRYSOGENUM</i> CON ALTA ACTIVIDAD FAE.....	161
1. TRANSFORMANTES SOBREENPRESADOS: CEPA SUPERPRODUCTORA Y SUSTRATO	163
2. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO FERMENTATIVO	168
3. MAYOR ACTIVIDAD QUE LOS PREPARADOS COMERCIALES.....	171
II. ANÁLISIS DEL PROTEOMA EXTRACELULAR	173
1. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO RELACIONADAS CON LA DEGRADACIÓN DE LA PARED CELULAR VEGETAL:	173
2. PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA DEGRADACIÓN DE LA PARED CELULAR VEGETAL	175
DISCUSIÓN GENERAL	186
CONCLUSIONES.....	182
CONCLUSIONES.....	184
BIBLIOGRAFÍA.....	188
BIBLIOGRAFIA	189

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1: Clasificación taxonómica de <i>P. chrysogenum</i> .	9
Fig. 2: Imágenes de la morfología de <i>Penicillium</i> .	10
Fig. 3: Reproducción asexual de los hongos filamentosos.	12
Fig. 4: Tipos de remolacha	14
Fig. 5: Destino de la producción de remolacha azucarera en 2014.	16
Fig. 6: Proceso simplificado de la obtención de pulpa de remolacha a partir de la remolacha azucarera.	18
Fig. 7: Aspecto de la pulpa de remolacha	19
Fig. 8: Representación esquemática de la estructura química del xiloglucano y ramnogalacturonano I	22
Fig. 9: Composición de la pared celular vegetal.	22
Fig. 10: Representación esquemática del mecanismo de acción sinérgico de las distintas celulasas.	29
Fig. 11: Estructura química de los ácidos hidroxicinámicos.	30
Fig. 12: Diagrama esquemático que muestra posibles enlaces covalentes entre los polisacáridos y la lignina en las paredes celulares vegetales	34
Fig. 13: Modelos estructurales de polisacáridos ferulilados de la pared celular de plantas y el sitio de corte por las enzimas que degradan dichas estructuras.	33
Fig. 14: Porcentaje de AF presente en 100g de pared celular de diferentes especies vegetales (w/w).	35
Fig. 15: Mecanismo de acción de las FAEs	44
Fig. 16: Representación esquemática de los plásmidos pSfaeA y pSfaeB.	49
Fig. 17: Esquema del funcionamiento de un espectrómetro de masas MALDI/TOF.	94
Fig. 18: Medida de la actividad FAE de cultivos de varias cepas de <i>Penicillium</i>	100
Fig. 19: Potencia de hidrólisis.	101
Fig. 20: Liberación de ácido ferúlico en presencia de pulpa de remolacha en medio líquido estático y con agitación constante por <i>P. chrysogenum</i> .	103
Fig. 21: Optimización del inóculo.	105
Fig. 22: Optimización de pH y temperatura	106
Fig. 23: Optimización del tipo de sustrato y la dosis enzimática	107
Fig. 24 Predicción de la estructura secundaria de la proteína PcFaeA.	110
Fig. 25 Modelo de la estructura tridimensional de la proteína PcFaeA	111
Fig. 26 Predicción de la estructura secundaria de la proteína PcFaeB.	112
Fig. 27 Modelo de la estructura tridimensional de la proteína PcFaeB	113
Fig. 28: Construcciones plásmidicas: pSfaeA y pSfaeB.	115
Fig. 29: Digestión con la enzima de restricción BglII para comprobación de la correcta ligación del inserto (faeA o faeB) con el plásmido pIBRC43-BglII.	116
Fig. 30: Digestión de comprobación tras la lisis alcalina.	116
Fig. 31: Halos de hidrólisis de los transformantes sobreexpresados para los genes faeA y faeB.	118
Fig. 32: Actividad FAE de los transformantes sobreexpresados.	119
Fig. 33: Sobreexpresión de los genes faeA y faeB en <i>P. chrysogenum</i> .	121
Fig. 34: Actividad FAE de los extractos enzimáticos de <i>P. chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255 y sus transformantes A68, A76, A78, B13, B77 Y B83 frente a los sustratos PR y MFA	123
Fig. 35: Actividad FAE de los extractos enzimáticos de <i>P. chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255 y los transformantes B13 y A78, frente al sustratos MC.	124
Fig. 36: Sondas Northern.	126
Fig. 37: Eficiencia de la amplificación de la RT-qPCR.	130
Fig. 38: Estudio de la expresión de los genes faeA y faeB en los transformantes A78 y B13 respectivamente junto con la cepa parental <i>P. chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255	130
Fig. 39: Biorreactores.	131
Fig. 40: Gráficas comparativas de la evolución de las fermentaciones.	135

Fig. 41: Actividad FAE de los extractos enzimáticos en biorreactor de 5 L.	136
Fig. 42: Actividad FAE de los extractos enzimáticos de <i>P. chrysogenum</i> B13 recuperados de un biorreactor de 5 L a pH 5, frente a los sustratos PR y MFA	138
Fig. 43: Actividad FAE de los extractos enzimáticos de <i>P. chrysogenum</i> B13 recuperados del fermentador de 20 L a pH 5, frente a los sustratos PR y MFA	140
Fig. 44: Comparativa de la actividad FAE de los cócteles enzimáticos de <i>P. chrysogenum</i> B13 recuperados del fermentador de Braun Biostat C a pH 5, y de las enzimas comerciales DEPOL 740L	142
Fig. 45: Fotografía de las señales de fluorescencia obtenidas por tinción 2D-DIGE del secretoma de <i>P. chrysogenum</i>	145
Fig. 46: Señales de fluorescencia individualizadas generadas por la tinción 2D-DIGE.	147
Fig. 47: Imagen tridimensional de los puntos proteicos 409 y 427.	147
Fig. 48: Gel con muestras de diferentes métodos de precipitación y limpieza de muestras proteicas.....	148
Fig. 49: Mapa proteico del extracto enzimático de <i>Penicillium chrysogenum</i> B13	150
Fig. 50: Clasificación funcional de todas las isoformas de las proteínas identificadas en el extracto enzimático de <i>P. chrysogenum</i> B13 según su función biológica.....	151
Fig. 51: Enzimas implicadas en la degradación de la pared celular de la pulpa de remolacha.....	177
Fig. 52: Diagrama esquemático que muestra posibles enlaces covalentes entre los polisacáridos y la lignina en las paredes celulares vegetales.....	179
Fig. 53: Esquema de tres hemicelulosas y tres pectinas: xilano, galacto (gluco) manano, xiloglucano, ramnogalacturonano I, homogalacturonano y xilogalacturonano, con las enzimas encargadas de la degradación de dicha estructuras.....	180

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1: Composición de la pulpa de remolacha seca.</i>	26
<i>Tabla 2: Clasificación de las enzimas FAEs en subfamilias según Udatha et al., 2011a.</i>	42
<i>Tabla 3: Secuencias de los oligonucleótidos empleados en el desarrollo del trabajo experimental.</i>	49
<i>Tabla 4: Componentes necesarios para una reacción de PCR con la enzima Phusion.</i>	60
<i>Tabla 5: Tiempos y temperaturas utilizados en las reacciones de PCR.</i>	60
<i>Tabla 6: PDA del ácido ferúlico. Datos de la recta patrón del calibrado del HPLC.</i>	79
<i>Tabla 7: Método cromatográfico empleado para cuantificar AF y AC en HPLC.</i>	79
<i>Tabla 8: Recta patrón para el calibrado del método Bradford.</i>	84
<i>Tabla 9: Composición de la parte concentradora de los geles desnaturalizantes de proteínas.</i>	84
<i>Tabla 10: Composición de la parte separadora de los geles desnaturalizantes de proteínas.</i>	85
<i>Tabla 11: Composición de geles desnaturalizantes de proteínas. Segunda dimensión</i>	88
<i>Tabla 12: Oligonucleótidos empleados en el análisis por RT-PCR de la expresión de los genes actA, faeA y faeB.</i>	127
<i>Tabla 13: Fermentación a pH 5.</i>	134
<i>Tabla 14: Fermentación a pH libre.</i>	134
<i>Tabla 15: Fermentación a pH 5 en fermentador de 5 L.</i>	137
<i>Tabla 16: Fermentación a pH 5 en fermentador de 20 L.</i>	139
<i>Tabla 17: Electroforesis diferencial en gel (DIGE).</i>	144
<i>Tabla 18: Proteínas de interés resultantes de la comparativa entre el secretoma de la cepa parental <i>P. chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255 y su transformante B13.</i>	145
<i>Tabla 19: Características de los puntos proteicos 409 y 427.</i>	146
<i>Tabla 20: Características proteínas encargadas de la degradación de la pared celular vegetal.</i>	153
<i>Tabla 21: Características proteínas relacionadas con la estructura de la pared celular del hongo.</i>	155
<i>Tabla 22: Características de las proteínas implicadas en el metabolismo general del hongo.</i>	156
<i>Tabla 23: Características de las proteínas encargadas de la defensa celular.</i>	157
<i>Tabla 24: Características de las proteínas con función desconocida</i>	158

ABREVIATURAS

- °C: grado centígrado
- AC: ácido cafeico
- *actA*: gen de la actina
- AF: ácido ferúlico
- AFAE: actividad feruloil esterasa
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- ADNc: ADN complementario
- Amp: ampicilina
- ARN: ácido ribonucleico
- ARNm: ARN mensajero
- EF: etil-ferulato
- FAE: feruloil esterasa
- *faeA*: gen feruloil esterasa A
- *faeB*: gen feruloil esterasa B
- FAEs: feruloil esterasas
- HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia (high performance liquid chromatography)
- MALDI: desorción/ionización láser asistida por matriz (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*)
- MC: marro del café
- min: minutos
- OD : oxígeno disuelto
- Phleo : fleomicina
- pb : pares de bases
- PC: pared celular vegetal
- PcFaeA: Proteína feruloil esterasa A de *P. chrysogenum*
- PcFaeB: Proteína feruloil esterasa B de *P. chrysogenum*
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*)
- PDA: *Photo Diode Array*
- PR: pulpa de remolacha
- rpm: revoluciones por minuto
- RT-qPCR: PCR en tiempo real
- T^a: temperatura
- vvm: volumen de aire/volumen de medio/minuto

RESUMEN

Los hongos filamentosos son conocidos por ser grandes productores de enzimas extracelulares, principalmente enzimas que degradan la pared celular vegetal, entre ellas las: celulasas, xilanasas, pectinasas y feruloil esterasa (FAEs) (Quiroz-Castañeda y Folch-Mallol, 2011). Se sabe que la acción conjunta de todas estas enzimas potencia la completa degradación de la estructura de la pared celular vegetal. Por ello, el uso de enzimas FAEs, han experimentado un gran interés en los últimos años debido a sus múltiples aplicaciones biotecnológicas. En este estudio se describe por primera vez la actividad feruloil esterasa de PcFaeA y PcFaeB en *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255, así como la sobreexpresión de dichas secuencias para la obtención de cepas superproductoras de enzimas con actividad feruloil esterasa y su potencial aplicación industrial en la degradación de la pulpa de remolacha y la obtención de ácido ferúlico. Así mismo se analiza por primera vez el secretoma completo de *P. chrysogenum* B13, cepa superproductora de PcFaeB en condiciones de producción de FAEs. Pudiéndose emplear este conocimiento en la mejora de algunos de los procesos biotecnológicos industriales más comunes en las industrias: alimentaria, del papel, de biocombustibles, textil, farmacéutica, cervecera, de detergentes, etc., así como para la producción biotecnológica de compuestos de interés.

ABSTRACT

Filamentous fungi are known to be the major producers of extracellular enzymes, mainly enzymes that break down the cell wall, including: cellulases, xylanases, pectinases and feruloyl esterases (FAEs) (Quiroz-Castañeda y Folch-Mallol, 2011). It is known that the combined action of all of these enzymes enhances the complete degradation of the plant cell wall structure. Therefore, the use of the enzymes FAEs, have experienced great interest in the past years due to their multiple biotechnological applications. In this study, the feruloyl esterase activity of PcFaeA and PcFaeB in *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 is described for the first time, as well as the overexpression of these sequences in order to obtain superproducing strains of feruloyl esterase enzymes and their potential industrial application in the degradation of sugar beet pulp and the production of ferulic acid. The complete secretoma of *P. chrysogenum* B13, a PcFaeB superproducing strain under induction conditions for FAE production, is also analyzed for the first time. It is possible to use this knowledge in the improvement of some the most common industrial biotechnological processes related to food, paper, biofuel, textile, pharmaceutical, brewing, detergent, etc. industries, as well as for the biotechnological production of compounds of interest.

INTRODUCCIÓN y OBJETIVOS

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Las enzimas feruloil esterasas (conocidas también como cinamoil éster hidrolasas, esterasas del ácido ferúlico, esterasas del hidroxicinamoilo, o por sus siglas en inglés FAE) catalizan la liberación de compuestos fenólicos de las paredes celulares vegetales. Entre estos compuestos fenólicos, se encuentra el ácido ferúlico (AF) y otros ácidos como los ácidos p-cumárico, cafeico y sinápico. Las enzimas FAEs hidrolizan el enlace éster entre el ácido fenólico y un polisacárido (Williamson *et al.*, 1998a)(Mathew y Abraham, 2004). Las enzimas FAEs están clasificadas, en líneas generales, en cuatro grupos A, B, C y D según la especificidad de sustrato (véase Crepin *et al.*, 2004), son proteínas extracelulares que se secretan al medio de cultivo cuando se induce su producción (Fazary y Ju, 2007).

El interés por las enzimas feruloil esterasas se ha incrementado de manera considerable en los últimos años dadas sus múltiples aplicaciones biotecnológicas en la industria farmacéutica (Omar, 1992)(García-Conesa *et al.*, 2004); alimentaria, tanto animal (Yu *et al.*, 2005a) como humana (Priefert *et al.*, 2001), (Mathew y Abraham, 2004); papelera (Record *et al.*, 2003)(Sigoillot *et al.*, 2005); textil (Graf, 1992) y de producción de biocombustibles (Saha, 2003). Además, en esta última industria, una de las necesidades es limitar las emisiones de monóxido de carbono, para fomentar los llamados "bioprocesos verdes" (*green bioprocesses*), por lo que se está potenciando la utilización de las enzimas FAEs junto con las enzimas lacasas y xilanasas para la obtención de etanol a partir de azúcares fermentables procedentes de biomasa lignocelulósica (Farrell *et al.*, 2006). Este mismo enfoque de industrias limpias se aplica a la elaboración del papel para eliminar el uso de compuestos clorados, altamente contaminantes, empleando en su lugar enzimas microbianas (entre las que se incluyen las FAEs) reduciendo también, de esta forma los costes del tratamiento de los residuos generados (Record *et al.*, 2003)(Sigoillot *et al.*, 2005). Como consecuencia, el número de patentes depositadas en las bases de datos de los organismos: *US Patent applications* (US), *European Parliament documents* (EP) y en *World Intellectual Property Organization-Patent Cooperation Treaty* (WIPO/PCT) referidas tanto a aplicaciones como a nuevos descubrimientos de enzimas FAEs se ha ido incrementando a lo largo de los años situándose en casi 150 a finales del año 2016 (Dilokpimol *et al.*, 2016), 35 de las cuales han sido depositadas desde el año 2000 (Gopalan *et al.*, 2015).

A pesar de su interés industrial y tecnológico, no existen en el mercado enzimas FAEs totalmente puras, ni existencias suficientes de dichas enzimas. Esta actividad enzimática se ha encontrado tanto en hongos como en bacterias, existiendo diversas isoformas que varían en cuanto a peso molecular, punto isoeléctrico y condiciones óptimas de actividad. Esto hace que, a pesar de que pueden actuar sobre un amplio rango de sustratos vegetales, la eficacia de liberación de ácidos fenólicos podría variar según el sustrato de que se trate (Polaina y MacCabe, 2007).

La actividad FAE, dentro de sus potenciales aplicaciones, podría otorgar un valor añadido a los residuos agroindustriales conocidos, como por ejemplo la pulpa de remolacha, dada su riqueza en compuestos fenólicos, como el AF.

El AF es un potente antioxidante con capacidad para neutralizar radicales libres con diversas aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica. De nombre sistemático IUPAC ácido (E)-3-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil) propil-2-enoico, es un derivado del ácido cinámico y es muy abundante en la naturaleza (Ou y Kwok, 2004), se encuentra formando parte de la pared celular de diferentes especies vegetales (Graf, 1992)(Mathew y Abraham, 2004)(Alamed *et al.*, 2009). Entre sus propiedades se encuentra la de proteger de la radiación ultravioleta, por lo cual es utilizado en la elaboración de protectores solares (Saija *et al.*, 2000); también es utilizado como antiinflamatorio (Graf, 1992) y en la industria alimentaria como precursor para la elaboración del saborizante alimentario: 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído o vainillina, utilizando para su producción microorganismos como *Streptomyces setonii* o *Amycolatopsis* (Priefert *et al.*, 2001)(Walton *et al.*, 2000).

En la actualidad, los hongos constituyen el grupo de microorganismos más utilizado para la producción de enzimas FAEs habiéndose encontrado dicha actividad en diferentes especies del género *Penicillium* (Panagiotou *et al.*, 2007)(Castanares *et al.*, 1992)(Sakamoto *et al.*, 2005). Actualmente el número de proteínas FAEs de microorganismos que aparecen depositadas en las bases de datos no es muy grande. Sin embargo, se ha descrito la presencia de esta actividad enzimática en muchas especies de hongos y bacterias sin que se conozcan ni sus secuencias proteicas ni la de los genes que las codifican. Este hecho supone una oportunidad para buscar nuevas enzimas FAEs con nuevas propiedades que puedan tener una aplicación biotecnológica y que superen el problema de las patentes para su producción industrial. En el caso del género *Penicillium* se ha detectado la presencia de la actividad enzimática FAE en diferentes especies (Donaghy y McKay, 1997)(Panagiotou *et al.*, 2007)(Castanares *et al.*, 1992), no encontrándose protegida bajo ninguna patente en el caso concreto de la especie *Penicillium chrysogenum*.

Uno de los compuestos comúnmente utilizados en la producción de enzimas extracelulares en los procesos biotecnológicos son las fuentes de carbono de origen vegetal de bajo coste. Los residuos lignocelulósicos procedentes de la agricultura de la remolacha, como es la pulpa de remolacha (PR) es un ejemplo de ellos. La pulpa de remolacha es un compuesto muy abundante en nuestra provincia, en 2014 se obtuvieron 134.515 toneladas de pulpa de remolacha procedentes de la industria azucarera en la Castilla y León, de las cuales 24.903 fueron obtenidas en la provincia de León (según el Anuario Estadística Agraria de la Junta de Castilla y León 2014).

Por todo lo indicado anteriormente, la manipulación génica constituye una importante herramienta para potenciar la producción de la actividad FAEs en *P. chrysogenum*. Dada la disponibilidad del genoma de este hongo filamentoso, así como el conocimiento adquirido en relación a las herramientas para su manipulación génica, se planteó en el presente trabajo de doctorado el uso de *P. chrysogenum* como un potencial productor de enzimas FAEs primeramente a escala de laboratorio y posteriormente a escala semi-industrial en planta piloto.

El objetivo fundamental de este trabajo de doctorado fue la obtención de cepas de *P. chrysogenum* capaces de producir extractos enzimáticos enriquecidos en actividad FAE utilizando fuentes de carbono de bajo coste, como es la pulpa de remolacha. Se trató de mejorar dicha producción de enzimas FAEs en dicho hongo filamentoso mediante técnicas de ingeniería genética. Igualmente, dichos extractos fueron caracterizados con la intención de buscar una potencial aplicación industrial de los mismos. Para todo esto se tuvieron en cuenta los siguientes objetivos específicos:

1.- Optimizar medios y condiciones de cultivo para una producción óptima de enzimas FAEs.

2.- Identificar los genes *fae* en *P. chrysogenum*, obtener mediante ingeniería genética transformantes sobreexpresados en los mismos y seleccionar aquellos con mayor actividad FAE.

3.- Escalar el proceso de fermentación, a escala de planta piloto, para maximizar la producción enzimas FAEs empleando transformante/s de *P. chrysogenum* con los mejores ratios de producción.

4.- Llevar a cabo el análisis proteómico del extracto enzimático producido por *P. chrysogenum* durante el proceso fermentativo en medio con pulpa de remolacha como fuente inductora de la producción de enzimas FAE.

**REVISIÓN
BIBLIOGRÁFICA**

1. *Penicillium chrysogenum*

1.1. TAXONOMÍA Y NOMENCLATURA

La especie *Penicillium chrysogenum* fue descrita por primera vez por Thom en 1910 (Thom, 1910). Es un organismo eucariota perteneciente al reino *Fungi*, filo *Ascomycota* y orden *Eurotiales*. La clasificación taxonómica completa de *P. chrysogenum*, se muestra en la Fig. 1.

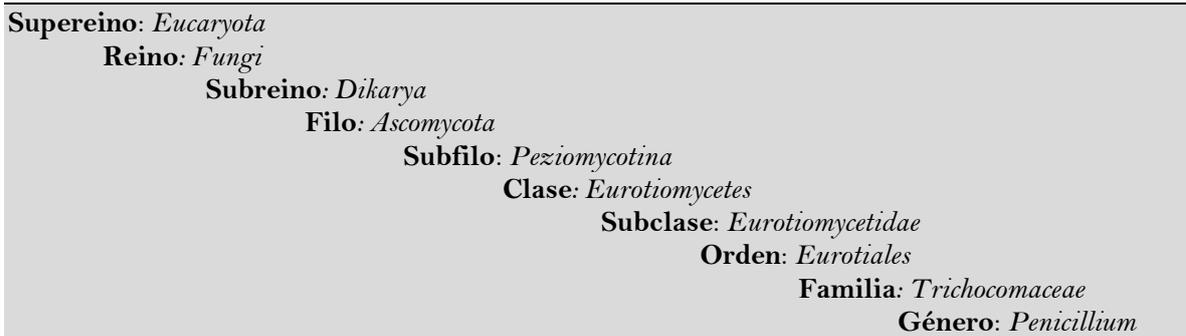


Fig. 1: Clasificación taxonómica de *P. chrysogenum*.

El nombre *Penicillium chrysogenum* proviene del latín *penicillus* (pincel) y del griego *chrysosχρυσος* (dorado, amarillo) y *genosγενος* (linaje, origen) (Pontón J. *et al.*, 2002). En la Fig. 2 se muestran diferentes imágenes de su morfología.

Respecto a la nomenclatura del microorganismo *Penicillium chrysogenum* existe mucha controversia y disparidad de opiniones y estudios. *Penicillium notatum* (especie en la que A. Fleming descubrió la actividad antibiótica de la penicilina por primera vez) y *P. chrysogenum* a menudo han sido descritas como la misma especie, puesto que a nivel morfológico no existen diferencias significativas entre ambas (Samson *et al.*, 1977). Así mismo, un reciente estudio (Houbraken *et al.*, 2011), basado en análisis filogenéticos, asegura que *P. notatum/chrysogenum*, es en realidad *Penicillium rubens*. En este trabajo de doctorado se va a usar la nomenclatura de *P. chrysogenum*, por ser la más utilizada por la comunidad científica.

1.2. CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES

Los hongos pertenecientes al género *Penicillium* se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza: en suelos, material vegetal en descomposición, en pieles de animales, en alimentos, en ambientes cerrados, húmedos y oscuros, etc. Sus esporas se encuentran habitualmente en el polvo doméstico y en el aire (Pontón J. *et al.*, 2002), (Houbraken *et al.*, 2011), (Madigan *et al.*, 2012).

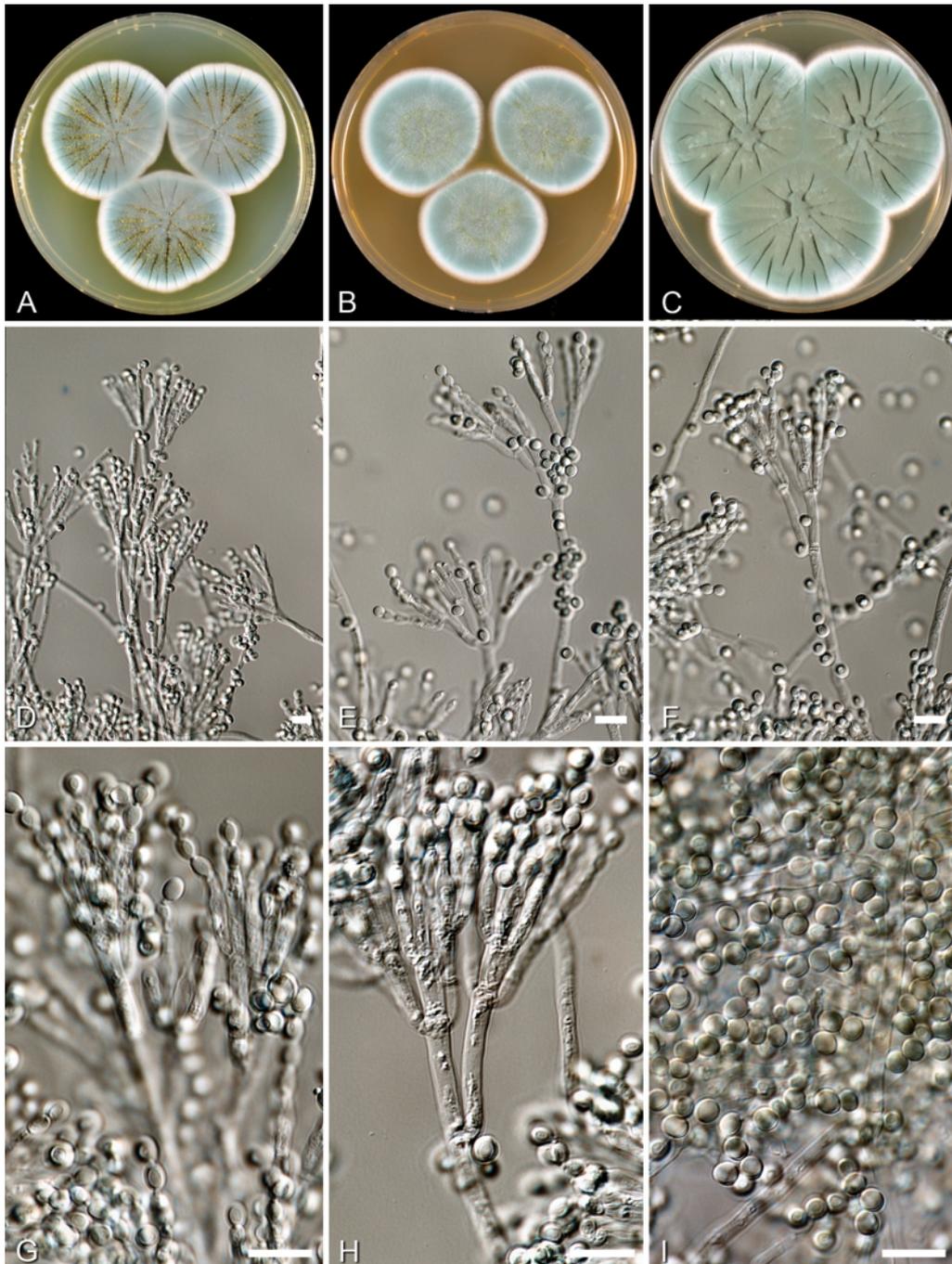


Fig. 2: Imágenes de la morfología de *Penicillium*. Cepa *Penicillium chrysogenum* CBS 205.57. A–C. Placas Petri con colonias de *P. chrysogenum* cultivadas en diferentes medios de cultivo. A. CYA. B. MEA. C. YES. D–H. Conidióforos. I. Conidios. Barra = 10 μ m. Fuente: Houbraken *et al.*, 2011.

Estos hongos son típicamente aerobios y quimioorganótrofos, es decir, obtienen la energía tanto del carbono como de compuestos orgánicos (Peberdy, 1987). Tienen pocos requerimientos nutricionales, lo que les hace muy atractivos desde el punto de vista de su uso industrial. Muchas especies pueden crecer en ambientes extremos como pHs bajos o altas temperaturas (hasta 62°C), propiedades que junto con la ubicuidad de las esporas fúngicas, hacen que sean los contaminantes más frecuentes de alimentos, medios de cultivo microbianos, etc.

La característica principal de estos hongos filamentosos es que sus células se encuentran dispuestas en largos filamentos tubulares, divididos en segmentos que se denominan hifas septadas. Cada célula está separada de las contiguas por un septo de pared celular, dejando un poro que permite el intercambio de material citoplasmático y la comunicación entre las células. Cada filamento crece fundamentalmente por el extremo mediante un mecanismo de extensión celular. El crecimiento en masa de las hifas se denomina micelio vegetativo, el cual puede verse fácilmente sin ayuda del microscopio.

Las cepas de *P. chrysogenum* forman colonias de crecimiento rápido, son vellosas, aterciopeladas y de color verdoso con una corona radial ancha y blanca (Fig. 2 A-C). El reverso de las colonias habitualmente es de color amarillento o cremoso. Su temperatura óptima de crecimiento es de 25°C, sin embargo son capaces de crecer entre 5 y 37°C (Pontón J. *et al.*, 2002).

La reproducción de *P. chrysogenum* es principalmente asexual, mediante la formación de esporas o conidios a partir del micelio, constituyendo el denominado micelio aéreo (Fig. 3), aunque recientemente también se ha descrito reproducción mediante ciclo sexual en *P. chrysogenum* (Böhm *et al.*, 2013)(Dahlmann *et al.*, 2015). El micelio aéreo está formado por hifas aéreas a partir de las cuales surgen los conidióforos o ramas fértiles, cada uno de ellos formado por un tallo basal septado que soporta una estructura ramificada en tres niveles (terverticilado). Dichas ramificaciones terminan en unas células que se conocen como fiálides. Las fiálides originan los conidios (Peberdy, 1987). Los conidios son esporas asexuales que a menudo se encuentran muy pigmentadas, son extremadamente resistentes a la desecación y sirven como forma de dispersión del hongo en nuevos hábitats, cuando las condiciones ambientales lo permiten.

En el caso de *P. chrysogenum*, cuando se forman los conidios, cambia el color blanco del micelio, y se torna de un color verde-azulado. La presencia de estas esporas da a la masa micelial la apariencia de una capa de polvo.

La alimentación de estos hongos se produce mediante la secreción de enzimas extracelulares que digieren complejos materiales orgánicos como madera, papel, tela u otros derivados presentes en el medio. Siendo capaces dichos hongos, gracias a las enzimas secretadas, de descomponer los polisacáridos o proteínas, en unidades más simples como azúcares, péptidos, o aminoácidos, los cuales son fácilmente asimilables por el hongo como fuente de carbono y energía (Hu *et al.* 2015).

Las especies del género *Penicillium* son mundialmente conocidas por su capacidad para producir antibióticos β -lactámicos ampliamente utilizados como son las penicilinas (Fernández-Aguado *et al.*, 2012)(Fernández-Aguado *et al.*, 2013)(Fernández-Aguado *et al.*, 2014).

Además de varios tipos de penicilina, *P. chrysogenum*, produce otros metabolitos secundarios de gran interés en la industria, como la roquefortina C, meleagrina, xantocilinas, ácido ciclopiazónico, sorbicilina y chrisogenina (de Hoog *et al.*, 2000) (Pontón J. *et al.*, 2002)(Hidalgo *et al.*, 2014). Es por ello, que ha sido utilizado industrialmente tanto para la producción de metabolitos secundarios como de enzimas extracelulares, como son la poliamina oxidasa, la fosofogluconato deshidrogenasa o la glucosa oxidasa, ya que posee una gran capacidad para degradar la biomasa de las plantas (Kobayashi *et al.*, 1982) (Leiter *et al.*, 2004). En consecuencia, es potencialmente una excelente fuente de nuevas enzimas para un amplio abanico de industrias: alimentaria, química, farmacéutica, del papel, etc.

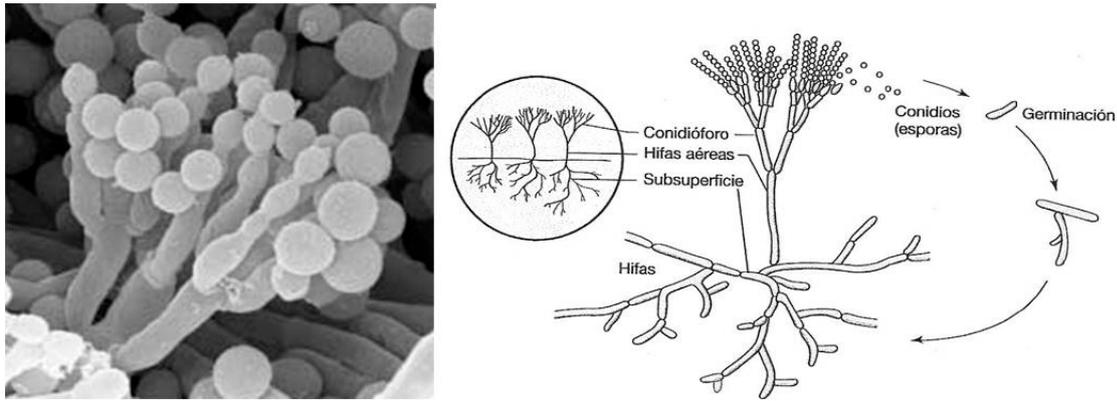


Fig. 3: Reproducción asexual de los hongos filamentosos. Izda.: imagen de microscopía electrónica de barrido de un conidióforo de un hongo filamentosos. **Dcha.:** Esquema del ciclo de reproducción asexual en hongos filamentosos.

1.3. DIVERSIDAD DE CEPAS

Como se ha indicado anteriormente, *P. chrysogenum* es utilizado a nivel industrial como productor de penicilinas, es por ello que con el paso del tiempo y gracias principalmente a las mutaciones al azar con agentes mutagénicos, se han desarrollado cepas de *P. chrysogenum* con una gran capacidad de producción de penicilinas (Ozcengiz y Demain, 2013). Igualmente la ingeniería genética ha sido utilizada como herramienta para mejorar la producción de este y otros antibióticos β -lactámicos (Weber *et al.*, 2012)(Adrio y Demain, 2010).

Fue Alexander Fleming quien, en 1928, descubrió la existencia de la penicilina por un “descuido afortunado” mientras trabajaba en su laboratorio del Hospital de Saint Mary de Londres (Reino Unido). La cepa original del hallazgo de Fleming (Fleming, 1929) fue denominada como *P. notatum* NRRL-1249B21 y producía alrededor de 1,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de penicilina. Aunque inicialmente se desconocía la molécula causante de la actividad antibiótica y no fue hasta 1940 cuando se aisló y caracterizó la penicilina. Durante la Segunda Guerra Mundial el uso de este antibiótico se hizo de extrema necesidad, y a partir de 1941 desde el *Northern Regional Research Laboratory* (NRRL) de Peoria (Illinois, EEUU) se desarrollaron métodos de fermentación para acelerar el crecimiento de

cultivos fúngicos y se fomentó el envío de cepas desde todas las partes del mundo para ser analizadas. Dicho proyecto tuvo un fuerte apoyo, investigador y económico, tanto por parte del Reino Unido como de los Estados Unidos (Kardos y Demain, 2013).

En 1943, a partir de una muestra de melón enmohecido, se aisló la cepa *P. chrysogenum* NRRL-1951. Esta cepa producía entre 60 y 150 µg/mL de penicilina y era más adecuada para crecer en cultivos sumergidos que la cepa original (Raper *et al.*, 1944). Esta diferencia en la producción es debida a una mutación de un gen involucrado en el catabolismo del ácido fenilacético, mediante la cual se reduce la oxidación de este ácido, lo que aumenta la producción de penicilina con respecto a la cepa original (Rodríguez-Sáiz *et al.*, 2001).

A partir de la cepa NRRL-1951 se seleccionaron diversos mutantes, formados bien por mutagénesis al azar, bien usando mutágenos físicos como la luz UV y los rayos X o mediante el uso de compuestos químicos como la nitroguanidina.

Mediante mutación con rayos X de la cepa *P. chrysogenum* NRRL-1951, se obtuvo el mutante X-1612, que tenía un rendimiento en la producción de 300 µg/mL de penicilina. A partir de este mutante en la Universidad de Wisconsin (EEUU) y mediante varias rondas de mutación por luz UV se obtuvo otro mutante (Q-176) que producía 550 µg/mL. Esta cepa es conocida a nivel industrial como la antecesora de toda una línea de cepas “Wisconsin”, como por ejemplo la cepa de baja producción *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (Backus y Stauffer, 1955), (Elander, 1983). Esta cepa, presenta una modificación genética en la que se ve disminuida la ruta del homogentisato para el catabolismo del ácido fenilacético, el precursor de la cadena lateral en la biosíntesis de bencilpenicilina (Rodríguez-Sáiz *et al.*, 2001).

Todas estas cepas han dado lugar a cientos de cepas nuevas, entre ellas la cepa AS-P-78 de alto rendimiento de producción de penicilina, obtenida por la empresa Antibióticos S.A. de León (España). Algunas de estas cepas han dado lugar a las cepas utilizadas actualmente en la producción de penicilinas y que obtienen rendimientos de más de 50 mg/mL, ayudadas también por las mejoras técnicas, como la mejora en los procesos de fermentación y la eficacia de la recuperación del producto.

Gracias a su elevado interés y principal uso como productor de penicilinas, tanto el metabolismo y la regulación génica, como el manejo en el laboratorio del hongo *Penicillium chrysogenum* se conocen en profundidad. En el año 2008 concluyó un proyecto internacional dedicado a la secuenciación del genoma de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255, en el que colaboraron centros de todo el mundo entre los que se encuentran la Asociación de Investigación Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC) (España) y la Universidad de León (España) (van den Berg *et al.*, 2008). Tan solo dos años más tarde en INBIOTEC y en colaboración con la

Universidad de León, se llevó a cabo el análisis del proteoma, tanto intracelular como extracelular, de varias cepas de *P. chrysogenum* (Jami *et al.*, 2010a)(Jami *et al.*, 2010b).

La utilización de cepas de *P. chrysogenum* con otros fines diferentes a la producción de penicilinas no está tan extendida y aun siendo relativamente reciente, tiene un grandísimo potencial.

2. Remolacha

2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

La remolacha (*Beta vulgaris* L.), pertenece a la familia *Chenopodiaceae*, que tiene más de 1400 especies y unos 105 géneros. Existen diferentes variedades de remolacha (Fig. 4), entre ellas las más conocidas son la remolacha roja o de mesa (*Beta vulgaris* L. var. *rubra*), usada en alimentación humana, la remolacha de forraje (*Beta vulgaris* L. var. *rappacea*), para consumo animal y la remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L. var. *saccharifera* o var. *altissima*), cultivada para la obtención de azúcar (Villarías, 2000).

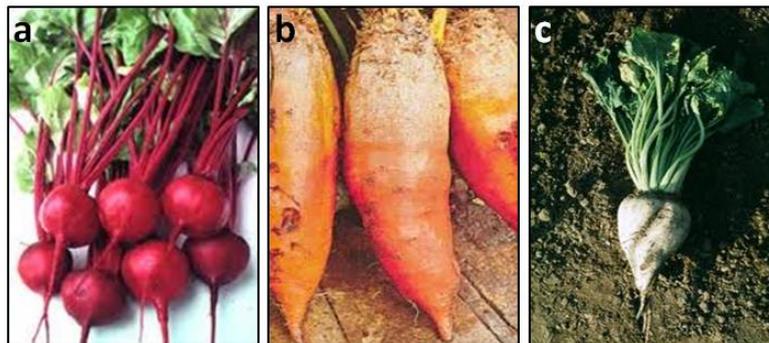


Fig. 4: Tipos de remolacha: a) Roja o de mesa, b) Forrajera amarilla, c) Azucarera

Se trata de una planta dicotiledónea de ciclo bianual, con polinización cruzada, principalmente llevada a cabo por el viento. En el primer año de siembra forma abundante follaje y acumula sacarosa en la raíz principal, mientras que en el segundo año, tras la vernalización, emite las flores y fructifica (Villarías, 2000). Para la producción de azúcar interesa sólo el primer año de crecimiento (fase vegetativa) y se recomienda recolectar cuando la acumulación de sacarosa en la raíz es máxima. El segundo año de crecimiento (fase reproductiva) sólo interesa para la producción de semillas.

La remolacha azucarera ha sido usada desde la Edad Media para la producción de azúcar. La carne blanca y carnosa de su raíz es particularmente rica en sacarosa, actualmente y gracias a la mejora del cultivo, el contenido en este carbohidrato alcanza el 15-20% (Castells, 2012). No

necesita ninguna transformación química, puesto que el azúcar se encuentra de forma natural en la raíz de la planta.

La industria azucarera separa únicamente la sacarosa de otros componentes de la remolacha (pulpa de remolacha y melazas), los cuales se suelen utilizar en nutrición animal, producción de alcohol o incluso como fuente de carbono para la producción de levadura de panadería.

El azúcar producido en el mundo se obtiene principalmente a partir de dos plantas, la caña de azúcar, en las zonas tropicales (80% de la producción mundial) y la remolacha azucarera, en zonas templadas (www.azucarera.es).

2.2. CULTIVO DE REMOLACHA EN ESPAÑA

Según datos del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente de España (MAGRAMA) sobre la campaña 2013/14, España es el octavo país productor de azúcar dentro de la Unión Europea. El cultivo de remolacha en España se divide en zonas:

- **Zona Norte:** Castilla y León, País Vasco, La Rioja y Navarra. Cultivo de regadío con siembra primaveral y cosecha en otoño.
- **Zona Sur:** Andalucía. El cultivo puede ser tanto de secano como de regadío, en ambos casos la siembra se realiza en otoño con cosecha en primavera.

El 91 % de la remolacha que se cultiva en España es de regadío, el cultivo de secano tan solo se da en el sur de Sevilla y en Cádiz. Castilla y León destaca con el cultivo del 71,5 % del total de superficie de regadío.

Respecto a la producción de remolacha en España el orden de Comunidades Autónomas de mayor a menor importancia es el siguiente (datos campaña 2013/14):

- **Castilla y León:** 86,3 % de la producción de remolacha invernal. Las provincias más destacadas son Valladolid y León con 7.042 ha / 584.056 toneladas y 5.218 ha / 401.037 toneladas de remolacha respectivamente.
- **Andalucía:** Produce prácticamente la totalidad de la remolacha de recolección estival de España. Sevilla con 5.739 ha/531.154 toneladas y Cádiz con 2.795 ha/210.550 toneladas.
- **País Vasco:** Toda su producción se concentra en la provincia de Álava con 2.240 ha / 163.520 toneladas de remolacha de recolección invernal.
- **La Rioja:** 1.257 ha / 115.300 toneladas de remolacha de recolección invernal.

- **Navarra:** 118 ha / 12.780 toneladas de remolacha de recolección invernal.

La producción de azúcar en España, se lleva principalmente a cabo en cinco fábricas. Cuatro de ellas situadas en la Zona Norte de España, tres pertenecen a la compañía Azucarera Iberia S.L. y están localizadas en La Bañeza (León), Toro (Zamora) y Miranda de Ebro (Burgos) y la otra pertenece a la cooperativa ACOR, situada en Olmedo (Valladolid). En la Zona Sur de España, concretamente en Jerez de la Frontera (Cádiz), se localiza otra fábrica de la empresa Azucarera Iberia S.L.

En la Fig. 5 se puede observar la producción de pulpa de remolacha en la comunidad de Castilla y León en el año 2014, siendo las provincias de Valladolid y León las mayores productoras de la comunidad de este subproducto agroindustrial con 46.178 y 24.903 toneladas de pulpa de remolacha seca producidas en el año 2014.

	Producción Remolacha (t)	Productos obtenidos de la industrialización		
		Azúcar	Melaza	Pulpa seca
Ávila	212	39.340	-	10.186
Burgos	191	28.305	8.617	9.575
León	498	71.405	22.910	24.903
Palencia	205	27.700	9.233	10.259
Salamanca	172	26.582	6.680	8.575
Segovia	143	22.841	-	8.565
Soria	25.282	3.887	1.163	1.291
Valladolid	84	127.224	42.408	46.178
Zamora	300	53.943	13.484	14.983
CASTILLA Y LEÓN	27.633	401.227	104.495	134.515

Fig. 5: Destino de la producción de remolacha azucarera en 2014, según el Anuario de Estadística Agraria de la Junta de Castilla y León de 2014.

2.3. PROCESO DE OBTENCIÓN DE LA PULPA DE REMOLACHA DURANTE EL PROCESADO DE LA REMOLACHA AZUCARERA PARA LA PRODUCCIÓN DE AZÚCAR

En zonas templadas, la remolacha se siembra a principios de primavera, después de las últimas heladas y se recoge aproximadamente seis meses después. La recolecta comienza en septiembre y se extiende a lo largo del otoño. En zonas más cálidas el cultivo tiene lugar en otoño y la recogida en primavera.

La remolacha azucarera se utiliza principalmente para la producción de azúcar, sin embargo, en el proceso se obtienen varios subproductos de gran utilidad, como por ejemplo la pulpa de remolacha (PR), de interés en este trabajo de doctorado.

Una vez extraída de la tierra, la remolacha azucarera pierde rápidamente el azúcar, puesto que se alimenta de él. Por ello es muy importante realizar la extracción de azúcar lo más rápido

posible. De hecho, la mayoría de las plantas de procesado o azucareras se sitúan muy cerca de los cultivos de remolacha, para minimizar, de este modo, la pérdida de azúcar.

A su llegada a la azucarera (Fig. 6), se eliminan el tallo y las hojas de las remolachas y se lavan las raíces con agua a presión o a contracorriente para eliminar tierra, piedras u otros materiales no deseados (Castells, 2012). Una vez limpias, las remolachas pasan por un molino donde son cortadas en láminas muy finas llamadas cosetas, con el fin aumentar la superficie de contacto y que la extracción de azúcar sea más eficiente.

El azúcar se encuentra en el interior de las células de la remolacha recubierta de una membrana impermeable, la manera de romper esta barrera es utilizando agua a contracorriente a más de 70°C, proceso conocido como difusión. La barrera se rompe y el azúcar y la materia soluble difunden al agua poco a poco. En esta etapa se obtienen dos productos: por un lado el jugo de difusión, líquido negro que contiene entre un 13 y un 14% de azúcar, 2-3% de impurezas orgánicas o minerales y un 83-85% de agua. Y por otro lado se obtienen la denominada **pulpa de remolacha**, que prácticamente no contiene nada de azúcar pero es muy rica en materia orgánica y contiene otros compuestos de alto valor añadido, como por ejemplo la celulosa o la betaína.

Por un lado, la PR obtenida de los difusores y que contiene una gran cantidad de agua, se somete a un proceso de prensado, secado y granulado, para su posterior comercialización (www.azucarera.com). Y por otro lado, el jugo obtenido en la etapa de difusión pasa a la etapa de depuración, donde es sometido a varios procesos consecutivos, con el fin de eliminar las impurezas restantes: preencalado, encalado, carbonatación, filtraciones, sulfitación, decalcificación y evaporación (www.cooperativaacor.com).

Después de estas etapas se obtiene un sirope líquido al cual se le extrae el agua poco a poco en el proceso conocido como cristalización. En esta etapa, la sacarosa se va concentrando y formando cristales, a la vez que las últimas impurezas se eliminan pasando a las aguas madres, que se conocen como melazas. La cristalización consiste en al menos tres etapas de cristalización alternadas con etapas de centrifugado y secado (www.cooperativaacor.com). Los cristales de azúcar se secan y se almacenan en silos hasta su acondicionamiento y consumo posteriores.

La industria azucarera puede considerarse una de las industrias en las que no se desperdicia nada, todos los subproductos generados, tienen un valor añadido (Villarías, 2000) (www.azucarera.com):

- Tierra vegetal: la tierra que trae la remolacha del campo de cultivo, es aprovechada como sustrato de cultivo fértil así como las piedras, que son utilizadas para la regeneración paisajística y la construcción.

- Melaza: es la principal materia prima para la fabricación de alcohol, levadura para panificación y pienso para el ganado.
- Rabihojas: los rabillos y las hojas que trae la remolacha, y que se eliminan en la primera etapa, constituyen un alimento rico en nutrientes que se destina a la alimentación animal.
- Carbocal: formado por carbonato cálcico, es comercializado como fertilizante ecológico, mejorando notablemente los cultivos y evitando el uso de fertilizantes tradicionales.
- Agua: la contenida por la remolacha y extraída durante el proceso, se utiliza para el lavado de otras remolachas en el circuito de fábrica evitándose así un mayor uso del cauce público.
- Pulpa de la remolacha: una vez prensada y seca, se comercializa como pienso de alto valor nutricional para el ganado.

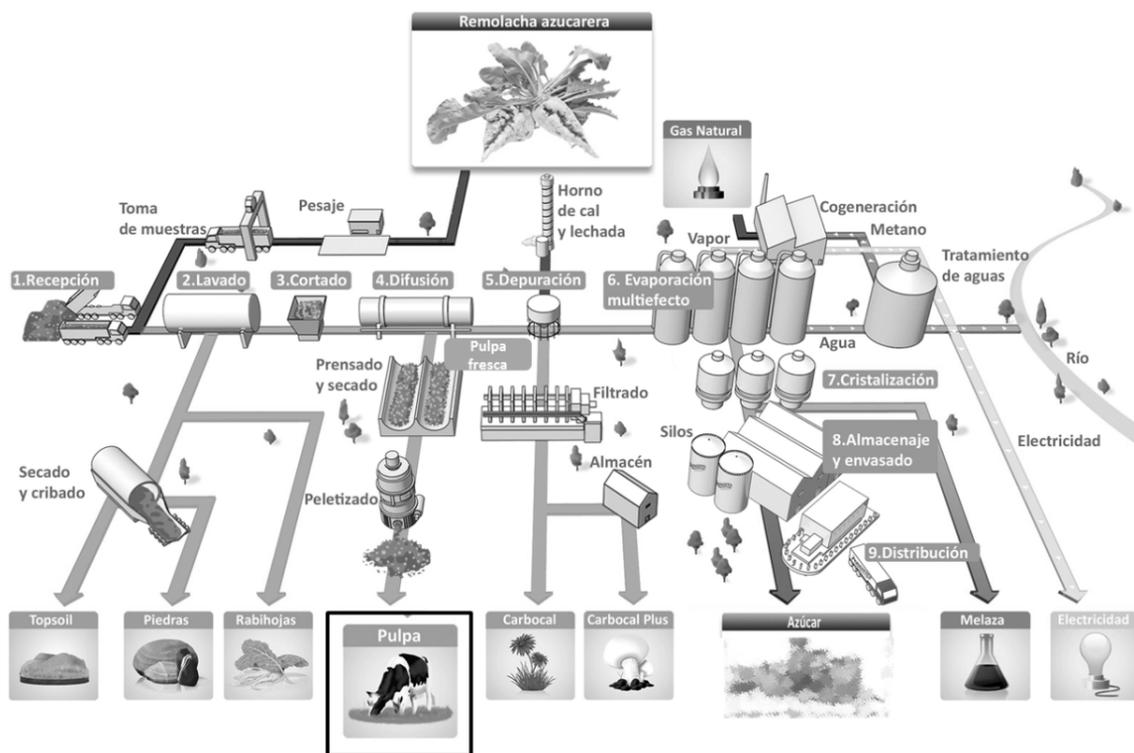


Fig. 6: Proceso simplificado de la obtención de pulpa de remolacha a partir de la remolacha azucarera. Modificado de www.azucarera.com.

2.4. LA PULPA DE REMOLACHA

La PR es un subproducto de la industria azucarera. El tratamiento de una tonelada de remolacha genera, aproximadamente, unos 430-500 kg de PR húmeda (Villarías, 2000).

Tras la extracción de azúcar de la remolacha, la pulpa queda muy enriquecida en pared celular vegetal y por lo tanto en celulosa y hemicelulosa (Castle *et al.*, 1966). Esta pared, al estar poco lignificada, es muy digestible por los rumiantes. Por ello, tradicionalmente la PR se ha utilizado exclusivamente para la alimentación animal, en sus dos formas: húmeda y seca (Fig. 7).

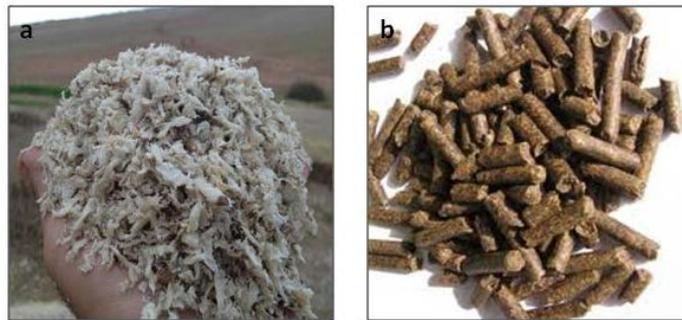


Fig. 7: Aspecto de la pulpa de remolacha: a) húmeda, b) seca en forma de pellet.

En zonas templadas cercanas a las azucareras, la pulpa húmeda sirve de alimento para el ganado durante el invierno, justo después de la cosecha ya que tiene un excelente valor nutricional. Tiene un contenido en materia seca del 10-12% y sirve de alimento principalmente para rumiantes, ya que gracias a las bacterias de su intestino son capaces de degradar la celulosa. No obstante, su almacenamiento produce un olor desagradable y no puede mantenerse durante mucho tiempo debido a su elevada humedad.

Las pulpas secas o deshidratadas, sin embargo, pueden conservarse durante largos periodos de tiempo, pueden transportarse a lugares más alejados de las azucareras y conservan su excelente valor nutricional. La pulpa seca contiene un 25-30% de materia seca, mientras que la pulpa deshidratada alcanza el 88-90% de contenido en materia seca.

En la actualidad, la PR comienza a tener otras aplicaciones, según la Unión de Sociedades de Interés Agrícola Colectivo de Transformación de Pulpa de Remolacha francesa (USICA, *L'Union des Sociétés d'Intérêt Collectif Agricole de Transformation des Pulpes de Betteraves*) las posibles aplicaciones serían las siguientes:

- Es una fuente importante de pectinas para la industria cosmética y para el tratamiento de efluentes.

- El hombre no digiere las fibras que la componen, por lo cual, incorporadas a los alimentos, favorecen el tránsito intestinal, lo que comúnmente se conoce como “fibra”.
- Es un medio orgánico que sirve como fuente de carbono, esencial para el crecimiento de microorganismos en procesos fermentativos. Algunos de estos procesos fermentativos están enfocados a alterar el valor nutricional de la remolacha o pueden estar orientados a la producción de enzimas u otros metabolitos secundarios.
- Los diferentes ácidos que constituyen las pectinas son la materia base para la síntesis de tensioactivos biodegradables.
- Obtención de vainillina natural a partir de la biotransformación de la pulpa.
- La pulpa deshidratada también puede ser utilizada en la industria papelera.

3. Pared celular vegetal

La pared celular es una estructura rígida que se encuentra en el exterior de la membrana plasmática en las células vegetales. Además de en las plantas, la pared celular se puede encontrar también en algunas bacterias, algas y hongos. La pared celular de las plantas tiene unas determinadas funciones primarias como regular el volumen celular y determinar la forma de la célula, pero también tiene otras funciones adicionales como otorgar estabilidad mecánica, mantener unidas las células y constituir una barrera frente al ataque de los patógenos.

3.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

3.1.1. COMPOSICIÓN:

La pared celular vegetal (Fig. 9) consiste en una mezcla compleja de polisacáridos y otros polímeros secretados por la célula y ensamblados en una red. Contiene además proteínas estructurales, lípidos, enzimas, polímeros fenólicos, minerales y otros materiales que modifican las características físico-químicas de la pared. Su composición varía ampliamente en los distintos grupos taxonómicos (Azcón-Bieto y Talón, 1993). La descripción de los componentes más habituales de la pared celular vegetal se detalla a continuación:

- **POLISACÁRIDOS:** los polisacáridos son los compuestos más abundantes en todas las paredes celulares vegetales, están formados por monómeros enlazados entre sí mediante enlaces glucosídicos, formando largas cadenas. Existen unos doce monosacáridos comúnmente encontrados en las paredes celulares vegetales: D- glucosa, D- galactosa, D- manosa, L- fucosa, L- arabinosa, D- xilosa, D- apiosa, L-ramnosa, ácido D- galacturónico, ácido D-glucurónico, ácido L-

acérico, ácido 3-desoxi-D-mano-octulosónico (Coll, 2005). Los cuales, combinados, forman los tres polisacáridos mayoritarios de las paredes celulares vegetales: la celulosa, las hemicelulosas y las pectinas (McNeil *et al.*, 1984). Las características de dichos polisacáridos se describen a continuación:

- **Celulosa:** es el componente más abundante de la materia vegetal. Está formada por cadenas lineales de unidades de glucosa unidas mediante enlaces $\beta(1\rightarrow4)$. Las cadenas de celulosa tienden a agregarse formando microfibrillas y éstas a su vez formando fibrillas y fibras de celulosa, todas ellas unidas mediante puentes de hidrógeno (McNeil *et al.*, 1984). Su principal función es la de asegurar la rigidez de la pared celular vegetal (Vries *et al.*, 2001).

- **Hemicelulosas:** son polímeros heterogéneos formados por la combinación de varios monosacáridos simples: pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (manosa, glucosa, galactosa) y derivados ácidos de monosacáridos (Timell, 1967).(Saha, 2003). Existen varios tipos de hemicelulosas, pero todas ellas tienen dos características comunes: todas forman cadenas planas de monosacáridos unidos casi siempre por enlace $\beta(1\rightarrow4)$, de las que pueden salir ramificaciones muy cortas y todas poseen alguna característica estructural que les impide formar agregados como las cadenas de celulosa. Las clases más frecuentes de hemicelulosas son: xilanos, arabinoxilanos, galactomananos, glucuroarabinoxilanos, glucomananos y xiloglucanos (Coll, 2005).

El **xiloglucano** (Fig. 8) es el polisacárido hemicelulósico más abundante en las paredes primarias, representando más del 70% de las hemicelulosas totales (Quiroz-Castañeda y Folch-Mallol, 2011). En las plantas dicotiledóneas, constituye un 20-25 % del peso seco, mientras que en monocotiledóneas tan sólo el 2-5% (Coll, 2005).

La estructura del xiloglucano consiste en un esqueleto celulósico de unidades repetidas de β -D-glucosa enlazadas en $(1\rightarrow4)$, con ramificaciones de α -D-xilosa unidas por enlace $(1\rightarrow6)$ al esqueleto de glucano, las cuales a su vez, pueden presentar sustituciones β -D-galactosa- $(1\rightarrow2)$ y eventualmente sustituciones α -L-fucosa- $(1\rightarrow2)$. La estructura y distribución molecular de estas cadenas laterales de xiloglucano varía según la especie y tejidos vegetales (Vincken *et al.*, 1997).

En todos los tejidos de monocotiledóneas, como por ejemplo en los cereales y en las plantas herbáceas, los ácidos p-cumárico y ferúlico están unidos principalmente a los heteroxilanos de la pared celular. El AF forma puentes diferúlico entre distintas cadenas de xiloglucanos, aportando rigidez a la pared celular.

- **Pectinas:** las pectinas son polisacáridos ricos en ácido D-galacturónico que forman una cadena lineal altamente ramificada. Los principales polisacáridos pécticos son: homogalacturonano, ramnogalacturonanos I y II y arabinogalactanos I y II.

El **homogalacturonano** está formado por restos de ácido D-galacturónico unidos por enlace $\alpha(1\rightarrow4)$ y suele estar esterificado con grupos metilo. El **ramnogalacturonano I** (Fig. 8) está formado por una cadena principal en la que se alternan residuos de L-ramnosa unidos por el carbono 2 con unidades de ácido D-galacturónico unidos por el carbono 4, aproximadamente la mitad de las ramnosas están glicosiladas en el carbono 4 con cadenas laterales ricas en residuos de arabinosa y galactosa y raramente fructosa, formando cadenas poliméricas de arabinogalactanos I o arabinanos.

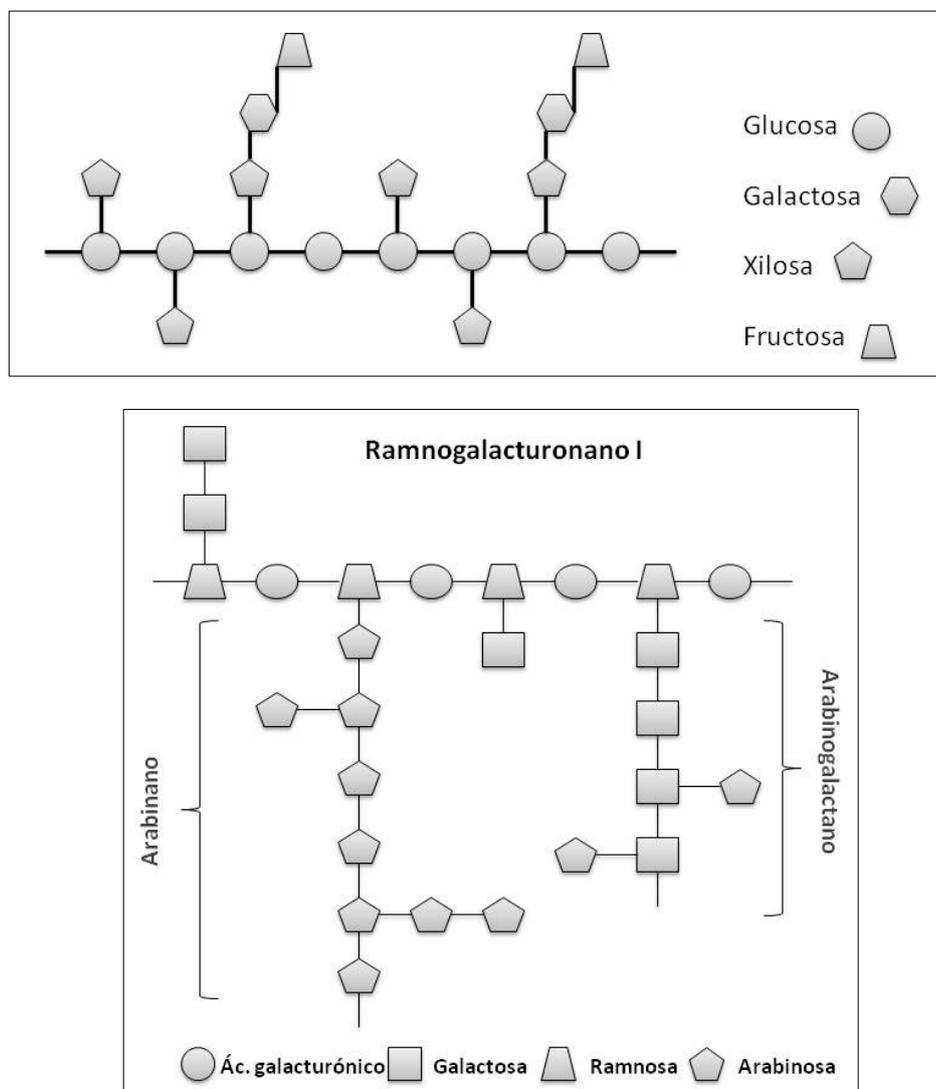


Fig. 8: Representación esquemática de la estructura química del xiloglucano (arriba) y del ramnogalacturonano I (abajo).

El **ramnogalacturonano II** está formado por aproximadamente 60 residuos glicosidos con 12 azúcares diferentes entre los que se encuentran numerosos restos glucósidos poco frecuentes en las plantas y está muy ramificado. Los **arabinogalactanos** están formados por una cadena de D-galactosas, con cadenas laterales de D-glucosa con residuos de arabinosa (Coll, 2005).

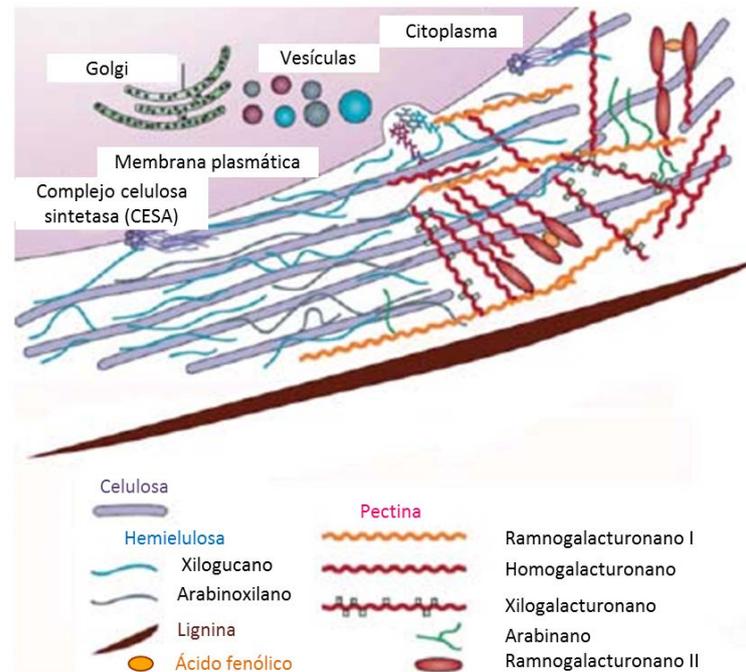


Fig. 9: Composición de la pared celular vegetal. Representación esquemática de la pared celular vegetal y el interior de la célula vegetal implicado en su formación. Formada básicamente por polisacáridos de celulosa, hemicelulosa, pectina y por lignina. Modificado de Quiroz-Castañeda y Folch-Mallol, 2011.

- **PROTEÍNAS:** las proteínas constituyen aproximadamente un 10% del peso seco de las paredes celulares primarias. Dentro de estas proteínas se encuentran tanto proteínas estructurales, como proteínas con actividad enzimática:

o **Proteínas estructurales:** las proteínas estructurales más abundantes en la pared celular vegetal son: extensina, arabino-glucano proteínas, lectinas, proteínas ricas en glicina y proteínas ricas en prolina. Las principales funciones de estas proteínas son contribuir a la resistencia de la pared celular y actuar como defensa frente al ataque de patógenos.

o **Enzimas:** además de las proteínas estructurales, en las paredes celulares se pueden encontrar proteínas enzimáticas que modifican los componentes estructurales de la pared, interviniendo en el crecimiento celular. Las enzimas más frecuentes son: hidrolasas, transglucosilasas, peroxidasas y oxidasas.

- **LIGNINA:** está formada por polímeros fenólicos en forma de red (reticulados). Son el componente de naturaleza no polisacáridica más abundante de las paredes celulares vegetales. Se forman por deshidrogenación enzimática de los alcoholes cumarílico, coniferílico y sinapílico,

seguido de una polimerización (Lebo *et al.*, 2000). La lignina juega un papel muy importante en la resistencia de las células vegetales debido a los enlaces covalentes que forma con los polisacáridos. Se trata de una de las estructuras más complejas de la pared celular vegetal y la más difícil de degradar.

- **OTROS COMPONENTES MINORITARIOS:**

- **Cera, cutina y suberina:** forman una especie de cubierta hidrófoba sobre la superficie de las plantas, protegiéndolas contra las lesiones mecánicas, la pérdida excesiva de agua o las invasiones de patógenos.
- **Sustancias minerales:** principalmente sílice y carbonato de calcio.
- **Taninos:** compuestos orgánicos más o menos complejos de tipo fenólico, cuya función es la defensa de la planta frente al ataque de parásitos.
- **Ácidos hidroxicinámicos:** como los ácidos: ferúlico, p-cumárico, sinápico y cafeico. Su contenido es muy bajo y están asociados a polisacáridos estructurales como arabinogalactanos y arabinosilanos y a las pectinas, cuya asociación tiene cierta importancia funcional.

Es importante remarcar, que no todos los componentes se encuentran en todas las paredes celulares, sino que la composición varía ampliamente de unas especies a otras, e incluso de la localización y función de las células dentro de la planta (Brett y Waldron, 1996).

Una pared celular primaria típica de una planta dicotiledónea está formada por 25-30% de celulosa, 15-25% de hemicelulosa, 35% de pectina y 5-10% de proteínas (extensinas y lectinas), en base al peso seco. La constitución molecular y estructural depende del tipo de célula, tejido y especie vegetal (Carpita y Gibeaut, 1993).

3.1.2. ESTRUCTURA:

Todos los componentes mencionados en el apartado anterior se disponen de forma irregular en la pared celular vegetal, formando diversas capas que se van depositando a medida que madura la célula vegetal. Según el orden de formación, las capas de la pared celular vegetal son las siguientes:

- **Lámina media:** tras la división celular es la primera en surgir (Azcón-Bieto y Talón, 1993). Está integrada por pectinas y proteínas, que se unen posteriormente a iones Ca^{2+} . Es la capa más externa que une las paredes primarias de dos células adyacentes, gracias a la acción de las pectinas que actúan como sustancia cementante, conectando una célula con otra y otorgando rigidez a la pared celular.

- **Pared celular primaria:** se deposita durante el crecimiento celular y se sitúa por debajo de la lámina media hacia el interior de la célula proporcionando estabilidad a la misma. Está formada mayoritariamente por celulosa y hemicelulosas, aunque también contiene pectinas y glicoproteínas estructurales (Carpita y Gibeaut, 1993). Representa hasta el 15% del volumen total de la pared celular.

- **Pared celular secundaria:** se deposita una vez finalizado el crecimiento celular sólo en las células especializadas. Es la capa más interna y se encuentra por debajo de la pared primaria. Las fibras ocupan entre el 70-90% del volumen total de la pared. Esta estructura está caracterizada por la presencia de lignina (Carpita y Gibeaut, 1993).

Las paredes celulares primaria y secundaria, se diferencian en la ordenación de las fibrillas de celulosa y en la proporción de sus constituyentes.

A día de hoy, y a pesar de todas las investigaciones realizadas en torno a la pared celular vegetal, sigue siendo difícil establecer un modelo estructural que incorpore el conocimiento actual de la composición y la estructura de los componentes de las paredes celulares de las plantas. A lo largo de los años se han propuesto diversos modelos, entre los más relevantes se encuentran: el modelo macromolecular; el modelo de urdimbre y trama y el modelo de los tres dominios (Coll, 2005).

Uno de los modelos más utilizados es el modelo de los tres dominios descrito por (Carpita y Gibeaut, 1993). Dicho modelo propone la existencia en las paredes primarias de tres dominios independientes aunque interrelacionados: el primer dominio, el armazón celulosa-xiloglucano, está embebido en el segundo dominio, la matriz de polisacáridos pécticos, y el tercer dominio lo constituyen las proteínas estructurales. Según este modelo, se pueden distinguir dos tipos de paredes celulares:

- **Tipo I:** se encuentra en muchas de las especies vegetales (la mayoría de las dicotiledóneas y algunas monocotiledóneas), está formada por proporciones similares de celulosa y xiloglucano (50%), pectinas (30%) y proteínas estructurales (20%).

- **Tipo II:** se encuentra en las gramíneas y en otras monocotiledóneas, principalmente en la familia *Poaceae*, formado por una matriz de celulosa-glucuronoarabinanos, pectinas (10%), proteínas estructurales y ácidos hidroxicinámicos.

3.2. PARTICULARIDADES DE LA PARED CELULAR DE LA REMOLACHA

La fracción lignocelulósica de la PR seca está compuesta por 22-30% de celulosa, 24-32% de hemicelulosa (principalmente cadenas de arabinosa), 24-32% sustancias pécticas y 2-3% de lignina (Spagnuolo *et al.*, 1997).

Como se puede observar en la Tabla 1, la remolacha es especialmente rica en pectinas, conteniendo altas cantidades de ácido galacturónico y arabinosa. Las pectinas de la remolacha poseen algunas diferencias con respecto a las pectinas de otras especies, entre ellas: la presencia de grupos acetilo unidos al ácido galacturónico, la presencia de AF y el contenido en ramnosa (Hutnan *et al.*, 2000).

Componentes	Porcentaje (%)
Ramnosa	2,1-2,4
Fucosa	0,2
Arabinosa	20,9-23,5
Xilosa	1,7
Manosa	1,1-1,3
Galactosa	5,1-5,8
Glucosa	21,1-23,3
Ácido galacturónico	19,8-21,1
Metanol	1,8
Ácido acético	3,9
Ácido ferúlico	0,8
Ácido diferúlico	0,04
Proteínas	10,2-11,3
Ceniza	3,6-4,7

Tabla 1: Composición de la pulpa de remolacha seca. Modificado de Ralet *et al.*, 1994a y Micard *et al.*, 1996.

Los polisacáridos esterificados con grupos feruloil se encuentran en las paredes celulares de varias plantas, pero especialmente en la familia *Poaceae* y en el orden *Caryophyllales*. La familia *Poaceae* se corresponde con plantas monocotiledóneas denominadas comúnmente como gramíneas, incluye entre otras especies a los cereales y al bambú. En ellas, la mayoría de los grupos feruloil están unidos por enlace éster a los arabinoxilanos de las hemicelulosas a través de enlaces O-5 en los residuos de arabinosa (Colquhoun *et al.*, 1994)(Ishii, 1997)(Saulnier y Thibault, 1999). Los residuos fenólicos, como el AF, raramente están presentes en las paredes celulares de las dicotiledóneas, a excepción del orden *Caryophyllales*, al que pertenecen la remolacha y la espinaca, entre otras especies, donde los residuos fenólicos se encuentran unidos mediante enlace éster a los polisacáridos pécticos, principalmente a las cadenas laterales de los ramnogalacturonanos de tipo I, los arabinanos y los arabinogalactanos (Hartley y Harris, 1981)(Fry, 1982)(Rombouts y Thibault, 1986)(Bacic *et al.*, 1988)(Colquhoun *et al.*, 1994)(Ishii, 1997)(Levigne *et al.*, 2004a).

Concretamente en la remolacha, el AF está unido al grupo hidroxilo O-6 de los residuos de β -D-galactopiranosil en el arabino-glucano y en posición O-2 y O-5 a los residuos de α -L-arabinofuranosil de la arabinosa (Colquhoun *et al.*, 1994)(Ralet *et al.*, 1994a)(Levigne *et al.*, 2004b), ambos pertenecientes a las cadenas laterales de los ramnogalacturonanos tipo I.

Los monosacáridos mayoritarios que componen las pectinas de la remolacha son la arabinosa y la galactosa (Rombouts y Thibault, 1986). Tanto los residuos de arabinosa como de galactosa presentes en las cadenas laterales de las pectinas están feruloilados, el 50-55% de los grupos ferúlicos están unidos a la arabinosa y el 45-50% a la galactosa, lo que supone que uno de cada 56 residuos de arabinosa y uno de cada 16 de galactosa presentes en las cadenas laterales de las pectinas de la PR contienen un grupo ferúlico (Ralet *et al.*, 1994a). El AF es el mayor ácido hidroxicinámico presente en PR, suponiendo un porcentaje superior al 99% respecto al total de ácidos hidroxicinámicos (Rombouts y Thibault, 1986). El contenido de AF en la PR es del orden de 0,8-0,9% como se puede observar en la Tabla 1 (Micard *et al.*, 1996)(Ralet *et al.*, 1994a)(Jankovska *et al.*, 2001).

Los ácidos ferúlicos de cadenas cercanas de arabinogalactanos y arabinanos, se pueden unir entre sí por enlaces covalentes tipo éster, formando ácidos diferúlicos (Fry, 1986)(Saulnier y Thibault, 1999)(Levigne *et al.*, 2004a). Estas reacciones permiten uniones entre los polisacáridos de las paredes celulares (Ishii, 1991)(Saulnier y Thibault, 1999), los cuales controlan la extensibilidad y las propiedades mecánicas de la pared celular (Fry, 1986)(Kamisaka, Seiichiro, 1990). Se cree que estos ésteres de ferúlico juegan un papel importante en el fin del crecimiento celular y en la defensa frente a microorganismos patógenos (ver apartado 4.3).

3.3. APLICACIONES DE LA PARED CELULAR

La mayor fuente de energía renovable de la Tierra se encuentra en las paredes celulares de las plantas. La celulosa es el polímero renovable más abundante del planeta y en segundo lugar se encuentra la hemicelulosa, representando un 20-35% de la biomasa lignocelulósica (Saha, 2003).

Como el mayor reservorio de carbono orgánico en la naturaleza, la pared celular vegetal además, forma parte del proceso de circulación del carbono a través de los ecosistemas. Las sustancias orgánicas que componen el humus en el suelo y que otorgan la estructura y fertilidad al suelo son derivadas de las paredes celulares vegetales.

Además de las funciones biológicas anteriormente descritas, la pared celular vegetal es un compuesto muy importante en la economía humana ya que se utiliza como producto natural en muchas industrias. Comercialmente se puede encontrar en forma de papel, material textil, fibras (algodón, lino, cáñamo y otras), carbón, madera y otros productos. Además de ser una importante

fuelle de fibra en nuestra dieta, la pared celular vegetal es un factor clave en la salud y nutrición humana (Taiz y Zeiger, 2006).

Otra de las aplicaciones es la obtención de extractos de polisacáridos a partir de las paredes celulares vegetales que son utilizados en la industria para la obtención de compuestos muy diversos y de gran importancia económica, como por ejemplo: plásticos, películas fotográficas (celuloide), etanol, adhesivos, geles y espesantes, etc.(Taiz y Zeiger, 2006).

Para poder aprovecharlas como fuente de energía, en la mayoría de las aplicaciones es necesario degradar la estructura de la pared celular vegetal (polímeros) hasta unidades individuales de monosacáridos (monómeros) que puedan ser asimiladas por los microorganismos y transformadas por los mismos en los compuestos de interés. Dicha labor es llevada a cabo por enzimas lignocelulolíticas, las cuales son principalmente producidas por microorganismos.

3.4. ENZIMAS QUE DEGRADAN LA PARED CELULAR VEGETAL

En la pared celular existen dos tipos de cadenas laterales: sustituciones para limitar el acceso de las enzimas al núcleo del polisacárido y cruzamientos entre los polisacáridos para aumentar la fuerza física y la integridad de la pared celular de las plantas. Los microorganismos han desarrollado enzimas, esterasas particulares, para degradar estas cadenas laterales y así permitir el acceso de sus enzimas degradantes al núcleo del polisacárido (Williamson *et al.*, 1998b).

Los microorganismos saprofitos y patógenos producen una gran variedad de enzimas para degradar las paredes celulares de plantas con el fin de poder utilizar el contenido de la célula como nutrientes o para digerir y utilizar los polisacáridos de la pared celular de las plantas. De los componentes de la pared celular de la planta, la lignina es el más difícil de degradar y se encuentra especialmente en los tejidos vegetales más maduros, seguidos por celulosa, hemicelulosa y pectinas (Williamson *et al.*, 1998b). Los derivados de los ácidos hidroxicinámicos, como el AF o los ácidos cumáricos están covalentemente unidos a estos polisacáridos a través de enlaces éster, aumentando la complejidad de estas estructuras.

Para la completa ruptura de los polisacáridos de la pared celular vegetal, los microorganismos necesitan toda una batería de enzimas específicas (Fazary y Ju, 2007).. La degradación de los polímeros de la pared celular requiere de la actuación de varias enzimas hidrolíticas como las celulasas, xilanasas, pectinasas y esterasas (Quiroz-Castañeda y Folch-Mallol, 2011):

3.4.1. Celulasas: estas enzimas pertenecen a la familia de las hidrolasas y a la categoría de enzimas O-glucósido-hidrolasas que hidrolizan los enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ de la celulosa. Se encuentran

predominantemente en procariotas y hongos. Las celulasas se clasifican en función de su actividad enzimática en tres grandes grupos (Fig. 10):

- **Exoglucanasas** (EC 3.2.1.74): catalizan la hidrólisis de los residuos desde los extremos reductor y no reductor del polisacárido de celulosa, liberando, como producto principal celobiosa (dímero de glucosa).
- **Endoglucanasas** (EC 3.2.1.4): hidrolizan enlaces internos de la celulosa de manera aleatoria, generando oligosacáridos de diversos tamaños y creando, de esta manera, nuevos extremos donde las exoglucanasas puedan actuar.
- **β -glucosidasas** (EC 3.2.1.21): estas enzimas degradan por completo la celulosa al hidrolizar la celobiosa. En esta reacción se liberan dos moléculas de glucosa, lo cual proporciona una fuente de carbono fácilmente metabolizable por los microorganismos.

3.4.2. Xilanasas: son las enzimas encargadas de degradar los polímeros de xilano y principalmente se clasifican en dos tipos:

- **Endoxilanasas** (EC 3.2.1.8): actúan sobre la cadena principal del xilano, rompiendo los enlaces entre sus unidades de xilosa y liberando oligosacáridos.
- **β -xilosidasas** (EC 3.2.1.37): liberan unidades de xilosa de los oligosacáridos obtenidos por las endoxilanasas.

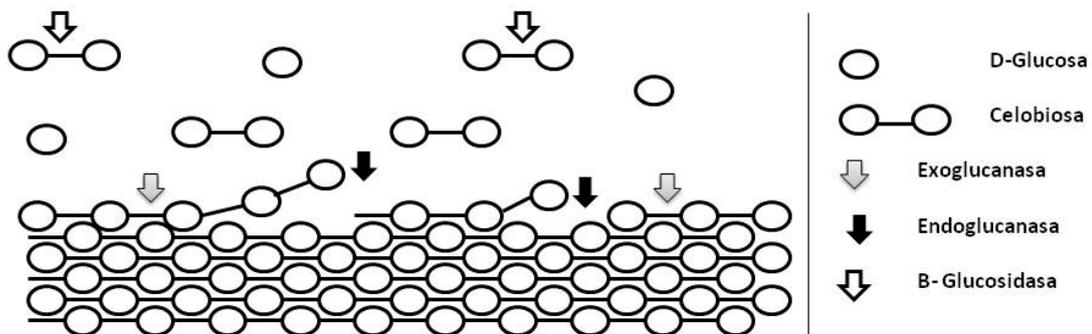


Fig. 10: Representación esquemática del mecanismo de acción sinérgico de las distintas celulasas

3.4.3. Pectinasas: incluyen una amplísima variedad de enzimas esterasas (EC 3.1.1.11), hidrolasas (EC 3.2.1.15, EC 3.2.1.67 y EC 3.2.1.82) y lipasas (EC 4.2.2.2) implicadas en la degradación de las pectinas.

3.4.4. Carboxil-éster hidrolasas: son una subclase de las enzimas hidrolasas que catalizan la O-, N-deacetilación de sustratos como el xilano, la quitina o algunos péptidoglicanos. De entre todas las enzimas de este grupo merecen especial atención las feruloil esterasas y las acetilxilan esterasas:

○ **Feruloil esterasas (FAEs)** (EC 3.1.1.73): incrementan la liberación de carbohidratos de la lignocelulosa al liberar los residuos de AF que se encuentran uniendo fibras de hemicelulosa. Al romper estos enlaces, la estructura se desestabiliza y se hace más accesible para que el resto de enzimas puedan desempeñar su función.

○ **Acetilxilano esterasas** (EC 3.1.1.72): catalizan la deacetilación de los polímeros de xilano, ayudando de esta forma a la degradación del xilano.

3.4.5. Enzimas accesorias: la degradación completa de los polisacáridos también requiere la actuación de otras enzimas como: xilano esterasas, p-cumárico esterasas, arabinofuranosidasas, polisacárido-monooxigenasas (PMOs), α -4-metil-glucuronosidasas, entre otras. Actúan de forma sinérgica con las anteriores hidrolizando la hemicelulosa eficientemente.

3.4.6. Enzimas que degradan la lignina: las principales enzimas implicadas en la degradación de la lignina son peroxidasas (EC 1.11.1.14) y lacasas (EC 1.10.3.1), ambas pertenecientes a la categoría de enzimas óxidoreductasas.

4. Ácidos Hidroxicinámicos: el ácido ferúlico

Los ácidos hidroxicinámicos (Fig. 11) más frecuentemente encontrados en la naturaleza son el AF, el p-cumárico, el cafeico y el sinápico. De entre ellos, el AF es el ácido hidroxicinámico más abundante en la naturaleza (Ou y Kwok, 2004), se puede encontrar en todo tipo de plantas (hortalizas, legumbres, frutas, cereales, granos, especias, plantas medicinales, etc.) y en sus procesados como el té, la sidra, el aceite o diversas bebidas (Fazary y Ju, 2007). El AF se aisló por primera vez en 1866 de la planta *Umbelliferae Ferula foetida*, de donde proviene su nombre (von Hlasiwetz y Barth, 1866).

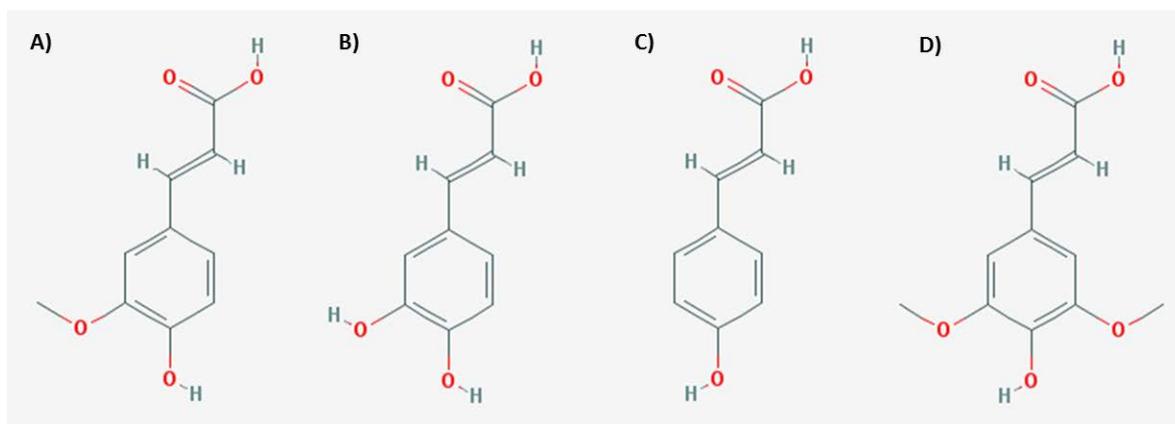


Fig. 11: Estructura química de los ácidos hidroxicinámicos. (A) Ácido ferúlico (B) Ácido cafeico (C) Ácido p-cumárico (D) Ácido sinápico Fuente: www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov

Su fórmula es: $C_{10}H_{10}O_4$ y su nombre sistemático (IUPAC) es: ácido (E)-3-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil) propil-2-enoico, aunque también se le conoce como ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico (Ou y Kwok, 2004). Tiene dos isómeros: el isómero cis que tiene apariencia de líquido oleoso de color amarillo y el isómero trans de apariencia cristalina (Fazary y Ju, 2007)(Nethaji *et al.*, 1988).

El AF es uno de los ácidos fenólicos más abundantes en plantas, los contenidos varían desde 5 g/kg en salvado de trigo y grano de maíz ó 9 g/kg en PR, hasta 15-28 g/kg en aceite de salvado de arroz (Fazary y Ju, 2007).

4.1. OBTENCIÓN DE AF

El AF se puede obtener tanto a partir de fuentes naturales como por síntesis química. Existen 3 tipos de rutas para extraer AF de fuentes naturales: por conjugados de ferúlico de bajo peso molecular, a partir de paredes celulares de plantas o por fermentación microbiana (Fazary y Ju, 2007).

El AF se puede obtener por síntesis química a partir de la condensación de la vainillina y el ácido malónico, reacción catalizada por la piperidina (Adams y Bockstahler, 1952). Este método produce una mezcla de isómeros cis y trans de AF, el rendimiento es alto, pero la duración del proceso es larga, ya que la reacción tarda en completarse unas 3 semanas.

Actualmente existen dos métodos principales para romper el enlace éster y liberar el AF de las paredes celulares de las plantas, mediante hidrólisis química, concretamente hidrólisis alcalina y mediante hidrólisis enzimática, por la acción de las enzimas FAEs.

La hidrólisis alcalina, permite liberar el AF en un corto periodo de tiempo sometiendo la muestra a una alta concentración alcalina y alta temperatura. Este método se usa frecuentemente para determinar el contenido en AF en el salvado (Oosterveld *et al.*, 2000). La desventaja, es la difícil purificación del AF, debido a la gran variedad de componentes generados y al color marrón que adquiere el AF debido a las altas temperaturas utilizadas en el proceso.

La liberación de AF por parte de las FAEs se detectó por primera vez en cultivos del hongo *Streptomyces olivochromogenes*. Hasta el momento la gran mayoría de las FAEs aisladas son de origen fúngico y unas pocas de origen bacteriano (Gopalan *et al.*, 2015). La extracción enzimática usando enzimas FAEs se suele acompañar de la acción de otras enzimas tipo hidrolasas, que degradan la pared celular vegetal. Actualmente no se considera un método útil de obtención de AF comercial debido al alto coste de la producción de la enzima por parte del microorganismo y al tiempo necesario para llevar a cabo la ruptura del enlace.

El AF natural que se comercializa se obtiene a partir del γ -orizanol del aceite de salvado de arroz (Xu y Godber, 1999). El γ -orizanol es una mezcla de AF, ésteres de esterol y alcoholes triterpenos (Ou y Kwok, 2004). A pesar de que las paredes celulares de las plantas contienen mucha más cantidad de AF que el γ -orizanol, se utiliza este método debido a que la formación de enlaces entre el AF y los polisacáridos de la pared celular de las plantas, dificulta mucho el proceso de extracción y purificación (Fazary y Ju, 2007).

4.2. LOCALIZACIÓN DEL AF EN LA PARED CELULAR

En las plantas monocotiledóneas, como la caña de azúcar, el trigo o el maíz, los ácidos hidroxicinámicos se encuentran comúnmente esterificados a los polisacáridos de la pared celular de las plantas como el xilano (Fig. 12a), unidos en posición O-5 y O-2 a la L-arabinosa (Mueller-Harvey, 1986) o al xiloglucano, en el caso del bambú, esterificados en posición O-4 de los residuos α -D-xilopiranoxil de los xiloglucanos (Ishii *et al.*, 1990).

En las plantas dicotiledóneas como las espinacas y la remolacha, el AF se encuentra unido a las pectinas (Fig. 12b), esterificado en posición O-2 a los residuos de α -L-arabinofuranosil en arabinosa y a la posición O-6 de los residuos β -galactopiranosil en los ramnogalacturonanos I (Colquhoun *et al.*, 1994).

Uno de los entrecruzamientos más importantes que tienen lugar en la pared de las células vegetales es la unión, mediante enlaces covalentes, de dos cadenas de polisacáridos adyacentes. Esta reticulación covalente puede ser debida a la formación de enlaces diferuloil entre las cadenas del polímero, formando dímeros de AF (Fig. 12c-h), la cual está correlacionada con el cese de crecimiento de la pared celular vegetal (Williamson *et al.*, 1998b).

El AF se encuentra distribuido a lo largo de la pared celular primaria y secundaria de las plantas y es particularmente abundante en la epidermis, vasos del xilema, vasos leñosos y esclerénquima (Faulds y Williamson, 1999). La lignina a su vez se une a los polisacáridos de celulosa y hemicelulosa mediante enlaces diferúlicos (Fig. 13) (Iiyama *et al.*, 1994).

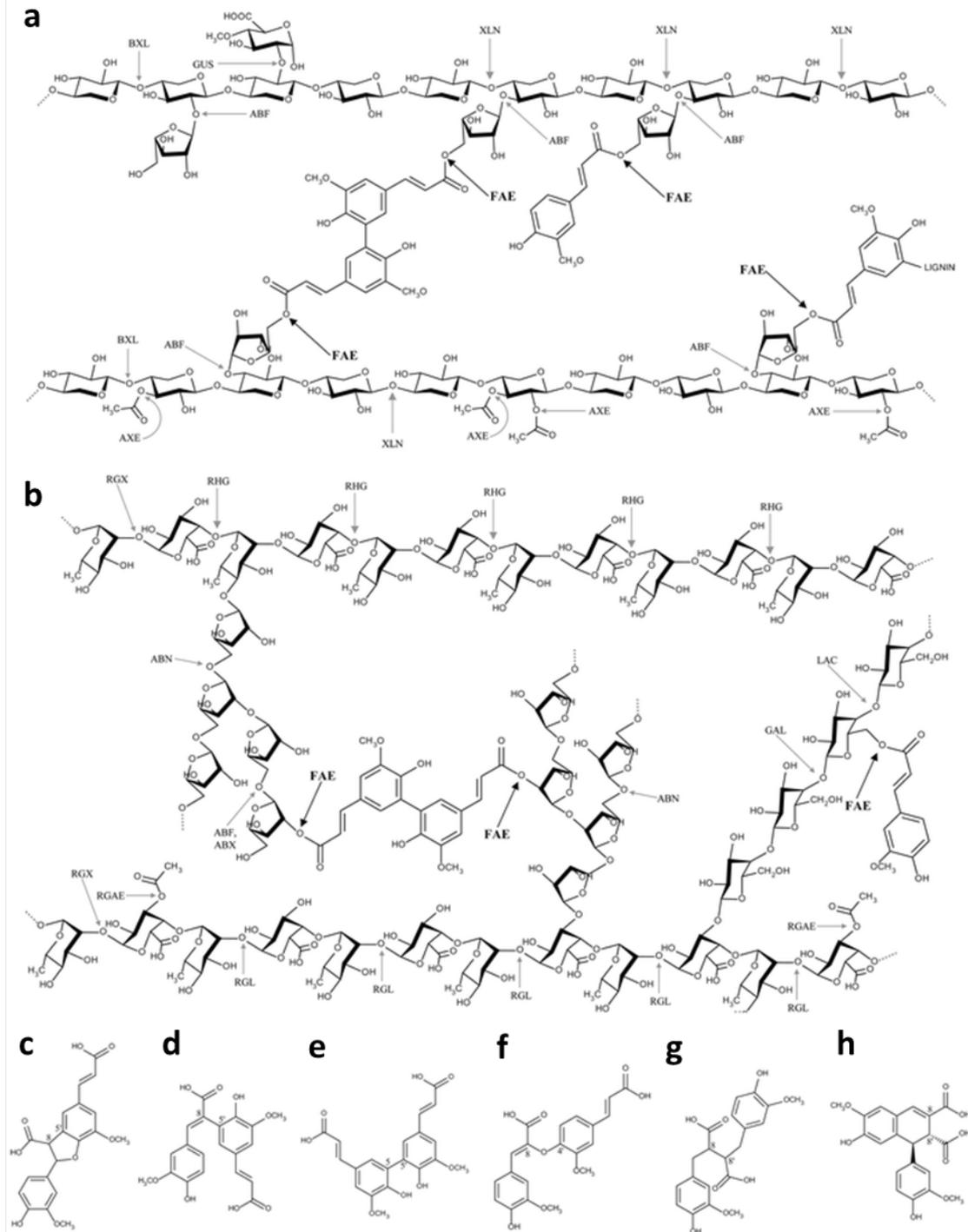


Fig. 12: Modelos estructurales de polisacáridos ferulizados de la pared celular de plantas y el sitio de corte por las enzimas que degradan dichas estructuras (a y b). Modelos estructurales de ácidos diferúlicos (c-h). Polisacáridos: (a) glucuronoarabinosilano ferulizado, (b) pecto- ramnogalacturonano ferulizado, (c) 8,5' ácido diferúlico- benzofurano (d) 8,5'- ácido diferúlico, (e) 5,5'- ácido diferúlico, (f) 8,4'- ácido diferúlico, (g) 8,8'- ácido diferúlico, (h) 8,8'-(aril)- ácido diferúlico. Enzimas: Abf: α - arabinofuranosidasa; abn: endoarabinanasa; abx: exoarabinanasa; axe: acetil xilano esterasa; bxl: β - 1,4- xilosidasa; fae: feruloil esterasa; gal: β - 1,4- endogalactanasa; gus: α - glucuronidasa; lac: β - 1,4- galactosidasa; rgae: ramnogalacturonan acetil esterasa; rgl: ramnogalacturonano liasa; rgx: exoramnogalacturonasa; rhg: endoramnogalacturonasa; xln: β - 1,4- endoxilanasas. Modificado de Dilokpimol *et al.*, 2016.

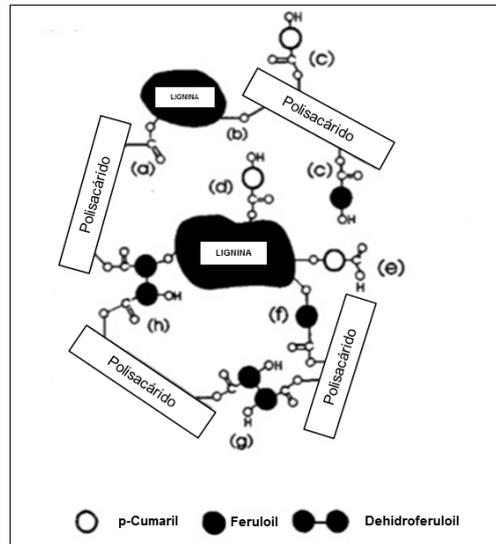


Fig. 13: Diagrama esquemático que muestra posibles enlaces covalentes entre los polisacáridos y la lignina en las paredes celulares vegetales. (a y b) enlaces éster directo; (c) ácido hidroxicinámico esterificado a polisacáridos; (d y e) ácido hidroxicinámico esterificado a lignina; (f) puente éster-éter de AF; (g) puente de diéster de ácido dehidrodiferúlico; (h) puente de diéster-éter de ácido dehidrodiferúlico. Modificado de Iiyama *et al.*, 1994.

4.3. PAPEL DEL AF EN LA PARED CELULAR DE LAS PLANTAS

Las hemicelulosas y las pectinas que forman las paredes celulares tienen una gran variedad de cadenas laterales conectadas a una red troncal. Incluyen grupos acetyl, metoxil y feruloil, todos los cuales modifican las propiedades físicas como la solubilidad y la cristalinidad del polisacárido (Hwang y Kokini, 1992) y reducen la accesibilidad de las enzimas a la cadena principal (Mitchell *et al.*, 1990).

El AF juega un papel muy importante en el mantenimiento de la integridad de la matriz de la pared celular de las plantas. Como se ha mencionado anteriormente, la función del AF en la pared celular vegetal es unir los polímeros de xilano y pectina, entre ellos y unos con otros (Mueller-Harvey, 1986)(Colquhoun *et al.*, 1994), así como con la lignina (Iiyama *et al.*, 1994). Estas uniones juegan un papel importante en el crecimiento celular (MacAdam y Grabber, 2002), provocan rigidez en la pared celular de las plantas y limitan parcialmente la biodegradabilidad de los polisacáridos de las paredes celulares por parte de las enzimas de degradación de biomasa secretadas por los microorganismos (Chandrasekharaiah *et al.*, 2011), así como su digestibilidad por los microorganismos del rumen (Grabber *et al.*, 1998).

Los AF se unen entre sí mediante enlaces covalentes formando diferulatos o triferulatos, que conectan las cadenas de polímeros y que parecen ser los responsables de dichas funciones (Ishii *et al.*, 1990). Los puentes diferúlico que se encuentran entre los polisacáridos y la lignina provocan rigidez e hidrofobicidad a la pared celular vegetal complicando, de este modo la degradación de la biomasa lignocelulósica (Iiyama *et al.*, 1994). El grado de entrecruzamientos

también está implicado en la estabilidad térmica de la adhesión célula-célula, lo cual es muy importante en la industria del procesamiento de paredes celulares vegetales (Faulds y Williamson, 1999). El contenido de este tipo de compuestos en los diferentes sustratos varía según la especie, por ejemplo el maíz contiene 2,5% de diferulatos mientras que la PR posee únicamente 0,17% (Topakas *et al.*, 2007).

4.4. AF EN LOS DISTINTOS SUSTRATOS VEGETALES

El AF se encuentra en distinta proporción en los sustratos vegetales, dependiendo de las características de la pared celular de cada uno. Según se puede ver en la Fig. 14, constituye sobre el 0,5-0,7% (p/p) en el salvado de trigo (Topakas *et al.*, 2007), 1,24% del trigo (Benoit *et al.*, 2006), 3,1% en salvado de maíz (Saulnier *et al.*, 1995), 0,87% en la PR (Kroon y Williamson, 1996), 0,9% en células de la pared del endospermo del arroz (Nordkvist *et al.*, 1984), 0,14% en granos de cebada (Topakas *et al.*, 2007) y del 2,2 al 3,8% en avena (Yu *et al.*, 2003).

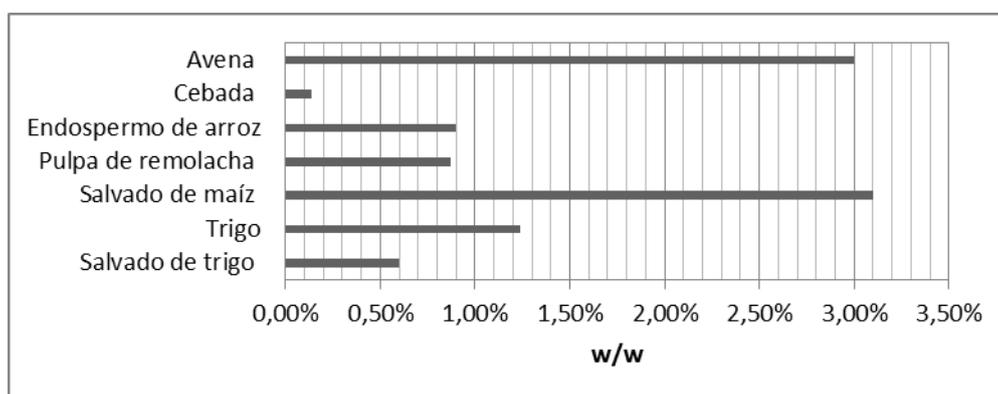


Fig. 14: Porcentaje en peso de AF presente en la pared celular de diferentes especies vegetales.

4.5. APLICACIONES INDUSTRIALES DEL AF

Diversos estudios realizados en diferentes áreas como: medicina, cosmética, nutrición humana y animal, industria del papel, industria del bio-fuel, etc., recogen múltiples aplicaciones del AF debido sobre todo a sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antiinflamatorias (Kumar y Pruthi, 2014).

El cuerpo humano genera, de forma natural, radicales libres, ya sea por influencia de factores endógenos o exógenos. Estos radicales pueden desencadenar diversas enfermedades como el cáncer, la aterosclerosis, cataratas, mácula lútea, etc. (Young y Woodside, 2001). Es por ello que el cuerpo cuenta con un sistema de defensa frente a estos radicales libres que se ve fortalecido por la ingesta de compuestos con propiedades antioxidantes. El AF libre es un excelente antioxidante, puesto que forma radicales fenoxi con resonancia estable y muestra una alta afinidad por los radicales libres del peróxido de hidrógeno, superóxido, hidroxilo, y dióxido de nitrógeno

(Ou y Kwok, 2004). El AF no sólo atrapa los radicales libres, sino que también incrementa la acción de las enzimas responsables de neutralizar los radicales libres e inhibe las enzimas que catalizan la formación de los mismos (Kawabata *et al.*, 2000). Este gran potencial antioxidante, es la base de la mayoría de las aplicaciones del AF en la industria, tanto farmacéutica, como alimentaria. A continuación se describen las principales aplicaciones:

4.5.1. APLICACIONES EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA:

- **Disminución del colesterol:** estudios realizados con ratas muestran que el AF tiende a disminuir las VLDL (*very-low-density lipoprotein*) y las LDL (*low-density lipoprotein*) en plasma, incrementando las HDL (*high-density lipoprotein*), lo cual ayuda a disminuir la tasa de colesterol en sangre (Kamal-Eldin *et al.*, 2000).

- **Prevención contra la trombosis:** se han usado frecuentemente plantas ricas en AF en la medicina China tradicional para curar la trombosis (Ou y Kwok, 2004). Existen trabajos realizados en ratas que muestran que el AF y sus derivados previenen la agregación plaquetaria y disuelven el trombo (Kayahara *et al.*, 1999).

- **Prevención contra la aterosclerosis:** se ha comprobado que el índice aterogénico se reduce al administrar AF intravenoso en ratas con dieta rica en colesterol (Sakamoto *et al.*, 1987).

- **Antiviral:** el AF inhibe el crecimiento y la reproducción de algunos tipos de virus como el virus de la gripe, virus sincital respiratorio y el virus del SIDA (Ou y Kwok, 2004).

- **Antimicrobiano:** se ha observado la actividad antimicrobiana del AF frente a bacterias Gram-positivas, bacterias Gram-negativas y frente a levaduras (Jeong *et al.*, 2000). Se ha visto que posee un fuerte efecto inhibitorio frente al crecimiento de algunos patógenos gastrointestinales humanos como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter koseri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori* y *Shigella sonnei* (Lo y Chung, 1999)(Ou y Kwok, 2004). También hay estudios que indican que los compuestos fenólicos de la pared celular de las plantas, especialmente el ácido p-cumárico, el AF, y el p-hidroxibenzaldehído, inhiben el crecimiento de los microorganismos del rumen de los rumiantes, reduciendo, de este modo, posibles infecciones en el tracto digestivo (Williamson y Vallejo, 1997)(Williamson *et al.*, 1998b)(Chandrasekharaiah *et al.*, 2011).

- **Anticancerígeno:** diversos estudios realizados en ratas sugieren que el AF es un buen profiláctico en el cáncer oral, de recto y de colon. Debido al importante papel que juegan los radicales libres en la aparición del cáncer, el efecto anti-oxidante del AF podría aportar propiedades anticancerígenas (Ou y Kwok, 2004).

- **Fotoprotector:** los oxígenos activos son los causantes de algunos de los efectos dañinos de la luz UV sobre la piel, pudiendo llegar a provocar cáncer de piel (Podda *et al.*, 1998). Debido al

alto grado de insaturación conjugada (se comporta como buen absorbente UV) y a su permeabilidad a la piel (Saija *et al.*, 2000), el AF constituye un ingrediente activo en muchas lociones para la piel, pantallas de protección y cremas para el cabello diseñadas para la fotoprotección (Priefert *et al.*, 2001)(Mathew y Abraham, 2004) y para la inhibición de tumores de la piel (Murakami *et al.*, 2002).

- **Potencial uso en el tratamiento contra la enfermedad de Alzheimer:** el AF actúa como inhibidor o agente desagregante de las estructuras amiloides, así como de sus efectos sobre los modelos biológicos implicados en la enfermedad de Alzheimer (Sgarbossa *et al.*, 2015)(Nabavi *et al.*, 2015). Esta capacidad se debe a su poder antioxidante.

- **Principio activo en plantas medicinales:** el AF es uno de los principales compuestos activos del rizoma de la planta *Cimicifuga heracleifolia*, usado tradicionalmente en la medicina japonesa por su efecto antiinflamatorio (Sakai *et al.*, 1999). Así mismo, el ferulato sódico es el principal compuesto activo de las plantas *Angelica sinensis*, *Cimicifuga heracleifolia*, *Lignsticum chuangxiong*, usadas en la medicina china tradicional y aprobadas por la Administración Estatal de Medicamentos de China para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares (Wang y Ou-Yang, 2005).

A pesar de todas estas evidencias preclínicas, apenas existen estudios clínicos realizados en humanos. Serían necesarios más estudios clínicos para evaluar el efecto del AF en el tratamiento de estas enfermedades crónicas (Mancuso y Santangelo, 2014).

4.5.2. APLICACIONES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA:

- **Aditivo alimentario:** el AF tiene una baja toxicidad, en Japón ha sido aprobado como aditivo alimentario y usado como antioxidante natural en alimentos, bebidas y cosméticos. En los EE.UU. y en la mayoría de los países europeos, numerosas esencias medicinales como extractos naturales de hierbas, café, granos de vainilla, especias y otros compuestos, han sido seleccionadas por su alto contenido en AF y han sido catalogadas por la FDA como alimentos con propiedades antioxidantes (Graf, 1992)(Ou y Kwok, 2004), sin embargo, en Europa no está tipificado como aditivo alimentario.

- **Precursor de vainillina:** en la industria alimentaria el AF puede ser biotransformado por una gran variedad de microorganismos en vainillina, un aditivo alimentario ampliamente utilizado (Lesage-Meessen *et al.*, 1996)(Ou y Kwok, 2004)(Mathew y Abraham, 2004)(Priefert *et al.*, 2001). La vainillina es un saborizante aromático usado en alimentos, bebidas, perfumes y fármacos. Se puede producir químicamente a gran escala, con el inconveniente de que no es considerado como un producto natural. La otra vía de obtención es mediante la bioconversión de AF en vainillina. Dicha ruta de biotransformación se ha descubierto en bacterias, hongos y en levaduras. Se prefiere el uso de las enzimas secretadas por estos microorganismos más que el uso directo de los

microorganismos ya que la vainillina es tóxica para la mayoría de ellos, aunque se oxida rápidamente a ácido vainílico, que es menos tóxico. La bioconversión también puede darse a partir de otras fuentes naturales como la lignina, estilbenos fenólicos, isoeugenol, eugenol o aminoácidos aromáticos (Priefert *et al.*, 2001). La vainillina además de como aditivo alimentario, también se usa para síntesis de medicamentos, elaboración de perfumes y en la industria del chapado de metales (Fazary y Ju, 2007).

- **Conservante alimentario:** esta aplicación se debe a dos características anteriormente mencionadas del AF, su acción antioxidante y su actividad antimicrobiana. El AF tiene una mayor actividad antioxidante que otros compuestos fenólicos (Heinonen *et al.*, 1998) y se ve menos afectado por los cambios de pH (Friedman y Jürgens, 2000)(García-Conesa *et al.*, 1999), cualidades que lo hacen un buen conservante de los alimentos.

- **Espesante:** el AF forma enlaces con los polisacáridos, por ello se emplea para incrementar la viscosidad y para formar geles a partir de algunos polisacáridos como la pectina y los arabinosilanos (Oosterveld *et al.*, 2000)(Ou y Kwok, 2004).

- **Ingrediente en alimentos para deportistas:** como el AF es un potente antioxidante y además parece estimular la secreción de hormonas en humanos, se utiliza frecuentemente como sustancia ergogénica en comida para deportistas (Headley y Massad, 1999).

5. Feruloil esterasas

5.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Las enzimas FAEs son un grupo de enzimas pertenecientes a la familia de las hidrolasas y a la subclase de las carboxil-éster hidrolasas, cuyo número de identificación es EC 3.1.1.73 (<http://www.enzyme.expasy.org/>). Estas enzimas catalizan la ruptura del enlace éster entre los polisacáridos de la pared celular de las plantas y los ácidos hidroxicinámicos, liberando ácidos fenólicos o difenólicos que se encuentran unidos a las hemicelulosas y a la pectina de la pared celular de las plantas (Williamson *et al.*, 1998b)(Fazary y Ju, 2007)(Topakas *et al.*, 2007).

El nombre sistemático de estas enzimas es: 4-hidroxi-3-metoxicinamoil hidrolasas, aunque también son conocidas por: feruloil esterasas, ácido ferúlico esterasas, ácido cinámico esterasas, cinamoil esterasas, cinamoil éster hidrolasas o clorogenato hidrolasas (Benoit *et al.*, 2008) (Faulds, 2009). Actualmente el nombre más usado en la bibliografía es el de enzimas feruloil esterasas o su acrónimo del inglés: FAEs (*feruloil acid esterases*).

La principal característica de las enzimas FAEs es que son enzimas extracelulares, es decir, son secretadas al medio extracelular por los microorganismos, con el fin de degradar los polisacáridos de la pared celular de las plantas y liberar ácidos hidroxicinámicos.

La primera enzima FAE se purificó en 1991 a partir de *Streptomyces olivochromogenes* (Faulds y Williamson, 1991), desde entonces multitud de enzimas FAEs se han purificado y caracterizado a partir de bacterias, hongos y plantas. Entre los microorganismos y plantas productores de enzimas FAEs se encuentran: *Pseudomonas fluorescens* (Faulds *et al.*, 1995), *Penicillium funiculosum* (Knoshaug *et al.*, 2008), *Talaromyces stipitatus* (Crepin *et al.*, 2003), *Aspergillus niger* (Faulds y Williamson, 1995) (Record *et al.*, 2003) (Levasseur *et al.*, 2004), *Streptomyces tendae* (Ferreira *et al.*, 2007), *Penicillium citrium* (Li *et al.*, 2010), *Dickeyadadantii* (Hassan y Hugouvieux-Cotte-Pattat, 2011), *Penicillium brasilianum* (Panagiotou *et al.*, 2007), *Penicillium expansum* (Donaghy y McKay, 1997), *Lactobacillus acidophilus* (Wang *et al.*, 2004), *Aspergillus awamori* (Koseki *et al.*, 1998)(Fazary *et al.*, 2009), *Penicillium chrysogenum* (Sakamoto *et al.*, 2005), *Myceliophthora thermophila* (Topakas *et al.*, 2012), *Fusarium oxysporum* (Topakas y Christakopoulos, 2004) y *Chrysosporium lucknowense* (Kühnel *et al.*, 2012), entre otros.

La cantidad de posibles secuencias genéticas relacionadas con la producción de enzimas FAEs en cada organismo es muy variable, puede ir desde una secuencia como en el caso de *Aspergillus tubingensis* o *Piromyces equi*, hasta 16 en *Nectria haematococca* (Udatha *et al.*, 2011) o 29 posibles secuencias que codifican FAEs encontradas en *Aspergillus niger* (Dilokpimol *et al.*, 2016).

Existen importantes variaciones en las características físicas de las enzimas FAEs purificadas hasta el momento, como el peso molecular, el punto isoeléctrico (pI), y las condiciones óptimas de reacción. El rango de peso molecular varía desde 11 a 210 kDa, el pI desde 3 a 9,9, el pH óptimo varía entre 4 y 8 y la temperatura óptima de reacción entre 30 y 65°C. Hasta la fecha no se ha encontrado ninguna correlación entre las características fisicoquímicas de las enzimas FAEs y sus condiciones óptimas de reacción (Topakas *et al.*, 2007)(Fazary y Ju, 2007).

5.2. NOMENCLATURA

La nomenclatura de las enzimas FAE ha sido muy diversa a lo largo de los años, no existe una nomenclatura única ni estándar, sino que cada autor le ha ido dando el nombre que ha estimado oportuno a las enzimas FAE que se han ido describiendo. Un ejemplo de esta diversidad de nomenclaturas es el siguiente: FAE II de *Fusarium oxysporum* (Topakas y Christakopoulos, 2004), FaeA de *Aspergillus awamori* (Koseki *et al.*, 1998), FE de *Penicillium expansum* (Donaghy y McKay, 1997), Fae III de *Aspergillus niger* (Faulds y Williamson, 1995), CinnAE de *Aspergillus niger* (Kroon y Williamson, 1996), EstA de *Piromyces equi* (Poidevin *et al.*, 2009). Llama especialmente la atención el caso de *Aspergillus niger*, donde se han encontrado hasta 6 denominaciones diferentes: Fae-I, Fae-II, FAEA, FaeIII, CinnAE y FaeB, no quedando claro en la bibliografía consultada si estas enzimas son todas diferentes entre sí o se trata de la misma enzima.

Craig B. Faulds en 2003 sugirió unificar la nomenclatura de estas enzimas proponiendo la siguiente denominación: en primer lugar las iniciales del microorganismo productor (primera letra del género en mayúscula y primera letra de la especie en minúscula), seguido de “Fae” y finalmente indicar el sub-tipo basado en la capacidad de la enzima descrita para hidrolizar los metil éster (A-D), por ejemplo, la enzima con actividad FAE de *Aspergillus niger* de tipo A, denominada anteriormente como FAE-III o FAEA, con esta nomenclatura pasaría a ser denominada AnFaeA (Faulds, 2003) (Faulds, 2009). Esta nomenclatura es la que se seguirá en el presente trabajo de doctorado.

5.3. CLASIFICACIÓN

Al igual que la nomenclatura, la clasificación de las enzimas FAEs aún es un estudio en desarrollo. En muchos casos, la obtención de datos referentes a la especificidad de estas enzimas no se ha llevado a cabo mediante métodos similares, lo que hace complicadas las comparaciones entre ellas y por lo tanto su clasificación. Por otro lado, en muchas clasificaciones no se han tenido en cuenta todos los datos de los que se dispone hasta el momento (Benoit *et al.*, 2008).

A lo largo de los últimos años se han propuesto varias posibles clasificaciones, siendo tres las más destacadas. La primera de ellas (1), basada en la especificidad de sustrato, establece 4 tipos de enzimas FAEs (tipos A-D) (Crepin *et al.*, 2004), la segunda (2) está basada en el análisis computacional de la secuencia de aminoácidos de enzimas FAEs verificadas y probables, proponiendo así 12 familias de enzimas FAEs (Udatha *et al.*, 2011), y por último (3), la clasificación más reciente y completa de la que se dispone hasta la fecha (Dilokpimol *et al.*, 2016) propone 13 subfamilias de enzimas FAEs en función del análisis filogenético de las secuencias de aminoácidos de enzimas FAEs caracterizadas. Dichas clasificaciones se describen a continuación:

Clasificación 1.- La clasificación propuesta por Crepin *et al.* en 2004 o también denominada Modelo ABCD, establece 4 tipos de enzimas y está basada en: la homología de la secuencia primaria de aminoácidos, la especificidad por los metil ésteres de los ácidos hidroxicinámicos, la habilidad de liberar ácido diferúlico unido en posición 5,5' a sustratos complejos y los materiales de la pared celular de las plantas que inducen la secreción de estas enzimas:

- **Tipo A:** su secreción se induce bajo crecimiento con sustratos que contienen derivados de cereales. Son capaces de hidrolizar el metil ferulato (MFA), metil sinapato (MSA) y el metil p-cumarato (MpCA), pero no el metil cafeinato (MCA). Pueden liberar ácido diferúlico (5-5') de sustratos complejos.

- **Tipo B:** este tipo de enzimas se secretan preferentemente durante el crecimiento del microorganismo en medios que contienen PR. Hidrolizan MFA, MpCA y MCA. Sin embargo, ni hidrolizan MSA ni liberan ácido diferúlico.

- **Tipo C:** la inducción de estas enzimas se produce tanto en medios con derivados de cereales como en medios con PR. Hidrolizan los 4 metil ésteres: MFA, MpCA, MCA y MSA, pero no pueden liberar ácido diferúlico (5-5') de sustratos complejos.

- **Tipo D:** sustratos que contienen derivados de cereales inducen la secreción de este tipo de enzimas. Hidrolizan los 4 metil ésteres: MFA, MpCA, MCA y MSA, además de liberar ácido diferúlico (5-5') de sustratos complejos.

En este mismo estudio, Crepin *et al.*, realizan un alineamiento de secuencias conocidas de enzimas FAEs y de otras enzimas próximas como lipasas y xilanasas, observándose la división en 5 grupos, cuatro de los cuales corresponden con los anteriormente descritos y habría un quinto grupo que podría corresponder a un "tipo E" con características bioquímicas desconocidas.

Esta clasificación ha sido muy utilizada, e inicialmente fue soportada por el análisis filogenético de las secuencias de amino ácidos de enzimas FAE (Benoit *et al.*, 2008) debido al número limitado de secuencias conocidas en el momento, sin embargo con los nuevos avances y con el descubrimiento de nuevas secuencias de enzimas FAE esta clasificación está quedando en desuso (Dilokpimol *et al.*, 2016).

Clasificación 2.- Udatha *et al.*, 2011, han realizado la clasificación de enzimas FAEs, analizando un total de 365 secuencias primarias de aminoácidos de enzimas FAEs, tanto conocidas como probables, de origen fúngico (54%), bacteriano (45%) y vegetal (1%), utilizando herramientas de array computacional.

En un primer lugar se realizó un análisis filogenético de dichas secuencias, eliminando duplicidades al utilizar principalmente la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) y también se eliminaron los péptido señal de las secuencias para evitar interferencias. El resultado del análisis fue la distribución de las enzimas FAEs en 13 clusters. Esta clasificación taxonómica es desordenada e irregular, lo que sugiere la probabilidad de transferencia lateral de genes y/o la ganancia o pérdida de genes a lo largo del proceso evolutivo entre hongos, bacterias y plantas.

Dicho análisis tampoco muestra correlación con los tipos funcionales descritos por Crepin *et al.*, 2004, lo que sugiere que la agrupación filogenética no está relacionada con la especificidad de sustrato y por lo tanto no es suficiente para una clasificación funcional de las enzimas FAEs de hongos, bacterias y plantas.

En un segundo lugar se realizó una identificación del patrón de residuos que causa los cambios en la especificidad de sustrato basada en la predicción de la posición de las triadas catalíticas de cada enzima. Este nuevo enfoque permitió reducir los 13 clusters a 12, que se denominaron FEF1-12 (*Feruloyl Esterase Family*) y basándose en la distancia entre los residuos catalíticos (Ser, His y Asp) se realizó una división en sub-familias, obteniendo de este modo un patrón de distribución más ordenado y en concordancia con la clasificación funcional de Crepin *et al.*, 2004, como se puede ver en la Tabla 2.

Familia Feruloil Esterasa	Sub-familia	Relación con Crepin 2004
FEF 1	1A	
	1B	
FEF 2	-	Tipo D
FEF 3	3A	
	3B	
	3C	
FEF 4	4A	Tipo B
	4B	Tipo C
	4C	
	4D	Tipo D
FEF 5	5A	
	5B	Tipo B
	5C	
FEF 6	6A	Tipo B
	6B	
FEF 7	7A	
	7B	
	7C	

Familia Feruloil Esterasa	Sub-familia	Relación con Crepin 2004
FEF 8	8A	
	8B	
	8C	
	8D	
FEF 9	9A	
	9B	
	9C	
FEF 10	10A	
	10B	
	10C	
FEF 11	11A	
	11B	
FEF 12	12A	Tipo A
	12B	Tipo B

Tabla 2: Clasificación de las enzimas FAEs en subfamilias según (Udatha *et al.*, 2011).

Clasificación 3.- La clasificación filogenética realizada por Dilokpimol y colaboradores, (2016) es la clasificación de enzimas FAEs más reciente y completa que se conoce hasta la fecha de enzimas FAEs de origen fúngico y está basada en el análisis filogenético realizado por Benoit y colaboradores en 2008.

La disponibilidad de las secuencias genéticas de muchos hongos, hace posible obtener una perspectiva general de la prevalencia de las enzimas FAEs en el Reino Fungi y proporciona una buena base para la clasificación de estas esterases en combinación con la comparación de secuencias de aminoácidos y la especificidad de sustrato.

Dilokpimol y col. (2016), han reconstruido un nuevo árbol filogenético usando 20 secuencias de aminoácidos de enzimas FAEs ya caracterizadas y comparando, mediante la herramienta informática BlastP, estas secuencias contra 247 genomas publicados de hongos filamentosos. Este estudio analiza un total de 1251 posibles secuencias de enzimas FAEs.

Las secuencias de aminoácidos obtenidas de este análisis se sometieron a un alineamiento múltiple que se usó para el análisis filogenético. Este estudio propone la clasificación de las enzimas FAEs en trece subfamilias, a diferencia de las siete subfamilias propuestas por Benoit y

col. en 2008. Este análisis se basa exclusivamente en las diferencias filogenéticas y no en las funcionales, de ahí la discrepancia con el Modelo ABCD.

No se observa un agrupamiento de las enzimas FAEs respecto al género o la especie del microorganismo del que proceden. Tanto la pérdida o la duplicación de genes, como el origen de las enzimas FAEs (evolución desde tanasas, lipasas, acetil-xilanasas o colinesterasas, juegan un papel importante en la inclusión de las enzimas FAEs en una u otra de las trece subfamilias. Esta clasificación puede indicar que la secreción por parte del microorganismo de un tipo concreto de enzimas FAEs depende fuertemente del nicho ecológico en el que viva cada especie y no tanto de la especie en sí misma.

5.4. REACCIÓN CATALÍTICA

Como se ha comentado anteriormente, las enzimas FAEs forman parte de un grupo de enzimas degradadoras de biomasa lignocelulósica, que actúan de forma colectiva y sinérgica en la ruptura de la biomasa, tales como: enzimas celulasas, xilanasas, pectinasas y/o estererasas (Beg *et al.*, 2001)(Saha, 2003). Las enzimas FAEs actúan como “enzimas ayudantes” en la red de desorganización de la pared celular de las plantas gracias a su capacidad para hidrolizar enlaces éster, lo que facilita el acceso del resto de enzimas a los polisacáridos de la pared celular (Benoit *et al.*, 2008). Por otra parte, la mayoría de las enzimas FAEs no son capaces de liberar por sí solas los ferulatos a partir del material polimérico de la pared celular, sino que necesitan la ayuda de otras enzimas hidrolíticas (Kroon *et al.*, 1999).

Esta habilidad de las enzimas FAEs para actuar sinérgicamente con otras enzimas en la degradación de biomasa vegetal constituye un amplio rango de potenciales aplicaciones en las industrias alimentaria, farmacéutica y agrícola (Fazary y Ju, 2007, Topakas *et al.*, 2012).

Por lo general, la secreción de enzimas FAEs se induce en presencia de sustratos que contienen polisacáridos o ácidos hidroxicinámicos (Kroon y Williamson, 1996) (Crepin *et al.*, 2003 a, b)(De Vries y Visser, 1999) (Faulds *et al.*, 1997) (Koseki *et al.*, 1998) (Topakas *et al.*, 2004).

Los polisacáridos forman complejos con otros polímeros, como la lignina, la celulosa o la hemicelulosa (Fazary y Ju, 2007). Las enzimas FAEs liberan el arabinoxilano de la lignina al romper los enlaces entre las cadenas de arabinoxilanos, mediante la hidrólisis del enlace éster entre el AF y la arabinosa (McAuley *et al.*, 2004), liberando, en esta hidrólisis, el AF, compuesto, que como ya se ha comentado anteriormente posee enormes aplicaciones en la industria.

La reacción química que catalizan las enzimas FAEs para la liberación del AF a partir de polisacáridos feruloilados se puede observar a continuación en la Fig. 15.

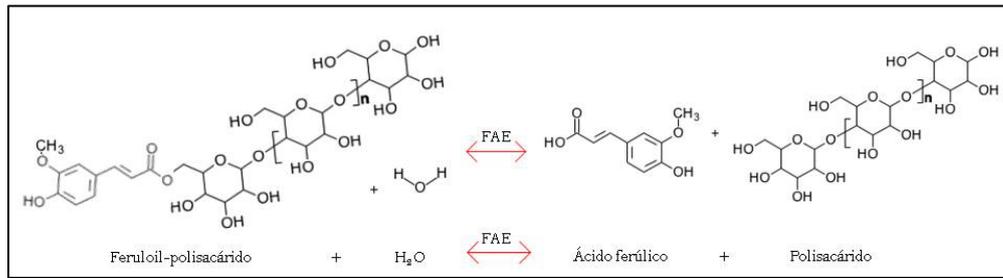


Fig. 15: Mecanismo de acción de las FAEs. Fuente: <http://www.genome.jp/kegg>

5.5. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD FERULOIL ESTERASA

El análisis de la producción de enzimas FAEs se suele llevar a cabo mediante la cuantificación de AF liberado durante la fermentación. El AF liberado comúnmente se cuantifica mediante el uso de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) (Faulds y Williamson, 1995)(Topakas *et al.*, 2007), aunque existen otros métodos, como la cromatografía de gases (Borneman *et al.*, 1990), electroforesis capilar (Donaghy y McKay, 1997) o la espectrometría en el rango de 320–340nm (Ralet *et al.*, 1994b).

Las enzimas FAEs se pueden producir por fermentación en medio sólido o en cultivo sumergido. Especies como *Aspergillus flavipes* o *Aspergillus niger* son las mayores productoras de enzimas FAEs en cultivo sumergido en presencia de lignocelulosa como fuente de carbono, como el salvado de maíz o de trigo, mientras que *Penicillium brasilianum* es uno de los mayores productores de enzimas FAEs en medio sólido (Topakas *et al.*, 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Microorganismos

1.1. CEPAS BACTERIANAS

Escherichia coli DH5 α (Hanahan, 1983): Cepa empleada en experimentos de transformación y amplificación de ADN plasmídico. Permite obtener células competentes con elevada eficiencia de transformación (hasta 5×10^8 transformantes/ μg de ADN). Posee una deleción en el gen *lacZ* del operon *lac*, susceptible de ser complementada por determinados vectores de clonación, como el pBluescriptR (*Stratagene*) o el pBC (*Stratagene*). Esta α -complementación produce una coloración azul en la colonia, originada por la acción de la β -galactosidasa (codificada por *lacZ*) sobre el compuesto *X-gal* (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido).

1.2. CEPAS FÚNGICAS

Penicillium chrysogenum NRRL 1951. Cepa silvestre, aislada a partir de un melón en Peoria (Illinois) (Raper *et al.*, 1944) (Normansell *et al.*, 1979).

Penicillium chrysogenum Wisconsin 54-1255. Cepa de referencia en muchos laboratorios, obtenida por mutación y selección de la cepa *Penicillium chrysogenum* NRRL-1951 (Luengo *et al.*, 1979)(López-Nieto *et al.*, 1985)(Cantoral *et al.*, 1987)(Fierro *et al.*, 1995). Se trata de una cepa de baja producción de penicilina (800 $\mu\text{g}/\text{mL}$) que posee una sola copia de la agrupación de genes biosintéticos de penicilina. Cedida por el Dr. A. L. Demain (M.I.T., Cambridge, MA, USA).

Penicillium chrysogenum npe10 *pyrG*⁻. Cepa auxótrofa de uridina obtenida a partir de la cepa Wisconsin 54-1255 por mutación con nitrosoguanidina y posterior selección en presencia de ácido 5-fluorótico (Díez *et al.*, 1987).

Penicillium chrysogenum AS-P-78. Cepa de mediana producción de penicilina (2-3 mg/mL) obtenida por mutación a partir de cepas derivadas de NRRL 1951 B25 (Luengo *et al.*, 1979)(López-Nieto *et al.*, 1985)(Alvarez *et al.*, 1987)(Fierro *et al.*, 1995)(Díez *et al.*, 1990). Cedida por Antibióticos S.A., León.

Penicillium chrysogenum AS-P-99. Cepa de alta producción de penicilina. Cedida por Antibióticos S.A., León (Bañuelos *et al.*, 1999).

Penicillium notatum NRRL-1249. Primera cepa productora de penicilina aislada por Fleming en 1928 (Fleming, 1929) (Clutterbuck *et al.*, 1932).

2. Plásmidos

2.1. VECTORES PLÁSMIDICOS

pIBRC43-*Bgl*II: es un plásmido de 4,3 Kb que contiene un casete de resistencia a fleomicina. Deriva del plásmido pIBRC43 (Cardoza *et al.*, 1998) en el que se ha cambiado el sitio de restricción *Nco*I por un sitio *Bgl*II mediante mutagénesis dirigida (*Stratagene*). Dicho casete está compuesto por el gen de resistencia a fleomicina (*ble*) y está bajo el control del promotor del gen de la glutamato deshidrogenasa de *A. awamori* (*Pgdh*) y el terminador transcripcional del citocromo c1 de *Saccharomyces cerevisiae* (*Tcyc1*) (Kosalková *et al.*, 2009).

pJL43: plásmido de un tamaño de 4,5 Kb construido a partir del pBluescript KS⁺ en cuyo policonector se ha clonado un casete que confiere resistencia a fleomicina a las células fúngicas hospedadoras (Gutiérrez *et al.*, 1991a). Dicho casete de resistencia a fleomicina, está formado por el promotor del gen *pcbC* de *P. chrysogenum* fusionado a nivel del ATG con el gen *ble* de *Streptoalloteicus hindustanus* y con el terminador del gen *cyc1* de *S. cerevisiae*.

2.2. CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS: PLÁSMIDOS pSfaeA y pSfaeB

Con el fin de sobreexpresar los genes *faeA* y *faeB* en *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 se construyeron los plásmidos pSfaeA y pSfaeB (Fig. 16 A y B). Dichos plásmidos contienen los genes *faeA* y *faeB* bajo el control de un promotor de expresión constitutiva como es el promotor de la glutamato deshidrogenasa (*Pgdh*) de *A. awamori*. Para realizar las construcciones plasmídicas se lleva a cabo una PCR utilizando como ADN molde el ADN total de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 y como cebadores los oligonucleótidos *faeA*-F y *faeA*-R (ver Tabla 3), para el gen *faeA* y los oligos *faeB*-F y *faeB*-R (ver Tabla 3), para el gen *faeB*. Los oligos F fueron diseñados por homología con la secuencia de cada gen y se les añadió una cola con un sitio de restricción *Bgl*II, mientras que los oligos R fueron diseñados por homología con la secuencia de cada gen y se les añadió una cola con un sitio de restricción *Stu*I.

El producto de PCR se digirió con las enzimas de restricción *Bgl*II y *Stu*I. Posteriormente, las bandas de 933 pb y 1643 pb, correspondientes a los genes *faeA* y *faeB* respectivamente, se ligaron al vector pIBRC43-*Bgl*II, digerido previamente con las enzimas *Bgl*II y *Stu*I. Los plásmidos obtenidos se denominaron pSfaeA y pSfaeB (Fig. 16 A y B), en los que los genes de interés se encuentran bajo el control del promotor del gen *gdh* de *A. awamorii* (*Pgdh*) y el terminador del gen *Tcyc1* (citocromo c1) de *S. cerevisiae* (*Tcyc1*).

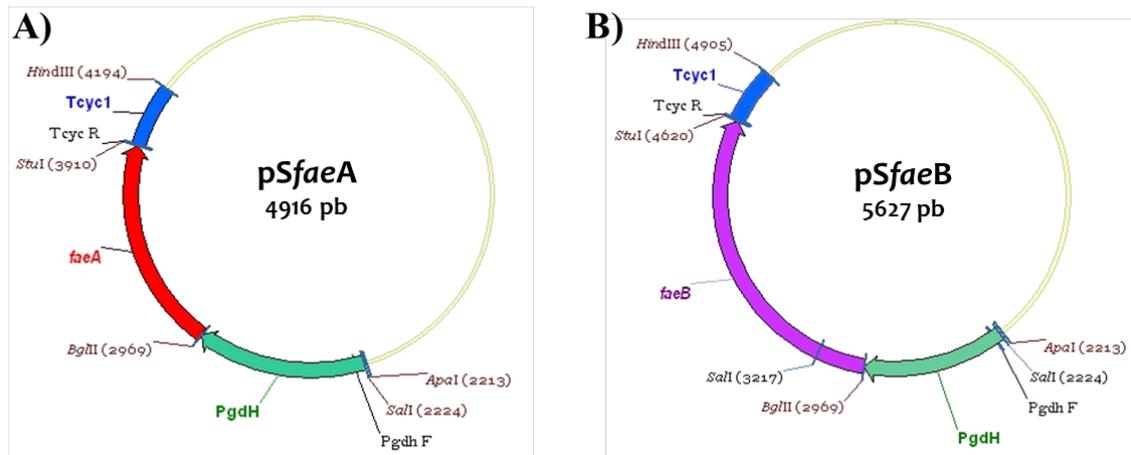


Fig. 16: Representación esquemática de los plásmidos pSfaeA (A) y pSfaeB (B).

3. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) utilizados en este trabajo fueron adquiridos a Sigma Chemical Co. y son los siguientes:

Nombre del oligonucleótido	Secuencia 5' → 3'
<i>faeA</i> -F	GGAAGATCTATGAAAATCTCCGCACCACG
<i>faeA</i> -R	AAAAGGCCTCTACCAGCTGCAAGCTCCGC
<i>faeB</i> -F	GGAAGATCTATGACTCGTCTTCATGTGTT
<i>faeB</i> -R	AAAAGGCCTCTAAACACACTGCCAAGCGT
<i>Pgdh</i> -F	GGACTCCCTAATGGATTCCGA
<i>Tyc</i> -R	GAAAAGGGGGACGGATCTCCG
<i>actA</i> -F	CTGGCCGTGATCTGACCGACTAC
<i>actA</i> -R	GGGGGAGCGATCTTGACCT
1- <i>faeB</i> -F	CTTCATGTGTTGCCCTTGTT
2- <i>faeB</i> -F	TTCCCGAAACCAACAT
3- <i>faeB</i> -F	CGCTGGTGCCCCTGCTATC
4- <i>faeB</i> -F	ATCCTCGCTGCACCAATAAT
5- <i>faeB</i> -F	ATTGCGGTGATGGAGATG
1- <i>faeB</i> -R	CACACTGCCAAGCGTTCT
2- <i>faeB</i> -R	CAGCTTGGAGTTGTCG
3- <i>faeB</i> -R	GACTTGGGCGCTTGTGAGAC
4- <i>faeB</i> -R	TTGTGGAAGCCCTCCTCA
5- <i>faeB</i> -R	CGTGATCTCGCTGCTA

Tabla 3: Secuencias de los oligonucleótidos empleados en el desarrollo del trabajo experimental.

4. Medios de cultivo

En este trabajo se utilizaron medios de cultivos diferentes para el cultivo de bacterias y para el cultivo de hongos filamentosos. La mayoría de los medios empleados se esterilizaron por

calor durante 20 min a 121°C antes de su uso con el fin de eliminar la mayor carga microbiana posible, excepto cuando se indique lo contrario.

4.1. MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS

- Medio sólido o líquido de mantenimiento y propagación de *E. coli* (Miller, 1972):

Medio Luria-Bertani (LB)	
Bacto-triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agua destilada	Hasta 1L
Ajustar pH a 7.5	
Para conseguir medio sólido se añade un 2 % de agar	

- Medio líquido para el crecimiento de *E. coli*:

Medio Terrific-Broth (TB)	
Bacto-triptona	12 g
Extracto de levadura	24 g
Glicerol	4 mL
Agua destilada	Hasta 900 mL
Después de la esterilización por calor se añaden 100 mL de la siguiente solución de sales: K_2HPO_4 170 mM y KH_2PO_4 720 mM, previamente esterilizada por filtración con un filtro de 0,22 μ m.	

- Medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *E. coli* en la preparación de células competentes (Hanahan, 1983):

Medio SBO	
Bacto-triptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	0,5 g
Agua destilada	Hasta 980 mL
Ajustar pH a 7,5	
Antes de utilizarlo se añadieron 20 mL de una solución estéril de $MgSO_4$ 1M.	

4.2. MEDIOS DE CULTIVO PARA *Penicillium chrysogenum*

- Medio sólido para la esporulación y mantenimiento de hongos del género *Penicillium*, el cual consiste en una fusión de los medios PM1 (López-Nieto *et al.*, 1985) y Czapek-KCl 0.7 M (Cantoral *et al.*, 1987):

Medio Power 2 (PW2)	
Sacarosa	25 g
Lactosa	5 g
Peptona	2,5 g
Sólidos de maceración de maíz	0,5 g
KCl	52 g

NaNO ₃	1 g
K ₂ HPO ₄	0,025 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,275 g
NaCl	2 g
CuSO ₄ ·7 H ₂ O	0,005 g
FeCl ₃ ·6 H ₂ O	0,015 g
KH ₂ PO ₄	0,3 g
Agar	2 %
Agua destilada	Hasta 1L

- Medio mínimo sólido de crecimiento para microorganismos capaces de utilizar el NaNO₃ como única fuente de nitrógeno (Smith, 1960):

Medio Czapek (Cz)	
Sacarosa	30 g
NaNO ₃	2g
K ₂ HPO ₄	0,5g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,5g
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	0,01g
Agar	20g
Agua destilada	Hasta 1L
Ajustar pH a 6,8 ± 0,2	
Cuando se utiliza como medio de regeneración de protoplastos se añade un estabilizador osmótico: sorbitol 1 M.	

- Medio líquido de germinación y crecimiento para hongos del género *Penicillium* (Modificación de (Anné, 1977):

Medio MPPY	
Glucosa	40 g
NaNO ₃	3 g
Extracto de levadura	2 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	0,01 g
Agua destilada	Hasta 1 L
Ajustar pH a 6,0	

- Medio sólido usado para medir la actividad enzimática de los caldos de cultivo, basándose en el hidrólisis del EF (Sakamoto *et al.*, 2005):

Medio EF		
Solución A	Agar	10 g
	Agua destilada	Hasta 1L
Solución B	Etil-ferulato	0,5 g
	Etanol Absoluto	Hasta 10 mL

Las soluciones A y B se esterilizan por separado. La solución A se esteriliza por calor (20 min/121°C) y la solución B por filtración mediante un filtro con tamaño de poro de 0,22 µm.

Se mezclan justo antes de su uso a razón de 1,5 mL de la solución B por cada 100 mL de solución A.

- Medio líquido con PR para la producción de enzimas con actividad FAE (Sakamoto *et al.*, 2005):

Medio MPR	
NH ₄ NO ₃	0,2 %
K ₂ HPO ₄	0,1 %
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,05 %
KCl	0,05 %
FeSO ₄	0,001 %
Peptona de soja	0,1 %
Glucosa	0,1 %
Pulpa de remolacha	2 %
Agua destilada	Hasta 1 L
Ajustar pH a 5,0	

Para la realización de este medio se utilizaron dos formatos de PR diferentes, por un lado PR húmeda (Medio MPR) y por otro PR seca (Medio MPR-2).

- Medio líquido con MC para la producción de enzimas con actividad FAE (Modificado de (Sakamoto *et al.*, 2005)):

Medio MC	
NH ₄ NO ₃	0,2 %
K ₂ HPO ₄	0,1 %
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,05 %
KCl	0,05 %
FeSO ₄	0,001 %
Peptona de soja	0,1 %
Glucosa	0,1 %
Marro de café	2 %
Agua destilada	Hasta 1 L
Ajustar pH a 5,0	

5. Soluciones para el mantenimiento y medición de la actividad FAE

- Tampón utilizado para el mantenimiento y conservación de los extractos enzimáticos:

TAMPÓN ACETATO 0,02M (Tampón 1)		
Solución A	Ácido acético glacial	111,5 µL
	Agua destilada	Hasta 100 mL
Solución B	Acetato de sodio	0,164 g
	Agua destilada	Hasta 100 mL
Mezclar solución A y B hasta pH=5,0 y volumen deseado.		
Esterilizar por filtración (0,22 µm).		

- Tampón utilizado para la medición de la actividad FAE de los extractos enzimáticos.

TAMPÓN ACETATO 0,1 M (Tampón 2)		
Solución A	Ácido acético glacial	557,5 µL
	Agua destilada	Hasta 100 mL
Solución B	Acetato de sodio	0,82 g
	Agua destilada	Hasta 100 mL
Mezclar solución A y B hasta pH=5,0 y volumen deseado.		
Esterilizar por filtración (0,22 µm).		

6. Reactivos químicos

Los reactivos empleados para la realización de los experimentos presentados en este informe fueron adquiridos a las siguientes casas comerciales: Aldrich Chemie GmbH y Co. (Steinheim, Alemania), Amersham Internacional (Reino Unido), Bethesda Research laboratorios (California, USA), Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Alemania), Carlo Erba (Milán, Italia), Difco (Detroit, Michigan, USA), ICN Biomedicals. Inc. (Irvine, California, USA), Merck (Darmstadt, Alemania), Panreac (Barcelona, España), Pharmacia (Uppsala, Suecia), Probus (Barcelona, España), Promega Co. (Madison, Wisconsin, USA), Quiagen (Crawley, Reino Unido), Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, USA), USB (Cleveland, Ohio, USA), Stratagene (USA).

6.1. ENZIMAS COMERCIALES

Las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo, como por ejemplo *Stu*I, *Bgl*II, *Eco*RV, *Hind*III o *Apa*I, fueron suministradas por las casas comerciales: *New England Biolabs*, MBI Fermentas, Takara y Roche.

Otro tipo de enzimas utilizadas fueron: Fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* (Amersham Biosciences), ADN ligasa del fago T4 (Roche), ADNasa I libre de ARNasa de páncreas bovino, ARNasa-A de páncreas bovino, *Polimerasa Phusion*® *High-Fidelity DNA* (New England Biolabs), *Go-Taq ADN polimerasa* (Promega), Transcriptasa reversa *SuperScript*™II *RNase H* (Invitrogen), Lisozima de clara de huevo (Fluka Chemical & Biochemical Co), β-glucoronidasa y enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich, Inc). En todos los casos se siguieron las indicaciones del fabricante para su utilización.

Las enzimas comerciales con capacidad para degradar la pared celular vegetal usadas en este trabajo son: Depol™ 740L, Depol™ 667 y Depol™ 680 todas ellas de la casa Biocatalysts (Reino Unido).

6.2. ANTIBIÓTICOS:

- **Ampicilina** (Amp): Se preparó una solución acuosa concentrada a 200 mg/mL a partir del producto farmacéutico Britapen (Laboratorio Reig Jofre, SA). Se utilizó para la selección de transformantes de *E. coli* a una concentración final de 100 µg/mL. Se conservó a -20°C.

- **Fleomicina** (Phleo): Se preparó a una concentración inicial de 10 mg/mL en solución acuosa. Se utilizó para la selección de transformantes de *P. chrysogenum* a una concentración de 2-8 µg/mL. Se conservó a -20°C (CAYLA; Toulouse, Francia).

6.3. KITS COMERCIALES:

En varios de los procedimientos descritos en esta memoria se utilizaron kits comerciales que incluían tanto los reactivos como las instrucciones necesarias para la utilización de los mismos. Los kits comerciales fueron los siguientes:

- *DIG Oligonucleotide 3'-End Labelling Kit, 2nd Generation* (Roche): marcaje de ADN con digoxigenina en el extremo 3' para su detección.

- *GFXTM Micro Plasmid Prep. Kit.* (Amersham Biosciences): purificación de ADN plasmídico de *E. coli* destinado a reacciones de secuenciación. El kit permite la extracción de ADN plasmídico a partir de 1-3 mL de cultivo.

- *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences): purificación, aislamiento y determinación de la concentración de productos de PCR y fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa o soluciones de ADN.

- *2-D Clean-Up Kit* (Amersham Biosciences): limpieza de muestras de proteínas para su uso en electroforesis de proteínas de dos dimensiones.

7. Equipamiento

7.1. CENTRÍFUGAS

- Centrífuga para tubos GSA: Sorvall RC 5B Plus. Thermo Fisher Scientific. EE.UU.
- Centrífuga para falcons (50mL): Centrífuga de mesa ALLEGRA 21R. Beckman Coulter. Alemania.
- Centrífuga para tubos de 10 mL: Centrífuga de mesa ALLEGRA X22R. Beckman Coulter. Alemania.
- Centrífuga 5415D (Eppendorf).
- Centrífuga 5415 C (Eppendorf).

7.2. ARCONES AGITADORES

- Para matraces de 100mL:
 - o Agitador orbital INFORS HT Ecotron (Suiza).
- Para matraces de 500mL:
 - o Agitador orbital INNOVA 4230. New-Bruswick. Eppendorf (USA)
 - o Agitador orbital IDC400. Gallenkamp (Reino Unido).
 - o Agitador orbital INR250. Gallenkamp (Reino Unido).
 - o Agitador orbital Centromat BS-1. Sartorius (Alemania).
 - o Infors AGCH-4103. Bottmingen (Suiza).

7.3. BIOREACTORES:

- Bioreactor Braun Biostat® B (5 litros). Alemania.
- Bioreactor Braun Biostat® C (20 Litros). Alemania.

7.4. OTROS EQUIPOS:

- **HPLC:** Waters HPLC System (Waters Corporation, Milford, MA, USA)
- **Transiluminador de luz UV:** Vilber Loumart modelo ECX-26-M $\lambda = 312$ nm; GeneFlash-Sungene Bio Imaging (Synoptics group).
- **Cámara:** UVP Image Store 5000 (Ultraviolet Products).
- **Video impresora:** Video Graphic Printer UP-890CE (Sony Corporation, Tokyo, Japón).
- **Termociclador** Biometra Thermocycler T-Gradient ThermoBlock (Biometra, Goettingen, Alemania).
- **Microscopio óptico:** Olympus CX40 (Olympus, Shinjuku, Tokyo, Japón).
- **Espectrofotómetro U-2900** (Hitachi, Tokio, Japon).
- **Espectrómetro de masas:** Ultraflex III MALDI-TOF (Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA, USA).
- **Micropipetas monocal** (2, 20, 200 y 1000 μ L) (Gilson, Middleton, WI, USA).
- **Microondas T.D.S.** (Samsung, Daegu, Corea del Sur).
- **Agitador horizontal** Heidolph Promax 1020 (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Alemania)
- **Autoclave** (JP Selecta, Barcelona, España).
- **Balanzas:**
 - o Balanza granataria Sartorius AW-4202 (Sartorius AG, Goettingen, Alemania).
 - o Balanza analítica Ohaus Adventurer (Ohaus Corporation, Parsippany, Nueva Jersey, USA).
- **Bloque térmico:** Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).
- **Estufa** de cultivos 28°C y 37°C (JP Selecta).
- **Campanas de flujo laminar:**

- MDH Contamination Control (MDH Limited, Andover, Hampshire, UK)
- Telstar AV-100 (Telstar, Terrassa, España).
- **Equipo de electroforesis:**
 - - CubetaSub-cell@GT (BIO-RAD, CA, USA).
 - - Cubeta Mini sub-cell@GT (BIO-RAD).
 - - Fuente de alimentación Power pac 300 (BIO-RAD).
- **pH-metro** Sentix 41 (WTW, Alemania).
- **Evaporador de solventes:** Sistema SPEED VAC ELUT 20 (Varian).

8. Herramientas informáticas

El análisis informático desarrollado en este trabajo ha tenido como base el uso de las siguientes herramientas informáticas:

- **PubMed:** motor de búsqueda de información y artículos científicos en MEDLINE, la más amplia base de datos de bibliografía. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>.
- **BLAST** (*Basic Local Alignment Search Tool*): programa informático que permite el alineamiento de secuencias de ADN, ARN y proteínas (Altschul *et al.*, 1997). Disponible a través del NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) en la página web: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- **Vector NTI:** programa informático desarrollado por la casa comercial Invitrogen que permite el análisis y diseño de secuencias genéticas, entre otras aplicaciones.
- **Tm Calculator:** herramienta on-line de Applied Biosystems que permite calcular la temperatura de hibación de los oligos en la PCR a partir de su secuencia de bases. Está disponible en la página web: www6.appliedbiosystems.com/support/techtools/calc/
- **Gel Pro-Analyzer:** programa informático de MediaCybernetics que permite, entre otros, el análisis tanto cualitativo, como cuantitativo de bandas de geles de electroforesis y blots.
- **SignalP:** servidor on-line del CBS (Dinamarca) que predice la presencia y localización del péptido señal a partir de secuencias de aminoácidos de diferentes microorganismos. www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/ (Petersen *et al.*, 2011).
- **SecretomeP:** servidor on-line del CBS (Dinamarca) que predice la presencia de péptidos señal que no tienen un comportamiento clásico y por lo tanto no pueden ser detectados por SignalP. www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/ (Bendtsen *et al.*, 2005).
- **KEGG** (*Kioto Encyclopedia of Genes and Genomes*): base de datos on-line que permite entender el funcionamiento y la utilidad de los sistemas biológicos, siendo de especial interés en este trabajo las rutas metabólicas. www.genome.jp/kegg.
- **MASCOT:** motor de búsqueda empleado para la identificación, caracterización y cuantificación de proteínas a partir de los resultados obtenidos por espectrometría de masas. www.matrixscience.com.

9. Cultivo y mantenimiento de microorganismos. Determinación del crecimiento

9.1. CEPAS BACTERIANAS

El crecimiento de *E. coli* DH5 α y sus clones en medio sólido se realiza en LB con agar al 2% y a una temperatura de 37°C durante 16-18 horas. Los cultivos en medio líquido se realizan en matraces lisos de 500 mL con 100 mL de medio LB en agitadores orbitales a 37°C y con una agitación constante de 250 rpm. Cuando se cultivan clones resistentes a ampicilina los medios se suplementan con dicho antibiótico a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

La conservación de las cepas bacterianas se realiza de diferentes formas en función del tiempo de mantenimiento requerido. Para periodos cortos de 2-3 semanas, se conservan a 4°C en placa Petri y se sellan con Parafilm™. Si se requieren conservaciones más largas de entre uno y dos años, se realiza una suspensión de bacterias en glicerol al 20% y se almacena a -20°C. Finalmente para periodos más largos se realiza una liofilización de las cepas bacterianas de interés.

El crecimiento bacteriano se determina midiendo la turbidez del medio de cultivo líquido utilizado, mediante la lectura de la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro Hitachi U-2009.

9.2. CEPAS FÚNGICAS

El crecimiento en medio sólido de las diferentes estirpes de *P. chrysogenum* utilizadas, se realiza en medio PW2 (para el crecimiento y la esporulación del micelio) o medio Czapek (exclusivamente para el crecimiento vegetativo del micelio del hongo), incubándose durante cinco días a una temperatura de 28°C.

Para el crecimiento en medio líquido, se inoculan las esporas procedentes de una placa de medio PW2 (incubada en las condiciones anteriormente descritas) en un matraz liso de 500 mL con el medio de interés. El cultivo se incuba en un agitador orbital a una temperatura de 25°C y con una agitación constante de 250 rpm.

La conservación y el mantenimiento de las cepas de *P. chrysogenum* se realiza a partir de esporas frescas de las siguientes formas:

- Si se conservan a 4°C se siembran en una placa de Petri y se sellan con Parafilm™, conservándose de esta forma de 3 a 4 semanas.

- Si la temperatura de conservación es de -20°C , se realiza una suspensión de esporas en glicerol al 40% y de este modo se pueden conservar al menos un año.

- Para una conservación óptima y duradera las cepas son liofilizadas.

La determinación del crecimiento de *P. chrysogenum* durante las fermentaciones se valora mediante el cálculo de peso seco por volumen de medio. Para realizar estos cálculos se recogen muestras de fermentación cada 24 horas hasta el fin de la fermentación. A continuación, se separa el micelio del sobrenadante mediante centrifugación a 4400 rpm durante 30 minutos (el caldo de fermentación se reserva para análisis posteriores) y el micelio se seca en un horno a 80°C durante al menos 7 días, momento en el que generalmente se estabiliza el peso.

10. Manipulación de ADN

10.1. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa (Lodish, 2005), conocida como PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), es una técnica de biología molecular descrita en 1986 por Kary Mullis (Mullis y Faloona, 1987), cuyo objetivo es obtener un gran número de copias (hasta 10^5 - 10^9 copias) partiendo de un fragmento de ADN molde. Proporcionando de este modo, grandes cantidades de ADN para su posterior clonación, secuenciación o mutagénesis.

Esta técnica requiere que se conozca la secuencia nucleotídica de la región del gen deseado, porque es necesario disponer de oligonucleótidos iniciadores cortos, también llamados cebadores o *primers*, complementarios de secuencias presentes en el gen o genes de interés.

1. COMPONENTES BÁSICOS DE UNA REACCIÓN DE PCR

- *Desoxinucleótido trifosfato (dNTPs)*: el sustrato que utiliza la enzima ADN polimerasa para sintetizar nuevo ADN.

- *Dos cebadores*: oligonucleótidos que son, cada uno, complementarios a una de las dos hebras del ADN. Son secuencias cortas de ADN monocatenario, de entre seis y cuarenta nucleótidos, que son reconocidos por la enzima ADN polimerasa permitiendo iniciar la reacción. Deben estar situados enfrentados y a no mucha distancia (no más de 4 kb). Delimitan la zona de ADN a amplificar.

- *Iones divalentes*: Se suele usar magnesio (Mg^{2+}), agregado comúnmente como cloruro de magnesio (Cl_2Mg), actúa como cofactor de la ADN polimerasa.

- *Solución tampón*: mantiene el pH adecuado para el buen funcionamiento de la enzima ADN polimerasa.

- *ADN polimerasa*: han de ser enzimas termoestables, puesto que en las reacciones de PCR se alcanzan temperaturas de hasta 98°C en el paso de desnaturalización. Hoy en día, se emplean enzimas recombinantes producidas por ingeniería genética que poseen una alta procesividad y fidelidad, lo que permite la amplificación de fragmentos de ADN de gran tamaño y con una baja tasa de error.

- *ADN molde*: que contiene la región de ADN que se quiere a amplificar. Posee regiones complementarias con los oligonucleótidos utilizados como cebadores.

2. ETAPAS DE UNA REACCIÓN DE PCR

1.- Desnaturalización inicial: consiste en llevar la reacción hasta una temperatura de 94-98°C, que se mantiene entre 1-9 minutos, para que la ADN polimerasa se active gracias al calor.

2.- Desnaturalización del ADN de doble cadena: la doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Para ello se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (94-98°C). La renaturalización se producirá cuando la temperatura disminuya.

3.- Hibridación o anillamiento de cebadores: los cebadores se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que se desea amplificar. Se realiza gracias a la bajada de la temperatura (37-70°C), durante un corto periodo de tiempo (30 segundos-1 minuto). La temperatura de renaturalización debe diferir en 5°C como máximo de la temperatura de fusión media (T_m) de los cebadores, establecida de forma empírica por su composición nucleotídica.

4.- Extensión o elongación: a 68-72°C se produce la síntesis de una cadena sencilla (produciéndose un fragmento de doble cadena por la complementariedad) en la dirección 5' → 3' mediante la enzima ADN polimerasa, la cual incorpora los desoxinucleótidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde. El tiempo de extensión depende del tamaño del fragmento de ADN a amplificar y de la actividad de la polimerasa. La polimerasa utilizada durante este trabajo experimental ha sido *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs), que posee una velocidad de síntesis de 1 kb/minuto.

5.- Elongación final: etapa única que se lleva a cabo a una temperatura de 70-74°C durante 5-15 minutos tras el último ciclo de PCR. Con ella se asegura que cualquier ADN de cadena simple restante sea totalmente amplificado.

Los pasos 2, 3 y 4, se suelen repetir entre 20 y 35 veces, lográndose así incrementar la secuencia molde entre 10^6 y 10^9 veces. Actualmente, todo el proceso de la PCR está automatizado mediante el uso de un aparato llamado termociclador, que permite calentar y enfriar los tubos de reacción para controlar la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción.

Muchos termocicladores modernos hacen uso del efecto Peltier, que permite tanto calentar como enfriar los tubos simplemente invirtiendo la corriente eléctrica. Los tubos usados para PCR tienen una pared muy fina, lo que favorece una buena conductividad térmica, permitiendo que se alcance rápidamente el equilibrio térmico. Casi todos los termocicladores tienen un sistema que calienta la tapa de cierre con el fin de evitar la condensación en los tubos de reacción.

3. REACCIONES DE PCR REALIZADAS

En la Tabla 4 se especifican los componentes necesarios para la realización de una reacción de PCR utilizando la enzima de alta fidelidad *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs). Es importante destacar que el tampón de esta enzima ya contiene el Cl_2Mg , necesario para el correcto desarrollo de la reacción.

Componentes	Concentraciones finales para 50 µl de reacción
Tampón Phusion™HF 5x ⁽¹⁾	10 % del volumen final
dNTPs mix (stock a 2 mM)	Volumen necesario para alcanzar una concentración de 200 µM
Cebadores (stock a 200 µM)	Volumen necesario para alcanzar una concentración final de entre 0,2 y 0,3 µM
ADN molde	Añadir entre 10 pg y 200 ng
Enzima Phusion™	Una unidad de enzima (0,5 µl)
Agua MilliQ	Hasta volumen final de 50 µl.

Tabla 4: Componentes necesarios para una reacción de PCR con la enzima *Phusion*.

Los cebadores utilizados fueron en el caso de la amplificación del gen *faeA*: *faeA*-F y *faeA*-R y en el caso del gen *faeB*: *faeB*-F y *faeB*-R (Ver Tabla 3).

Los ciclos de PCR se llevaron a cabo en un termociclador *Biometra Thermocycler T-Gradient ThermoBlock* (Biometra, Goettingen, Alemania). Los tiempos y las temperaturas de reacción se pueden observar en la Tabla 5.

Etapa	Tiempo y T ^a (°C)	Ciclos
Desnaturalización inicial	30 seg. a 98°C	1 ciclo
Amplificación	Desnaturalización	35 ciclos
	Anillamiento	
	Elongación	
Extensión final	10 min a 72°C	1 ciclo

Tabla 5: Tiempos y temperaturas utilizados en las reacciones de PCR.

Al final de cada reacción de PCR se recomienda realizar una electroforesis en gel de agarosa con el fin de comprobar la cantidad de ADN amplificado y la no existencia de bandas inespecíficas.

⁽¹⁾Tampón 5X *Phusion™ HF*: TrisHCl 20 mM (pH 7,4), EDTA 0,1 mM, DTT 0,1 mM, KCl 100 Mm, estabilizadores, BSA 200 µg//mL, glicerol 50% y MgCl₂.

10.2. ELECTROFORESIS DE ADN

La electroforesis es una técnica empleada para la separación de moléculas, tales como ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos, etc., en función de su tamaño y carga eléctrica. En el caso de la separación de ácidos nucleicos la electroforesis se desarrolla en geles de agarosa.

Las condiciones de electroforesis para separar moléculas de ADN en geles de agarosa son las descritas por (Maniatis *et al.*, 1982) y (Sambrook *et al.*, 1989). Se utiliza agarosa D1-Electroendosmosis Media (Pronadisa) a diferentes porcentajes (desde 0,8% hasta 2%), en función del tamaño de banda esperado, utilizando TAE (1x)⁽²⁾ como tampón de electroforesis. Los geles se preparan disolviendo la agarosa en TAE (1x) por calentamiento.

Las muestras de ADN se mezclan con 0,1 volúmenes de tampón de carga 10x⁽³⁾ antes de introducirse en los pocillos del gel. La electroforesis se desarrolla generalmente en geles del 0,8-1% de agarosa aplicando una diferencia de potencial de 80 voltios durante 3-4 horas. Una vez finalizada la electroforesis, se tiñen los geles sumergiéndolos en una solución de bromuro de etidio⁽⁴⁾ durante 10-15 minutos. Los geles se observan sobre un transiluminador de luz UV (*Vilber Loumart*) modelo ECX-26-M $\lambda = 312$ nm; *Geneflash-Sungene Bio Imaging* (Synoptics group), se fotografían con una cámara *UVP Image Store 5000* (Ultraviolet Products) y se imprimen mediante una video impresora (*Video Graphic Printer UP-890CE*, Sony).

El tamaño de las bandas de ADN en los geles de agarosa se estima por comparación con diferentes marcadores de peso molecular como el ADN del bacteriófago lambda (MBI Fermentas), el *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen), o el *DNA Molecular Weight Marker II, Digoxigenin-labeled* (Roche) en función del tipo de electroforesis.

⁽²⁾**TAE (50x):** Tris base 242 g, ácido acético glacial 57,1 mL; EDTA 0,5 M, pH 8 100 mL, H₂O 1 litro. ⁽³⁾ **Tampón de carga 10x:** 0,25% azul de bromofenol, 40% sacarosa; 0,25% xilen-cianol; en solución acuosa. Se esteriliza en la olla a presión a 120°C durante 20 minutos. Se conserva 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 xilen-cianol a una velocidad similar a un fragmento de 4000 pb. ⁽⁴⁾**Bromuro de etidio:** se prepara un stock a 10 mg/mL; para la tinción de geles se prepara una solución diluida a 0,5 µg/mL. Se conserva a temperatura ambiente.

10.3. EXTRACCIÓN DE ADN DE GELES DE AGAROSA

Para la extracción y purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se utiliza el kit comercial *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amershan Biosciences). Siguiendo las instrucciones del fabricante a través del protocolo. El citado protocolo se basa en el empleo de un agente caotrópico que desnaturaliza proteínas, ayuda a disolver la agarosa y promueve la unión de ADN de doble cadena (ADNdc) de entre 100 pb y 48 kb a una matriz de fibra de vidrio contenida en una columna. Una vez que el ADNdc queda atrapado, las proteínas y sales contaminantes son eliminadas por lavado con un tampón que contiene etanol. El ADNdc es

eluido de la columna con un pequeño volumen de un solvente con baja fuerza iónica, como TE o agua, obteniéndose así una solución de ADNdc altamente pura y concentrada. Cuando el kit se utiliza para purificar productos de PCR, este método permite limpiar el ADNdc de *primers* y nucleótidos libres. El ADNdc purificado mediante este método puede utilizarse directamente en otras aplicaciones. El protocolo de purificación de ADNdc a partir de geles de agarosa indicado por el fabricante y por lo tanto el seguido en este trabajo, consta de los siguientes pasos:

1. Colocar en un tubo eppendorf el fragmento de gel de agarosa que contiene el ADNdc que se desea purificar.
2. Añadir 10 µl de *capture buffer* ⁽⁵⁾ (tampón de captura) por cada 10 mg de gel de agarosa, teniendo en cuenta que el volumen máximo que soportan las columnas es de 600 µl. Además la cantidad máxima de ADNdc que son capaces de retener las columnas es de 25 µg.
3. Cerrar el tubo eppendorf y mezclar el contenido con ayuda de un vortex. A continuación incubar a 65°C hasta que la agarosa se disuelva completamente.
4. Transferir la muestra a una columna GFX ⁽⁶⁾ previamente colocada en un tubo colector (proporcionado por el kit). Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto para que la muestra con el ADNdc impregne por completo la micromatriz. Se pueden hacer varios pases de la muestra a través de la columna sin que esta se sature, siempre y cuando la agarosa esté caliente y no se exceda la capacidad de unión de ADNdc a la columna anteriormente citada.
5. Centrifugar a 13.200 rpm durante 30 segundos. Descartar la solución recogida en el tubo colector y colocar la columna GFX en un tubo nuevo.
6. Añadir 500 µl de *wash buffer* ⁽⁷⁾ (tampón de lavado) a la columna GFX. Centifugar a 13.200 rpm durante 30 segundos. Descartar la solución recogida en el tubo colector y colocar la columna GFX en un tubo eppendorf de 1,5 mL.
7. Añadir 50 µl de *elution buffer* ⁽⁸⁾ (tampón de elución), agua destilada ultra pura (MilliQ) o TE directamente a la matriz de fibra de vidrio de la columna GFX. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Para obtener el ADNdc más concentrado se debe reducir el volumen de elución, pero nunca debe ser menor de 10 µl. Si queremos recuperar todo el ADNdc retenido en la columna, se eluye con un volumen de 100 µl con alguna de las soluciones de elución. Asimismo se puede calentar la solución utilizada para eluir la columna puesto que aumenta considerablemente el rendimiento obtenido.
8. Centrifugar a 13.200 rpm durante 1 minuto. Recuperar el ADNdc purificado.

⁽⁵⁾**Capture Buffer:** solución tamponada que contiene acetato y una sustancia caotrópica. ⁽⁶⁾**Columnas GFX:** Columnas MicroSpin TM que contienen una matriz de fibra de vidrio. ⁽⁷⁾**Wash Buffer:** Tampón Tris EDTA (10 mM TrisHCl pH 8,0, 1 mM EDTA). Es necesario diluir el wash buffer, por lo que se añaden a la botella 48 mL de etanol absoluto. ⁽⁸⁾**Elution buffer:** 10 mM TrisHCl pH 8,0.

10.4. DIGESTIÓN DE ADN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.

Las enzimas de restricción son nucleasas capaces de hidrolizar enlaces fosfodiéster internos, en moléculas de ADNdc. Generalmente actúan sobre sitios específicos, al reconocer y unirse a secuencias diana concretas. Cada enzima posee unas condiciones óptimas de actuación, en cuanto a pH, temperatura, concentración salina y presencia de cofactores, indicadas por los proveedores en cada caso. Las condiciones de pH, salinas y de cofactores son suministrados por

los proveedores en forma de tampones de digestión comerciales, por lo que estos tampones fueron los empleados para llevar a cabo las reacciones de digestión.

Las enzimas de restricción empleadas en este trabajo fueron adquiridas a diferentes casas comerciales: Fermentas, Amershan, Promega, England Biolabs, Takara y a parte de seguir las indicaciones específicas en cada caso, como regla general se siguieron las siguientes recomendaciones:

- Añadir menos de 1/10 de volumen de enzima con respecto al volumen final de reacción, para diluir el glicerol presente en las soluciones de conservación de las enzimas, evitando que este pueda inhibir la actividad enzimática.
- Si el ADN se encuentra suspendido en TE, realizar la reacción en un volumen 10 veces superior al volumen de ADN a digerir. De esta forma, el TE no altera significativamente las características del tampón de reacción.
- Incubar las reacciones a la temperatura descrita por el proveedor y durante un periodo de tiempo que no exceda el tiempo máximo de actividad indicado para la enzima.
- El esquema general que se siguió en la preparación de las reacciones de digestión fue el siguiente:

- Tampón de digestión (10x)	1/10 del volumen final
- ADN.....	[1-2 µg de ADN por cada 20 µl reacción]
- ARNasa (1µg/mL)	1/10 volumen final
- Enzima de restricción	1-2 U/µg de ADN
- Agua MilliQ.....	Hasta completar el volumen final

10.5. ELIMINACIÓN DE PROTEÍNAS Y OTRAS IMPUREZAS EN LAS MUESTRAS DE ADN MEDIANTE EXTRACCIÓN CON FENOL-CLOROFORMO.

Una vez obtenido el ADN, es necesario limpiarlo antes de su utilización, y para ello, en este trabajo se ha llevado a cabo el siguiente procedimiento de forma rutinaria:

1. Se añade un volumen de fenol neutro (9) a la muestra de ADN, se agita vigorosamente durante 20-30 segundos y se centrifuga 5 min a 14.000 rpm y T^a ambiente.
2. Se recoge la fase acuosa superior cuidadosamente con una micropipeta y se transfiere a un tubo limpio. Se añaden 0,5 volúmenes de fenol neutro y 0,5 volúmenes de cloroformo isoamílico (CIA)⁽¹⁰⁾. Se agita de nuevo vigorosamente durante 20-30 segundos y se centrifuga 5 minutos a 14.000 rpm y a temperatura ambiente. La fase superior se pasa a un tubo limpio.
3. Se añade un volumen de CIA para eliminar los restos de fenol y se agita suavemente durante 20-30 segundos. Se centrifuga durante 5 minutos a 14.000 rpm y a temperatura ambiente, recogiendo la fase superior acuosa que contiene el ADN. Se repite la adición de fenol CIA hasta que la interfase queda completamente libre de proteínas.
4. El ADN se precipita mezclando la fase acuosa obtenida en el paso anterior, con 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C) y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5,2. Se incuba la mezcla a -20°C durante, al menos, 3-4 horas.

5. Se centrifuga a 13.200 rpm y 4°C durante 30 minutos, se desecha el sobrenadante y se lava el precipitado con etanol al 70% (en agua destilada) centrifugando durante 5 minutos en las mismas condiciones. Se secan los restos de etanol al aire, se resuspende el ADN en agua destilada o en TE ⁽¹¹⁾ y se conserva a -20°C ó 4°C respectivamente.

⁽⁹⁾**Fenol neutro:** Se mezclan por agitación fuerte 3 volúmenes de fenol ácido con 1 volumen de TrisHCl 1 M pH 8,0. Se deja reposar hasta que se separan las fases y se guarda a 4°C. ⁽¹⁰⁾**CIA:** Cloroformo 24 volúmenes; alcohol isoamílico 1 volumen. ⁽¹¹⁾**TE:** TrisHCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0.

10.6. ELIMINACIÓN SELECTIVA DE ÁCIDOS NUCLEICOSCONTAMINANTES

Durante el proceso de purificación de ADN o ARN habitualmente las muestras resultan contaminadas con ARN y ADN respectivamente. Por ello, se lleva a cabo la eliminación del ARN y el ADN contaminantes utilizando las enzimas ARNasa ⁽¹²⁾ libre de ADNasa y ADNasa ⁽¹³⁾ libre de ARNasa respectivamente. Las dos enzimas se emplean a una concentración de 10 µg/mL, incubando la reacción durante 60 minutos a 37°C. (Quitar DNAasa- ver apartado 14 protocolo de Lisis Alcalina).

⁽¹²⁾**ARNasa:** Stock a 10 mg/mL en TrisHCl 10 mM pH 7,5 NaCl 15 mM. Las DNAasas presentes se eliminan hirviendo la solución durante 10 minutos. Se enfría lentamente y se almacena a 20°C. ⁽¹³⁾**ADNasa:** Solución 10 mg/mL en agua.

10.7. LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN

Para la ligación de fragmentos lineales de ADN se utilizan enzimas ADN ligasas, que catalizan la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos 3'-OH y 5'-P de los fragmentos a ligar. La enzima ADN ligasa empleada en este trabajo ha sido la del bacteriófago T4 (*Fermentas*) siguiendo el protocolo indicado a continuación:

1. Se mezcla 20-40 veces más de inserto con respecto al vector en molaridad (fentomoles). Un fentomol equivale a 10⁻¹⁵ moles de extremos de ADN, siendo utilizada la siguiente fórmula para calcular la cantidad de ADN (ng) que equivale a dicha concentración en molaridad:

$$\text{Cantidad de extremos de ADN (ng)} = \frac{\text{moles ADN} \times \text{tamaño ADN (pb)} \times 660 \text{ Da/pb}}{2}$$

2. La relación molar anteriormente aplicada se realiza teniendo en cuenta que la cantidad de vector está entre 1-10 fentomoles para ligaciones cohesivas y entre 5-20 fentomoles para ligaciones con extremos romos.

3. Se añade 1 µl de tampón de ligasa ⁽¹⁴⁾ (10x), se mezcla y se añade 1 µl de enzima.

4. La reacción se incuba a temperatura ambiente (22°C) un mínimo de 10 minutos para las ligaciones de extremos cohesivos y entre 2 y 16 horas para las ligaciones de extremos romos.

5. Inactivar la ligasa mediante calentamiento a 65°C durante 10 minutos.

6. Los productos de ligación se transforman en células competentes de *E.coli* DH5α.

⁽¹⁴⁾**Tampón de ligasa (10x):** TrisHCl 0,4 M; MgCl₂ 0,1 M; DTT 0,1 M; dATP 5 mM, pH 7,8.

11. Obtención de células competentes de *E. coli*

Para poder incorporar ADN exógeno de forma estable a una bacteria, mediante el mecanismo conocido como transformación, es preciso que dicha bacteria se encuentre en estado de competencia. Hay bacterias que adquieren este estado de forma natural y otras que requieren que dicho estado sea inducido de forma artificial.

E. coli no es una bacteria competente de forma natural. Por ello, para que las células de *E. coli* puedan interiorizar ADN plasmídico por transformación se someten a tratamientos que alteran las envueltas celulares para aumentar la permeabilidad al ADN.

Para la inducción artificial del estado de competencia en las células de la cepa *E. coli* DH5 α se ha seguido el método del cloruro de rubidio, descrito inicialmente por (Hanahan, 1983). Dichas células alcanzan eficiencias de transformación de hasta $5 \cdot 10^8$ transformantes/ μ g ADN. Se llevó a cabo el siguiente protocolo:

1. Se inocula una colonia aislada de medio LB sólido en 5 mL de medio SBO líquido suplementado con la solución de sales de magnesio ⁽¹⁵⁾ y se incuba durante toda la noche a 37°C y con una agitación constante de 250 rpm.
2. Con 200-400 μ l del pre-inóculo anterior, se inocula en 100 mL de medio SOB líquido (suplementado con 2 mL de solución de sales de magnesio), incubándolo en idénticas condiciones de temperatura y agitación.
3. Cuando el cultivo alcanza una DO_{600 nm} de 0,4-0,5 unidades se enfría rápidamente en un baño de agua-hielo, para detener el crecimiento celular de inmediato. A partir de este momento, las células se mantienen a una temperatura constante de 4°C.
4. Las células se recogen por centrifugación a 5000 rpm durante 5 min y a 4°C. El precipitado celular se resuspende en 30 mL de solución RF1 ⁽¹⁶⁾ fría y se mantiene durante 30 min en hielo.
5. Las células se vuelven a recoger por centrifugación a 5000 rpm durante 5 min y a 4°C, y se resuspenden en 8 mL de solución RF2 ⁽¹⁷⁾ fría.
6. Por último las células se reparten en alícuotas de unos 120 μ l y pueden utilizarse en el momento o pueden almacenarse a -80°C, previa congelación en N₂ líquido.

⁽¹⁵⁾Solución de sales de magnesio: MgCl₂ 1M MgSO₄ 1 M. Esterilizar mediante filtración. ⁽¹⁶⁾RF1: RbCl 100 mM, MnCl₂ 50 mM, Acetato potásico 30 mM, CaCl₂ 10 mM, Glicerol 15%, pH 5,8 ajustando con ácido acético 0,2 M. Esterilizar por filtración. ⁽¹⁷⁾RF2: MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM, Glicerol 15%, pH 6,8 ajustando con NaOH 1 N. Esterilizar mediante filtración.

12. Transformación de *E. coli*

En el presente trabajo se utilizó el siguiente protocolo descrito por (Hanahan, 1983) para la transformación de células competentes de *E. coli*:

1. Se descongelan las células competentes en hielo durante 10 minutos. Una vez descongeladas, se mezclan con 1-10 μl de solución de ADN y se incuban en hielo durante 30 minutos.
2. La mezcla anterior se somete a un choque térmico, mediante inmersión en un baño de agua a 42°C durante 45 segundos y enfriamiento rápido en hielo durante 2 minutos.
3. Se añaden 600 μl de medio LB a la mezcla de transformación y se incuba a 37°C y 250 rpm durante 60 minutos para permitir la expresión de la resistencia al antibiótico de selección.
4. Se siembra la mezcla (toda o una alícuota) en placas de medio LB sólido suplementado con el antibiótico de selección.

13. Minipreparaciones de ADN plasmídico (minipreps)

Para el aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli* se ha seguido el método de Holmes-Quigley (Holmes y Quigley, 1981):

1. Se inocula una colonia aislada de *E. coli* DH5 α en un tubo eppendorf con 1 mL de medio TB, suplementado con el antibiótico de selección. El cultivo se incuba durante 6-12 h a 37°C y con agitación a 250 rpm.
2. Se recogen las células por centrifugación durante 4 min a 8.000 rpm. Se elimina el sobrenadante y se resuspenden las células en 300-350 μl de STET⁽¹⁸⁾. Se añaden 10 μl de una solución 10 mg/mL de lisozima en agua y se incuba 45 segundos con agitación fuerte. La lisozima va a destruir la pared celular bacteriana, lo que va a hacer que las células sufran una lisis osmótica.
3. Inmediatamente después de la lisis celular, se incuban en agua hirviendo durante 45 s. Mediante este tratamiento el ADN cromosómico y las proteínas se desnaturalizan, lo que permite eliminarlas fácilmente mediante un palillo estéril del fondo de los tubos tras una centrifugación durante 15 min a 14.000 rpm.
- 4.- El sobrenadante obtenido se mezcla con 1/10 de volumen de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 1 volumen de isopropanol. Transcurridos 10 minutos, el ADN plasmídico se recupera por centrifugación durante 10 min a 13.200 rpm.
- 5.- Tras descartar el sobrenadante, el precipitado se lava con etanol al 70% en agua, se deja secar al aire y se resuspende en 40 μl de TE.

⁽¹⁸⁾STET: Sacarosa 8%, Tritón X 100 0,5%; Tris HCl 10 mM, EDTA 50 mM, pH 8,0 en solución acuosa.

14. Obtención de ADN plasmídico a gran escala: lisis alcalina

En este trabajo se ha seguido el protocolo descrito por (Zhou *et al.*, 1990), con ligeras modificaciones:

1. 100 mL de medio LB, suplementados con el antibiótico de selección, se inoculan con una colonia aislada de *E. coli* DH5 α (portadora del plásmido) y se incuba el cultivo durante 12-16 horas a 37°C y a 250 rpm.
2. Una vez crecido el cultivo, se recuperan las células mediante centrifugación durante 10 minutos a 4800 rpm y 4°C. Se deja un poco de medio y se resuspende el precipitado con ayuda del vortex.

3. Se añaden 6 mL de solución TENS ⁽¹⁹⁾ y se mezcla suavemente por inversión hasta obtener una mezcla homogénea y viscosa. Se incuba un máximo de 5 minutos a temperatura ambiente.

4. Se añaden 3 mL de acetato sódico 3 M pH 5,2 y se agita suavemente hasta obtener una mezcla homogénea y fluida. Esto permite que precipiten las proteínas y los restos celulares.

5. A continuación se eliminan los restos precipitados mediante centrifugación a 4800 rpm durante 25 minutos y a 4°C. El sobrenadante se transfiere a un tubo limpio mediante una micropipeta.

6. Los ácidos nucleicos presentes se precipitan añadiendo 18 mL de etanol absoluto frío y mezclando suavemente varias veces, por inversión. Posteriormente se centrifuga durante 30 minutos a 4800 rpm y a 4°C. El precipitado se lava con etanol al 70% en agua, se deja secar y se resuspende en 1 mL de TE.

7. Se trata la solución obtenida con ARNasa (concentración final 10 µg/mL) durante 30-90 minutos a 37°C para eliminar el ARN. A continuación se eliminan las proteínas por fenolización y se precipita nuevamente el ADN con 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C) y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5.2.

8. Después de recuperar el ADN por centrifugación durante 30 minutos a 13.200 rpm y 4°C, se lava con etanol al 70% en agua y se resuspende en 75-150 µl de TE.

⁽¹⁹⁾TENS: NaOH 0,15M, SDS 1% en TE.

15. Transformación de *P. chrysogenum*

La introducción de ADN en *P. chrysogenum* consta de varios pasos y se ha realizado siguiendo los procedimientos descritos por (Cantoral *et al.*, 1987):

15.1. OBTENCIÓN DE PROTOPLASTOS

El protocolo que se ha seguido para transformar *P. chrysogenum* comienza con la obtención de protoplastos de este microorganismo y para obtenerlos se ha seguido el siguiente protocolo:

1. Se inoculan 100 mL de medio MPPY con esporas procedentes de una placa de Petri con medio Power 2, previamente incubada durante 5 días a 28°C. Se incuba el cultivo durante 12-24 horas a 25°C y 250 rpm para procurar un alto porcentaje de germinación (superior al 95%) de las esporas presentes, pero sin que se genere un micelio muy entrelazado.

2. Se recoge el micelio por filtración a través de un filtro estéril de nilón de 30 µm de tamaño de poro, lavándose a continuación con 100 mL de NaCl 0,9%.

3. Al micelio recogido se le elimina el exceso de líquido secándolo entre papeles de filtro estériles y se toma 1 g de micelio que se resuspende por inversión en 10 mL de tampón de protoplastos (TPP ⁽²⁰⁾) hasta conseguir una suspensión homogénea. El micelio resuspendido se mezcla en un matraz de 500 mL con 10 mL de solución de enzimas líticas (Sigma Chemical Co.) a una concentración final de 10 mg/mL en TPP. Esta solución de enzimas líticas ha de ser esterilizada por filtración mediante un filtro millipore de 0,22 µm antes de su uso. La mezcla se incuba a 28°C con agitación suave (85 rpm) durante 2-3 horas. Se controla el proceso de liberación de protoplastos tomando muestras y visualizándolas al microscopio periódicamente.

4. Una vez que se han liberado la mayoría de los protoplastos, se filtra la suspensión a través de un filtro estéril de nilón de 30 μm de tamaño de poro y se reparte en dos tubos de 10 mL. A continuación, para recoger los protoplastos, se centrifuga el filtrado en una centrífuga basculante a 2500 rpm durante 5 minutos. Se elimina el sobrenadante y se lava el precipitado tres veces con solución KCM ⁽²¹⁾, centrifugando y eliminando el sobrenadante cada vez. Antes de la última centrifugación se hace un recuento de protoplastos en la cámara Thoma.

5. Los protoplastos obtenidos en el paso anterior se resuspenden en KCM con un 10% de solución PCM ⁽²²⁾ a una concentración de $2,5 \times 10^8$ protoplastos/mL. La suspensión se mantiene en hielo hasta el momento de la transformación.

⁽²⁰⁾**Tampón de protoplastos (TPP):** *Tampón fosfato potásico 50 mM, KCl 0,7 M pH 5,8.* ⁽²¹⁾**Solución KCM:** *KCl 0,7 M CaCl₂ 50 mM, Mes 10 mM, pH 5,8.* ⁽²²⁾**Solución PCM:** *Polietilenglicol 6000 50%, CaCl₂ 50 mM, Mes 10 mM, pH 5,8.*

15.2. TRANSFORMACIÓN DE PROTOPLASTOS

En nuestro caso la transformación se han llevado a cabo con dos plásmidos diferentes en lo que se conoce como cotransformación. Mientras el primer plásmido porta el casete de expresión de las FAES (faeA o faeB), el segundo posee el casete de resistencia a fleomicina lo cual permite la selección de los transformantes, por resistencia a dicho compuesto. El protocolo llevado a cabo para la cotransformación fue el siguiente:

1.- En un tubo de 10 mL estéril se realiza la siguiente mezcla de transformación (las muestras control no llevan ADN):

Suspensión de protoplastos	100 μl
ADN plasmídico sobreexpresado (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	1-10 μl
ADN plasmídico con resistencia a fleomicina (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	1-10 μl
Ácido arintricarboxílico (ATA) 0,1M	10 μl

2.- Se mezcla suavemente con una micropipeta intentando no formar burbujas y se incuba en hielo durante 20 minutos.

3.- Se añaden 500 μl de solución PCM, se mezcla con una micropipeta y se incuba a temperatura ambiente durante 20 minutos.

4.- Se diluye el polietilenglicol de la solución PCM de la reacción de transformación con 600 μl de solución KCM mezclando con una micropipeta.

5.- Una vez realizada la reacción de transformación se procede a la selección de los transformantes (ver apartado siguiente).

Además de las reacciones de transformación, se emplea un control de regeneración de protoplastos en el cual no se añade ADN plasmídico. Esta mezcla es sembrada en medio selectivo y no selectivo, lo cual da una idea a cerca de la viabilidad de los protoplastos, de la aparición de colonias revertientes (si se emplea la complementación de alguna mutación como sistema de selección), de la sensibilidad al agente de selección empleado y de la posible presencia de microorganismos contaminantes.

15.3. SISTEMA DE SELECCIÓN POSITIVA DE TRANSFORMANTES EN *P. chrysogenum*

Se utiliza como sistema de selección positiva de transformantes la resistencia a fleomicina otorgada por el gen *ble* de *Streptoalloteicus hindustanus*. La fleomicina es un antibiótico metaloglucopeptídico de la familia de la bleomicina (Berdy, 1980) con un amplio espectro antimicrobiano. Su mecanismo de acción se basa en la rotura del ADN actuando sobre ADN monocatenario con secuencias repetidas invertidas y sobre ADN bicatenario no metilado (Hertzberg *et al.*, 1985). La resistencia frente a este antibiótico se produce por bloqueo físico de las moléculas de fleomicina mediante el producto del gen *ble*. Este gen se ha encontrado en bacterias Gram negativas (Genilloud *et al.*, 1984)(Collis y Hall, 1985), en bacterias Gram positivas (McKenzie *et al.*, 1986) y en el actinomiceto productor de fleomicina *S. hindustanus* (Drocourt *et al.*, 1990). En los experimentos de cotransformación realizados se ha utilizado el plásmido pJL43 que contiene un casete de resistencia a fleomicina formado por el gen *ble* bajo el control del promotor del gen *pcbC* de *P. chrysogenum* y el terminador *T_{cyc1}* de *S. cerevisiae* (Gutiérrez *et al.*, 1991b).

La selección de los transformantes se realiza en medio sólido selectivo que contiene el antibiótico de selección, en este caso fleomicina. Se utilizó el medio mínimo Czapek-Sorbitol 1M, en el que el sorbitol es el estabilizante osmótico que impide la lisis de los protoplastos y una concentración de 35 µg/mL de fleomicina.

A partir de la reacción de transformación obtenida en el apartado anterior se realiza la selección de los transformantes de la siguiente manera:

- 1.- Se prepara una base de 10 mL de medio selectivo (Cz-sorbitol 1M), se vierte sobre las placas de Petri y se deja polimerizar durante 10 minutos.
- 2.- En un tubo de 10 mL estéril se mezclan 300 µl de la reacción de transformación, la fleomicina (35 µg/mL) y el medio de cultivo Cz-sorbitol 1M fundido a una temperatura de entre 48 y 50°C.
3. Mezclar suavemente y se añade a modo de cobertera sobre las de Petri previamente preparadas. Dejar secar.
4. Incubar a 28°C durante 6-8 días hasta la aparición de las colonias de los transformantes.
5. Los transformantes obtenidos se repican en Czapek con fleomicina (35µg/mL) y se vuelven a incubar a 28°C durante 6-8 días.

16. Hibridación de ADN: Southern Blot

La técnica de Southern Blot (Southern, 1975) es un método de biología molecular que permite detectar la presencia de una secuencia de ADN en una mezcla compleja de este ácido nucleico. Esta técnica se basa en la fragmentación in situ del ADN, separación de las cadenas del mismo y transferencia de estas en forma monocatenaria a la membrana, para su posterior fijación a

la misma mediante luz UV. Una vez fijado el ADN a la membrana, al estar en forma monocatenaria, se puede hibridar con una sonda de interés y de este modo localizar la presencia de secuencias de ADN que sean de interés.

Esta técnica requiere de varias etapas: extracción de ADN total, digestión del mismo con endonucleasas de restricción, electroforesis en gel de agarosa, transferencia a membrana de hibridación, marcaje de las sondas, hibridación con la sonda de interés, lavados y detección inmunológica de la sonda. Todas estas etapas se describen con detalle a continuación:

16.1. OBTENCIÓN DE ADN TOTAL

Para la obtención de ADN total de *P. chrysogenum* se utiliza un método rápido en el cual se obtiene poca cantidad de ADN pero suficiente para realizar análisis genéticos mediante hibridación de *Southern*, de cepas mutantes o transformantes (Casqueiro *et al.*, 1999). El protocolo seguido, fue el siguiente:

1. Se inoculan 100 mL de medio MPPY con esporas frescas de *P. chrysogenum* procedentes de una placa de Power 2. El cultivo se incuba en un matraz liso de 500 mL, durante 24 horas a 25°C y una agitación de 250 rpm. A continuación, se recoge el micelio a través de un filtro de nilón estéril (30-45 µm de poro) y se lava con 100 mL de NaCl 0,9%. El micelio así obtenido se seca y se aplasta entre papeles de filtro y se congela inmediatamente con N₂ líquido.

2. Se pulverizan 500 mg de micelio en un mortero con N₂ líquido. Se recogen en un tubo eppendorf (2,2 mL) y se mezclan con 1 mL de tampón de rotura para *Penicillium*⁽²³⁾. Cuando se consigue una mezcla homogénea, se le añaden 500 µl de fenol neutro y 500 µl de CIA. Se mezcla por agitación suave y se incuba en un baño con agua a 50°C durante 30 min, agitándolo cada 5 min.

3. Seguidamente, se centrifuga a 14000 rpm y temperatura ambiente durante 5 min. Finalizado este tiempo, se recoge la fase acuosa (superior) y se extrae con fenol/CIA hasta que la interfase quede limpia de restos celulares. Los restos de fenol se eliminan por una extracción final con CIA.

4. El ADN total se precipita con 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C) y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5,2. La mezcla se incuba a -20°C durante al menos 2 h. Transcurrido este tiempo, se centrifuga durante 30 min a 14000 rpm y 4°C. El precipitado obtenido se lava con etanol al 70% en agua, se deja secar al aire y se resuspende en 40 µl de TE.

⁽²³⁾ **Tampón de rotura para *Penicillium*: TrisHCl 0,18 M; EDTA 10 mM, SDS 1% pH 8,2.**

16.2. TRANSFERENCIA DE ADN MEDIANTE SISTEMA DE VACÍO

Este procedimiento se utilizó en aquellos casos en los que se quiso transferir ADN digerido y desarrollado en geles de agarosa a membranas de hibridación. Este método (VacuGene XL, Amershan Biosciences) permite una transferencia óptima de moléculas de ADN de pequeño y medio tamaño. Dicho procedimiento fue el siguiente:

1. Tras visualizar el gel de agarosa y tras comprobar que la electroforesis se ha desarrollado de manera óptima, dicho gel se lava con agua destilada.
2. Se monta el sistema de transferencia, colocando la membrana Hybond-N sobre la placa porosa de la cubeta de transferencia. Sobre la membrana se coloca una lámina de plástico que cubra toda la placa porosa y que posea una apertura rectangular central, de un tamaño ligeramente inferior al del gel. Debe colocarse de forma que la membrana quede centrada en la apertura de la lámina de plástico.
3. A continuación, se coloca el gel sobre la apertura de la lámina de plástico y se conecta la bomba de vacío. Una vez que comienza la succión se añade sobre el gel ácido clorhídrico 0,25 M de manera que cubra toda la superficie del mismo. Se incuba de esta forma durante 15 minutos o hasta que se observe que ha ocurrido un cambio de pH, indicado por el viraje de los restos de tampón de carga en el gel de azul a amarillo.
4. Seguidamente, se elimina el ácido clorhídrico de la superficie del gel y se sustituye por solución desnaturalizante ⁽²⁴⁾, incubándolo durante 20 minutos.
5. Posteriormente se elimina la solución desnaturalizante y se sustituye por solución neutralizante ⁽²⁵⁾, incubando el gel con esta solución durante otros 20 minutos más.
6. Finalmente, se elimina la solución neutralizante y se cubre el gel con SSC (20x) ⁽²⁶⁾. Se mantiene la transferencia durante al menos 2 horas. Transcurrido ese tiempo, se desconecta el equipo de transferencia, se retira el gel y se recoge la membrana. Dicha membrana se lava con SSC (6x) y se seca colocándola sobre un papel Watman. El ADN se fija a la membrana mediante irradiación con luz ultravioleta en un Stratalinker siguiendo las instrucciones del fabricante.

⁽²⁴⁾Solución desnaturalizante: NaOH 0,5 M NaCl 1,5 M. ⁽²⁵⁾Solución neutralizante: NaCl 3 M, TrisHCl 1 M pH 7,5. ⁽²⁶⁾SSC (20x): NaCl 3 M citrato sódico 0,3 M pH 7.

16.3. MARCAJE DE SONDAS

El sistema de marcaje no radiactivo se basa en la utilización del desoxinucleótido dUTP, modificado por la unión de un hapteno esteroide denominado digoxigenina (DIG), que actúa como antígeno de los anticuerpos que posteriormente se utilizarán para la detección. Los nucleótidos modificados se introducen por medio de la amplificación, a partir de cebadores unidos al azar, de la molécula de ADN (*random primer*; Feinberg y Vogelstein, 1983). La reacción de marcaje con el sistema *DIG-High Prime* (Roche) se realiza de la siguiente forma:

1. El ADN (10 ng-3 µg) que se quiere marcar con digoxigenina se disuelve en 15 µl de H₂O. A continuación se desnaturaliza hirviéndolo 10 minutos y enfriándolo rápidamente en hielo durante 2-3 minutos.
2. Seguidamente se añaden 2 µl de hexanucleótidos marcados ⁽²⁷⁾ (10x), 2 µl DIG-labelling mix ⁽²⁸⁾, 1 µl fragmento Klenow (2U/ µl, *Fermentas*) y la mezcla se incuba a 37°C durante 1-20 horas (marcaje óptimo 20 horas).
3. Para descartar los restos de sales y enzimas, se purifica la sonda. Para llevar a cabo la purificación de la sonda, se añaden 2 µl de EDTA 0,2 M pH 8,0, 2,5 µl de LiCl 4 M y 75 µl de etanol absoluto frío. Se mezcla varias veces por inversión suave para que precipite el ADN y se mantiene a -20°C toda la noche para lograr una precipitación óptima de la sonda.
4. Se recupera el ADN de la sonda mediante centrifugación a 13200 rpm durante 30 minutos y a 4°C. Se lava con etanol al 70% en agua (durante 10 minutos) para eliminar los restos de sales. El ADN se deja secar al aire y se resuspende en 400 µl de TE. La sonda se

puede recoger con 20-30 mL de tampón de hibridación⁽²⁹⁾ y puede almacenarse, una vez marcada, durante más de un año.

⁽²⁷⁾**Hexanucleótidos marcados (10x):** dATP/dCTP/dGTP cada uno 1 mM, dTTP 0,65 mM. ⁽²⁸⁾**DIG Labelling Mix:** DIG 11 dUTP 0,35 mM; tampón de reacción (5 x 50%). ⁽²⁹⁾**Tampón de hibridación para ADN:** Formamida 40%, SSC (5x), Sarcosina 0,1% SDS 0,02% agente bloqueante 2%.

16.4. PREHIBRIDACIÓN

Para evitar uniones inespecíficas de la sonda de ADN a la membrana, este se bloquea con agente bloqueante, *Blocking reagent* (Roche), así se eliminan los posibles sitios activos de la membrana que pudieran retener la sonda y generar la aparición de señales de hibridación inespecíficas. El protocolo realizado es el siguiente:

1. Se introduce la membrana en una bolsa de plástico adecuada para tal fin junto con el tampón de hibridación ⁽²⁹⁾ y se retiran las burbujas que se puedan haber formado para evitar fallos en la hibridación. A continuación, se sella la bolsa completamente para evitar fugas del tampón de hibridación o entrada del agua del baño utilizado en la hibridación.
2. La bolsa se incuba en un baño de agua con agitación constante a la temperatura de hibridación de interés durante al menos 3 horas.

16.5. HIBRIDACIÓN

Las condiciones de astringencia de la hibridación se controlan mediante la temperatura de hibridación y la composición del tampón de hibridación, este último en lo referente al porcentaje de formamida. La hibridación de filtros con ADN se realizó a una temperatura de 42°C y con un 40% de formamida, de la siguiente manera:

1. Se desecha el tampón de hibridación utilizado en la prehibridación y se añade nuevamente tampón de hibridación al que se le ha añadido la sonda purificada y desnaturalizada. La sonda ha de desnaturalizarse, justo antes de su uso.
2. Se cierra bien la bolsa eliminando las burbujas de aire y se incuba en un baño en agitación a la temperatura de hibridación de interés durante 12 horas.

16.6. LAVADO DE LAS MEMBRANAS

Una vez finalizada la hibridación, se elimina la sonda libre y el exceso de sonda unido inespecíficamente mediante el lavado de las membranas con varias soluciones de lavado. La intensidad del lavado y la temperatura dependerá de la especificidad de la sonda.

La composición de las soluciones de lavado y las condiciones de incubación que se ha empleado son las que se describen a continuación:

- SSC (2x); SDS 0,1% 15 minutos a la temperatura de hibridación.

- SSC (0,1x); SDS 0,1%: 15 minutos a la temperatura de hibridación.

Una vez lavadas las membranas se dejan secar al aire y se procede a realizar la detección inmunológica.

16.7. DETECCIÓN INMUNOLÓGICA

La detección de membranas hibridadas con sondas se realiza por métodos inmunológicos. La sonda se detecta por su unión a un anticuerpo anti-digoxigenina que lleva unida la enzima fosfatasa alcalina. La fosfatasa alcalina utiliza como sustrato el compuesto comercial CDP-Star, el cual al ser desfosforilado por la enzima genera de inmediato una señal lumínica. Esto permite una detección inmediata y precisa de las sondas marcadas debido a que la señal de luz visible que se genera puede ser visualizada por medio de un film fotográfico y este puede revelarse y guardarse. El protocolo utilizado para la detección fue el siguiente:

1. Se lava la membrana a temperatura ambiente y en agitación con solución 1 ⁽³⁰⁾ (100 mL) durante 5 minutos.
2. Se incuba durante 30 minutos en solución 2 ⁽³¹⁾ (100 mL), también a temperatura ambiente y en agitación.
3. Se introduce la membrana en una bolsa de plástico y se incuba, al menos durante 2 horas, en solución 2 (100 mL) a la que se le habrá añadido anticuerpo antidigoxigenina conjugado con la fosfatasa alcalina (Roche) en una proporción de 20 µl Ac/100 mL de solución.
4. Se lava la membrana 2 veces con solución 1 durante 15 minutos para eliminar el exceso de anticuerpo.
5. Se lava la membrana con solución 3 ⁽³²⁾ (tampón de la fosfatasa), para equilibrarlo y prepararlo para los procesos siguientes.
6. Se realiza la reacción de quimioluminiscencia, incubando la membrana en una bandeja con tampón 3 (30-40 mL) más 100 µl de CDP-Star (Roche) por cada 10 mL de tampón. Se incuba en oscuridad y reposo durante 5 minutos.
7. Se seca la membrana al aire y se introduce en un casete de autoradiografía, colocando sobre la membrana un film de autoradiografía. El tiempo de exposición variará en función de la intensidad de la señal, del estado del CDP, del estado del revelador, etc.
8. Tras la exposición el film de autoradiografía se revela pasándolo, ordenadamente, por las siguientes soluciones: revelador ⁽³³⁾ (hasta que aparezcan las señales de hibridación), paro ⁽³⁴⁾ y fijador ⁽³⁵⁾.

⁽³⁰⁾**Solución 1:** Ácido maleico 11,61 gr; NaCl 8,76 gr; H₂O destilada hasta 1 litro, pH 7,5. ⁽³¹⁾**Solución 2:** Solución 1 más agente bloqueante al 1%. ⁽³²⁾**Solución 3:** Tris base 12,11 gr; NaCl 5,84 gr; pH 9,5; H₂O hasta 1 litro, pH 9,5. ⁽³³⁾**Revelador** (Kodak Professional HC 110 Developer): se prepara mezclando 1 parte de revelador y 30 de agua destilada. ⁽³⁴⁾**Paro:** Solución de ácido acético al 2% en agua destilada. ⁽³⁵⁾**Fijador** (Kodak): se mezclan 1 parte de fijador por cada 3 partes de agua destilada. Las soluciones CDP Star, revelador, fijador y paro se conservan en oscuridad

17. Métodos para la extracción y el análisis de ARN

La extracción de ARN de las células de *P. chrysogenum* presenta una gran dificultad debido a la rápida degradación del ARN por las enzimas RNasas, ampliamente presentes en el entorno de trabajo. Por ello, es esencial extremar la limpieza y desinfección del material, así como el uso de guantes durante su manipulación.

17.1. OBTENCIÓN DE ARN TOTAL A GRAN ESCALA

Para extraer el ARN total de *P. chrysogenum* se ha seguido un protocolo basado en el propuesto por Chomczynski y Sacchi en 1987, con ligeras modificaciones:

1. Se siembra una placa de medio PW2 con las cepas de *P. chrysogenum* de interés y se dejan crecer durante 5 días.

2. Pasado este tiempo se recogen las esporas y se crecen en medio MPPY durante 24h a 28°C y 250 rpm, tras las cuales se inoculan, con un 10% de inóculo, matraces con medio MPR-2 y se incuban a 28°C y 250 rpm. Se recoge el micelio a las 24, 48 y 72h de fermentación mediante un filtro de nilón estéril (30 µm de diámetro de poro) y se lava con 100 mL de NaCl 0,9%. El micelio obtenido se seca, se compacta entre papeles de filtro y se congela inmediatamente en nitrógeno líquido para almacenarlo a -80°C hasta el momento de la extracción del ARN.

3. El micelio congelado se pulveriza en un mortero con nitrógeno líquido y se machaca hasta reducirlo a polvo fino. Se recogen 500 mg en un tubo eppendorf de 2,2 mL, al que se le añaden 1,3 mL de tampón EF ⁽³⁶⁾. Posteriormente, la mezcla se agita vigorosamente con el vortex durante un minuto, para conseguir una mezcla homogénea. Las muestras se mantienen en hielo.

4. Seguidamente las muestras se centrifugan a 13200 rpm y a 4°C durante 5 minutos. El sobrenadante se transfiere a otro tubo eppendorf de 2,2 mL al que se añaden 130 µl de CIA y se agita enérgicamente durante 15 segundos.

5. A continuación, se vuelve a centrifugar a 13200 rpm y a 4°C durante 10 minutos y se recoge la fase superior obtenida. Se hace una extracción con 0,5 volúmenes de fenol ácido y 0,5 volúmenes de CIA de la fase superior. Se mezcla por inversión hasta homogeneizar y se centrifuga 10 minutos a 4°C y 13200 rpm. Se repite este paso hasta obtener una fase superior totalmente limpia de impurezas.

6. Posteriormente, se recupera el sobrenadante limpio y el ARN total se precipita añadiendo 0,5 volúmenes de LiCl 8 M⁽³⁷⁾ e incubándolo a 4°C durante al menos 30 minutos.

7. Pasado el tiempo de incubación se vuelve a centrifugar a 13200 rpm y 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante S+ se elimina cuidadosamente con una micropipeta sin arrastrar el precipitado.

8. Finalmente el precipitado se lava dos veces, con 1 mL y 400 µl de etanol al 70% en agua centrifugando a 13200 rpm y a temperatura ambiente durante 5 minutos. El precipitado de ARN se resuspende en 30 µl de H₂O libre de RNasas ⁽³⁸⁾ y se conserva a -80°C hasta su utilización.

La concentración del ARN se valoró utilizando el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000. La integridad del ARN puede visualizarse cargando una alícuota en un gel de agarosa al 1%.

Una vez extraído el ARN de las células, el análisis de su expresión se realizó mediante PCR a tiempo real y mediante la técnica de Northern Blot, que se describen a continuación.

⁽³⁶⁾**Tampón EFA:** 1 volumen de tampón de extracción* suplementado con 7 µl de β-mercaptoetanol y 1 volumen de fenol neutro. ***Tampón de extracción:** isotiocianato de guanidinio 4 M y lauril sarcosina al 5% en tampón citrato sódico 25 mM pH 7. ⁽³⁷⁾**LiCl 8M:** preparado en agua MilliQ libre de ARNasas. ⁽³⁸⁾**H₂O libre de ARNasas:** H₂O MilliQ recogida en una botella libre de ARNasas (tratada previamente con peróxido de hidrógeno y etanol absoluto) autoclavada dos veces.

17.2. NORTHERN BLOT

Northern blot es una técnica de análisis de expresión de ARN desarrollada en 1977 por James Alwine, David Kempy y George Stark. El nombre de la técnica deriva de la técnica de detección de ADN, denominada *Southern blot* en honor a su descubridor; de este modo, al desarrollarse la técnica equivalente para ARN se empleó el punto cardinal opuesto (*northern*, septentrional en inglés, frente al meridional *southern*). Por lo tanto, mientras que un *southern blot* permite analizar el ADN, el *northern blot* detecta el ARN. Se puede usar para comparar cantidades relativas de distintas formas de ARN, detectar el tamaño de un ARN dado y localizar distintas formas de ARN, entre otras aplicaciones.

Realizar un *northern blot* requiere de varias etapas. En primer lugar, se coloca el ARN en un gel de agarosa, en condiciones desnaturizantes, que lo separa por tamaño. Luego se transfiere el ARN a una membrana cargada positivamente, la cual se incuba con un marcador de ADN de hebra simple, que es complementario al ARN en cuestión. El marcador al unirse al ARN, permite la detección del mismo por radiactividad o por una reacción enzimática que emite fluorescencia. De este modo se puede ubicar y cuantificar el ARN de interés. Todas estas etapas se describen con más detalle a continuación.

1. Electroforesis de ARN en geles desnaturizantes:

La electroforesis en condiciones desnaturizantes se basa en el método descrito por Sambrook *et al.* (1989). Desarrollar un gel en condiciones desnaturizantes permite separar las moléculas de ARN en función de su tamaño. Como agente desnaturizante se ha utilizado formaldehído, tanto en el propio gel, como en las muestras, para evitar la formación de estructuras secundarias en el ARN que pudieran interferir con la migración electroforética. El protocolo realizado se describe a continuación:

- El gel desnaturizante se compone de: agarosa al 1,2%, MOPS ⁽³⁹⁾ (10x) y formaldehído al 6% disuelto en agua MilliQ estéril y libre de ARNasas. El gel se prepara en una botella estéril libre de ARNasas (tratada previamente con peróxido de hidrógeno y etanol absoluto) y con todos los componentes excepto el formaldehído. La mezcla se esteriliza, se deja enfriar lentamente hasta los 65°C y se le añade el formaldehído en una campana de extracción de gases. Se deja polimerizar el gel en un molde nivelado y se predesarrolla a 70-80 voltios durante 10 min sólo con tampón MOPS (1x) para facilitar la entrada del ARN a través de la matriz de agarosa.

- A continuación, se preparan las muestras de ARN con una composición de formaldehído al 6%; formamida al 50% y MOPS (10x) al 1% en H₂O MilliQ estéril y libre de ARNasas. Se incuban a 65°C un tiempo de 10 min y se enfrían rápidamente en hielo durante 3 minutos, para deshacer las estructuras secundarias del ARN y que de este modo la migración electroforética dependa sólo del tamaño de la molécula de ARN linealizada. Finalmente se añade 1/10 de volumen de tampón de carga ⁽⁴⁰⁾ y se carga el gel. La electroforesis se desarrolla a 80 voltios durante 4-5 horas.

- La cantidad de ARN cargada en el gel debe ser la misma en todas las muestras para que a posteriori los resultados puedan ser comparables entre sí. Dicha cantidad estará entre 15 y 30 µg.

2. Transferencia de ARN por capilaridad:

- Concluida la electroforesis en condiciones desnaturalizantes, se lava el gel con agua destilada durante 5 min y luego con SSC (20x) durante 1 h con agitación moderada. Estos lavados sirven para limpiar el gel de tampón de electroforesis y de restos de componentes no deseados presentes en las muestras.

- Se prepara el sistema de transferencia por capilaridad: papeles de filtro en gran cantidad y 4 papeles Whatman 3MM de la medida del gel. Igualmente se corta la membrana de nitrocelulosa Hybond-N+ (Amersham Bioscience) donde se va a transferir el ARN, con un perímetro 1 cm superior al del gel.

- A continuación, se coloca, en una bandeja, un taco de 8-10 cm de alto de papeles de filtro y sobre ellos 2 papeles Whatman 3MM humedecidos en SSC (20x). Posteriormente se coloca el gel en el que se desarrollaron las muestras de ARN, la membrana previamente equilibrada con agua y SSC (20x) y otros dos papeles Whatman 3MM humedecidos en SSC (20x), por este orden. Por último, se coloca otro taco (30-35 cm) de papeles de filtro y un peso adicional (1-2 kg). Se añade solución SSC (20x) a la bandeja hasta empapar la torre inferior de papeles de filtro por debajo del gel. La transferencia del ARN del gel al filtro se lleva a cabo durante 12 h. La solución SSC (20x) irá ascendiendo por capilaridad y transfiriendo el ARN que se encuentra en el gel a la membrana de nitrocelulosa.

- Transcurridas las 12 horas, se desmonta el sistema de transferencia. Se espera hasta que la membrana esté seca y luego se fija el ARN mediante luz ultravioleta en el Stratalinker. La membrana fijada se puede conservar protegida con papel Whatman y papel de aluminio a 4°C o utilizarse directamente para hacer la hibridación.

3. Hibridación del ARN y detección inmunológica:

El protocolo seguido es exactamente el mismo que el descrito para la técnica del Southern Blot en los apartados: 16.5, 16.6 y 16.7.

⁽³⁹⁾ **MOPS (10x):** Ácido 3-(N-morfolino) propano-sulfónico 0,2 M; acetato sódico 0,05 M; EDTA 0,01 M; pH 7,0 ajustando con NaOH 10M. ⁽⁴⁰⁾ **Tampón de carga para ARN(6x):** Azul de bromofenol 4%, xileno cianol 4%, EDTA 1 mM, glicerol 50%.

17.3. PCR EN TIEMPO REAL A PARTIR DE ADNc

a) EXTRACCIÓN DE ARN

El ARN total se obtuvo a partir de cultivos líquidos en medio PR de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 cepas A78 y B13. Se realizaron cultivos de 24, 48 y 72h. Para la extracción de ARN se utilizaron columnas *RNeasy Mini Kit* (Qiagen Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN total (20µg) se trató en primer lugar con DNasa libre de

RNasa *RQ1* (Promega Corporation, EE.UU.), seguido de un segundo tratamiento con DNasa (Qiagen) para eliminar el ADN contaminante, siguiendo las indicaciones de los fabricantes. Para la cuantificación del RNA se utilizó un espectrofotómetro *NanoDrop ND-1000* (Thermo Fisher Scientific Inc, EE.UU.). La calidad de la muestra fue evaluada mediante un *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies, EE.UU) utilizando los chips incluidos en el kit *RNA 6000 Nano LabChip* (Agilent).

b) ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *faeA* y *faeB* MEDIANTE RT-qPCR

El ADNc utilizado para el análisis de la expresión genética mediante PCR en tiempo real (qPCR), se obtuvo mediante transcripción inversa de 2,5 µg de ARNm utilizando el kit *SuperScriptTM III* transcriptasa reversa (Invitrogen) y siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Las reacciones de qPCR se realizaron usando 20 µl de SYBR[®] *Premix Ex TaqTM* (TaKaRa), 0,2-0,3 µM de cada oligo mostrado en la Tabla 3 y ADNc diluido 1:2 como patrón. La reacción se llevó a cabo en un equipo de PCR *StepOnePlus Real Time PCR* (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: 10 min a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 34 segundos a 62°C.

Los oligonucleótidos fueron diseñados para generar productos de PCR cercanos al extremo 5' del ARNm, usando el programa informático PRIMER3 (Rozen y Skaletsky, 2000). La fluorescencia verde SYBR se normalizó con fluorescencia ROX. La línea base y el umbral se determinaron usando el programa informático *StepOnePlus*. Las reacciones se realizaron usando dos replicas biológicas y tres réplicas técnicas. Se incluyó un control negativo (ARN patrón) para verificar la ausencia de contaminación por ADN genómico en las muestras de ARN.

En cada ensayo se realizó una curva de fusión manteniendo la muestra a 60°C durante 60s, seguido de una rampa lenta de la temperatura a 95°C, con el fin de evaluar la especificidad de reacción y excluir la formación de dímeros de oligonucleótidos. Los datos resultantes se analizaron utilizando el método Pfaffl (Pfaffl, 2001), usando el gen constitutivo *act* para la normalización de los resultados. Para calcular la eficiencia del cebador (E) se utilizaron diluciones estándar 5x de ADN genómico que variaron de 0,013 a 40 ng (n = 6 con tres repeticiones para cada dilución). La E se calculó de acuerdo con la ecuación $E = 10^{-1 / \text{pendiente}}$ (Rasmussen, 2000), con un coeficiente de determinación $R^2 > 0,99$.

18. Valoración cualitativa de actividad feruloil esterasa: bioensayo

Para seleccionar aquellas cepas con mayor actividad FAE, se empleó la técnica del bioensayo en taco, un método rápido y sensible inicialmente descrito por (Donaghy y McKay, 1994). Se siguió el siguiente procedimiento:

1. Sembrar en masa las cepas de *P. chrysogenum* a bioensayar en medio PW2 e incubarlas 5 días a 28°C.

2. Extraer un taco del medio de cultivo sembrado con ayuda de un sacabocados de 6 mm de diámetro y depositarlo en una placa de Petri de 20x20 cm de diámetro con medio EF (ver apartado 4.2). Como control se utiliza un medio compuesto de agar y etanol al 90%, en la misma cantidad que EF. Las placas se incuban a 28°C durante 12 días. Todos los ensayos se realizan por triplicado.

3. Las enzimas FAE rompen el enlace éster del EF produciendo dos compuestos, el AF y etanol. La rotura del enlace éster por parte de la enzima se detecta por un halo de hidrólisis alrededor del taco. Con la ayuda de un indicador de pH como es el verde de Bromocresol ⁽⁴¹⁾ (Panreac), se puede comprobar que en las zonas (halo) donde se ha producido AF se observa una coloración amarilla debido a la acidificación del medio.

4. La actividad FAE se analizó mediante la potencia de hidrólisis, usando la siguiente fórmula (Pérez Morales, 2008), donde se tuvieron en cuenta las tres réplicas de cada experimento:

$$\text{Potencia de hidrólisis} = \sum \frac{\varnothing \text{ taco} + \varnothing \text{ halo}}{\varnothing \text{taco}}$$

⁽⁴¹⁾ Verde de bromocresol se prepara al 0,04% disolviendo 40 mg de verde de bromocresol en 5 mL de etanol y añadiendo 95 mL de agua destilada. Ajustar pH a 4,6.

19. Cuantificación de ácido ferúlico y de ácido cafeico mediante HPLC

Para poner a punto el método de análisis del AF y AC, en primer lugar, se realiza un PDA (*Photodiode array*) de una solución de AF (Sigma-Aldrich) (Tabla 6) y de otra solución de AC (Sigma-Aldrich) determinando una absorción máxima a 324 nm en ambos casos.

La concentración de AF en el medio de cultivo se determina a 324 nm con un equipo de HPLC (Waters HPLC System) equipado con un detector de absorbancia dual 2487 y con una columna analítica de fase reversa: Mediterránea Sea18 3µm 15x0,46 (Teknokroma, Barcelona, España). Como fase móvil A se utiliza agua MilliQ con 0,01% de TFA y como fase B se utiliza metanol. El método analítico realiza un gradiente de la fase B del 40% al 90% en 15 minutos y un flujo de 0,80 (Tabla 7).

El tiempo de retención es de en torno a 9,21 min para el AF y de unos 6 min para el AC. Posteriormente se procede a elaborar dos curvas de calibrado utilizando varios niveles de concentración tanto para el AF, como para el AC al relacionar los valores del área del pico con la concentración y obteniendo una recta patrón. Se obtuvieron los datos reflejados en la Tabla 6.

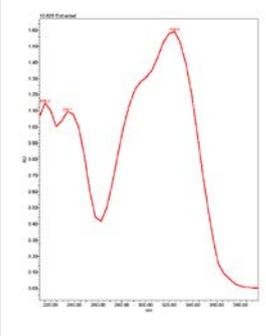
		ÁCIDO FERÚLICO	ÁCIDO CAFEICO
	Ecuación de la recta patrón	$Y = 6,095455 \cdot 10^7 X + 1,592709 \cdot 10^4$	$Y = 6,277997 \cdot 10^7 X + 5,777140 \cdot 10^5$
	R	0,999	0,9912
	R²	0,997	0,9824
	Duración del método	27 min	27 min
	Tiempo de retención	9 min	6 min
	Máximo de absorción	324 nm	324 nm

Tabla 6: PDA del ácido ferúlico. Datos de la recta patrón del calibrado de HPLC.

Tiempo	% A	% B
0	60	40
15	10	90
16	0	100
21	0	100
22	60	40
27	60	40

Tabla 7: Método cromatográfico empleado para cuantificar AF y AC en HPLC.

20. Recuperación de extractos enzimáticos

Para la obtención de un extracto enzimático a partir de un medio de cultivo líquido se sigue el protocolo descrito por Sakamoto *et al.*, 2005, incluyendo algunas modificaciones:

1. Tras la fermentación el volumen total del cultivo de los matraces, o el volumen total de las muestras, en el caso de los biorreactores, se filtra a través de una membrana de nilón estéril de 0.45 μm .
2. El volumen del líquido filtrado se transfiere a 6-8 tubos de centrifuga, BD Falcon™ de 50 mL, adicionando en cada uno 40 mL de filtrado (obteniendo un volumen total de 240 mL).
3. Se centrifuga a 4000 rpm y a una temperatura de 4°C, durante un tiempo de 10 minutos (ALLEGRA 21R Centrifuge beckman Coulter. Alemania).
4. Se recupera el sobrenadante y se realiza una segunda centrifugación en las mismas condiciones.
5. El sobrenadante se filtra mediante una bomba de vacío (Millivac vacuum Pump. Millipore. Millipore Corporation. EE.UU.), a través de una membrana de 0.22 μm de poro (Millipore Express plus. Millipore Corporation. EE.UU.).
6. Para precipitar las proteínas del filtrado, se añade de sulfato amónico, dejándolo al 80% (p/v). La mezcla se incuba en agitación a una temperatura de 4°C durante un mínimo de 12 horas. Trascurrido este tiempo, la fase líquida se distribuye en tubos GSA estériles, evitando tomar el exceso de sal, y se centrifuga durante 1 hora a 8000 rpm y a 4°C (Sorvall RC 5B Plus. Thermo Fisher Scientific. EE.UU.).
7. Tras la centrifugación, se elimina el sobrenadante, y los tubos se dejan escurrir durante 15 minutos sobre papel filtro.
8. Para recuperar el precipitado y manteniendo los tubos en hielo, se adicionan 15 mL de tampón acetato 0,02 M (ver apartado 5), y se deja disolver durante 20-30 minutos.

9. El volumen del extracto enzimático se distribuye en tubos de 2 mL (Eppendorf, Alemania) y se almacena a -20°C.

10. Estas muestras congeladas se usan para determinar la concentración total de proteínas, evaluar la actividad feruloil esterasa y realizar estudios de proteómica.

21. Determinación de la actividad FAE

Para cuantificar la actividad FAE de los extractos enzimáticos se utilizaron tanto sustratos sintéticos como naturales.

21.1. ENSAYO FRENTE A SUSTRATO SINTÉTICO METIL-4-HIDROXI-3-METOXICINAMATO (MFA):

Para realizar este ensayo de actividad enzimática se ha utilizado el protocolo descrito por (Sakamoto *et al.*, 2005):

En este tipo de ensayo de actividad enzimática se utiliza MFA (Alfa Aesar, Alemania) como sustrato de la reacción. La acción de las enzimas FAEs sobre dicho sustrato produce la liberación de AF que posteriormente es cuantificado mediante HPLC.

La reacción enzimática transcurre a una temperatura de 37°C durante 20 minutos, en un tubo de 2 mL en el que se adicionan 190 µL de la solución de MFA (preparado al 0.05%, en tampón acetato 100 mM ⁽⁴⁴⁾ y 10 µL de extracto enzimático. Transcurridos los 20 minutos, la reacción se detiene hirviendo la mezcla durante 5 minutos. Finalmente se centrifuga a 14000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se analiza mediante HPLC determinando la cantidad de AF liberado. Todos los ensayos se realizan por triplicado y con muestras control (sin extracto enzimático).

Para comprobar el efecto de la temperatura y del pH sobre la actividad enzimática de los extractos enzimáticos se realiza el mismo ensayo aplicando, en este caso, diferentes temperaturas (37, 40, 45, 50, 55 y 60°C) y diferentes pHs (3, 4, 5, 6 y 7), usando en este caso tampón citrato-fostato ⁽⁴²⁾ para ajustar el pH al valor deseado.

⁽⁴²⁾**Tampón citrato-fostato:** Solución A: Na₂HPO₄ 0,2 M. Solución B: Citrato 0,1 M. Mezclar solución A y B hasta pH deseado y volumen deseado.

21.2. ENSAYO FRENTE A LOS SUSTRATOS NATURALES DE INTERÉS: PULPA DE REMOLACHA Y MARRO DEL CAFÉ

Este tipo de ensayo se utiliza para cuantificar la actividad FAE de los extractos enzimáticos frente a los sustratos de interés: PR y marro del café. Para la reacción enzimática se

utiliza una cantidad fija de sustrato (2%), previamente esterilizado. Se pone en contacto el sustrato con la cantidad de extracto enzimático que se desea ensayar y se completa con tampón acetato 100 mM hasta 100 mL de volumen final. La mezcla de reacción se incuba durante 1-5 horas a 50°C y con una agitación de 175 rpm. Finalmente, las muestras se hierven durante 5 min para inactivar la actividad enzimática, se centrifugan otros 5 min a 14000 rpm y el sobrenadante se analiza mediante HPLC determinando la cantidad de AC y/o AF liberado. Para la PR se cuantifica la liberación de AF y en caso del MC, también la liberación de AC. Todos los ensayos se realizan por triplicado y con muestras control (sin extracto enzimático).

22. Fermentación a escala piloto en biorreactores

El proceso de escalado a Planta Piloto se ha llevado a cabo en dos etapas, en un primer lugar escalando a un biorreactor con capacidad para 5L y en una segunda etapa a un biorreactor de 20L. Dichos equipos son: Braun Biostat® B (5 litros) y un fermentador Braun Biostat® C (20 Litros). Estos fermentadores permiten controlar el pH, el flujo de aire estéril que entra en el biorreactor, la agitación y la temperatura durante el proceso fermentativo. Las medidas de oxígeno disuelto en el medio (OD) se realizaron mediante un electrodo (Braun Biostat pO₂ probe) que se encuentra integrado en el biorreactor.

Los microorganismos se crecieron inicialmente en placas de medio PW2 durante 5 días, de ahí, se inocularon las esporas producidas en varios matraces de 500 mL con 100 mL de medio MPPY cada uno. Se incubaron durante 24h a 28°C y 250 rpm. Pasado este tiempo, estos matraces se utilizaron como inóculo de los biorreactores de 5 y 20L a razón de un 10% de inóculo respecto del volumen de trabajo inicial del biorreactor.

Se ensayaron fermentaciones con tiempos de duración y condiciones de aireación, agitación, pH y T^a variables. Se cogieron muestras a diversos tiempos (24, 48, 72 y 92h). De las muestras, por un lado, se analizó el peso seco (biomasa) y por otro lado se precipitó la proteína total con sulfato amónico según lo indicado en el apartado 20 y se cuantificó por el método Bradford (apartado 23.2). A todos los extractos obtenidos se les cuantificó la actividad FAE, mediante la liberación de AF (ver apartados 19 y 21).

23. Análisis proteómico de los extractos enzimáticos producidos por *P. chrysogenum*

El análisis de las proteínas de un organismo es un proceso complejo que requiere de varios pasos. En primer lugar, se realiza la obtención de las proteínas en las condiciones biológicas que se quieren analizar, puesto que el proteoma de un organismo depende de las condiciones de cultivo y del estado celular, entre otros factores.

Posteriormente, la muestra proteica se limpia de las impurezas que pueda contener y que puedan interferir en la siguiente etapa. Las proteínas, una vez cuantificadas, se pueden desarrollar en geles monodimensionales o bidimensionales de poliacrilamida, estos geles se tiñen para visualizar los puntos de proteínas y de ellos se extraen las proteínas de interés.

Existen varios métodos descritos para la detección de proteínas a partir de geles de poliacrilamida. En todos los métodos es deseable que se cumplan una serie de características: alta sensibilidad, amplio rango lineal para la cuantificación, compatibles con espectrometría de masas, baja toxicidad y seguros para el medio ambiente. Algunos de los métodos más utilizados son: *Difference Gel Electrophoresis* (DIGE), tinción de plata, tinción de Coomassie o de Coomassie coloidal, tinción negativa de Zinc-Imidazol, marcaje fluorescente y tinción fluorescente. Todos poseen diferentes sensibilidades, ventajas y desventajas.

En este trabajo se optó por el uso de la tinción DIGE como método principal para el análisis proteico, motivado por su alta sensibilidad y la cantidad de información que brinda. Dentro de los métodos no radiactivos es el método más sensible, estando su límite de detección por debajo de los 125 pg de proteína. Su mayor inconveniente es de tipo económico, debido al elevado coste del equipamiento necesario para su utilización. Además, en este trabajo se utilizó la tinción de Coomassie coloidal para teñir los geles desde los que se picaron los puntos de las proteínas seleccionadas para su identificación. La tinción de Coomassie es aproximadamente 50 ó 100 veces menos sensible que la tinción de plata, pero es un método relativamente simple, más cuantitativo y lineal que la tinción de plata. Además, al incorporar Coomassie coloidal se incrementa la sensibilidad del método, quedando el límite de detección por debajo de 100 ng de proteína/punto.

Una vez obtenidos los puntos proteicos de proteínas que se quieren identificar, el siguiente paso es digerirlas con tripsina y finalmente se procede a su identificación mediante su huella peptídica por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF. Estos pasos se describen en detalle en los siguientes apartados.

Durante todo el proceso de manipulación de proteínas es muy importante utilizar guantes para evitar cualquier contaminación de las muestras con proteínas humanas, en especial la

queratina, así como mantener una limpieza escrupulosa de todos los materiales empleados, eliminando sales, detergentes o compuestos orgánicos que puedan afectar al correcto desarrollo del proceso.

23.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

La preparación de las muestras de proteínas se realizó según el procedimiento descrito por Fernández-Acero *et al.*, (2006), incluyendo las modificaciones realizadas por (Jami *et al.*, 2010b):

1. Se obtienen los extractos proteicos que se quieren analizar mediante fermentación (ver apartado 20 de Materiales y Métodos) y se filtran para eliminar impurezas.
2. Se precipitan las proteínas del extracto con sulfato amónico al 80% y se resuspenden en tampón acetato 20 mM, pH=5.
3. Se precipitan las proteínas añadiendo por cada mL de muestra 1 mL de solución TCA al 20% y DTT (ditiotreitól) al 0,14% en tubos de 50 mL. Se incuban durante al menos 30 min a -20°C.
4. Se centrifugan 10 min a 4400 rpm y 4°C. Se elimina el sobrenadante con cuidado de no perder el precipitado.
5. Se lavan dos veces con una solución de acetona y DTT al 0,7%. Se utiliza igual volumen que el usado para precipitar. Se homogeniza mediante agitación y se recoge el precipitado por centrifugación (10 min a 4400 rpm y 4°C).
6. Se elimina el sobrenadante y se añaden 10 mL de acetona al 80% para eliminar los restos de TCA. Se homogeniza bien y se pasa a un tubo de 10 mL.
7. Se centrifuga 10 min a 4400 rpm y 4°C para eliminar el sobrenadante. Se eliminan los restos de acetona con una micropipeta y se seca ligeramente (2-5 minutos). Se resuspende el precipitado en 100-300 µl de tampón de rehidratación ⁽⁴³⁾.
8. Se agita entre 1-2 horas hasta que se resuspende completamente y se centrifuga 1 min para recoger el sobrenadante.
9. Finalmente se cuantifican las proteínas totales mediante el método de Bradford (ver apartado 23.2 de Materiales y Métodos) y la muestra se conserva a -80°C hasta su uso.

⁽⁴³⁾ **Tampón de rehidratación:** 8 M urea; 2% CHAPS; 0,002% azul de bromofenol, suplementado al momento con: 60 mM DTT; 0,5% IGP Buffer 3-11 NL (GE Healthcare).

23.2. MÉTODO BRADFORD PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

La cuantificación de la concentración de proteínas se lleva a cabo mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Para ello se utiliza el compuesto *Bio-Rad Dye Reagent* (BioRad) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ensayo se basa en el cambio de absorción de 465 nm a 595 nm del azul de Coomassie al reaccionar con proteínas. La concentración de la muestra problema se determina frente a una recta patrón realizada con seroalbúmina bovina (BSA) (MBI Fermentas), diluida en agua (ver apartado 5 de Materiales y Métodos). Para ello se prepara una solución maestra de proteínas con una concentración de 1 mg/mL, a partir de la cual se obtienen

las concentraciones de referencia para la recta patrón que a continuación se especifican en la Tabla 8:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
µl BSA	0	2	5	10	15	20	25	30	35	40
µl H ₂ O	800	798	795	790	785	780	775	770	765	760
[BSA] µg	0	0,5	1,25	2,5	3,75	5	6,25	7,5	8,75	10

Tabla 8: Recta patrón para el calibrado del método Bradford. Composición de los puntos de calibrado (1-10) de la recta patrón y concentraciones finales de BSA en de cada uno de los viales.

Realizadas las diluciones, se añaden 200 µl de reactivo de Bradford (*Bio-Rad Dye Reagent*) por dilución, se mezcla y se deja reposar un mínimo de 5 min en oscuridad. Las diluciones se analizan por espectrofotometría a una longitud de onda de 595 nm para obtener una recta patrón.

Por otro lado, se realizan diluciones 1:2000 de cada una de las muestras problema, se procesan del mismo modo y se calcula la concentración de proteínas por comparación con la recta patrón.

23.3. ANÁLISIS MONODIMENSIONAL DE PROTEÍNAS

El análisis monodimensional de proteínas se realiza mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE, de las siglas en inglés *Sodic Dodedylsulphate-Polyacrylamidae Gel Electrophoresis*). Los geles de poliacrilamida monodimensionales utilizados constan de dos fases que difieren en porosidad, pH y fuerza iónica, así como en su función. La fase superior se denomina concentradora (Tabla 9) y sirve para concentrar la muestra en el límite de separación de ambas fases y así permitir la entrada homogénea de las proteínas en la siguiente fase del gel y la fase inferior se denomina separadora (Tabla 10), puesto que en ella se realiza la separación de las proteínas según su masa molecular. En las tablas se indican las cantidades necesarias para 10 mL de volumen final y diferentes porcentajes de acrilamida/bis-acrilamida.

Componente	Volumen
Acrilamida/bis-acrilamida 30%	1,3 mL
Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	2,5 mL
SDS 20% (p/v)	50 µl
Persulfato amónico 10% (p/v)	50 µl
TEMED (N, N, N', N'-Tetrametiletilendiamina)	10 µl
Agua Milli-Q	6,09 mL

Tabla 9: Composición de la parte concentradora de los geles desnaturizantes de proteínas.

5. Colocar el peine para formar los pocillos entre los dos cristales y añadir el gel concentrador, dejándolo polimerizar durante 15 min.
6. Diluir las muestras con al menos 2 volúmenes de tampón de muestra desnaturante ⁽⁴⁵⁾ y hervirlas durante 5 min.
7. Colocar los geles dentro de la cámara de electroforesis y llenarla con tampón de electroforesis ⁽⁴⁶⁾. Cargar las muestras en los pocillos.
8. Realizar la electroforesis a 100-150 V hasta que la banda correspondiente al colorante del tampón de muestra desnaturante comience a salir del gel.
9. Retirar los geles de la cubeta. Fijarla durante 30 min en solución fijadora ⁽⁴⁷⁾ con agitación. Teñirlos con solución de t eñido ⁽⁴⁸⁾ toda la noche.
10. Eliminar la solución de t eñido y hacer lavados de 15 a 30 min con agua Milli-Q hasta que desaparezca el color de fondo.

⁽⁴⁵⁾ **Tampón de muestra desnaturante:** 350 mM Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; SDS 10% (v/v); glicerol 30% (v/v); Azul de bromofenol 0,02% y DTT 0,6 M. ⁽⁴⁶⁾ **Tampón de electroforesis:** 3 g de Tris-base (20mM); 14 g de glicina (186mM) y 5 mL de SDS 20% (0,1%); completar con agua hasta 1 litro. Comprobar que el pH sea de 8,3 ($\pm 0,2$). ⁽⁴⁷⁾ **Solución fijadora:** 7% (v/v) ácido acético glacial; 7% (v/v) metanol; en agua milli-Q. ⁽⁴⁸⁾ **Solución de t eñido Coomassie coloidal (Blue-Silver):** 10% (v/v) ácido fosfórico; 10% sulfato de amonio; 0,12% Coomassie Blue G-250; 20% metanol anhidro.

23.4. ANÁLISIS BIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS

La electroforesis bidimensional (2D) es un método que permite el análisis de mezclas complejas de proteínas basándose en dos propiedades distintas de las mismas: el punto isoeléctrico y el peso molecular. Fue utilizada por primera vez por O'Farrell (1975) y Klose (1975). Este método se desarrolla en dos pasos: la primera dimensión o isoelectroenfoque (IEF) separa las proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico (pI) y la segunda dimensión (SDS-PAGE) separa las proteínas en función de su masa molecular. La electroforesis bidimensional permite la separación de cientos o miles de proteínas (puntos o *spots*) en un único gel de poliacrilamida.

- PRIMERA DIMENSIÓN O ISOELECTROENFOQUE (IEF):

El isoelectroenfoque (IEF, de sus siglas en inglés *Isoelectric Focusing*) es un método electroforético que separa las proteínas según sus puntos isoeléctricos (pI). Las proteínas son moléculas anfóteras, que pueden presentar carga neta positiva, negativa o neutra, dependiendo del pH del medio. La carga neta de una proteína es la suma de todas las cargas negativas y positivas de las cadenas laterales de sus aminoácidos y de los grupos amino y carboxil terminales. El pI de una proteína es el pH al cual las cargas positivas de las proteínas (debidas a los aminoácidos lisina y arginina), se igualan a las cargas negativas (debidas a los aminoácidos aspártico y glutámico) y la carga total de la proteína es "0" (neutra). Las proteínas están cargadas positivamente a pH inferior a su pI y negativamente cargadas a pH superior a su pI.

La presencia de gradientes de pH es crítica en la técnica de IEF. En un gradiente de pH y bajo la influencia de un campo eléctrico, una proteína se va a mover a la posición del gradiente donde su carga neta sea cero. Una proteína con una carga neta positiva va a migrar hacia el

cátodo, disminuyendo progresivamente su carga positiva mientras migra en el gradiente de pH, hasta que alcanza su pI. Una proteína con una carga neta negativa va a migrar hacia el ánodo, disminuyendo progresivamente su carga negativa hasta que su carga neta sea cero (pI). Si una proteína se mueve de su pI, inmediatamente va a ganar carga y volverá a migrar hacia su pI. Esta técnica permite separar proteínas en base a diferencias de carga muy pequeñas. Si se desarrolla bajo condiciones desnaturalizantes de proteínas se obtiene una mayor resolución y resultados más afinados (*2-D Electrophoresis using immobilized gradients. Principles and Methods*. DE Healthcare).

En este trabajo se utilizó, como sistema de separación de proteínas, el *IPGphor Isoelectric Focusing System* (GE Healthcare) y como rango de pH se utilizaron tiras de 18 cm con gradientes de pH inmovilizados de 3,0 a 10,0 NL (no lineal) o de 4,0 a 7,0 NL. Desarrollo del protocolo:

1. Para tiras de 18 cm, se pone en un microtubo de 1,5 mL: 350-400 µg de la mezcla de proteínas a analizar, 0,5-1% de IPG-buffer⁽⁴⁹⁾ 3-11 NL y 20-60 mM de 2,5 M DTT (1,4-ditiotreitól). Se completa con tampón de rehidratación⁽⁵⁰⁾ hasta 350 µl. Se mezcla y se le da un pulso de centrifuga.
2. Se depositan los 350 µl de la mezcla anterior en un sarcófago (*Holder*) para tiras de 18 cm del sistema IPGphor Isoelectric Focusing System I ó II (GE Healthcare).
3. A continuación se retira el plástico de protección de la tira con gradiente de pH inmovilizado y se coloca en el sarcófago con el gel desecado en contacto con las proteínas. Es importante evitar la formación de burbujas.
4. Se cubre con 2-2,5 mL de *DryStrips Cover Fluid* (GE Healthcare).
5. Finalmente se inicia el programa de isoelectroenfoque (IEF) (con un máximo de 75 µA/tira y 20°C) consistente en: 1 h a 0 V; 12 h a 30 V (rehidratación); 2 h a 60 V; 1 h a 500 V; 1 h a 1000 V, para terminar por subir en gradiente durante media hora hasta 8.000 V y aproximadamente 7 h a 8.000 V hasta llegar a los 50 kV-h (Kilo voltios hora).
6. Una vez terminado se retiran las tiras y se continúa con la fase de equilibrado (ver apartado siguiente), si se va a realizar la segunda dimensión (SDS-PAGE) o bien congela a -80°C, para continuar en otro momento.

⁽⁴⁹⁾**IPG-buffer o Pharmalite** (Amersham Biosciences): mezcla comercial de anfolitos que potencian la migración de las proteínas y producen una conductividad uniforme a través del gradiente de pH de la tira. ⁽⁵⁰⁾**Tampón de rehidratación**: 8 M Urea; 2% (p/v) CHAPS (3-[[3-colamidopropil] dimetilamonio]-1-propanosulfonato); 0,01% azul de bromofenol. Filtrar con filtros de 0,45 µm (Millipore). Conservar congelado a -20°C.

- SEGUNDA DIMENSIÓN (SDS-PAGE):

El SDS-PAGE es un método electroforético que sirve para separar polipéptidos de acuerdo a su peso molecular. El SDS es un detergente que posee carga negativa y es capaz de rodear completamente una proteína enmascarando su carga, y confiriendo a los complejos SDS-proteína carga neta negativa, lo que permite que las proteínas tengan una idéntica relación de masa/carga y similar forma. Además, las muestras son tratadas con DTT, agente reductor que rompe los puentes disulfuro que unen las subunidades de las proteínas, formando monómeros. La combinación de SDS y DTT hace que la migración electroforética de las proteínas en geles de

poliacrilamida depende casi exclusivamente de su peso molecular. Las proteínas sufren un segundo tratamiento con iodoacetamida antes de la segunda dimensión, lo que previene la reoxidación durante la electroforesis evitando así la formación de artefactos. El protocolo llevado a cabo se describe a continuación:

1. Se prepara la mezcla para el gel (SDS-PAGE) según lo indicado en la Tabla 11 excepto el persulfato amónico.

Componentes	12,5% poliacrilamida
Acrilamida/bis-acrilamida 30% ^(a)	166,8 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	100 mL
SDS 20% (p/v) ^(b)	4 mL
Persulfato amónico 10% (p/v)	2 mL
TEMED	132 µl
Agua Milli-Q	129,2 mL

Tabla 11: Composición de geles desnaturantes de proteínas^(c). Segunda dimensión

Notas: ^(a) Debido a los grandes volúmenes que se utilizan de la mezcla acrilamida/bis-acrilamida y a la pureza necesaria para los geles bidimensionales, ésta se adquiere de forma comercial (National Diagnostics). ^(b) Filtrar con filtros de 0,45 µm (Millipore). ^(c) Se indican las cantidades para 6 geles (400 mL) del sistema Ettan DALT Six (GE Healthcare).

2. Se dDesgasifica la mezcla en un Kitasato conectado a una bomba de vacío durante unos 10 min.

3. Se montan los cristales del sistema Ettan DALT Six (GE Healthcare) para la polimerización de los geles según las indicaciones del fabricante. El grosor de los geles utilizados fue de 1 mm.

4. Se añade el persulfato amónico a la mezcla y agitar unos segundos. Se dispensa la mezcla entre los cristales hasta la altura deseada. Se cubre inmediatamente la mezcla con 2-propanol y se deja polimerizar durante toda la noche.

5. Se elimina el 2-propanol, se lava con agua Milli-Q el frente del gel y se rellena con tampón de electroforesis a 1x ⁽⁵¹⁾. Si no se van a utilizar de inmediato, se pueden conservar a 4°C durante 2 días cubriendo el frente con tampón de electroforesis 1x.

6. Se equilibran las tiras en 2 pasos de 15 min con tampón de equilibrado ⁽⁵²⁾. Primero: tampón de equilibrado suplementado con DTT 1% (p/v). Segundo: tampón de equilibrado suplementado con iodoacetamida 4% (p/v). Se utilizan 5 mL de tampón por cada tira de 18 cm. Mantener las tiras en el tampón con agitación constante.

7. Se lavan las tiras con agua Milli-Q y se depositan sobre un papel Whatman 3MM.

8. Se eliminan 0,5 cm de los extremos de cada tira y se introducen las tiras con las proteínas inmovilizadas entre los cristales. Si se desea utilizar marcador de peso molecular, dispensar 5 µl de marcador de peso molecular preteñido ⁽⁵³⁾ (4-5 µl por gel) en un trozo de papel Whatman 3MM de 10-15 mm x 2 mm inmediatamente antes de iniciar la carrera.

9. Se introducen los geles en la cámara de electroforesis y añadir 1,5 L de tampón de electroforesis 2x en la cámara superior del sistema. En la cámara inferior se utilizan 5 L de tampón de electroforesis 1x.

10. Se realiza la separación de las proteínas en las siguientes condiciones: 25°C, 3-5 W por gel durante 45 min, 15-20 W por gel (180 W máximo) durante 3,5-4 horas.

⁽⁵¹⁾ **Tampón de electroforesis 10x:** 250 mM Tris-HCl, pH 8,3; 1,92 M glicina; 1% (p/v) SDS; agua hasta 1 litro. Almacenar a temperatura ambiente. ⁽⁵²⁾ **Tampón de equilibrado:** urea 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (p/v), Tris-HCl 50 mM pH 8,8, azul de bromofenol 0,002%. Filtrar con filtros de 0,45 µm (Millipore). Conservar a temperatura ambiente. ⁽⁵³⁾ **Precision Plus Protein Standards** (BioRad): marcador comercial preteñido con bandas entre 200 y 10 kDa.

23.5. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS

23.5.1. TINCIÓN POR EL MÉTODO DE AZUL DE COOMASSIE COLOIDAL:

Los geles se tiñeron con una solución de tinte basada en el colorante azul de Coomassie coloidal. El azul de Coomassie coloidal (en inglés, *Colloidal Coomassie blue*) es un colorante derivado del trifenilmetano y tiene la capacidad de acomplejarse con ciertos aminoácidos básicos como arginina, tirosina, lisina e histidina proporcionando una sensibilidad de detección proteica de 8-50 ng, a la vez de no producir un fondo demasiado intenso.

El método de la tinción con azul de Coomassie coloidal G-250 (Sigma) fue desarrollado por (Neuhoff *et al.*, 1988) y posteriormente mejorado por (Candiano *et al.*, 2004) para proporcionar una mayor sensibilidad y reproducibilidad. La receta mejorada incorpora un 20% más de azul de Coomassie y una mayor concentración de ácido fosfórico. El protocolo llevado a cabo se describe a continuación:

1. Una vez finalizada la electroforesis, retirar los geles de poliacrilamida de la cámara de electroforesis y extraerlos de los cristales. Eliminar los restos de poliacrilamida.
2. Situar los geles en bandejas de tinte y añadir 300 mL de la solución fijadora ⁽⁵⁴⁾. Mantener en agitación durante 30 min.
3. Eliminar la solución fijadora y hacer tres lavados de 10 min con agua destilada.
4. Quitar el agua y añadir 300 mL de solución de tinte ⁽⁵⁵⁾. Incubar durante toda la noche en agitación.
5. Retirar la solución de tinte que contiene el azul de Coomassie y hacer lavados de 30 min con agua Milli-Q para eliminar el exceso de colorante.

⁽⁵⁴⁾ Solución fijadora: 7%(v/v) ácido acético glacial; 7%(v/v) metanol; en agua Milli-Q. ⁽⁵⁵⁾ Solución de tinte: 10% (v/v) ácido fosfórico; 10% sulfato de amonio; 0,12% Coomassie Blue G-250; 20% metanol anhidro.

23.5.2. TINCIÓN 2D- DIGE:

La técnica de tinción 2-D DIGE, de sus siglas en inglés *Difference Gel Electrophoresis*, es un método que se basa en la tinción diferencial de las proteínas previamente a su separación por electroforesis. Permite identificar diferencias en la expresión de proteínas en distintas muestras.

Utiliza tres tipos diferentes de fluorocromos de cianina en función de sus espectros de excitación y emisión; Cy2 (488/520 nm, amarillo), Cy3 (532/580 nm, rojo) y Cy5 (633/670, azul) (*CyDye™ DIGE Dyes*, GE Healthcare), cuyas principales características son:

- Tienen la misma carga y el mismo tamaño, de modo que la misma proteína marcada con los diferentes fluorocromos va a migrar a la misma posición, independientemente del fluorocromo empleado en su tinción.
- No afectan al pH de la muestra y por lo tanto no alteran el isoelectroenfoque.
- Cada fluorocromo emite una señal espectral diferente y diferenciable del resto.

- Señal fotoestable a lo largo del proceso y altamente sensible y brillante.

Estos fluorocromos contienen un grupo reactivo N-hidroxisuccinimidil-éster (NHS-éster) que forma un enlace covalente con los grupos épsilon-amino de los residuos de lisina formando un enlace amida. Los fluorocromos reemplazan la carga positiva de la lisina por otra carga positiva, de este modo no se ve alterado el pI de la proteína marcada. Añaden aproximadamente 500 Da a la masa molecular de las proteínas. En estas condiciones se marcan únicamente el 1-2% de los residuos de lisina presentes en una proteína y aproximadamente el 98% de las proteínas permanecen sin marcar. Con el fin de asegurar la extracción de una cantidad suficiente de proteína para la identificación por espectrometría de masas, la extracción se realiza a partir de geles preparativos teñidos con azul de Coomassie.

Esta técnica se caracteriza por el empleo de un estándar interno formado por la mezcla, a partes iguales, de las muestras a analizar. Este patrón interno se incluye en cada uno de los geles del experimento junto con muestras a comparar y permitirá la estandarización de los resultados obtenidos (Alban *et al.*, 2003).

El protocolo seguido se detalla a continuación (Martínez-Gomariz *et al.*, 2009):

1. Limpiar la muestra de posibles compuestos alterantes usando el kit comercial *Clean Up Kit* (GE Healthcare). Seguir el procedimiento indicado por el fabricante.
2. Resuspender las proteínas en tampón RB2⁽⁵⁶⁾.
3. Ajustar a pH 8,5 con NaOH (100 mM) utilizando papel indicador de pH.
4. Mantener a temperatura ambiente los colorantes (Cy) al menos durante 5 min para que se atemperen y no se hidraten al abrirse.
5. Marcar, de cada muestra, 50 µg con Cy3 ó Cy5 y 25 µg con Cy2 (control interno), usando 400 pmol/µL de colorante por cada 50 µg de muestra. Incubar durante 30 min en hielo y oscuridad.
6. Preparar una solución maestra añadiendo 5 µl de dimetilformamida a una concentración de 5 nM de colorante quedando finalmente a una concentración de 1 nM. Esta solución se puede almacenar hasta 3 meses.
7. Preparar la solución de trabajo a 400 pM, 2 partes de solución maestra en 3 partes de dimetilformamida.
8. Añadir 50 µg (5-10 µg/µl) de muestra en un micro tubo de 1,5 mL. Adicionar 1 µl del colorante (solución de trabajo). Mezclar en vortex y centrifugar. Incubar en oscuridad durante 30 min y en hielo.
9. Parar el proceso de tinción añadiendo 1 µl de lisina 10 mM. Incubar 10 min en hielo y en ausencia de luz.
10. Combinar las muestras que se desarrollarán en un mismo gel en un microtubo y completar el volumen hasta 350 µl con tampón RB⁽⁵⁷⁾ suplementado con IPG buffer 0,5% y DTT 60 mM.
11. Finalmente se realiza el isoelectroenfoque y los demás pasos del análisis bidimensional.

⁽⁵⁶⁾**Tampón RB2:** Urea 8 M; CHAPS 4% (p/v) y Tris 30 mM (añadir inmediatamente antes de su uso) ⁽⁵⁷⁾ **Tampón RB:** Urea 8M; CHAPS 2% (p/v); 0,01% azul de bromofenol.

23.6. ANALISIS DIFERENCIAL DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

Para capturar la imagen de los geles bidimensionales de proteínas marcadas con fluoróforos se empleó el escáner *Ettan™ DIGE Imager* (GE Healthcare) con filtros *CyDye* usando un tamaño de píxel de 100 μm . Para analizar las imágenes generadas por el escáner se usó el software *DeCyder™ differential analysis* v 7.0 (GE Healthcare), el cual utiliza un algoritmo de detección que permite la detección automática, la eliminación del ruido de fondo, la cuantificación, la normalización y la comparación inter-geles de las imágenes de fluorescencia. El uso de un estándar interno proporciona la seguridad de que los resultados reflejan las variaciones biológicas y que no son debidas a variaciones en el sistema.

El módulo DIA (*Differential In-gel Analysis*) sirve para la detección y cuantificación de puntos de proteínas en un grupo de imágenes procedentes del mismo gel. Se utiliza para asignar límites y calcular parámetros tales como los volúmenes de los puntos normalizados. La variabilidad inter-gel se corrigió por comparación y normalización con los mapas de puntos del patrón interno usando el módulo BVA (*Biological Variance Analysis*). El gel con el patrón interno con el mayor número de puntos se utilizó como gel de referencia. Entre todos los grupos de geles se realizaron cálculos estadísticos como: la media, la t-Student (en inglés *t-test*) para datos independientes y el análisis de varianza o ANOVA (*ANalysis Of VAriance*, según terminología inglesa). Con el fin de reducir falsos positivos, se utilizó el módulo FDR (*False Discovery Rate*) (Bland y Altman 1995). Los puntos de proteínas presentes en al menos el 70% de los geles con 1,5 veces de variación y valores de p inferiores a 0,05 se consideraron como diferencialmente expresados con significación estadística. El análisis multivariable se realizó utilizando el módulo de EDA (*Extended Data Analyses*). Las proteínas presentes en el 70% de los mapas de puntos con una variación en abundancia de 1,5 veces o más (ANOVA $p < 0,05$) fueron utilizados como un subconjunto para este análisis.

Se consideró que existía una expresión diferencial de proteínas entre cepas cuando el ratio del volumen relativo de un punto de proteína concreto era mayor de 1.5 y el valor de p inferior a 0,05.

23.7. DIGESTIÓN TRÍPTICA DE PROTEÍNAS

Los puntos proteicos visualizados en los geles teñidos con azul de Coomassie que resultan de interés se extraen del gel por escisión y se procede a su digestión con tripsina.

La tripsina es una enzima que hidroliza los enlaces peptídicos de las proteínas formando péptidos de menor tamaño y aminoácidos. La tripsina es una enzima muy específica que siempre corta la cadena polipeptídica después de un residuo de lisina o arginina (aminoácidos básicos con carga positiva) y siempre y cuando no haya una prolina después. Esta hidrólisis genera una serie de péptidos que son característicos de cada proteína y que se denominan huella peptídica. Gracias a ésta huella peptídica característica se pueden identificar las proteínas mediante espectrometría de masas.

Se siguió el siguiente protocolo descrito por Havlis *et al.*, 2003 para la digestión triptica de proteínas extraídas de geles de poliacrilamida:

1. Cortar los puntos de proteínas con una punta de pipeta recortada y depositar cada una de ellas en un microtubo de 1,5 mL.
2. Añadir agua destilada hasta que cubra el punto y evite su deshidratación. Guardar a 4°C hasta el procesamiento de las muestras.
3. Realizar 2 lavados con agua destilada durante 10 min. Los lavados se realizan a 25°C y en agitación (1400 rpm).
4. Deshidratar los puntos añadiendo 50 µl de acetonitrilo (AcN) y esperar 5 min para que el gel se deshidrate y libere el colorante. Repetir esta operación dos veces con el fin de eliminar el Coomassie quedando el gel más o menos blanco. Entre cada deshidratación hacer un lavado con agua destilada.
5. Secar los puntos en centrifuga de vacío (Jouan RC-10).
6. Cubrir los puntos con una solución 10 mM de DTT en bicarbonato amónico 25 mM (NH₄HCO₃), incubar 30 min a 56°C con agitación de 300 rpm.
7. Retirar la solución de DTT con una micropipeta.
8. Añadir 50 µl AcN y retirar rápidamente para incubar con iodoacetamida 55 mM (10 mg/mL) en 25 mM NH₄HCO₃ durante 15 min y en oscuridad.
9. Eliminar la iodoacetamida y añadir 20 µl de AcN, se incuba durante 5 min y se retira.
10. Añadir 20 µl NH₄HCO₃ a 25 mM e incubar 5 min, tras los cuales sin retirar el sobrenadante se añade igual volumen de AcN y se incuba 15 min más.
11. Retirar el sobrenadante y secar en centrifuga de vacío.
12. Añadir 10 µl tripsina a una concentración de 12,5 ng/µl en 25 mM de NH₄HCO₃. Incubar en hielo durante 45 min para que los puntos absorban la tripsina, pero sin que esta llegue a actuar.
13. Retirar el sobrenadante y añadir NH₄HCO₃ 25 mM cubriendo completamente los puntos.
14. Incubar durante al menos 6 horas a 37°C, preferiblemente toda la noche.
15. Tras la digestión, centrifugar y recoger el sobrenadante en un nuevo microtubo.
16. Añadir un 50% AcN con 0.5% ácido trifluoroacético (TFA) y sonicar 10 min. Pasar el sobrenadante al microtubo en el que se había recogido el sobrenadante en el paso anterior.
17. Realizar otra extracción de 10 min pero sólo con AcN y depositar los sobrenadantes junto con la extracción anterior.
18. Llevar a sequedad usando la centrifuga de vacío y resuspender en 5 µl de 50% AcN con 0,1% TFA.

19. Mezclar 3 μl muestra digerida con 3 μl de la solución matriz ⁽⁵⁸⁾. Depositar 1 μl de la mezcla sobre el objetivo del MALDI-TOF/TOF sin tocarlo y dejar que la gota se seque.

20. Realizar la identificación de las proteínas por espectrometría de masas acoplada a un detector MALDI-TOF/TOF.

⁽⁵⁸⁾**Solución matriz:** saturar una solución de 50% acetonitrilo, 50% agua y 0,1 ácido trifluoroacético, con ácido α -ciano 4-hidroxicinámico.

23.8. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS ACOPLADA A UN DETECTOR MALDI-TOF

Anteriormente la identificación de proteínas se veía limitada a la secuenciación del extremo peptídico, proceso que requiere cantidades de proteína del orden de microgramos y cuyo resultado puede verse dificultado por el bloqueo de los extremos de la proteína. Actualmente, la espectrometría de masas se ha impuesto como técnica estándar para la identificación de proteínas, principalmente a través del uso del espectrómetro de masas tipo MALDI-TOF/TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Fly*).

La muestra proteica que se quiere analizar se mezcla con una matriz formada por compuestos insaturados capaces de absorber energía a la longitud de onda emitida por el láser del MALDI. El MALDI emplea un láser ultravioleta que suministra la energía capaz de ionizar un compuesto, de esta forma, la matriz absorbe la mayor parte de la energía suministrada que de otra forma, destruiría la muestra totalmente y facilita la ionización del compuesto que se desea analizar. La energía de este haz de láser en la matriz, separa los péptidos y permite que vuelen. El analizador TOF (*Time Of Flight*) (Wiley y McLaren, 1955) se basa en el hecho de que los iones acelerados por un campo eléctrico adquieren distintas velocidades según el valor de su relación masa/carga (m/z) y por lo tanto tardan distinto tiempo en recorrer una determinada distancia. La medida del tiempo de vuelo ($E_k=1/2mv^2$) permite determinar de forma muy precisa la masa de cada uno de estos iones (Fig. 17).

El patrón de masas de los péptidos trípticos es único para cada proteína. Existen bases de datos con el patrón esperado de masas de los péptidos trípticos de cada proteína. Cuatro o cinco péptidos son suficientes para identificar una proteína.

La comparación del espectro de masas obtenido para cada proteína se realiza utilizando bases de datos de secuencias conocidas como Swiss Prot (http://web.expasy.org/docs/swiss-prot_guideline.html) o nr-GenBank (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch). Para facilitar esta tarea se utilizan motores de búsqueda como MASCOT (Perkins *et al.*, 1999).

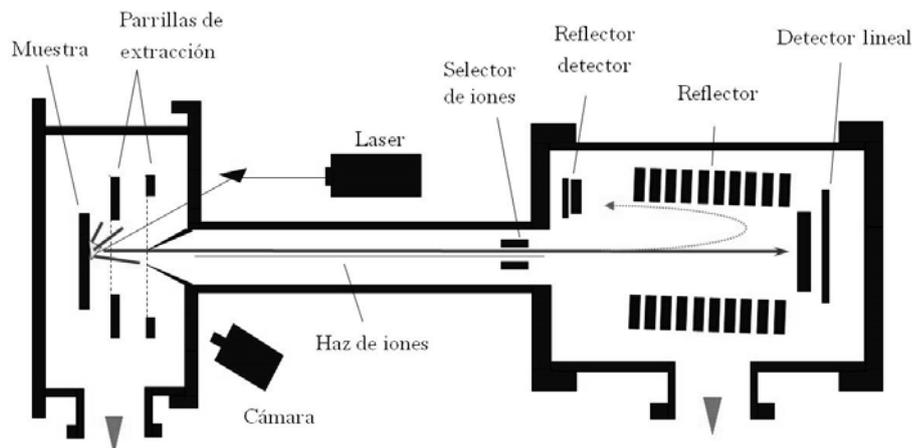


Fig. 17: Esquema del funcionamiento de un espectrómetro de masas MALDI/TOF.

La principal limitación de esta técnica es, en muchos casos, la falta del genoma secuenciado del organismo que se desea estudiar o de alguno próximo filogenéticamente. En el caso de este trabajo de doctorado, esto no ha supuesto ninguna limitación a la hora de utilizar esta técnica, puesto que el genoma del microorganismo empleado en el mismo, *Penicillium chrysogenum*, ya ha sido secuenciado (van den Berg *et al.*, 2008).

23.8.1. PROTOCOLO DE IDENTIFICACION DE PROTEÍNAS

1. Los puntos de proteína de interés fueron extirpados manualmente desde geles teñidos con Coomassie coloidal usando un sacabocados, colocados en un tubo Eppendorf y lavados dos veces con agua bidestilada.

2. Las proteínas se digieren siguiendo el método de (Havlis *et al.*, 2003) y son procesadas para posteriores análisis según lo descrito por (Jami *et al.*, 2010a).

3. Las muestras se analizaron en un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF 4700 (AB Sciex).

4. Como calibración externa se empleó la mezcla para calibración 4700 (Cal Mix 5; AB Sciex).

5. Todos los espectros de MS fueron calibrados internamente usando péptidos de la digestión con tripsina.

6. El análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF produce huellas peptídicas, y los péptidos observados (hasta 65 péptidos por punto) se recogen y representan como una lista de los pesos moleculares monoisotópicos con una relación señal a ruido (S/N) en una proporción superior a 20 utilizando el programa *Series Explorer 4000 v3.5.3* (AB Sciex). Todos los contaminantes conocidos (péptidos derivados de tripsina y queratina) fueron excluidos para posteriores análisis MS/MS.

7. Para cada uno de los espectros de MS, los 10 precursores más intensos con un S/N mayor que 20, fueron seleccionados para su análisis por MS/MS con CID (se utilizó gas atmosférico) en el modo reflector de iones 2-kV y precursor ventanas de masas de ± 7 Da.

8. Se optimizó la calibración predeterminada para el espectro MS/MS.

9. Para la identificación de proteínas, se crearon archivos genéricos de MASCOT combinados con espectros MS y MS/MS y se utilizaron para compararlos con la base de datos de proteínas no redundantes, utilizando la licencia local de MASCOT v 2.2 para *Matrix Science* a través del servidor *Global Protein* v 3.6 (AB Sciex).

10. Los parámetros de búsqueda de las huellas peptídicas y los espectros tándem MS obtenidos se establecieron como sigue: (i) se utilizaron secuencias de bases de datos NCBI nr (2009.11.03); (ii) taxonomía: todas las entradas (9.993.394 secuencias y 3.409.286.210 residuos); (iii) se consideraron modificaciones fijas y variables (S-carbamidometilación de las cisteínas y Met como metionina oxidada); (iv) se permitió un sitio de escisión de menos; (v) la tolerancia del precursor se estableció en 50 ppm y la tolerancia de fragmentos MS/MS en 0,3 Da; (vi) carga de los péptidos: 1+; y (vii) el algoritmo se configuró para utilizar la tripsina como enzima.

11. Las proteínas candidatas producidas por esta combinación de huellas peptídicas y espectrometría en tándem, se consideraron válidas cuando la puntuación global en MASCOT fue superior a 83, con un nivel de significación de $p < 0.05$.

23.8.2. PREDICCIÓN DEL MECANISMO DE SECRECIÓN DE LAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS:

La predicción de la presencia de un péptido señal para la secreción de las proteínas identificadas al medio extracelular se realizó utilizando el programa SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), para señales de secreción clásicas (Petersen *et al.*, 2011) y el programa SecretomeP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>), para señales de secreción no clásicas (Bendtsen *et al.*, 2004).

RESULTADOS

I. SELECCIÓN DE LA CEPA Y DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE FERMENTACIÓN

En esta fase inicial del trabajo se realizó la selección de una cepa de *P. chrysogenum* que presentara gran actividad FAE. Además, se trabajó en la identificación de las condiciones óptimas de fermentación para una producción óptima de un cóctel enzimático con alta actividad FAE. Dichas mejoras se centraron en el medio de cultivo, el inóculo, la dosis enzimática y todos los parámetros de la fermentación como agitación, pH, T^a y tiempos óptimos de recogida del cóctel enzimático. Del mismo modo se realizó la puesta a punto de un método analítico para la determinación de AF y AC mediante HPLC (Ver apartado 19 de Materiales y Métodos).

1. Selección de una cepa con alta actividad enzimática feruloil esterasa

Con el fin de identificar aquellas cepas de *P. chrysogenum* con mayor actividad FAE, se realizó un bioensayo en taco, utilizando un medio sólido (Medio EF) con etil ferulato como sustrato (ver apartados 4.2 y 17.3 de Materiales y Métodos). Dicho experimento se realizó con 5 cepas de *P. chrysogenum* disponibles en nuestro laboratorio: NRRL-1951, Wisconsin 54-1255, A-SP-78, A-SP-99 y Npe10pyrG- y usando como control *P. notatum*, que como ya se ha explicado anteriormente se considera muy cercano genéticamente a *P. chrysogenum* (ver apartado 1.2 de Materiales y Métodos).

Todas las cepas se sembraron por triplicado en placas de medio PW2 (ver apartado 4.2 de Materiales y Métodos), a partir de la misma concentración inicial de esporas: 10⁷ esporas/mL. Transcurrido el período de incubación de 5 días 28°C, se extrajeron varios tacos del medio en el que se había crecido cada cepa y se depositaron sobre placas con medio EF, y sobre placas control (sin EF) (Ver apartado 17.3 de Materiales y Métodos). Todos los ensayos se realizaron por triplicado. El medio EF ya ha sido anteriormente utilizado con éxito para este mismo fin: selección de cepas con actividad FAE (Donaghy y McKay, 1994)(Sakamoto *et al.*, 2005)(Pérez Morales, 2008).

En las placas utilizadas como control se sustituyó el etil-ferulato por etanol al 90%. La cepa Npe10pyrG- posee una mutación genética en el gen *pyrG* que le confiere una auxotrofia en uridina. Debido a esta auxotrofia, dicha cepa fue inoculada en placas separadas suplementadas con uridina.

Tras 12 días de incubación a 28°C se observa la formación de halos de hidrólisis (Fig. 18B) en las zonas con actividad FAE. Las enzimas FAE rompen el enlace éster del EF produciendo dos compuestos, el AF y etanol. La rotura del enlace éster por parte de la enzima se detecta por un halo de hidrólisis alrededor del taco. Se midieron el diámetro de las colonias y el de los halos de

cada una de las cepas en todas las réplicas, según las indicaciones descritas en el apartado 17.3 de Materiales y Métodos.

Además, las placas se tiñeron con verde de bromocresol, un indicador de pH (Fig. 18D), que se torna amarillo a pHs ácidos. Todos los halos se tiñeron de amarillo, lo que indica la acidificación del medio debido a la liberación de AF a partir del etil-ferulato presente en el medio de cultivo, por a la actividad FAE del microorganismo. En las placas control, no se observan ni halos (Fig. 18A), ni coloración amarilla después de la tinción con verde de bromocresol, puesto que carecen de etilferulato (Fig. 18C).

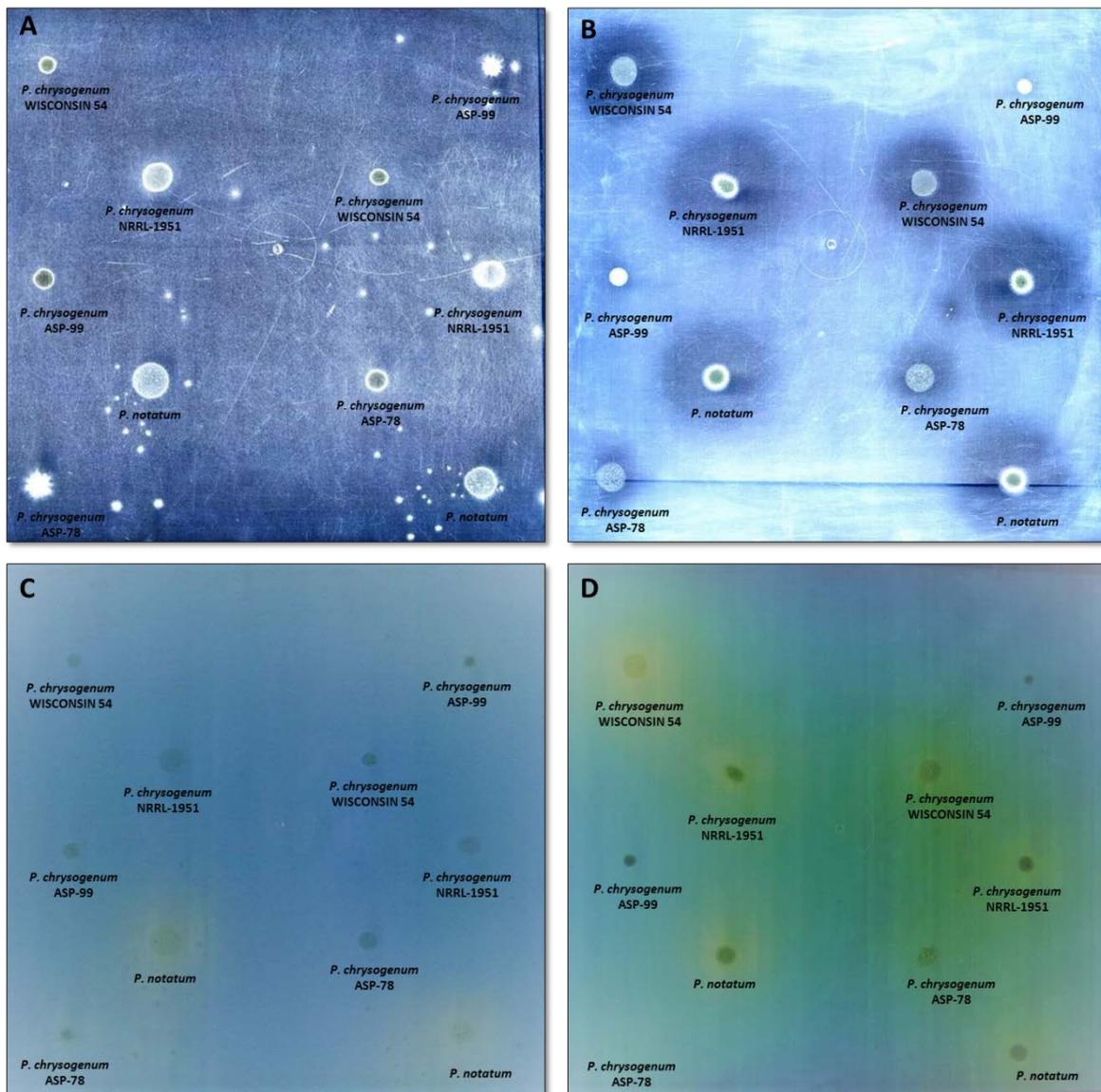


Fig. 18: Medida de la actividad FAE de cultivos de varias cepas de *Penicillium*. (A) Placa control sin EF. **(B)** Placa con EF. **(C)** Placa control sin EF teñida con verde de bromocresol. **(D)** Placa con EF teñida con verde de bromocresol.

La actividad FAE se calculó mediante la potencia de hidrólisis según la fórmula descrita en el apartado 17.3 de Materiales y Métodos. Los resultados para las diferentes cepas ensayadas se muestran en la Fig. 19.

Como se puede observar las cepas con mayor actividad FAE son *P. chrysogenum* NRRL-1951, *P. notatum* y *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255. En las placas sembradas con la cepa npe10pyrG- se observa crecimiento de la misma, pero sin embargo no presenta, aparentemente, actividad FAE. Las cepas A-SP-78 y A-SP-99 poseen una baja actividad FAE.

Se descarta la utilización en futuros ensayos de la cepa *P. notatum*, a pesar de tener una buena actividad FAE, puesto que al ser una cepa silvestre presenta una mala capacidad de fermentación en medio sumergido y su pared celular es más resistente a las enzimas líticas, lo cual dificulta su transformación.

A la vista de estos resultados se decidió trabajar con las cepas de *P. chrysogenum* NRRL-1951 y Wisconsin 54-1255 para estudios posteriores en cuanto a la selección de medios de cultivo y optimización de las condiciones de fermentación.

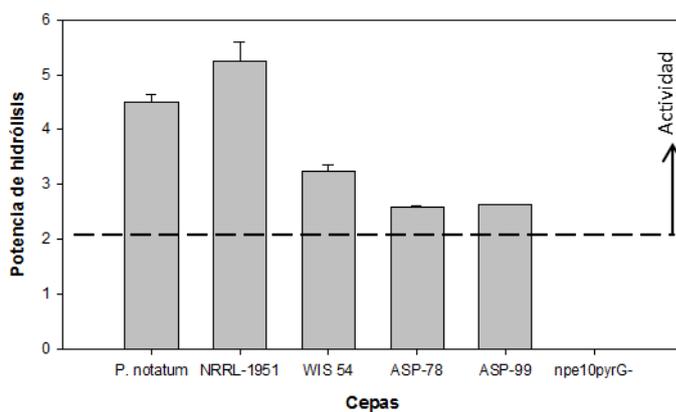


Fig. 19: Potencia de hidrólisis. Medida indirecta de la actividad FAE a través de la capacidad para hidrolizar el etil ferulato de cada cepa ensayada.

2. Determinación de las condiciones óptimas de fermentación para la producción de FAEs por *P. chrysogenum*

2.1. INFLUENCIA DE LA AGITACIÓN

Con el fin de conocer las condiciones óptimas para una producción eficiente de FAEs se cuantificó la actividad enzimática FAE de una forma indirecta, a través de la medición de la liberación de AF, producto de la reacción enzimática. En el proceso experimental se utilizó como fuente de carbono la PR, un subproducto agroindustrial, de bajo coste económico y muy abundante en nuestra región.

La estrategia consiste en utilizar un medio de cultivo con un bajo porcentaje de glucosa (0,1%) pero suficiente para permitir que germinen las esporas y se inicie el desarrollo del micelio. De este modo, una vez agotada la glucosa inicial del medio, el micelio tiene que secretar enzimas que le permitan alimentarse de la otra y única fuente de carbono disponible en el medio de cultivo; la PR. Dicho medio de cultivo se denomina medio de pulpa de remolacha (MPR)(Sakamoto *et al.*, 2005) (Ver apartado 4.2 de Materiales y Métodos).

En la bibliografía consultada se han encontrado tanto ejemplos de fermentaciones en estático, como en agitación, dependiendo del microorganismo y el sustrato utilizados, los resultados obtenidos muestran gran variabilidad. Es por ello que se decidió hacer un ensayo con el fin de comprobar las condiciones idóneas (estático o con agitación) para obtener una mayor actividad FAE en ambas cepas *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 y *P. chrysogenum* NRRL-1951.

El proceso experimental se desarrolló utilizando matraces de 500 mL con 50 mL de medio MPR. Los matraces se inocularon con las esporas procedentes de las cepas *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 y *P. chrysogenum* NRRL-1951, tras su crecimiento en medio PW2 durante 5 días a 28°C. Ambas cepas se incubaron a 28°C con agitación constante (250 rpm) y sin agitación. Durante el proceso fermentativo se tomaron muestras a las 0, 14, 24, 38, 48, 62, 72 y 90 h de incubación. Todos los ensayos se realizan por triplicado (Fig. 20).

Las muestras así obtenidas, fueron centrifugadas durante 10 min y a 4000 rpm. Tras la centrifugación se recuperó el sobrenadante que fue analizado por HPLC (metodología recogida en el apartado 19 de Materiales y Métodos) para cuantificar la liberación de AF a partir de la PR en el proceso fermentativo [*P. chrysogenum* NRRL-1951 (Fig. 20A) y *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (Fig. 20B)]. Por otro lado, el precipitado micelial obtenido en la centrifugación se llevó a sequedad en un horno a 80°C para determinar el peso seco por unidad de volumen. Con estos datos se calculó la producción específica (μg de ácido ferúlico/mg de micelio), de AF en ambas condiciones y cepas (Fig. 20C).

El análisis de los resultados indica una mayor liberación de AF en condiciones de cultivo en agitación frente al estático, tanto en *P. chrysogenum* NRRL-1951 (Fig. 20A) como en *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (Fig. 20B). Cuando se comparan la producción específica de AF de ambas cepas de *P. chrysogenum* en cultivo en agitación se observa que son muy similares (Fig. 20C). A la vista de los resultados obtenidos, se estableció el cultivo con agitación como el más idóneo para el cultivo de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 para la producción de FAEs.

Por otro lado, este experimento también sirvió para la selección de la cepa a utilizar en los estudios posteriores. Teniendo en cuenta los buenos resultados de producción específica observados en este experimento, el buen conocimiento de las técnicas de manipulación genética, así como la disponibilidad de las herramientas para llevarla a cabo junto con la disponibilidad del genoma, se decidió mejorar la producción de enzimas FAEs en la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255.

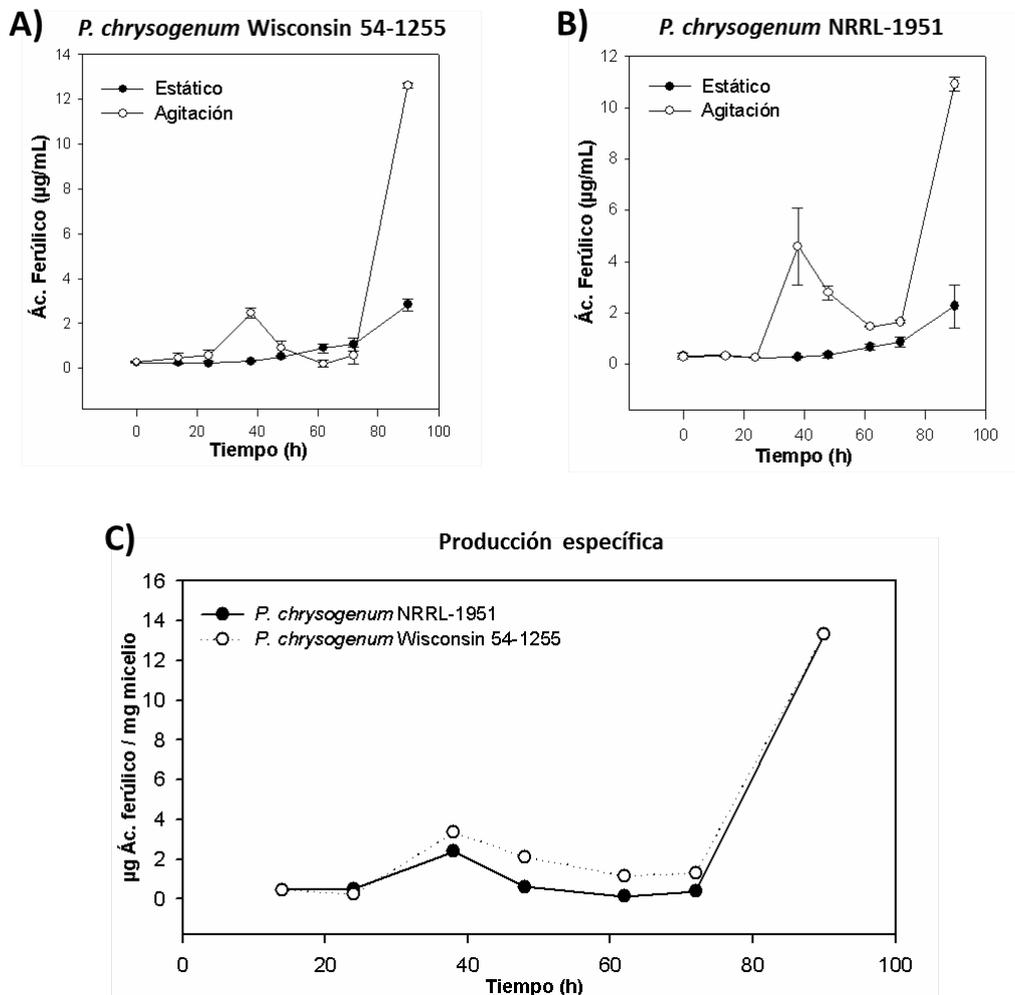


Fig. 20: Liberación de ácido ferúlico en presencia de pulpa de remolacha en medio líquido estático y con agitación constante por *P. chrysogenum*. **(A)** Liberación de AF por parte de la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 en cultivo en estático y con agitación. **(B)** AF liberado por la cepa *P. chrysogenum* NRRL-1951 en cultivo en estático y con agitación. **(C)** Producción específica de AF en presencia de PR en medio líquido con agitación constante de las cepas *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 y NRRL-1951.

2.2. OPTIMIZACIÓN DEL INÓCULO

Los estudios realizados muestran que inicialmente el medio de cultivo MPR es adecuado para la producción de FAEs por parte de *P. chrysogenum*. En este medio de cultivo se inocula directamente con esporas las cuales germinan y forman el micelio, el cual secreta al medio de cultivo las enzimas FAEs con el fin de utilizar la fuente de carbono disponible como alimento, en este caso la PR.

El siguiente objetivo que se planteó fue comparar las producciones de FAEs obtenidas al inocular directamente con esporas y al inocular con el micelio obtenido tras el desarrollo de un inóculo en la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255.

Para inocular a partir de micelio, las esporas generadas en las placas de medio PW2 (previamente sembradas e incubadas a 28 °C durante 5 días) fueron recogidas en 100 mL de medio MPPY (ver apartado 4.2 de Materiales y Métodos) y pasadas a un matraz de 500 mL. El matraz se incubó a 28°C, durante 24 horas en una incubadora orbital con una agitación constante de 250 rpm. De esta forma las esporas germinaron y desarrollaron micelio, aumentando la masa micelial. El micelio fue inoculado en el medio PR en una proporción de un 10% (v/v). El inóculo a partir de esporas se realizó directamente en medio líquido de fermentación MPR a partir de esporas generadas en el medio de cultivo sólido PW2, previamente incubadas como se ha descrito anteriormente. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los matraces con medio PR se incubaron a 28°C y con una agitación de 250 rpm.

El momento de recogida del extracto enzimático se estableció a las 88 horas de incubación ya que a las 90 horas se produce la máxima liberación de AF (Fig. 20) y de esta forma se evita la fase de lisis del micelio que podría degradar las FAEs al liberarse enzimas intracelulares como las proteasas. El protocolo seguido para la recuperación de los extractos se indica en el apartado 20 de Materiales y Métodos.

Tras los procesos de fermentación, se obtuvieron los extractos enzimáticos procedentes de las dos condiciones de cultivo, tanto del inóculo de esporas como del inóculo de micelio. Los resultados de la medición de la actividad FAE frente al sustrato metil-4-hidroxi-3-metoxicinamato (MFA) de dichos extractos enzimáticos se realizó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 21.1 de Materiales y Métodos. El análisis de los resultados obtenidos indica una mayor actividad FAE (reflejada en porcentaje) cuando el inóculo utilizado es micelio (Fig. 21), no existiendo de todos modos grandes diferencias entre los dos tipos de inóculos.

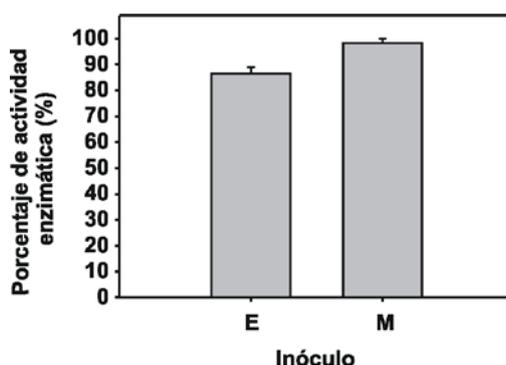


Fig. 21: Optimización del inóculo. Extractos enzimáticos de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 procedentes de cultivos en medio PR tras ser inoculados con esporas (E) o micelio (M).

2.3. OPTIMIZACIÓN DE pH y Tª

Para caracterizar y cuantificar la actividad enzimática FAE de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 es necesario recuperar los extractos enzimáticos a partir de cultivos sumergidos de este hongo filamentoso en el medio inductor de su producción (MPR). El protocolo seguido para la recuperación de los extractos se indica en el apartado 20 de Materiales y Métodos.

Una vez obtenidos los extractos enzimáticos se determinaron las condiciones óptimas de la reacción catalizada por las FAEs en cuanto a pH y temperatura. En el ensayo del pH óptimo se utilizó MFA como sustrato de la reacción siguiendo el protocolo descrito en el apartado 21.1 de Materiales y Métodos. Los valores de pH utilizados fueron 3, 4, 5, 6 y 7, todas las reacciones se realizaron a una temperatura de 37°C.

En el caso de la determinación de la temperatura óptima para la actividad FAE, se utilizó el mismo sustrato sintético descrito anteriormente y siguiendo las indicaciones del apartado 21.1 de Materiales y Métodos. Las temperaturas ensayadas fueron: 37, 40, 45, 50, 55 y 60°C. Todas las reacciones se llevaron a cabo a pH 5, puesto que resultó el óptimo en los experimentos previos.

La actividad FAE se determinó cuantificando la liberación de AF mediante análisis de HPLC (apartado 19 de Materiales y Métodos) y relativizándola con respecto a la condición de mayor liberación de dicho ácido fenólico.

Los resultados de la actividad FAE (Fig. 22) muestran un pH óptimo de 5 (Fig. 22A), resultado dicha actividad muy superior al resto de pHs ensayados. En cuanto a la temperatura óptima (Fig. 22B), se observa como la actividad FAE va aumentando progresivamente desde los 37 a los 50-55°C, valores en los que alcanza su máximo de actividad. A partir de los 55°C se puede observar cómo la actividad FAE disminuye drásticamente.

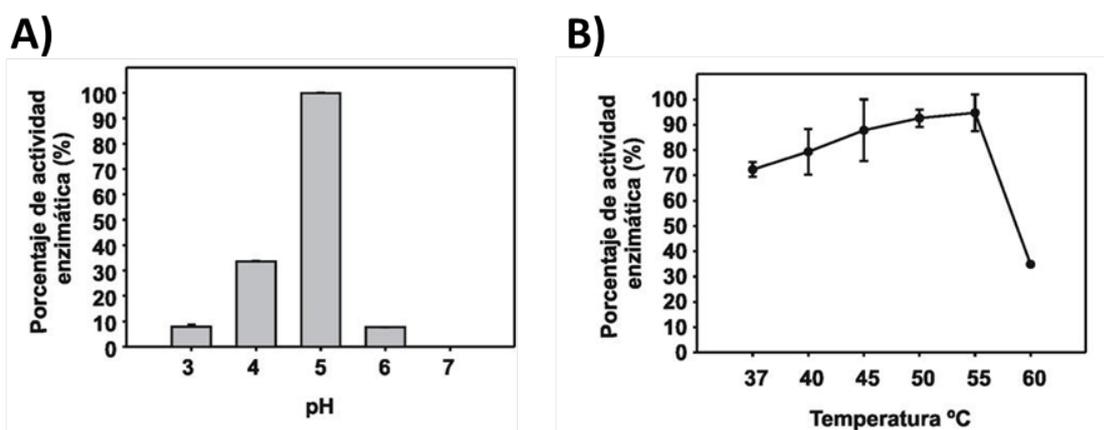


Fig. 22: Optimización de pH y temperatura. Porcentaje de actividad enzimática FAE en los extractos enzimáticos producidos por *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 a diferentes pHs (A) y temperaturas (B).

Teniendo en cuenta las variaciones propias de este tipo de experimentos, cabría concluir que la temperatura y pH óptimos para la actividad enzimática FAE en la cepa de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255, se sitúan en 50°C y 5 respectivamente.

2.4. OPTIMIZACIÓN DEL TIPO DE SUSTRATO Y DOSIS ENZIMÁTICA

Tras la caracterización del extracto enzimático de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 se ha observado que la máxima actividad FAE del mismo tiene lugar a una temperatura de 50°C y a un pH 5.0. Estas mismas condiciones se utilizaron en este ensayo para determinar la cantidad óptima de extracto enzimático necesario para liberar el máximo de AF a partir de los sustratos naturales, concretamente PR y marro de café (MC).

Se ensayaron distintas cantidades de extracto enzimático (0, 0.2, 1, 3 y 4.2 mg) manteniendo fijo en un 2% el sustrato (p/v), en el tampón y condiciones indicadas en el apartado 2.1.2 de Materiales y Métodos. También se ensayaron dos tiempos de incubación distintos, 1 y 5 horas. Como se ha comentado anteriormente, los ensayos se realizaron frente a dos sustratos vegetales diferentes: PR y MC.

Los resultados del ensayo muestran que la cantidad de extracto enzimático que libera la mayor cantidad de AF a 50°C y pH 5 es 3 mg cuando el sustrato es PR (Fig. 23A), siendo mayor la liberación del mismo tras 5 horas de incubación (Fig. 23A). Sin embargo, cuando el sustrato es marro de café, la liberación de AF es mucho menor que con PR y además solo se produce con concentraciones superiores a 3 mg (Fig. 23B).

Los resultados muestran que el coctel enzimático producido por la cepa de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 es más activo frente a la PR, siendo capaz de liberar 28,5 veces más AF a partir de PR que de MC.

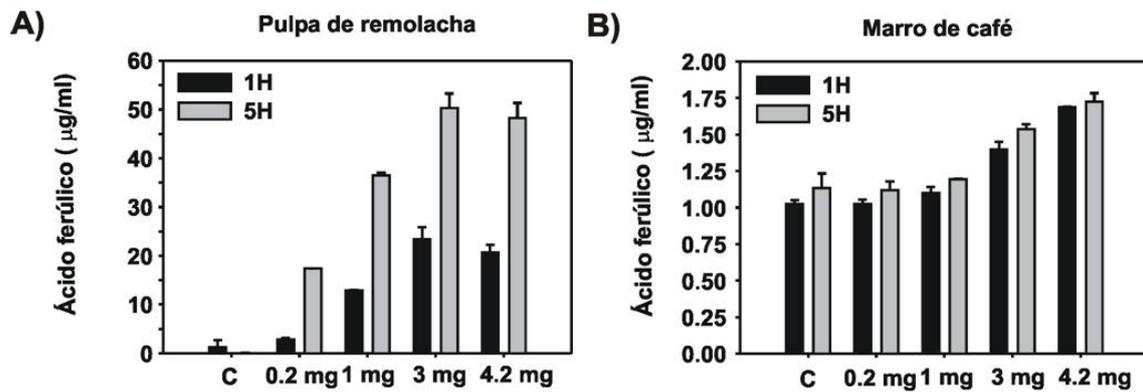


Fig. 23: Optimización del tipo de sustrato y la dosis enzimática. Liberación de AF por parte de diferentes concentraciones del extracto enzimático frente a los sustratos: pulpa de remolacha (A) y marro de café (B) a una temperatura de 50°C, a un pH 5 y con una agitación constante de 175 rpm. 1H: 1 hora de incubación; 5H: 5 horas de incubación; C: control.

Tras analizar los resultados en su conjunto, podemos concluir que para una producción óptima de FAE es necesario desarrollar un inóculo micelial obtenido tras la germinación de las esporas en medio líquido MPPY. Posteriormente inocular con un 10% de dicho inóculo en medio líquido MPR a pH 5.0, e incubar durante 88h a temperatura y agitación constantes de 28°C y 250 rpm, respectivamente. Y finalmente recuperar los extractos enzimáticos que contienen las enzimas FAEs.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de fermentación, inóculo, sustrato y dosis enzimática idónea, se decide identificar y sobreexpresar los genes que codifican las enzimas FAEs en *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 con el fin de aumentar lo máximo posible la actividad enzimática FAE en el cóctel enzimático. El procedimiento y los resultados de la sobreexpresión se muestran en el capítulo II de Resultados.

II. SOBREEXPRESIÓN DE LOS GENES FAE EN *P. chrysogenum* y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO PRODUCIDO POR LOS TRANSFORMANTES

1. Análisis bioinformático del genoma de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 para identificar los genes *fae* y caracterizar las proteínas PcFae.

Tal y como se ha comentado anteriormente, estudios moleculares recientes han renombrado la especie *P. chrysogenum* como *P. rubens* (Houbraken *et al.*, 2011). En este trabajo se utiliza la terminología tradicional de *P. chrysogenum*.

Durante la secuenciación del genoma de *P. chrysogenum* (van den Berg *et al.*, 2008) se asignó a cada ORF un código que proporcionaba diferentes informaciones acerca del ORF en cuestión. Por ejemplo, si un ORF se denomina Pc22g22070, la información que proporciona es la siguiente: **Pc**: son las siglas de *Penicillium chrysogenum* (Actualmente renombrado como *Penicillium rubens*); el número **22** (de Pc22) indica el supercontig en el que se incluye el ORF analizado, en este caso el supercontig 22; **g22070**: indica la posición en el genoma del ORF (_ _070) dentro del supercontig en el que se incluye (22_ _).

Las FAEs, enzimas de interés para este trabajo, han sido caracterizadas en muchos microorganismos, encontrándose mayoritariamente en hongos filamentosos y siendo especialmente conocidas, las FAEs de los hongos filamentosos del género *Aspergillus* debido a su gran diversidad y abundancia (Ralet *et al.*, 1994b)(Faulds y Williamson, 1995)(Kroon y Williamson, 1996)(de Vries *et al.*, 1997)(Koseki *et al.*, 1998)(García-Conesa *et al.*, 1999)(Asther *et al.*, 2002)(Record *et al.*, 2003)(Levasseur *et al.*, 2004)(McAuley *et al.*, 2004)(Hermoso *et al.*, 2004)(Fazary *et al.*, 2009)(Udatha *et al.*, 2011)(Dilokpimol *et al.*, 2016).

Teniendo en cuenta que se había detectado la actividad FAE en los cultivos de *P. chrysogenum* y de la cepa Wisconsin 54-1255 y dada la disponibilidad del genoma (van den Berg *et al.*, 2008), se realizó una búsqueda de genes homólogos a los genes ya conocidos que codifican las proteínas FAEA y FAEB en los hongos filamentosos del género *Aspergillus*. Se escogió este género debido a su proximidad genética con los hongos del género *Penicillium* y a su conocida capacidad de producir enzimas extracelulares, entre ellas las FAEs (Dilokpimol *et al.*, 2016). De esta manera, las secuencias amonoacídicas de las proteínas FAEA y FAEB se cruzaron con las proteínas del genoma de *Chrysogenum* Wisconsin 54-1255 utilizando la herramienta informática BLAST (Altschul *et al.*, 1997). Dicha búsqueda reveló la existencia de dos proteínas codificadas por dos secuencias génicas del genoma de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 similares a las proteínas FAEA y FAEB de varias especies del género *Aspergillus*.

1.1 ANALISIS BIOINFORMÁTICO DEL GEN *faeA* Y LA PROTEÍNA PcFaeA

La base de datos del genoma de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (AM920435-AM920427) indica que el ORF Pc20g07010 de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 es similar a las FAE de otras especies del género *Aspergillus* y posee 933 pb de longitud. Dicha secuencia está interrumpida por un intrón de 89 pb y se denominará a partir de este momento como gen *faeA*.

El pre-ARNm correspondiente al gen *faeA* en este trabajo, genera un ARN mensajero maduro cuya traducción da lugar a una proteína (CAP86030), denominada como PcFaeA.

Si se compara la secuencia aminoacídica de la proteína PcFaeA (CAP86030) con las bases de datos de proteínas pertenecientes a especies del género *Aspergillus*, mediante la herramienta informática *Protein BLAST*, se obtienen altos porcentajes de identidad (72-75%) con secuencias catalogadas como FAEs tipo A o probables FAEs tipo A de varias especies del género *Aspergillus*: *A. niger* (75%), *A. awamori* (74%), *A. usarii* (75%), *A. flavus* (74%), *A. cistatus* (75%), *A. oryzae* (73%) y *A. terreus* (75%), con porcentaje de secuencia alineada de entre el 99 y el 92% en todos los casos.

La secuencia ORF del gen *faeA* (Pc20g07010) de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 codifica la proteína PcFaeA (CAP86030) de 280 aminoácidos, incluyendo el péptido señal para su secreción extracelular de 20 aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 1 al 20 de la secuencia (MKISAPRALALSVAVGHALA). Esta predicción ha sido realizada usando el programa *SignalP* (Petersen *et al.*, 2011). Por otro lado, la estimación de la masa molecular y del punto isoeléctrico (pI) de la proteína madura se realizó con el programa *ExPASy Compute pI/Mw tool* (http://web.expasy.org/compute_pi/) resultando ser 30.167,58 Da y 4,86 respectivamente.

Usando el servidor PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>) (Buchan *et al.*, 2013) que predice la estructura secundaria de las proteínas (Jones, 1999), se realizó la predicción de la estructura secundaria de la enzima PcFaeA. El análisis dio como resultado que la enzima PcFaeA contiene 7 hélices alfa (cilindros morados en la Fig. 24) y 10 láminas beta (flechas amarillas en la Fig. 24) en su estructura secundaria. Teniendo en cuenta el alto grado de certeza de los resultados obtenidos (histograma en color azul en la Fig. 24), se puede asumir que la localización de las 7 hélices alfa es: Ser4-Ala18, Asp28-Ala44, Asp91-Asp97, Gly118-Gln141, Leu154-Ser167, Leu186-Asn195 y Asn264-Phe271 y la localización de las láminas beta en la estructura secundaria de la proteína PcFaeA es Thr56-Try62, Ile68-Asp75, Glu80-Phe85, Leu102-Ala103, Ala115-His117, Ala146-Thr150, Thr174-Thr177, Phe206-Thr210, Try233-Val236 y Thr244-Thr248.

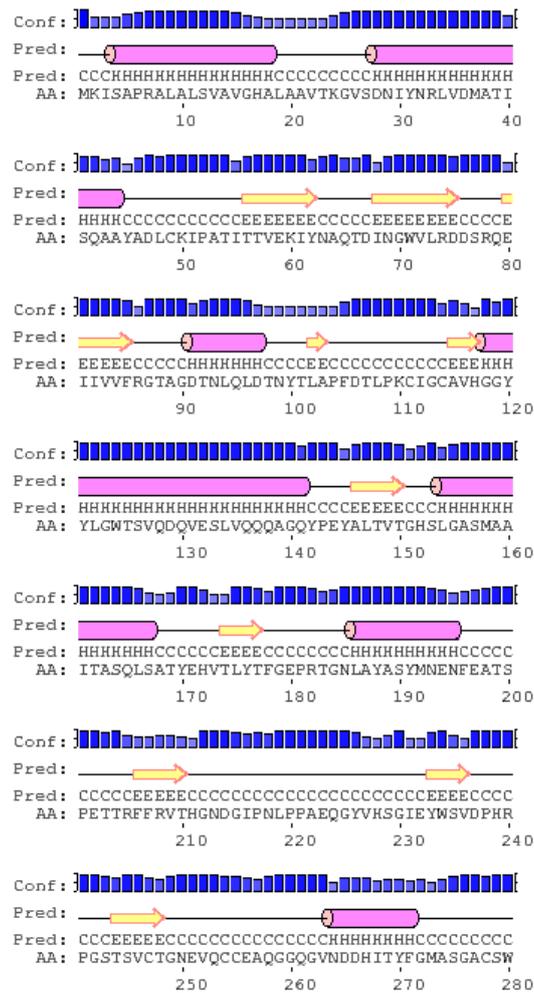


Fig. 24 Predicción de la estructura secundaria de la proteína PcFaeA. Representación obtenida usando el servidor PSIPRED. “Conf”: grado de certeza de los resultados obtenidos representado por un histograma de color azul. “Pred”: predicción de la estructura secundaria: H= hélice alfa, representada por un cilindro morado, E=lámina beta, representada por una flecha amarilla, C=giros, representados por una línea negra. “AA”: secuencia aminoacídica de la proteína PcFaeA.

Además se realizó la predicción de la estructura terciaria de la proteína PcFaeA (Fig. 25) usando el servidor *Phyre2* (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>) (Kelley *et al.*, 2015). El 93% de la secuencia (260 residuos) se ha podido modelar con un 100% de confianza para la obtención del modelo tridimensional. Dicho análisis indica que la secuencia de la proteína PcFaeA pertenece al grupo de las enzimas hidrolasas y a la familia de lipasas fúngicas con un grado de identidad del 77% y 100% de confianza. El análisis no revela similitud con ninguna proteína conocida depositada en la base de datos.



Fig. 25 Modelo de la estructura tridimensional de la proteína PcFaeA. Modelo obtenido usando el servidor Phyre2. Imagen coloreada con los colores del arcoíris desde el extremo N al C terminal. Dimensiones del modelo:(Å): X: 43.538 Y: 50.488 Z: 47.586.

1.2 ANALISIS BIOINFORMÁTICO DEL GEN *faeB* Y LA PROTEÍNA PcFaeB

La base de datos del genoma de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (AM920435-AM920427) indica el ORF Pc12g08300 de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 es similar a las FAEB de otras especies del género *Aspergillus*, dicha secuencia tiene 1643 pb de longitud y está interrumpida por la presencia de un intrón de 58 pb. Dicha secuencia se denomina como gen *faeB* en el presente trabajo.

Cuando el pre-ARNm correspondiente al gen *faeB* es procesado y su intrón es eliminado, se genera un ARN mensajero maduro cuya traducción da lugar a una proteína denominada como PcFaeB.

Al comparar la secuencia aminoacídica de la proteína PcFaeB (CAP80457) con la bases de datos de proteínas pertenecientes a especies del género *Aspergillus*, mediante la herramienta informática *Protein BLAST*, se obtienen grados de identidad de entre el 71 y el 75% con secuencias catalogadas como FAE tipo B o probables FAE tipo B de varias especies del género *Aspergillus*: *A. udagawae* (74%), *A. cristatus* (73%), *A. lentulus* (75%), *A. fischeri* (75%), *A. fumigatus* (74%), *A. clavatus* (72 %), *A. oryzae* (71%), con porcentajes de 100-97% de secuencia alineada.

El ORF del gen *faeB* (Pc12g08300) de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 codifica la proteína PcFaeB (CAP80457) de 527 aminoácidos, incluyendo el péptido señal para su secreción extracelular de 19 aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 1 al 19 de la secuencia (MTRLHVLPLL AAMGSLALA). Esta predicción ha sido realizada usando el programa *SignalP* (Petersen *et al.*, 2011). Por otro lado, la estimación de la masa molecular y del punto isoeléctrico

(pI) de la proteína madura se realizó con el programa *ExPASy Compute pI/Mw tool* (http://web.expasy.org/compute_pi/) resultando ser 57.787,63Da y 5,44 respectivamente. Los valores de masa molecular y pI obtenidos experimentalmente son de 71-77 kDa y pH 5,1-5,3, respectivamente (datos de las 4 isoformas identificadas).

Usando el servidor PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>) (Buchan *et al.*, 2013) que predice la estructura secundaria de las proteínas (Jones, 1999), se realizó la predicción de la estructura secundaria de la enzima PcFaeB. El análisis dio como resultado que la enzima PcFaeB contiene 13 hélices alfa (cilindros morados en la Fig. 26) y 12 láminas beta (flechas amarillas en la Fig. 26) en su estructura secundaria.

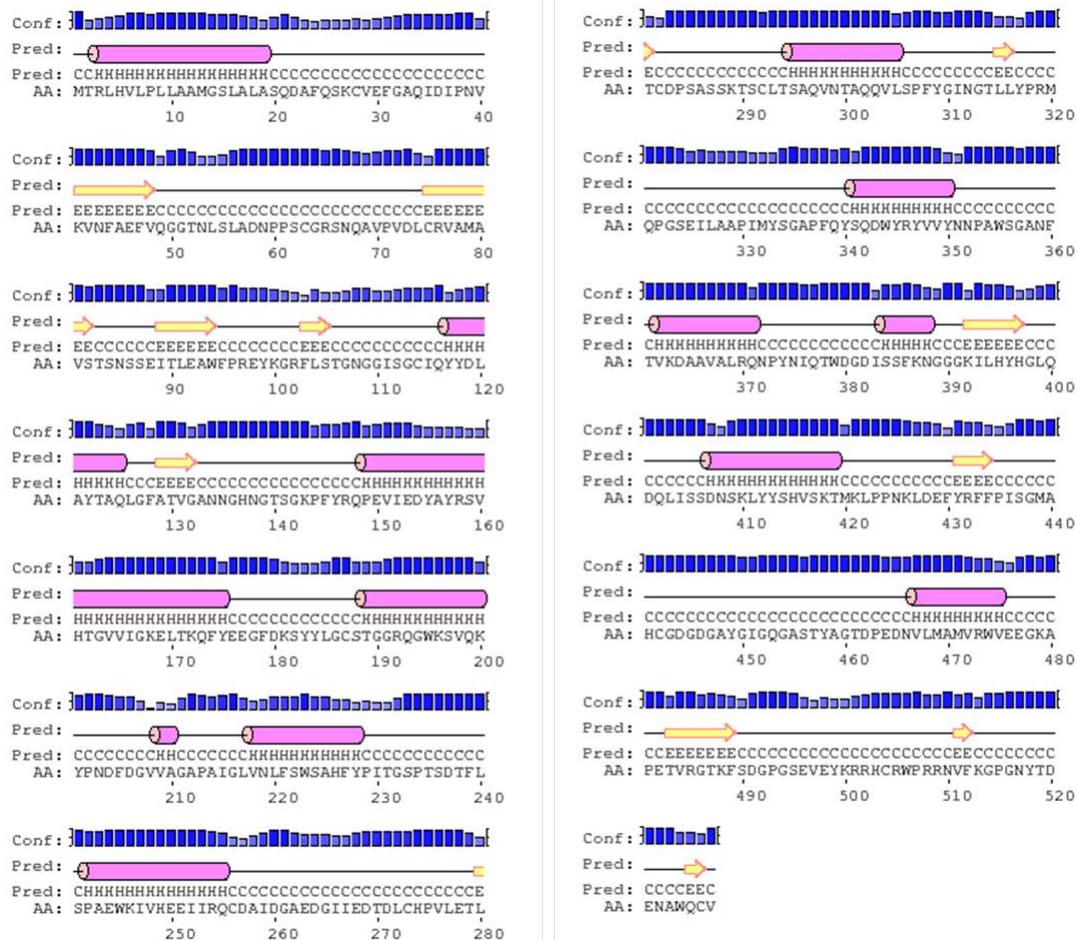


Fig. 26 Predicción de la estructura secundaria de la proteína PcFaeB. Representación obtenida usando el servidor PSIPRED. “Conf”: grado de certeza de los resultados obtenidos representado por un histograma de color azul. “Pred”: predicción de la estructura secundaria: H= hélice alfa, representada por un cilindro morado, E=lámina beta, representada por una flecha amarilla, C=giros, representados por una línea negra. “AA”: secuencia aminoacídica de la proteína PcFaeB.

Teniendo en cuenta el alto grado de certeza de los resultados obtenidos (histograma en color azul en la Fig. 26), se puede asumir que la localización de las 13 hélices alfa es: Arg3-Ala19, Try117-Gln125, Pro149-Tyr175, Thr189-Lys200, Val209-Ala210, Val218-Try228, Pro242-

Gln255, Ser295-Leu305, Ser341-Tyr350, Val362-Gln371, Ser384-Asn388, Asp407-Thr419 y Val467-Val475 y la localización de las láminas beta en la estructura secundaria de la proteína PcFaeB es: Lys41-Val48, Cys75-Ser82, Ile89-Trp94, Phe103-Ser105, Ala129-Gly132, Ile280-Thr281, Leu315-Leu316, Lys392-His397, Try431-Phe434, Thr483-Phe489, Val511-Phe512 y Gln525-Cys526.

Además se realizó la predicción de estructura terciaria de la proteína PcFaeB (Fig. 27) usando el servidor Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) (Kelley *et al.*, 2015). Dicho análisis indica que la secuencia de la proteína PcFaeB pertenece al grupo de las enzimas hidrolasas y la clasifica como una posible FAE b-1. Los resultados muestran que 502 residuos de los 527 aa que tiene la proteína PcFaeB (95% de la secuencia), se ha podido modelar con un grado de identidad del 100,0%. Se obtiene un grado de identidad del 59% con una confianza del 100% con la estructura cristalina de la enzima FAE tipo B de *A. oryzae*.

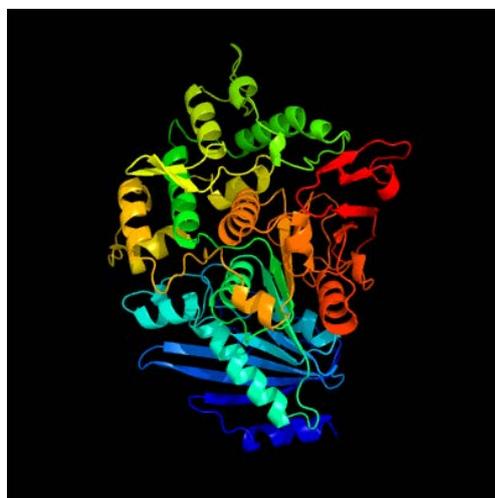


Fig. 27 Modelo de la estructura tridimensional de la proteína PcFaeB. Modelo obtenido con el servidor Phyre2. Imagen coloreada con los colores del arcoíris desde el extremo N al C terminal. Dimensiones del modelo:(Å): X: 63.626 Y: 74.287 Z: 59.052.

Ambas proteínas presentan un pentapéptido de secuencia consenso conservada GXSXG, cuyo residuo de serina forma parte de la tríada catalítica (Ser-His-Asp) característica de la familia de serin-proteasas y esterasas, observado también en la proteína AnFaeA de *A. niger* (Hermoso *et al.*, 2004). En la proteína PcFaeA dicho dominio se sitúa entre los aminoácidos 151 a 155 mientras que en PcFaeB se sitúa entre las posiciones aminoacídicas 183 a 197.

Por todo esto se presupone la existencia de dos secuencias que codifican sendas proteínas FAEs de tipo A y B en *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 y en las cuales se basa el presente trabajo. Dichas proteínas se denominaron: PcFaeA y PcFaeB y sus respectivos genes: *faeA* y *faeB*, siguiendo la nomenclatura propuesta por Faulds *et al.* (2003).

2. Clonación y sobreexpresión de los genes *faeA* y *faeB* en *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255

Uno de los objetivos principales del presente trabajo es incrementar la actividad FAE en el extracto enzimático producido por *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255, utilizando la técnica de sobreexpresión de los genes endógenos del propio *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255. Concretamente se sobreexpresaron los genes *faeA* y *faeB*, con el fin de sobreexpresar las proteínas PcFaeA y PcFaeB, creando de este modo, dos líneas de transformantes, cada una de ellas sobreexpresada en una proteína. De esta manera la línea A corresponde a los transformantes sobreexpresados con el gen *faeA* y la línea B corresponde a los transformantes sobreexpresados con el gen *faeB*. Para realizar la sobreexpresión se utilizó el plásmido pIBRC43-*Bgl*II ya que permite una expresión fuerte y constitutiva de los genes. Este plásmido ha sido utilizado previamente en nuestro laboratorio con gran éxito (Kosalková *et al.*, 2009).

El plásmido pIBRC43-*Bgl*II contiene un casete para la sobreexpresión de genes en hongos filamentosos, de tal forma que se encuentran bajo el control del promotor *Pgdh*, promotor de expresión constitutiva y el terminador *Tcyc1* de *Saccharomyces cerevisiae*. Dicho casete está flanqueado por puntos de corte para las enzimas de restricción *Stu*I y *Bgl*II.

Como se mencionó anteriormente, la secuencia génica del gen *faeA* de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 posee 933 pb mientras que la del gen *faeB* posee 1643 pb. Dichas secuencias génicas se amplificaron mediante PCR siguiendo las condiciones descritas en el apartado 10.1 de Materiales y Métodos. Para la PCR se emplearon cebadores específicos diseñados a partir de las secuencias que las codificaban: *faeA*-F y *faeA*-R para amplificar el gen *faeA* y *faeB*-F y *faeB*-R en el caso de la amplificación del gen *faeB* (ver apartado 3 de Materiales y Métodos). Estos oligómeros se diseñaron con los nucleótidos correspondientes a los sitios de restricción *Stu*I y *Bgl*II para su clonación en el vector de expresión pIBRC43-*Bgl*II.

Una vez amplificados por PCR los genes *faeA* y *faeB* se digirieron con las enzimas de restricción *Stu*I y *Bgl*II (véase apartado 10.4 de Materiales y Métodos), al igual que el plásmido pIBRC43-*Bgl*II. Dichas enzimas poseen un único punto de corte tanto en los fragmentos amplificados, como en el plásmido, generando extremos romos en el caso de la enzima *Stu*I y extremos cohesivos en el caso de *Bgl*II, evitando, de este modo, que los fragmentos se religuen entre sí. La digestión con *Stu*I y *Bgl*II en el plásmido pIBRC43-*Bgl*II provoca la escisión del casete de genes que confieren resistencia a la fleomicina (Fig. 28).

Los fragmentos amplificados (Fig. 28) de los genes *faeA* y *faeB* digeridos con las enzimas de restricción se clonaron, de manera individual y dirigida, en el vector de expresión pIBRC43-*Bgl*III (ver apartado 2.1 de Materiales y Métodos). Para ello se realizó una ligación siguiendo el protocolo descrito en el apartado 10.7 de Materiales y Métodos. El vector porta promotores fúngicos de expresión constitutiva (Cardoza *et al.*, 1998). Como resultado de la clonación de ambos genes en dicho vector de expresión se obtuvieron los plásmidos de sobreexpresión p*SfaeA* y p*SfaeB* (ver Fig. 16 apartado 2.2 de Materiales y Métodos).

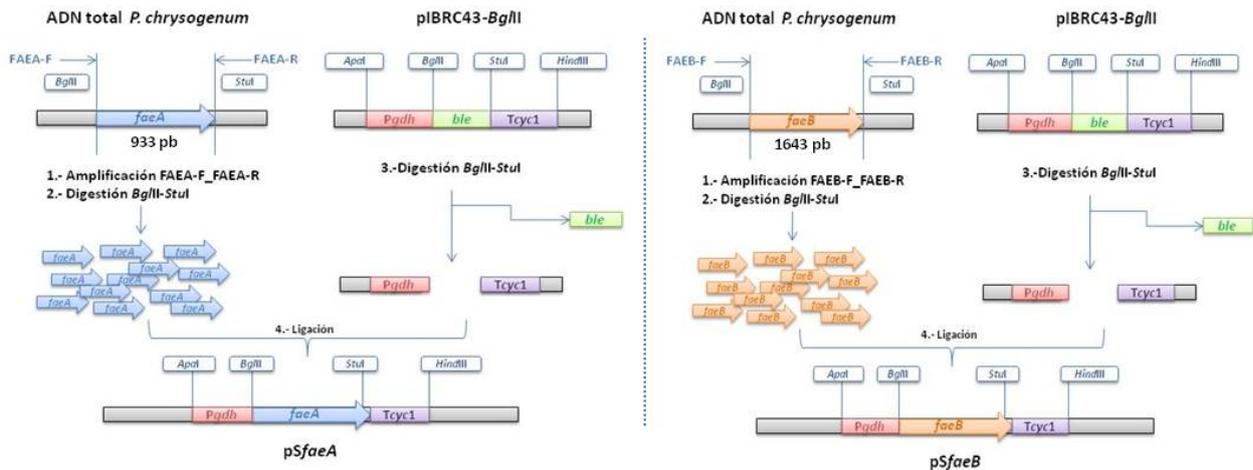


Fig. 28: Construcciones plásmidicas: p*SfaeA* y p*SfaeB*.

Los plásmidos de sobreexpresión p*SfaeA* y p*SfaeB* se transformaron por separado en *E. coli* DH5 α , con el fin de amplificar el ADN plasmídico, para poder transformarlo de manera eficiente en las cepas de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (ver apartados 12 y 13 de Materiales y Métodos).

Una vez amplificado el ADN plasmídico de las construcciones p*SfaeA* y p*SfaeB*, se realizó una digestión de comprobación con la enzima de restricción *Bgl*III que posee un único punto de corte. A la digestión se añadió ARNasa con el fin de limpiar la muestra de ARN y obtener un resultado más claro. Dicha digestión se comprobó por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (Fig. 29), en el cual se puede observar que las bandas obtenidas corresponden con el tamaño de las esperadas según la secuencia del vector más el inserto. En el caso de p*SfaeA* (Fig. 29, carriles 1 a 7) se observa una única banda en todas las colonias analizadas, excepto en la colonia 7A (carril 7 Fig. 29) de 4857 pb correspondiente a la suma de las 3924 pb del plásmido digerido y las 933 del inserto con el gen *faeA*. En el caso del p*SfaeB* (Fig. 29, carriles 9 a 14), tan sólo se observa la banda esperada de 5567 pb correspondiente a la suma de 3924 pb del plásmido digerido y las 1643 del inserto con el gen *faeB*, en las colonias 2B (carril 10) y 5B (carril 13).

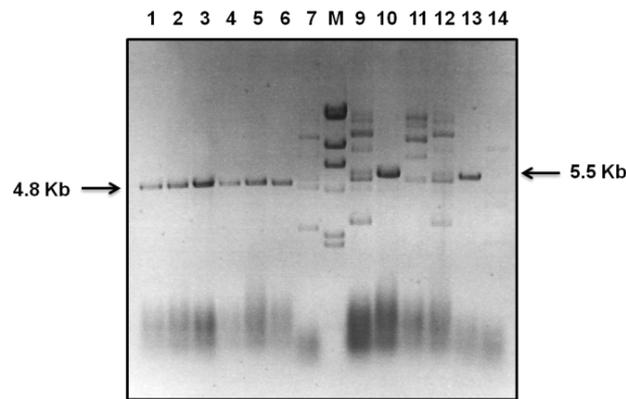


Fig. 29: Digestión con la enzima de restricción *Bgl*III para comprobación de la correcta ligación del inserto (*faeA* o *faeB*) con el plásmido *pIBRC43-Bgl*III. Carriles 1-7: Colonias de *E. coli* con el plásmido *pSfaeA*: 1A, 2A, 3A, 4A, 5A, 6A y 7A. Carril 8: Marcador de peso molecular *Hind*III. Carriles 9-14: Colonias de *E. coli* con el plásmido *pSfaeB*: 1B, 2B, 3B, 4B, 5B y 6B respectivamente.

Una vez comprobado que los plásmidos de sobreexpresión clonados en *E. coli* DH5 α tienen el gen de interés correctamente insertado, se procede a realizar una lisis alcalina según el protocolo descrito en el apartado 14 de Materiales y Métodos con el fin de obtener ADN de las construcciones plasmídicas a gran escala y así poder realizar una clonación eficiente en *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255. Para realizar la lisis alcalina se eligieron las colonias 5A (*pSfaeA*) y 5B (*pSfaeB*) puesto que tenían el gen de interés correctamente insertado.

Tras la lisis se realizó una nueva digestión de comprobación, en este caso, con la enzima de restricción *EcoRV*, que posee dos puntos de corte en el plásmido y un único punto de corte en el inserto. El resultado de la electroforesis de la digestión con *EcoRV* se puede ver la Fig. 30. En el caso de *pSfaeA* (carril 1 Fig. 30) se observan tres bandas de aproximadamente 3857 pb, 760 pb y 267 pb. En el caso de *pSfaeB* (carril 2 Fig. 30) las bandas son de aproximadamente 4857 pb, 480 pb y 267 pb. Dichos resultados confirman que el ADN obtenido tras la lisis alcalina lleva correctamente insertado tanto el plásmido como los genes de interés.

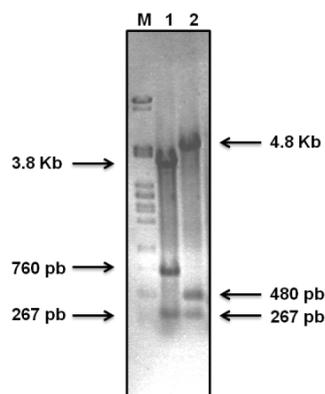


Fig. 30: Digestión de comprobación tras la lisis alcalina. M: Marcador de peso molecular *Pst*I. Carril 1: colonia 5A. Carril 2: colonia 5B.

Una vez obtenidos los plásmidos pSfaeA y pSfaeB, el siguiente paso fue obtener los transformantes de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 con los genes *faeA* y *faeB* sobreexpresados. Para poder transformar células de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 es necesario obtener protoplastos. Los protoplastos son las células fúngicas sin la pared celular que las recubre, lo que hace que sea mucho fácil la introducción de cualquier tipo de material genético a través de la membrana plasmática, pero a su vez estas células son mucho más vulnerables y sensibles, sobre todo a los procesos de ósmosis. Debido a ello, hay que tener especial cuidado en su manipulación, como por ejemplo utilizando sorbitol como complemento del medio mínimo Czapek para el crecimiento de protoplastos, ya que es un estabilizante osmótico.

El método empleado para seleccionar los protoplastos transformados fue por resistencia a fleomicina, pero tal y como se ha indicado anteriormente, las construcciones pSfaeA y pSfaeB no contienen el gen *ble* de resistencia a fleomicina, ni ningún otro gen que confiera resistencia a antibióticos, lo que hace necesario la cotransformación de estas construcciones con otro plásmido que sí contenga el gen *ble*. El plásmido elegido para ello fue el plásmido pJL43 que otorga resistencia al antibiótico fleomicina, ya que contiene el gen *ble* en su construcción (Gutiérrez *et al.*, 1991a). Dicha cotransformación permite seleccionar a los transformantes de una forma rápida y sencilla por resistencia a la fleomicina (ver apartado 15.3 de Materiales y Métodos).

En cada uno de los experimentos de transformación se utilizaron controles positivos y negativos, para verificar la ausencia de protoplastos revertientes (colonias de mutantes espontáneas resistentes al agente de selección empleado), la sensibilidad frente a dicho agente y la viabilidad de los protoplastos usados en la transformación. También se realizaron ensayos de resistencia de los protoplastos a diferentes concentraciones de fleomicina (0,5–50 µg/mL). Se observó que los protoplastos (sin transformar) no crecían a concentraciones superiores a 30 µg/mL, por ello se estableció como concentración óptima de fleomicina para la selección de protoplastos transformados la concentración de 35 µg/mL.

Esta técnica permitió obtener numerosos transformantes, de los cuales se seleccionaron 100 de cada tipo (pSfaeA y pSfaeB) al azar y se replicaron para posteriormente realizar ensayos de actividad FAE en alguno de ellos.

3. Bioensayo de la actividad FAE en los transformantes de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 sobreexpresados en *faeA* y *faeB*

Se realizó un análisis inicial de la actividad FAE de transformantes con el fin de identificar aquellos con una actividad FAE más elevada. Se eligieron 48 transformantes de la línea A (*pSfaeA*) y 48 de la línea B (*pSfaeB*) al azar y se llevó a cabo un bioensayo en medio EF con cada uno de ellos y por triplicado, según el protocolo descrito en el apartado 17.3 de Materiales y Métodos. Tras 12 días de incubación se observaron claramente los halos de hidrólisis producidos como consecuencia de la actividad FAE que libera el AF y etanol a partir del etilferulato presente en el medio.

A partir de estos resultados se determinó la potencia de hidrólisis, según lo indicado en el apartado 17.3 de Materiales y Métodos, de cada transformante analizado, teniendo en cuenta el carácter más cualitativo que cuantitativo del ensayo (Fig. 31). Cuanto mayor es la relación entre el diámetro del taco y el diámetro del halo, mayor es la potencia de hidrólisis.

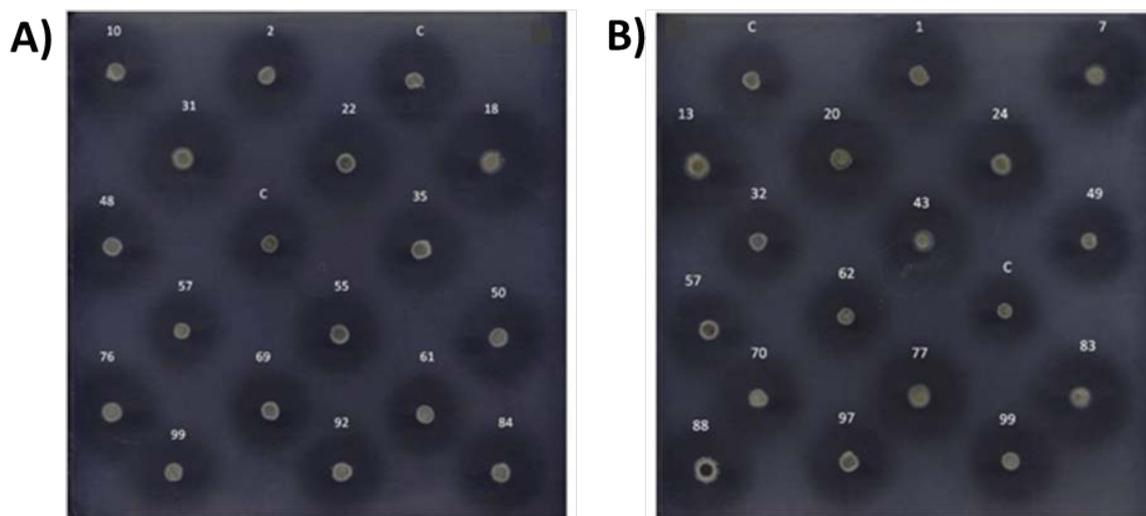


Fig. 31: Halos de hidrólisis de los transformantes sobreexpresados para los genes *faeA* y *faeB*. Ejemplos de halos de hidrólisis observados en el método de bioensayo en medio etilferulato-agar de algunos de los 48 transformantes elegidos de la línea A (*P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 sobreexpresados en *faeA*) (A) y de la línea B (*P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 sobreexpresados en *faeB*) (B). Se utilizó la cepa parental *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 como control (C).

Estos resultados (Fig. 32) sirvieron para seleccionar aquellos transformantes con una mayor actividad FAE respecto de la cepa parental *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255. Estos transformantes son los que se utilizarán posteriormente para estudios más profundos tanto de expresión génica como de actividad enzimática FAE.

En base a los resultados obtenidos se seleccionaron los transformantes con mayor actividad FAE para los ensayos posteriores. Para la línea A, se seleccionaron los siguientes transformantes: A1, A18, A31, A68, A71, A76, A77, A78, A84 y A94 y para la línea B, los transformantes: B1, B7, B10, B13, B17, B20, B27, B77, B83 y B88. Con dichos transformantes se procedió a realizar un análisis genético para comprobar la correcta integración del casete de sobreexpresión. Dichos análisis se describen a continuación.

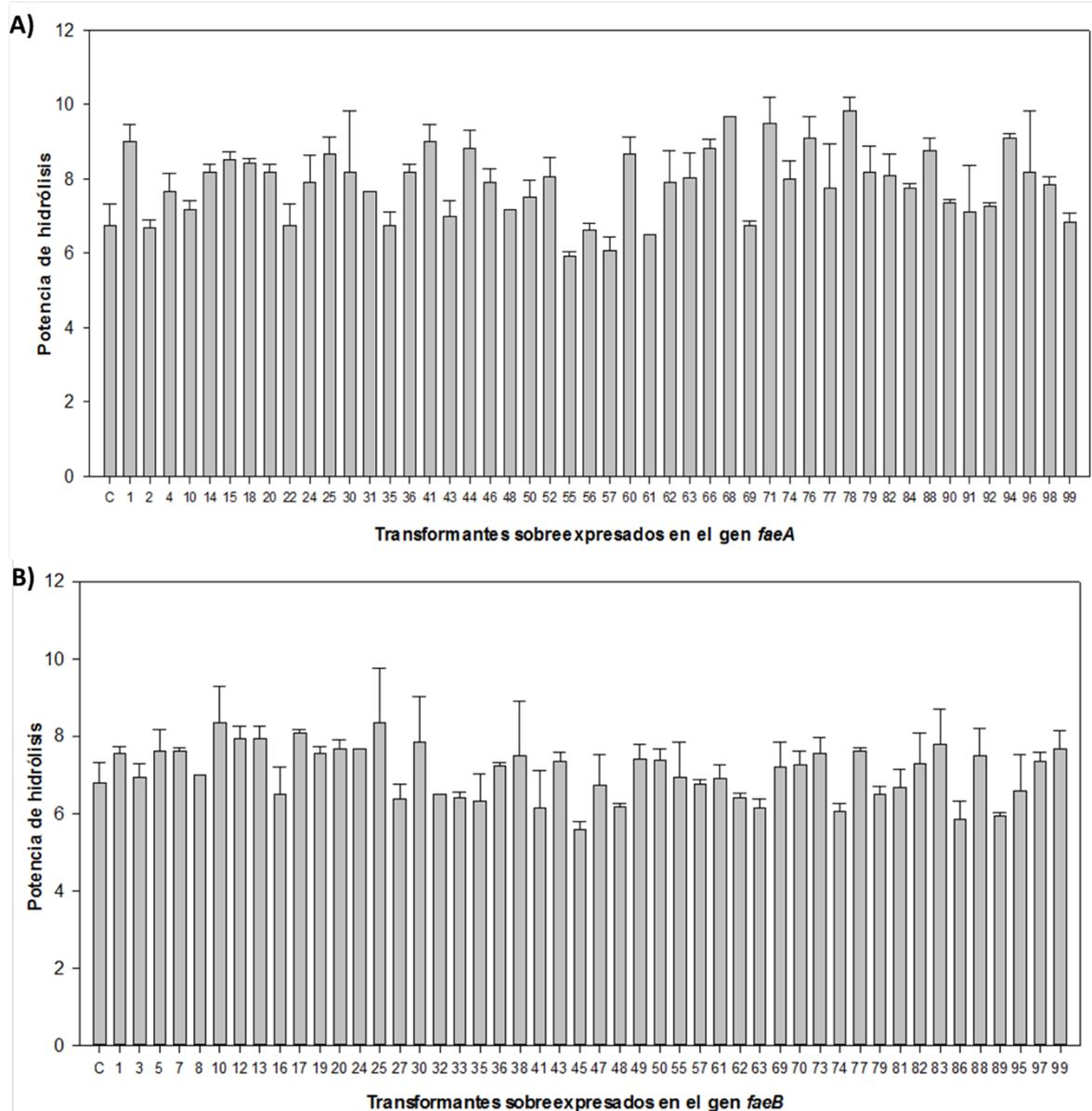


Fig. 32: Actividad FAE de los transformantes sobreexpresados. Actividad FAE de los transformantes sobreexpresados con pSfaeA (A) y con pSfaeB (B) medida a través de la potencia de hidrólisis del etilferulato. C= Control (Cepa parental *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255).

4. Análisis mediante hibridación de *Southern* de los transformantes de las líneas A y B. Comprobación de la completa inserción del casete de sobreexpresión

La hibridación de ADN mediante la técnica de *Southern Blot* permite comprobar la integración completa del casete de sobreexpresión de los genes *faeA* y *faeB* dentro del genoma del *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255.

A partir de los resultados obtenidos en el bioensayo se eligieron los 10 transformantes de cada línea: A y B (ver apartado 3) con una mayor potencia de hidrólisis del EF y menor desviación entre las réplicas y por lo tanto *a priori* una mayor actividad FAE. Dichos transformantes se analizaron mediante hibridación de *Southern* (ver protocolo apartado 16 de Materiales y Métodos).

Para llevar a cabo esta técnica en primer lugar se extrajo el ADN genómico de todos ellos y se digirió con las enzimas de restricción *HindIII-ApaI*. Seguidamente dicho ADN, ya digerido, fue resuelto mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7%. Posteriormente el ADN fue transferido mediante vacío a un filtro de nilón y se fijó al mismo irradiándolo con luz ultravioleta. El ADN ya transferido y fijado se hibridó con una sonda (marcada con digoxigenina) correspondiente a los genes *faeA* (Fig. 33) y *faeB* (Fig. 33C) para los ADNs provenientes de los transformantes de la línea A y B respectivamente (véase protocolo completo en el apartado 16 de Materiales y Métodos).

El resultado de la hibridación de *Southern* en el caso de los transformantes de la línea A mostró que la cepa parental *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 presenta una única banda de hibridación de 5.8 kb (Fig. 33B, carril 1) correspondiente al gen *faeA* endógeno (Fig. 33A). La misma banda aparece en todos los transformantes analizados, lo que indica que en éstos el gen endógeno está intacto y no se ha visto alterado como consecuencia de la transformación. Los transformantes A68 (Fig. 33B, carril 5), A76 (Fig. 33B, carril 7) y A78 (Fig. 33B, carril 8) además de la banda endógena, presentan bandas de hibridación adicionales siendo la banda de 1995 pb la correspondiente a la correcta integración del casete de sobreexpresión del gen *faeA* sin reorganización alguna (Fig. 33A). En el caso de los transformantes de la línea B el análisis de la hibridación de *Southern* muestra una banda de hibridación de 4.1 Kb correspondiente al gen endógeno *faeB* presente tanto en la cepa parental *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 como en los transformantes (Fig. 33D). Además, los transformantes B1 (Fig. 33D, carril 2), B7 (Fig. 33D, carril 3), B10 (Fig. 33D, carril 4), B13 (Fig. 33D, carril 5), B20 (Fig. 33D, carril 7), B77 (Fig. 33D, carril 9) y B83 (Fig. 33D, carril 10), presentan una banda de hibridación de 2705 pb correspondiente al casete de sobreexpresión del gen *faeB* (Fig. 33C). Sin embargo, los transformantes B17 (Fig. 33D carril 6), B27 (Fig. 33D carril 8) y B88 (Fig. 33D carril 11) no presentan dicha banda.

Los transformantes A68, A76, A78, B1, B7, B10, B13, B20, B77 y B83 contienen el casete de sobreexpresión correctamente integrado en su genoma. Además, se observa que en estos transformates no se ha visto afectado el gen endógeno como consecuencia del proceso de transformación.

Como análisis complementario se realizó la secuenciación de ambos plásmidos (pS*faeA* y pS*faeB*) con el fin de comprobar la completa integración del casete de sobreexpresión en el plásmido. Los resultados muestran que el casete se encuentra correctamente integrado en ambos casos (resultados no mostrados).

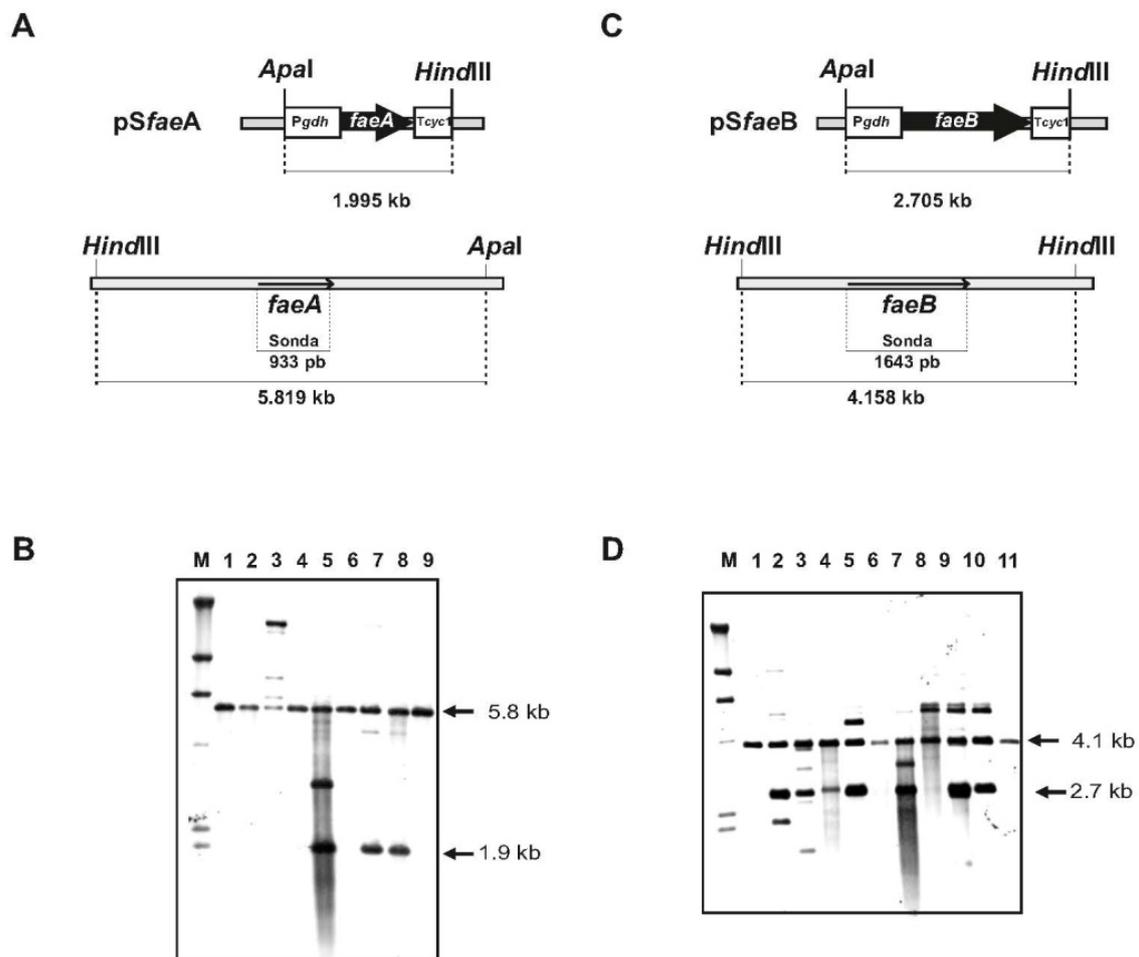


Fig. 33: Sobreexpresión de los genes *faeA* y *faeB* en *P. chrysogenum*. (A) Mapa físico del plásmido pS*faeA* para la sobreexpresión del gen *faeA* y esquema de la región del genoma de *P. chrysogenum* que contiene el gen *faeA*. Se indica el tamaño de la banda de hibridación del casete de expresión Pgdh-*faeA*-Tcyc1. (B) Hibridación de Southern del ADN total de 8 transformantes y de la cepa parental *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 con una sonda de 933 pb correspondiente a la secuencia del gen *faeA*: 1: Wisconsin 54-1255; 2: A1; 3: A18; 4: A31; 5: A68; 6: A71; 7: A76; 8: A78; 9: A84. (C) Esquema del plásmido pS*faeB*, que contienen el del casete de expresión Pgdh-*faeB*-Tcyc1, y de la región del genoma que contiene el gen *faeB*. (D) Hibridación de Southern del ADN total de 10 transformantes y de la cepa parental *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 con una sonda de 1643 pb correspondiente a la secuencia del gen *faeB*: 1: Wisconsin 54-1255; 2: B1; 3: B7; 4: B10; 5: B13; 6: B17; 7: B20; 8: B27; 9: B77; 10: B83; 11: B88. M: marcador de peso molecular lambda *HindIII* marcado con digoxigenina.

5. Cuantificación de la actividad enzimática FAE de varios transformantes de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 frente a diferentes sustratos

Tras la realización del bioensayo de actividad FAE y el análisis de la hibridación *Southern*, se seleccionaron los 3 transformantes de cada línea con mejores características para la realización de ensayos de actividad enzimática más específicos. Los transformantes seleccionados fueron: para la línea A: A68, A76 y A78 y para la línea B: B13, B77 y B83 (ver resultados apartado 4).

5.1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA FRENTE A PULPA DE REMOLACHA

Para cuantificar la actividad enzimática FAE de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 y los transformantes de la línea A y los de la B, se utilizó tanto un sustrato natural (PR) como un sustrato sintético (MFA).

Para la reacción enzimática con sustrato natural se mezcla un 2% de PR esterilizada con 3 mg de extracto enzimático de cada cepa a analizar (obtenido según el protocolo descrito en el apartado 20 de Materiales y Métodos) y se sigue el protocolo descrito en el apartado 21 de Materiales y Métodos. La reacción enzimática con MFA, sustrato sintético, se lleva a cabo según lo descrito en el apartado 21.1 de Materiales y Métodos, con los mismo extractos enzimáticos utilizados en el ensayo con el sustrato natural. Todos los ensayos se realizan por triplicado y con muestras control (sin extracto enzimático). La cuantificación de la cantidad de proteína presente en cada extracto se realizó mediante el método Bradford (véase apartado 23.2 de Materiales y Métodos) y la cuantificación del AF se realizó mediante HPLC (según lo descrito en el apartado 19 de Materiales y Métodos).

La actividad enzimática FAE resultante de los ensayos se muestra en la Fig. 34: frente a PR (Fig. 34A) y MFA (Fig. 34B). Dicha actividad se midió en *unidad de actividad enzimática* (U) por gramo de proteína total por gramo de sustrato para la PR y U por gramo de proteína total cuando el sustrato es MFA. Una U se describe como la cantidad de enzima que es capaz de liberar 1 μmol de AF en un tiempo de 1 minuto.

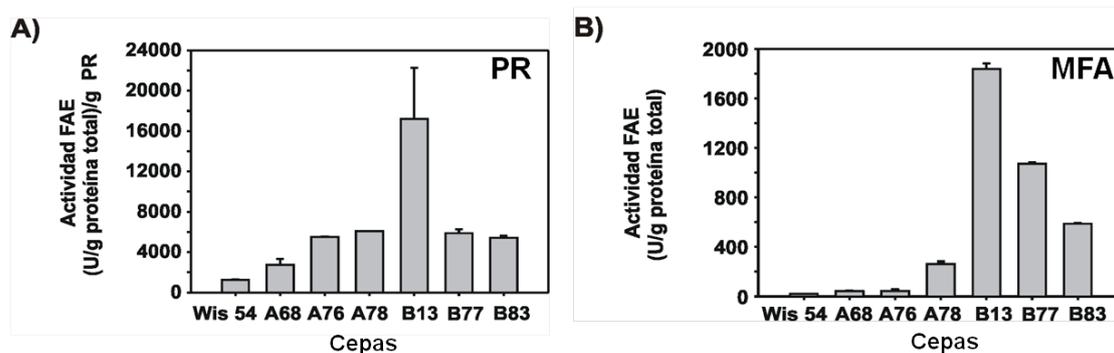


Fig. 34: Actividad FAE de los extractos enzimáticos de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 y sus transformantes A68, A76, A78, B13, B77 Y B83 frente a los sustratos PR (A) y MFA (B). U: Unidades, cantidad de enzima que es capaz de liberar 1 μ mol de AF en un tiempo de 1 minuto. PR: pulpa de remolacha; MFA: metil-ferulato.

Los resultados del ensayo (Fig. 34) muestran que cuando el sustrato es PR tanto las cepas de la línea A como las de la línea B muestran una mayor actividad FAE multiplicando la actividad por dos en el caso del transformante A68 y por más de cuatro en el resto. Cuando el sustrato es MFA las cepas de la línea B destacan sobre las de la línea A, ya que si bien presentan más actividad que la cepa parental Wisconsin 54-1255, en el caso de las de la línea B la actividad FAE está más incrementada. No obstante, la cepa que destaca por encima de todas es la B13 tanto con sustrato natural PR (Fig. 34A) como con el sintético MFA (Fig. 34B). Este transformante multiplica por más de 90 y por 14 la actividad FAE de la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 cuando el sustrato es MFA o PR respectivamente.

5.2 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA FRENTE A MARRO DE CAFÉ

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en cuanto a producción de FAEs utilizando PR como fuente de carbono inductora de su producción, se decidió utilizar marro de café (MC) como sustrato vegetal en lugar de PR. La cepa parental y los transformantes B13 y A78, se fermentaron en medio MMC (contiene MC) tras inocularlos con micelio previamente crecido en MPPY. Finalizada la fermentación se recogieron los extractos siguiendo indicaciones del apartado 20 de Materiales y Métodos, para posteriormente medir la actividad enzimática FAE frente a MC, cuantificando la liberación de AC y AF mediante análisis de HPLC (apartado 19 de Materiales y Métodos).

Los resultados experimentales muestran una baja liberación de ambos ácidos clorogénicos (Fig. 35), tanto el cafeico (Fig. 35A) como el ferúlico (Fig. 35B), como consecuencia de una baja actividad FAE de los extractos enzimáticos recuperados tras el crecimiento en el medio MMC. La cepa B13 muestra mayor actividad que la cepa parental, tanto en la liberación de AF como de AC, sin embargo, la A78 a penas muestra actividad.

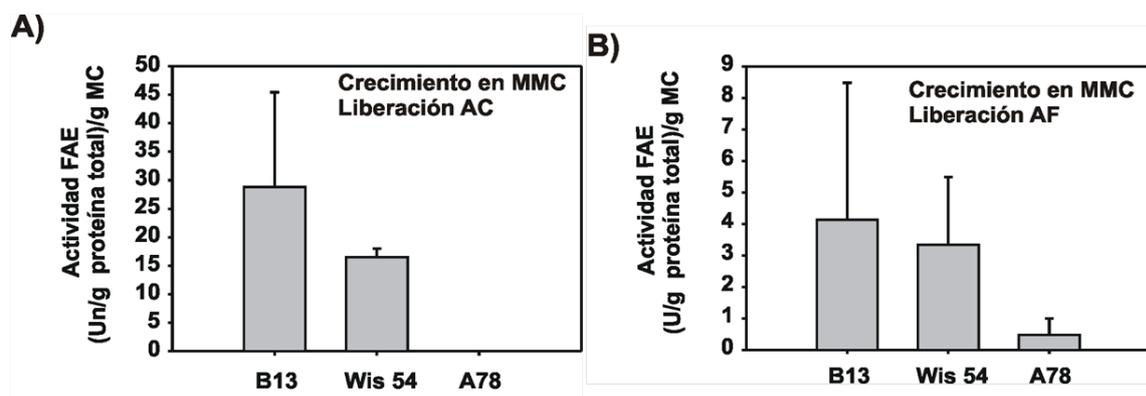


Fig. 35: Actividad FAE de los extractos enzimáticos de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 y los transformantes B13 y A78, frente al sustrato MC. Cuantificación de la liberación de AC (A) y AF (B). Un: Unidades, cantidad de enzima que es capaz de liberar 1 μ mol de ácido cafeico en un tiempo de 1 minuto; U: Unidades, cantidad de enzima que es capaz de liberar 1 μ mol de AF en un tiempo de 1 minuto; AC: ácido cafeico; AF: AF.

6. Análisis de expresión de los genes *faeA* y *faeB*

En los transformantes A78 y B13 se ha comprobado la correcta integración del casete de sobreexpresión de los genes *faeA* y *faeB* respectivamente (Fig. 33). Además, la evaluación de la actividad enzimática FAE indica que en ambos transformantes dicha actividad está incrementada. Para comprobar que dicho incremento en la actividad FAE es resultado de un incremento de la expresión de los genes *faeA* para A78 y *faeB* para B13, se decidió analizar la expresión de ambos genes mediante dos técnicas: hibridación de *Northern* y PCR en tiempo real. Los resultados de dichos análisis se muestran a continuación.

6.1. ANÁLISIS DEL ARN MEDIANTE HIBRIDACIÓN NORTHERN:

Mediante el uso de la técnica de hibridación *Northern* se pretende comparar la expresión de los genes *faeA* y *faeB* de la cepa parental *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 con los de las cepas sobreexpresadas para dichos genes A78 y B13, mediante el análisis del perfil de expresión de su ARN. Como control para normalizar los datos, se utilizó el gen *actA* que codifica la γ -actina y que es un gen que se expresa constitutivamente en *P. chrysogenum* (Díez *et al.*, 2001).

Para realizar este estudio de expresión se realizaron fermentaciones en matraz, por un lado, los transformantes de *P. chrysogenum* A78 sobreexpresado en el gen *faeA* y B13 sobreexpresado en el gen *faeB* y por otro lado la cepa parental *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 en condiciones de producción de FAEs. Se recogió el micelio de todos ellos a las 24, 48 y 72 horas de fermentación. Posteriormente se realizó la extracción del ARN total según el protocolo descrito en el apartado 17 de Materiales y Métodos. Una vez obtenido el ARN total se utilizó para realizar un estudio de la expresión de los genes mediante hibridación de *Northern*. Las sondas utilizadas para la hibridación fueron:

- Sonda *actA*: formada por un fragmento de ADN de 626 pb obtenido mediante PCR del ADN total de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255, utilizando los oligonucleótidos *actA-F* y *actA-R* (véase Tabla 3 y apartado 17.2 de Materiales y Métodos)

- Sonda *faeA* (Fig. 36A): corresponde a un fragmento de 359 pb de una región exónica del gen *faeA*. Dicha sonda se obtuvo mediante digestión del plásmido pSfaeA con las enzimas de restricción NheI y StuI.

- Sonda *faeB* (Fig. 36B): fragmento exónico de 627 pb del gen *faeB*. Dicha sonda se obtuvo mediante digestión del plásmido pSfaeB con las enzimas de restricción SphI y StuI.

La delimitación de los exones de los genes *faeA* y *faeB* se realizó mediante la utilización de bases de datos donde aparece la secuencia del ADN y del ADNc, al igual que el mapeo de los puntos de corte únicos de las enzimas de restricción. Se utilizó el programa Vector NTI (Invitrogen) para realizar las representaciones.

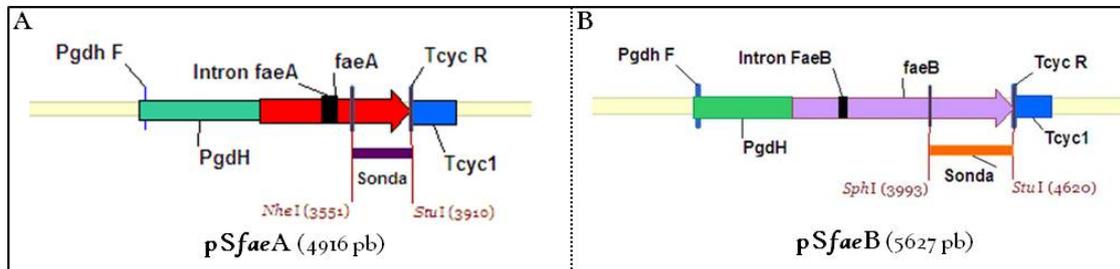


Fig. 36: Sondas Northern. (A) Representación lineal del plásmido pSfaeA: localización del intrón y de los puntos de corte de las enzimas de restricción *NheI* y *StuI* entre los que se encuentra la sonda *faeA* utilizada en la hibridación por northern (359pb). (B) Representación lineal del plásmido pSfaeB: localización del intrón y de los puntos de corte de las enzimas de restricción *SphI* y *StuI* entre los que se encuentra la sonda *faeB* utilizada en la hibridación Northern (627pb). Representación realizada con el programa Vector NTI (Invitrogen).

Los experimentos de hibridación *Northern* se realizaron siguiendo las indicaciones descritas en el apartado 17.2 de Materiales y Métodos.

El análisis de la hibridación *Northern* (Fig. 37A) para la sobreexpresión del gen *faeB* en la cepa B13 confirma que efectivamente el gen *faeB* tiene mayor nivel de expresión en el transformante que en la cepa parental Wisconsin 54-1255 (no se detecta ninguna banda de hibridación). De esta forma se demuestra que la sobreexpresión del gen *faeB* en la cepa B13 es correcta. En el caso del transformante A78 no se obtuvieron bandas de expresión ni para éste, ni para la cepa parental, pero sí se obtuvieron bandas en el control de actina (resultados no mostrados), probablemente las bandas de expresión no se detectaron debido a que el límite de detección de esta técnica podría ser superior a la expresión del gen *faeA*, por ello se decidió llevar a cabo una técnica de análisis de la expresión de ARN más sensible: PCR a tiempo real (ver apartado siguiente).

6.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ARN MEDIANTE RT-qPCR EN TIEMPO REAL.

Mediante la técnica de PCR es posible amplificar un segmento de ADN de manera exponencial, ya que después de cada ciclo se duplica la cantidad de ADN que existe si la reacción ocurre con máxima eficiencia. La realidad es que las reacciones de PCR alcanzan un *plateau* o meseta debido al agotamiento de los reactantes después de numerosos ciclos (Wittwer *et al.*, 1997), lo que se hace imposible calcular la cantidad de ADN de partida midiendo la cantidad de producto final.

Una de las ventajas de la técnica de PCR en tiempo real es la cuantificación de ARN. Bajo condiciones apropiadas, la cantidad de ADNc generado por transcripción reversa es proporcional al número de moléculas de ARN presente en una muestra dada. Dicho ADNc puede ser usado como molde para una reacción de PCR en tiempo real, utilizando su sensibilidad y precisión para determinar cambios en la expresión de genes. Esta técnica es conocida como RT-qPCR en tiempo real y se ha convertido en el método más popular para la cuantificación de los niveles de ARNm (Bustin, 2000).

Para determinar el nivel de expresión de los genes *faeA* y *faeB*, tanto en la cepa parental como en los transformantes A78 y B13 se llevó a cabo un estudio de RT-qPCR. Como control se utilizó el gen *actA* de expresión constitutiva de la proteína γ -actina, al igual que en el experimento de hibridación *Northern*. La extracción de ARN se realizó según lo indicado en el apartado 17.3 de Materiales y Métodos.

Este estudio permite el análisis de la expresión de los genes *faeA* y *faeB*, a través del análisis del ARNm presente en cada tiempo de fermentación. El ARNm es transcrito a ADNc gracias a la acción de la enzima retrotranscriptasa o transcriptasa reversa.

Los oligonucleótidos empleados como cebadores en las reacciones de PCR fueron: *Lact* y *Ract* para la amplificación de un fragmento del ADNc del gen *actA* de la proteína γ -actina de 626 pb; *LfaeA* y *RfaeA* para la amplificación de un fragmento del ADNc del gen *faeA* de la proteína PcFaeA de 842 pb y *LfaeB* y *RfaeB* para la amplificación de un fragmento del ADNc del gen *faeB* de la proteína PcFaeB de 533 pb (véase Tabla 3 de Materiales y Métodos y Tabla 12). El tamaño de los transcritos obtenidos para los diferentes genes analizados se puede ver en la Tabla 12.

El método de RT-qPCR usa moléculas de fluorescencia, en este caso SYBR verde, para monitorear la amplificación de productos durante cada ciclo de reacción. Esta técnica combina los pasos de amplificación de ADN y la detección en un único ensayo y evita tener que preparar geles de electroforesis para detectar los productos amplificados

Gen analizado	Oligonucleótidos	Tamaño transcrito
<i>actA</i>	<i>Lact/ Ract</i>	107 pb
<i>faeA</i>	<i>LfaeA/ RfaeA</i>	136 pb
<i>faeB</i>	<i>LfaeB / RfaeB</i>	100 pb

Tabla 12: Oligonucleótidos empleados en el análisis por RT-qPCR de la expresión de los genes *actA*, *faeA* y *faeB*.

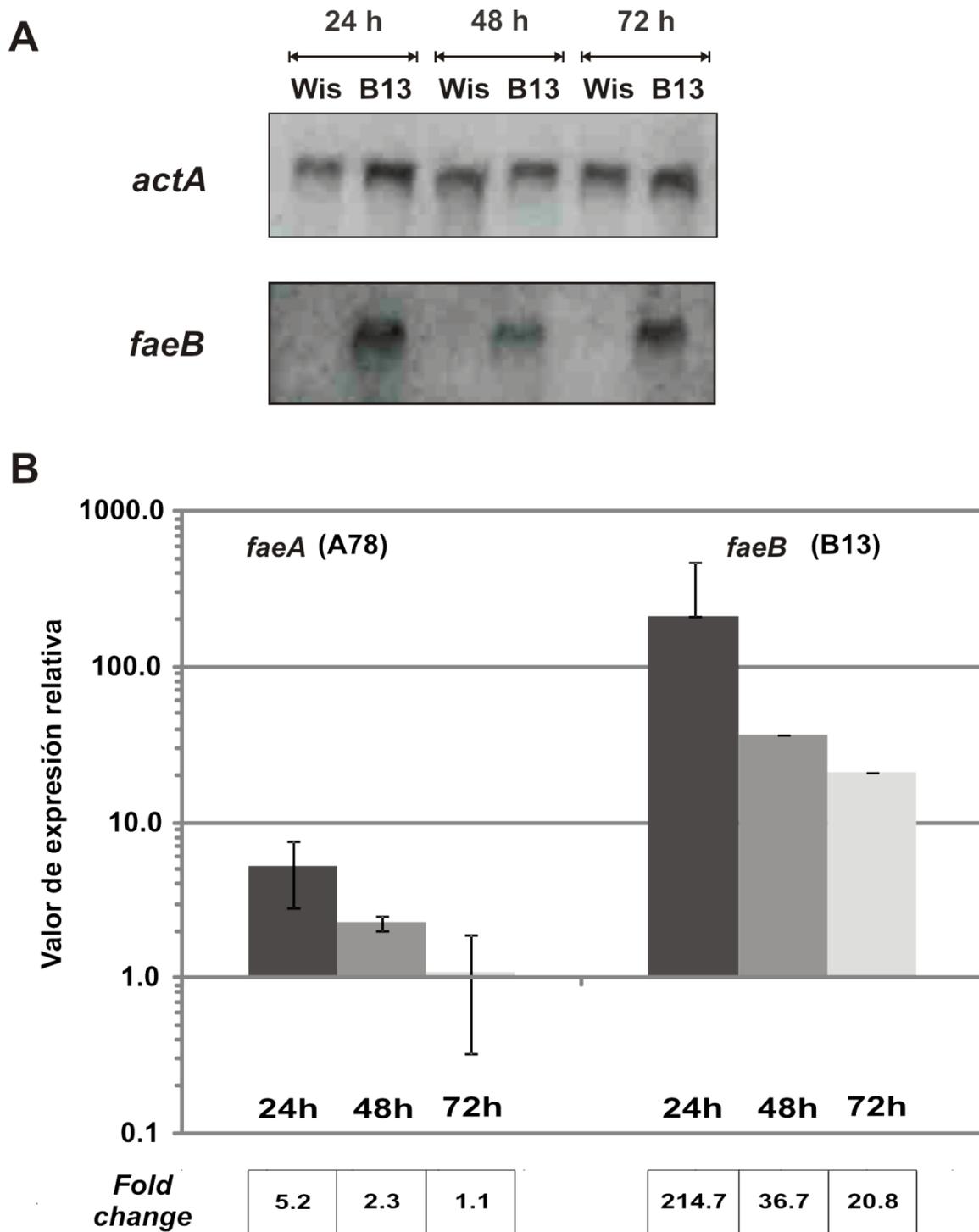


Fig. 37: Estudio de la expresión de los genes *faeA* y *faeB* en los transformantes A78 y B13 respectivamente junto con la cepa parental *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255. (A) Hibridación de northern del ARN total de la cepa B13 y de la cepa parental *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (Wis) con las sondas correspondientes a los genes *actA* y *faeB* a las 24, 48 y 72 h de fermentación en condiciones de producción de FAEs. (B) Análisis de la expresión de los genes *faeA* y *faeB* mediante RT-qPCR en los transformantes sobreexpresados en *faeA* (A78) y *faeB* (B13). Los valores relativos se refieren a 1, el valor relativo asignado para la expresión de cada gen *fae* en *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255. La expresión de *actA* (codifica Y- actina) se utilizó como control. Las barras de error se calcularon mediante la medición de la desviación estándar del valor de relación entre las tres muestras biológicas y tres repeticiones técnicas de cada muestra. Se indican los valores *fold change*.

El ciclo umbral es inversamente proporcional al número de copias iniciales del ADN muestra. Para calcular la concentración inicial de ARN de cada muestra se representaron los logaritmos de las concentraciones de ADN de cada uno de los genes analizados frente al ciclo umbral (Fig. 38A-C). El resultado es una recta cuya pendiente debe ser teóricamente igual a $-3,32$ en caso de obtener una eficiencia de amplificación (E) de 1,00. Se considera una E aceptable entre 0,92 y 1,00. El valor de la E para los genes analizados se muestra en la Fig. 38D y es igual a 1 para los tres genes analizados.

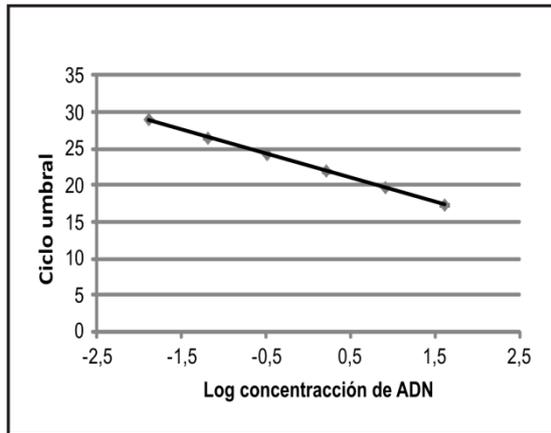
El nivel de expresión de cada gen analizado se relativizó frente al nivel de expresión en la cepa parental Wisconsin 54-1255, de esta manera se obtuvo el nivel de expresión que corresponde a cada transformante sobreexpresado o *fold change* (Fig. 37B).

La expresión del gen *faeA* en el transformante A78 (Fig. 37B) se ve aumentada 5,2 veces a las 24h de fermentación respecto a la expresión en la cepa parental Wisconsin 54-1255, a las 48h el incremento es de 2,3 veces, mientras que a las 72h de fermentación no se observa a penas incremento en nivel de expresión en el transformante que en la cepa parental Wisconsin 54-1255 (1,1 veces).

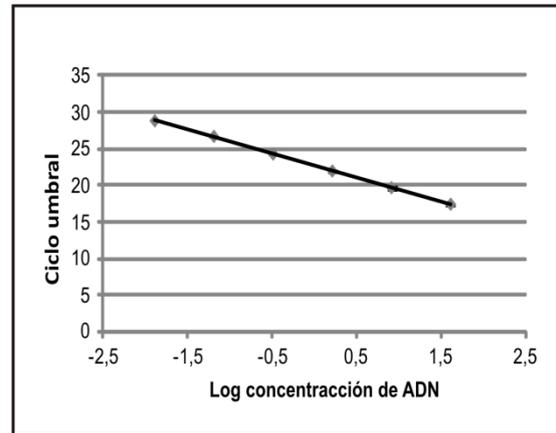
El análisis de la expresión para el gen *faeB* en el transformante B13 (Fig. 37B) muestra una reducción secuencial de los niveles de expresión respecto de las horas de fermentación, siendo a las 24h de 214,7 veces, a las 48h de 36,7 veces y a las 72h de 20,8 veces respecto a la expresión de la cepa parental Wisconsin 54-1255.

Tanto en el caso del transformante A78 como en el del transformante B13 se observa el máximo de expresión a las 24h de fermentación, lo que a su vez corresponde con el tiempo de mayor actividad FAE en las fermentaciones, como se verá en el siguiente apartado. Así mismo se observa que la expresión del gen *faeB* en el transformante B13 es 214 veces superior a la expresión en la cepa parental, lo que demuestra que la mayor actividad FAE observada en dicho transformante, efectivamente está directamente relacionada con un aumento en la expresión del ARN, al igual que en el caso del transformante A78, aunque en menor medida.

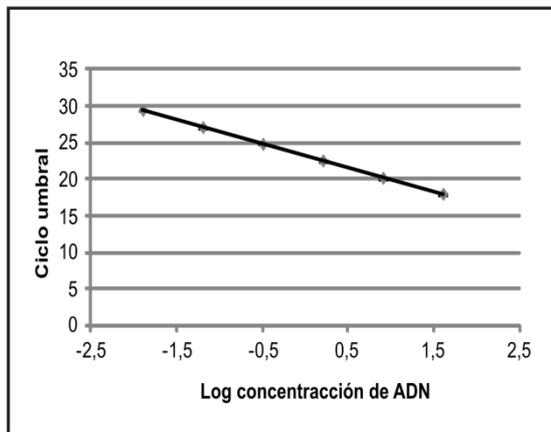
a *faeA*



b *faeB*



c *act*



d

	Slope	R^2	Eficiencia
LfaeA/RfaeA	-3.3104	0.999	1.00
LfaeB/RfaeB	-3.2856	0.999	1.01
Lact/Ract	-3.2855	0.999	1.01

Fig. 38: Eficiencia de la amplificación de la RT-qPCR. Representación de las concentraciones estándar de ADN con respecto al ciclo umbral para el cálculo de la eficiencia de amplificación para los distintos genes analizados: *faeA* (A), *faeB* (B) y actina (C). (D) Datos de la pendiente, R^2 y eficiencia de la amplificación para cada uno de los fragmentos de ADNc amplificados de los genes analizados.

III. ESCALADO DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE ALTOS NIVELES DE FAEs A PARTIR DE LA CEPA *P. chrysogenum* B13

La fermentación en matraz ha identificado las mejoras en la producción de FAEs por parte de los transformantes de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255. Sin embargo, durante el proceso de escalado de la fermentación son frecuentes los problemas derivados de la interacción del microorganismo productor con su medio de crecimiento y producción de manera indeseada, pudiendo causar resultados inesperados que lo hagan inviable desde un punto de vista económico.

Los estudios de escalado se han realizado en la Planta Piloto de INBIOTEC donde se localizan biorreactores altamente instrumentalizados. Un biorreactor es por definición un dispositivo biotecnológico que proporciona un ambiente controlado para garantizar y maximizar la producción de un determinado producto y/o el crecimiento de un cultivo vivo. Igualmente protege dicho cultivo del ambiente externo y además posee los controles necesarios para llevar a cabo el bioproceso de la forma más efectiva posible. En el presente trabajo se han utilizado 4 biorreactores Braun Biostat® B (5 litros) y un biorreactor Braun Biostat® C (20 Litros). Estos biorreactores (Fig. 39) permiten controlar el pH, el flujo de aire que entra en el biorreactor, la agitación y la temperatura durante todo el proceso fermentativo. Además, se realizaron medidas de oxígeno disuelto (OD) en el medio de cultivo durante el bioproceso. Las mediciones del OD se realizaron mediante un electrodo (*Braun Biostat pO₂ probe*) que se encuentra integrado en el biorreactor.



Fig. 39: Biorreactores: Braun Biostat® B 5L (izda.) y Braun Biostat® C 20 L (dcha.).

El transformante de la línea B, *P. chrysogenum* B13 muestra una producción óptima de FAEs que multiplica por más de 90 la actividad de la cepa parental (Fig. 34B) en fermentaciones

realizadas en matraz. Esta característica lo hace un candidato idóneo para el escalado del proceso fermentativo en los biorreactores de 5 y 20 L.

El proceso de escalado de la producción de enzimas con actividad FAE por parte de *P. chrysogenum* B13, se llevó a cabo en diferentes fases (ver apartado 22 de Materiales y Métodos):

- **Fase inicial o de reactivación del hongo**, en la cual se siembran las esporas conservadas a -80°C en un medio sólido de esporulación (PW2). El objetivo de esta fase es la reactivación del microorganismo con la consiguiente producción de esporas.

- **Fase de propagación**: en esta etapa las esporas fúngicas germinan en un medio líquido, concretamente MPPY, generando la masa micelial suficiente para ser empleada como inóculo en la siguiente fase de fermentación.

- **Fase de fermentación**: finalmente la masa micelial obtenida en la etapa anterior se inocula en un medio óptimo para la producción de FAEs y se lleva a cabo la fermentación. El inóculo de la masa micelial corresponde a un 10% del volumen inicial del biorreactor. En esta etapa tanto las variables del proceso, como los nutrientes, se ajustan para conseguir una buena secreción de las mencionadas enzimas de interés.

Las fermentaciones que se han llevado a cabo son las denominadas de tipo *batch* o en lotes. De modo que se introduce dentro del biorreactor la carga total del medio de cultivo e inóculo necesarios para cada proceso y se deja que se desarrolle el proceso fermentativo por el tiempo necesario, sin que exista ningún aporte externo de nutrientes o inóculo a lo largo del proceso, tan sólo las soluciones de ajuste de pH. Al tratarse de fermentaciones de tipo aerobio, se ha realizado un aporte de oxígeno continuo a lo largo de todo el proceso fermentativo para mantener la OD por encima del 40%.

1. Escalado en biorreactores de 5 L

En el paso de matraz a biorreactores de 5 L (con un volumen de trabajo de 3 L) se pretendía fijar los parámetros físicos de la fermentación (temperatura, OD, agitación, etc.) que, junto con el medio de cultivo, pretendían optimizar el proceso de producción de FAEs de la cepa *P. chrysogenum* B13. Para ello se realizaron ensayos de fermentación a pH libre y controlado y se analizaron los tiempos de fermentación para una producción óptima de FAEs.

1.1. DETERMINACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL CONTROL DE pH DURANTE LA FERMENTACIÓN:

Uno de los parámetros que se ha identificado como crítico para la actividad FAE a escala de matraz es el pH. Como consecuencia y con el fin de analizar el efecto del control de pH sobre la producción de FAEs, los primeros ensayos se realizaron con pH libre y pH controlado a 5,0 durante todo el proceso fermentativo. El pH se controló a 5,0 mediante la adición automática de soluciones diluidas de ácido (HCl 1N) y base (NaOH 1M). Las fermentaciones se realizaron en biorreactores de 5 L, con un volumen de trabajo de 3 litros. El medio de cultivo empleado fue medio MPR, con PR húmeda. La PR húmeda contiene, en suma, una menor cantidad de fuentes de carbono que la PR seca induciendo un menor crecimiento del hongo filamentoso. El objetivo inicial era una comparativa más directa con las fermentaciones realizadas en matraz. Por otro lado, la fermentación en los biorreactores Braun Biostat® B de la cepa *P. chrysogenum* B13 a pH libre permite ver la evolución del pH a lo largo del proceso fermentativo.

Como inóculo para llevar a cabo el proceso de fermentación en el biorreactor Braun Biostat® B se utilizó un 10% (v/v) de micelio obtenido en la fase de propagación, tras la germinación de las esporas de *P. chrysogenum* B13 en matraces con medio MPPY. Ambas fermentaciones se llevaron a cabo a una temperatura de 28°C y con agitación y aireación constantes de 300 rpm y 2,5 L/min, equivalente a 0,8 vvm (volumen de aire por volumen de medio por minuto). Tal y como se ha comentado anteriormente, el pH se mantuvo constante a 5,0 (Tabla 14) en un caso y libre en el otro, ajustando el pH inicial al 5,0 (Tabla 15). Además de estos parámetros se realizaron mediciones del oxígeno disuelto en el medio de fermentación.

Los procesos de fermentación se llevaron a cabo durante 96 h, tomando una muestra inicial, que sirve de referencia y muestras cada 24 h, con el fin de evaluar la evolución del proceso fermentativo.

a) Fermentación a pH 5,0:

Los resultados de la fermentación realizada a pH controlado a 5,0 (Tabla 14), muestran que el mayor crecimiento del hongo filamentoso se produce en las primeras 24 h, tal y como indica el dato de masa micelial (6,32 mg/mL) y el dato de OD en el medio que se corresponde con el valor más bajo del proceso. Todo ello indica una tasa metabólica más alta en este tiempo que en el resto del proceso. El metabolismo del hongo es muy activo y está utilizando la fuente de carbono presente en el medio de cultivo (PR) para multiplicarse, es decir, generar más masa micelial.

Tiempo (horas)	0	24	48	72	96
OD (%)	100	69±3,7	90±1,7	92±2,9	93±2,8
Base (NaOH 1M) (mL)		21±2,4	22±2,5	23±4,8	24±5,9
Ácido (HCl 1N) (mL)		93±9,2	120±3,7	130±3,7	140±3,7
Antiespumante. (mL)		-	-	-	-
Masa micelial (mg/mL)		6,325±0,190	5,175±0,077	4,715±0,318	3,710±0,424
Proteína total (mg/mL)		0,45±0,083	0,95±0,078	1,27±0,094	2,01±0,114

Tabla 13: Fermentación a pH 5. Valores numéricos exactos de los parámetros de la fermentación a lo largo de la misma: pH, OD (oxígeno disuelto), consumo de ácido, base y antiespumante, producción de masa micelial y proteína. Las fermentaciones se repitieron tres veces. Los resultados mostrados se corresponden con la media de tres mediciones.

Pasadas las primeras 24 h de proceso, se observa cómo hay un cambio en el metabolismo del hongo filamentoso. Deja de generar masa micelial y empieza a utilizar los nutrientes disponibles para producir enzimas, lo cual se ve reflejado en el incremento de proteína total que se observa entre las horas 48 y 96 del proceso, cuando la proteína total se incrementa de 0,95 a 2,01 mg/mL. Todas las muestras se visualizaron al microscopio para comprobar que este aumento en la proteína no fuera debido a la lisis del micelio.

No se observó formación de espuma durante el proceso, por lo que no fue necesaria la adición de antiespumante. Respecto al consumo de ácido y base para el ajuste de pH, se observa claramente cómo durante la fase de multiplicación se basifica el medio y se consume ácido para mantener el pH a 5,0 ya que *P. chrysogenum* tiende durante su crecimiento a un pH en torno a 7 (Miles y Trinci, 1983). Esta tendencia de basificación del pH se observa también en la Tabla 15 durante el proceso fermentativo a pH libre de *P. chrysogenum* B13.

b) Fermentación a pH libre:

Los resultados de la fermentación realizada a pH libre (Tabla 15), muestran que, al igual que en el caso anterior, el mayor crecimiento del hongo filamentoso se produce en las primeras 24 h, tal y como indica el dato de masa micelial (6,10 mg/mL). En este caso también se observa que corresponde con el menor valor de OD en el medio. Dichos parámetros indican que la fuente de carbono (PR) está siendo utilizada para la multiplicación del hongo filamentoso.

Tiempo(horas)	0	24	48	72	96
pH	5,00	6,00±0,25	7,58±0,34	7,80±0,16	7,72±0,42
OD (%)	100	89±4,8	97±2,4	97±1,7	98±0,95
Antiespumante (mL)	-	-	-	-	-
Masa micelial(mg/mL)		6,105±0,134	4,735±0,219	4,265±0,176	3,455±0,007
Proteína total (mg/mL)		0,87±0,052	1,89±0,127	2,12±0,282	2,59±0,381

Tabla 14: Fermentación a pH libre. Evolución de los parámetros de la fermentación a lo largo de la misma: pH, OD (oxígeno disuelto), consumo de antiespumante, producción de masa micelial y proteína. Las fermentaciones se repitieron tres veces. Los resultados mostrados se corresponden con la media de tres mediciones.

Se observa el mismo cambio en el metabolismo del hongo filamentoso que en el caso anterior, pasadas las primeras 24 h de proceso deja de generar masa micelial y pasa a producir enzimas extracelulares. En este caso también se observa un incremento de la proteína total entre las horas 48 y 96 del proceso, incrementándose de 1,89 a 2,59 mg/mL. Todas las muestras se visualizaron al microscopio y, al igual que en la fermentación a pH controlado, no se observó lisis del micelio.

La adición de antiespumante no fue necesaria puesto que no se observó formación de espuma durante el proceso. En el transcurso de la fermentación no se ejerció control alguno sobre el pH. Se detectó un aumento significativo de éste durante la fermentación pasando desde un pH ácido (5,00) al inicio hasta un pH ligeramente básico (7,72) al final de la misma (Tabla 15). Este incremento del pH indica que el crecimiento y la utilización de los sustratos por parte del hongo filamentoso tienden a alcalinizar el medio de cultivo, lo cual explica, como se indicó anteriormente, las adiciones altas de HCl 1N, necesarias para mantener el pH en 5,0 en las fermentaciones realizadas a pH 5,0 (Tabla 14).

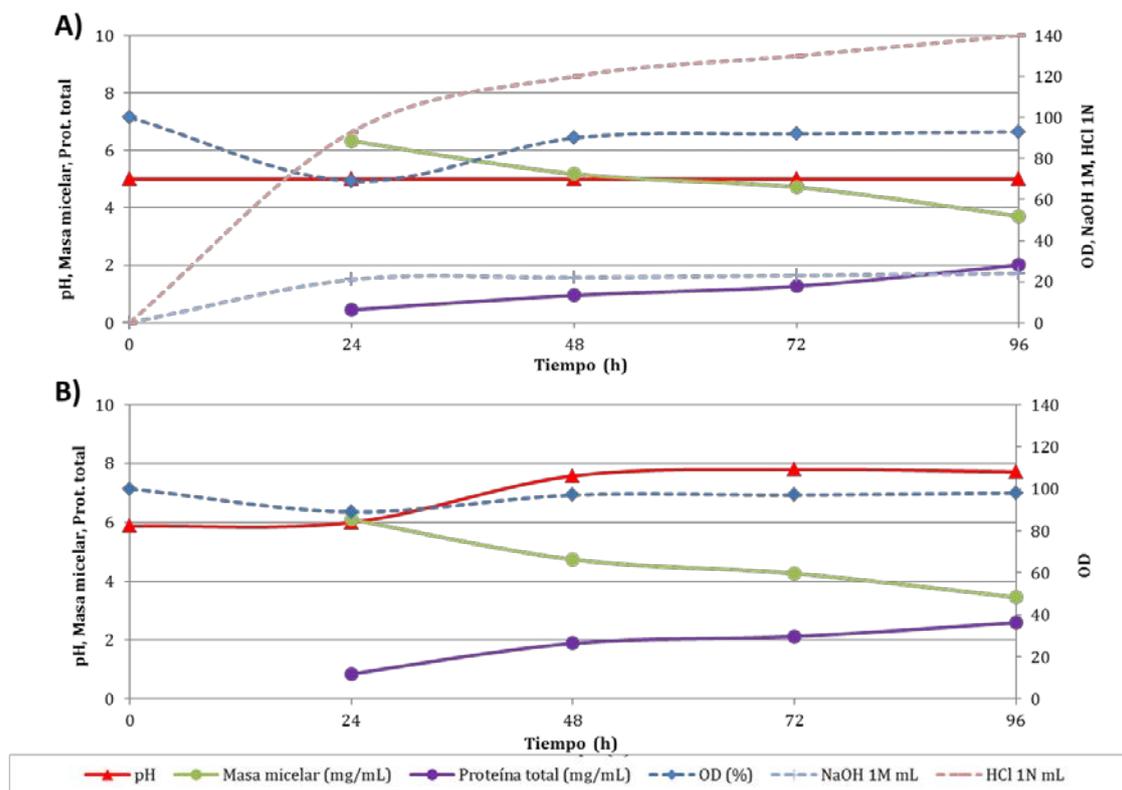


Fig. 40: Gráficas comparativas de la evolución de las fermentaciones. A) Fermentación a pH controlado de 5 y B) Fermentación a pH libre. En línea continua parámetros representados en el eje principal (pH, Masa micelial y Proteína total) y en línea discontinúa los parámetros representados en el eje secundario (OD, NaOH 1M y HCl 1N).

En el transcurso de ambas fermentaciones el nivel de oxígeno disuelto en el medio de cultivo se mantuvo en niveles del 69% al 98% para evitar una hipoxia que afectase a la supervivencia del microorganismo.

Se tomaron muestras cada 24 horas hasta las 96 horas de fermentación con un volumen de 40 mL. El procesado de dichas muestras se realizó filtrándolas a través de un filtro de nilón estéril de 0,45 μm de poro, para separar el micelio del caldo de cultivo. El micelio se colocó en un recipiente de aluminio y se secó en un horno a 80°C, para determinar la masa micelial (en peso seco) presente en los 40 mL de muestra y obtener los gramos de peso seco/mL de medio de cultivo (Tabla 14 y Tabla 15). La evolución de la masa micelial indica un crecimiento máximo a las 24 horas de fermentación, tanto con pH libre como controlado, momento que coincide con el valor más bajo de OD en el medio de fermentación

Por otro lado, se recuperó el extracto enzimático del caldo de cultivo siguiendo las indicaciones del apartado 20 de Materiales y Métodos. Una vez obtenido el extracto enzimático enriquecido en FAEs, se analizó su actividad FAE según las indicaciones descritas en el apartado 21 Materiales y Métodos frente a dos sustratos diferentes PR y MFA, con el fin de evaluar la calidad de los extractos enzimáticos obtenidos.

Los resultados indican una mayor actividad FAE a las 72 horas de fermentación y con el pH controlado a 5, tanto frente al sustrato natural: PR (Fig. 41A) como al sintético MFA (Fig. 41B).

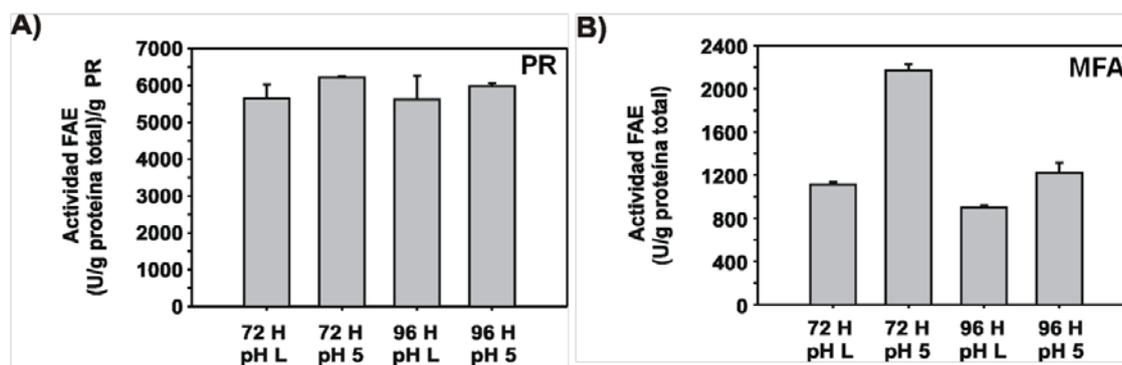


Fig. 41: Actividad FAE de los extractos enzimáticos en biorreactor de 5 L. Actividad FAE de los extractos enzimáticos de *P. chrysogenum* B13 recuperados de los biorreactores de 5 L a pH L (pH libre) y pH 5, frente a los sustratos natural: PR (A) y sintético: MFA (B). PR, pulpa de remolacha; MFA, metil-ferulato; U: Unidades, cantidad de enzima que es capaz de liberar 1 μmol de AF en un tiempo de 1 minuto. Los resultados mostrados se corresponden con la media de tres mediciones.

1.2. DETERMINACIÓN DEL MOMENTO ÓPTIMO DE RECOGIDA DEL CÓCTEL ENZIMÁTICO EN BIORREACTOR DE 5 L.

Una vez analizado el efecto del control de pH sobre el proceso fermentativo se decidió repetir la fermentación a pH 5 utilizando como medio de cultivo el medio MPR-2, que utiliza como fuente de carbono PR seca. La adición de PR seca permite que durante el proceso fermentativo *P. chrysogenum* B13 disponga de mayor cantidad de fuente de carbono y pueda generar masa micelial más rápidamente. La fermentación se realizó en un biorreactor Braun Biostat B de 5 L de capacidad y 3 L de volumen de trabajo. Las condiciones de fermentación fueron un pH controlado de 5, una aireación de 2,5 L/min (0,8 vvm) y una temperatura de 28°C. El inóculo se preparó según lo indicado en el apartado anterior. La agitación se fue aumentando a lo largo del proceso, partiendo en 300 rpm al inicio y subiendo a 400 rpm a las 22 horas de fermentación con el objeto de aumentar la difusión de oxígeno en el medio de cultivo y por tanto el OD con el fin de disminuir el riesgo de hipoxia por parte del microorganismo productor de FAEs (Tabla 15).

Tiempo (horas)	0	24	48	72
OD (%)	100	60±2,6	92±5,1	100±0,0
Agitación (rpm)	300	400	400	400
Base (NaOH 1M)		21±3,6	27±1,8	30±2,4
Ácido (HCl 1N)		13±1,3	32±1,1	43±6,7
Antiespumante. (mL)		1±0,0	1±0,0	1±0,0
Masa micelial (mg/mL)		12,576±1,120	10,429±0,980	5,656±0,470
Proteína total (mg/mL)		1,231±0,162	2,522±0,328	6,813±1,034

Tabla 15: Fermentación a pH 5 en fermentador de 5 L. Evolución de los parámetros de la fermentación a lo largo de la misma: pH, OD (oxígeno disuelto), agitación, consumo de ácido, base y antiespumante y producción de masa micelial y proteína. Las fermentaciones se repitieron tres veces. Los resultados mostrados se corresponden con la media de tres mediciones.

En el transcurso de la fermentación los niveles de oxígeno disuelto en el medio de cultivo se mantuvieron en niveles superiores al 60% (Tabla 15).

Como se puede observar en la Tabla 15, en las primeras horas de fermentación el hongo utiliza los nutrientes disponibles en el medio para crecer y generar masa micelial. Tal y como se ha observado en las fermentaciones anteriores el valor máximo de masa micelial también corresponde con los datos de la muestra de las 24 h (12,57 mg/mL), siendo en este caso, el valor de masa micelial de aproximadamente el doble que los casos anteriores, debido al uso de PR seca en el medio de cultivo.

Al inicio del proceso de fermentación se observó una ligera producción de espuma, por lo que fue necesario añadirle antiespumante (1 mL), sin que se volviera a observar formación de espuma a lo largo del proceso. Al igual que en el caso anterior, se observa una acidificación del

medio en la etapa inicial de crecimiento debido a la tendencia de *P. chrysogenum* a un pH más básico, como se ha comentado anteriormente.

A medida que el proceso de fermentación transcurre, la cantidad de proteína total aumenta hasta alcanzar el máximo a las 72 horas de fermentación. A este tiempo dicha proteína total no se corresponde con una mayor producción de enzimas extracelulares con actividad FAE por parte del hongo como se verá más adelante. Por otro lado, se puede observar que a partir de las 24 h de fermentación el OD del medio aumenta notablemente y la masa micelial disminuye, lo que indica una degradación progresiva de la masa micelial presente en el fermentador. Tras 72 h de fermentación, se observa el agotamiento del cultivo (OD=100%), y la masa micelial disminuye notablemente. Tras las primeras 24 h de fermentación iniciales, el cultivo presenta alguna limitación nutricional grave, que le impide seguir creciendo, seguramente se deba al consumo total de la fuente de carbono inicialmente añadida al medio de fermentación.

Durante el proceso fermentativo realizado a escala 5 L, con pH controlado a 5 y utilizando PR seca en el medio de cultivo, se tomaron muestras a las 24, 48 y 72 horas de fermentación que se procesaron según el procedimiento descrito en el apartado 20 de Materiales y Métodos. Las muestras obtenidas se analizaron con el fin de evaluar la calidad de la actividad FAE presente en las mismas. Una vez obtenido el extracto enzimático enriquecido en FAEs, se analizó su actividad FAE según las indicaciones descritas en el apartado 21 de Materiales y Métodos frente a un sustrato vegetal natural: PR, y uno sintético: MFA. Los resultados se pueden observar en la Fig. 42.

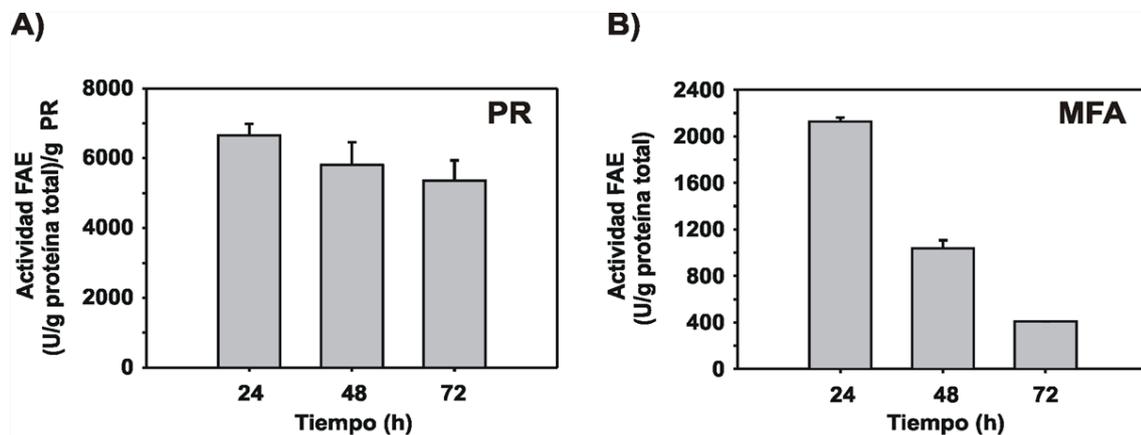


Fig. 42: Actividad FAE de los extractos enzimáticos de *P. chrysogenum* B13 recuperados de un biorreactor de 5 L a pH 5, frente a los sustratos PR (A) y MFA (B). PR: pulpa de remolacha; MFA: metil-ferulato; U: Unidades, cantidad de enzima que es capaz de liberar 1 μ mol de AF en un tiempo de 1 minuto. Los resultados mostrados se corresponden con la media de tres mediciones.

El análisis de los resultados de actividad FAE indica una mayor actividad a las 24 horas de fermentación frente a los sustratos ensayados (Fig. 42). Frente al sustrato PR existe un comportamiento similar de la actividad FAE en los tres tiempos analizados (Fig. 42A) sin embargo frente al sustrato sintético MFA (Fig. 42B) la actividad se reduce de forma notable a las

72 horas de fermentación. Como se puede observar la mayor liberación de AF se obtiene en extractos enzimáticos de 24 horas de fermentación indicando que la actividad FAE es máxima en este tiempo de fermentación (Fig. 42). Cabe mencionar que la actividad FAE procedente de extractos enzimáticos de 72 horas a pH controlado en fermentaciones con PR húmeda (Fig. 35) como fuente de carbono, es muy similar a la de 24 horas con PR seca (Fig. 37A y B). La conclusión es clara, el uso de PR seca acorta los tiempos de producción de extractos enzimáticos enriquecidos en FAE en formaciones con pH controlado a 5,0.

2. Escalado en biorreactores de 20 L

2.1. FERMENTACIÓN DE 20 L:

Una vez analizado el efecto del pH y de los medios de cultivo MPR y MPR-2 sobre la producción de FAEs, se decidió escalar la producción en fermentadores de 20 L, con volumen real de trabajo el 60% del volumen total del tanque, es decir, 12 L. Se utilizó el medio de cultivo MPR-2. Las condiciones de fermentación utilizadas fueron las mismas que en casos anteriores: pH controlado a 5,0, aireación de 10 L/min (0,8 vvm) y temperatura constante de 28°C.

El inóculo se preparó según lo indicado en los apartados anteriores, utilizando igualmente un 10% (v/v) de micelio de *P. chrysogenum* B13 obtenido en la fase de propagación. En este caso la agitación no se mantuvo constante a lo largo del proceso fermentativo, sino que se realizó una rampa de agitación: se partió de 300 rpm al inicio de la fermentación, posteriormente se subió a 350 rpm a las 10 horas de fermentación y finalmente se aumentó a 450 rpm. a las 22 horas de fermentación para mantener los niveles de OD por encima del 70% (Tabla 16).

El pH se controló automáticamente mediante la adición de soluciones diluidas de ácido (HCl 1N) y base (NaOH 1M). Se realizaron mediciones del OD presente en el medio de cultivo a lo largo del proceso de fermentación, usando la sonda descrita al inicio del apartado.

En este caso, la duración del proceso de fermentación se acortó a 72 h y se recogieron muestras cada 24 h, con el fin de analizar el estado de la fermentación.

Tiempo (horas)	0	24	48	72
OD (%)	100	75	89	100
Agitación (rpm)	300	450	450	450
Base (NaOH 1M)		58±6,8	21±1,0	11±1,4
Ácido (HCl 1N)		58±3,5	65±4,2	85±5,7
Masa micelial (mg/mL)		12,285±1,163	10,481±1,031	3,275±0,657
Proteína total (mg/mL)		2,19±0,053	1,30±0,127	0,12±0,042

Tabla 16: Fermentación a pH 5 en fermentador de 20 L. Evolución de los parámetros de la fermentación a lo largo de la misma: pH, OD (oxígeno disuelto), agitación, consumo de ácido y base y producción de masa micelial y proteína. Las fermentaciones se repitieron tres veces. Los resultados mostrados se corresponden con la media de tres mediciones.

Al igual que en las fermentaciones llevadas a cabo en biorreactores de 5 L, el momento de máxima producción de masa micelial coincide con las 24 horas de fermentación (Tabla 16). Durante el proceso fermentativo se tomaron muestras cada 24 horas que se procesaron según el procedimiento descrito en el apartado 20 de Materiales y Métodos. Una vez obtenido el extracto enzimático enriquecido en FAEs, se analizó su actividad FAE según las indicaciones descritas en el apartado 21 de Materiales y Métodos frente a PR y MFA.

2.2. CALIDAD DE LA ACTIVIDAD FAE DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS OBTENIDOS

Para las fermentaciones llevadas a cabo en el fermentador de 20 L los resultados de actividad FAE (Fig. 43) indican una gran similitud de la actividad FAE a las 24 y 48 horas de fermentación frente a los dos sustratos analizados: natural (PR) y sintético (MFA). Cabe mencionar que a las 72 horas no se detectó actividad significativa (datos no mostrados). Dicha actividad es ligeramente inferior cuando se utiliza PR como sustrato (A) si la comparamos con las fermentaciones realizadas en las mismas condiciones el fermentador de 5 L (Fig. 42A), sin embargo la diferencia es mayor si el sustrato empleado es MFA (Fig. 42B y Fig. 43B). En este caso el momento óptimo de recogida se situaría a las 24 horas de fermentación. No sería recomendable alargar la fermentación hasta las 48 horas ya que el ligero incremento de actividad FAE con respecto a las 24 h, no compensaría el gasto energético que suponen 24 horas más de fermentación en un proceso de producción.

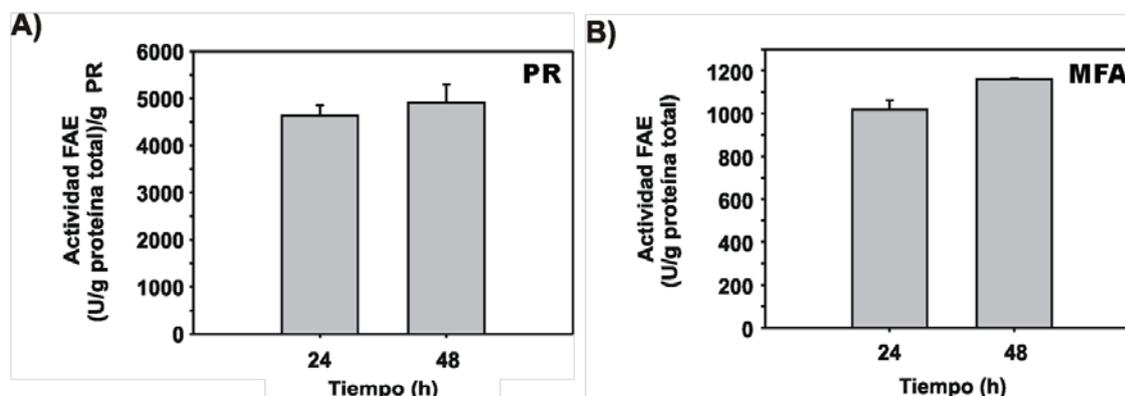


Fig. 43: Actividad FAE de los extractos enzimáticos de *P. chrysogenum* B13 recuperados del fermentador de 20 L a pH 5, frente a los sustratos PR (A) y MFA (B). PR, pulpa de remolacha; MFA, metil-ferulato; U: Unidades, cantidad de enzima que es capaz de liberar 1 μmol de AF en un tiempo de 1 minuto. Los resultados mostrados se corresponden con la media de tres mediciones.

3. Comparativa de la actividad enzimática de FAEs de *P. chrysogenum* con la de las enzimas comerciales

Todos los ensayos realizados hasta el momento revelan que la cepa *P. chrysogenum* B13 produce extractos enzimáticos con alta actividad FAE. Con el fin de comparar la actividad FAE de las enzimas comerciales con la del extracto enzimático de la cepa B13, se realizó una mezcla de enzimas comerciales y se ensayó frente al sustrato natural PR cuantificando la liberación de AF por HPLC según el método descrito en el apartado 19 de Materiales y Métodos.

Existen muy pocas empresas que comercialicen cócteles enzimáticos o enzimas con actividad FAE. Para este ensayo se eligió la empresa BIOCATALYSTS (Reino Unido) que comercializa la enzima DEPOL 740L, (D740L. FAE, adquirida en forma líquida). Además, esta misma empresa posee preparados enzimáticos con otro tipo de enzimas relacionadas con la degradación de la pared celular vegetal, como son: DEPOL 667P (D667P. β -glucanasa) y 680P (D680P. α -amilasa, amiloglucosidasa y xilanasa).

Para la realización del experimento se mezclan las tres enzimas comerciales: DEPOL 740L, 667L y 680L, enzimas habitualmente encontradas en cocteles enzimáticos con actividad celulasa. Las diluciones de las enzimas y la cantidad usada de cada una de ellas en la reacción se realizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante. La finalidad de esta mezcla es realizar la comparación con el cóctel enzimático procedente de la cepa B13 de *P. chrysogenum*. Para la cepa B13 se utilizaron cócteles enzimáticos obtenidos tras 24 y 48 h de fermentación, en fermentaciones realizadas en un fermentador Braun Biostat C.

El análisis de los resultados muestra que el cóctel enzimático procedente de *P. chrysogenum* B13, tienen una actividad FAE del orden de 3 a 4 veces mayor que la mezcla de enzimas comerciales D740L, D667P y D680P, cuando el sustrato es PR (Fig. 44A).

Adicionalmente se analizó la actividad FAE procedente de la cepa *P. chrysogenum* B13 y la de la marca comercial D740L frente al sustrato sintético MFA (Fig. 44B). Como en el caso anterior la liberación de AF se cuantificó mediante HPLC según el método descrito en el apartado 19 de Materiales y Métodos. Los resultados muestran nuevamente que la actividad FAE de la cepa *P. chrysogenum* B13 supera a la actividad de la FAE comercial D740L en los términos ensayados y según recomendaciones del fabricante. Dicha actividad se multiplica por más de cuatro, repitiendo los resultados obtenidos frente al sustrato natural PR.

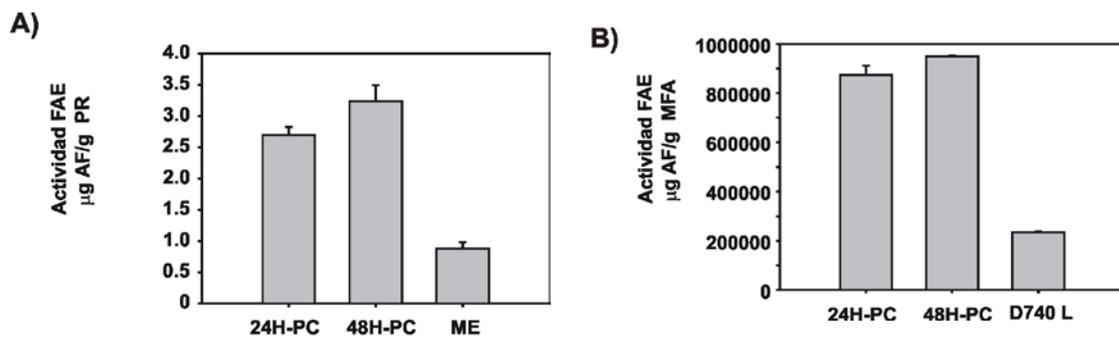


Fig. 44: Comparativa de la actividad FAE de los cócteles enzimáticos de *P. chrysogenum* B13 recuperados del fermentador de Braun Biostat C a pH 5, y de las enzimas comerciales DEPOL 740L, (D740L. Feruloil esterasa, adquirida en forma líquida), DEPOL 667P (D667P. β -glucanasa) y 680P (D680P. α -amilasa, amiloglucosidasa y xilanasa) frente a los sustratos PR (A) y MFA (B). PR, pulpa de remolacha; MFA, metil-ferulato; 24H-PC extractos enzimáticos de 24 horas; 48H-PC extractos enzimáticos de 48 horas; ME, mezcla de enzimas D740L, D667Py D680P. Frente a MFA únicamente se utilizó la enzima comercial D740L. Los resultados mostrados se corresponden con la media de tres mediciones.

IV. ANÁLISIS DEL PROTEOMA EXTRACELULAR DE *Penicillium chrysogenum* EN CONDICIONES DE PRODUCCIÓN DE FAES

El estudio del proteoma de un organismo es mucho más complejo que el análisis de su ADN o ARN. Mientras que las moléculas de ADN y ARN se construyen mediante un ordenamiento variable de sólo cuatro componentes estructurales invariables (desoxinucleótidos y nucleótidos respectivamente), las moléculas de proteínas presentan una diversidad estructural extraordinaria que se manifiesta en varios niveles de complejidad: a nivel de estructura primaria por los posibles ordenamientos de 20 residuos de aminoácidos a los que se suman todas las variantes de modificaciones post-traduccionales posibles. Y a nivel de estructura espacial, altamente variable según la actividad biológica.

Una de las técnicas muy utilizadas hoy en día en proteómica se basa en el uso de la electroforesis bidimensional (2-DE) y la espectrometría de masas. Dichas técnicas ya han sido utilizadas anteriormente con éxito en nuestro laboratorio para el análisis del proteoma y el secretoma de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (Jami *et al.*, 2010a)(Jami *et al.*, 2010b).

En el presente trabajo nuestro punto de interés se centra en el secretoma de *P. chrysogenum*, tanto de la cepa parental Wisconsin 54-1255, como de la cepa B13, sobreexpresada con el gen *faeB*, puesto que las FAEs son proteínas que son secretadas al medio por estos microorganismos con el fin de degradar la materia vegetal presente en el mismo y de este modo obtener nutrientes fácilmente asimilables.

Con el fin de identificar las diferencias existentes entre la cepa parental Wisconsin 54-1255 y la cepa B13 se llevó a cabo la comparación de ambos secretomas mediante la técnica de DIGE, y por otro lado se analizó el secretoma completo de la cepa B13 identificando todas las proteínas presentes en el secretoma cuando la cepa se crece en condiciones de producción de FAEs.

1. Comparativa entre el secretoma de la cepa parental Wisconsin 54-1255 y el transformante B13

Se llevaron a cabo varias fermentaciones de ambas cepas, Wisconsin 54-1255 y B13, en medio PR para la producción de FAEs (ver apartado 22 de Materiales y Métodos) con el fin de analizar las proteínas que son secretadas por ambos microorganismos al medio bajo condiciones de producción de FAEs. Todos los experimentos se realizaron por cuadruplicado. Tras las fermentaciones se recuperaron los extractos enzimáticos de las fermentaciones siguiendo las indicaciones descritas en el apartado 20 de Materiales y Métodos y se evaluó la cantidad de

proteína presente en cada extracto por el método Bradford (apartado 23.2 de Materiales y Métodos).

Para comprobar la calidad de los extractos enzimáticos, en primer lugar, se realizaron geles monodimensionales de todas las muestras y a continuación geles bidimensionales de algunas de las muestras. Para ello se utilizó la técnica de electroforesis bidimensional (2D) convencional con tiras de 18 cm de IPG (*Immobilized pH Gradient*) con un gradiente de pH de 3-10 NL (ver apartado 23.4 de Materiales y Métodos). Los geles resultantes se tiñeron en primer lugar con azul de Coomassie para evaluar si existía degradación proteica en alguna de las muestras. Una vez comprobada la calidad de los extractos enzimáticos de todas las réplicas se llevó a cabo la tinción 2D-DIGE (*Differential Gel Electrophoresis*) (ver apartado 23.5 de Materiales y Métodos). Esta técnica se basa en el marcaje diferencial de los extractos proteicos previamente a su separación por electroforesis bidimensional. En el 2D-DIGE en cada gel se analizan dos muestras a comparar, más un estándar interno consistente en una mezcla equimolar de todas las muestras a analizar, lo que permite la normalización de las señales de fluorescencia que generan las dos muestras que se están comparando (Alban *et al.*, 2003).

De cada cepa se analizaron cuatro réplicas biológicas con la misma cantidad de proteína cada una de ellas. Dos réplicas se marcaron con el fluorocromo Cy3 (rojo) y dos con el Cy5 (azul) con el fin de contrarrestar la posible afinidad de algunas de las proteínas por un fluorocromo en particular (Dye Swap). El patrón interno fue marcado con el fluorocromo Cy2 (amarillo). Se mezclaron los tres extractos (Cyc3, Cyc5 y Cyc2) y se sometieron a una separación por electroforesis bidimensional usando un gradiente de pH de 3-10 NL (Tabla 17). Los geles se escanearon usando el equipo *Ettan Dige Imager* (EDI) (GE Healthcare), que permite tanto la obtención de las imágenes de los tres fluorocromos por separado, como la superposición de los mismo para su comparación (Fig. 45).

Gel	Cyc3	Cyc5
1	Wisconsin 54-1255 (I)	B13 (I)
2	B13 (II)	Wisconsin 54-1255 (II)
3	Wisconsin 54-1255 (III)	B13 (III)
4	B13 (IV)	Wisconsin 54-1255 (IV)

Tabla 17: Electroforesis diferencial en gel (DIGE). Fluorocromos y muestras marcadas con cada uno de ellos y gel en el que fueron analizados.

El programa DeCyder™2D 7.0 (GE Healthcare) detectó aproximadamente 1174 puntos proteicos en cada uno de los 4 geles. Estos puntos proteicos corresponden a proteínas cuyo punto isoeléctrico está en rango de pH entre 3 y 10 y cuyo peso molecular está comprendido entre 13,5 y 270 kDa.

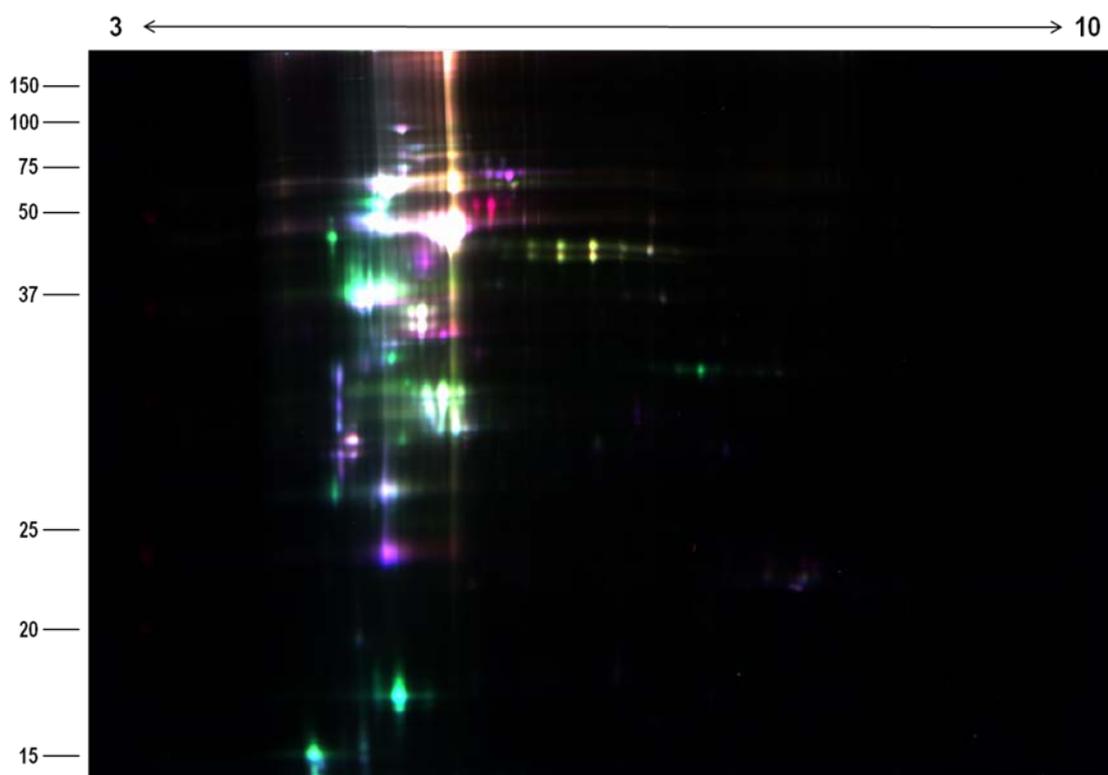


Fig. 45: Imagen del análisis 2D-DIGE del secretoma de *P. chrysogenum*: proteínas del secretoma de Wisconsin 54-1255 (azul), a cepa B13 (rojo) y control interno (amarillo).

Se realizó un análisis comparativo de los puntos proteicos de los geles de Wisconsin 54-1255 y de la cepa B13 ajustando los criterios de selección según las especificaciones de GE Healthcare que más se ajustaban a nuestro experimento: cambios significativos $p \leq 0,05$, una relación mayor que 1,5 o menor que -1,5, ANOVA $\leq 0,05$ y que los puntos estuvieran en el 70% de las imágenes de los geles. Dicho análisis señaló 10 puntos proteicos (Tabla 18) como proteínas de interés (POI), es decir, las diferencias significativas encontradas entre el secretoma de la cepa Wisconsin 54-1255 y la cepa B13 son de tan sólo 10 puntos proteicos de las 1174 identificadas, un 0,85% del total.

Punto proteico nº	t-test	Ratio	pI	MW (kDa)
344	0,0390	-1,53	5,9	86,9
345	0,0300	-1,54	6,0	86,6
404	0,0021	3,01	5,8	80,2
405	0,0043	2,89	5,8	80,2
406	0,0055	1,61	5,2	77,6
409	0,0056	4,49	5,7	80,2
411	0,0083	4,08	5,6	80,0
423	0,0470	2,96	5,5	77,6
427	0,0190	4,78	5,8	76,7
1058	0,0140	1,97	5,2	22,0

Tabla 18: Proteínas de interés resultantes de la comparativa entre el secretoma de la cepa parental *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 y su transformante B13.

Se realizó un gel preparativo que se tiñó con azul de Coomassie coloidal para extraer las POI y proceder a su identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight*), según lo descrito en el apartado 23 de Materiales y Métodos. De los 10 puntos identificados como proteínas expresadas diferencialmente, sólo se pudieron extraer 4, el resto no eran visibles en el gel. Tras analizar estos puntos proteicos mediante MALDI-TOF/TOF se obtuvo que dos de los puntos correspondían con la proteína PcFaeB (Pc12g08300) sobreexpresada en la cepa B13.

En la Fig. 46 se representan 3 de los 12 geles realizados: el control interno que emite la fluorescencia amarilla (Cyc2), la muestra de la cepa parental Wisconsin 54-1255 teñida en este caso con el fluorocromo rojo (Cyc3) y la muestra del transformante B13 teñida con Cyc5 (azul). Como se puede observar en la Fig. 46 B y C, la flecha señala los dos puntos proteicos en los que se encontraron diferencias significativas y que se ven mucho más intensos en el gel correspondiente al transformante B13 que en el gel de su cepa parental. Estas proteínas expresadas diferencialmente se corresponden con los puntos proteicos 409 y 427, cuyas características detalladas se describen en la Tabla 19.

Como se puede observar en la Tabla 19 los puntos 409 y 427 identificados en el NCBI como PcFaeB de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255, tienen un ratio positivo de 4,49 y 4,78 respectivamente, lo cual indica que la señal de fluorescencia es 4,49 y 4,78 veces más intensa en la cepa B13 que en la cepa Wisconsin 54-1255 y por lo tanto la expresión de la proteína PcFaeB. Estas diferencias se observan muy bien en la imagen tridimensional del gel obtenida con el programa DeCyder™ (Fig. 47): los picos rodeados con una línea amarilla corresponden a los puntos 409 y 427 y se encuentran mucho más pronunciados en los geles de la cepa B13

	Punto proteico	409	427
Datos: DeCyder™	t-test	0,0056	0,019
	Ratio	4,49	4,78
	pI estimado	5,7	5,8
	Peso molecular estimado (kDa)	80,169	76,681
Datos NCBI	Identificación	Pc12g08300	Pc12g08300
	Nº de acceso	gi 211582280	gi 211582280
	pI teórico	5,44	5,44
	Peso molecular teórico (kDa)	58,435	58,435
	Péptido señal	Sí	Sí
	Descripción	Alta similitud con el precursor de la tanasa de <i>Aspergillus oryzae</i>	Alta similitud con el precursor de la tanasa de <i>Aspergillus oryzae</i>

Tabla 19: Características de los puntos proteicos 409 y 427.

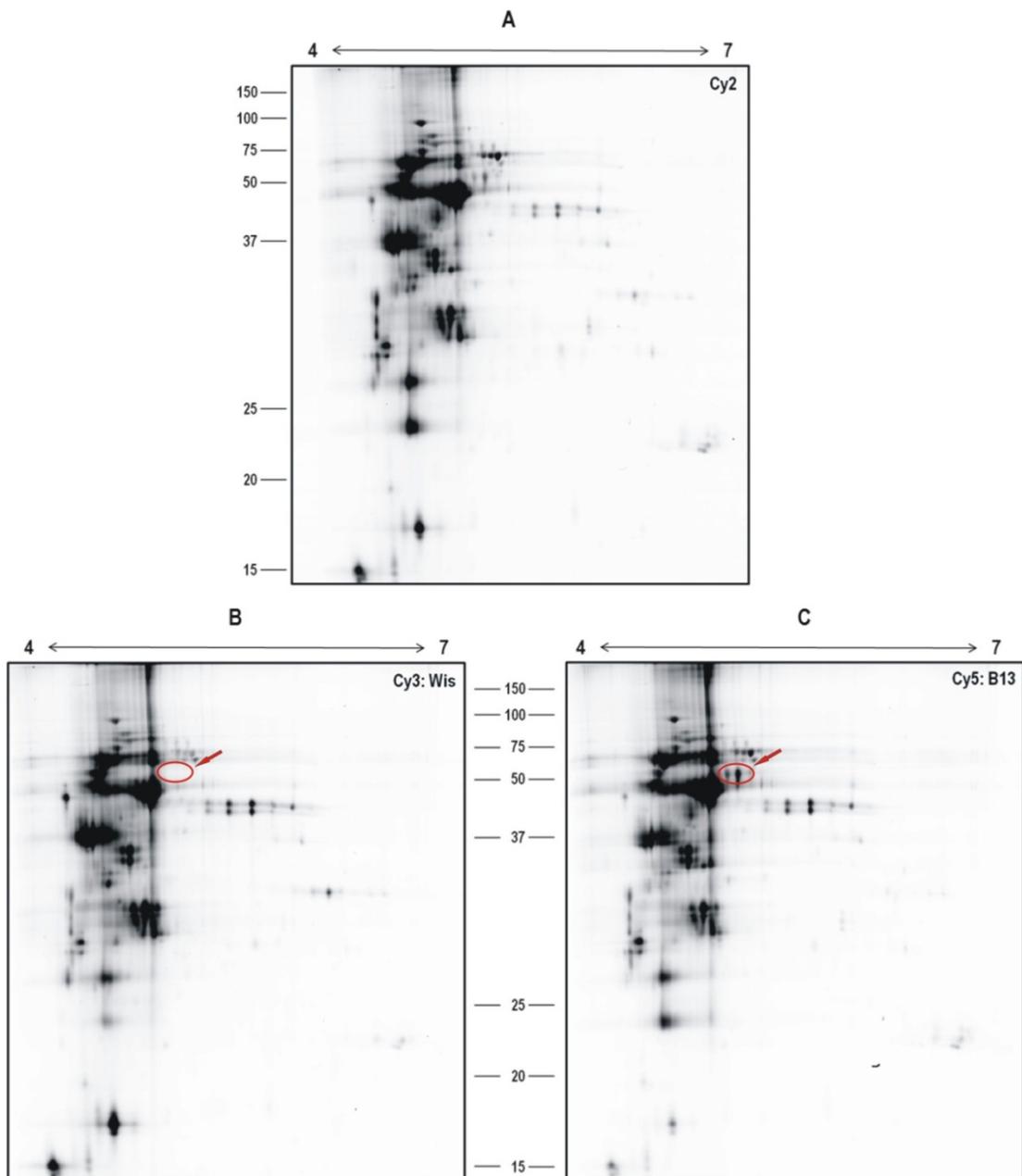


Fig. 46: Señales de fluorescencia individualizadas generadas por la tinción 2D-DIGE. (A) Control interno: fluorocromo Cy2 (amarillo). **(B)** Cepa Wisconsin 54-1255: fluorocromo Cy3 (rojo). **(C)** Cepa B13: fluorocromo Cy5 (azul).

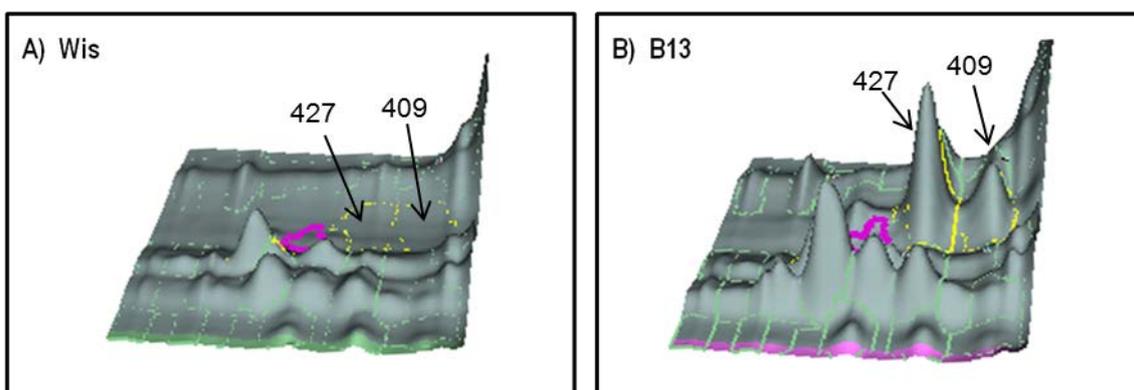


Fig. 47: Imagen tridimensional de los puntos proteicos 409 y 427: en color amarillo.

2. Análisis proteómico completo del extracto enzimático producido por la cepa *P. chrysogenum* B13

El análisis del secretoma aporta mucha información sobre el estado de un cultivo bajo unas determinadas condiciones de fermentación. Las FAEs son proteínas de secreción al medio de cultivo, así como el resto de enzimas encargadas de la degradación de la pared celular vegetal, como las celulasas, xilanasas, arabinasas, etc. Se sabe que todas estas enzimas juegan un papel muy importante en la degradación de la pared celular vegetal, por ello se decidió realizar un análisis completo del secretoma de la cepa B13 obtenido bajo condiciones de producción de enzimas FAEs y así conocer la composición proteica del extracto enzimático. Para ello se recuperó el extracto enzimático procedente de fermentaciones en medio PR de la cepa B13 en fermentaciones de 20 L (ver apartados 20 y 22).

2.1. OPTIMIZACIÓN DE LA PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS

Los extractos enzimáticos obtenidos se filtran y sus proteínas se precipitan con sulfato amónico al 80%, posteriormente se resuspenden las proteínas en buffer acetato 20 mM pH 5. Con el fin de optimizar la precipitación y limpiar los restos de sales que contengan las muestras y que puedan interferir posteriormente con los ensayos de proteómica, se realizan tres ensayos: uno con acetona, otro con TCA al 20% más DTT al 0,14% y por último utilizando el kit comercial Clean Up para la limpieza de muestras proteicas (apartado 23.1 de Materiales y Métodos).

Las muestras se desarrollan en un gel desnaturalizante para comprobar el estado de las muestras (Fig. 48). En las muestras precipitadas con acetona se observan dos fases, una superior de color verde y otra inferior de color amarillento, dichas fases se desarrollaron individualmente en el gel, como se puede observar en la Fig. 48.

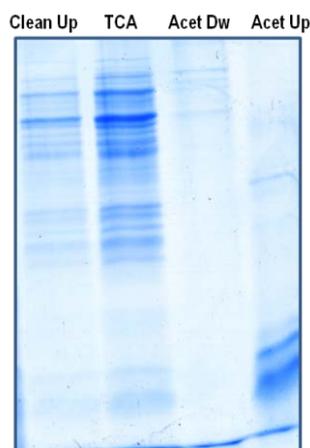


Fig. 48: Gel con muestras de diferentes métodos de precipitación y limpieza de muestras proteicas. De izquierda a derecha: muestra tratada con el kit comercial Clean Up; muestra tratada con TCA 20% + DTT 0,14%; muestra tratada con acetona: fase inferior (Acet Dw) y fase superior (Acet Up).

Dichas muestras presentan un aspecto extraño y fuera de la normalidad, por lo que el método de extracción con acetona es descartado. Entre el método Clean Up y el TCA, este último se desarrolla con mayor definición en el gel por lo cual será el método empleado para la precipitación y limpieza de las muestras utilizadas para el análisis del secretoma de la cepa B13.

2.2. COMPOSICIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO DEL TRANSFORMANTE B13

El extracto enzimático obtenido se analizó en dos pasos, en primer lugar, mediante electroforesis bidimensional (2-D): isoelectroenfoque (primera dimensión) y en segundo lugar mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (segunda dimensión). Se realizaron 3 réplicas con 3 extractos enzimáticos diferentes de *P. chrysogenum* B13. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie para la visualización de las proteínas.

En este caso, el isoelectroenfoque se llevó a cabo en tiras de gradientes de pH inmovilizados (IPG) de 18 cm, con un rango de pH de 4 a 7 no lineal (GE Healthcare), puesto que, como se ha observado en la tinción con 2DE-DIGE en el apartado anterior, la gran mayoría de las proteínas se encuentran dentro de este rango y tanto para la visualización, como la extracción de los puntos proteicos resultaba mucho más apropiado. Finalizada la primera dimensión se realizó una segunda dimensión de las tiras mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12,5% según lo descrito en el apartado 23.4 de Materiales y Métodos. Los geles obtenidos se tiñeron con azul de Coomassie coloidal para la visualización de los puntos. Posteriormente se escanearon todos los geles con un escáner ImageScannerII (GE Healthcare) y se numeraron todos los puntos proteicos con el software ImageMaster (GE Healthcare) para su posterior identificación.

Se extrajeron todos los puntos posibles del gel para proceder a su digestión con tripsina según el protocolo descrito en el apartado 23.6 de Materiales y Métodos y a su posterior identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF (apartado 23.8 de Materiales y Métodos).

El software detectó un total de 205 puntos (Fig. 49), de los cuales se pudieron extraer del gel 189 y se consiguieron identificar 135 puntos que se corresponden con 46 proteínas diferentes y sus isoformas. Todos los puntos extraídos identificados mediante MASCOT, obtuvieron coincidencias exactas con el genoma de *P. chrysogenum* 54-1255.

De los 134 puntos identificados, 23 proteínas no presentan isoformas y otras 23 presentan un total de 111 isoformas diferentes. En algunos casos la cantidad de isoformas de una misma proteína es elevado, como es el caso del ORF Pc21g23210 con 8 isoformas o el ORF Pc16g11860 con 10 isoformas.

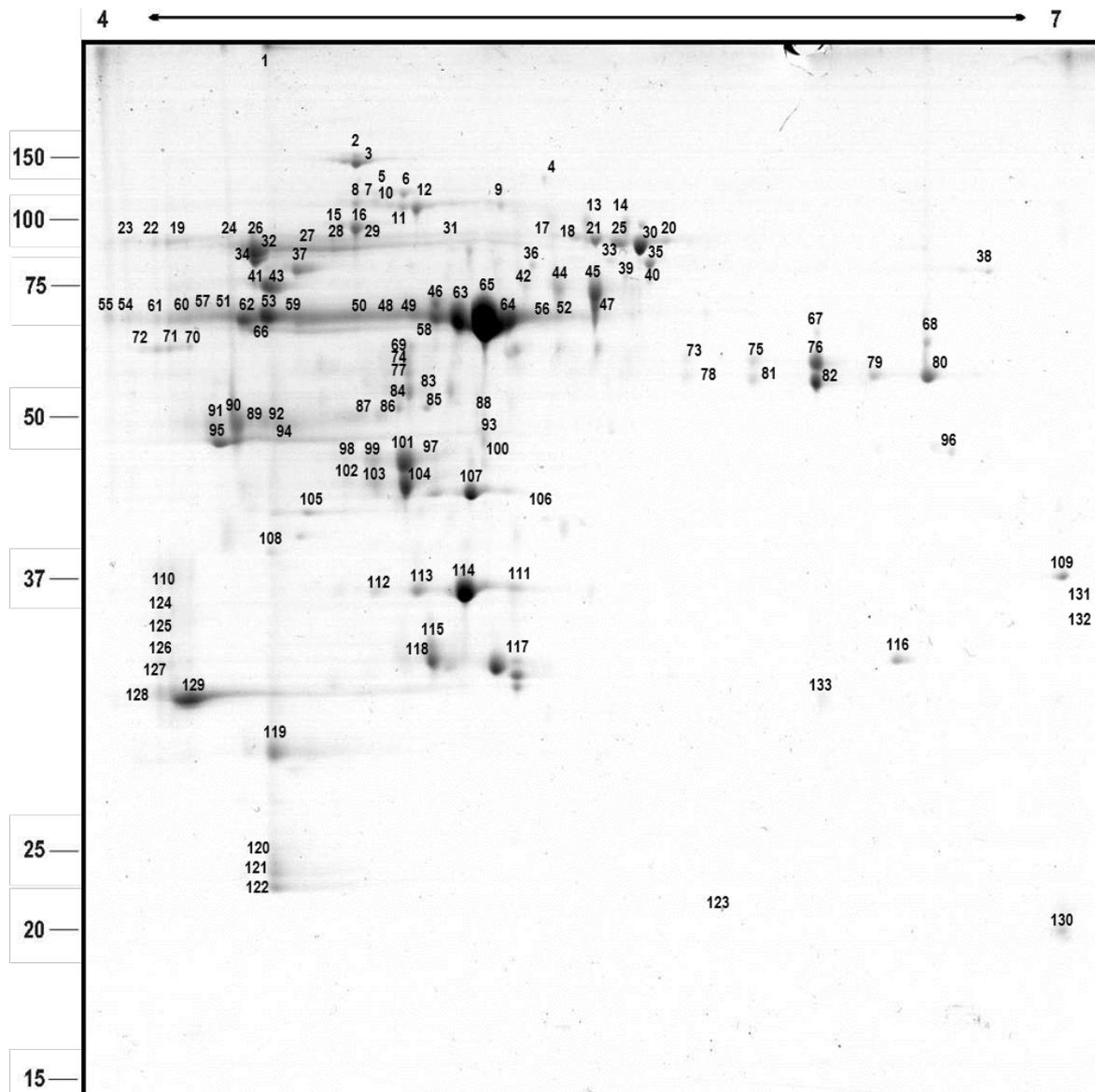


Fig. 49: Mapa proteico del extracto enzimático de *Penicillium chrysogenum* B13. Se visualizan un total de 205 puntos proteicos en un rango de pH de 4-7. Los puntos proteicos numeradas en esta figura son las que se han podido identificar por MALDI-TOF/TOF. El peso molecular se indica a la izquierda.

Con el fin de determinar si las proteínas que se observan en los gels son realmente proteínas de secreción y que no se están analizando proteínas del medio o del interior del microorganismo, todas las secuencias proteicas identificadas se analizaron con diversas herramientas informáticas para conocer si dichas secuencias eran proteínas de secreción. De las 135 proteínas identificadas, 128 (94,81%) poseen un sistema de secreción extracelular clásico, identificado mediante la herramienta informática SignalP 4.0 (Petersen *et al.*, 2011); 6 de las

150

proteínas (4,44%) presentan un sistema de secreción no clásico identificado por SecretomeP 2.0 (Bendtsen *et al.*, 2005); y finalmente una de las isoformas identificadas (0.74%) no presenta ninguno de los sistemas anteriormente descritos. En base a estos resultados podemos afirmar que 134 de las 135 proteínas analizadas en el secretoma de la cepa *P. chrysogenum* B13 son proteínas extracelulares.

Se realizó una clasificación funcional de los 135 puntos proteicos identificados, según su papel biológico. Tal y como se muestra en la Fig. 50, un 42,22% de los puntos proteicos identificados (20 proteínas con 57 isoformas), son proteínas encargadas de la degradación de la pared celular vegetal; un 26,67% de los puntos proteicos (6 proteínas con 36 isoformas) corresponden con proteínas encargadas de la morfogénesis de la pared celular; un 10,37% de los puntos proteicos (9 proteínas con 14 isoformas) tienen un función desconocida; un 7,41% de los puntos proteicos (1 proteína con 11 isoformas) están relacionadas con papeles de defensa celular; un 13,33% de los puntos proteicos (9 proteínas con 11 isoformas) son proteínas relacionadas con el metabolismo celular y la utilización de nutrientes.

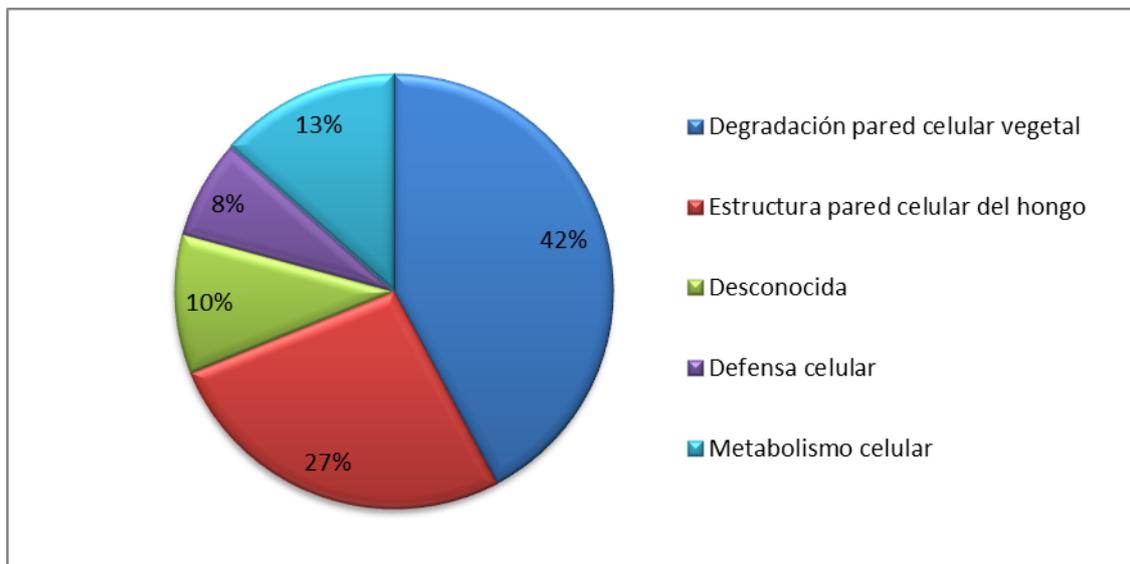


Fig. 50: Clasificación funcional de todas las isoformas de las proteínas identificadas en el extracto enzimático de *P. chrysogenum* B13 según su función biológica.

El 100% de los puntos proteicos identificados son proteínas con actividad enzimática y todas ellas se corresponden con proteínas del genoma de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255. No se identifica ninguna proteína relacionada con la PR.

El genoma de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 está secuenciado desde 2008 (van den Berg *et al.*, 2008), sin embargo aún muchos de los genes en él descritos carecen de una función definida. Los resultados que se obtienen al comparar el análisis del MALDI con el genoma de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255, en la gran mayoría de los casos, son similitudes con genes de otras especies próximas cuya función ya ha sido descrita, y que, en muchos casos, por proximidad

genética se asume que su función en *P. chrysogenum* puede ser igual o parecida. A continuación, se realiza una descripción de todas proteínas analizadas en el secretoma de la cepa B13, asociándoles una posible función biológica en base a su similitud con otras proteínas ya descritas en otros organismos.

a) PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA DEGRADACIÓN DE LA PARED CELULAR VEGETAL

Como se puede observar (Fig. 50) bajo las condiciones analizadas, casi el 43% de las proteínas presentes en el secretoma de *P. chrysogenum* B13 están relacionadas con la degradación de la pared celular vegetal, un total de 20 proteínas con 57 isoformas diferentes. Todas ellas se describen a continuación y sus características se detallan en la Tabla 20.

Se han identificado varios puntos proteicos como posibles enzimas con actividad β -glucosidasa: punto proteico 4 (Pc12g11110), puntos proteicos 110, 124, 125, 126, 127 y 128 (Pc15g00210), puntos proteicos 2, 3 y 8 (Pc18g01940) y puntos proteicos 15 y 16 (Pc20g10170). El punto proteico 107 (Pc16g13100) es una posible enzima con actividad exoglucanasa y el punto proteico 85 (Pc22g01850) corresponde con una enzima ya descrita en *P. chrysogenum* y que se identifica como glucano-1,4- α -glucosidasa. La posible actividad glucanocelobiohidrolasa también se ha identificado en los puntos proteicos 70, 71 y 72 (Pc18g05490) y en los puntos proteicos 41, 43, 53 y 62 (Pc20g01970). Todas ellas son enzimas encargadas de la degradación de la celulosa y hemicelulosas presentes de la pared celular vegetal y casi todas muy similares a enzimas de varias especies del género *Aspergillus* (excepto Pc1500210 similar a *Saccharomyces cerevisiae*).

Entre las enzimas que degradan el xilano encontramos enzimas con posible actividad arabinofuranosidasa: punto proteico 28b (Pc12g004070) y los puntos proteicos 67, 73, 75, 76, 78, 81 y 82 (Pc22g19620); actividad manosidasa: punto proteico 86 (Pc16g14170) y con actividad bifuncional xilosidasa-arabinoxidasa: puntos proteicos 5 y 6a (Pc22g14710). Las tres primeras proteínas presentan gran similitud con proteínas de *Aspergillus niger*, mientras que la última es similar a una proteína de *Thermoanaerobacter ethanolicus*.

También encontramos enzimas encargadas de la degradación de las pectinas presentes en la pared celular vegetal: los puntos proteicos 133 (Pc12g10800) y 117 (Pc13g15920) se identifican como enzimas con posible actividad α -arabinasa. Una posible actividad ramnogalacturonasa se identifica en los puntos proteicos 68, 69, 79 y 80 (Pc14g00370). Por su parte los puntos proteicos 109, 131, 132 (Pc21g09850) y los puntos proteicos 111, 112, 113 y 114 (Pc22g24890) corresponden con enzimas con una posible actividad pectin-liasa. Todas las enzimas anteriores presentan una gran similitud con enzimas de hongos del género *Aspergillus*. En los puntos proteicos 97, 98, 99, 101, 102, 103 y 104 (Pc18g01880) encontramos una enzima con actividad exo-arabinasa descrita en *P. chrysogenum*.

Mancha	ORF	Número acceso	Descripción proteína	Teórico		Estimado		Puntuación	Función	Péptido señal (SignalP)
				pl	Masa (kDa)	pl	Masa (kDa)			
2	Pc18g01940	gij211586771	strong similarity to beta-glucosidase 1 <i>bgl1</i> - <i>Aspergillus aculeatus</i>	4,83	94,66	4,7	150,83	311,00	Degradación pared celular vegetal	SI
3	Pc18g01940	gij211586771	strong similarity to beta-glucosidase 1 <i>bgl1</i> - <i>Aspergillus aculeatus</i>	4,83	94,66	4,7	148,00	605,00	Degradación pared celular vegetal	SI
4	Pc12g11110	gij211582550	strong similarity to beta-glucosidase 1 <i>bgl1</i> - <i>Aspergillus aculeatus</i>	5,28	94,06	5,2	134,61	151,00	Degradación pared celular vegetal	SI
5	Pc22g14710	gij211592409	strong similarity to bifunctional xylosidase-arabinosidase <i>xarB</i> - <i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	4,88	85,49	4,8	122,43	181,00	Degradación pared celular vegetal	SI
6a	Pc22g14710	gij211592409	strong similarity to bifunctional xylosidase-arabinosidase <i>xarB</i> - <i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	4,88	85,49	4,9	121,66	128,00	Degradación pared celular vegetal	SI
8	Pc18g01940	gij211586771	strong similarity to beta-glucosidase 1 <i>bgl1</i> - <i>Aspergillus aculeatus</i>	4,83	94,66	4,7	114,20	119,00	Degradación pared celular vegetal	SI
15	Pc20g10170	gij211588246	strong similarity to beta-glucosidase 1 <i>bgl1</i> - <i>Aspergillus aculeatus</i>	4,78	77,89	4,7	99,24	351,00	Degradación pared celular vegetal	SI
16	Pc20g10170	gij211588246	strong similarity to beta-glucosidase 1 <i>bgl1</i> - <i>Aspergillus aculeatus</i>	4,78	77,89	4,7	97,73	664,00	Degradación pared celular vegetal	SI
28b	Pc12g00470	gij211581570	strong similarity to alpha-L arabinofuranosidase precursor <i>abfA</i> - <i>Aspergillus niger</i>	4,72	69,44	5,2	84,47	94,00	Degradación pared celular vegetal	SI
36	Pc13g15360	gij211584551	strong similarity to extracellular triacylglycerol lipase <i>Lip1</i> - <i>Candida rugosa</i>	5,22	61,10	5,2	84,47	140,00	Degradación pared celular vegetal	SI
41	Pc20g01970	gij211587491	strong similarity to 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase B precursor <i>cbhB</i> - <i>Aspergillus niger</i>	4,70	57,07	4,0	78,84	226,00	Degradación pared celular vegetal	SI
42	Pc12g08300	gij211582280	strong similarity to precursor of tannase- <i>Aspergillus oryzae</i>	5,44	58,44	5,1	77,93	261,00	Degradación pared celular vegetal	SI
43	Pc20g01970	gij211587491	strong similarity to 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase B precursor <i>cbhB</i> - <i>Aspergillus niger</i>	4,70	57,07	4,0	77,63	479,00	Degradación pared celular vegetal	SI
44	Pc12g08300	gij211582280	strong similarity to precursor of tannase- <i>Aspergillus oryzae</i>	5,44	58,44	5,2	76,75	494,00	Degradación pared celular vegetal	SI
45	Pc12g08300	gij211582280	strong similarity to precursor of tannase- <i>Aspergillus oryzae</i>	5,44	58,44	5,3	75,00	734,00	Degradación pared celular vegetal	SI
47	Pc12g08300	gij211582280	strong similarity to precursor of tannase- <i>Aspergillus oryzae</i>	5,44	58,44	5,3	71,25	744,00	Degradación pared celular vegetal	SI
53	Pc20g01970	gij211587491	strong similarity to 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase B precursor <i>cbhB</i> - <i>Aspergillus niger</i>	4,70	57,07	4,0	70,25	513,00	Degradación pared celular vegetal	SI
62	Pc20g01970	gij211587491	strong similarity to 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase B precursor <i>cbhB</i> - <i>Aspergillus niger</i>	4,70	57,07	4,0	69,65	245,00	Degradación pared celular vegetal	SI
67	Pc22g19620	gij211592881	strong similarity to arabinofuranosidase B <i>abfB</i> - <i>Aspergillus niger</i>	5,80	52,91	5,9	67,12	173,00	Degradación pared celular vegetal	SI
68	Pc14g00370	gij211584653	strong similarity to rhamnogalacturonase B precursor <i>rhgB</i> - <i>Aspergillus aculeatus</i>	6,21	57,10	6,1	65,05	334,00	Degradación pared celular vegetal	SI
69	Pc14g00370	gij211584653	strong similarity to rhamnogalacturonase B precursor <i>rhgB</i> - <i>Aspergillus aculeatus</i>	6,21	57,10	4,9	64,49	128,00	Degradación pared celular vegetal	SI
70	Pc18g05490	gij211587109	strong similarity to 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A precursor <i>cbhA</i> - <i>Aspergillus niger</i>	4,31	49,17	4,0	64,31	159,00	Degradación pared celular vegetal	SI
71	Pc18g05490	gij211587109	strong similarity to 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A precursor <i>cbhA</i> - <i>Aspergillus niger</i>	4,31	49,17	4,0	63,94	167,00	Degradación pared celular vegetal	SI
72	Pc18g05490	gij211587109	strong similarity to 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A precursor <i>cbhA</i> - <i>Aspergillus niger</i>	4,31	49,17	4,0	63,76	176,00	Degradación pared celular vegetal	SI
73	Pc22g19620	gij211592881	strong similarity to arabinofuranosidase B <i>abfB</i> - <i>Aspergillus niger</i>	5,80	52,91	5,5	62,15	95,00	Degradación pared celular vegetal	SI
75	Pc22g19620	gij211592881	strong similarity to arabinofuranosidase B <i>abfB</i> - <i>Aspergillus niger</i>	5,80	52,91	5,7	61,62	318,00	Degradación pared celular vegetal	SI
76	Pc22g19620	gij211592881	strong similarity to arabinofuranosidase B <i>abfB</i> - <i>Aspergillus niger</i>	5,80	52,91	5,9	61,10	701,00	Degradación pared celular vegetal	SI
78	Pc22g19620	gij211592881	strong similarity to arabinofuranosidase B <i>abfB</i> - <i>Aspergillus niger</i>	5,80	52,91	5,5	59,04	102,00	Degradación pared celular vegetal	SI
79	Pc14g00370	gij211584653	strong similarity to rhamnogalacturonase B precursor <i>rhgB</i> - <i>Aspergillus aculeatus</i>	6,21	57,10	6,0	58,88	478,00	Degradación pared celular vegetal	SI
80	Pc14g00370	gij211584653	strong similarity to rhamnogalacturonase B precursor <i>rhgB</i> - <i>Aspergillus aculeatus</i>	6,21	57,10	6,1	58,54	697,00	Degradación pared celular vegetal	SI
81	Pc22g19620	gij211592881	strong similarity to arabinofuranosidase B <i>abfB</i> - <i>Aspergillus niger</i>	5,80	52,91	5,7	58,38	331,00	Degradación pared celular vegetal	SI
82	Pc22g19620	gij211592881	strong similarity to arabinofuranosidase B <i>abfB</i> - <i>Aspergillus niger</i>	5,80	52,91	5,9	57,71	754,00	Degradación pared celular vegetal	SI
85	Pc22g01850	gij255946924	glucan 1,4-alpha-glucosidase <i>BAC8255-Penicillium chrysogenum</i>	5,01	52,36	4,9	53,60	469,00	Degradación pared celular vegetal	SI
86	Pc16g14170	gij211586338	strong similarity to mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase like protein <i>An01g12550</i> - <i>Aspergillus niger</i>	5,06	56,53	4,8	53,44	260,00	Degradación pared celular vegetal	SI

Tabla 20: Características proteínas encargadas de la degradación de la pared celular vegetal.

Mancha	ORF	Número acceso	Descripción proteína	Teórico		Estimado		Puntuación	Función	Péptido señal (SignalP)
				pI	Masa (kDa)	pI	Masa (kDa)			
97	Pc18g01880	gij306991585	exo-arabinanase abnx- <i>Penicillium chrysogenum</i>	5,1	42	4,9	48	190	Degradación pared celular vegetal	SI
98	Pc18g01880	gij306991585	exo-arabinanase abnx- <i>Penicillium chrysogenum</i>	5,1	42	4,7	48	228	Degradación pared celular vegetal	SI
99	Pc18g01880	gij306991585	exo-arabinanase abnx- <i>Penicillium chrysogenum</i>	5,1	42	4,8	47	225	Degradación pared celular vegetal	SI
101	Pc18g01880	gij306991585	exo-arabinanase abnx- <i>Penicillium chrysogenum</i>	5,1	42	4,9	47	658	Degradación pared celular vegetal	SI
102	Pc18g01880	gij306991585	exo-arabinanase abnx- <i>Penicillium chrysogenum</i>	5,1	42	4,7	45	148	Degradación pared celular vegetal	SI
103	Pc18g01880	gij306991585	exo-arabinanase abnx- <i>Penicillium chrysogenum</i>	5,1	42	4,8	45	260	Degradación pared celular vegetal	SI
104	Pc18g01880	gij306991585	exo-arabinanase abnx- <i>Penicillium chrysogenum</i>	5,1	42	5,2	42	643	Degradación pared celular vegetal	SI
107	Pc16g13100	gij211586232	strong similarity to hypothetical glucan beta-1,3 exoglucanase exgS - <i>Aspergillus phoenicis</i>	5,3	42	5,2	41	72	Degradación pared celular vegetal	SI
109	Pc21g09850	gij211589732	strong similarity to pectin lyase pelA - <i>Aspergillus niger</i>	8,4	39	6,5	37	363	Degradación pared celular vegetal	SI
110	Pc15g00210	gij211584871	similarity to glucan 1,3-beta-glucosidase Bgl2 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4,5	48	4,0	37	130	Degradación pared celular vegetal	SI
111	Pc22g24890	gij211593394	strong similarity to pectate lyase plyA - <i>Aspergillus niger</i>	5,3	34	5,1	36	219	Degradación pared celular vegetal	SI
112	Pc22g24890	gij211593394	strong similarity to pectate lyase plyA - <i>Aspergillus niger</i>	5,3	34	4,8	36	59	Degradación pared celular vegetal	SI
113	Pc22g24890	gij211593394	strong similarity to pectate lyase plyA - <i>Aspergillus niger</i>	5,3	34	4,9	36	573	Degradación pared celular vegetal	SI
114	Pc22g24890	gij211593394	strong similarity to pectate lyase plyA - <i>Aspergillus niger</i>	5,3	34	5,0	36	876	Degradación pared celular vegetal	SI
117	Pc13g15920	gij211584606	strong similarity to endo 1,5-alpha-arabinanase abnA - <i>Aspergillus niger</i>	5,5	34	5,1	33	77	Degradación pared celular vegetal	SI
124	Pc15g00210	gij211584871	similarity to glucan 1,3-beta-glucosidase Bgl2 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4,5	48	4,0	36	369	Degradación pared celular vegetal	SI
125	Pc15g00210	gij211584871	similarity to glucan 1,3-beta-glucosidase Bgl2 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4,5	48	4,0	35.27	173	Degradación pared celular vegetal	SI
126	Pc15g00210	gij211584871	similarity to glucan 1,3-beta-glucosidase Bgl2 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4,5	48	4,0	35	206	Degradación pared celular vegetal	SI
127	Pc15g00210	gij211584871	similarity to glucan 1,3-beta-glucosidase Bgl2 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4,5	48	4,0	34	143	Degradación pared celular vegetal	SI
128	Pc15g00210	gij211584871	similarity to glucan 1,3-beta-glucosidase Bgl2 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4,5	48	4,0	33	244	Degradación pared celular vegetal	SI
131	Pc21g09850	gij211589732	strong similarity to pectin lyase pelA - <i>Aspergillus niger</i>	8,4	39	6,5	37	65	Degradación pared celular vegetal	SI
132	Pc21g09850	gij211589732	strong similarity to pectin lyase pelA - <i>Aspergillus niger</i>	8,4	39	6,5	36	447	Degradación pared celular vegetal	SI
133	Pc12g10800	gij211582519	strong similarity to endo 1,5-alpha-arabinanase abnA - <i>Aspergillus niger</i>	6,2	36	5,9	30	257	Degradación pared celular vegetal	SI

Tabla 20: Características proteínas encargadas de la degradación de la pared celular vegetal

Finalmente se identifican enzimas minoritarias implicadas en la degradación de la pared celular vegetal como el punto proteico 36 (Pc13g15360) identificada como una posible triacilglicerol lipasa por su similitud con dicha proteína de *Candida rugosa* y los puntos proteicos 42, 44, 45 y 47 (Pc12g08300) identificadas como una posible tanasa por su similitud con el precursor de dicha enzima en *Aspergillus oryzae*.

b) PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA ESTRUCTURA DE LA PARED CELULAR DEL HONGO

En el secretoma de *P. chrysogenum* B13 se han identificado un total de 6 proteínas con 36 isoformas relacionadas con la estructura de la pared celular del hongo (Tabla 21). Se identificó una posible proteína de pared celular Crh1 similar a la de *S. cerevisiae* (Pc21g23210, puntos proteicos 1, 89, 90, 91, 119, 120, 121 y 122). Los puntos proteicos 94 y 95 (Pc13g09520), se asemejan a un precursor de la enzima quitinasa de *Coccidioides immitis*. También se identificaron dos posibles 1,3- β -glucanosiltransferasas: Bgt1 (Pc13g08730, puntos proteicos 115 y 118) y Gel1 (Pc16g08980, punto proteico 38), similares a las de *Aspergillus fumigatus*.

Mancha	ORF	Número acceso	Descripción proteína	Teórico		Estimado		Puntuación	Función	Péptido señal	
				pI	Masa (kDa)	pI	Masa (kDa)			SignalP	Sec.P
1	Pc21g23210	gij211590999	strong similarity to cell w all protein Crh1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4,7	36	4,0	330	428	Estructura pared celular del hongo	SI	
6b	Pc22g24800	gij211593385	similarity to beta-N-acetylhexosaminidase - <i>Vibrio furnissii</i>	4,9	79	4,9	122	112	Estructura pared celular del hongo	SI	
7	Pc22g24800	gij211593385	similarity to beta-N-acetylhexosaminidase - <i>Vibrio furnissii</i>	4,9	79	4,8	115	127	Estructura pared celular del hongo	SI	
10	Pc22g24800	gij211593385	similarity to beta-N-acetylhexosaminidase - <i>Vibrio furnissii</i>	4,9	79	4,8	113	72	Estructura pared celular del hongo	SI	
11	Pc22g24800	gij211593385	similarity to beta-N-acetylhexosaminidase - <i>Vibrio furnissii</i>	4,9	79	4,8	111	184	Estructura pared celular del hongo	SI	
12	Pc22g24800	gij211593385	similarity to beta-N-acetylhexosaminidase - <i>Vibrio furnissii</i>	4,9	79	4,9	110	651	Estructura pared celular del hongo	SI	
31	Pc22g24800	gij211593385	similarity to beta-N-acetylhexosaminidase - <i>Vibrio furnissii</i>	4,9	79	5,0	89	350	Estructura pared celular del hongo	SI	
38	Pc16g08980	gij211585840	weak similarity to 1,3-beta-glucanosyltransferase gel1 - <i>Aspergillus fumigatus</i>	5,7	97	6,3	83	416	Estructura pared celular del hongo	SI	
48	Pc20g10360	gij255945521	beta-N-acetylhexosaminidase hex - <i>Penicillium chrysogenum</i>	5,3	67	4,8	71	426	Estructura pared celular del hongo	SI	
49	Pc20g10360	gij255945521	beta-N-acetylhexosaminidase hex - <i>Penicillium chrysogenum</i>	5,3	67	4,9	71	436	Estructura pared celular del hongo	SI	
50	Pc20g10360	gij255945521	beta-N-acetylhexosaminidase hex - <i>Penicillium chrysogenum</i>	5,3	67	4,7	70	472	Estructura pared celular del hongo	SI	
51	Pc20g10360	gij255945521	beta-N-acetylhexosaminidase hex - <i>Penicillium chrysogenum</i>	5,3	67	4,0	70	446	Estructura pared celular del hongo	SI	
52	Pc20g10360	gij255945521	beta-N-acetylhexosaminidase hex - <i>Penicillium chrysogenum</i>	5,3	67	5,2	70	270	Estructura pared celular del hongo	SI	
54	Pc20g10360	gij255945521	beta-N-acetylhexosaminidase hex - <i>Penicillium chrysogenum</i>	5,3	67	4,0	70	278	Estructura pared celular del hongo	SI	
55	Pc20g10360	gij255945521	beta-N-acetylhexosaminidase hex - <i>Penicillium chrysogenum</i>	5,3	67	4,0	70	279	Estructura pared celular del hongo	SI	
56	Pc20g10360	gij255945521	beta-N-acetylhexosaminidase hex - <i>Penicillium chrysogenum</i>	5,3	67	5,2	70	242	Estructura pared celular del hongo	SI	
57	Pc20g10360	gij255945521	beta-N-acetylhexosaminidase hex - <i>Penicillium chrysogenum</i>	5,3	67	4,0	70	412	Estructura pared celular del hongo	SI	
58	Pc20g10360	gij255945521	beta-N-acetylhexosaminidase hex - <i>Penicillium chrysogenum</i>	5,3	67	4,9	70	520	Estructura pared celular del hongo	SI	
59	Pc20g10360	gij255945521	beta-N-acetylhexosaminidase hex - <i>Penicillium chrysogenum</i>	5,3	67	4,6	70	463	Estructura pared celular del hongo	SI	
60	Pc20g10360	gij255945521	beta-N-acetylhexosaminidase hex - <i>Penicillium chrysogenum</i>	5,3	67	4,0	70	361	Estructura pared celular del hongo	SI	
61	Pc20g10360	gij255945521	beta-N-acetylhexosaminidase hex - <i>Penicillium chrysogenum</i>	5,3	67	4,0	70	375	Estructura pared celular del hongo	SI	
63	Pc20g10360	gij255945521	beta-N-acetylhexosaminidase hex - <i>Penicillium chrysogenum</i>	5,3	67	5,0	69	761	Estructura pared celular del hongo	SI	
64	Pc20g10360	gij255945521	beta-N-acetylhexosaminidase hex - <i>Penicillium chrysogenum</i>	5,3	67	5,1	69	706	Estructura pared celular del hongo	SI	
65	Pc20g10360	gij255945521	beta-N-acetylhexosaminidase hex - <i>Penicillium chrysogenum</i>	5,3	67	5,0	68	957	Estructura pared celular del hongo	SI	
83	Pc20g10360	gij255945521	beta-N-acetylhexosaminidase hex - <i>Penicillium chrysogenum</i>	5,3	67	5,0	56	263	Estructura pared celular del hongo	SI	
89	Pc21g23210	gij211590999	strong similarity to cell w all protein Crh1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4,7	36	4,0	52	178	Estructura pared celular del hongo	SI	
90	Pc21g23210	gij211590999	strong similarity to cell w all protein Crh1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4,7	36	4,0	51	542	Estructura pared celular del hongo	SI	
91	Pc21g23210	gij211590999	strong similarity to cell w all protein Crh1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4,7	36	4,0	51	145	Estructura pared celular del hongo	SI	
94	Pc13g09520	gij211583995	strong similarity to chitinase 1 precursor cts1 - <i>Coccidioides immitis</i>	4,5	44	4,1	50	86	Estructura pared celular del hongo	NO	SI
95	Pc13g09520	gij211583995	strong similarity to chitinase 1 precursor cts1 - <i>Coccidioides immitis</i>	4,5	44	4,0	49	237	Estructura pared celular del hongo	NO	SI
115	Pc13g08730	gij211583918	strong similarity to 1,3-beta-glucanosyltransferase bgt1 - <i>Aspergillus fumigatus</i>	5,0	35	4,9	33	144	Estructura pared celular del hongo	SI	
118	Pc13g08730	gij211583918	strong similarity to 1,3-beta-glucanosyltransferase bgt1 - <i>Aspergillus fumigatus</i>	5,0	35	4,9	33	321	Estructura pared celular del hongo	SI	
119	Pc21g23210	gij211590999	strong similarity to cell w all protein Crh1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4,7	36	4,0	29	137	Estructura pared celular del hongo	SI	
120	Pc21g23210	gij211590999	strong similarity to cell w all protein Crh1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4,7	36	4,0	24	144	Estructura pared celular del hongo	SI	
121	Pc21g23210	gij211590999	strong similarity to cell w all protein Crh1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4,7	36	4,0	24	129	Estructura pared celular del hongo	SI	
122	Pc21g23210	gij211590999	strong similarity to cell w all protein Crh1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4,7	36	4,0	23	182	Estructura pared celular del hongo	SI	

Tabla 21: Características proteínas relacionadas con la estructura de la pared celular del hongo.

Los puntos proteicos 6b, 7, 10, 11, 12 y 31 (Pc22g24800) tienen similitud con la enzima β -N-acetilhexosaminidasa de *Vibrio furnissii*. Y finalmente se identifica una proteína de *P. chrysogenum* con 17 isoformas (puntos proteicos de la 48 a la 52, de la 54 a la 61, de la 63 a la 65 y la 83): la β -N-acetilhexosamidasa (Pc20g10360).

c) PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO GENERAL DE LA CÉLULA

Se han identificado 10 proteínas con 18 isoformas (Tabla 22). Los puntos proteicos identificados son posibles enzimas con actividad: amidasa: Pc22g01750 (punto proteico 40) similar a la de *Schizosaccharomyces pombe*; hidroxinicotin-oxidasa: Pc21g12590 (puntos proteicos 74, 77 y 84) y Pc18g05530 (punto proteico 92), ambas similares a las de *Arthrobacter oxidans*; sulfidril-oxidasa: Pc22g22810 (punto proteico 87), similar a la de *A. niger* y glutaminasa: Pc20g02640 (puntos proteicos 24, 26, 27, 28a, 29, 32 y 34), similar a la de *A. oryzae*.

Además, se han identificado 5 puntos proteicos como posibles proteasas: la 106 (Pc22g15910), la 108 (Pc13g09680), la 116 (Pc21g14160), la 123 (Pc20g09400) y la 130 (Pc22g13950), en ninguna de ellas se han identificado isoformas.

Mancha	ORF	Número acceso	Descripción proteína	Teórico		Estimado		Puntuación	Función	Péptido señal	
				pl	Masa (kDa)	pl	Masa (kDa)			SignalP	Sec.P
24	Pc20g02640	gij211587553	strong similarity to glutaminase A gtaA- <i>Aspergillus oryzae</i>	4,6	76	4,0	93	265	Metabolismo general	SI	
26	Pc20g02640	gij211587553	strong similarity to glutaminase A gtaA- <i>Aspergillus oryzae</i>	4,6	76	4,0	91	306	Metabolismo general	SI	
27	Pc20g02640	gij211587553	strong similarity to glutaminase A gtaA- <i>Aspergillus oryzae</i>	4,6	76	4,6	91	244	Metabolismo general	SI	
28a	Pc20g02640	gij211587553	strong similarity to glutaminase A gtaA- <i>Aspergillus oryzae</i>	4,6	76	4,7	91	202	Metabolismo general	SI	
29	Pc20g02640	gij211587553	strong similarity to glutaminase A gtaA- <i>Aspergillus oryzae</i>	4,6	76	4,7	91	191	Metabolismo general	SI	
32	Pc20g02640	gij211587553	strong similarity to glutaminase A gtaA- <i>Aspergillus oryzae</i>	4,6	76	4,0	89	794	Metabolismo general	SI	
34	Pc20g02640	gij211587553	strong similarity to glutaminase A gtaA- <i>Aspergillus oryzae</i>	4,6	76	4,0	85	562	Metabolismo general	SI	
40	Pc22g01750	gij211591236	strong similarity to hypothetical amidase - <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	5,9	54	5,4	79	99	Metabolismo general	NO	SI
74	Pc21g12590	gij211589997	similarity to 6-hydroxy-D-nicotine oxidase 6-HDNO - <i>Arthrobacter oxidans</i>	5,2	55	4,9	62	284	Metabolismo general	SI	
77	Pc21g12590	gij211589997	similarity to 6-hydroxy-D-nicotine oxidase 6-HDNO - <i>Arthrobacter oxidans</i>	5,2	55	4,9	59	391	Metabolismo general	SI	
84	Pc21g12590	gij211589997	similarity to 6-hydroxy-D-nicotine oxidase 6-HDNO - <i>Arthrobacter oxidans</i>	5,2	55	4,9	56	543	Metabolismo general	SI	
87	Pc22g22810	gij255950816	strong similarity to sulphhydryl oxidase Sox from patent EP565172-A1 - <i>Aspergillus niger</i>	4,9	42	4,8	53	207	Metabolismo general	SI	
92	Pc18g05530	gij211587113	similarity to 6-hydroxy-D-nicotine oxidase 6-HDNO - <i>Arthrobacter oxidans</i>	4,8	56	4,1	51	184	Metabolismo general	SI	
106	Pc22g15910	gij211592524	strong similarity to cytoplasmic form of aminopeptidase like protein An03g04230 - <i>Aspergillus niger</i>	5,5	68	5,2	42	105	Metabolismo general	NO	NO
108	Pc13g09680	gij211584011	strong similarity to aspartyl proteinase candidapepsin - <i>Candida albicans</i>	5,1	44	4,0	39	140	Metabolismo general	SI	
116	Pc21g14160	gij211590143	alkaline serine protease AAM33821- <i>Penicillium chrysogenum</i>	5,8	40	6,1	33	182	Metabolismo general	SI	
123	Pc20g09400	gij211588171	strong similarity to dipeptidyl-peptidase V DPP V - <i>Aspergillus fumigatus</i>	5,6	79	5,5	22	174	Metabolismo general	NO	SI
130	Pc22g13950	gij211592336	strong similarity to vacuolar aminopeptidase Ysci - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5,7	56	6,5	20	177	Metabolismo general	NO	SI

Tabla 22: Características de las proteínas implicadas en el metabolismo general del hongo.

d) PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA DEFENSA CELULAR

En el secretoma de *P. chrysogenum* B13 se ha identificado una única proteína (Pc16g11860) relacionada con la defensa celular que posee 10 isoformas (puntos proteicos 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25 y 30). Dicha proteína es una posible enzima con actividad catalasa ya que posee una fuerte similitud con la catalasa catR de *A. niger* (Tabla 23).

Mancha	ORF	Número acceso	Descripción proteína	Teórico		Estimado		Puntuación	Función	Péptido señal (SignalP)
				pl	Masa (kDa)	pl	Masa (kDa)			
17	Pc16g11860	gij211586109	strong similarity to catalase R catR - <i>Aspergillus niger</i>	5,4	80	5,2	95	178	Defensa celular	SI
18	Pc16g11860	gij211586109	strong similarity to catalase R catR - <i>Aspergillus niger</i>	5,4	80	5,3	95	486	Defensa celular	SI
19	Pc16g11860	gij211586109	strong similarity to catalase R catR - <i>Aspergillus niger</i>	5,4	80	4,0	93	349	Defensa celular	SI
20	Pc16g11860	gij211586109	strong similarity to catalase R catR - <i>Aspergillus niger</i>	5,4	80	5,5	93	657	Defensa celular	SI
21	Pc16g11860	gij211586109	strong similarity to catalase R catR - <i>Aspergillus niger</i>	5,4	80	5,3	93	886	Defensa celular	SI
22	Pc16g11860	gij211586109	strong similarity to catalase R catR - <i>Aspergillus niger</i>	5,4	80	4,0	93	335	Defensa celular	SI
23	Pc16g11860	gij211586109	strong similarity to catalase R catR - <i>Aspergillus niger</i>	5,4	80	4,0	93	575	Defensa celular	SI
25	Pc16g11860	gij211586109	strong similarity to catalase R catR - <i>Aspergillus niger</i>	5,4	80	5,4	92	787	Defensa celular	SI
30	Pc16g11860	gij211586109	strong similarity to catalase R catR - <i>Aspergillus niger</i>	5,4	80	5,4	90	1090	Defensa celular	SI
39	Pc16g11860	gij211586109	strong similarity to catalase R catR - <i>Aspergillus niger</i>	5,4	80	5,4	81	352	Defensa celular	SI

Tabla 23: Características de las proteínas encargadas de la defensa celular.

e) PROTEÍNAS CON FUNCIÓN DESCONOCIDA

Se identificaron un total de 9 proteínas con 14 isoformas (Tabla 24) cuya función es desconocida hasta el momento (Pc12g08730, Pc13g07340, Pc16g03030, Pc16g15050, Pc18g03120, Pc21g14410, Pc21g19010, Pc22g00820 y Pc22g08520).

Resultados

Mancha	ORF	Número acceso	Descripción proteína	Teórico		Estimado		Puntuación	Función	Péptido señal	
				pI	Masa (kDa)	pI	Masa (kDa)			SignalP	Sec.P
9	Pc13g07340	gij211583784	strong similarity to hypothetical protein contig_1_93_scaffold_6.tfa_580cg - <i>Aspergillus nidulans</i>	5,2	44	5,1	113	85	Desconocida	SI	
13	Pc16g03030	gij211585295	strong similarity to hypothetical protein contig1492_0.tfa_6350cg - <i>Aspergillus fumigatus</i>	5,5	69	5,3	101	296	Desconocida	SI	
14	Pc16g03030	gij211585295	strong similarity to hypothetical protein contig1492_0.tfa_6350cg - <i>Aspergillus fumigatus</i>	5,5	69	5,4	100	280	Desconocida	SI	
33	Pc22g08520	gij211591881	weak similarity to heparanase - <i>Homo sapiens</i>	5,4	59	5,3	86	133	Desconocida	SI	
35	Pc22g08520	gij211591881	weak similarity to heparanase - <i>Homo sapiens</i>	5,4	59	5,4	85	495	Desconocida	SI	
37	Pc12g08730	gij211582322	strong similarity to conserved hypothetical protein - <i>Xanthomonas axonopodis</i>	4,8	71	4,5	83	563	Desconocida	SI	
46	Pc22g08520	gij211591881	weak similarity to heparanase - <i>Homo sapiens</i>	5,4	59	4,9	73	413	Desconocida	SI	
66	Pc21g14410	gij211590166	strong similarity to hypothetical protein contig1495_1.tfa_80cg - <i>Aspergillus fumigatus</i>	4,6	62	4,0	68	271	Desconocida	SI	
88	Pc21g19010	gij211590603	strong similarity to hypothetical conserved protein SPAC12B10.16c - <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	5,4	59	5,0	53	89	Desconocida	SI	
93	Pc21g19010	gij211590603	strong similarity to hypothetical conserved protein SPAC12B10.16c - <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	5,4	59	5,0	50	349	Desconocida	SI	
96	Pc22g00820	gij211591144	Strong similarity to sequence 1 - unknow n organism	6,2	43	6,2	48	117	Desconocida	SI	
100	Pc21g19010	gij211590603	strong similarity to hypothetical conserved protein SPAC12B10.16c - <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	5,4	59	5,0	47	278	Desconocida	SI	
105	Pc18g03120	gij211586885	strong similarity to hypothetical protein mg00375.1 - <i>Magnaporthe grisea</i>	5,5	46	4,6	42	283	Desconocida	NO	SI
129	Pc16g15050	gij255942060	strong similarity to hypothetical protein ncu05319.1 - <i>Neurospora crassa</i>	4,6	25	4,1	33	279	Desconocida	SI	

Tabla 24: Características de las proteínas con función desconocida

DISCUSIÓN

I. OBTENCIÓN DE UNA CEPA SOBREEXPRESADA EN LOS GENES FAE DE *P. chrysogenum* CON ALTA ACTIVIDAD FAE

La pared celular de las células vegetales está formada por polisacáridos, principalmente celulosa, hemicelulosa y pectina (McNeil *et al.*, 1984). Dichos polisacáridos, pueden estar, unidos entre sí a través de puentes covalentes con ácidos hidroxicinámicos, entre los cuales el más abundante en la naturaleza es el AF (Ishii, 1997). En el caso concreto de la pulpa de remolacha, los ácidos hidroxicinámicos se encuentran principalmente uniendo la estructura de las pectinas, al tratarse de una planta dicotiledónea (Fry y Miller, 1989)(Colquhoun *et al.*, 1994).

El presente trabajo de doctorado tiene como principal objetivo la obtención de cócteles enzimáticos enriquecidos en la actividad enzimática FAE. La plataforma para su producción es el hongo filamentoso *P. chrysogenum* y el interés radica en su posible aplicación industrial en la producción de enzimas FAE.

Actualmente, las aplicaciones industriales de las enzimas con actividad FAEs son múltiples y muy variadas. Las enzimas FAEs tienen aplicación en la industria química, farmacéutica, agroalimentaria, de la pulpa y el papel, textil, bioetanol, etc. (Gopalan *et al.*, 2015)(Koseki *et al.*, 2009). Todas estas aplicaciones se basan principalmente en dos aspectos: la capacidad de las enzimas FAE para obtener AF a partir de biomasa vegetal y su actuación sinérgica con otras enzimas de degradación de la pared celular vegetal, facilitando, de este modo, la degradación de la biomasa vegetal (Fazary y Ju, 2007).

Entre las aplicaciones basadas en la capacidad de las FAEs para liberar AF a partir de biomasa vegetal se encuentran las siguientes:

- **Degradación de subproductos agrícolas:** Las enzimas FAEs rompen el enlace éster entre los polisacáridos de la pared celular de las plantas y el AF, liberando grandes cantidades del mismo. Como sustrato de esta reacción los compuestos más empleados son los subproductos agroindustriales que contienen gran cantidad de materia orgánica, como es el caso de la pulpa de remolacha (Levasseur *et al.*, 2005, Topakas *et al.*, 2007).

- **Aplicaciones en la industria farmacéutica y alimentaria como enzimas productoras de AF:** como ya se ha visto en el apartado 4.5 de la Introducción del presente trabajo de doctorado, el AF tiene múltiples aplicaciones: actúa como antioxidante (Ou y Kwok, 2004), disminuye el colesterol (Kamal-Eldin *et al.*, 2000), previene contra la trombosis y la aterosclerosis (Kayahara *et al.*, 1999) y tiene propiedades antimicrobianas (Jeong *et al.*, 2000), antiinflamatorias (Sakai *et al.*, 1999), antivirales y anticancerígenas (Ou y Kwok, 2004).

También se usa como aditivo alimentario, precursor de la vainillina, conservante, espesante, etc. (Mathew y Abraham, 2004).

Entre las aplicaciones basadas en su actuación sinérgica con otras enzimas, con el fin de la degradación de la materia vegetal, encontramos las siguientes:

- **En la industria de la pulpa y el papel:** debido a su potencial para romper los enlaces covalentes de la hemicelulosa y la pectina con los compuestos aromáticos de la lignina. La actividad FAE facilita la acción de otras enzimas, como las xilanasas, rompiendo la estructura de la pared celular vegetal y haciendo a la lignina más susceptible a la degradación por otras enzimas. Precisamente el aumento en la degradación de la lignina posibilita la reducción del consumo de cloro en la etapa de blanqueamiento y aumenta la claridad de la pulpa (Record *et al.*, 2003)(Sigoillot *et al.*, 2005)(Topakas *et al.*, 2007), disminuyendo, de esta forma, la gran contaminación ambiental provocada por este sector.

- **En la industria del bioetanol:** con el fin de limitar las emisiones de carbono a la atmósfera se ha hecho necesario desarrollar procesos que no dañen el medio ambiente y que supongan una producción sostenible. El bioetanol es un alcohol producido a partir de productos agrícolas como el maíz, sorgo, patata, trigo, caña de azúcar o biomasa (Akbas y Stark, 2016). Por ello el bioetanol se ha postulado como una importante alternativa al petróleo. En estos momentos la investigación está focalizada en la producción de bioetanol a partir de biomasa celulósica, comúnmente conocido como bioetanol de segunda generación (Koseki *et al.*, 2009) y las enzimas FAEs producidas por hongos han ganado mucha importancia en este sector en los últimos años gracias a su capacidad de facilitar la accesibilidad a los tejidos vegetales de las xilanasas, celulasas y hemicelulasas (Topakas *et al.*, 2007)(Dilokpimol *et al.*, 2016), aumentando de este modo el grado de liberación de azúcares sencillos de la pared celular, lo que se materializa en un incremento en el rendimiento en la producción final de etanol.

- **En la industria ganadera:** los di y triferulatos dificultan la digestión de los compuestos ricos en pared celular por parte de los animales rumiantes (Yu *et al.*, 2005a). La suplementación de este tipo de alimentos con cócteles enzimáticos que incluyen actividad enzimática FAE y otras enzimas accesorias de degradación de la pared celular, facilita la digestión y la asimilación de nutrientes y por ese motivo se usan como aditivos para la comida animal (Mathew y Abraham, 2004)(Yu *et al.*, 2005a)(Yu *et al.*, 2005b)(Topakas *et al.*, 2007). Un ejemplo de este tipo de productos ricos en pared celular vegetal son los DDGS (*Dried Distillers Grains with Solubles*) obtenidos como co-producto en las plantas de producción de etanol de primera generación (Liu, 2011).

Otro tipo de aplicaciones industriales de las enzimas con actividad FAE es la síntesis de nuevos compuestos: las enzimas FAEs no sólo degradan la biomasa, también pueden formar nuevos compuestos bioactivos para el desarrollo de los materiales alimentarios (Faulds, 2009). Se ha demostrado que la preparación de productos alimenticios con alto contenido en ácido cafeico libre (liberado por enzimas FAEs) tiene un alto poder antioxidante y potenciales propiedades probióticas (Guglielmetti *et al.*, 2008). En las décadas pasadas, las enzimas FAEs microbianas se han convertido en importantes productos con papeles relevantes en los procesos biotecnológicos por sus diversas aplicaciones industriales y médicas (Gopalan *et al.*, 2015). Así el descubrimiento de nuevas enzimas FAEs con nuevas propiedades continúa siendo una importante área de investigación. Cabe destacar el hecho de que no todas las enzimas FAEs sirven para todo. Dependiendo del tipo y las características de la enzima FAE, pueden ser más o menos adecuadas para una aplicación u otra, por lo cual es importante la investigación en este sentido.

1. Transformantes sobreexpresados: cepa superproductora y sustrato

El primer objetivo que se planteó en este trabajo fue la elección de una cepa que ya tuviera actividad FAE endógena y posteriormente potenciar dicha actividad, mediante ingeniería genética, en el extracto enzimático producido por el propio microorganismo. Los hongos filamentosos, debido a su hábitat natural tradicional, son grandes productores de enzimas extracelulares, entre las que se encuentran las enzimas con actividad FAE, pero en muchos casos, los genes que las codifican se encuentran bajo patentes de las grandes empresas que se dedican a la producción y venta de este tipo de enzimas, como Novozymes, Dupont, Biocatalysts, etc. Los dos géneros de hongos filamentosos productores de enzimas extracelulares por excelencia son *Aspergillus* y *Trichoderma*, por ello, la mayoría de sus actividades enzimáticas lignocelulolíticas se encuentran bajo patente. Por ejemplo, *Aspergillus oryzae* sintetiza una enzima con actividad FAE que se encuentra patentada por la empresa Novozymes (Patente: ES 2 288 976 T3). Los análisis filogenéticos realizados, basados en estudios de genómica y proteómica, determinaron que *P. chrysogenum* muestra una gran proximidad evolutiva con especies del género *Aspergillus* (van den Berg *et al.*, 2008). Por ello se valoró la posibilidad de utilizar cepas de la especie *Penicillium chrysogenum*, puesto que no se encuentran bajo patente y tienen gran parecido genético con el género *Aspergillus*.

P. chrysogenum es un hongo filamentoso muy conocido desde hace décadas en la industria farmacéutica gracias a su gran capacidad de producción de penicilinas (Ozcengiz y Demain, 2013), sin embargo también posee un gran potencial en la producción de metabolitos secundarios (van den Berg *et al.*, 2008) y enzimas extracelulares (Sakamoto y Thibault, 2001)(Sakamoto y Kawasaki, 2003)(Sakamoto *et al.*, 2003)(Leiter *et al.*, 2004)(Jami *et al.*, 2010b). Dentro de la especie *P. chrysogenum* se optó por ensayar varias cepas disponibles en nuestro laboratorio relacionadas

con la producción de penicilina. El análisis por bioensayo en taco en medio sólido con etil-ferulato, capaz de ser hidrolizado por la presencia de actividad FAE, reveló que las dos cepas de *P. chrysogenum* con mayor actividad FAE en medio sólido son NRRL-1951 y Wisconsin 54-1255. Esto contrasta con la actividad casi nula de las cepas A-SP-78 y A-SP-99, lo cual parece indicar que, durante los procesos de mejora de la producción de penicilina y las mutaciones sufridas durante el mismo, se ha visto disminuida su actividad FAE. En dichos procesos de selección de cepas se pretende que el metabolismo se dirija a la producción de penicilina en detrimento de otras rutas metabólicas (Barreiro *et al.*, 2012)(Jami *et al.*, 2010a). Los resultados muestran que las cepas menos modificadas genéticamente, más próximas a la silvestre, son las que mayor actividad FAE conservan.

Tras realizar la comparativa de la cuantificación del AF liberado por las cepas NRRL-1951 y Wisconsin 54-1255 crecidas en presencia de PR, inductor natural de la producción de enzimas FAEs y teniendo en cuenta el conocimiento de las técnicas de manipulación genética así como la disponibilidad de las herramientas para llevarla a cabo junto con la disponibilidad del genoma secuenciado (van den Berg *et al.*, 2008) se decidió potenciar la producción de FAEs de la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255.

La disponibilidad desde 2008 del genoma completo secuenciado de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 ha sido de gran utilidad para la realización del presente trabajo de doctorado (van den Berg *et al.*, 2008). La secuenciación del genoma se realizó utilizando el método de secuenciación aleatorio de genomas completos en 5 librerías genómicas construidas en cromosomas artificiales de bacterias (BACs) (Nierman *et al.*, 2005). Los análisis de dichas secuencias revelaron que el genoma nuclear de *P. chrysogenum* posee 32,19 Mb y está organizado en 49 agrupaciones llamadas “*supercontig*”, siendo dicho tamaño comparable al tamaño de los supercontigs de otros hongos filamentosos ya secuenciados. Por otro lado, considerando que un ORF (marco de lectura abierto del inglés *Open Reading Frame*) típico codifica una proteína de un tamaño de 100 aminoácidos y descartando los pseudogenes y los ORF aberrantes, en el genoma de *P. chrysogenum* existen aproximadamente 12.943 genes. El tamaño de la mayor parte de estos genes es de en torno a 1,5 kb, existiendo una media de 3 exones y 2 intrones por gen (el 83,5% de los genes contienen intrones). Un 30% de las proteínas deducidas de los posibles genes de *P. chrysogenum* carece de ortólogos en otros hongos filamentosos cuyo genoma ha sido secuenciado. Estos genes se habrían adquirido mediante transferencia horizontal (Machida *et al.*, 2008) o duplicación génica seguida de una diversificación acelerada y una pérdida diferencial de genes (Thon *et al.*, 2006). Otro dato importante es que el contenido medio en G + C del genoma está en torno al 48,9% (van den Berg *et al.*, 2008).

Para potenciar la producción de enzimas FAEs en *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255, inicialmente se realizó una búsqueda en el genoma de ORFs que codificasen proteínas con

actividad FAE partiendo de secuencias conocidas de *Aspergillus* que presentan dicha actividad. Como consecuencia de dicha búsqueda se identificaron dos hipotéticas proteínas CAP86030 (ORF Pc20g07010) y CAP80457 (ORF Pc12g08300) nombradas como PcFaeA (gen *faeA*) y PcFaeB (gen *faeB*) respectivamente. Ambas proteínas presentan un pentapéptido de secuencia consenso conservada GX SXG, cuyo residuo de serina forma parte de la tríada catalítica (Ser-His-Asp) característica de la familia de serin-proteasas y esterases, observado también en la proteína AnFaeA de *A. niger* (Hermoso *et al.*, 2004). A partir de estos genes se obtuvieron dos líneas independientes de transformantes, la línea A: transformantes sobreexpresados con el gen *faeA* y la línea B: transformantes sobreexpresados con el gen *faeB*. Es importante remarcar que la asignación de las letras A y B a los genes, se realizó por semejanza a los genes de *A. niger* y puede o no, coincidir con la clasificación funcional de las enzimas FAE realizada por Crepin *et al.* (2003).

Una vez identificados los transformantes con mayor actividad FAE de cada línea (A78 y B13), se llevaron a cabo análisis de actividad enzimática, de expresión genética y cuantificación de enzimas FAEs producidas. Se analizó la actividad enzimática FAE por parte de la cepa parental *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 y de sus transformates sobreexpresados (A78 y B13), frente a dos sustratos naturales: PR (los resultados se pueden ver en la Fig. 34A) y MC (Fig. 35). Además, se analizó la actividad FAE frente al sustrato sintético MFA (Fig. 34B).

La enzima PcFaeB (transformante B13) tiene mayor capacidad de hidrólisis que la enzima PcFaeA (transformante A78) frente a todos los sustratos ensayados: PR, MC y MFA. Estos resultados ya se han observado en anteriores estudios, donde las FAE tipo A muestran muy baja o nula actividad frente al sustrato PR, siendo las enzimas FAE tipo B las más activas (Kühnel *et al.*, 2012). Y al contrario, enzimas FAE de tipo B no son activas frente a sustratos como maíz, caña de azúcar o salvado de trigo (Sakamoto *et al.*, 2005). Esto se debe a que el AF está unido de forma diferente en los sustratos naturales, en la PR y en la espinaca el ácido ferúlico se encuentra principalmente en las pectinas y se encuentra unido por enlaces éster O-2 a residuos de arabinofuranosa y por enlaces O-6 a residuos de galactopiranososa (Colquhoun *et al.*, 1994)(Ishii, 1994), en el caso de sustratos vegetales como el salvado de maíz, la caña de azúcar o el salvado de trigo, el AF está esterificado al carbono C-5 de la arabinosa en los arabinoxilanos (enlaces O-5) (Saulnier *et al.*, 1995). Debido a estas diferencias en los enlaces y a la alta especificidad de este tipo de enzimas, las enzimas FAE de tipo A son más activas frente a enlaces ester O-5, (Ralet *et al.*, 1994b), sin embargo las FAE de tipo B son más activas frente a enlaces ester O-2 y O-6 (Williamson *et al.*, 1998b), lo que concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo.

De la selección del medio de cultivo adecuado depende en gran parte el éxito del proceso de producción de enzimas con actividad FAEs, es necesario que el medio de cultivo utilizado actúe como inductor natural de la secreción de enzimas con actividad FAE por parte del microorganismo utilizado. Los ácidos hidroxicinámicos y los compuestos fenólicos pueden inducir la producción de

enzimas FAEs por parte de los microorganismos, sin embargo no ocurre lo mismo con los componentes de la pared celular vegetal, como la pectina o el arabinosilano que no inducen la producción de FAEs (de Vries *et al.*, 2002). Biomasa vegetal con alto contenido en AF, se ha usado frecuentemente para la producción de FAEs (Dilokpimol *et al.*, 2016), si bien, como se ha observado en este trabajo, las enzimas inducidas pueden ser diferentes en cada caso, según el sustrato utilizado.

De los dos medios ensayados en el presente trabajo se observa que el MC no es una fuente inductora adecuada para una producción eficiente de las enzimas con actividad FAEs por parte de la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 ni de sus transformantes sobreexpresados (A78 y B13), bajo las condiciones ensayadas. Sin embargo, se observa que el transformante B13 tiene mayor actividad que la cepa parental y que el transformante A78 frente al MC, dicho resultado fue ya observado anteriormente por Benoit *et al.* (2006) utilizando las enzimas FAEA y FAEB de *A. niger*, donde vieron que tan sólo la enzima FAEB era activa frente al marro de café.

Sin embargo, los resultados obtenidos bajo las condiciones ensayadas muestran que la PR, subproducto agroindustrial muy abundante en nuestra región, sí resulta ser un medio inductor de la producción de enzimas FAEs por parte *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 y de sus transformantes sobreexpresados (A78 y B13), como se ha observado en estudios anteriores con diferentes enzimas FAEs (de Vries *et al.*, 2002)(Sakamoto *et al.*, 2005)(Benoit *et al.*, 2006).

El uso del sustrato sintético MFA, utilizado comúnmente en estudios de evaluación de la actividad de las enzimas FAEs (Ralet *et al.*, 1994b)(Rumbold *et al.*, 2003), (Record *et al.*, 2003), (Wang *et al.*, 2016), ha sido de gran utilidad en el presente trabajo, rindiendo valores de actividad enzimática FAE del cóctel de entre 1,1 y 2,2 U/mg, dependiendo de las condiciones ensayadas. Al tratarse de un sustrato simple, no se requiere la actuación de otras enzimas que degraden la pared celular vegetal y dejen accesible nuevos enlaces, por lo que se realiza una medida directa de la actividad enzimática FAE. Record *et al.*, 2003, ensayaron la actividad FAE de la enzima FAEA de *A. niger* sobreexpresa frente a MFA señalando unos valores máximos de 20,6 nkat/mg, equivalentes a 1,2 U/mg. Estudios realizados por Rumbold *et al.*, 2003 en el hongo *Aureobasidium pullulans*, NRRL Y 2311-1, indican que la actividad específica FAE de dicho hongo frente a MFA es de 21.6 U/mg en las condiciones ensayadas. Mientras que estudios realizados por Wang *et al.* 2016 en el hongo *Lactarius hatsudake* indican valores de actividad de 10.3 U/mg. Dichos resultados corresponden con estudios realizados con enzimas FAE purificadas, en el caso del estudio realizado por Wang *et al.* 2016, se vio que la enzima purificada tenía una actividad 33.2 veces superior a la del extracto enzimático crudo, que era de 0,3 U/mg, unas siete veces inferior a la actividad máxima obtenida en el presente trabajo de doctorado.

Dentro de las enzimas FAEs se engloban una gran diversidad de clases de enzimas, como por ejemplo, tanasas, lipasas, acetil-xilano esterasas y clorin-esterasas (Dilokpimol *et al.*, 2016). El análisis de los dominios conservados en la secuencia de la proteína PcFaeA indica la existencia de 5 dominios relacionados con la actividad lipasa (cd00519, pfam01764, PLN02802, PLN03037 y COG3675). Así mismo la clasificación filogenética más reciente, realizada por Dilokpimol y col., 2016, la clasifica en la subfamilia 7, subfamilia que engloba las FAEs relacionadas con lipasas. Por otro lado, el análisis de los dominios conservados en la secuencia de la proteína PcFaeB revela la existencia de un solo dominio conservado, se trata del dominio pfam07519 relacionado con las enzimas tanasas y FAEs de origen fúngico, lo cual está también en relación con la Subfamilia otorgada a esta proteína en la clasificación filogenética realizada por Dilokpimol y col., 2016, la subfamilia 1. En este estudio las subfamilias 1-4 y 9-11 están relacionadas con tanasas. Puesto que las enzimas FAEs han evolucionado desde diferentes tipos de enzimas, esto explicaría por qué las enzimas FAEs analizadas en este trabajo, tienen diferentes comportamientos frente a los sustratos analizados (Dilokpimol *et al.*, 2016).

Además, se cuantificó la expresión de los genes sobreexpresados en A78 y B13 (*faeA* y *faeB* respectivamente) frente a la cepa parental *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 mediante PCR en tiempo real. En ambos casos se comprobó que la actividad estaba incrementada, en el caso del transformante A78, el incremento es de 5,2 veces y en el caso del transformante B13 de 214,7 veces respecto a la expresión observada en la cepa parental. La sobreexpresión de ambos genes se llevó a cabo bajo el control del mismo promotor, por lo que esto no debería afectar a las diferencias de expresión observadas.

Finalmente, y mediante técnicas de proteómica se comprobó que, en el caso del transformante B13, ese incremento observado tanto en la expresión del gen *faeB*, como el aumento de la actividad, como cabe esperar, está relacionado con un aumento en la cantidad de proteína secretada (PcFaeB) por el microorganismo, encontrándose incrementada 9,27 veces respecto a la cepa parental. En dicho análisis, no se identifica la enzima PcFaeA, lo que indica que la cantidad de esta proteína producida por transformante B13 es tan baja que se encuentra por debajo del límite de detección de la técnica utilizada. Estudios consultados en la bibliografía indican que las enzimas tipo A, generalmente son inducidas por plantas monocotiledóneas, como el maíz, y no por plantas dicotiledóneas, como la PR (Colquhoun *et al.*, 1994)(Zwane *et al.*, 2014).

En el estudio realizado por Zwane *et al.*, 2014, donde se realiza la clonación y expresión de la proteína AtFaeA de *A. tubigenis* en *A. niger* D15#26 bajo el control del promotor *gpd*, se observa un incremento en la actividad FAE de tres veces en relación con la actividad endógena de *A. niger* D15#26 y cuando se utiliza salvado de maíz autoclavado como única fuente de carbono la actividad de multiplica por dos.

Las dos secuencias utilizadas en este trabajo para la sobreexpresión de FAE en *P. chrysogenum* (*faeA* y *faeB*) aparecen en las bases de datos descritas como posibles enzimas con actividad FAE debido a sus características o similitud con otras secuencias genéticas ya descritas (Udatha *et al.*, 2011)(Dilokpimol *et al.*, 2016). En este trabajo de doctorado se comprueba por primera vez la actividad FAE de dichas secuencias.

Un reciente estudio sobre la clasificación filogenética de las enzimas FAEs (Dilokpimol *et al.*, 2016) revela la existencia de cinco ORF en *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 que podrían codificar posibles enzimas FAEs. Dichos ORF serían Pc13g15360 (Subfamilia 13), Pc20g11110 (Subfamilia 5) y Pc21g17360 (Subfamilia 11), además de las dos secuencias utilizadas en este trabajo. En el análisis del proteoma realizado en este trabajo, tan sólo se ha identificado una de las secuencias anteriores, el ORF Pc13g15360, perteneciente a la familia de las lipasas. Dicho estudio releva la existencia de unas 1251 posibles secuencias de enzimas FAEs en hongos filamentosos obtenidas a partir de genomas ya secuenciados, lo que indica que en la naturaleza existe un gran potencial aún por estudiar.

2. Optimización del proceso fermentativo

En este trabajo de doctorado no se ha buscado el análisis de las condiciones óptimas de fermentación de las enzimas FAEs purificadas, sino como parte importante del cóctel enzimático secretado por el hongo que actúa de forma sinérgica con el resto de enzimas encargadas de la degradación de la pared celular vegetal, potenciando, de este modo, su rendimiento en la degradación de la pared celular. Las enzimas purificadas tienen una actividad muy baja cuando se usan directamente sobre el sustrato vegetal (Benoit *et al.*, 2006) y no resultan rentables desde el punto de vista industrial.

Las enzimas FAE muestran grandes variaciones en sus características físico-químicas como el peso molecular, el punto isoeléctrico o temperaturas y pH óptimos (Topakas *et al.*, 2007). Esto es debido al diferente origen que presentan todas las enzimas FAEs, como ya se ha indicado anteriormente (Dilokpimol *et al.*, 2016). Las enzimas FAE microbianas normalmente tienen un amplio rango de pH y T^a óptimos, se han descrito actividades óptimas entre pH de 5,0 a 8,0 y temperaturas entre 30° y 65°C, no observándose hasta el momento ninguna correlación entre las características de las FAEs y sus condiciones óptimas de reacción (Fazary y Ju, 2007)(Dilokpimol *et al.*, 2016).

En el caso de la actividad FAE observada en *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 el rango de pH para el que se observa una actividad FAE elevada es muy estrecho, concentrándose en valores cercanos a 5,0, para el resto de valores de pH ensayados (3,0-7,0), la actividad FAE no supera el 40%. En el caso de la enzima FAE-1 de *P. chrysogenum* 31B, el rango de pH óptimo es de

6,0 a 7,0 (Sakamoto *et al.*, 2005). La enzima FAE purificada a partir de *A. awamori* (Koseki *et al.*, 1998) sin embargo, pose el mismo pH óptimo que *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255: 5,0. Enzimas FAEs aisladas de otros hongos filamentosos como las enzimas FaeA1, FaeA2 y FaeB2 de *Chrysosporium lucknowense* C1 (Kühnel *et al.*, 2012) muestran un rango de actividad mucho más amplio, obteniendo más de un 60% de actividad a pHs entre 5,0 y 7,5. En el caso de las enzimas FAE de *A. oryzae* AoFaeB y AoFaeC el pH óptimo es de 6,0 (Koseki *et al.*, 2009).

A pesar de que el pH óptimo para el crecimiento del hongo *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 es 7,0, el pH óptimo para la actividad de las enzimas es 5,0, por lo cual realizando la fermentación a pH 5,0 se obtiene un coctel con mayor actividad FAE.

El rango de actividad FAE observada en *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 en función de la temperatura ensayada es bastante amplio, observándose más de 70% de actividad entre los 37 y los 55°C y más del 90% de actividad entre 50 y 55°C, sin embargo, la inactivación tiene lugar en un rango mucho más estrecho de temperatura (55-60°C). Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos para la mayoría de las enzimas FAE de origen fúngico, cuyo rango de temperatura óptimo está ente 50 y 60°C (Koseki *et al.*, 2009).

Los pH y T^a óptimos, 5,0 y 50-55°C respectivamente, observados en el análisis del cóctel enzimático producido por *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 son similares a los observados en otros microorganismos, siendo mucho más parecidos a los observados en especies próximas genéticamente a *P. chrysogenum*, como es el caso de la especie *A. niger* (pH: 5,0 y T^a: 55°C) (Faulds y Williamson, 1994), que en otras especies más distantes genéticamente como por ejemplo *Talaromyces stipitatus* (pH: 6,0-7,0 y T^a: 60°C) (Topakas *et al.*, 2004). En el caso de las enzimas FAE de origen bacteriano, la temperatura óptima de reacción disminuye a valores de 30-37°C (Faulds y Williamson, 1991), (Wang *et al.*, 2004), (Esteban-Torres *et al.*, 2013). Todas estas diferencias entre las enzimas con actividad FAE, se deben al distinto origen de las mismas y a las diferentes especificidades de sustrato de cada enzima. También influye en el resultado el hecho de analizar las enzimas purificadas o como parte de un cóctel enzimático secretado por el hongo.

Una vez determinadas las condiciones óptimas de fermentación para la producción de enzimas FAEs por parte de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 y sus transformantes sobreexpresados, se decidió realizar un escalado semi-industrial de la fermentación utilizando el transformante B13, al ser el que mejor resultados mostró. El éxito del escalado de la producción de FAEs deriva no sólo de la utilización de microorganismos que presentan una ventaja competitiva sino del desarrollo de unos parámetros adecuados de fermentación que incrementen la producción y ahorren costes en la misma. En el caso de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255, se trata de una cepa que se ha usado frecuentemente en la industria farmacéutica para la producción

de penicilinas, y aun que existen cepas más adaptadas para la producción industrial, gran parte de ellas, derivan de la cepa Wisconsin 54-1255 (Barreiro *et al.*, 2012).

El proceso de escalado más sensible es el que se produce entre la escala de laboratorio (matraz) y la planta piloto (biorreactor), debido a las diferencias en el diseño de los equipos, que modifican las condiciones hidrodinámicas del proceso. Además, concretamente los hongos filamentosos son especialmente sensibles al proceso de escalado, debido a que existe una modificación en la viscosidad de los medios, razón por la cual se presentan problemas de transferencia de masa, de energía y de oxígeno y problemas de mezclado. El sistema de agitación del biorreactor, también puede influir de forma negativa en el crecimiento del hongo llegando a romper las hifas (si la agitación es excesiva) o provocando falta de oxígeno y formación de aglutinaciones de las hifas (si la agitación es escasa) (Cui *et al.*, 1997). También se ha observado que la producción de enzimas disminuye si se sobrepasa al agitación óptima del proceso (Ibrahim *et al.*, 2015).

Los resultados obtenidos en el proceso de escalado de escala de laboratorio (matraz 500 mL) a escala planta piloto (biorreactores 5-20 L) demuestran que, la calidad del cóctel enzimático producido por el transformante B13, en lo que a la actividad FAE se refiere, es óptima, bajo las condiciones ensayadas. Estos ensayos también demuestran la buena capacidad de adaptación del transformante B13 a condiciones semi-industriales, haciéndole un candidato óptimo para la producción a gran escala de enzimas con actividad FAE.

El tiempo de fermentación al que se obtiene la máxima actividad FAE pasa de 90 h observadas en el laboratorio en matraz, a 24 h a escala de 20 L, reduciéndose de forma considerable el tiempo de fermentación, y consecuentemente los costes de la misma.

Para una mayor optimización del proceso de producción de FAEs y lograr mayores rendimientos, sería aconsejable añadir mayor cantidad de fuente de carbono en el medio inicial de fermentación y acortar el tiempo de cada lote, o bien realizar una fermentación tipo *fed-batch*, donde se iría añadiendo progresivamente más fuente de carbono al biorreactor a lo largo del proceso de fermentación. Esto se debe a que se ha observado el agotamiento del cultivo tras 24 h de fermentación en los biorreactores. De esta manera, se podría optimizar aún más el proceso de producción de enzimas FAE por parte del transformante B13 en medio con PR, siendo posible la obtención de mayores rendimientos de producción.

En el caso de que el objetivo de la fermentación sea la obtención de AF a partir de fuentes naturales, sería aconsejable realizar un pretratamiento al sustrato vegetal previo a la fermentación, de modo que facilite el acceso de las enzimas FAEs para la liberación de AF. Este pretratamiento puede ser por calor, por medio de sustancias químicas, por medio de enzimas hidrolíticas o combinación de varios o todos ellos. En este trabajo se ha realizado un

pretratamiento de calor a través de la esterilización del medio de cultivo en el autoclave, que ayuda a la separación de las fibras y facilita el acceso de las enzimas. El AF no es soluble en agua a temperatura ambiente, pero sí lo es en agua caliente (Guo *et al.*, 2003). Otra opción sería un tratamiento químico, en este caso la recomendación sería un tratamiento básico, ya que rompe los enlaces ester por los que está unido el AF a los polisacáridos de la pared celular vegetal (Tilay *et al.*, 2008)(Kumar y Pruthi, 2014) y es más apropiado para este tipo de sustrato. El tratamiento ácido estaría más recomendado para la ruptura de otro tipo de enlaces, según estudios realizados en trigo (Pan *et al.*, 1998). Otro pretratamiento posible sería el uso de enzimas que degraden la pectina, facilitando de este modo la acción de las enzimas FAE, como por ejemplo el uso de las enzimas ramnoglacturonano hidrolasa y ramnoglacturonano acetil-esterasa, usadas previamente para este fin en anteriores estudios (de Vries *et al.*, 2002). Una vez desestructurada la pared celular de la PR mediante uno o varios de estos pretratamientos, se realizaría la fermentación con *P. chrysogenum* B13, las enzimas FAEs producidas por el mismo, liberarían las moléculas de AF de la estructura de la pared celular y posteriormente se realizaría la extracción y purificación del AF para su uso comercial o industrial. Hay que tener en cuenta que para que el AF será considerado natural, generalmente no puede ser extraído por métodos químicos (Kumar y Pruthi, 2014).

3. Mayor actividad que los preparados comerciales

En el mercado no existe una gran variedad de preparados con actividad FAEs, y muchos sólo están disponibles a nivel industrial. En el presente trabajo se comparó la actividad del cóctel enzimático producido por la cepa B13 frente a uno de estos preparados comerciales con actividad FAE que se puede adquirir para su uso en el laboratorio: D740L, de la empresa Biocatalysts (Reino Unido). Las enzimas FAEs de este producto proceden del microorganismo *Humicola* sp.

Este preparado comercial se mezcló con otros dos preparados comerciales de la misma empresa con actividades enzimáticas necesarias para la degradación de la estructura de la pared celular de la pulpa de remolacha, como son D667P (actividad β -glucanasa) y D680P (actividades α -amilasa, amiloglucosidasa y xilanasas). El cóctel enzimático producido por la cepa B13 tiene una actividad 3-4 veces superior a la del cóctel de enzimas comerciales de Biocatalysts cuando se ensaya frente a la PR. El preparado comercial D740L es usado principalmente en la industria para biotransformar el ácido p-cumárico en vainillina y/o protector solar. Otro uso es el de obtener ácido cafeico a partir del café, lo que puede indicar que las enzimas FAE que contiene dicho preparado comercial no serían las idóneas para la degradación de la PR, debido a las diferencias en la estructura de la pared celular entre la remolacha y el café, como se ha indicado anteriormente.

Por otro lado, se ensayó el coctel producido por la cepa B13 y el preparado D740L frente al sustrato sintético MFA. En este caso, al tratarse de un compuesto simple, no sería necesario el uso de enzimas complementarias que degraden la estructura de pared celular vegetal para dejar accesibles los enlaces entre el AF y los polisacáridos, ni entraría en juego la especificidad de sustrato. En este caso, se observa también cómo la actividad FAE de la cepa B13 es muy superior a la del preparado D740L. Lo cual indicaría una mayor actividad FAE presente en el cóctel enzimático producido por la cepa B13 que en el preparado comercial D740L.

Otro preparado comercial disponible en el mercado es E-FAEZCT, de la empresa Megazime (EEUU), que contiene una enzima recombinante de alta pureza procedente del microorganismo *Clostridium thermocellum*. Según el fabricante tiene una actividad de 40 U/mg, superior a la actividad del preparado ensayado, D740L, que según el fabricante es de 36 U/g. A parte, existen otras preparaciones comerciales a base de enzimas cutinasas y tanasas que contienen actividad FAE. Este es el caso de la enzima tanasa de *A. oryzae* que es capaz de hidrolizar 5,5'- y 8,5'-diFA diésteres (García-Conesa *et al.*, 2001)(Vafiadi *et al.*, 2008), pero no se trata de una actividad FAE pura.

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, las FAEs producidas por el transformante B13 tienen mayor actividad enzimática (en los términos ensayados) que las enzimas con actividad FAE comercializadas por Biocatalyst, pudiendo ser competitivas en un mercado tan amplio y en expansión como es el de las enzimas con actividad FAEs, ya sea como única actividad (enzima purificada), o en conjunto con otras actividades enzimáticas (cóctel enzimático), según la aplicación y el resultado que se desee. Estos resultados también indican la necesidad en el mercado de una gran variedad de enzimas FAEs con diferentes actividades y que sean activas frente a la gran variedad de sustratos lignocelulósicos que se emplean actualmente en las industrias (paja de maíz, paja de trigo, madera, marro de café, pulpa de remolacha, etc...).

Dependiendo de la naturaleza del sustrato, la elección de la enzima FAE adecuada es de fundamental importancia. Un mejor conocimiento de la especificidad de estas enzimas ayudaría a mejorar los cocteles enzimáticos potenciando una actividad en concreto.

II. ANÁLISIS DEL PROTEOMA EXTRACELULAR

En este trabajo se ha analizado la composición proteica del proteoma extracelular completo (secretoma) de la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 B13 obtenido en condiciones de producción de enzimas FAEs, mediante técnicas de proteómica. Para ello se ha utilizado la cepa B13 sobreexpresada para el gen *faeB*, que codifica la enzima con actividad FAE PcFaeB, enzima implicada en los procesos de degradación de la pared celular vegetal y para ello se ha cultivado en presencia de PR en un biorreactor semi-industrial de 20 L.

La proteómica es la ciencia dedicada al estudio del proteoma, ya sea intra, extracelular, o de membrana y de sus cambios en función del contexto biológico. A diferencia de las técnicas clásicas utilizadas en bioquímica, que tan sólo permiten el análisis simultáneo de unas pocas proteínas, la proteómica permite la separación y la identificación de muchas proteínas (del orden de mil o superior) simultáneamente. De hecho, se está convirtiendo en una herramienta esencial para la optimización de cócteles enzimáticos lignocelulolíticos, con el fin de desarrollar procesos de degradación de la pared celular vegetal más eficientes (Song *et al.*, 2016).

Si comparamos las proteínas identificadas en el secretoma de referencia de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 en el estudio realizado por Jami *et al.* (2010a) en un medio no inductor de enzimas lignocelulolíticas (MPPY), con las proteínas identificadas en el secretoma de la cepa B13, observamos cómo el total de proteínas identificadas es menor, pasa de 328 a 189 en la cepa B13, y vemos cómo las proteínas implicadas en el metabolismo celular (metabolismo general, utilización de nutrientes, control de las funciones, etc.) disminuye de 53,38% a 13,33% y se ve aumentado en un 30,63% el porcentaje de enzimas relacionadas con la degradación de la pared celular vegetal, pasando de representar el 11,59% al 42,22% en el transformante B13.

1. Proteínas identificadas no relacionadas con la degradación de la pared celular vegetal:

En el análisis realizado se han identificados enzimas relacionadas con la estructura de la pared celular del hongo, con la defensa celular y con el metabolismo general de la célula. Todas ellas cumplen un papel relevante en el proceso fermentativo.

La pared celular de los hongos es una estructura dinámica que está formada por una red de polisacáridos y glicoproteínas, que protege a las células del estrés exterior, pero también permite la comunicación con el medio exterior (Zhao *et al.*, 2013). Los enlaces entre los diferentes componentes estabilizan la estructura de la pared celular formando una malla continua, suficientemente fuerte como para soportar la presión osmótica y para proteger a las células de agresiones mecánicas externas (Cabib *et al.*, 2007)(Free, 2013).

En el secretoma de *P. chrysogenum* B13 se han identificado un total de 6 proteínas con 36 isoformas relacionadas con la estructura de la pared celular del hongo. Una de las proteínas identificada (Pc21g23210) tiene una gran similitud con una posible proteína de pared celular Crh1, descrita anteriormente en *Saccharomyces cerevisiae* (Mazán et al., 2013) como una enzima transglicosidasa perteneciente a la familia de enzimas glicosil-hidrolasa 16 (GH16). Dicha enzima está encargada de formar los enlaces entre la quitina y el glucano en la pared celular del microorganismo (Cabib *et al.*, 2007) y de este modo hacer la pared celular más resistente frente a estreses externos. La familia GH16 incluye un gran número de enzimas de bacterias, hongos y plantas con funciones no relacionadas, pero que comparten secuencia y estructura similares (Cantarel *et al.*, 2009). Todas ellas contienen un dominio catalítico muy conservado y muestran varias características estructurales similares, tales como una señal de secreción N-terminal, una región rica en Ser-Thr y una señal de unión a GPI (glicosil-fosfatidilinositol), que es necesaria para su anclaje a la membrana plasmática. Esto explicaría las diferencias observadas entre la masa teórica de la proteína (36,15 kDa) y la masa estimada analizada en este trabajo (330,39 kDa). Muy probablemente, en el momento del análisis dicha proteína permanecía unida a algún complejo de membrana, típico de estas enzimas transglicosilasas (Blanco *et al.*, 2015).

Se ha identificado también proteínas con posible función 1,3- β -glucanosiltransferasas (Pc13g08730), dichas enzimas elongan el β -1,3-glucano de la pared celular de los hongos filamentosos, lo cual forma un papel importante en el crecimiento de las células (Zhao *et al.*, 2014). La proteína quitinasa identificada (Pc13g09520), es la enzima encargada de remodelar la quitina existente en la propia pared celular del hongo o de atacar la quitina de otras especies presentes en el medio. La quitina es hidrolizada por las quitinasas a unidades de acetil glucosamina (Shahidi *et al.*, 1999).

Otra posible proteína identificada con 17 isoformas es la β -N-acetilhexosamidasa de *P. chrysogenum* (Pc20g10360), esta enzima hidroliza los residuos de β -N-acetilglucosamina procedentes de la degradación de la quitina (Díez *et al.*, 2005). Dicha enzima ha estado patentada por Antibióticos León S.A WO/1998/039459 (Barredo Fuente *et al.*, 1998).

Un factor importante en la capacidad de degradación de la pared celular vegetal es la habilidad del organismo para eliminar o tolerar moléculas tóxicas producidas como consecuencia de dicha degradación. En el secretoma de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 B13 se ha identificado 10 isoformas de una única proteína relacionada con procesos de defensa celular (Pc16g11860). Dicha proteína posee una fuerte similitud con la catalasa *catR* de *Aspergillus niger*. La enzima catalasa rompe el peróxido de hidrógeno, generado al romperse los enlaces que forman la estructura de la pared celular vegetal, y forma agua y oxígeno (Garre *et al.*, 1998), compuestos

no tóxicos para el microorganismo. Esta enzima también puede estar relacionada con procesos de patogenicidad.

Dentro de las enzimas relacionadas con el metabolismo celular encontramos la posible enzima glutaminasa (Pc20g02640) que cataliza la conversión de glutamina a glutamato (Koibuchi *et al.*, 2000), por lo cual forma parte del metabolismo de aminoácidos. La posible enzima amidasa (Pc22g01750), cataliza la ruptura de una amida formando ácido carboxílico y amonio, fácilmente asimilables por el microorganismo. Las posibles hidroxinicotin-oxidasas (Pc21g12590 y Pa18g05530) son enzimas que en presencia de oxígeno y agua convierten la D-6-hidroxinicotina en [6-hidroxipiridil-(3)]-(4-N-metilaminopropil)-cetona y peróxido de hidrógeno (Brühmüller *et al.*, 1972). La hidroxinicotina es una fuente de carbono y de nitrógeno para los microorganismos. Las posibles sulfidril-oxidasas (Pc22g22810) son un tipo de enzimas oxidasas que catalizan una reacción de óxido-reducción donde el O₂ es el aceptor final de electrones.

Dentro de las enzimas metabólicas secretadas por *P. chrysogenum* B13, encontramos un grupo de enzimas denominadas proteasas o peptidasas. Son enzimas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas usando una molécula de agua. Por ello se clasifican dentro de las enzimas hidrolasas. La degradación de las proteínas presentes en el medio en unidades más pequeñas, péptidos o aminoácidos, facilita en gran medida la utilización de estos nutrientes por parte del microorganismo. En el secretoma de *P. chrysogenum* B13 se han identificado 5 proteínas como posibles proteasas. Las posibles proteasas Pc13g09680 y Pc21g14160 presentaron un sistema de secreción clásico, mientras que las Pc20g09400 y Pc22g13950 presentaron un sistema de secreción no clásico. La proteína Pc22g15910 es una posible aminopetidasa y es la única proteína analizada que no presentó ni un sistema de secreción clásico, ni no clásico, por lo que no podemos afirmar que se trate de una proteína de secreción. Dicha proteína se ha encontrado con anterioridad en el citoplasma de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 con tres isoformas (Jami *et al.*, 2010a) y una isoforma en el secretoma (Jami *et al.*, 2010b). Existe la posibilidad de que se trate de una proteína *moonlighting*, es decir, que sea una proteína con varias funciones (Mani *et al.*, 2015).

2. Proteínas relacionadas con la degradación de la pared celular vegetal

El extracto enzimático producido por *P. chrysogenum* B13 en presencia de PR posee una gran variedad de enzimas relacionadas con la degradación de la pared celular vegetal. El 42,22% de los puntos proteicos identificados en el extracto enzimático de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 B13, un total de 57 isoformas, están relacionadas con la degradación de la pared celular vegetal, porcentaje muy superior al 11,59% descrito en el secretoma de referencia de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 por (Jami *et al.*, 2010b), el cual fue obtenido a partir de un medio de cultivo sin fuente de carbono de origen vegetal (MPPY).

En dicho secretoma de referencia la única proteína con posible actividad FAE identificada fue la proteína PcFaeA (Pc20g07010), sin embargo, no se identificó la PcFaeB (Pc12g08300), objeto del presente estudio. Esto parece indicar que el MPR utilizado en este estudio, induce la secreción de dicha enzima, al contrario que el medio MPPY utilizado por Jami *et al.* 2010b.

Al contrario sucede en el análisis del secretoma de la cepa B13, donde no se identifica la proteína PcFaeA (Pc20g07010). Las proteínas FAEs tienen orígenes muy diversos (Dilokpimol *et al.*, 2016), la enzima PcFaeA deriva de enzimas con actividad lipasa como así demuestra el análisis de dominios conservados de la secuencia y la clasificación filogenética realizada por Dilokpimol *et al.* (2016). Esto, junto con el resto de estudios realizados en el presente trabajo, hacen indicar que la PR y las condiciones de cultivo no son una fuente inductora para la secreción de dicha enzima, bajo las condiciones ensayadas. También es posible que al encontrarse la actividad PcFaeB sobreexpresada en la cepa B13, la actividad PcFaeA haya quedado reprimida en esta cepa.

Entre las enzimas identificadas cabe destacar 4 isoformas de la enzima PcFaeB (Pc12g08300), sobreexpresada en esta cepa. Esta enzima se encuentra descrita en las bases de datos consultadas como muy similar al precursor de la tanasa de *Aspergillus oryzae*. La tanasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces éster (Aguilar y Gutierrez-Sanchez, 2001), al igual que hacen las enzimas FAEs y de la que deriva la proteína PcFaeB según su clasificación filogenética (Dilokpimol *et al.*, 2016) y el estudio de los dominios conservados de sus secuencias.

Llama especialmente la atención la elevada cantidad (82,8%) de isoformas o isoenzimas identificadas en el secretoma. Estas isoformas, son distintas formas de una única proteína, es decir, todas ellas catalizan la misma reacción química, pero esta variabilidad estructural les permite una cierta flexibilidad a la hora de degradar la gran variedad de sustratos vegetales y nutrientes presentes en el medio (van den Brink y de Vries, 2011). El grupo de enzimas en el que se ha encontrado la mayor cantidad de isoformas es en las enzimas relacionadas con la degradación de la pared celular vegetal.

La pared celular de la remolacha está formada principalmente por celulosa (22-30%), hemicelulosa (24-32%) y pectinas (24-32%) (McNeil *et al.*, 1984)(Saha, 2003). Además de la enzima PcFaeB con sus 4 isoformas (7,02%), encontramos otras 19 enzimas, con 53 isoformas y 15 actividades enzimáticas diferentes, relacionadas con la degradación de los componentes de la pared celular vegetal: 36,84% isoenzimas relacionadas con la degradación de la celulosa y la hemicelulosa, 19,30% relacionadas con la degradación de la hemicelulosa, 35,09% implicadas en la degradación de pectinas y 1,75% de otras enzimas (Fig. 51), cuyas posibles funciones se detallan a continuación.

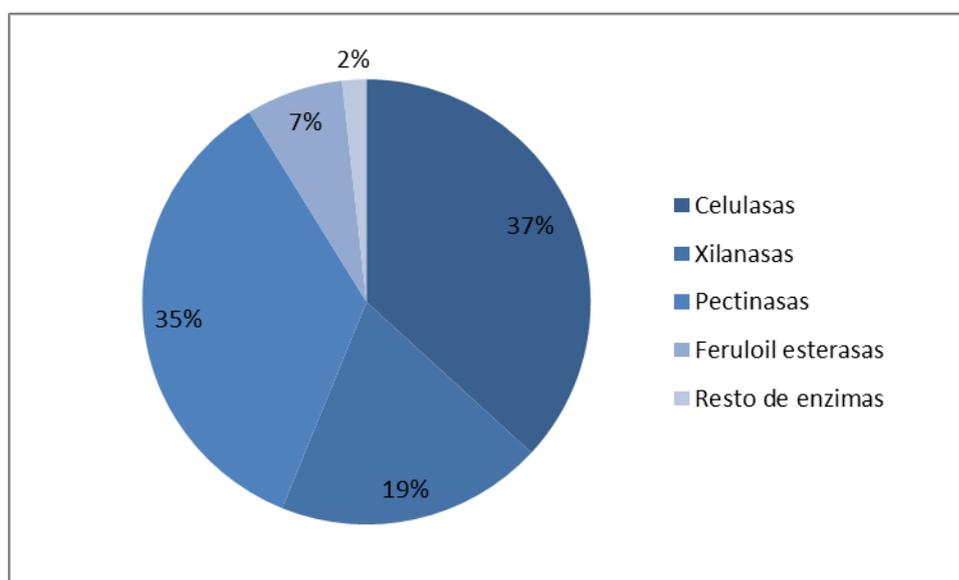


Fig. 51: Enzimas implicadas en la degradación de la pared celular de la pulpa de remolacha, identificadas en el análisis del secretoma de *P. chrysogenum* B13.

CELULASAS: Las posibles enzimas encargadas de la degradación de residuos celulósicos identificadas, disponen de una actividad en cadena, es decir, es necesaria la actuación de una de ellas, para que el resto pueda actuar y de este modo poder degradar la estructura celulósica a unidades simples de glucosa. Las posibles enzimas **exoglucanasas** (Pc16g13100) rompen los enlaces internos de las cadenas de glucano, liberando oligosacáridos. Las posibles enzimas hidrolasas con actividad **celobiohidrolasa** (Pc18g05490 y Pc20g01970) liberan moléculas de celobiosa al romper los enlaces glicosídicos de las cadenas de celulosa y de los oligosacáridos (Saharay *et al.*, 2010). La posible actividad enzimática **glucano-1,4- α -glucosidasa** (Pc22g01850) cataliza la hidrólisis de residuos terminales de D-glucosa unidos mediante enlace α -1,4 en los residuos terminales no reductores de las cadenas de polisacáridos, con liberación de unidades de β -glucosa. La posible enzima **β -glucosidasa** (Pc12g11110, Pc15g00210, Pc18g01940 y Pc20g10170) cataliza la hidrólisis de las moléculas de celobiosa formando dos unidades de glucosa, fuente de carbono fácilmente asimilable por los microorganismos (van den Brink y de Vries, 2011).

HEMICELULASAS: La posible actividad **α -arabinofuranosidasa** (Pc12g004070) es capaz de hidrolizar los arabinoxilanos presentes en las paredes celulares vegetales, pero no los arabinanos ni los arabinogalactanos (Maehara *et al.*, 2014). La posible enzima **1,2- α -manosidasa** (Pc16g14170) hidroliza las cadenas de manano y galactomanano actuando sobre los enlaces no reductores y los N-glicanos de las glicoproteínas (Ademark *et al.*, 2001). Las posibles actividades **arabinosidasa** y **xilosidasa** (Pc22g14710) se consideran accesorias a la degradación de xilano como heteropolímero. Las arabinosidasas contribuyen con la escisión de grupos laterales arabinofuranósidos, los cuales pueden causar impedimentos estéricos para la acción de las

endo-xilansas; mientras que las xilosidasas remueven los sustituyentes de xilosa e hidrolizan xilotriosas y xilobiosas. La posible actividad **arabinofuranosidasa** (Pc22g19620) hidroliza la arabinosa de los arabinoxilanos. Todas estas enzimas actúan conjuntamente para la completa degradación de la hemicelulosa presente en la PR. Una representación esquemática de la gran variedad de las enzimas implicadas en la degradación de algunas estructuras de las hemicelulosas se puede ver en la Fig. 52.

PECTINASAS: La actividad de las enzimas catalogadas como pectinasas permite la completa ruptura de los polímeros de pectina en oligómeros o monómeros, los cuales pueden ser fácilmente asimilables por los hongos filamentosos. La posible enzima **endo 1,5- α -arabinasa** (Pc12g10800 y Pc13g15920) degrada enlaces internos de los arabinanos de la pared celular vegetal formando dímeros o trímeros (Sakamoto *et al.*, 2003). La posible enzima **ramnogalacturonasa** (Pc14g00370) rompe las cadenas de ramnogalacturonanos, presentes en las paredes celulares vegetales, por su extremo reductor liberando unidades de ramnosa (Mutter *et al.*, 1996). La posible actividad **pectin-liasa** (Pc21g09850 y Pc22g24890) rompe el enlace metil éster las cadenas de pectina dando lugar a oligómeros de ácido galacturónico y ramnosa, entre otros (Mutenda *et al.*, 2002). La posible **exo-arabinanasa** (Pc18g01880) degrada los arabinanos de las paredes celulares vegetales liberando unidades de arabinobiosas de los extremos no reductores (Sogabe *et al.*, 2011). Una representación esquemática de las enzimas involucradas en la degradación de algunos polisacáridos de las pectinas se puede ver en la Fig. 52.

FAEs: La actividad **FAE** (Pc12g08300) es la encargada de la ruptura de los enlaces éster entre los ácidos hidroxycinámicos y los polímeros de pectinas de la PR (Colquhoun *et al.*, 1994), y de la lignina (Iiyama *et al.*, 1994) dejando de este modo más accesibles las pectinas para su degradación por otras enzimas (van den Brink y de Vries, 2011). Las FAEs se han catalogado como enzimas accesorias en la bibliografía durante años. Este estudio revela la importancia y necesidad de dichas enzimas en el proceso de degradación de la pared celular vegetal.

RESTO DE ENZIMAS: Finalmente encontramos enzimas definidas como accesorias. Estas enzimas accesorias rompen enlaces entre cadenas de polímeros, como puede ser el caso de las enzimas con actividad lipasa: la actividad **triacilglicerol lipasa** (Pc13g15360) extracelular identificada en este estudio es la encargada de la degradación de los lípidos presentes en las paredes celulares vegetales.

En este análisis no se ha identificado ninguna de las principales enzimas relacionadas con la degradación de la lignina, como son la lignina peroxidasas, manganeso-peroxidasas o lacasas (Adav *et al.*, 2012). Esto se debe a que el contenido en lignina en la PR es muy bajo (2-4%), y debido a ello, no induce la secreción de este tipo de enzimas. Sin embargo, recientes estudios (Song *et al.*, 2016) han demostrado que la presencia de lignina afecta de forma negativa a la

degradación de la biomasa lignocelulósica al actuar como una barrera física y provocar una adsorción no productiva de componentes enzimáticos sobre la lignina, lo que también afecta a la eficiencia hidrolítica. Gran parte de los enlaces entre la lignina y los polisacáridos de la pared celular vegetal son enlaces éster con el AF u otros ácidos hidroxicinámicos (Fig. 13). El uso de un cóctel enzimático rico en actividad FAE, como es el producido por la cepa B13 de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255, sería determinante a la hora de optimizar los procesos de degradación de material lignocelulósico rico en lignina, al facilitar el rápido acceso a la estructura de la pared celular al resto de enzimas encargadas de su degradación.

El proteoma o secretoma es el conjunto de proteínas expresadas por un organismo en un momento dado. Mientras que el genoma de un organismo es esencialmente constante a lo largo de su vida, el proteoma tiene un carácter dinámico: la expresión de proteínas varía en cada tipo celular, en las diferentes etapas del ciclo celular y también en respuesta a las acciones externas que tengan lugar en cada momento. Una prueba de ello es que en el genoma de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 existen un total de 285 genes relacionados con la degradación de la pared celular vegetal (van den Berg *et al.*, 2008). En este trabajo se han identificado un total de 20 proteínas con 57 isoformas, mientras que en el secretoma de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 realizado por Jami *et al.*, (2010a), donde las condiciones de cultivo utilizadas no inducían la secreción de enzimas que degradan la pared celular vegetal, se identificaron únicamente 18 proteínas con 38 isoformas. Por ello la proteómica es una técnica que nos aporta mucha información sobre un estado celular concreto y nos ayuda a entender la gran versatilidad de los hongos filamentosos y en concreto de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 que tiene un grandísimo potencial como productor de enzimas lignocelulóticas que pueden ser inducidas en función de las necesidades específicas del proceso.

La Fig. 52 proporciona una idea de lo complejo que es el sistema de degradación de la pared celular vegetal y la cantidad de enzimas implicadas en el proceso. Como se puede ver en dicho esquema, las FAE juegan un papel importantísimo, puesto que facilitan el acceso a la estructura al resto de enzimas.

Estudios proteómicos realizados en otros hongos filamentosos como *Phanerochaete chrysosporium* (Adav *et al.*, 2012), *Penicillium decumbens* (Liu *et al.*, 2013) o *Penicillium oxalicum* (Song *et al.*, 2016) también muestran una mayor cantidad de proteínas secretadas relacionadas con la degradación de la biomasa vegetal cuando son cultivados con una fuente inductora. Por ejemplo, en el caso del estudio realizado por Song *et al.* (2016) en residuos de maíz se identificaron un total de 202 proteínas producidas por *Penicillium oxalicum*, donde el 48% de las mismas fueron identificadas como enzimas carbohidrato-activas (CAZymes). Datos muy similares a los obtenidos en el presente trabajo.

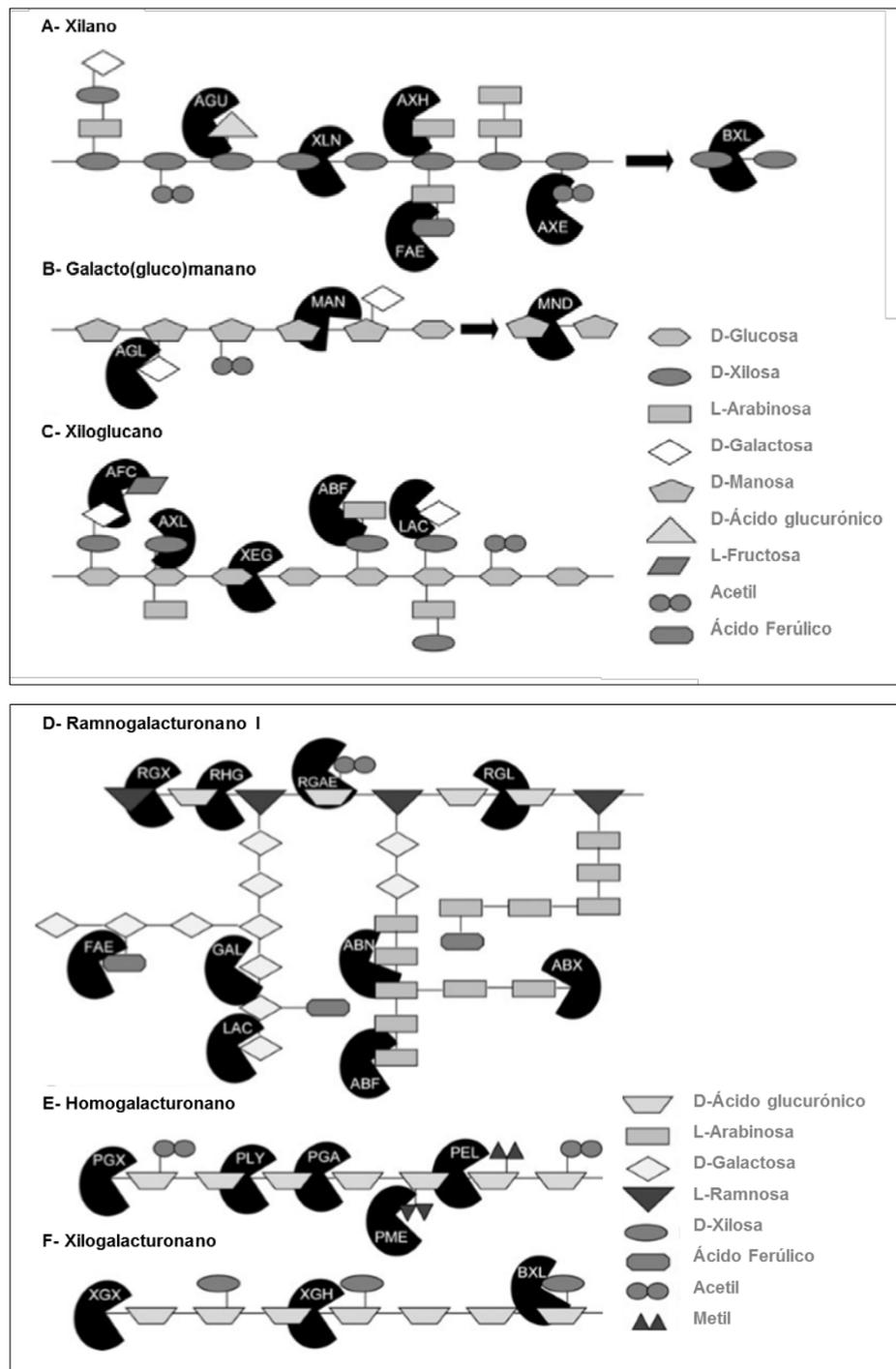


Fig. 52: Esquema de tres hemicelulosas (A-C) y tres pectinas (D-F): xilano (A), galacto (gluco) manano (B), xiloglucano (C), ramnogalacturonano I (D), homogalacturonano (E) y xilogalacturonano (F), con las enzimas encargadas de la degradación de dichas estructuras. Enzimas hemicelulolíticas (A-C): **ABF**: α -fucosidasa, **AGL**: α -1,4 galactosidasa, **AGU**: α -glucuronidasa, **AX**: acetil (xilano) esterasa, **AXH**: arabinoxilano α -arabinofuranohidrolasa, **AXL**: α -xilosidasa, **BXL**: β -1,4xilosidasa, **FAE**: feruloil esterasa, **LAC**: β -1,4-galactosidasa, **MAN**: β -1,4-endomannanasa, **MND**: β -1,4-manosidasa, **XEG**: xiloglucano-activa β -1,4endoglucanasa, **XLN**: β -1, 4-endoxilanasa. Enzimas pectinolíticas (D-F). **ABF**: α -arabinofuranosidasa, **ABN**: endo-arabinanasa, **ABX**: exo-arabinanasa, **BXL**: β -1,4-xilosidasa, **FAE**: feruloil esterasa, **GAL**: β -1,4-endo-galactanasa, **LAC**: β -galactosidasa, **PEL**: pectin liasa, **PLY**: pectato liasa, **PGA**: endo-poligalacturonasa, **PGX**: exo-poligalacturonasa, **PME**: Pectina metil esterasa, **RGAE**: ramnogalacturonano acetil esterasa, **RGL**: ramnogalacturonano liasa, **RHG**: endo-ramnogalacturonasa, **RGX**: exo-ramnogalacturonasa, **XGH**: endo-xilogalacturonasa, **XGX**: exoxilogalacturonasa. Las enzimas α -ramnosidasa (RHA), ramnogalacturonasa insaturada (URH) y la glucuronil hidrolasa insaturada (UGH) no se representan en esta figura. Modificado de (van den Brink y de Vries, 2011).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 tiene actividad enzimática feruloil esterasa.
2. El marro de café no induce una secreción eficiente de enzimas con actividad feruloil esterasa en *P. chrysogenum*, bajo las condiciones de estudio.
3. La pulpa de remolacha induce la producción de enzimas con actividad feruloil esterasa en *P. chrysogenum*, bajo las condiciones ensayadas.
4. En *P. chrysogenum* se han identificado los genes *faeA* y *faeB*, así como las proteínas que codifican dichos genes: PcFaeA y PcFaeB respectivamente.
5. Las proteínas PcFaeA y PcFaeB de *P. chrysogenum* poseen actividad feruloil esterasa.
6. Los transformantes sobreexpresados en *faeA* y *faeB* presentan una mayor actividad feruloil esterasa que la cepa parental *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 frente a los sustratos metil ferulato y pulpa de remolacha.
7. El análisis de los resultados de hibridación de Northern y RT-qPCR en tiempo real indican que ambos transformantes A78 y B13 están sobreexpresados en los genes *faeA* y *faeB* respectivamente.
8. El análisis de la actividad feruloil esterasa indica que el transformante A78, sobreexpresado en el gen *faeA*, multiplica la actividad de la cepa parental frente a pulpa de remolacha por 4 y por 15 frente a metil ferulato.
9. El transformante B13, sobreexpresado con el gen *faeB*, multiplica la actividad feruloil esterasa por más de 90 cuando el sustrato es metil ferulato y por 14 cuando es pulpa de remolacha con respecto a *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255.
10. El escalado de la fermentación para la producción de extractos enzimáticos enriquecidos en PcFaeB a partir del transformante B13, permite reducir el tiempo de fermentación a 24 horas tras su inoculación en biorreactores.
11. El extracto enzimático producido por el transformante B13 presenta una actividad feruloil esterasa 3 veces superior frente a pulpa de remolacha que las enzimas comerciales analizadas y 4,5 veces superior frente a metil ferulato, bajo las condiciones ensayadas.
12. La pulpa de remolacha induce una secreción eficiente de la enzima PcFaeB en *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255, pero no de la enzima PcFaeA.

13. En las fermentaciones del transformante B13, la pulpa de remolacha induce la secreción de enzimas extracelulares relacionadas con la degradación de la pared celular vegetal como indica el análisis del secretoma.
14. El análisis proteómico 2D-DIGE indica un aumento de 9,27 veces en la cantidad de proteína PcFaeB presente en el cóctel enzimático producido por el transformante B13 con respecto a la cepa parental *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255.
15. Se describe un nuevo uso para la pulpa de remolacha, subproducto agroindustrial, gracias a su potencial para inducir la secreción de enzimas lignocelulolíticas y a su alto contenido en ácido ferúlico.

CONCLUSIÓN GENERAL

Según nuestros conocimientos hasta la fecha, en este trabajo se realiza por primera vez la comprobación de la actividad enzimática FAE de las proteínas PcFaeA y PcFaeB de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255, así como la modificación genética del mismo para la obtención de una cepa superproductora de enzimas FAEs, la cepa B13, empleando un sub-producto agroindustrial como es la PR como fuente vegetal inductora de la secreción de enzimas lignocelulolíticas. Lo cual, amplía la comprensión sobre la diversidad y complejidad de la composición de los cócteles enzimáticos lignocelulolíticos producidos por hongos filamentosos y aporta nuevas vías de investigación. La cepa B13 de *P. chrysogenum*, es una cepa superproductora de enzimas con actividad FAE capaces de romper los enlaces éster entre los ácidos hidroxicinámicos, principalmente el AF y los polisacáridos de la pared celular vegetal. Por un lado, estas enzimas actúan dejando más accesibles dichos polisacáridos a la acción de otras enzimas secretadas por el mismo hongo, que de otro modo, no podrían acceder a estos compuestos y por otro lado, pudiendo acceder a mayor cantidad de moléculas de AF para su liberación al medio de cultivo, y posterior recuperación. Este estudio muestra que *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 B13 es una cepa prometedora para la producción industrial de complejos cócteles de enzimas lignocelulolíticas para una degradación eficiente de la biomasa vegetal, así como para la producción biológica de AF a escala industrial.

Debido a la gran diversidad de sustratos naturales utilizados en el mundo y de la especificidad de cada proceso en concreto, la tendencia de la biotecnología en los últimos años es a individualizar cada proceso y aplicar las mejoras y la tecnología necesarias para sacar el máximo rendimiento del mismo. En este sentido, el conocimiento de la composición del secretoma bajo determinadas condiciones y la evolución del mismo a lo largo del proceso fermentativo, ayudará a optimizar la composición óptima del cóctel enzimático para cada tipo de aplicación. Este trabajo amplía los conocimientos sobre la composición del cóctel enzimático de *P. chrysogenum* 54-1255 bajo condiciones de producción de enzimas lignocelulolíticas y abre nuevas vías de investigación que permitan hacer procesos industriales a la carta.

El presente trabajo ha demostrado que es posible preparar transformantes de *P. chrysogenum* con mayor actividad FAE a la de otros preparados comerciales, bajo las condiciones ensayadas y que además permite dar un nuevo uso a la PR, sub-producto agroindustrial, a la vez que abre nuevas vías de investigación hacia la producción biológica de AF a escala industrial.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

A

Adams, R., and Bockstahler, T.E. (1952). *Preparation and Reactions of o-Hydroxycinnamic Acids and Esters*. J. Am. Chem. Soc. 74, 5346–5348.

Adav, S.S., Ravindran, A., and Sze, S.K. (2012). *Quantitative proteomic analysis of lignocellulolytic enzymes by Phanerochaete chrysosporium on different lignocellulosic biomass*. J. Proteomics 75, 1493–1504.

Ademark, P., de Vries, R.P., Hägglund, P., Stålbrand, H., and Visser, J. (2001). *Cloning and characterization of Aspergillus niger genes encoding an alpha-galactosidase and a beta-mannosidase involved in galactomannan degradation*. Eur. J. Biochem. FEBS 268, 2982–2990.

Adrio, J.-L., and Demain, A.L. (2010). *Recombinant organisms for production of industrial products*. Bioeng. Bugs 1, 116–131.

Aguilar, C.N., and Gutierrez-Sanchez, G. (2001). *Review: Sources, Properties, Applications and Potential uses of Tannin Acyl Hydrolase*. Food Sci. Technol. Int. 7, 373–382.

Akbas, M.Y., and Stark, B.C. (2016). *Recent trends in bioethanol production from food processing byproducts*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 1–17.

Alamed, J., Chaiyasit, W., McClements, D.J., and Decker, E.A. (2009). *Relationships between free radical scavenging and antioxidant activity in foods*. J. Agric. Food Chem. 57, 2969–2976.

Alban, A., David, S.O., Bjorkesten, L., Andersson, C., Sloge, E., Lewis, S., and Currie, I. (2003). *A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard*. Proteomics 3, 36–44.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997). *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. Nucleic Acids Res. 25, 3389–3402.

Alvarez, E., Cantoral, J.M., Barredo, J.L., Díez, B., and Martín, J.F. (1987). *Purification to homogeneity and characterization of acyl coenzyme A: 6-aminopenicillanic acid acyltransferase of Penicillium*

chrysogenum. Antimicrob. Agents Chemother. 31, 1675–1682.

Anné, J. (1977). *Somatic hybridization between Penicillium chrysogenum species after induced fusion of their protoplasts*. Agricultura. 1–17.

Asther, M., Haon, M., Roussos, S., Record, E., Delattre, M., Lesage-Meessen, L., Labat, M., and Asther, M. (2002). *Feruloyl esterase from Aspergillus niger: a comparison of the production in solid state and submerged fermentation*. Process Biochem. 38, 685–691.

Azcón-Bieto, J., and Talón, M. (1993). *Fisiología y bioquímica vegetal*. Madrid, España. McGraw-Hill/Interamericana de España. ISBN: 978-84-486-0033-4.

B

Bacic, A., Harris, P.J., and Stone, B.A. (1988). *Structure and function of plant cell walls in The Biochemistry of Plants, Volume 14*. London. Academic Press. ISBN: 9780126754148 – 9780080926155. p 297–372.

Backus, M.P., and Stauffer, J.F. (1955). *The Production and Selection of a Family of Strains in Penicillium chrysogenum*. Mycologia 47, 429.

Bañuelos, O., Casqueiro, J., Fierro, F., Hijarrubia, M.J., Gutiérrez, S., and Martín, J.F. (1999). *Characterization and lysine control of expression of the lys1 gene of Penicillium chrysogenum encoding homocitrate synthase*. Gene 226, 51–59.

Barredo Fuente, J.L., Rodriguez Saiz, M., Moreno Valle, M.A., Collados De La Vieja, A.J., Salto Maldonado, F., and Díez García, B. (1998). *Promotores de los genes glutamato deshidrogenasa, β -n-acetilhexosaminidasa η -actina y su utilizacion en sistemas de expresion, secrecion y antisentido de hongos filamentosos*. Patent: WO/1998/039459; 1998/09/12.

Barreiro, C., Martín, J.F., and García-Estrada, C. (2012). *Proteomics Shows New Faces for the Old Penicillin Producer Penicillium chrysogenum*. BioMed Res. Int. 2012, e105109.

Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L., and Hoondal, G.S. (2001). *Microbial xylanases and their industrial*

applications: a review. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56, 326–338.

Bendtsen, J.D., Jensen, L.J., Blom, N., Heijne, G. von, and Brunak, S. (2004). *Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion*. Protein Eng. Des. Sel. 17, 349–356.

Bendtsen, J.D., Kiemer, L., Fausbøll, A., and Brunak, S. (2005). *Non-classical protein secretion in bacteria*. BMC Microbiol. 5, 58.

Benoit, I., Navarro, D., Marnet, N., Rakotomanomana, N., Lesage-Meessen, L., Sigoillot, J.-C., Asther, M., and Asther, M. (2006). *Feruloyl esterases as a tool for the release of phenolic compounds from agro-industrial by-products*. Carbohydr. Res. 341, 1820–1827.

Benoit, I., Danchin, E.G.J., Bleichrodt, R.-J., and de Vries, R.P. (2008). *Biotechnological applications and potential of fungal feruloyl esterases based on prevalence, classification and biochemical diversity*. Biotechnol. Lett. 30, 387–396.

Berdy, J. (1980). *Bleomycin type antibiotics*. In *Amino Acid and Peptide Antibiotics. Handbook of Antibiotic Compounds*. Boca Raton FL (Ed.). CRC Press., pp. 459–491. ISBN: 0849334500, 9780849334504.

Blanco, N., Sanz, A.B., Rodríguez-Peña, J.M., Nombela, C., Farkaš, V., Hurtado-Guerrero, R., and Arroyo, J. (2015). *Structural and functional analysis of yeast Crh1 and Crh2 transglycosylases*. FEBS J. 282, 715–731.

Böhm, J., Hoff, B., O’Gorman, C.M., Wolfers, S., Klix, V., Binger, D., Zadra, I., Kürsteiner, H., Pöggeler, S., Dyer, P.S., et al. (2013). *Sexual reproduction and mating-type-mediated strain development in the penicillin-producing fungus Penicillium chrysogenum*. Proc. Natl. Acad. Sci. 110, 1476–1481.

Borneman, W.S., Hartley, R.D., Morrison, W.H., Akin, D.E., and Ljungdahl, L.G. (1990). *Feruloyl and p-coumaroyl esterase from anaerobic fungi in relation to plant cell wall degradation*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 33, 345–351.

Bradford, M.M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem. 72, 248–254.

Brett, C.T., and Waldron, K.W. (1996). *Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls*. Cambridge. University Press. ISBN: 978-0-412-58060-4

Brühmüller, M., Möhler, H., and Decker, K. (1972). *Covalently Bound Flavin in d-6-Hydroxynicotine Oxidase from Arthrobacter oxidans*. Eur. J. Biochem. 29, 143–151.

Buchan, D.W.A., Minneci, F., Nugent, T.C.O., Bryson, K., and Jones, D.T. (2013). *Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench*. Nucleic Acids Res. 41, W349–W357.

Bustin, S.A. (2000). *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. J. Mol. Endocrinol. 25, 169–193.

C

Cabib, E., Blanco, N., Grau, C., Rodríguez-Peña, J.M., and Arroyo, J. (2007). *Crh1p and Crh2p are required for the cross-linking of chitin to $\beta(1-6)$ glucan in the Saccharomyces cerevisiae cell wall*. Mol. Microbiol. 63, 921–935.

Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G.M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L., and Righetti, P.G. (2004). *Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis*. Electrophoresis 25, 1327–1333.

Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., and Henrissat, B. (2009). *The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics*. Nucleic Acids Res. 37, D233–D238.

Cantoral, J.M., Díez, B., Barredo, J.L., Alvarez, E., and Martín, J.F. (1987). *High-Frequency Transformation of Penicillium chrysogenum*. Nat. Biotechnol. 5, 494–497.

Cardoza, R.E., Moralejo, F.J., Gutiérrez, S., Casqueiro, J., Fierro, F., and Martín, J.F. (1998). *Characterization and nitrogen-source regulation at the transcriptional level of the gdhA gene of Aspergillus awamori encoding an NADP-dependent glutamate dehydrogenase*. Curr. Genet. 34, 50–59.

Carpita, N.C., and Gibeaut, D.M. (1993). *Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth*. Plant J. Cell Mol. Biol. 3, 1–30.

Casqueiro, J., Gutiérrez, S., Bañuelos, O., Hijarrubia, M.J., and Martín, J.F. (1999). *Gene targeting in Penicillium chrysogenum: disruption of the lys2 gene leads to penicillin overproduction*. J. Bacteriol. 181, 1181–1188.

- Castanares, A., McCrae, S.I., and Wood, T.M.** (1992). Purification and properties of a feruloyl/*q*-coumaroyl esterase from the fungus *Penicillium pinophilum*. *Enzyme Microb. Technol.* 14, 875–884.
- Castells, X.E.** (2012). Valoración de residuos procedentes de grandes industrias: Reciclaje de residuos industriales. In *Reciclaje de residuos industriales: Residuos sólidos urbanos y fangos de depurador*. Madrid. Ed. Díaz de Santos. ISBN: 978-84-9969-380-4.
- Castle, M.E., Drysdale, A.D., and Watson, J.N.** (1966). The effect of feeding dried sugar-beet pulp on the intake and production of dairy cows. *J. Dairy Res.* 33, 123–128.
- Chandrasekharaiah, M., Thulasi, A., Bagath, M., Kumar, D.P., Santosh, S.S., Palanivel, C., Jose, V.L., and Sampath, K.T.** (2011). Molecular cloning, expression and characterization of a novel feruloyl esterase enzyme from the symbionts of termite (*Coptotermes formosanus*) gut. *BMB Rep.* 44, 52–57.
- Clutterbuck, P.W., Lovell, R., and Raistrick, H.** (1932). Studies in the biochemistry of micro-organisms: The formation from glucose by members of the *Penicillium chrysogenum* series of a pigment, an alkali-soluble protein and penicillin—the antibacterial substance of Fleming. *Biochem. J.* 26, 1907–1918.
- Coll, J.B.** (2005). Fisiología Vegetal. Madrid. España: Pirámide. ISBN: 978-84-368-0219-1
- Collis, C.M., and Hall, R.M.** (1985). Identification of a *Tn5* determinant conferring resistance to phleomycins, bleomycins, and tallysomycins. *Plasmid* 14, 143–151.
- Colquhoun, I.J., Ralet, M.C., Thibault, J.F., Faulds, C.B., and Williamson, G.** (1994). Structure identification of feruloylated oligosaccharides from sugar-beet pulp by NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 263, 243–256.
- Crepin, V.F., Faulds, C.B., and Connerton, I.F.** (2003). Production and characterization of the *Talaromyces stipitatus* feruloyl esterase FAEC in *Pichia pastoris*: identification of the nucleophilic serine. *Protein Expr. Purif.* 29, 176–184.
- Crepin, V.F., Faulds, C.B., and Connerton, I.F.** (2004). Functional classification of the microbial feruloyl esterases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 647–652.
- Cui, Y.Q., van der Lans, R.G., and Luyben, K.C.** (1997). Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 55, 715–726.

D

Dahlmann, T.A., Böhm, J., Becker, K., and Kück, U. (2015). Sexual recombination as a tool for engineering industrial *Penicillium chrysogenum* strains. *Curr. Genet.* 61, 679–683.

de Hoog, G., Guarro J, Gené J, and Figueras F (2000). *Atlas of Clinical Fungi* (Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht)).

de Vries, R.P., and Visser, J. (1999). Regulation of the Feruloyl Esterase (*faeA*) Gene from *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5500–5503.

de Vries, R.P., Michelsen, B., Poulsen, C.H., Kroon, P.A., van den Heuvel, R.H., Faulds, C.B., Williamson, G., van den Hombergh, J.P., and 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, 4638–4644.

de Vries, R.P., vanKuyk, P.A., Kester, H.C.M., and 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, 377–386.

Díez, B., Alvarez, E., Cantoral, J.M., Barredo, J.L., and Martín, J.F. (1987). Selection and characterization of *pyrG* mutants of *Penicillium chrysogenum* lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase and complementation by the *pyr4* gene of *Neurospora crassa*. *Curr. Genet.* 12, 277–282.

Díez, B., Gutiérrez, S., Barredo, J.L., van Solingen, P., van der Voort, L.H., and Martín, J.F. (1990). The cluster of penicillin biosynthetic genes. Identification and characterization of the *pcbAB* gene encoding the alpha-aminoadipyl-cysteinyl-valine synthetase and linkage to the *pcbC* and *penDE* genes. *J. Biol. Chem.* 265, 16358–16365.

Díez, B., Marcos, A.T., Rodríguez, M., de la Fuente, J.L., and Barredo, J.L. (2001). Structural and phylogenetic analysis of the gamma-actin encoding gene from the penicillin-producing fungus *Penicillium chrysogenum*. *Curr. Microbiol.* 42, 117–121.

Díez, B., Rodríguez-Sáiz, M., de La Fuente, J.L., Moreno, M.Á., and Barredo, J.L. (2005). The *nagA* gene of *Penicillium chrysogenum* encoding β-N-

acetylglucosaminidase. *FEMS Microbiol. Lett.* 242, 257–264.

Dilokpimol, A., Mäkelä, M.R., Aguilar-Pontes, M.V., Benoit-Gelber, I., Hildén, K.S., and de Vries, R.P. (2016). *Diversity of fungal feruloyl esterases: updated phylogenetic classification, properties, and industrial applications*. *Biotechnol. Biofuels* 9, 231.

Donaghy, J.A., and McKay, A.M. (1994). *Novel screening assay for the detection of phenolic acid esterases*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10, 41–44.

Donaghy, J., and McKay, A.M. (1997). *Purification and characterization of a feruloyl esterase from the fungus *Penicillium expansum**. *J. Appl. Microbiol.* 83, 718–726.

Drocourt, D., Calmels, T., Reynes, J.P., Baron, M., and Tiraby, G. (1990). *Cassettes of the *Streptoalloteichus hindustanus ble* gene for transformation of lower and higher eukaryotes to phleomycin resistance*. *Nucleic Acids Res.* 18, 4009.

E

Elander, R.P. (1983). *Strain improvement and preservation of beta-lactam producing microorganisms, in Antibiotics Containing the Beta-lactam Structure I*. 97–146.

Esteban-Torres, M., Reverón, I., Mancheño, J.M., de Las Rivas, B., and Muñoz, R. (2013). *Characterization of a feruloyl esterase from *Lactobacillus plantarum**. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5130–5136.

F

Farrell, A.E., Plevin, R.J., Turner, B.T., Jones, A.D., O'Hare, M., and Kammen, D.M. (2006). *Ethanol Can Contribute to Energy and Environmental Goals*. *Science* 311, 506–508.

Faulds, C. (2009). *What can feruloyl esterases do for us?* *Phytochem. Rev.* 9, 121–132.

Faulds, C.B. (2003). *Feruloyl esterases: Molecular tools to unravel cell structure*. *Recent Res. Dev. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 245–275.

Faulds, C.B., and Williamson, G. (1991). *The purification and characterization of 4-hydroxy-3-methoxycinnamic (ferulic) acid esterase from *Streptomyces olivochromogenes**. *J. Gen. Microbiol.* 137, 2339–2345.

Faulds, C.B., and Williamson, G. (1994). *Purification and characterization of a ferulic acid esterase (FAE-III)*

*from *Aspergillus niger*: specificity for the phenolic moiety and binding to microcrystalline cellulose*. *Microbiology* 140, 779–787.

Faulds, C.B., and Williamson, G. (1995). *Release of ferulic acid from wheat bran by a ferulic acid esterase (FAE-III) from *Aspergillus niger**. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 1082–1087.

Faulds, C.B., and Williamson, G. (1999). *The role of hydroxycinnamates in the plant cell wall*. *J. Sci. Food Agric.* 79, 393–395.

Faulds, C.B., Ralet, M.C., Williamson, G., Hazlewood, G.P., and Gilbert, H.J. (1995). *Specificity of an esterase (XYLD) from *Pseudomonas fluorescens subsp. cellulosa**. *Biochim. Biophys. Acta* 1243, 265–269.

Faulds, C.B., deVries, R.P., Kroon, P.A., Visser, J., and Williamson, G. (1997). *Influence of ferulic acid on the production of feruloyl esterases by *Aspergillus niger**. *FEMS Microbiol. Lett.* 157, 239–244.

Fazary, A.E., and Ju, Y.-H. (2007). *Feruloyl esterases as biotechnological tools: current and future perspectives*. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 39, 811–828.

Fazary, A.E., Ismadji, S., and Ju, Y.-H. (2009). *Biochemical studies on native and cross-linked aggregates of *Aspergillus awamori* feruloyl esterase*. *Int. J. Biol. Macromol.* 44, 240–248.

Fernández-Acero, F.J., Jorge, I., Calvo, E., Vallejo, I., Carbú, M., Camafeita, E., López, J.A., Cantoral, J.M., and Jorrín, J. (2006). *Two-dimensional electrophoresis protein profile of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea**. *Proteomics* 6, S88–96.

Fernández-Aguado, M., Ullán, R., Teijeira, F., Rodríguez-Castro, R., and Martín, J. (2012). *The transport of phenylacetic acid across the peroxisomal membrane is mediated by the PaaT protein in *Penicillium chrysogenum**. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1–12.

Fernández-Aguado, M., Teijeira, F., Martín, J.F., and Ullán, R.V. (2013). *A vacuolar membrane protein affects drastically the biosynthesis of the ACV tripeptide and the beta-lactam pathway of *Penicillium chrysogenum**. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 795–808.

Fernández-Aguado, M., Martín, J.F., Rodríguez-Castro, R., García-Estrada, C., Albillos, S.M., Teijeira, F., and Ullán, R.V. (2014). *New insights into the isopenicillin N transport in *Penicillium chrysogenum**. *Metab. Eng.*

Ferreira, P., Diez, N., Faulds, C.B., Soliveri, J., and Copa-Patiño, J.L. (2007). *Release of ferulic acid and feruloylated oligosaccharides from sugar beet pulp by Streptomyces tendae*. *Bioresour. Technol.* 98, 1522–1528.

Fierro, F., Barredo, J.L., Díez, B., Gutierrez, S., Fernández, F.J., and Martín, J.F. (1995). *The penicillin gene cluster is amplified in tandem repeats linked by conserved hexanucleotide sequences*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 6200–6204.

Fleming, A. (1929). *On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae*. *Bull. World Health Organ.* 79, 780–790.

Free, S.J. (2013). *Fungal cell wall organization and biosynthesis*. *Adv. Genet.* 81, 33–82.

Friedman, M., and Jürgens, H.S. (2000). *Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic Compounds*. *J. Agric. Food Chem.* 48, 2101–2110.

Fry, S.C. (1982). *Phenolic components of the primary cell wall. Feruloylated disaccharides of D-galactose and L-arabinose from spinach polysaccharide*. *Biochem. J.* 203, 493–504.

Fry, S.C. (1986). *Cross-Linking of Matrix Polymers in the Growing Cell Walls of Angiosperms*. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37, 165–186.

Fry, S.C., and Miller, J.G. (1989). *Toward a Working Model of the Growing Plant Cell Wall: Phenolic Cross-Linking Reactions in the Primary Cell Walls of Dicotyledons*. In *Plant Cell Wall Polymers: Biogenesis y biodegradation*, N.G. Lewis, y M.G. Paice, eds. Washington, DC: American Chemical Society. ACS Symposium Series No. 399. pp. 33–46. ISBN 0-8412-1658-4

G

García-Conesa, M.-T., Kroon, P.A., Ralph, J., Mellon, F.A., Colquhoun, I.J., Saulnier, L., Thibault, J.-F., and Williamson, G. (1999). *A cinnamoyl esterase from Aspergillus niger can break plant cell wall cross-links without release of free diferulic acids*. *Eur. J. Biochem.* 266, 644–652.

García-Conesa, M.-T., Ostergaard, P., Kauppinen, S., and Williamson, G. (2001). *Hydrolysis of diethyl diferulates by a tannase from Aspergillus oryzae*. *Carbohydr. Polym.* 44, 319–324.

García-Conesa, M.-T., Crepin, V.F., Goldson, A.J., Williamson, G., Cummings, N.J., Connerton, I.F., Faulds, C.B., and Kroon, P.A. (2004). *The feruloyl esterase system of Talaromyces stipitatus: production of three discrete feruloyl esterases, including a novel enzyme, TsFaeC, with a broad substrate specificity*. *J. Biotechnol.* 108, 227–241.

Garre, V., Müller, U., and Tudzynski, P. (1998). *Cloning, Characterization, and Targeted Disruption of cpcat1, Coding for an in Planta Secreted Catalase of Claviceps purpurea*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 11, 772–783.

Genilloud, O., Garrido, M.C., and Moreno, F. (1984). *The transposon Tn5 carries a bleomycin-resistance determinant*. *Gene* 32, 225–233.

Gopalan, N., Rodríguez-Duran, L.V., Saucedo-Castaneda, G., and Nampoothiri, K.M. (2015). *Review on technological and scientific aspects of feruloyl esterases: A versatile enzyme for biorefining of biomass*. *Bioresour. Technol.* 193, 534–544.

Grabber, J.H., Ralph, J., and Hatfield, R.D. (1998). *Ferulate Cross-Links Limit the Enzymatic Degradation of Synthetically Lignified Primary Walls of Maize*. *J. Agric. Food Chem.* 46, 2609–2614.

Graf, E. (1992). *Antioxidant potential of ferulic acid*. *Free Radic. Biol. Med.* 13, 435–448.

Guglielmetti, S., De Noni, I., Caracciolo, F., Molinari, F., Parini, C., and Mora, D. (2008). *Bacterial cinnamoyl esterase activity screening for the production of a novel functional food product*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1284–1288.

Guo, T., Sun, Y., Sui, Y., and Li, F. (2003). *Determination of ferulic acid and adenosine in Angelicae Radix by micellar electrokinetic chromatography*. *Anal. Bioanal. Chem.* 375, 840–843.

Gutiérrez, S., Díez, B., Alvarez, E., Barredo, J.L., and Martín, J.F. (1991a). *Expression of the penDE gene of Penicillium chrysogenum encoding isopenicillin N acyltransferase in Cephalosporium acremonium: production of benzylpenicillin by the transformants*. *Mol. Gen. Genet.* MGG 225, 56–64.

Gutiérrez, S., Díez, B., Montenegro, E., and Martín, J.F. (1991b). *Characterization of the Cephalosporium acremonium pcbAB gene encoding alpha-aminoacyl-cysteine-valine synthetase, a large multidomain peptide synthetase: linkage to the pcbC gene as a cluster of early cephalosporin biosynthetic genes and*

evidence of multiple functional domains. *J. Bacteriol.* 173, 2354–2365.

H

Hanahan, D. (1983). *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.* *J. Mol. Biol.* 166, 557–580.

Hartley, R.D., and Harris, P.J. (1981). *Phenolic Constituents of the cell walls of dicotyledons.* *Biochem. Syst. Ecol.* 9, 189–203.

Hassan, S., and 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, 963–970.

Havlis, J., Thomas, H., Sebela, M., and Shevchenko, A. (2003). *Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins.* *Anal. Chem.* 75, 1300–1306.

Headley, S., and Massad, S.J. (1999). *Nutritional supplements for athletes.* Virginia. National Association for Sport y Physical Education. ISBN: 978-0-88314-708-5.

Heinonen, M., Rein, D., Satué-Gracia, M.T., Huang, S.-W., German, J.B., and Frankel, E.N. (1998). *Effect of Protein on the Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in a Lecithin-Liposome Oxidation System.* *J. Agric. Food Chem.* 46, 917–922.

Hermoso, J.A., Sanz-Aparicio, J., Molina, R., Juge, N., González, R., and Faulds, C.B. (2004). *The crystal structure of feruloyl esterase A from Aspergillus niger suggests evolutive functional convergence in feruloyl esterase family.* *J. Mol. Biol.* 338, 495–506.

Hertzberg, R.P., Caranfa, M.J., and Hecht, S.M. (1985). *DNA methylation diminishes bleomycin-mediated strand scission.* *Biochemistry (Mosc.)* 24, 5285–5289.

Hidalgo, P.I., Ullán, R.V., Albillos, S.M., Montero, O., Fernández-Bodega, M.Á., García-Estrada, C., Fernández-Aguado, M., and Martín, J.-F. (2014). *Molecular characterization of the PR-toxin gene cluster in Penicillium roqueforti and Penicillium chrysogenum: cross talk of secondary metabolite pathways.* *Fungal Genet. Biol. FG B* 62, 11–24.

Houbraken, J., Frisvad, J.C., and Samson, R.A. (2011). *Fleming's penicillin producing strain is not Penicillium chrysogenum but P. rubens.* *IMA Fungus Glob. Mycol. J.* 2, 87–95.

Hutnan, M., Drtil, M., and Mrafkova, L. (2000). *Anaerobic biodegradation of sugar beet pulp.* *Biodegradation* 11, 203–211.

Hwang, J., and Kokini, J.L. (1992). *Contribution of the side branches to rheological properties of pectins.* *Carbohydr. Polym.* 19, 41–50.

I

Ibrahim, D., Welosamy, H., and Lim, S.-H. (2015). *Effect of agitation speed on the morphology of Aspergillus niger HFD5A-1 hyphae and its pectinase production in submerged fermentation.* *World J. Biol. Chem.* 6, 265–271.

Iiyama, K., Lam, T., and Stone, B.A. (1994). *Covalent Cross-Links in the Cell Wall.* *Plant Physiol.* 104, 315–320.

Ishii, T. (1991). *Isolation and characterization of a diferuloyl arabinoxylan hexasaccharide from bamboo shoot cell-walls.* *Carbohydr. Res.* 219, 15–22.

Ishii, T. (1994). *Feruloyl oligosaccharides from cell walls of suspension-cultured spinach cells and sugar beet pulp.* *Plant Cell Physiol.* 35, 701–704.

Ishii, T. (1997). *Structure and functions of feruloylated polysaccharides.* *Plant Sci.* 127, 111–127.

Ishii, T., Hiroi, T., and Thomas, J.R. (1990). *Feruloylated xyloglucan and p-coumaroyl arabinoxylan oligosaccharides from bamboo shoot cell-walls.* *Phytochemistry* 29, 1999–2003.

J

Jami, M.-S., Barreiro, C., García-Estrada, C., and Martín, J.-F. (2010a). *Proteome analysis of the penicillin producer Penicillium chrysogenum: characterization of protein changes during the industrial strain improvement.* *Mol. Cell. Proteomics MCP* 9, 1182–1198.

Jami, M.-S., García-Estrada, C., Barreiro, C., Cuadrado, A.-A., Salehi-Najafabadi, Z., and 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 MCP* 9, 2729–2744.

Jankovska, P., Copikova, J., and Sinitsya, A. (2001). *The determination of ferulic acid in sugar beet pulp.* *Czech J. Food Sci. - UZPI v.* 19(4) pp. 143–147.

Jeong, Y., Jae, H., and Keun, H. (2000). *Isolation and identification of 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid and 3-methoxy-4-hydroxycinnamic acid from hot water extracts of Hovenia dulcis Thumb and confirmation of their antioxidative and antimicrobial activity.* Korean J Food Sci Technol 32, 1403–1408.

Jones, D.T. (1999). *Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices.* J. Mol. Biol. 292, 195–202.

K

Kamal-Eldin, A., Frank, J., Razdan, A., Tengblad, S., Basu, S., and Vessby, B. (2000a). *Effects of dietary phenolic compounds on tocopherol, cholesterol, and fatty acids in rats.* Lipids 35, 427–435.

Kamisaka, Seiichiro, S.T. (1990). *Diferulic and ferulic acid in the cell wall of Avena coleoptiles—Their relationships to mechanical properties of the cell wall.* Physiol. Plant. 78, 1–7.

Kardos, N., and Demain, A.L. (2013). *Ernst Chain: a great man of science.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 97, 6613–6622.

Kawabata, K., Yamamoto, T., Hara, A., Shimizu, M., Yamada, Y., Matsunaga, K., Tanaka, T., and Mori, H. (2000). *Modifying effects of ferulic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats.* Cancer Lett. 157, 15–21.

Kayahara, H., Miao, Z., and Fujiwara, G. (1999). *Synthesis and biological activities of ferulic acid derivatives.* Anticancer Res. 19, 3763–3768.

Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., and Sternberg, M.J.E. (2015). *The Pyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis.* Nat. Protoc. 10, 845–858.

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, 231–243.

Knoshaug, E.P., Selig, M.J., Baker, J.O., Decker, S.R., Himmel, M.E., and Adney, W.S. (2008). *Heterologous expression of two ferulic acid esterases from Penicillium funiculosum.* Appl. Biochem. Biotechnol. 146, 79–87.

Kobayashi, Y., Horikoshi, and Koki (1982). *Purification and characterization of extracellular polyamine oxidase produced by Penicillium sp.* No. PO-1. Biochim.

Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol. 705, 133–138.

Koibuchi, K., Nagasaki, H., Yuasa, A., Kataoka, J., and Kitamoto, K. (2000). *Molecular cloning and characterization of a gene encoding glutaminase from Aspergillus oryzae.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 54, 59–68.

Kosalková, K., García-Estrada, C., Ullán, R.V., Godio, R.P., Feltrer, R., Tejeira, F., Mauriz, E., and Martín, J.F. (2009). *The global regulator LaeA controls penicillin biosynthesis, pigmentation and sporulation, but not roquefortine C synthesis in Penicillium chrysogenum.* Biochimie 91, 214–225.

Koseki, T., Furuse, S., Iwano, K., and Matsuzawa, H. (1998). *Purification and characterization of a feruloyl esterase from Aspergillus awamori.* Biosci. Biotechnol. Biochem. 62, 2032–2034.

Koseki, T., Fushinobu, S., Ardiansyah, Shirakawa, H., and Komai, M. (2009). *Occurrence, properties, and applications of feruloyl esterases.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 84, 803–810.

Kroon, P.A., and Williamson, G. (1996). *Release of ferulic acid from sugar-beet pulp by using arabinanase, arabinofuranosidase and an esterase from Aspergillus niger.* Biotechnol. Appl. Biochem. 23 (Pt 3), 263–267.

Kühnel, S., Pouvreau, L., Appeldoorn, M.M., Hinz, S.W.A., Schols, H.A., and Gruppen, H. (2012). *The ferulic acid esterases of Chrysosporium lucknowense C1: Purification, characterization and their potential application in biorefinery.* Enzyme Microb. Technol. 50, 77–85.

Kumar, N., and Pruthi, V. (2014). *Potential applications of ferulic acid from natural sources.* Biotechnol. Rep. 4, 86–93.

L

Laemmli, U.K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature 227, 680–685.

Lebo, S.E., Gargulak, J.D., and McNally, T.J. (2001). *Lignin.* In Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology.

Leiter, É., Marx, F., Pusztahelyi, T., Haas, H., and Pócsi, I. (2004). *Penicillium chrysogenum glucose oxidase – a study on its antifungal effects.* J. Appl. Microbiol. 97, 1201–1209.

Lesage-Meessen, L., Delattre, M., Haon, M., Thibault, J.F., Ceccaldi, B.C., Brunerie, P., and Asther, M. (1996). *A two-step bioconversion process for vanillin production from ferulic acid combining Aspergillus niger and Pycnoporus cinnabarinus*. J. Biotechnol. 50, 107–113.

Levasseur, A., Benoit, I., Asther, M., Asther, M., and Record, E. (2004). *Homologous expression of the feruloyl esterase B gene from Aspergillus niger and characterization of the recombinant enzyme*. Protein Expr. Purif. 37, 126–133.

Levasseur, A., Navarro, D., Punt, P.J., Belaïch, J.-P., Asther, M., and Record, E. (2005). *Construction of engineered bifunctional enzymes and their overproduction in Aspergillus niger for improved enzymatic tools to degrade agricultural by-products*. Appl. Environ. Microbiol. 71, 8132–8140.

Levigne, S., Ralet, M.-C., Quéméner, B., and Thibault, J.-F. (2004a). *Isolation of diferulic bridges ester-linked to arabinan in sugar beet cell walls*. Carbohydr. Res. 339, 2315–2319.

Levigne, S.V., Ralet, M.-C.J., Quéméner, B.C., Pollet, B.N.-L., Lapiere, C., and Thibault, J.-F.J. (2004b). *Isolation from Sugar Beet Cell Walls of Arabinan Oligosaccharides Esterified by Two Ferulic Acid Monomers*. Plant Physiol. 134, 1173–1180.

Li, X., Fan, Y., and Fang, B. (2010). *Purification and characterization of ferulic acid esterase from Penicillium citrinum*. Wei Sheng Wu Xue Bao 50, 1058–1064.

Liu, K. (2011). *Chemical Composition of Distillers Grains, a Review*. J. Agric. Food Chem. 59, 1508–1526.

Liu, G., Zhang, L., Wei, X., Zou, G., Qin, Y., Ma, L., Li, J., Zheng, H., Wang, S., Wang, C., et al. (2013). *Genomic and Secretomic Analyses Reveal Unique Features of the Lignocellulolytic Enzyme System of Penicillium decumbens*. PLOS ONE 8, e55185.

Lo, H.H., and Chung, J.G. (1999). *The effects of plant phenolics, caffeic acid, chlorogenic acid and ferulic acid on arylamine N-acetyltransferase activities in human gastrointestinal microflora*. Anticancer Res. 19, 133–139.

Lodish, H. (2005). *Biología Celular y Molecular*. Buenos Aires. Ed. Médica Panamericana. ISBN: 978-950-06-1374-3

López-Nieto, M., Ramos, F., Luengo, J., and Martin, J. (1985a). *Characterization of the biosynthesis in vivo of*

alpha amino adipylcysteinylvaline in penicillium chrysogenum. Appl Microbiol Biotechnol. 22, 343–351.

Luengo, J.M., Revilla, G., Villanueva, J.R., and Martín, J.F. (1979). *Lysine regulation of penicillin biosynthesis in low-producing and industrial strains of Penicillium chrysogenum*. J. Gen. Microbiol. 115, 207–211.

M

MacAdam, J.W., and Grabber, J.H. (2002). *Relationship of growth cessation with the formation of diferulate cross-links and p-coumaroylated lignins in tall fescue leaf blades*. Planta 215, 785–793.

Machida, M., Yamada, O., and Gomi, K. (2008). *Genomics of Aspergillus oryzae: Learning from the History of Koji Mold and Exploration of Its Future*. DNA Res. 15, 173–183.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D., and Clark, D.P. (2012). *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson Education, Inc. ISBN: 0-321-64963-X.

Maehara, T., Fujimoto, Z., Ichinose, H., Michikawa, M., Harazono, K., and Kaneko, S. (2014). *Crystal structure and characterization of the glycoside hydrolase family 62 α -L-arabinofuranosidase from Streptomyces coelicolor*. J. Biol. Chem.

Mancuso, C., and Santangelo, R. (2014). *Ferulic acid: pharmacological and toxicological aspects*. Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc. 65, 185–195.

Mani, M., Chen, C., Amblee, V., Liu, H., Mathur, T., Zwicke, G., Zabad, S., Patel, B., Thakkar, J., and Jeffery, C.J. (2015). *MoonProt: a database for proteins that are known to moonlight*. Nucleic Acids Res. 43, D277–282.

Maniatis, T., Fritsch, E., and Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Martínez-Gomariz, M., Perumal, P., Mekala, S., Nombela, C., Chaffin, W.L., and Gil, C. (2009). *Proteomic analysis of cytoplasmic and surface proteins from yeast cells, hyphae, and biofilms of Candida albicans*. Proteomics 9, 2230–2252.

Mathew, S., and Abraham, T.E. (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, 59–83.

- Mazáň, M., Blanco, N., Kováčová, K., Firáková, Z., Rehulka, P., Farkaš, V., and Arroyo, J.** (2013). A novel fluorescence assay and catalytic properties of Crh1 and Crh2 yeast cell wall transglycosylases. *Biochem. J.* 455, 307–318.
- McAuley, K.E., Svendsen, A., Patkar, S.A., and Wilson, K.S.** (2004). Structure of a feruloyl esterase from *Aspergillus niger*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60, 878–887.
- McKenzie, T., Hoshino, T., Tanaka, T., and Sueoka, N.** (1986). The nucleotide sequence of pUB110: some salient features in relation to replication and its regulation. *Plasmid* 15, 93–103.
- McNeil, M., Darvill, A.G., Fry, S.C., and Albersheim, P.** (1984). Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annu. Rev. Biochem.* 53, 625–663.
- Micard, V., Renard, C.M.G.C., and Thibault, J.-F.** (1996). Enzymatic saccharification of sugar-beet pulp. *Enzyme Microb. Technol.* 19, 162–170.
- Miles, E.A., and Trinci, A.P.J.** (1983). Effect of pH and temperature on morphology of batch and chemostat cultures of *Penicillium chrysogenum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 81, 193–200.
- Miller, L.** (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor; New York. ISBN 10: 0879691069.
- Mitchell, D.J., Grohmann, K., Himmel, M.E., Dale, B.E., and Schroeder, H.A.** (1990). Effect of the Degree of Acetylation on the Enzymatic Digestion of Acetylated Xylans. *J. Wood Chem. Technol.* 10, 111–121.
- Mueller-Harvey, R.D.H.** (1986). Linkage of p-coumaroyl and feruloyl groups to cell-wall polysaccharides of barley straw. *Carbohydr. Res.* 71–85.
- Mullis, K.B., and Faloona, F.A.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335–350.
- Murakami, A., Nakamura, Y., Koshimizu, K., Takahashi, D., Matsumoto, K., Hagihara, K., Taniguchi, H., Nomura, E., Hosoda, A., Tsuno, T., et al.** (2002). FA15, a hydrophobic derivative of ferulic acid, suppresses inflammatory responses and skin tumor promotion: comparison with ferulic acid. *Cancer Lett.* 180, 121–129.
- Mutenda, K.E., Körner, R., Christensen, T.M.I.E., Mikkelsen, J., and Roepstorff, P.** (2002). Application of mass spectrometry to determine the activity and specificity of pectin lyase A. *Carbohydr. Res.* 337, 1217–1227.
- Mutter, M., Colquhoun, I.J., Schols, H.A., Beldman, G., and Voragen, A.G.** (1996). Rhamnogalacturonase B from *Aspergillus aculeatus* is a rhamnogalacturonan alpha-L-rhamnopyranosyl-(1->4)-alpha-D-galactopyranosyluronide lyase. *Plant Physiol.* 110, 73–77.
-
- ## N
-
- Nabavi, S.F., Devi, K.P., Malar, D.S., Sureda, A., Daglia, M., and Nabavi, S.M.** (2015). Ferulic acid and Alzheimer's disease: promises and pitfalls. *Mini Rev. Med. Chem.* 15, 776–788.
- Nethaji, M., Patabhi, V., and Desiraju, G.R.** (1988). Structure of 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoic acid (ferulic acid). *Acta Crystallogr. C* 44, 275–277.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., and Ehrhardt, W.** (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9, 255–262.
- Nierman, W.C., Pain, A., Anderson, M.J., Wortman, J.R., Kim, H.S., Arroyo, J., Berriman, M., Abe, K., Archer, D.B., Bermejo, C., et al.** (2005). Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 438, 1151–1156.
- Nordkvist, E., Salomonsson, A.-C., and Åman, P.** (1984). Distribution of insoluble bound phenolic acids in barley grain. *J. Sci. Food Agric.* 35, 657–661.
- Normansell, P.J., Normansell, I.D., and Holt, G.** (1979). Genetic and biochemical studies of mutants of *Penicillium chrysogenum* impaired in penicillin production. *J. Gen. Microbiol.* 112, 113–126.
-
- ## O
-
- O'Farrell, P.H.** (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007–4021.
- Omar, M.** (1992). In Phenolic compounds in food and their effect on health I. *ACS Symp. Ser.* 154–168.
- Oosterveld, A., Beldman, G., and Voragen, A.G.J.** (2000). Oxidative cross-linking of pectic

polysaccharides from sugar beet pulp. Carbohydr. Res. 328, 199–207.

Ou, S., and Kwok, K. (2004). *Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods*. J. Sci. Food Agric. 84, 1261–1269.

Ozcengiz, G., and Demain, A.L. (2013). *Recent advances in the biosynthesis of penicillins, cephalosporins and clavams and its regulation*. Biotechnol. Adv. 31, 287–311.

P

Pan, G.X., Bolton, J.L., and Leary, G.J. (1998). *Determination of Ferulic and p-Coumaric Acids in Wheat Straw and the Amounts Released by Mild Acid and Alkaline Peroxide Treatment*. J. Agric. Food Chem. 46, 5283–5288.

Panagiotou, G., Olavarria, R., and 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, 219–228.

Peberdy, J.F. (1987). *Penicillium and Acremonium*. New York, Plenum Press. ISBN: 978-0-306-42345-1.

Pérez Morales, G.G. *Producción de enzimas tipo feruloil esterasa por fermentación en medio sólido en pulpa de café*. Tesis Doctoral. Universidad autónoma metropolitana. Mexico, 2008.

Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M., and Cottrell, J.S. (1999). *Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data*. Electrophoresis 20, 3551–3567.

Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. (2011). *SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions*. Nat. Methods 8, 785–786.

Pfaffl, M.W. (2001). *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res. 29, e45.

Podda, M., Traber, M.G., Weber, C., Yan, L.J., and Packer, L. (1998). *UV-irradiation depletes antioxidants and causes oxidative damage in a model of human skin*. Free Radic. Biol. Med. 24, 55–65.

Poidevin, L., Levasseur, A., Paës, G., Navarro, D., Heiss-Blanquet, S., Asther, M., and Record, E. (2009). *Heterologous production of the *Piromyces equi* cinnamoyl esterase in *Trichoderma reesei* for*

biotechnological applications. Lett. Appl. Microbiol. 49, 673–678.

Polaina, J., and MacCabe, A. (2007). *Industrial Enzymes Structure, Function and Applications*. Springer; The Netherlands. ISBN: 978 1 4020 5376 4.

Pontón J., Quindós G., Moragues MD., Gené J., and Guarro J. (2002). *Hongos y Actinomicetos Alergénicos*. Rev. Iberoam. Micol. Bilbao.

Priefert, H., Rabenhorst, J., and Steinbüchel, A. (2001). *Biotechnological production of vanillin*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56, 296–314.

Q

Quiroz-Castañeda, R.E., and Folch-Mallol, J.L. (2011). *Plant cell wall degrading and remodeling proteins: current perspectives*. Biotechnol. Apl. 28, 205–215.

R

Ralet, M.C., Thibault, J.F., Faulds, C.B., and Williamson, G. (1994a). *Isolation and purification of feruloylated oligosaccharides from cell walls of sugar-beet pulp*. Carbohydr. Res. 263, 227–241.

Ralet, M.C., Faulds, C.B., Williamson, G., and Thibault, J.F. (1994b). *Degradation of feruloylated oligosaccharides from sugar-beet pulp and wheat bran by ferulic acid esterases from *Aspergillus niger**. Carbohydr. Res. 263, 257–269.

Raper, K.B., Alexander, D.F., and Coghill, R.D. (1944). *Penicillin: II. Natural Variation and Penicillin Production in *Penicillium notatum* and Allied Species*. J. Bacteriol. 48, 639–659.

Rasmussen, R. (2000). *Quantification on the LightCycler*. In Rapid Cycle Real-Time PCR, Methods y Applications. Heidelberg: Springer Press., pp 21-34. ISBN 978-3-642-18840-4

Record, E., Asther, M., Sigoillot, C., Pagès, S., Punt, P.J., Delattre, M., Haon, M., van den Hondel, C.A.M.J.J., Sigoillot, J.-C., Lesage-Meessen, L., et al. (2003). *Overproduction of the *Aspergillus niger* feruloyl esterase for pulp bleaching application*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 62, 349–355.

Rodríguez-Sáiz, M., Barredo, J.L., Moreno, M.A., Fernández-Cañón, J.M., Peñalva, M.A., and Díez, B. (2001). *Reduced function of a phenylacetate-oxidizing cytochrome p450 caused strong genetic improvement*

in early phylogeny of penicillin-producing strains. *J. Bacteriol.* 183, 5465–5471.

Rombouts, F.M., and Thibault, J.-F. (1986). *Feruloylated pectic substances from sugar-beet pulp.* *Carbohydr. Res.* 154, 177–187.

Rozen, S., and Skaletsky, H. (2000). *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers.* *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 132, 365–386.

Rumbold, K., Biely, P., Mastihubová, M., Gudelj, M., Gübitz, G., Robra, K.-H., and Prior, B.A. (2003). *Purification and properties of a feruloyl esterase involved in lignocellulose degradation by Aureobasidium pullulans.* *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5622–5626.

S

Saha, B.C. (2003). *Hemicellulose bioconversion.* *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30, 279–291.

Saharay, M., Guo, H., and Smith, J.C. (2010). *Catalytic mechanism of cellulose degradation by a cellobiohydrolase, CelS.* *PLoS One* 5, e12947.

Saija, A., Tomaino, A., Trombetta, D., De Pasquale, A., Uccella, N., Barbuzzi, T., Paolino, D., and Bonina, F. (2000). *In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents.* *Int. J. Pharm.* 199, 39–47.

Sakai, S., Kawamata, H., Kogure, T., Mantani, N., Terasawa, K., Umatake, M., and Ochiai, H. (1999a). *Inhibitory Effect of Ferulic Acid and Isoferulic Acid on the Production of Macrophage Inflammatory Protein-2 in Response to Respiratory Syncytial Virus Infection in RAW264.7 Cells.* *Mediators Inflamm.* 8, 173–175.

Sakamoto, T., and Kawasaki, H. (2003). *Purification and properties of two type-B α -L-arabinofuranosidases produced by Penicillium chrysogenum.* *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1621, 204–210.

Sakamoto, T., and Thibault, J.-F. (2001). *Exo-Arabinanase of Penicillium chrysogenum Able To Release Arabinobiose from α -1,5-L-Arabinan.* *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3319–3321.

Sakamoto, K., Tabata, T., Shirasaki, K., Inagaki, T., and Nakayama, S. (1987). *Effects of gamma-oryzanol and cycloartenol ferulic acid ester on cholesterol diet induced hyperlipidemia in rats.* *Jpn. J. Pharmacol.* 45, 559–565.

Sakamoto, T., Ihara, H., Kozaki, S., and Kawasaki, H. (2003). *A cold-adapted endo-arabinanase from Penicillium chrysogenum.* *Biochim. Biophys. Acta* 1624, 70–75.

Sakamoto, T., Nishimura, S., Kato, T., Sunagawa, Y., Tsuchiyama, M., and Kawasaki, H. (2005). *Efficient Extraction of Ferulic Acid from Sugar Beet Pulp Using the Culture Supernatant of Penicillium chrysogenum.* *J Appl Glycosci* 2, 115–120.

Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York. ISBN 978-1-936113-41-5.

Samson, R.A., Hadlok, R., and Stolk, A.C. (1977). *A taxonomic study of the Penicillium chrysogenum series.* *Antonie Van Leeuwenhoek* 43, 169–175.

Saulnier, L., and Thibault, J. (1999). *Ferulic acid and diferulic acids as components of sugar-beet pectins and maize bran heteroxylans.* *J. Sci. Food Agric.* 79, 396–402.

Saulnier, L., Vigouroux, J., and Thibault, J.F. (1995). *Isolation and partial characterization of feruloylated oligosaccharides from maize bran.* *Carbohydr. Res.* 272, 241–253.

Sgarbossa, A., Giacomazza, D., and di Carlo, M. (2015). *Ferulic Acid: A Hope for Alzheimer's Disease Therapy from Plants.* *Nutrients* 7, 5764–5782.

Shahidi, F., Arachchi, J.K.V., and Jeon, Y.-J. (1999). *Food applications of chitin and chitosans.* *Trends Food Sci. Technol.* 10, 37–51.

Sigoillot, C., Camarero, S., Vidal, T., Record, E., Asther, M., Pérez-Boada, M., Martínez, M.J., Sigoillot, J.-C., Asther, M., Colom, J.F., et al. (2005). *Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps.* *J. Biotechnol.* 115, 333–343.

Smith, G. (1960). *An introduction to industrial mycology.* Edward Arnold Ltd; London. B001SJLPK6.

Sogabe, Y., Kitatani, T., Yamaguchi, A., Kinoshita, T., Adachi, H., Takano, K., Inoue, T., Mori, Y., Matsumura, H., Sakamoto, T., et al. (2011). *High-resolution structure of exo-arabinanase from Penicillium chrysogenum.* *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 67, 415–422.

Song, W., Han, X., Qian, Y., Liu, G., Yao, G., Zhong, Y., and Qu, Y. (2016). *Proteomic analysis of the biomass hydrolytic potentials of Penicillium oxalicum*

lignocellulolytic enzyme system. Biotechnol. Biofuels 9, 68.

Southern, E.M. (1975). *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis*. J. Mol. Biol. 98, 503–517.

Spagnuolo, M., Crecchio, C., Pizzigallo, M.D.R., and Ruggiero, P. (1997). *Synergistic effects of cellulolytic and pectinolytic enzymes in degrading sugar beet pulp*. Bioresour. Technol. 60, 215–222.

T

Taiz, L., and Zeiger, E. (2006). *Fisiología Vegetal*. Barcelona. Ed. Universitat Jaume I. ISBN: 978-84-8021-601-2.

Thom (1910). *Cultural studies of species of Penicillium*. USDA Bur. Anim. Ind. 118, 1–109.

Thon, M.R., Pan, H., Diener, S., Papalas, J., Taro, A., Mitchell, T.K., and Dean, R.A. (2006). *The role of transposable element clusters in genome evolution and loss of synteny in the rice blast fungus Magnaporthe oryzae*. Genome Biol. 7, R16.

Tilay, A., Bule, M., Kishenkumar, J., and Annapure, U. (2008). *Preparation of Ferulic Acid from Agricultural Wastes: Its Improved Extraction and Purification*. J. Agric. Food Chem. 56, 7644–7648.

Timell, T.E. (1967). *Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses*. Wood Sci. Technol. 1, 45–70.

Topakas, E., and Christakopoulos, P. (2004). *Production and partial characterization of alkaline feruloyl esterases by Fusarium oxysporum during submerged batch cultivation*. World J. Microbiol. Biotechnol. 20, 245–250.

Topakas, E., Stamatis, H., Biely, P., and Christakopoulos, P. (2004). *Purification and characterization of a type B feruloyl esterase (StFAE-A) from the thermophilic fungus Sporotrichum thermophile*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 63, 686–690.

Topakas, E., Vafiadi, C., and Christakopoulos, P. (2007). *Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases*. Process Biochem. 42, 497–509.

Topakas, E., Moukouli, M., Dimarogona, M., and Christakopoulos, P. (2012). *Expression, characterization and structural modelling of a feruloyl esterase from the thermophilic fungus Myceliophthora thermophila*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 94, 399–411.

U

Udatha, D.B.R.K.G., Kouskoumvekaki, I., Olsson, L., and 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, 94–110.

V

Vafiadi, C., Topakas, E., and Christakopoulos, P. (2008). *Preparation of multipurpose cross-linked enzyme aggregates and their application to production of alkyl ferulates*. J. Mol. Catal. B Enzym. 54, 35–41.

van den Berg, M.A., Albang, R., Albermann, K., Badger, J.H., Daran, J.-M., Driessen, A.J.M., Garcia-Estrada, C., Fedorova, N.D., Harris, D.M., Heijne, W.H.M., et al. (2008). *Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus Penicillium chrysogenum*. Nat. Biotechnol. 26, 1161–1168.

van den Brink, J., and de Vries, R.P. (2011). *Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 91, 1477–1492.

Villarías, J.L. (2000). *La remolacha azucarera: nuevas técnicas culturales rentables y compatibles con el medio ambiente*. Valladolid. España: Consejería de Agricultura y Ganadería. ISBN: 84-7846-533-2 978-84-7846-533-0

Vincken, J.P., York, W.S., Beldman, G., and Voragen, A.G. (1997). *Two general branching patterns of xyloglucan, XXXG and XXGG*. Plant Physiol. 114, 9–13.

von Hlasiwetz, H., and Barth, L. (1866). *Ueber einige Harze [Zersetzungsproducte derselben durch schmelzendes Kali]*. Liebig's Ann. Chem. 138, 61–76.

Vries, D., P, R., and Visser, J. (2001). *Aspergillus Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65, 497–522.

W

Walton, N.J., Narbad, A., Faulds, C., and Williamson, G. (2000). *Novel approaches to the biosynthesis of vanillin*. Curr. Opin. Biotechnol. 11, 490–496.

Wang, B.-H., and Ou-Yang, J.-P. (2005). *Pharmacological actions of sodium ferulate in cardiovascular system*. Cardiovasc. Drug Rev. 23, 161–172.

Wang, L., Li, Z., Zhu, M., Meng, L., Wang, H., and Ng, T.B. (2016). *An acidic feruloyl esterase from the mushroom Lactarius hatsudake: A potential animal feed supplement*. *Int. J. Biol. Macromol.* 93, Part A, 290–295.

Wang, X., Geng, X., Egashira, Y., and Sanada, H. (2004). *Purification and characterization of a feruloyl esterase from the intestinal bacterium Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2367–2372.

Weber, S.S., Bovenberg, R.A.L., and Driessen, A.J.M. (2012). *Biosynthetic concepts for the production of β -lactam antibiotics in Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. J.* 7, 225–236.

Wiley, W.C., and McLaren, I.H. (1955). *Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution*. *Rev. Sci. Instrum.* 26, 1150–1157.

Williamson, G., and Vallejo, J. (1997). *Chemical and thermal stability of ferulic acid esterase-III from Aspergillus niger*. *Int. J. Biol. Macromol.* 21, 163–167.

Williamson, G., Faulds, C.B., and Kroon, P.A. (1998a). *Specificity of ferulic acid (feruloyl) esterases*. *Biochem. Soc. Trans.* 26, 205–210.

Williamson, G., Kroon, P.A., and Faulds, C.B. (1998b). *Hairy plant polysaccharides: a close shave with microbial esterases*. *Microbiol. Read. Engl.* 144 (Pt 8), 2011–2023.

X

Xu, Z., and Godber, J.S. (1999). *Purification and Identification of Components of γ -Oryzanol in Rice Bran Oil*. *J. Agric. Food Chem.* 47, 2724–2728.

Y

Young, I.S., and Woodside, J.V. (2001). *Antioxidants in health and disease*. *J. Clin. Pathol.* 54, 176–186.

Yu, P., McKinnon, J.J., Maenz, D.D., Olkowski, A.A., Racz, V.J., and Christensen, D.A. (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, P., McKinnon, J.J., and Christensen, D.A. (2005a). *Hydroxycinnamic acids and ferulic acid esterase in relation to biodegradation of complex plant cell walls*. *Can. J. Anim. Sci.* 85, 255–267.

Yu, P., McKinnon, J.J., and Christensen, D.A. (2005b). *Improving the nutritional value of oat hulls for ruminant animals with pretreatment of a multienzyme cocktail: in vitro studies*. *J. Anim. Sci.* 83, 1133–1141.

Z

Zhao, W., Lü, Y., Ouyang, H., Zhou, H., Yan, J., Du, T., and Jin, C. (2013). *N-Glycosylation of Gel1 or Gel2 is vital for cell wall β -glucan synthesis in Aspergillus fumigatus*. *Glycobiology* 23, 955–968.

Zhao, W., Li, C., Liang, J., and Sun, S. (2014). *The Aspergillus fumigatus β -1,3-glucanosyltransferase Gel7 plays a compensatory role in maintaining cell wall integrity under stress conditions*. *Glycobiology*.

Zhou, C., Yang, Y., and Jong, A.Y. (1990). *Mini-prep in ten minutes*. *BioTechniques* 8, 172–173.

Zwane, E.N., Rose, S.H., van Zyl, W.H., Rumbold, K., and Viljoen-Bloom, M. (2014). *Overexpression of Aspergillus tubingensis faeA in protease-deficient Aspergillus niger enables ferulic acid production from plant material*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41, 1027–1034.