

UNIVERSIDAD DE SEVILLA



TESIS DOCTORAL

Mejora del cóctel enzimático de hidrólisis de
biomasa vegetal mediante modificación genética de
Myceliophthora thermophila

Macarena López Morales

Sevilla, 2018

Memoria presentada por la licenciada Macarena López Morales para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla bajo la dirección de los doctores Bruno Díez García y Noelia Valbuena Crespo.

Fdo.: Macarena López Morales

El tutor

Fdo.: Dr. Fernando Publio Molina Heredia

Los directores

Fdo.: Dr. Bruno Díez García

Fdo.: Dra. Noelia Valbuena Crespo

Sevilla, 2017

ÍNDICE DE CONTENIDO

LISTADO DE ABREVIATURAS	9
1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1. Bioetanol como biocombustible.....	13
1.2. Bioetanol de segunda generación.....	15
1.2.1. Proceso de bioconversión del material lignocelulósico a bioetanol	16
1.2.2. Tipos de procesos	19
1.2.3. Limitaciones del proceso de bioconversión.....	20
1.3. Composición y estructura de la biomasa vegetal	21
1.3.1. Celulosa	23
1.3.2. Hemicelulosa	24
1.3.3. Lignina.....	24
1.4. Celulasas.....	25
1.4.1. Endoglucanasas	26
1.4.2. Celobiohidrolasas	26
1.4.3. β -glucosidasas.....	28
1.5. Hemicelulasas.....	30
1.6. Polisacárido monooxigenasas (PMO).....	32
1.7. Organismos degradadores de celulosa.....	33
1.7.1. <i>Myceliophthora thermophila</i>	35
1.8. Mejora del cóctel enzimático para la hidrólisis de biomasa lignocelulósica.	37
1.8.1. Eliminación de proteínas o enzimas no contributivas	39
1.8.2. Evolución molecular dirigida de enzimas	43
2. OBJETIVOS	47
3. MATERIALES Y MÉTODOS	51

3.1. Organismos.....	51
3.1.1. Cepas del hongo <i>Myceliophthora thermophila</i>	51
3.1.2. Cepas de la bacteria <i>Escherichia coli</i>	52
3.2. Medios de cultivo y disoluciones	53
3.2.1. Medios y condiciones de cultivo para <i>M. thermophila</i>	53
3.2.1. Medio y condiciones de cultivo para <i>E. coli</i>	53
3.3. Obtención, manipulación y análisis de ADN	54
3.3.1. Aislamiento de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	54
3.3.2. Aislamiento de ADN genómico de <i>M. thermophila</i>	54
3.3.3. Análisis y cuantificación de ADN.....	54
3.3.4. Purificación de fragmentos de ADN	55
3.4. Transformación de microorganismos.....	55
3.4.1. Transformación de <i>E. coli</i>	55
3.4.2. Transformación de <i>M. thermophila</i>	56
3.5. Construcción de plásmidos.....	56
3.5.1. Digestión con enzimas de restricción.....	56
3.5.2. Oligonucleótidos	56
3.5.3. Desfosforilación	57
3.5.4. Ligación	58
3.5.5. Plásmidos para la delección de genes en <i>M. thermophila</i>	58
3.5.6. Plásmido para la generación de librerías de mutantes del gen β - <i>glucosidasa 1 (bgl1)</i>	63
3.6. Escrutinio y selección de las cepas delecionadas.....	65
3.6.1. Escrutinio por PCR de transformantes delecionados <i>chi2</i>	65
3.6.2. Escrutinio por PCR de transformantes delecionados <i>eg6</i>	67
3.7. Eliminación del marcador	69
3.8. Construcción de librerías de mutantes de <i>bgl1</i>.....	71
3.9. Purificación y conservación de esporas de <i>M. thermophila</i>.....	74

3.9.1. Purificación de esporas	74
3.9.2. Obtención y conservación de esporas	74
3.10. Producción del cóctel enzimático	75
3.10.1. Fermentación en microplaca.....	75
3.10.2. Fermentación en matraz.....	76
3.11. Cuantificación de proteína y análisis del cóctel enzimático.....	76
3.11.1. Cuantificación de la concentración de proteínas.....	77
3.11.2. Análisis de proteínas mediante SDS-PAGE.....	77
3.11.3. Electroforesis bidimensional de proteínas.....	77
3.12. Hidrólisis enzimática	79
3.12.1. Hidrólisis enzimática de producciones a escala microplaca	79
3.12.2. Hidrólisis enzimática de producciones a escala matraz	80
3.13. Ensayos enzimáticos	81
3.13.1. Determinación de actividad β -glucosidasa (BGL)	81
3.13.2. Ensayo de actividad con cóctel mínimo de <i>M. thermophila</i> C1	82
3.13.3. Determinación de actividad de transglucosilación.....	83
4. RESULTADOS.....	87
4.1. Eliminación de enzimas no contributivas en la cepa AB2	87
4.1.1. Eliminación de la enzima no celulolítica quitinasa 2.....	87
4.1.2. Eliminación de la enzima celulolítica endoglucanasa Eg6.....	95
4.2. Mejora genética de <i>bgl1</i>	104
4.2.1. Generación de librerías de mutantes de <i>bgl1</i>	105
4.2.2. Transformación de las librerías de mutantes de <i>bgl1</i> en AB1	105
4.2.3. Escrutinio y selección de versiones mejoradas de <i>bgl1</i>	106
4.2.4. Determinación de la secuencia del mutante 31L2D	107
4.2.5. Análisis comparativo de Bgl1 nativa y Bgl1Q211H mutante.....	109
5. DISCUSIÓN.....	117

5.1. Optimización de la composición enzimática de <i>M. thermophila</i> C1 para la hidrólisis de biomasa lignocelulósica	117
5.1.1. La enzima Chi2 en el cóctel enzimático de <i>M. thermophila</i> C1.....	119
5.1.2. La enzima Eg6 en el cóctel enzimático de <i>M. thermophila</i> C1.....	119
5.2. Eliminación de los genes <i>chi2</i> y <i>eg6</i> que codifican enzimas no contributivas en el cóctel enzimático producido por <i>M. thermophila</i> C1	121
5.3. Rendimiento de los cócteles enzimáticos sin las enzimas Chi2 y Eg6	122
5.3.1. Efecto de la delección del gen <i>chi2</i>	122
5.3.2. Efecto de la delección del gen <i>eg6</i>	123
5.3.3. Delección frente a sobreexpresión de genes para la optimización del cóctel enzimático	124
5.4. Mejora de la actividad de la enzima Bgl1 producida por <i>M. thermophila</i> C1.....	125
5.4.1. Búsqueda de una enzima Bgl1 mutante con baja capacidad de transglicosilación	126
5.4.2. La variante con baja actividad de transglicosilación Bgl1 Q211H.....	131
5.4.3. Análisis comparativo de Bgl1 Q211H mutante y Bgl1 nativa	134
6. CONCLUSIONES.....	139
7. BIBLIOGRAFÍA.....	143

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
Amp	ampicilina
BGL	β -glucosidasa
CAZy	base de datos de enzimas (<i>Carbohydrate-Active enzymes</i>)
CBD	dominio de unión a carbohidratos
CBH	celobiohidrolasa
CBP	bioproceso consolidado
EG	endoglucanasa
GH	familia glicosil hidrolasa
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución (<i>High performance liquid chromatography</i>)
IEF	isoelectroenfoque
K_m	constante de Michaelis-Menten
NHEJ	recombinación no homóloga o unión de extremos no homólogos (<i>nonhomologous end-joining</i>)
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PCS	rastrojo de maíz pretratado (<i>pretreated corn stover</i>)
PMO	polisacárido monooxigenasa
pNGP	p-nitrofenil- β -Dglucopiranosido
<i>pyr4</i>	gen para orotidina-5'-fosfato descarboxilasa
<i>pyr5</i>	gen para orotato-fosforribosil transferasa
rpm	revoluciones por minuto
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
TAE	disolución tampón formada por Tris, acetato y EDTA
U	Unidad de actividad enzimática

1 INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la sociedad está estrechamente asociado a la demanda de energía. Durante el siglo XX e inicios del XXI, las fuentes fundamentales de energía fueron los combustibles fósiles, básicamente petróleo, gas natural y carbón. Actualmente, en torno al 80% del suministro mundial de energía depende de los combustibles fósiles (IEA, 2017).

En las últimas décadas se ha visto incrementado el interés mundial por las fuentes de energía alternativas, especialmente las renovables (Vohra y col., 2014). Esto es debido principalmente al inevitable agotamiento de los suministros de energía y al aumento de su demanda todo ello motivado por el incremento de la población e industrialización. A estos dos factores se une el aumento de los precios de los combustibles fósiles, así como el daño que causan las emisiones de efecto invernadero derivadas de su uso (Spyridon y col, 2014).

Por tanto, es cada vez más importante y necesaria la búsqueda de fuentes de energía alternativas que sean económicamente competitivas, que contribuyan a la sostenibilidad del medio ambiente y que estén disponibles de forma permanente.

1.1. Bioetanol como biocombustible

Los biocombustibles se han posicionado como una alternativa potencial a los combustibles de transporte derivados del petróleo. Se trata de combustibles producidos a partir de biomasa y por tanto son combustibles ecológicos y sostenibles cuyo uso contribuye a la reducción de la emisión de gases perjudiciales a la atmósfera (Aditiya y col., 2016).

La biomasa, fundamentalmente la de origen vegetal, es una fuente de materia prima orgánica renovable, por tanto, su utilización para producción de energía contribuye a la disminución de la dependencia de los combustibles fósiles y la incertidumbre causada por las fluctuaciones en el precio de estos, aportando seguridad en cuanto al abastecimiento energético (Balat, M. 2007).

De todas las energías alternativas para la producción de biocombustible en las que se trabaja en la actualidad, el que más atención ha recibido y el que más se ha desarrollado es el bioetanol, alcohol obtenido a partir de azúcares obtenidos de materia orgánica vegetal que se mezcla con gasolina. En la actualidad existen varios tipos en

función del porcentaje de etanol que lleva la mezcla. Las dos mezclas más comunes son las denominadas E10 y E85, que contienen un 10% y 85% de etanol, respectivamente.

Varios países, como Estados Unidos, Brasil, China, Canadá y varios estados miembros de la Unión Europea ya han proclamado compromisos con los programas de desarrollo de bioteanol como alternativa para reducir la dependencia de los combustibles fósiles (Zabed y col., 2017). Brasil y Estados Unidos son los dos principales países productores de etanol en el mundo. En 2016, Estados Unidos mantuvo su posición como el principal productor de etanol en el mundo, representando casi el 60% de la producción mundial (Renewable Fuels Association, 2017) (Figura 1).

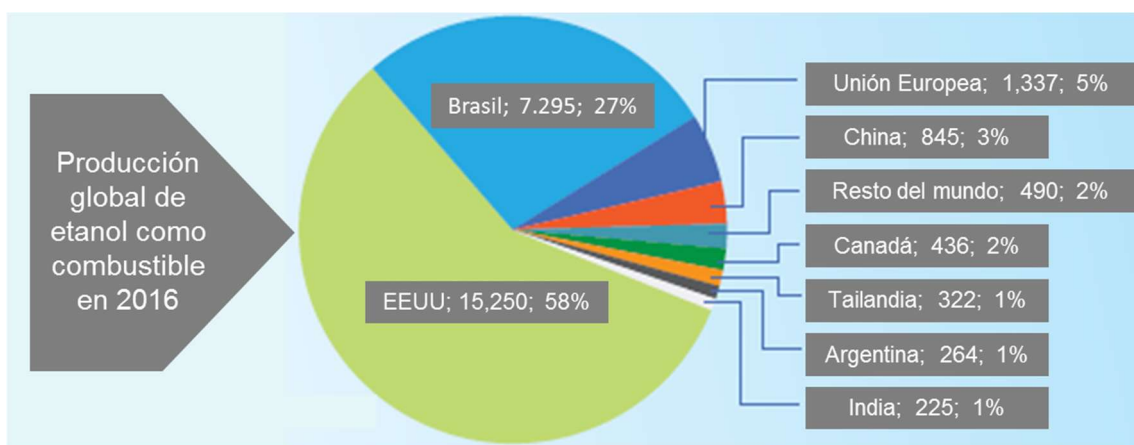


Figura 1. Gráfico representativo de la producción global de etanol en 2016 para su uso como biocombustible. Se detalla el país, la producción en millones de galones y el porcentaje de la producción mundial (Renewable Fuel Association, 2017).

La producción a gran escala de etanol como biocombustible depende principalmente de la sacarosa y el almidón. En Brasil se utiliza principalmente la sacarosa procedente de la caña de azúcar y en Estados Unidos el almidón, obtenido del maíz. La procedencia de los azúcares para la obtención de bioetanol permite diferenciar entre bioetanol de primera generación y bioetanol de segunda generación:

- a) La producción de etanol que depende de productos agrícolas que tienen valor alimenticio, como cereales (trigo, cebada y maíz) y la caña de azúcar, se conoce como bioetanol de primera generación (Naik y col., 2010). Aunque su coste de producción es bajo, no satisface la demanda mundial de bioetanol debido a su valor primario como alimento.
- b) Por su parte, el bioetanol de segunda generación se obtiene a partir de biomasa rica en celulosa y hemicelulosa sin valor alimenticio, como residuos

agrícolas y forestales. El reemplazo de los cultivos alimentarios por material lignocelulósico de mucho menor coste es una alternativa que podría hacer más competitivo el precio del bioetanol. Estos polímeros naturales de celulosa y hemicelulosa se pueden encontrar de forma abundante como residuos agrícolas (paja de trigo y arroz, tallos de maíz, residuos de soja, bagazo de caña de azúcar), residuos industriales (industria de pulpa y papel) e incluso de residuos sólidos urbanos (Faraco, 2013). Sin embargo, aunque el bioetanol de segunda generación es una alternativa potencial al de primera generación, su coste de producción todavía no llega a ser competitivo (Gupta y col., 2015).

1.2. Bioetanol de segunda generación

El trabajo descrito en esta tesis se centra en la optimización del proceso de producción de bioetanol de segunda generación a partir de biomasa lignocelulósica presente en residuos agrícolas.

Los biocombustibles de segunda generación, también llamados biocombustibles celulósicos, se pueden producir a partir de una amplia gama de materias primas celulósicas. El material lignocelulósico es la biomasa más abundante en la tierra y debido a la crisis energética y a la contaminación ambiental, la comunidad científica y las industrias han centrado sus esfuerzos en optimizar la explotación de esta biomasa en el campo de las energías renovables (Harris y col., 2014). La variedad y la frecuencia de nuevas publicaciones sobre este tema ha favorecido el mejor conocimiento de la bioquímica del material lignocelulósico, las enzimas que lo despolimerizan y las técnicas de pretratamiento para diferentes tipos de biomasa.

Debido a este paisaje sociopolítico y económico, el bioetanol de segunda generación se ha situado como sustituto potencial de los productos derivados del petróleo, aunque hoy en día existe todavía poca producción de este tipo de biocombustible a nivel comercial. El desarrollo y la expansión de los biocombustibles de segunda generación depende principalmente de cinco áreas de incertidumbre (McCann y col., 2014): (1) los precios futuros del petróleo, (2) la disponibilidad y el costo de la materia prima, (3) la eficiencia y el costo de la tecnología de conversión, (4) los impactos ambientales y los gases de efecto invernadero y (5) la política gubernamental.

La biomasa lignocelulósica destinada a la producción de bioetanol puede dividirse en seis grupos: i) residuos agrícolas (bagazo de caña de azúcar, de maíz y de sorgo azucarado, paja de trigo, de arroz y de cebada, hueso de aceituna y pulpa); ii) maderas duras (álamo, chopo); iii) maderas blandas (pino, abeto); iv) residuos celulósicos (papel de periódico, residuos de papel de oficina, lodos de papel reciclado); v) biomasa herbácea (alfalfa, pasto varilla, alpiste, limoncillo); y vi) residuos sólidos urbanos (Sánchez y Cardona, 2008).

En concreto, el material utilizado en este trabajo es biomasa procedente de rastrojos de maíz pretratado (*pretreated corn stover*, PCS). Es un residuo agrícola de bajo coste que se encuentra disponible en grandes cantidades.

1.2.1. Proceso de bioconversión del material lignocelulósico a bioetanol

Debido a la compleja estructura de la biomasa lignocelulósica y a su naturaleza recalcitrante, la hidrólisis enzimática para producir azúcares fermentables supone un desafío tecnológico. La bioconversión de residuos lignocelulósicos a bioetanol es un proceso más complejo que la bioconversión de almidón. Los procesos industriales más desarrollados comprenden cuatro etapas (Figura 2): pretratamiento, hidrólisis enzimática, fermentación, y, finalmente, separación y purificación del etanol. A continuación, se describen estas etapas en detalle.

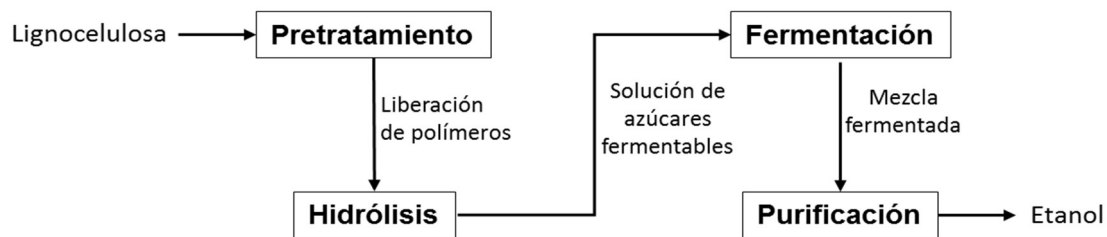


Figura 2. Diferentes unidades del proceso de producción de etanol a partir de materiales lignocelulósicos

(i) *Pretratamiento.* El pretratamiento tiene como objetivo reducir la cristalinidad de la celulosa y facilitar así el acceso posterior de las enzimas celulolíticas. Para romper la compleja estructura de la biomasa lignocelulósica se han desarrollado diversas tecnologías de pretratamiento que incluyen métodos físicos, químicos, biológicos y diversos métodos combinados (Rabemanolontsoa y Saka, 2016; Kumar y col., 2009):

- Los métodos físicos de pretratamiento incluyen molienda (Silveira, 2015), irradiación y explosión de vapor (McMillan, 1994). Los métodos químicos de pretratamiento incluyen la explosión amoniacal de la fibra (AFEX) y el tratamiento mediante el proceso denominado organosolv que utiliza solventes orgánicos y la adición de ácido o base (Agbor y col., 2011). Aunque el pretratamiento físico y químico puede reducir la presencia de compuestos lignocelulósicos recalcitrantes en un plazo más corto, estas técnicas requieren mucha energía y pueden producir compuestos tóxicos y aguas residuales complicando las etapas posteriores e incrementando el coste medioambiental para las industrias (Millati y col., 2011).

- Los métodos biológicos de pretratamiento incluyen el uso de microorganismos (hongos y bacterias) para deslignificar el material de lignocelulosa, reducir su recalcitrancia y mejorar su digestibilidad mediante enzimas hidrolíticas. Las enzimas producidas por los microorganismos alteran selectivamente las estructuras de microfibrillas y lignina de la pared celular de la planta (Figura 3). Los sistemas enzimáticos ligninolíticos se han estudiado principalmente en hongos de pudrición blanca, un tipo de hongos de la descomposición de la madera que es capaz de degradar la lignina de manera efectiva utilizando un conjunto de oxidoreductasas con alto potencial redox. El pretratamiento biológico se puede realizar cultivando el microorganismo directamente en la materia prima o utilizando los extractos de enzimas. Estos métodos tienen como ventaja demandas energéticas más bajas, producción mínima de residuos y reducción de efectos sobre el medioambiente (Vasco-Correa y col., 2016), aunque no se ha demostrado su viabilidad a escala industrial.

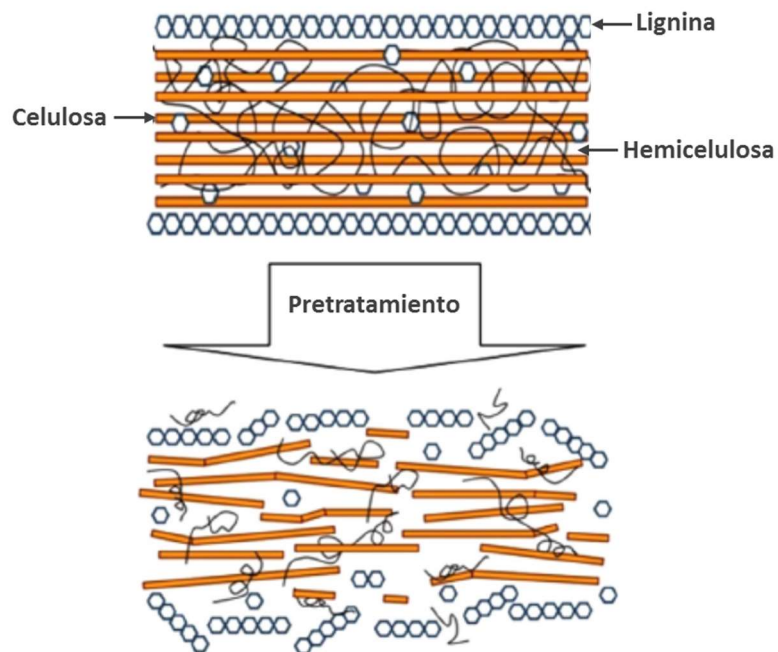


Figura 3. Esquema del pretratamiento de material lignocelulósico (Mood y col., 2013).

- (ii) *Hidrólisis enzimática.* El principal objetivo de la hidrólisis enzimática es despolimerizar las fibras de celulosa y otros oligómeros y polisacáridos como la hemicelulosa para liberar monómeros de glucosa y/o xilosa (Harris y DeBolt, 2010). Este paso también es conocido comúnmente como sacarificación. Existen dos métodos de hidrólisis utilizados en el proceso de biorrefinado: la hidrólisis ácida y la hidrólisis enzimática.

- La hidrólisis ácida es el método más antiguo de los dos y se utiliza ácido diluido o concentrado para hidrolizar la celulosa con las temperaturas de reacción adecuadas (Zhang y col., 2012). La opción de hidrólisis ácida es menos atractiva debido a los bajos rendimientos de recuperación y los factores ambientales involucrados.

 - En la hidrólisis enzimática las enzimas celulasas son las encargadas de ejecutar el proceso de conversión de los carbohidratos complejos a monómeros simples. Esta opción es más compleja, costosa y requiere más tiempo en comparación con la hidrólisis ácida, pero tiene la ventaja de tener poco o ningún subproducto de desecho al final del proceso de biorrefinado (Lambertz y col. 2014). La complejidad de la hidrólisis enzimática recae en la compleja estructura del material lignocelulósico compuesto por celulosa, hemicelulosa y lignina y la gran variedad de enzimas que participan en este proceso, además de otras dificultades como la absorción de algunas enzimas por la lignina condensada que disminuye el rendimiento de hidrólisis mediante enlaces no específicos con estas enzimas (Poovaiah y col., 2014). Para aumentar la eficiencia de la hidrólisis enzimática es necesario mejorar tanto la actividad catalítica de las enzimas individuales como la sinergia entre los componentes enzimáticos (Maitan-Alfenas y col., 2015). Además, generalmente necesita mejorarse otras propiedades como la termoestabilidad de las enzimas lignocelulolíticas para reducir la inactivación térmica en los procesos de sacarificación (Viikari y col., 2007).
- (iii) *Fermentación*. El tercer paso de la bioconversión convierte los hidrolizados, principalmente la glucosa, la xilosa, la arabinosa y la manosa, en bioetanol mediante fermentación microbológica, generalmente llevada a cabo por levaduras. Los hidrolizados en ocasiones se purifican antes de la fermentación debido a la producción de compuestos inhibidores en las etapas de pretratamiento e hidrólisis, tales como derivados fenólicos y de furano (Jönsson y Martín, 2016) aunque se han realizado esfuerzos significativos para estudiar los mecanismos moleculares relacionados con la respuesta de la levadura y su tolerancia a estos compuestos (An y col., 2015).

Saccharomyces cerevisiae es el microorganismo más comúnmente usado debido a su alta tasa de fermentación. Sin embargo, la cepa nativa de *S. cerevisiae* no puede fermentar de forma eficaz la xilosa a etanol. La utilización de xilosa es de gran importancia para una eficiente conversión de azúcares fermentables liberados de la biomasa lignocelulósica. Por este motivo, se han generado cepas optimizadas de *S. cerevisiae* mediante modificación genética capaces de convertir glucosa, xilosa y arabinosa en bioetanol de manera más eficiente (Kim y col., 2013).

- (iv) *Purificación/destilación de productos.* La mezcla fermentada con levaduras se filtra para separar los sólidos y se destila para obtener etanol. La eliminación del agua y las impurezas del alcohol se realiza mediante un proceso de rectificación, donde se obtiene un alcohol concentrado, que finalmente se deshidrata hasta alcanzar valores superiores al 99,75 % de pureza (Bothast y col., 2005).

1.2.2. Tipos de procesos

Las etapas de hidrólisis enzimática y fermentación pueden realizarse en pasos separados o de forma combinada (Figura 4). A continuación, se explican los diferentes grados de integración que existen:

- SHF (*Separate Hydrolysis and Fermentation*): proceso secuencial donde la hidrólisis de celulosa y la fermentación se llevan a cabo en diferentes unidades. Una de las características del proceso SHF es que cada paso puede ser realizado en sus condiciones de funcionamiento óptimas. El inconveniente es que las enzimas celulolíticas son inhibidas por el producto final de forma que, el rendimiento de hidrólisis se ve progresivamente reducido cuando se acumula glucosa y xilosa (Olofsson y col., 2008).
- SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*): este proceso de sacarificación y fermentación simultánea es más atractivo ya que pueden obtenerse mayores rendimientos de bioetanol y requiere menos consumo energético. En este caso, las enzimas y los microorganismos son añadidos a la misma unidad de proceso permitiendo que la glucosa formada durante la hidrólisis enzimática de celulosa sea inmediatamente consumida por el microorganismo convirtiéndolo a bioetanol. Por tanto, no se produce el efecto de inhibición de las enzimas causado por los azúcares que se van generando en la hidrólisis enzimática. La desventaja es que este proceso no se realiza a condiciones óptimas de hidrólisis y requiere altas dosis de enzima, lo que influye negativamente en los costes del proceso (Olofsson y col., 2008; Loannis Dogaris y col., 2012).
- CBP (*Consolidated Bioprocessing*): en este proceso todas las enzimas requeridas son producidas por un solo microorganismo y se realiza en un solo reactor. La ventaja de este proceso es que no requiere la suplementación con enzimas ya que las produce el propio microorganismo y reduce la diversidad de sustratos que se puedan utilizar. Para que este proceso sea eficaz se requiere un microorganismo con un sistema de secreción de proteínas eficiente para favorecer un alto contenido de enzima extracelular a la vez que importante capacidad fermentativa (Lynd y col., 2005).

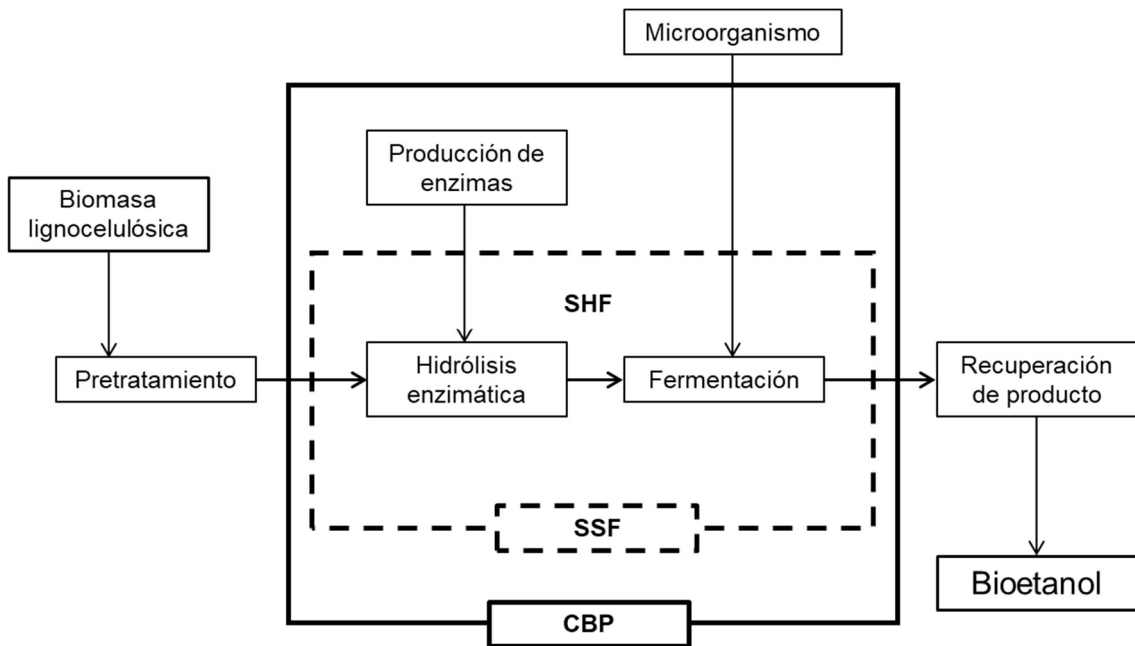


Figura 4. Esquema de los tipos de proceso para la conversión de biomasa lignocelulósica a etanol. La hidrólisis y la fermentación se pueden realizar por separado (SHF) o como sacarificación y fermentación simultáneas (SSF). En el bioprocésamiento consolidado (CBP), todas las etapas de bioconversión se minimizan a un paso en un solo reactor usando uno o más microorganismos (adaptado de Dashtban y col., 2009).

1.2.3. Limitaciones del proceso de bioconversión

Las cuatro etapas que implica la producción de bioetanol a partir de biomasa celulósica son procesos complejos que tienen limitaciones y desafíos por superar para llegar a ser competitivos y hacer que todo el proceso sea rentable. Si bien se han hecho avances hacia procesos de bioconversión económicamente viables, la eficiencia y el coste de las enzimas utilizadas durante la fase de hidrólisis son obstáculos que desafían la viabilidad de la producción de bioetanol de segunda generación a gran escala (Liguori y col., 2015). Estas limitaciones suponen un aumento de los costes de inversión y producción e implica la necesidad de desarrollar y mejorar la tecnología de hidrólisis de este tipo de biomasa.

Para reducir los costes y alcanzar dicho objetivo los aspectos que se han abordado en los últimos tiempos son:

- (i) *Mejora del proceso de pretratamiento.* El objetivo final del pretratamiento en sí debe ser la mejora de la tasa de hidrólisis de la biomasa lignocelulósica. El mejor pretratamiento depende principalmente del tipo de biomasa lignocelulósica y de

los productos deseados. Actualmente, existe un amplio margen para investigar y avanzar en el desarrollo de métodos de pretratamiento efectivos hechos a medida para los diversos tipos de biomasa. Este paso es uno de los pasos más caros en el procesamiento de biomasa, por tanto, es extremadamente importante abaratar los costes (Alvira y col., 2010). Además, la mayoría de los métodos de pretratamiento adoptan condiciones extremas lo que resulta en la generación de diversos inhibidores, como ácidos débiles, furanos y fenoles, durante el pretratamiento de la lignocelulosa (Jönsson y Martín, 2016)

- (ii) *Optimización de mezclas enzimáticas* para incrementar los rendimientos de producción de azúcares y reducir la dosis de enzima ya que el alto costo de las enzimas lignocelulolíticas sigue siendo una barrera importante en la producción de biocombustibles a partir de materiales lignocelulósicos (Klein-Marcuschamer y col., 2011). Para conseguir este objetivo se pueden desarrollar diferentes estrategias que incluyen: mejoras en los procesos de producción de enzimas, mejora de la eficiencia individual de las enzimas implicadas, optimización de los cócteles enzimáticos para condiciones industriales específicas, búsqueda de nuevos microorganismos productores de enzimas, estrategias metagenómicas, uso de ingeniería genética de microorganismos celulolíticos y/o de enzimas específicas, adición de surfactantes y reciclado de enzimas entre otras (Gupta y col., 2013).
- (iii) *Optimización del proceso de fermentación*. Se han descrito cuatro factores fundamentales que afectan a la capacidad de fermentación de las cepas microbinas: la limitación de sustrato, la inhibición por sustrato y por producto y la disminución de la viabilidad celular (Hasunuma y col., 2015). Aunque ya se han conseguido grandes avances en la mejora de los microorganismos que fermentan a etanol para que toleren las condiciones adversas, sigue existiendo margen de mejora de éstos mediante ingeniería genética y metabólica (Pereira y col., 2014). Por otro lado, se siguen haciendo grandes esfuerzos para desarrollar microorganismos eficientes en la fermentación de xilosa para que puedan convertirla de forma más eficiente a etanol (Demeke y col., 2013).

1.3. Composición y estructura de la biomasa vegetal

Los materiales lignocelulósicos son los biopolímeros más abundantes en la tierra y se componen principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina (Mood y col., 2013) (Figura 5). La celulosa y la hemicelulosa son polisacáridos de alto peso molecular que representan, generalmente, entre el 60-80% del total de la composición de los materiales lignocelulósicos. Ambos son una fuente potencial de azúcares fermentables. La lignina es un polímero no polisacárido de estructura tridimensional bastante compleja

que representa entre el 20-30% del total. Este compuesto se puede utilizar para otros fines tales como la producción de productos químicos (Laurichesse y col., 2014). Los componentes menores son proteínas, lípidos, pectinas, azúcares solubles y minerales

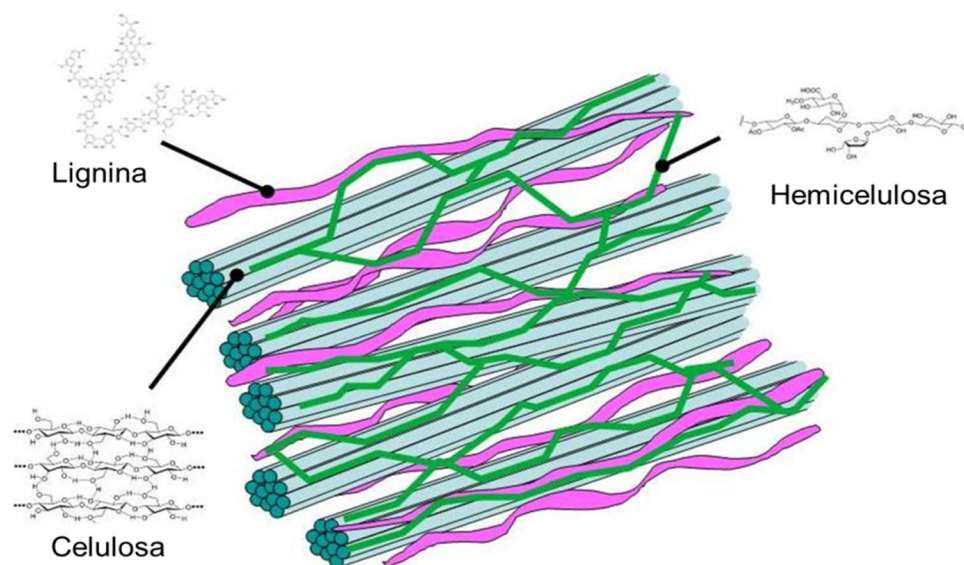


Figura 5. Estructura y composición de la lignocelulosa. Se muestra el esquema de la estructura de las fibras de celulosa con los polímeros de hemicelulosa entrelazados haciendo de nexo con los polímeros de lignina (adaptada de Meine y col., 2012).

No obstante, la composición del material lignocelulósico depende de la fuente de donde proceda y existe una variación significativa entre ellas (Gupta y col., 2013). El componente mayoritario es la celulosa (35-50%) seguido por la hemicelulosa (20-35%) y la lignina (10-25%). Las proteínas, aceites y cenizas constituyen la fracción restante de la biomasa lignocelulósica (Saha, 2003). En la Tabla 1 se indica la composición de algunos de los materiales lignocelulósicos más comunes.

Tabla 1. Proporciones de los principales componentes de los materiales lignocelulósicos más habituales para la producción de etanol (Fuente: Saha, 2003)

Biomasa	Composición (%)		
	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
Rastrojo de maíz	40	25	17
Fibra de maíz	15	35	8
Paja de trigo	30	50	20
Paja de arroz	35	25	12
Bagazo de caña de azúcar	40	24	25

1.3.1. Celulosa

La celulosa es el componente principal de las paredes celulares de los vegetales y está presente en algunos microorganismos. Su función principal es la de proporcionar estabilidad, rigidez y protección. Es un polímero lineal de 500-1500 unidades de D-glucosa unidas mediante enlaces β -1,4-glicosídicos formando largas cadenas no ramificadas. La fusión de varias cadenas de polímeros conduce a la formación de microfibrillas, las cuales se unen mediante puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals para formar las fibras de celulosa. Esta estructura fibrosa presenta zonas con una estructura cristalina que le otorga resistencia y otras regiones amorfas que le confiere elasticidad (Figura 6) (Rubin y col., 2008). Debido a esta naturaleza cristalina, la celulosa es insoluble en la mayoría de los solventes incluyendo el agua. Su fórmula química es $(C_6H_{10}O_5)_n$ y tiene un alto grado de polimerización.

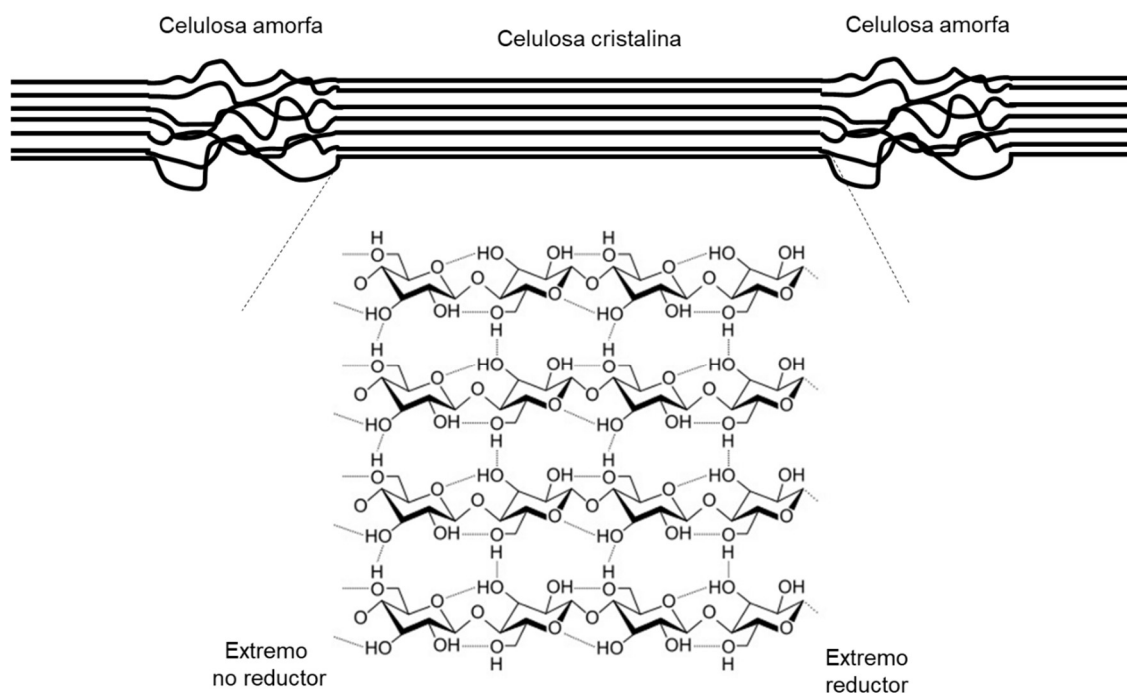


Figura 6. Estructura de la celulosa cristalina y amorfa. La estructura cristalina se conserva por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals; la estructura amorfa corresponde a regiones donde estas uniones se rompen alterando la disposición ordenada. Se muestran los extremos reductor y no reductor de estas cadenas (adaptado de Chandel y col., 2013).

La estructura de estos materiales es muy compleja y la biomasa es generalmente resistente a hidrólisis enzimática por lo que el pretratamiento de estos materiales es crucial.

1.3.2. Hemicelulosa

La hemicelulosa es el segundo polisacárido más común en la naturaleza y representa entre el 20-35% de la biomasa lignocelulósica. Es un heteropolímero formado por más de un tipo de azúcar, principalmente tres hexosas (glucosa, manosa y galactosa) y dos pentosas (xilosa y arabinosa), además de otros compuestos fenólicos (como el ácido ferúlico y p-cumárico) y grupos acetilo. A diferencia de la celulosa, la estructura de la hemicelulosa no es homogénea. Sus cadenas de polímeros individuales son más cortas que las de celulosa y normalmente están formadas por entre 100 y 200 residuos (Collins y col., 2005). Estos polímeros están altamente ramificados con sustituyentes de diferentes tipos y tienen estructura amorfa lo que la hace más difícil de hidrolizar que la celulosa (Figura 7). Las hemicelulosas más relevantes son xilanos y glucomananos, siendo los xilanos los más abundantes. Las hemicelulosas de madera dura contienen principalmente xilanos, mientras que las hemicelulosas de madera blanda contienen principalmente glucomananos (Gírio y col., 2010).

La hemicelulosa se encuentra entrelazada entre las fibras de celulosa unidas por puentes de hidrógeno donde su función principal es proporcionar la unión entre la celulosa y la lignina (Figura 5).

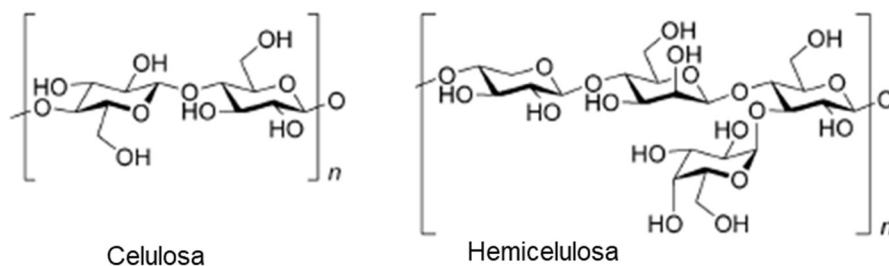


Figura 7. Estructuras de celulosa y hemicelulosa

1.3.3. Lignina

Detrás de la celulosa y hemicelulosa, la lignina es el tercer biopolímero más abundante en la Tierra. Es un polímero polifenólico complejo que forma parte de las paredes celulares secundarias de plantas y de algunas algas, proporcionando soporte estructural mediante el llenado de espacios entre celulosa, hemicelulosa y pectinas. La lignina es muy difícil de degradar y es responsable de la baja accesibilidad de la celulosa y hemicelulosa a las enzimas microbiológicas. Algunos hongos y bacterias son capaces de secretar enzimas que pueden romper los polímeros de lignina para mejorar el acceso a la celulosa, por ejemplo, enzimas del tipo lacasa (Zhang y col., 2012).

1.4. Celulasas

Las celulasas son glicosil hidrolasas o glicohidrolasas producidas por hongos y bacterias y son responsables de la degradación de la celulosa. Estas enzimas hidrolizan los enlaces β -1,4 o uniones glicosídicas entre dos o más carbohidratos o entre un carbohidrato y un resto no carbohidrato. De las actuales 125 familias de glicosil hidrolasas, 15 corresponden a celulasas (GH 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 44, 45, 48, 51, 74, 116 y 124) (<http://www.cazy.org/>). El mecanismo generalmente aceptado para la hidrólisis enzimática de la celulosa implica la acción sinérgica de tres tipos de enzimas principales: endoglucanasas (EG, EC 3.2.1.4), celobiohidrolasas (CBH, EC 3.2.1.74) y β -glucosidasas (BGL, EC 3.2.1.21). En primer lugar, las endoglucanasas hidrolizan las uniones internas en posiciones aleatorias de las regiones menos ordenadas o amorfas de la celulosa generando extremos en las cadenas de los polímeros que permiten la acción procesiva de las celobiohidrolasas. Éstas liberan principalmente dímeros de glucosa (celobiosa) desde ambos extremos de las cadenas de celulosa y, finalmente, las β -glucosidasas se encargan de hidrolizar esta celobiosa hasta monómeros de glucosa (Hasunuma y col., 2013) (Figura 8).

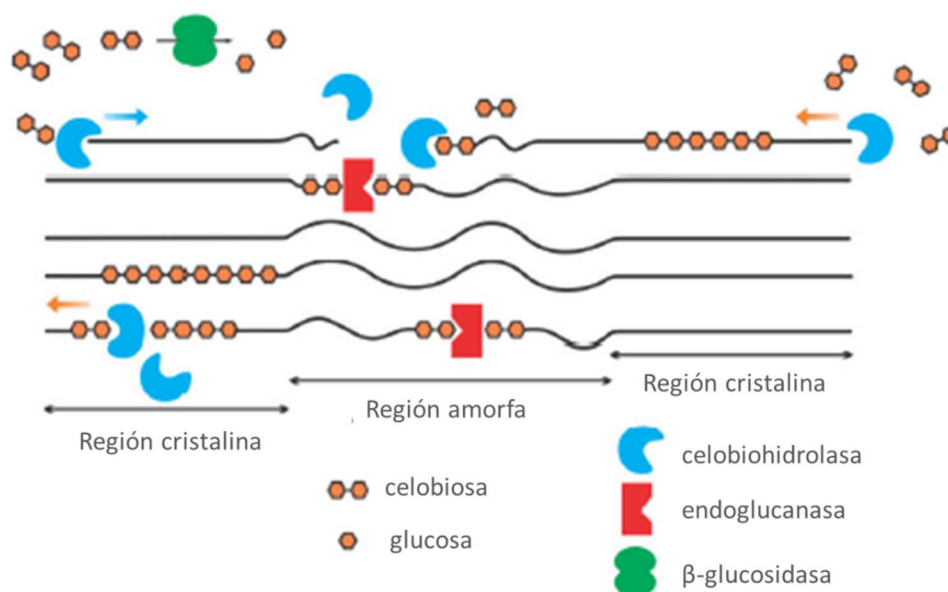


Figura 8. Representación esquemática de la acción enzimática de las celulasas sobre celulosa. Se representan los tres principales grupos de enzimas que participan en este proceso: endoglucanasas, celobiohidrolasas y β -glucosidasas (adaptado de Akhtar y col., 2016).

En cuanto a su estructura, muchas celulasas presentan una estructura modular, es decir, junto al dominio catalítico presentan un dominio no catalítico de unión a carbohidratos (*Cellulose Binding Domain*, CBD). Este CBD facilita la unión específica y adsorción de la enzima a los polímeros de celulosa gracias a su afinidad por la celulosa (Martínez-Anaya y col., 2008).

1.4.1. Endoglucanasas

Las endoglucanasas son las primeras celulasas en actuar en la descomposición de la celulosa. Para ello hidrolizan los enlaces glucosídicos β -1,4 de manera aleatoria en posiciones internas de regiones con baja cristalinidad (regiones amorfas) de las fibras de celulosa (Figura 9). La acción de estas enzimas genera oligosacáridos de diferentes longitudes por inserción de una molécula de agua en las uniones β -1,4, generando extremos reductores y no reductores en las cadenas de polímeros que son susceptibles a la posterior acción de las celobiohidrolasas (Gupta y col., 2015). Pueden pertenecer a diversas familias de glicosil hidrolasas, como GH 5-9, 12, 44, 45, 48, 51 y 74, descritas en la base de datos de enzimas activas para carbohidratos CAZy (Lombard y col., 2013).

Las endoglucanasas son enzimas monoméricas con un peso molecular que oscila entre 22 y 45 kDa. Se ha demostrado que muchos de los hongos productores de celulasas tienen múltiples endoglucanasas en su complejo enzimático. Por ejemplo, *Trichoderma reesei* produce al menos cinco endoglucanasas y el hongo *Penicillium chrysosporium* tres. Además, algunas endoglucanasas carecen de un dominio de unión a carbohidratos (CBD) mientras que se han descrito otras que sí poseen CBD (Sandgren y col., 2005).

Las endoglucanasas fúngicas son generalmente enzimas con baja o ninguna glicosilación y disponen de una hendidura abierta que les permite la unión al sustrato (Baldrian y col., 2008). La mayoría de las endoglucanasas estudiadas actúan a un pH óptimo entre 4-5 y a una temperatura óptima entre 50 y 70°C (Yennamalli y col., 2013).

Para ensayar la actividad endoglucanasa se utilizan sustratos tales como carboximetilcelulosa (CMC), una forma de celulosa amorfa soluble que es un sustrato excelente para endocelulasas y su hidrólisis no requiere de CBD (Quiroz-Castañeda y col., 2013).

1.4.2. Celobiohidrolasas

Las celobiohidrolasas o exoglucanasas, catalizan la sucesiva hidrólisis de residuos cortando de forma procesiva los enlaces glucosídicos β -1,4 desde el extremo reductor o no reductor de la celulosa. Se ha demostrado que las CBH crean un túnel de unión a sustrato que rodea la celulosa. Como principal producto se liberan moléculas de celobiosa (dímeros de glucosa), aunque también se liberan oligómeros mayores. Representan del 40% al 70% del componente total del sistema celulasa, y son capaces de hidrolizar la celulosa cristalina (Chandel y col 2013).

Sus principales representantes son la familia GH 7 (CBHI) que atacan el extremo reductor de la cadena de celulosa y la familia GH 6 (CBHII) que son específicas para el extremo no reductor de la cadena (Figura 9). Se ha demostrado que estas CBH tienen CBD. Por ejemplo, CBHI y CBHII de *T. reesei* tienen CBD en el extremo carboxilo terminal o en el extremo amino terminal de su módulo catalítico, respectivamente (Teeri y col., 1998)

Estas enzimas son proteínas monoméricas con un peso molecular que varía de 50 a 65 kDa, aunque hay variantes más pequeñas en algunos hongos, como en *Sclerotium rolfsii* de 41,5 kDa. Muestran bajos niveles de glicosilación (de 0% hasta un 12%) y su pH óptimo es de 4-5 en un rango de temperatura de 37-60 °C, dependiendo de la combinación enzima-sustrato.

Como sustrato para el ensayo de la actividad celobiohidrolasa se utiliza celulosa cristalina como Avicel, celulosa bacteriana o papel de filtro. Estos son buenos sustratos ya que tienen un grado de polimerización bajo y una accesibilidad relativamente baja (Zhang y col., 2004).

Tanto las endoglucanasas como las celobiohidrolasas pueden ser inhibidas por el producto celobiosa y otros oligómeros superiores.

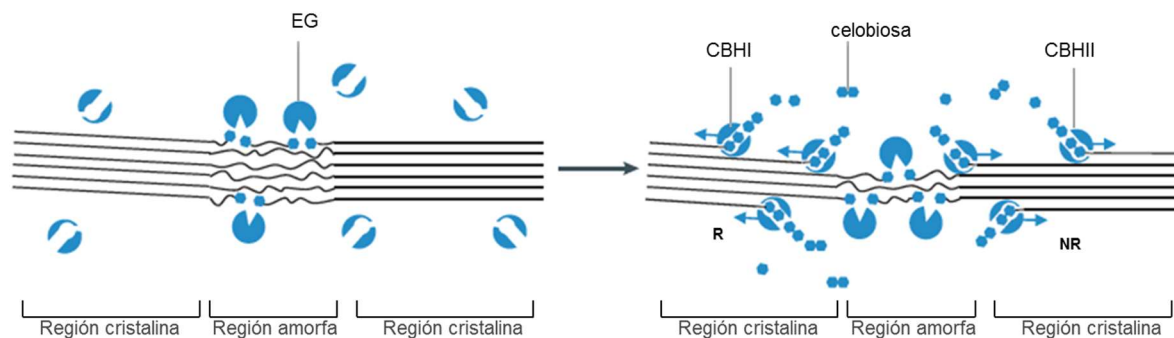


Figura 9. Representación esquemática de la degradación de celulosa cristalina por el sistema de celulasas. Celobiohidrolasa I (CBHI), celobiohidrolasa II (CBHII), endoglucanasa (EG). Extremo reductor (R), extremo no reductor (NR) Adaptado de Medie y col., 2012.

1.4.3. β -glucosidasas

Las β -glucosidasas (BGL) son el tercer componente principal de los sistemas de celulasas siendo las últimas participantes en la degradación de celulosa. Su función es doble: hidrolizan enlaces β -1,4-glucosídicos de celodextrinas solubles (celobiosa) hasta monosacáridos fermentables, como glucosa, mientras que al mismo tiempo eliminan los productos intermedios que actúan como inhibidores para EG y CBH. Estas enzimas pueden ser inhibidas competitivamente por su producto final, la glucosa (Zhang y col., 2004). De acuerdo con la similitud de la secuencia de aminoácidos, las BGL se pueden clasificar principalmente en GH 1, GH 3 y GH 9 perteneciendo la mayoría de las BGL fúngicas a GH 1 y GH 3 (Zhao y col., 2015).

Las enzimas BGL de hongos han sido ampliamente estudiadas en la literatura debido a su gran valor en la industria como componente final de la ruta de degradación de la celulosa. Se han aislado BGL de muchas especies fúngicas diferentes, incluyendo ascomicetos como *T. reesei* y basidiomicetos tales como hongos de podredumbre blanca y de podredumbre parda.

Las β -glucosidasas pertenecen a dos familias de glicosil hidrolasas GH 1 y GH 3. La familia GH3 incluye β -glucosidasas de hongos, bacterias y plantas, mientras que la familia GH1 incluye β -glucosidasas de origen bacteriano, vegetal y mamífero que tienen actividad galactosidasa además de actividad β -glucosidasa (Henrissat, 1991).

Las β -glucosidasas muestran la mayor variabilidad entre las enzimas celulolíticas debido a su variedad en estructura y localización. Mientras que algunas β -glucosidasas tienen una estructura monomérica simple, como la BGL de *Pleurotus ostreatus* con masa molecular de alrededor de 35 kDa (Morais y col., 2002), algunas otras tienen estructuras diméricas como la BGL de *Sporobolomyces singularis* con 146 kDa (Ishikawa y col., 2015), o incluso estructuras triméricas con más de 450 kDa como es el caso de *Pisolithus tinctorius* (Cao y col., 1993). En cuanto a la localización, las β -glucosidasas pueden agruparse en tres tipos diferentes: intracelular, asociada a la pared celular y extracelular (Cai y col., 1999). Además, estas enzimas carecen de CBD y constan de un único módulo catalítico.

La mayoría de las β -glucosidasas están glicosiladas y en algunos casos, como la β -glucosidasa monomérica de 300 kDa de *Trametes versicolor*, el grado de glicosilación es de hasta el 90% (Evans, 1985). Su pH óptimo oscila entre 3,5 y 5,5 y su temperatura óptima entre 45 y 75 °C (Dashban y col., 2009).

La actividad BGL puede medirse en base a (1) glucosa liberada de un sustrato natural, celobiosa, y (2) productos coloreados liberados de análogos de celobiosa, por ejemplo, p-nitro-fenil- β -1,4-glucopiranosido (pNGP) y 4-metilumberliferil- β -D-glucopiranosido, naftil- β -D-glucopiranosido (Liu y col., 2009). Los ensayos

colorimétricos basados en sustratos que ofrecen alta sensibilidad y facilidad de operación han sido ampliamente utilizados para facilitar la detección de mutantes de β -glucosidasa. Mucha de la ingeniería de β -glucosidasa a través de la evolución dirigida se ha basado en el uso del sustrato colorimétrico pNGP. Sin embargo, generalmente no hay una relación clara entre las actividades β -glucosidasa con los sustratos análogos y con el sustrato natural celobiosa (McCarthy y col., 2004).

Además de la sensibilidad a glucosa, a menudo se observa la inhibición de la actividad hidrolasa a ciertas concentraciones de celobiosa donde ocurre la reacción de transglicosilación. La inhibición de la actividad hidrolítica de BGL por producto y sustrato limita la eficiencia del proceso de bioconversión debido a que la sacarificación de la biomasa por las enzimas EG y CBH es dependiente de la hidrólisis de celodextrinas solubles a glucosa (Larue y col., 2016).

1.4.3.1. Transglicosilación

Las β -glucosidasas constituyen un componente crítico en las mezclas enzimáticas usadas para sacarificación de biomasa a nivel industrial, hidrolizando la celobiosa a monómeros de glucosa. Sin embargo, las β -glucosidasas con un mecanismo de retención, como es el caso de Bgl1 de *M. thermophila*, tienen actividad hidrolítica reducida a concentraciones elevadas de sustrato o de producto y esto depende al menos de la existencia de dos fenómenos diferentes:

- *Inhibición por sustrato*. Implica la presencia de un segundo sitio de unión de sustrato. Algunos trabajos han atribuido la disminución de la actividad hidrolítica de las BGL al mecanismo simple de inhibición competitiva de sustrato, en el cual, a altas concentraciones de sustrato disminuye la actividad de hidrólisis (Han y col., 2008; Krogh y col., 2009).
- *Transglicosilación*. Otros trabajos muestran que, para las BGL con un mecanismo de retención, la actividad hidrolítica depende (o al menos en parte) de que ocurra el proceso de transglicosilación. Durante el mecanismo de retención, inicialmente se forma un complejo covalente glicosil con la enzima. Este intermedio se rompe en el segundo paso de la reacción y puede ser provocado por una molécula de agua (actividad hidrolítica) o por un azúcar aceptor (actividad de transglicosilación) como se indica en la Figura 10. En la reacción de transglicosilación más sencilla, el aceptor es el propio sustrato (Christakopoulos y col., 1994; Kawai y col., 2004).

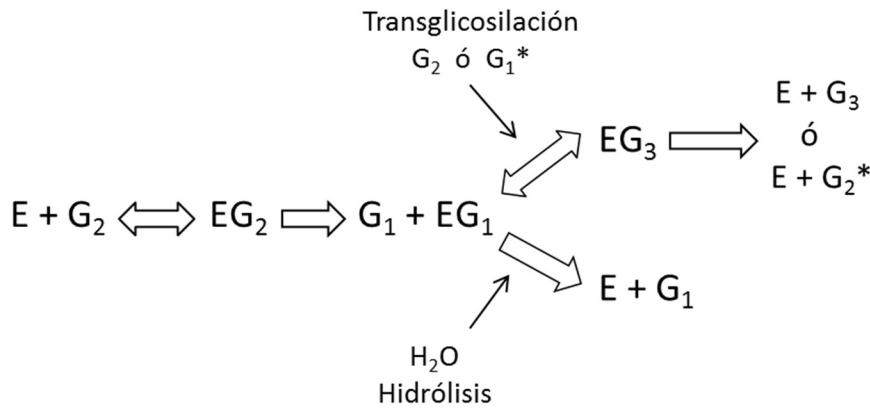


Figura 10. Interpretación molecular de la actividad hidrolítica y de transglicosilación. En las dos primeras etapas (comunes), la enzima libre (E) y la celobiosa (G₂) forman un intermedio glicosil covalente (EG₁) y una molécula de glucosa libre (G₁). En la etapa siguiente, el intermedio enzima glicosil se descompone A) por una molécula de agua (hidrólisis, vía inferior) dando lugar a la enzima libre y una segunda molécula de glucosa, o B) por un azúcar aceptor (transglicosilación, vía superior). Si el aceptor es el sustrato celobiosa, la vía de transglicosilación producirá un trisacárido (G₃) mientras que si el aceptor es una glucosa que actúa como sustrato (G₁^{*}) producirá un disacárido (G₂^{*}).

Las BGL han sido estudiadas en profundidad y la inhibición por glucosa y por altas concentraciones de sustrato están bien documentadas.

Con el fin de comprender estas actividades colaterales, las BGL se han ensayado bajo condiciones no óptimas. En diferentes publicaciones se ha estudiado de manera simultánea las actividades de hidrólisis y de transglicosilación de β-glucosidasas de varios hongos (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* y *Neurospora crassa*, entre otros) utilizando una alta concentración de celobiosa y/o glucosa para inducir la inhibición de la actividad de las BGL de forma significativa.

1.5. Hemicelulasas

Como se ha descrito anteriormente, la hemicelulosa es un heteropolímero complejo con grandes ramificaciones y estructura y composición heterogénea. Para su completa degradación, es necesario un conjunto de enzimas denominadas hemicelulasas. Dependiendo del tipo de hemicelulosa y de su composición se necesitan diferentes complejos y combinaciones de estas enzimas. Entre las principales se encuentran las endoxilanasas y β-xilosidasas para la hidrólisis de polímeros de xilano, las xiloglucanasas para el polisacárido xiloglucano y las endomananasas y β-manosidasas para la hidrólisis de cadenas de manano (Bhatia y col., 2012). Además, existen otras enzimas que actúan hidrolizando las ramificaciones haciendo más accesible la cadena principal del polisacárido. Entre estas enzimas se encuentran las arabinofuranosidasas que actúan eliminando los residuos de L-arabinosa, las α-

xilosidasas para las ramificaciones de xilosa unidos por enlace α , las α -galactosidasas que hidrolizan los residuos de D-galactosa, las α -glucuronidasas para los residuos de ácido glucorónico y ciertas esterasas (Saha, 2003).

Estas enzimas son de gran interés para la industria y han sido ampliamente estudiadas como enzimas auxiliares para el aumento de la producción de azúcares fermentables a partir de materias primas lignocelulósicas y mejorar los rendimientos de la producción de bioetanol y otros biocombustibles. Por otro lado, la acción de las hemicelulasas aumenta la accesibilidad de las fibras de celulosa, lo que mejora los rendimientos de hidrólisis enzimática y favorece la reducción de las dosis de celulasas (Alvira y col., 2010). Además, la hidrólisis de la fracción de hemicelulosa incrementa la cantidad total de azúcares fermentables.

Dependiendo del tipo de biomasa, se necesitan diferentes combinaciones de hemicelulasas. Dentro de esta batería de enzimas, las más estudiadas han sido las xilanasas. Las xilanasas incluyen endoxilanasas y β -xilosidasas. Las endoxilanasas hidrolizan enlaces internos β -1,4-glucosídicos en la cadena de xilano liberando oligómeros, mientras que las β -xilosidasas actúan sobre la xilobiosa y oligómeros de xilano, liberando unidades de xilosa. Estas enzimas y sus actividades han sido objeto de estudio para mejorar la accesibilidad de las celulasas a la celulosa y aumentar los rendimientos de la hidrólisis enzimática (García-Aparicio y col., 2007; Kumar y col., 2009).

Las endomananasas catalizan los enlaces internos de las cadenas de manano que componen un tipo de hemicelulosa predominante en la madera blanda, galactoglucomananos y glucomananos. Los principales productos de hidrólisis de estos polisacáridos son manobiosa, manotriosa y diversos oligosacáridos mixtos. Estas enzimas pueden tener un efecto positivo sobre la producción de biocombustible a partir de biomasa leñosa (Agrawal y col., 2011). Adicionalmente, las β -manosidasas son capaces de degradar los oligómeros de manano hasta manosa.

El xiloglucano es uno de los principales polisacáridos hemicelulósicos en la pared celular primaria de varias especies de plantas. Se compone de un esqueleto de glucano con sustituciones de xilosa y está íntimamente asociado con las cadenas de celulosa. Las xiloglucanasas degradan el xiloglucano permitiendo a las celulasas hidrolizar el polímero de celulosa de forma más eficiente y mejorar el proceso de hidrólisis enzimática a partir de sustratos lignocelulósicos (Benkö y col., 2008).

1.6. Polisacárido monooxigenasas (PMO)

Hasta hace poco, se pensaba que sólo las enzimas hidrolíticas desempeñaban un papel en la degradación de celulosa y hemicelulosa hasta azúcares fermentables. Recientemente se han identificado unas enzimas accesorias, denominadas polisacárido monooxigenasas, que tienen un efecto potenciador de la hidrólisis en combinación con las celulasas comunes (Horn y col., 2012). Aunque inicialmente estas enzimas se definieron como enzimas fúngicas con aparente débil actividad endoglucanasa (Karlsson y col., 2001), en la actualidad se sabe que este grupo de enzimas es capaz de romper de forma oxidativa la celulosa aumentando el rendimiento de hidrólisis enzimática de la lignocelulosa.). Por tanto, las PMO se reubicaron en la familia AA9 de la base de datos CAZy y su modo de acción se basa en la rotura de polisacáridos de celulosa cristalina mediante un mecanismo oxidativo dependiente de cobre. Estas enzimas actúan en la superficie de las fibras de celulosa generando extremos de cadena oxidados y no oxidados proporcionando nuevos sitios de unión para las celobiohidrolasas (Payne y col., 2015) y contribuyen a reducir la carga de enzimas para la bioconversión de materiales celulósicos. De hecho, se ha comprobado que pueden ser las responsables del incremento de hasta un 30% en la liberación de glucosa sobre el sustrato PCS (Benitez, L., 2017).

Dentro del grupo AA9, existen 3 tipos principales de PMO en función del átomo de carbono que oxidan: las enzimas PMO de tipo 1 que generan productos oxidados en el C1 formando aldonolactonas; las PMO de tipo 2 que generan productos oxidados en el C4 formando 4-cetoaldosas; las PMO de tipo 3 que oxidan tanto C1 como C4 con menor especificidad que los otros dos tipos (Beeson y col., 2015).

Otras proteínas sinérgicas que pueden contribuir al aumento de la eficacia de hidrólisis y reducir la dosis de celulasas necesarias para la degradación de celulosa son las expansinas, enzimas accesorias que inducen la relajación de las paredes celulares de plantas mediante la ruptura de los puentes de hidrógeno entre las fibras de celulosa (Kim y col., 2014).

1.7. Organismos degradadores de celulosa

El material celulósico es particularmente atractivo como fuente de carbono y energía debido a su gran abundancia y bajo coste. Sin embargo, debido a su carácter recalcitrante sólo ciertos organismos especializados en la degradación de las paredes celulares de plantas pueden hidrolizar la celulosa (Sanderson, 2011). Entre ellos, se incluyen bacterias, levaduras y hongos (Chandel y col., 2013). Estos microorganismos que degradan celulosa son conocidos como microorganismos celulolíticos y pueden ser aerobios o anaerobios, así como mesófilos o termófilos. Se ha descrito que los microorganismos termófilos son de particular interés debido a su facilidad para producir celulasas termoestables a pH muy ácido o muy alcalino, por tanto, tienen capacidades hidrolíticas más adaptables (Himmel y col., 2010).

En la industria, muchas de las enzimas industriales que se utilizan son enzimas fúngicas. En su hábitat natural, los hongos filamentosos secretan enzimas como celulasas, hemicelulasas, amilasas, quitinasas, proteasas, esterases y lipasas para la degradación extracelular de grandes biopolímeros en oligómeros y monómeros que tomarán como nutrientes (Sánchez, 2009).

En concreto, los hongos filamentosos son fuente de una amplia variedad de enzimas industriales y pueden ser muy eficientes en la secreción y producción de proteínas. Algunos de estos hongos se pueden cultivar relativamente fácil a altas densidades celulares en fermentadores sobre sustratos relativamente baratos. Esta combinación de características ha llevado al desarrollo de hongos filamentosos como herramienta para la producción de proteínas (Gupta y col., 2015).

Hoy en día, se conocen más de 14.000 hongos, que tienen actividad frente a celulosa y otras fibras insolubles (Lynd y col., 2002). *Aspergillus* y *Trichoderma* son dos de los géneros fúngicos más estudiados debido a su relevancia industrial para producir enzimas. Las especies de *Aspergillus* se usan ampliamente para la producción a gran escala de enzimas hidrolíticas como amilasas, por ejemplo, glucoamilasas producidas por *A. niger* (Izmirliloglu y col., 2016). Por otro lado, *T. reesei* es una de las especies más conocidas como productor eficiente de celulasas nativas y fue el primer microorganismo seleccionado para una investigación más detallada debido a su potencial (Druzhinina y Kubicek, 2016). Ambos hongos también se usan como huéspedes para la producción heteróloga de proteínas (Visser y col., 2011). Otros hongos estudiados por su habilidad de secretar complejos de celulasas extracelulares se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Listado de hongos productores de celulasas

Género	Especie
<i>Aspergillus</i>	<i>A. niger</i>
	<i>A. fumigatus</i>
	<i>A. terreus</i>
	<i>A. nidulans</i>
	<i>A. oryzae</i>
<i>Fusarium</i>	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. solani</i>
<i>Humicola</i>	<i>H. griesa</i>
	<i>H. insolens</i>
<i>Thermoascus</i>	<i>T. aurantiacus</i>
<i>Chaetomium</i>	<i>C. thermophilum</i>
<i>Melanocarpus</i>	<i>M. albomyces</i>
<i>Paecilomyces</i>	<i>P. fuisporus</i>
<i>Pahanerochaete</i>	<i>P. chrysosporium</i>
<i>Penicillium</i>	<i>P. brasilianum</i>
	<i>P. occitanis</i>
	<i>P. decumbens</i>
	<i>P. janthinellum</i>
	<i>P. funiculosum</i>
<i>Trichoderma</i>	<i>P. pinophilum</i>
	<i>T. reesei</i>
	<i>T. longibrachiatum</i>
	<i>T. harzianum</i>
	<i>T. viride</i>

Todas las cepas celulolíticas identificadas son bajas en uno o más tipos de glucósido hidrolasas requeridas para la hidrólisis eficiente de celulosa. Por ejemplo, entre las celulasas de *Aspergillus* generalmente se encuentra alta actividad β -glucosidasa pero niveles de actividad endoglucanasa más bajos, mientras que *Trichoderma* tiene altos componentes endo y exoglucanasa con niveles de actividad β -glucosidasa más bajos (Banerjee y col., 2010).

En la última década se han secuenciado los genomas de varios hongos productores de enzimas lignocelulolíticas permitiendo así mayores estudios de sus sistemas enzimáticos y la posibilidad de optimizar las mezclas enzimáticas fúngicas originales en base a la información genómica y proteómica (Liu y col., 2013).

La búsqueda de enzimas industriales nuevas y/o mejoradas y sistemas de producción de enzimas se intensifica a medida que aumenta la demanda del mercado. Aunque la mayoría de las enzimas desarrolladas y probadas para la degradación de

lignocelulosa son de hongos también se están realizando avances en el aislamiento y la caracterización de nuevas glicosido hidrolasas de bacterias. La ventaja que puede suponer el uso de bacterias es que generalmente tienen una tasa de crecimiento más alta que los hongos, aunque el nivel de producción de enzimas no suele ser tan alto como el producido por hongos. Por otro lado, las bacterias habitan en una amplia variedad de nichos ambientales y son extremadamente resistentes a los estreses del medioambiente. Esto incluye cepas que son termófilas, acidófilas, alcalófilas o halófilas. Gracias a esto, también pueden producir enzimas estables bajo condiciones extremas de bioconversión lo que puede aumentar las tasas de hidrólisis enzimática, fermentación y recuperación de producto (Maki y col., 2009).

Bacterias que pertenecen a *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora* y *Streptomyces* pueden producir celulasas. Algunas de las cepas bacterianas productoras de celulasas más estudiadas hasta la fecha son *Rhodospirillum rubrum*, *Cellulomonas fimi*, *Clostridium stercorarium*, *Bacillus polymyxa*, *Pyrococcus furiosus*, *Acidothermus cellulolyticus* and *Saccharophagus degradans*.

Las preparaciones de enzimas lignocelulolíticas comerciales son producidas principalmente por cepas de *T. reesei* (Merino y Cherry, 2007). Otros hongos ascomicetes como *Penicillium decumbens* (Fang y col, 2010), *Acremonium cellulolyticus* (Fujii y col., 2009) y *Myceliophthora thermophila* (Visser y col., 2011) también fueron utilizadas para la producción de celulasas comerciales.

1.7.1. *Myceliophthora thermophila*

En la presente Tesis Doctoral, el microorganismo productor de enzimas ha sido el hongo filamentoso *Myceliophthora thermophila* (Figura 11).



Figura 11. Imagen izquierda: Colonias del hongo *M. thermophila*. Imagen derecha: Hifas del hongo *M. thermophila*.

Se trata de un hongo filamentoso termófilo, descubierto a principios de 1990 y fue inicialmente clasificado como el ascomiceto *Chrysosporium lucknowense*. Es un potente organismo celulolítico capaz de sintetizar un conjunto completo de enzimas necesarias

para la descomposición de la celulosa, con rangos amplios de pH (4,5 - 7) y temperatura (25 - 44 °C) para su crecimiento (Visser y col., 2011).

El genoma de 38,7 Mpb de *M. thermophila* ha sido secuenciado y anotado y comprende alrededor de 9500 genes organizados en 7 cromosomas (Berka y col., 2011). Esta secuenciación permitió identificar un gran número de genes que codifican enzimas industrialmente importantes, tales como enzimas activas sobre carbohidratos (CAZy), proteasas, oxido-reductasas y lipasas, y más de 200 genes para enzimas degradadoras de pared celular de plantas que cubren la mayoría de las familias reconocidas.

Tras su descubrimiento, *M. thermophila* fue desarrollado como productor de enzimas por la empresa americana Dyadic International Inc., dedicada a la producción de proteínas y producción de mezclas enzimáticas hechas a medida para la degradación de la biomasa lignocelulósica. Una de las cepas desarrolladas fue la denominada C1 (Visser y col., 2011). Las principales características de C1 son los altos niveles de producción (hasta 100 g/L proteína), así como el mantenimiento de niveles de baja viscosidad del medio de cultivo favoreciendo el proceso de fermentación (Karnaouri y col., 2014).

M. thermophila C1 posee una gran diversidad de enzimas hidrolíticas por lo que es un candidato idóneo para la sacarificación de biomasa lignocelulósica (Gusakov y col., 2011). El caldo secretado por esta cepa se compone principalmente de endoglucanasas, celobiohidrolasas, polisacárido monooxigenasas y β -glucosidasas. Además, por la riqueza de genes que posee codificando enzimas industrialmente relevantes y por sus ventajosas características de producción, *M. thermophila* C1 ha sido un punto de partida fundamental para el desarrollo de diferentes cepas y sistemas de expresión que producen enzimas y mezclas de enzimas para otras aplicaciones industriales rentables como son la producción de anticuerpos y vacunas (Emalfarb y col., 2013). Las propiedades de C1 han proporcionado, por tanto, una alternativa a huéspedes tradicionales para producción de proteínas fúngicas como *Aspergillus* o *Trichoderma* y hacen de esta una cepa competitiva en el mercado de enzimas comerciales para la producción de bioetanol (Visser y col., 2011).

M. thermophila ha recibido una considerable atención a nivel industrial por su potencial como productor de enzimas termoestables. Es capaz de producir y secretar enzimas hidrolíticas de importancia industrial tales como fitasa, lipasa, celulasa, xilanasas y quitinasas, entre otras. Por tanto, este hongo se considera como un descomponedor de varios tipos de sustrato y para múltiples aplicaciones (Dua y col., 2017). Sin embargo, para la aplicación industrial de producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica, muchas de estas enzimas secretadas por el hongo son prescindibles debido a que carecen de actividad ante este sustrato y no aportan nada a la mezcla enzimática, como es el caso de las quitinasas. Las quitinasas son enzimas no celulolíticas capaces de hidrolizar la quitina, uno de los polímeros naturales más

abundantes después de la celulosa, en sus componentes oligo y monoméricos (Krolicka, 2015). En concreto catalizan la hidrólisis de uniones N-acetil- β -D-glucosaminida y β -1,4 en quitina y quitodextrinas pero no en polímeros de celulosa.

A pesar de que la quitinasa es una enzima improductiva para la hidrólisis de biomasa lignocelulósica, el uso de enzimas que catalizan la despolimerización de quitina es una herramienta prometedora para otras aplicaciones. Por ejemplo, Dua y col. (2017) han caracterizado recientemente una quitinasa de *M. thermophila* para la generación de N-acetil glucosamina y su aplicación en el biocontrol de hongos fitopatógenos.

Recientemente este grupo ha publicado como en el cóctel de *M. thermophila* C1 se han identificado, unas 52 proteínas extracelulares no activas para carbohidratos que permanecen en el caldo secretado por el hongo (Reyes-Sosa y col., 2017) y que son objeto de eliminación como continuación del programa de desarrollo del cóctel celulolítico producido por esta cepa.

1.8. Mejora del cóctel enzimático para la hidrólisis de biomasa lignocelulósica

La hidrólisis enzimática de la biomasa lignocelulósica se ve obstaculizada por diferentes factores que limitan el desarrollo de un proceso económico. Aunque las empresas como Novozymes, Genencor, Verenum o DSM han logrado un avance significativo en la reducción del coste de producción de enzimas, la hidrólisis enzimática requiere todavía altas cargas enzimáticas y sigue siendo una barrera económica para la producción de biocombustibles (Gupta y col., 2015). Por lo tanto, la eficiencia de la hidrólisis enzimática debe mejorarse aún más.

Los principales factores que afectan a la hidrólisis enzimática pueden dividirse en aquellos relacionados con la enzima y aquellos relacionados con el sustrato. Los factores relacionados con la enzima incluyen la inhibición por producto final, la estabilidad a pH y temperatura, la cantidad limitada de enzima producida o de eficiencia catalítica, la composición de mezclas de enzimas secretadas no óptimas para determinadas aplicaciones, la sinergia de las enzimas y la adsorción irreversible de las enzimas a la lignina (Kubicek y col., 2016). Los principales factores relacionados con el sustrato que limitan la hidrólisis enzimática comprenden el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa, el área superficial accesible y el contenido de lignina y hemicelulosa (Álvarez y col., 2016).

Una de las vías para la mejora de estos factores es el desarrollo de sistemas enzimáticos a medida para diferentes sustratos y combinaciones tecnológicas. Para ello, existen múltiples herramientas disponibles como la ingeniería genética y de proteínas, la sustitución de enzimas originales por otras de mejores cualidades enzimáticas provenientes de otros organismos, el uso de promotores alternativos o mejorados para

dirigir la expresión génica o conducir la sobreexpresión de genes, el incremento y el ajuste del número de copias del gen que codifica el producto deseado, la delección/interrupción dirigida de genes que codifican actividades secundarias no deseadas, la introducción de nuevas propiedades en la cepa de producción o la mejora del rendimiento de las proteínas enzimáticas mediante evolución dirigida, entre otras (Liu y col., 2013).

Gracias a la creciente disponibilidad de información genómica y proteómica se han logrado importantes avances en el análisis y la mejora de los sistemas enzimáticos lignocelulolíticos fúngicos. Algunos de los principales enfoques utilizados por los investigadores se resumen a continuación.

- (i) *Análisis genómico de cepas productoras de enzimas.* Es importante una comprensión exhaustiva de los sistemas enzimáticos antes de la mejora de estos. Debido al avance en la secuenciación de los genomas completos de varios hongos industriales se ha incrementado el conocimiento de los componentes enzimáticos y de las necesidades de mejora (Kubicek, 2013).
- (ii) *Análisis proteómico de los sistemas enzimáticos “reales”.* Aunque se pueden predecir cientos de genes que codifican enzimas lignocelulolíticas en un hongo productor, se requiere el perfil proteómico de los secretomas en condiciones de crecimiento específicas. Para ello se pueden utilizar tecnologías basadas en electroforesis bidimensional, cromatografía líquida y espectrometría de masas para analizar los componentes de un cóctel enzimático (Gonzalez-Vogel y col., 2011). Estos análisis proporcionan información valiosa para el desarrollo de cócteles enzimáticos más eficientes.
- (iii) *Mejora del rendimiento de las enzimas individuales.* Se concibe que las propiedades de la mayoría de los componentes en un sistema enzimático nativo pueden mejorarse aún más. Esta mejora se puede lograr mediante ingeniería de proteínas o mediante la sustitución de la enzima original por otra mejor de otros organismos. Actualmente, existen dos enfoques principales en la ingeniería de proteínas para la mejora de celulasas (Alcalde, 2015). Estos son: (1) El diseño racional de proteínas donde se utiliza la mutagénesis dirigida basada en la estructura de la proteína. Para ello se requiere un conocimiento detallado de la estructura tridimensional. (2) La evolución dirigida de enzimas que no está limitada por la falta de conocimiento de la estructura proteica o de la interacción entre la enzima y el sustrato, pero requiere un método eficiente de detección de alto rendimiento.
- (iv) *Mejora de la sinergia entre enzimas.* Los componentes de sistemas enzimáticos lignocelulósicos actúan sinérgicamente para degradar la biomasa vegetal. Para mejorar esto, la composición de los cócteles enzimáticos necesita ser optimizada y definida para diferentes materiales lignocelulósicos. La optimización puede realizarse dentro de un sistema enzimático nativo o entre sistemas enzimáticos de diferentes especies (Bhattacharya y col., 2015).

- (v) *Mejora de la productividad enzimática del organismo.* A pesar de los niveles altos de producción de proteína extracelular alcanzados por algunas cepas (Visser y col., 2011), existe un margen de mejora mediante la ingeniería genética. Para ello se pueden utilizar herramientas como la expresión heteróloga de genes, la sobreexpresión, el reemplazo o el silenciamiento / eliminación de genes (Liu y col., 2013). Otro enfoque podría ser la modificación genética de los componentes de la vía de secreción, del control del plegamiento, glicosilación, tráfico y degradación de proteínas (Idiris y col., 2010).

1.8.1. Eliminación de proteínas o enzimas no contributivas

Muchos de los esfuerzos realizados en la optimización del proceso de bioconversión han ido dirigidos a la generación de microorganismos que expresan cócteles enzimáticos mejorados gracias a la sobreexpresión de genes que codifican para enzimas celulolíticas específicas, tanto genes homólogos como heterólogos (Schmoll, M., y Dattenböck, C., 2016). Sin embargo, además de la sobreexpresión de genes, también se requiere la interrupción o eliminación de genes específicos como parte de programas de desarrollo de cepas. En este sentido, en la presente Tesis doctoral se planteó la delección de dos genes que codifican proteínas identificadas como no contributivas para la actividad celulolítica del cóctel.

La disrupción o eliminación de genes específicos es una estrategia interesante para la optimización de los cócteles enzimáticos para mejorar la eficiencia del proceso. Son susceptibles de ser eliminados aquellos genes que codifican actividades enzimáticas o proteínas que no contribuyen o que incluso son contraproducentes para la actividad global del cóctel enzimático (Visser y col., 2011) o genes que dan lugar a represores de la producción de celulasas (Kubicek y col., 2009). Normalmente, las cepas "superproductoras" producen una mezcla de muchas proteínas diferentes, predominantemente celulasas y hemicelulasas. Es común encontrar en estos organismos enzimas con actividades que se solapan o que son redundantes permitiendo a estos organismos adaptarse a los cambios de condiciones en el ambiente. En la industria, estas condiciones suelen estar restringidas al rendimiento óptimo de hidrólisis y de producción por lo que puede no ser necesaria una alta diversidad de enzimas. De hecho, esta diversidad puede ser contraproducente ya que en condiciones industriales sólo una fracción de las enzimas presentes en el cóctel secretado por la cepa será capaz de contribuir al rendimiento de hidrólisis de biomasa. Por tanto, una extrema complejidad de los cócteles enzimáticos es un impedimento para desarrollar mezclas de celulasas eficientes y competitivas en la industria. Además, no es deseable la producción de enzimas redundantes o con poca actividad puesto que disminuye la producción de las que sí lo son. La generación de microorganismos mejorados que sobreexpresen un cóctel celulolítico de baja diversidad, eliminando enzimas "menos contributivas" en favor de las más contributivas, ha permitido reducir la dosis enzimática para obtener, al

menos, el mismo rendimiento mejorando la economía del proceso (Reyes-Sosa y col., 2017).

Entre las diferentes estrategias para conseguir eliminar las enzimas no contributivas o reducir su actividad destacan la mutagénesis de la cepa y la posterior selección de mutantes con actividad reducida o la delección dirigida de aquellos genes no deseados o perjudiciales.

Los procedimientos para llevar a cabo delecciones génicas de forma eficiente estaban poco definidos y era un proceso tedioso que consumía mucho tiempo. En los últimos tiempos, se han desarrollado herramientas moleculares adecuadas para superar estas limitaciones (Forment y col., 2006).

Para la delección de genes, el uso de genes marcadores es esencial para discriminar entre células con el gen delecionado o no. Los genes marcadores pueden conferir resistencia a antibióticos (marcador dominante) o complementar una auxotrofia (marcador auxótrofo) y de este modo permitir la selección de las células transformadas.

Las transformaciones basadas en marcadores dominantes y auxótrofos generalmente limitan el número de manipulaciones genéticas. Además, la presencia de genes de resistencia a antibióticos no es deseable en cepas industriales y puede suponer un obstáculo en los procesos de aprobación de ciertos productos. Como solución a estos problemas, se desarrollaron sistemas con marcadores reciclables, es decir sistemas que permiten la eliminación del gen marcador después de cada paso de transformación y permiten la reutilización del mismo marcador en la siguiente ronda de transformación.

Se han desarrollado diferentes métodos con construcciones genéticas para facilitar el proceso de delección de genes y el reciclado de marcadores. Entre ellos destacan el casete de delección o el uso de una enzima recombinasa. Se detallan a continuación:

- (i) **Casete de delección.** El casete de delección es una opción para facilitar la eliminación y la reutilización del gen marcador en otros eventos de delección reduciendo la necesidad de usar diversos marcadores de selección (Figura 12A). En este sistema el gen marcador está ubicado entre dos repeticiones directas cortas (de aproximadamente 500 pb), lo que favorece la escisión del marcador por recombinación homóloga entre estas repeticiones. Este casete se puede reutilizar para múltiples rondas de delecciones génicas. Un ejemplo de la eficacia de este método aplicado en hongos es el descrito por Hartl y Seiboth (2005) para *T. reesei* en el cual se eliminaron consecutivamente dos genes de hexoquinasa con un casete de delección. El enfoque de esta estrategia se basa en la recombinación natural entre las dos repeticiones directas que flanquean el gen marcador. El

inconveniente es que esto se produce con una frecuencia relativamente baja (aproximadamente un 1%) (Seiboth, B., y col., 2011).

- (ii) **Recombinasa.** Otro sistema de recombinación consiste en la introducción de una recombinasa específica que detecta fragmentos cortos de ADN con una secuencia específica y recombina estos sitios, eliminando así el ADN existente entre ellos (Figura 12B). La ventaja de esta estrategia es una frecuencia de recombinación relativamente alta y el inconveniente es que requiere un gen adicional, el gen que codifica la recombinasa, que debe regularse de tal forma que el gen marcador no se elimine durante la transformación fúngica inicial, sino en el momento que se desee la eliminación del gen marcador de una forma controlada (Seiboth, B., y col., 2011). Ejemplos de tal método son el sistema Cre/loxP del bacteriófago P1 de *E. coli* (Martínez-Anaya y col., 2008) o el sistema FLP/FRT de *S. cerevisiae*. Ambos dependen de una recombinación específica de sitio mediada por la recombinasa Cre o FLP, además de secuencias de reconocimiento que sirven como sitios específicos de unión a recombinasa (loxP o FRT).

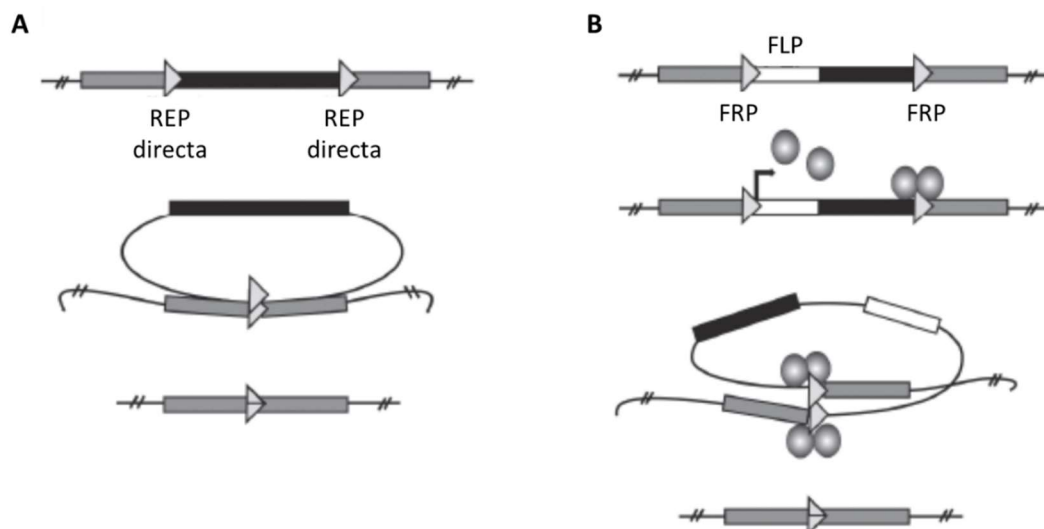


Figura 12. Construcciones para deleción de genes y diferentes sistemas de eliminación del gen marcador (A) Reciclaje del marcador de selección mediante el sistema de casete de deleción. Estos casetes se componen de un gen marcador (fragmento negro) flanqueado por dos repeticiones directas (REP) que son las responsables de la escisión del marcador de selección mediante recombinación homóloga después de la transformación. (B) Reciclaje del marcador de selección mediante un sistema de recombinación FLP/FRT. En este sistema la recombinasa FLP se introduce con el gen marcador y media la recombinación entre dos secuencias FRT (adaptado de Seiboth, B., y col., 2011).

Para la aplicación de los sistemas de casetes de deleción y los sistemas recombinasa, son esenciales los marcadores genéticos bidireccionales. Estos marcadores son aquellos que se pueden usar para seleccionar la ausencia y la presencia del marcador. La selección bidireccional se logra seleccionando primero la

presencia del marcador tras la transformación del hongo (selección positiva) y, posteriormente, se prueba la pérdida o ausencia del marcador (selección negativa). En caso de que el gen marcador aún esté presente, el transformante será sensible a cierta sustancia tóxica. En ausencia del marcador, esta sustancia no puede metabolizarse y, por lo tanto, ya no sería tóxica (Steiger y col., 2011). Algunos ejemplos de marcadores bidireccionales usados en hongos se exponen a continuación.

- (i) **Genes *ura3/pyr4*.** El gen *ura3* que codifica la orotidina-5'-fosfato decarboxilasa involucrada en la biosíntesis de pirimidina, confiere a la célula la capacidad de crecer en ausencia de uracilo (complementación de auxotrofia). De forma similar, el gen *pyr4* de *T. reesei* que codifica la misma enzima, confiere prototrofia de uridina/uracilo. Los transformantes que hayan integrado *ura3/pyr4* en su ADN genómico permiten su selección en medios deficientes en uracilo y/o uridina. Por otro lado, los mutantes deficientes en *ura3/pyr4* son resistentes al ácido 5-fluoro-orótico (5-FOA) que se convierte en el tóxico fluoro-uracilo en el caso de los protótrofos. De esta forma, es posible la selección de aquellas células que han perdido el gen marcador mediante el crecimiento en medio con 5-FOA más uracilo/uridina (Hartl y Seiboth, 2005).

- (ii) **Gen *amdS*.** Otro marcador de selección bidireccional y reciclable, frecuentemente usado en diferentes hongos filamentosos, es el gen *amdS* de *Aspergillus nidulans*. El gen *amdS* codifica la enzima acetamidasa capaz de catalizar la hidrólisis de acetamida liberando acetato y ión amonio. En organismos que no son capaces de utilizar acetamida como fuente de nitrógeno de forma natural, el gen *amdS* permite la producción de amonio, que es utilizable como fuente de este nutriente. Por tanto, su acción como marcador de selección se basa en la utilización de un medio mínimo con acetamida como única fuente de nitrógeno permitiendo solamente el crecimiento de las células que poseen dicho marcador (Kelly y Hynes, 1985; Hynes, 1994).

La contraselección para la selección de aquellas células que han perdido este gen marcador, por recombinación natural entre las dos repeticiones directas que lo flanquean, es posible mediante el crecimiento en medio conteniendo fluoroacetamida, que provoca la muerte celular si el gen *amdS* se expresa (Van ooyen y col., 2006). La fluoroacetamida es convertida por la acetamidasa en el compuesto tóxico fluoracetato provocando la muerte celular (Hynes y Pateman, 1970). De esta forma, permite la selección de células que han perdido el marcador de selección *amdS* para su posible reutilización en la misma cepa.

El gen *amdS* ha sido utilizado como marcador de selección en diversos hongos filamentosos (Gomi K., y col., 1992).

- (iii) **Combinación de marcadores.** De forma similar, se puede construir un casete fusionando un marcador positivo dominante con un marcador negativo, por

ejemplo, un gen de resistencia a la fleomicina se fusionó con el gen de la timidina quinasa del virus del herpes simple tipo 1. Esta fusión génica confería resistencia a la fleomicina para la selección positiva dominante y la sensibilidad al ganciclovir para la selección negativa (Krappmann y col., 2005).

1.8.2. Evolución molecular dirigida de enzimas

En las últimas décadas, la evolución dirigida se ha convertido en una poderosa herramienta para adaptar diversas funciones enzimáticas. Esta técnica permite el desarrollo de enzimas adecuadas con especificidad, actividad, estabilidad y solubilidad mejoradas que operan en condiciones específicas de procesos industriales (Porter y col., 2016).

La evolución molecular dirigida explora grupos de genes naturales o mutados con el fin de seleccionar las propiedades deseadas. Durante décadas esta herramienta se ha aplicado para muchos objetivos en biotecnología, tales como conseguir enzimas que sean estables durante largos periodos de tiempo, enzimas con mayor especificidad y estabilidad o enzimas que puedan aceptar diferentes sustratos que no pueden encontrarse en la naturaleza (Nevalainen y col., 2003). Esta técnica permite el desarrollo de enzimas adecuadas para las condiciones específicas de un proceso industrial.

La evolución dirigida es una herramienta probada y aceptada para la ingeniería de proteínas debido a su independencia del conocimiento de la estructura de la enzima y la interacción entre la enzima y el sustrato. Esta técnica permite optimizar la función o las propiedades de la enzima usando un proceso de selección artificial para detectar proteínas mutagenizadas según las necesidades (Larue y col., 2016). El uso de la evolución dirigida para modificar las celulasas para aplicaciones industriales se ha demostrado en EG (Wang y col., 2005), en CBH (Wu y Arnold, 2013) y en BGL (Pei y col., 2011), donde la estabilidad térmica, la actividad a temperaturas no naturales y el pH óptimo han sido los objetivos de mejora más habituales.

Habitualmente, un experimento de evolución dirigida consiste en la creación de librerías génicas aplicando técnicas de mutagénesis y/o recombinación para aislar los genes que codifican las proteínas con las propiedades deseadas (Nevalainen y col., 2003) (Figura 13).

El mayor desafío es desarrollar métodos que evalúen correctamente el rendimiento de los mutantes de la enzima de interés. Para la selección siempre es preferible realizar un cribado o *screening* que permita el análisis de un gran número de mutantes. El *screening* puede (1) facilitarse distinguiendo los mutantes deseados del resto en función de sus distintos fenotipos, como liberación de productos coloreados o

formación de halos, o (2) aleatorios, lo que implica elegir mutantes uno por uno para la evaluación de su rendimiento (Liu y col., 2009).

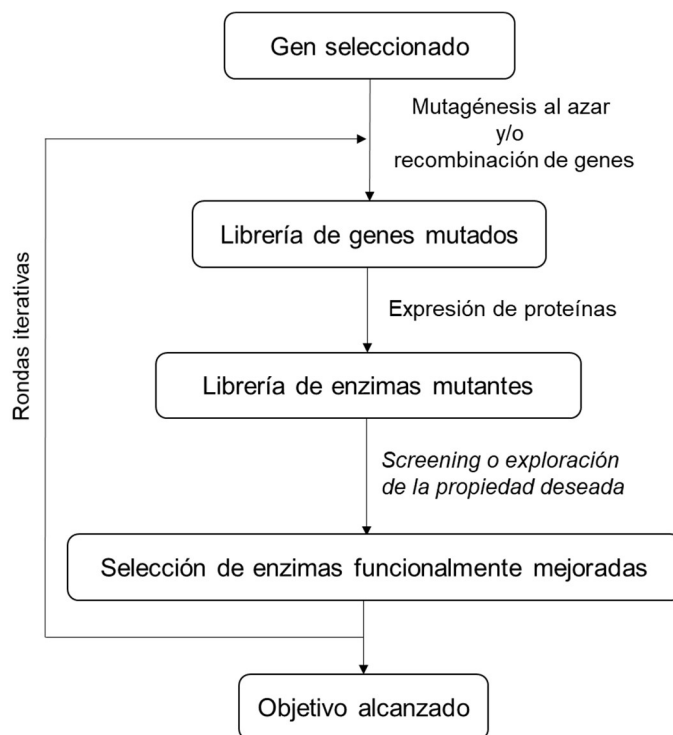


Figura 13. Esquema general de evolución dirigida. Partiendo del gen seleccionado se usan herramientas de mutagénesis aleatoria y/o recombinación génica seguidas de una selección o *screening* de alto rendimiento para aislar variantes funcionalmente mejoradas. Se pueden usar varios ciclos hasta alcanzar la propiedad o parámetros deseados.

En esta Tesis se afronta la evolución dirigida de la enzima Bgl1 de *M. thermophila* C1 que posee una significativa actividad de transglucosilación (Apartado 1.4.3.1.), con el fin de disminuir o eliminar esta actividad no deseada. La reducción de esta actividad implicaría el aumento de la actividad hidrolítica y del rendimiento de liberación de glucosa mejorando la actividad global de hidrólisis de biomasa lignocelulósica.

2 OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es la mejora genética del hongo productor del cóctel enzimático mediante dos líneas principales:

- La reducción y/o eliminación de aquellas actividades perjudiciales o productos no deseados que estén presentes en el cóctel enzimático. Para ello, se planteó la eliminación de genes que codifican estas proteínas no deseadas. Las candidatas son dos enzimas con significativa representación en el cóctel enzimático producido por *M. thermophila* pero que son aparentemente inactivas o ineficientes en las condiciones del proceso de hidrólisis de biomasa lignocelulósica. Concretamente se trata de una enzima no celulolítica no activa en el cóctel, la quitinasa 2, y una enzima celulolítica con actividad redundante y poco eficiente en el cóctel, la endoglucanasa 6. Por tanto, se decidió eliminar los genes que codifican para estas enzimas con el fin de optimizar la composición del cóctel enzimático y en consecuencia obtener un mayor rendimiento de hidrólisis para una misma dosis de cóctel enzimático.
- La mejora genética de aquella/s actividad/es celulolíticas principales. Este es el caso de la actividad β -glucosidasa que tiene una elevada actividad transglicosilante que supone una pérdida de rendimiento en la producción de glucosa. Para ello, se planteó la mejora de la enzima β -glucosidasa de *M. thermophila* mediante evolución dirigida con la finalidad de disminuir o eliminar esta actividad transglicosilante y por consiguiente aumentar el rendimiento final de liberación de glucosa.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Organismos

3.1.1. Cepas del hongo *Myceliophthora thermophila*

En la presente Tesis Doctoral se han utilizado dos cepas de *Myceliophthora thermophila* para los distintos objetivos de este trabajo. Ambas cepas derivan de la cepa industrial *M. thermophila* UV18-25 descrita en la patente WO 2008/008793 A2 (Magnuson y col., 2008) y son: (i) una cepa de uso industrial para la reducción y/o eliminación de enzimas ineficientes en el proceso de hidrólisis de biomasa con el fin de generar una cepa que exprese un cóctel enzimático óptimo, y (ii) una cepa parental para la mejora genética de una de las actividades celulolíticas principales, la actividad β -glucosidasa. En ambos casos con el objetivo general de mejorar el rendimiento de hidrólisis enzimática.

3.1.1.1. *M. thermophila* AB1

AB1 deriva de *M. thermophila* UV-1825 (Verdoes y col., 2007) con expresión nativa de las principales celulasas por lo que es una cepa adecuada para la búsqueda de versiones mejoradas de estas enzimas. En concreto, se utilizó como cepa hospedadora para el escrutinio de la librería de mutantes de la enzima β -glucosidasa 1 (Bgl1) con el objetivo de obtener una versión mejorada de esta celulasa. El uso de esta cepa para tal fin permitió el adecuado análisis de los mutantes y el ensayo de la actividad β -glucosidasa ya que no produce grandes cantidades de esta enzima que puedan enmascarar la actividad ensayada.

La cepa AB1 presenta auxotrofia de uridina ($\Delta pyr5$). El gen *pyr5* (número de acceso en NCBI XP_003660657.1) codifica la enzima orotato-fosforibosil transferasa funcional y su vector de expresión permite la complementación de la auxotrofia de uridina (Verdoes y col., 2007).

3.1.1.2. *M. thermophila* AB2

AB2 es una cepa industrial de *M. thermophila* que produce una mezcla enzimática optimizada (cóctel completo) compuesta por las principales enzimas celulolíticas (β -glucosidasa, celobiohidrolasa tipo I y tipo II, endoglucanasas, β -xilosidasas y polisacárido monooxigenasas) que actúan de forma sinérgica para la obtención de

azúcares fermentables a partir de biomasa. Dentro de este conjunto de enzimas están sobreexpresadas una β -glucosidasa, una endoglucanasa y dos polisacárido monooxigenasas. AB2 se utilizó para evaluar la mejora de eficiencia del cóctel mediante la eliminación de enzimas celulolíticas no contributivas (con menor o nula eficiencia celulolítica) con el fin de aumentar la concentración de enzimas activas con mayor eficiencia celulolítica.

La cepa AB2 presenta auxotrofia de uridina ($\Delta pyr4$). El gen *pyr4* (número de acceso en NCBI GI_367034702 XP_003666633.1) codifica una orotidina-5-fosfato-d Descarboxilasa y su expresión permite la complementación de la auxotrofia de la uridina (Verdoes y col., 2007).

3.1.2. Cepas de la bacteria *Escherichia coli*

3.1.2.1. *E. coli* XL1-Blue MRF

La cepa de *E. coli* XL1-Blue MRF (Stratagene) se utilizó para producir y purificar con un elevado rendimiento las diferentes construcciones de plásmidos. Se utilizaron células competentes comerciales para ser transformadas por electroporación con una eficiencia de transformación superior a 1×10^{10} transformantes/ μg de ADN. Su genotipo es: $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac$ [F' *proAB lac^qZ* Δ M15 Tn10 (Tet^r)]

3.1.2.2. *E. coli* XL10-Gold

La cepa de *E. coli* XL10-Gold (Stratagene) se utilizó para producir y purificar con un elevado rendimiento los plásmidos de las librerías de mutantes de *bgl1*. Se utilizaron células ultracompetentes comerciales con una eficiencia de transformación superior a 5×10^9 transformantes/ μg de ADN. Su genotipo es: Tetr $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac$ Hte [F' *proAB lac^qZ* Δ M15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r].

3.2. Medios de cultivo y disoluciones

3.2.1. Medios y condiciones de cultivo para *M. thermophila*

Las cepas de *M. thermophila* utilizadas en este trabajo se cultivaron en el medio nutritivo adecuado según el fin a alcanzar: el crecimiento general de la cepa, la selección de transformantes, la obtención de esporas o la producción del cóctel enzimático.

Para la producción del cóctel enzimático de *M. thermophila* se usaron distintos medios según la escala de producción (microplaca o matraz). En ambos casos, esta producción consta de una fase previa de crecimiento y posteriormente de producción en las cuales la composición de los medios varía según la escala. Estos medios contienen las fuentes de carbono, nitrógeno y sales adecuadas para cada caso. La composición de los medios se describe en las publicaciones de Verdoes y col., 2007 y Visser y col, 2011 y en la patente Emalfarb y col., 1998. Para cualquiera de estos fines, las cepas de *M. thermophila* se cultivaron a 35 °C.

Para el crecimiento de cepas auxótrofas *pyr4* o *pyr5* (ver descripción en Apartado 3.1.1.1. y 3.1.1.2.) se utilizó el mismo medio añadiendo uracilo y uridina a la mezcla. Antes de esterilizar en autoclave se añade el uracilo a una concentración final de 1,12 g/L y post-esterilización se añade uridina 1M a una concentración final de 10 mM.

Para la selección de transformantes delecionados se utilizó el marcador *amdS* (Kelly y Hynes, 1985). Este gen codifica una acetamidasa capaz de hidrolizar la acetamida como fuente de carbono y nitrógeno para el hongo (ver Introducción, Apartado 1.8.1.). Debido a que el medio contiene acetamida (1M) como única fuente de carbono y nitrógeno, sólo aquellos transformantes que expresen el gen *amdS* serán capaces de crecer. Posteriormente el marcador se puede eliminar mediante selección en fluoroacetamida (5 g/L) en presencia de urea como fuente de nitrógeno (Debets y col., 1990).

3.2.1. Medio y condiciones de cultivo para *E. coli*

3.2.1.1. Medio de crecimiento de *E. coli* Luria Bertani (LB)

El crecimiento de *E. coli* se realizó en medio LB deshidratado (Merck, 30 g/L). La esterilización de este medio se realizó en autoclave, a 1 atmósfera de presión y 121 °C durante 20 min.

Para la selección de los transformantes de células de *E. coli* transformadas con plásmido se añadió post-esterilización el antibiótico ampicilina (200 mg/mL) a una concentración final de 100 µg/mL, resultando el medio LB/amp. Se transfirieron colonias aisladas a tubos de 10 mL con 2,5 mL de LB/amp y se incubaron a 37 °C y 100 rpm durante 12 h.

3.3. Obtención, manipulación y análisis de ADN

3.3.1. Aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli*

Para el aislamiento de pequeñas cantidades de ADN plasmídico de cultivos bacterianos de *E. coli* en LB/amp se usó el kit *PureYield Plasmid Miniprep System* (Promega) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Para el aislamiento de mayores cantidades de ADN plasmídico se empleó el kit *E.Z.N.A. Plasmid Maxi Kit* (Omega bio-tek, Inc.) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante y partiendo de cultivos de *E. coli* de 100 mL de LB/amp. Ambos kits se basan en el método de lisis alcalina seguida de la purificación del ADN y elución en agua mili-Q estéril.

3.3.2. Aislamiento de ADN genómico de *M. thermophila*

Para la extracción y purificación de ADN genómico de cultivos de *M. thermophila* se empleó el kit *DNeasy Plant Mini Kit* (Quiagen) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Para ello se partió de inóculos de micelio de colonias aisladas en 500 µL de medio de crecimiento en microtubos de 2 mL y se incubó a 35 °C con una agitación de 250 rpm durante 72 h.

3.3.3. Análisis y cuantificación de ADN

3.3.3.1. Electroforesis de ADN

Para la caracterización de plásmidos, separación de fragmentos de distinto tamaño generados de digestiones con enzimas de restricción o verificación de los productos obtenidos mediante PCR, el ADN se sometió a electroforesis en geles de agarosa (AMRESCO) preparados en tampón TAE 1X (a partir de TAE 50X compuesto por Tris-base 2M; 5,70% ácido acético glacial; 50 mM EDTA pH 8,00). Las concentraciones de agarosa variaron entre 0,7% y 1,5% (p/v) dependiendo del tamaño

de los fragmentos a separar. El ADN se visualizó por tinción con SYBER Safe (Thermo Fisher Scientific) e iluminación con luz ultravioleta utilizando un transiluminador *Gel Doc TM XR* (BioRad).

La polimerización de los geles de agarosa y el desarrollo de la electroforesis se llevó a cabo en cubetas de Bio-Rad. Las muestras de ADN se disolvieron en tampón de carga (Takara) y la electroforesis se realizó en tampón TAE 1X a una intensidad de corriente variable según el tamaño de la cubeta.

3.3.3.2. Cuantificación de ADN

La concentración de ADN se calculó: A) Mediante electroforesis en gel de agarosa (Apartado 3.3.3.1.) por comparación de intensidad de las bandas a cuantificar con las bandas del marcador *High Mass DNA ladder* (Invitrogen) de masa molecular, tamaño y concentración conocidos. B) Con el espectrofotómetro *NanoDrop* (Thermo Scientific).

3.3.4. **Purificación de fragmentos de ADN**

Para la purificación de los fragmentos de ADN procedentes tanto de digestiones enzimáticas como de amplificaciones por PCR se llevaron a cabo electroforesis en geles de agarosa para separar los fragmentos de ADN. Las bandas de interés se cortaron con un bisturí y se purificaron con el kit *QIAquick Gel Extraction kit* (Quiagen) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

3.4. **Transformación de microorganismos**

3.4.1. **Transformación de *E. coli***

Las células competentes XL1-Blue MRF[™] de *E. coli* fueron transformadas por electroporación y las células competentes de XL10-Gold de *E. coli* fueron transformadas por choque térmico siguiendo para cada una de ellas las indicaciones del protocolo proporcionado por del fabricante (Stratagene).

3.4.2. Transformación de *M. thermophila*

La transformación del hongo *M. thermophila* se realizó mediante la fusión de protoplastos como se describe en Verdoes y col., 2007 y siguiendo el procedimiento patentado por Emalfarb y col., 2003. Este procedimiento se basa en la generación de protoplastos mediante la incubación del micelio con una solución de enzimas líticas para la correcta degradación de la pared celular y la liberación de protoplastos para su posterior transformación con el ADN correspondiente (Figura 14).

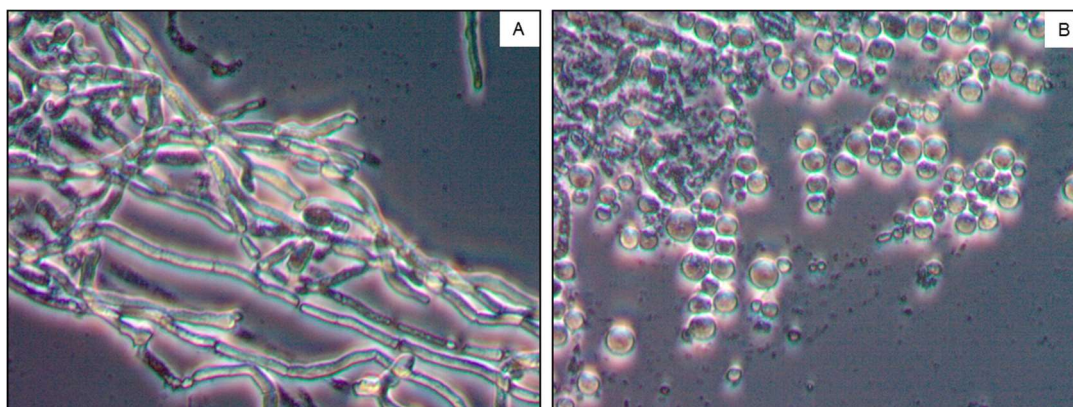


Figura 14. Liberación de protoplastos mediante tratamiento con una solución de enzimas líticas (Caylasa C4, Invivogen). A) Imagen al microscopio del micelio de *M. thermophila* antes del tratamiento. B) Imagen al microscopio de los protoplastos libres y desprovistos de pared celular tras el tratamiento.

3.5. Construcción de plásmidos

3.5.1. Digestión con enzimas de restricción

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción (Takara o New England Biolabs) se realizaron en el tampón indicado por el fabricante y teniendo en cuenta las unidades de cada enzima. Se incubaron a la temperatura y tiempo recomendado para cada enzima.

3.5.2. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos fueron diseñados usando el software Primer3 (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge) y sintetizados por IDT (Integrated DNA

Technologies, Bélgica). A continuación, se incluye una Tabla con los oligonucleótidos utilizados en este trabajo (Tabla 3). La finalidad de cada uno de ellos se describe en los correspondientes apartados. Las secuencias en negrita corresponden con secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción.

Tabla 3. Listado de oligonucleótidos

Oligo	Secuencia
1-F	AAGGCGTTAGTGAGCTTGA
1-R	GCAGCCTGCAGTCAAACATA
2-F	CTATAGGGCGAATTG GAGCTC TTGGAAAATGCCGAAATGATGCGGCTCGCTC
2-R	CCACTAGTTCTAGAG CGGGCCGC GGTGGAGAAGAAGTAGCAAAGCAGGGAATG
3-F	GTAATCATGGTCATAG GAATTC GGCCCTATGACCTCCCGAGTCCTGGTCGAG
3-R	GGTACCGGGCCCCC CTCGAG ACGAGCCGTTGCCGACACCGAGTGTGTTCC
4-F	GTTGGTTACCTCGCTGGTCCATGATTGC
4-R	CGATGCAATCAAATCCACGCACATGG
5-F	ATGCTCTCGAGTTCACGGGTATAAGAGC
5-R	AGCGGAAGAAGAATGATTGCAAGTTGAC
6-F	CAGTCATCGGGATACAAGAACAT
6-R	GGTGGATGGAAGAGGGATATAAT
7-F	CCGTTGAACCCCTCTGAAGAA
7-R	GTTGAGGACGACGGATTCAT
8-F	ACC GAATTC ATCAAATGGATAGGTCGGTAATG
8-R	CAC CTCGAG CAAGGAAGTCGAGTACGAGTCC
9-F	ACC GAGCTC GTAGCACTCGCTGTGTATCCTC
9-R	CCT GGATCC CTTATACCCAGGACATTCACAGTTC
10-F	GAGATTATACGCCTTGAGCTTCTC
10-R	CTACAAGAACAATGTGGACAACAAG
11-F	CGTCTGCAGCGAAACGACCAAGAAGATCACGG
11-R	CGAGAATTCGTGCTTAGCGACACCCGTGCCGC
12-F	CCTCAATCCTGGGAAGAAGTGGCCGCTGAT
12-R	GAGTCACCACATTTCCCAGCAACTTCCCCACT
13-F	CTTTACCGCCATCGAGAATTT
13-R	AGAATTCGGAAGACGACCTG
14-F	GGCTCGAGATCTACAAGACTG
14-R	GTAGTTGGACACGTTGGTGA
15-F	GCTGACAATCATCGTCAGGTTACCAGAAGCCCCTCGCGA
15-R	AGGAAGCTCAATCTTGAGATCCAACCTCCGGCTGCTCCTC
16-F	CGAG GAGCTC CTTACAAAAAAGGTATCC
16-R	TTCTGCAGCCCGGGGAT CTCA AGGAAGCTCAATCTTGAGATCCAACCTCC

Las dianas de restricción introducidas aparecen subrayadas y en negrita: 2-F y 16-F, *SacI*; 2-R, *NotI*; 3-F, *EcoRI*; 3-R, *XhoI*; 8-F, *SacI*; 8-R y 16-R, *BamHI*; 9-F, *EcoRI*; 9-R, *XhoI*; 16-R, *SmaI*; 16-R, *PstI* TCA: codón de stop.

3.5.3. Desfosforilación

La desfosforilación del extremo 5' de los plásmidos se hizo para evitar la recirculación y autoligación de vectores durante la ligación. Para ello se utilizó la enzima fosfatasa alcalina (TSAP) de Promega siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.5.4. Ligación

Para las ligaciones se utilizó el kit *DNA Ligation Kit Mighty Mix* (Takara) que contiene una única solución denominada *2X Ligation Mix*. La ligación de ambos fragmentos se realizó en una relación molar 1:7 (vector:inserto) en un volumen total de 7,5 μ L. A esta solución de ADN se añadió un volumen de la solución *2X Ligation Mix* (7,5 μ L). La mezcla fue incubada a 16 °C durante 30 min. Esta solución se usó directamente para transformar en *E. coli* como se describe en el Apartado 3.4.1.

3.5.5. Plásmidos para la delección de genes en *M. thermophila*

Para la eliminación o interrupción de genes que codifican las proteínas no deseadas se utilizó la estrategia de delección usando un casete de delección. Esta herramienta permite la reutilización del gen marcador en otros eventos de delección. Este método se basa en el intercambio del gen objeto de delección en el genoma por el fragmento que contiene el marcador *amdS* mediante recombinación homóloga con las regiones flanqueantes del gen a deleccionar (*rec 5'* y *3'*). Las secuencias REP permiten la escisión del marcador por recombinación homóloga entre ambas repeticiones. Esta estrategia se muestra en detalle en la Figura 15. Las construcciones genéticas para las delecciones de este trabajo se describen en los siguientes Apartados.

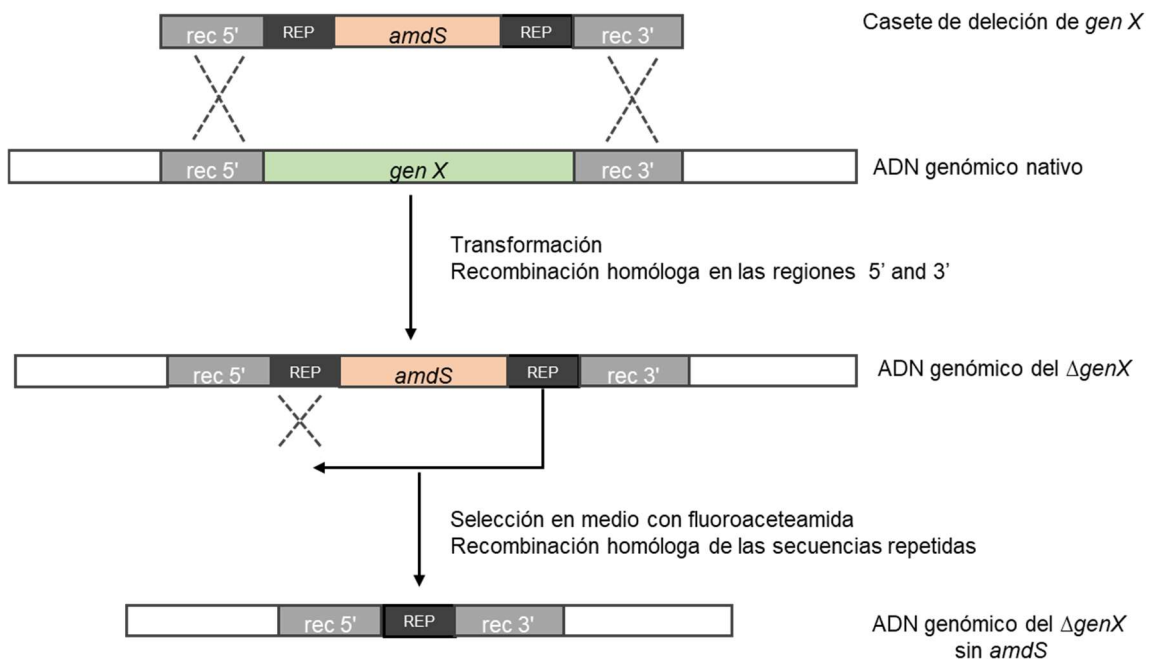


Figura 15. Esquema de la estrategia para deleccionar genes utilizando el gen marcador *amdS*. El fragmento de ADN lineal (casete de delección) para deleccionar el gen de interés (*genX*) contiene el gen *amdS* flanqueado por fragmentos de secuencias repetidas (REP) y las regiones de ADN

homólogas aguas arriba (rec 5') y aguas abajo (rec 3') del gen objeto de delección. Tras su introducción en células de *M. thermophila*, el casete de delección reemplaza el gen a deleccionar mediante recombinación homóloga con una frecuencia en torno al 1% de los transformantes. Los transformantes deleccionados se seleccionaron por crecimiento en un medio con acetamida como única fuente de carbono. Mediante selección en fluoroacetamida, se elimina el gen *amdS* mediante recombinación homóloga de las secuencias repetidas. Mediante este método se permite la delección secuencial de varios genes con el mismo marcador (*amdS*).

3.5.5.1. Vector para las construcciones de delección

La construcción del casete de delección implica varios pasos de clonación. El vector utilizado para generar las construcciones genéticas para delección de genes se denomina pBASE7 (Figura 16).

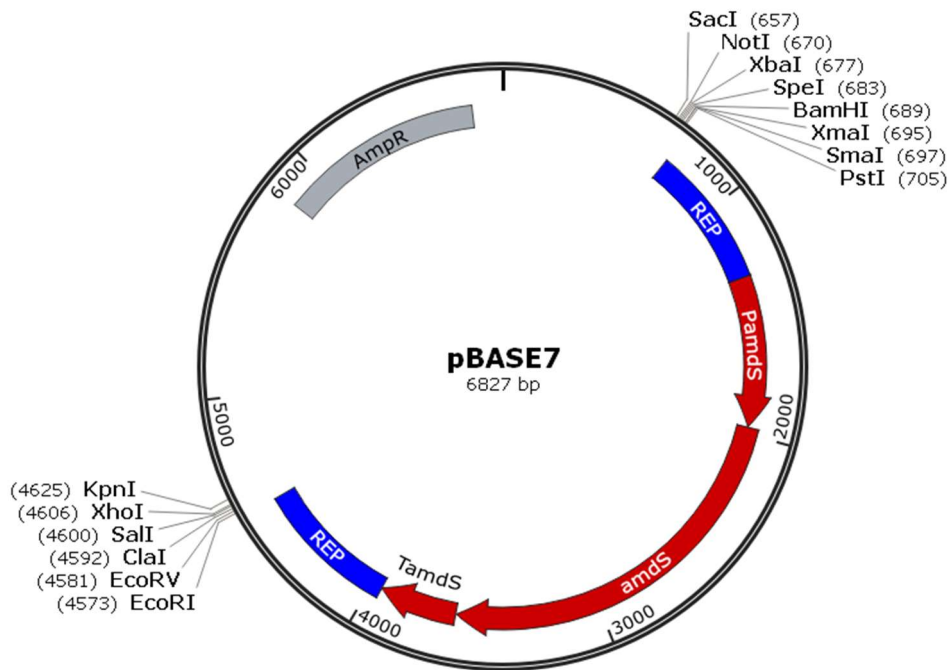


Figura 16. Esquema del plásmido pBASE7 utilizado como vector para las construcciones genéticas destinadas a deleccionar genes.

Este vector permite la clonación de los dos fragmentos de ADN aguas arriba y aguas abajo del gen candidato a deleccionar e incluye como marcador de selección el gen *amdS* que confiere capacidad de utilizar la acetamida como única fuente de nitrógeno. Este gen fue sintetizado previamente *in vitro* eliminando los puntos de corte de las principales enzimas de restricción. El marcador *amdS* además contiene su región promotora (P_{amdS}) y terminadora (T_{amdS}). A ambos lados del marcador de selección *amdS* se localizan dos regiones denominadas REP que son secuencias cortas repetidas de

592 pb correspondientes a un pequeño fragmento del gen *cbh1* y que permiten, una vez integrado el vector en el genoma, la eliminación del gen *amdS* mediante recombinación homóloga entre ambas.

3.5.5.2. Plásmido para la delección del gen quitinasa 2 (*chi2*)

La construcción genética utilizada con el fin de deleccionar el gen que codifica la quitinasa 2 se obtuvo a partir del vector pBASE7 (Apartado 3.5.5.1.). En este vector se clonaron los fragmentos aguas arriba y aguas abajo del gen *chi2*. El fragmento aguas arriba de este gen, denominado extremo 5', se amplificó por PCR a partir de ADN genómico de *M. thermophila* (obtenido como se describe en el Apartado 3.3.2.) con la ADN polimerasa *iProof High-Fidelity* (BioRad) usando los oligos 2-F y 2-R (Tabla 3) y las condiciones de amplificación que se indican en la Tabla 4. Estos oligos incluyen las secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción *SacI* y *NotI*. De la misma forma se amplificó el fragmento aguas abajo del gen *chi2*, denominado extremo 3', con los oligonucleótidos 3-F y 3-R (Tabla 3) con las mismas condiciones que para el extremo 5' (Tabla 4). Estos oligonucleótidos incluyen las secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI*.

Tabla 4. Condiciones de PCR para la amplificación del extremo 5' (fragmento aguas arriba del gen *chi2*) y del extremo 3' (fragmento aguas abajo del gen *chi2*).

Paso del ciclo	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	98°C	30 s	1
Desnaturalización	98°C	10 s	35 ciclos
Alineamiento	55°C	30 s	
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	10 min	1

Una vez amplificados estos fragmentos, se clonaron en el vector pBASE7. En primer lugar, el fragmento amplificado correspondiente al extremo 3' (situado aguas abajo del gen) se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI* y se ligó en el vector pBASE7 digiriendo previamente con las mismas enzimas de restricción y desfosforilando el vector como se describe en el Apartado 3.5.3. El producto de ligación se transformó en células electrocompetentes de *E. coli* XL1-Blue MRF'' tal y como se describe en el Apartado 3.4.1. Una vez obtenido este plásmido se continuó con la clonación del extremo 5' situado aguas arriba del gen *chi2*. Para ello, tanto el fragmento correspondiente como el plásmido donde previamente se había clonado el extremo 3' se digirieron con las enzimas de restricción *SacI* y *NotI* y se ligaron tal y como se detalla en el Apartado 3.5.4. La mezcla de ligación se transformó en células electrocompetentes de *E. coli* XL1-Blue MRF' como se describe en el Apartado 3.4.1. El plásmido obtenido fue el denominado pABC418 (Figura 17).

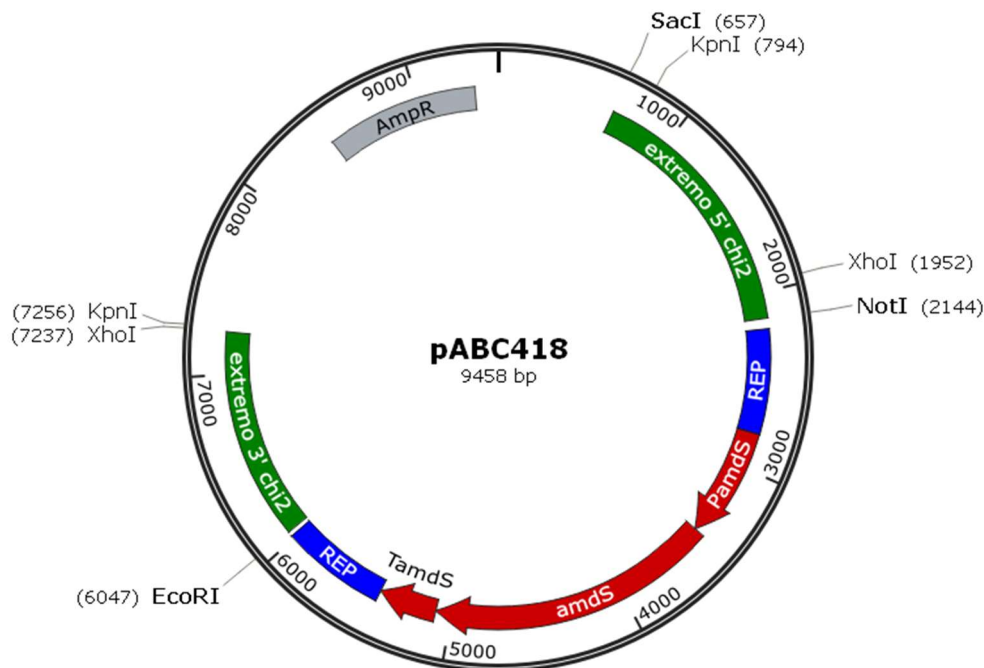


Figura 17. Esquema del plásmido pABC418 utilizado para deleccionar el gen quitinasa 2 (*chi2*).

Para transformar esta construcción en *M. thermophila*, este plásmido se digirió con la enzima de restricción *KpnI* con el fin de obtener el fragmento lineal correspondiente al casete de delección. El fragmento obtenido se purificó desde gel de agarosa al 0,8% como se indica en el Apartado 3.3.4.

3.5.5.3. Plásmido para la delección del gen endoglucanasa 6 (*eg6*)

La construcción genética utilizada con el fin de deleccionar el gen que codifica para la endoglucanasa 6 se obtuvo a partir del vector pBASE7 (Apartado 3.5.5.1.). En este vector se clonaron los fragmentos aguas arriba y aguas abajo del gen *eg6*. El fragmento aguas arriba, denominado extremo 5', se amplificó por PCR a partir de ADN genómico de *M. thermophila* (obtenido como se describe en el Apartado 3.3.2.) con la ADN polimerasa *iProof High-Fidelity* (BioRad) usando los oligos 8-F y 8-R (Tabla 3) y las condiciones de amplificación que se indican en la Tabla 5. Estos oligos incluyen las secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción *SacI* y *BamHI*. De la misma forma se amplificó el fragmento aguas abajo del gen *eg6*, denominado extremo 3', con los oligonucleótidos 9-F y 9-R (Tabla 3) con las condiciones que se indican en la Tabla 5. Estos oligonucleótidos incluyen las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI*.

Tabla 5. Condiciones de PCR para la amplificación del extremo 5' (fragmento aguas arriba del gen *eg6*) y del extremo 3' (fragmento aguas abajo del gen *eg6*).

Paso del ciclo	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	98°C	30 s	1
Desnaturalización	98°C	10 s	35 ciclos
Alineamiento	58°C	30 s	
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	10 min	1

Una vez amplificados estos fragmentos, se clonaron en el vector pBASE7. En primer lugar, el fragmento amplificado correspondiente al extremo 5' del gen (situado aguas abajo del mismo) se digirió con las enzimas de restricción *SacI* y *KpnI* y se clonó en el vector pBASE7 digiriendo previamente con las mismas enzimas de restricción. La mezcla de ligación se transformó en células electrocompetentes de *E. coli* XL1-Blue MRF' tal y como se describe en el Apartado 3.4.1.

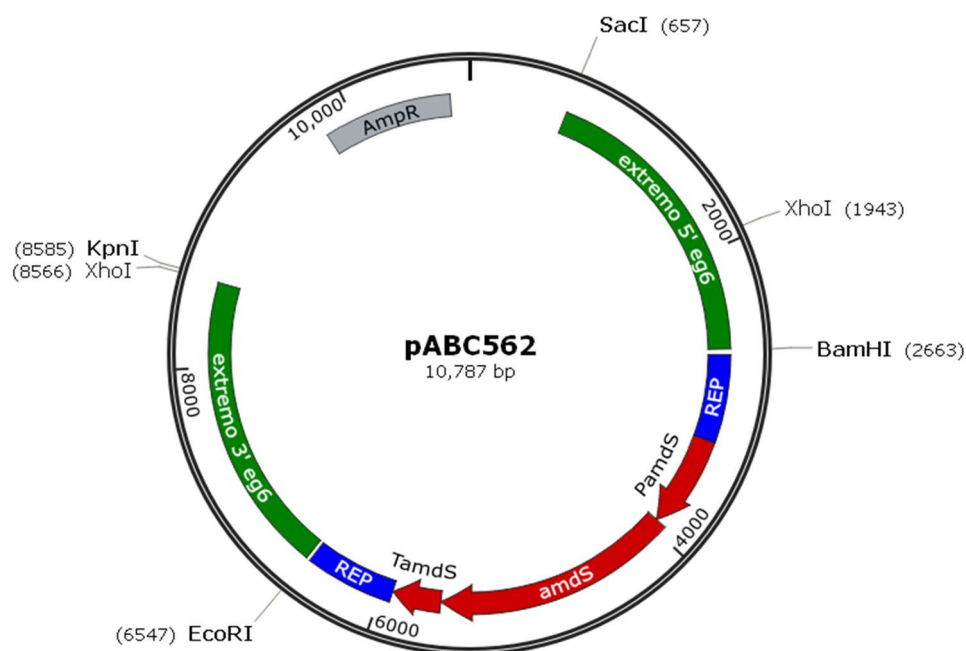


Figura 18. Esquema del plásmido pABC562 utilizado para la delección del gen *eg6*.

Una vez obtenido este plásmido se continuó clonando el extremo 3' situado aguas arriba del gen *eg6*. Para ello, tanto el fragmento correspondiente como el plásmido donde previamente se había clonado el extremo 5' se digirieron con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI* y se ligaron tal y como se describe en el Apartado 3.5.4. La mezcla de ligación se transformó en células electrocompetentes de *E. coli* XL1-Blue

MRF' como se describe en el Apartado 3.4.1. El plásmido obtenido fue el denominado pABC562 (Figura 18).

Para transformar en *M. thermophila*, este plásmido se digirió con las enzimas de restricción *SacI* y *KpnI* con el fin de obtener el fragmento lineal correspondiente al casete de delección. El fragmento obtenido se purificó desde gel de agarosa al 0,8% como se indica en el Apartado 3.3.4.

3.5.6. Plásmido para la generación de librerías de mutantes del gen β -glucosidasa 1 (*bgl1*)

La construcción genética utilizada para la generación de librerías de mutantes de *bgl1* se realizó como se detalla a continuación. La secuencia de nucleótidos de ADNc de *bgl1* de *M. thermophila* se sintetizó *in vitro* (GeneScript, NewJersey, EE. UU.) eliminando los intrones y las secuencias de reconocimiento de las principales enzimas de restricción, sin alterar la secuencia de aminoácidos. La secuencia codificante tiene una longitud de 2616 pb incluyendo el codón de terminación. La proteína codificada por esta secuencia tiene una longitud de 871 aminoácidos con una masa molecular prevista de 95 KDa. Usando el programa Signal IP (Petersen y col., 2011) se predijo un péptido señal de 19 residuos por lo que la proteína madura prevista contiene 852 aminoácidos con una masa molecular prevista de 93 KDa.

Para una correcta expresión, el gen *bgl1* se sintetizó *in vitro* bajo el promotor del gen de la celobiohidrolasa 1 (*cbh1*, número de registro en NCBI XP_003660789.1) de *M. thermophila* C1. Este casete (P_{cbh1} -*bgl1*) se sintetizó *in vitro* incluyendo la secuencia de las enzimas de restricción *SacI* (en el extremo 5') y *NotI* (en el extremo 3') para clonarlo en el vector de expresión denominado pBASE1 (Figura 19).

Este vector contenía la secuencia terminadora del gen de la celobiohidrolasa 1 de *M. thermophila* C1 (T_{cbh1} , correspondiente a una región de 1014 pb aguas abajo de *cbh1*) y el gen *pyr5* de la misma cepa como marcador de selección.

El casete P_{cbh1} -*bgl1* se digirió con las enzimas de restricción *SacI* y *NotI* y se clonó en pBASE1 digerido previamente con las mismas enzimas de restricción y desfosforilando el vector tal y como se describe en el Apartado 3.5.3. Ambos productos se ligaron tal y como se detalla en el Apartado 3.5.4. El producto de ligación se transformó en células electrocompetentes de *E. coli* XL1Blue MRF' como se describe en el Apartado 3.4.1. El plásmido recombinante obtenido se denominó pABC334 y se muestra en la Figura 20.

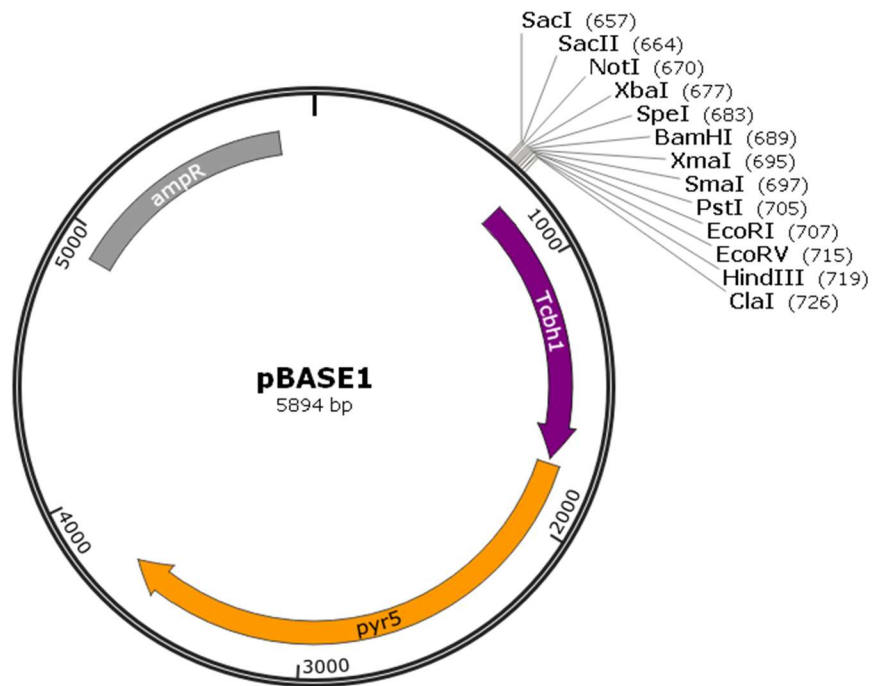


Figura 19. Esquema del vector de expresión pBASE1 utilizado para la clonación del casete P_{cbh1} -*bgl1*.

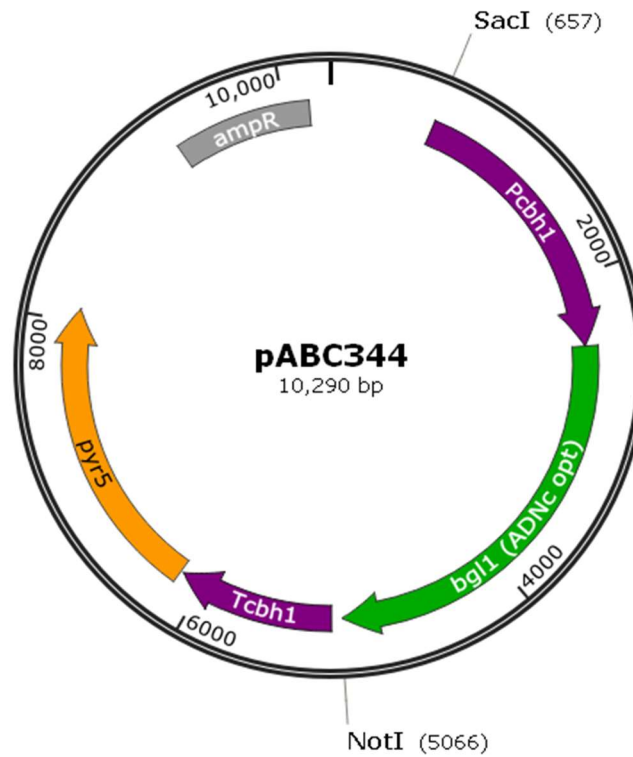


Figura 20. Esquema del plásmido pABC344 de expresión del ADNc de *bgl1* de *M. thermophila*.

3.6. Escrutinio y selección de las cepas delecionadas

Tras la transformación con los plásmidos de deleción en la cepa AB2 de *M. thermophila* C1, se seleccionaron transformantes capaces de crecer en medio con acetamida como única fuente de carbono como consecuencia de haber integrado en su genoma y expresado el marcador *amdS*. Estos transformantes se evaluaron genéticamente para identificar si la integración del casete de *amdS* se había producido en el lugar adecuado y había reemplazado el gen objeto de deleción. La mayoría de los fragmentos se integran por recombinación no homóloga en cualquier lugar del genoma y sólo en torno a un 1% lo hace por recombinación homóloga.

3.6.1. Escrutinio por PCR de transformantes delecionados *chi2*

Tras la transformación del casete de deleción de *chi2* (Apartado 3.5.5.2.) se seleccionaron aquellos transformantes que fueron capaces de crecer en medio con acetamida. Los transformantes seleccionados en este medio se analizaron genéticamente para comprobar la correcta sustitución del gen *chi2* por el casete de deleción mediante la recombinación homóloga entre las regiones 5' (rec 5') y 3' (rec 3') de dicho casete con las secuencias homólogas que flanquean el gen a deleccionar. Para ello se analizó el ADN genómico de cada transformante (obtenido como se describe en el Apartado 3.3.2.) y se confirmó la deleción mediante amplificación por PCR como se detalla a continuación:

- Para confirmar que la integración del casete de deleción se había producido en el lugar correcto del genoma sustituyendo el gen *chi2*, se analizaron mediante PCR las regiones aguas arriba y abajo de esa región. La región 5' y la región 3' se analizaron mediante las PCR 1 y PCR 2, respectivamente, con oligos que amplificaban desde las regiones flanqueantes de rec 5' y rec 3' hasta el gen *amdS* (Figura 21).
- La ausencia del gen *chi2* (amplificación negativa) se comprobó con los oligos que amplifican un fragmento interno de este gen mediante la PCR 3 como se indica en la Figura 21.

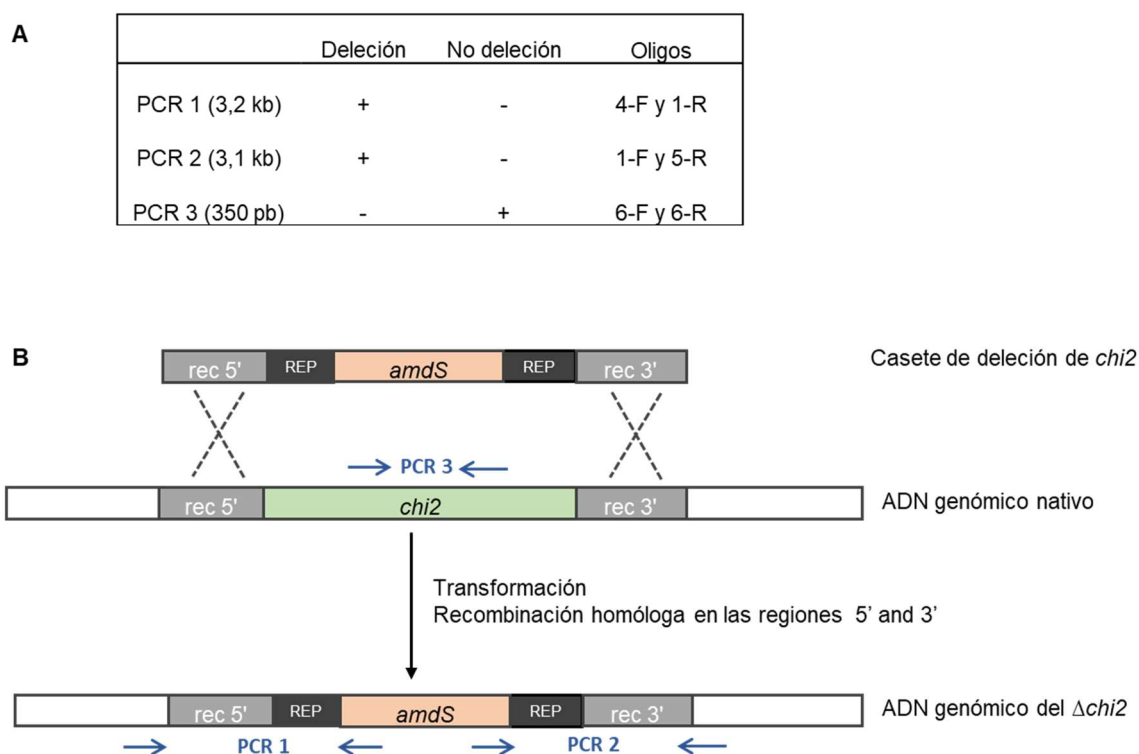


Figura 21. Esquema del análisis por PCR para verificar el reemplazo del gen *chi2* por el casete de delección conteniendo el marcador *amdS*. A) Resultados esperados para las distintas PCR en la selección de transformantes delecionados donde se indica el tamaño esperado de los fragmentos y la amplificación positiva (+) o negativa (-) esperada, además de los oligos usados en cada caso: 4-F y 1-R para PCR 1, 1-F y 5-R para PCR 2, 6-F y 6-R para PCR 3 (información de oligos en Tabla 3). B) Esquema del proceso de delección mediante la integración del casete que alberga el marcador de selección *amdS* en el lugar del gen *chi2* en el ADN genómico (ADNg) de AB2. Esto se produce gracias a la recombinación homóloga de *rec 5'* y *rec 3'*, regiones flanqueantes 5' y 3' del gen *chi2*. Las flechas horizontales delimitan la región que ha de ser amplificada, los sitios de apareamiento y la orientación de los oligos utilizados para cada PCR.

Para las distintas PCR se utilizó la polimerasa GoTaq (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las condiciones de amplificación fueron las indicadas en la Tabla 6 (PCR1 y PCR2) y Tabla 7 (PCR3).

Tabla 6. Condiciones de PCR1 y PCR2 para la amplificación del extremo 5' y 3' en la delección del gen *chi2*.

Paso del ciclo	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	30 s	30 ciclos
Alineamiento	58°C	30 s	
Extensión	72°C	3 min	
Extensión final	72°C	10 min	1

Tabla 7. Condiciones de PCR3 para la amplificación del fragmento interno del gen *chi2*.

Paso del ciclo	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	30 s	30 ciclos
Alineamiento	62°C	30 s	
Extensión	72°C	30 s	
Extensión final	72°C	10 min	1

La calidad del ADN genómico extraído siempre se verificó mediante una PCR utilizando oligos internos del gen de actina con los oligos 7F y 7R que amplifican un fragmento de aproximadamente 350 pb en las condiciones que se indican en la Tabla 8.

Tabla 8. Condiciones de PCR para la amplificación del fragmento interno del gen de γ - actina (control de correcta extracción de ADN genómico).

Paso del ciclo	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	30 s	30 ciclos
Alineamiento	55°C	30 s	
Extensión	72°C	30 s	
Extensión final	72°C	10 min	1

3.6.2. Escrutinio por PCR de transformantes delecionados *eg6*

Tras la transformación del casete de deleción de *eg6* (Apartado 3.5.5.3.) se seleccionaron aquellos transformantes que fueron capaces de crecer en medio con acetamida. Los transformantes seleccionados en este medio se analizaron genéticamente para comprobar la correcta sustitución del gen *eg6* por el casete de deleción, que contiene el marcador de selección *amdS*, mediante la recombinación homóloga de los extremos 5' (rec 5') y 3' (rec 3'), secuencias que flanquean el gen a deleccionar. Para ello se analizó el ADN genómico de cada transformante mediante PCR (obtenido como se describe en el Apartado 3.3.2.) y se confirmó la deleción mediante amplificación por PCR como se detalla a continuación:

- Para confirmar que la integración del casete de deleción se había producido en el lugar correcto del genoma sustituyendo el gen *eg6*, se analizaron mediante PCR las regiones aguas arriba y abajo de esa región. La región 5' y la región 3' se analizaron mediante las PCR 1 y PCR 2, respectivamente, con oligos que amplificaban desde las regiones flanqueantes de rec 5' y rec 3' hasta el gen *amdS* (Figura 22).

- La ausencia del gen *eg6* (amplificación negativa) se comprobó con los oligos que amplifican un fragmento interno de este gen mediante la PCR 3 también indicado en la Figura 22.

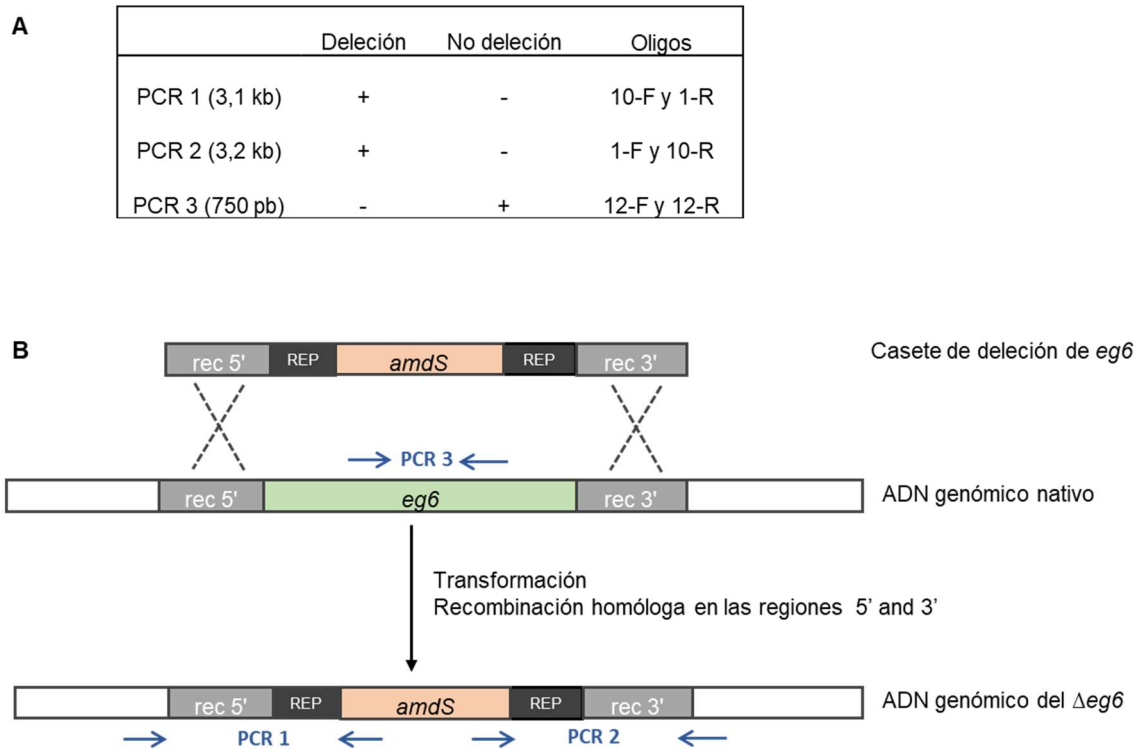


Figura 22. Esquema del análisis genético para verificar el reemplazo del gen *eg6* por el casete de delección con *amdS*. A) Resultados esperados para las distintas PCR en la selección de transformantes delecionados donde se indica el tamaño esperado de los fragmentos y la amplificación positiva (+) o negativa (-) esperada además de los oligos usados en cada caso: 10-F y 1-R para PCR 1, 1-F y 10-R para PCR 2, 12-F y 12-R para PCR 3 (información en Tabla 3). B) Esquema del proceso de delección mediante la integración del casete, que alberga el marcador de selección *amdS*, en el lugar del gen *eg6* en el ADN genómico (ADNg) de *M. thermophila*. Esto se produce gracias a la recombinación homóloga de *rec 5'* y *rec 3'*, regiones flanqueantes 5' y 3' del gen *eg6*. Las flechas horizontales delimitan la región que ha de ser amplificada, los sitios de apareamiento y la orientación de los oligos utilizados para cada PCR.

Para las distintas PCR se utilizó la polimerasa GoTaq (Promega) conforme a las recomendaciones del fabricante de esta polimerasa. Las condiciones de amplificación fueron las indicadas en las Tabla 9.

Tabla 9. PCR 1. Condiciones de PCR para la amplificación del extremo 5' en la deleción del gen *eg6*.

Paso del ciclo	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	30 s	30 ciclos
Alineamiento	55°C	30 s	
Extensión	72°C	3,5 min	
Extensión final	72°C	10 min	1

La calidad del ADN genómico extraído siempre se verificó mediante una PCR utilizando oligos internos del gen de actina como se indica en el Apartado 3.6.1.

3.7. Eliminación del marcador

El gen marcador *amdS* fue el utilizado en este trabajo para discriminar entre células con el gen de interés delecionado o no. La ventaja del uso de este marcador es la posibilidad de eliminación y reutilización de éste en nuevas rondas de deleción en la misma cepa, reduciendo la necesidad de usar diversos marcadores de selección. La eliminación del marcador se produce gracias a la recombinación natural entre las dos repeticiones directas que flanquean el gen marcador en el casete de deleción (ver Figura 23).

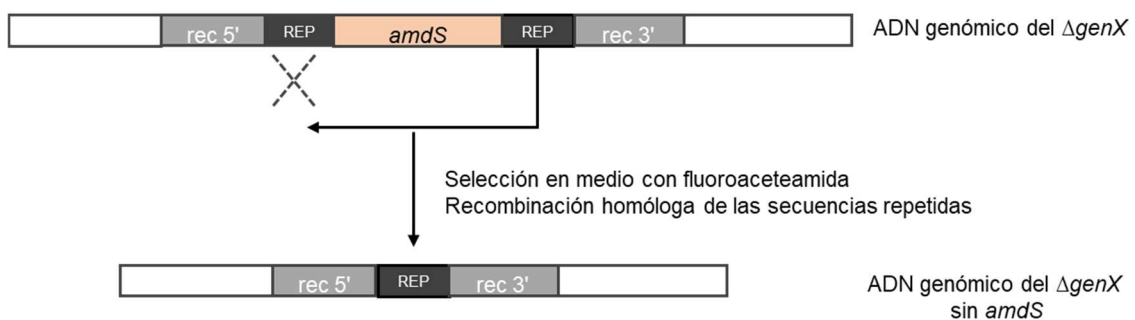


Figura 23. Representación esquemática del proceso de eliminación del marcador *amdS*. Mediante selección en fluoroacetamida, se seleccionan los clones que han perdido el gen *amdS* mediante recombinación homóloga de las secuencias repetidas REP. Gracias a este método es posible delecionar varios genes de forma consecutiva usando el mismo marcador de selección.

Para eliminar el gen *amdS* se utilizó el método de contraselección con fluoroacetamida (Debets, A. J. y col., 1990). Las células que contienen el gen *amdS* son capaces de hidrolizar fluoroacetamida para utilizarla como fuente de nitrógeno. Como resultado de esta hidrólisis se libera fluoracetato que impide el crecimiento ya que es un

compuesto tóxico para la célula. En contraposición, las células carentes del gen *amdS* son incapaces de hidrolizar la fluoroacetamida y, por tanto, son capaces de crecer ya que no generan el compuesto tóxico fluoracetato. Para permitir el crecimiento de las colonias carentes de *amdS*, el medio se suplementó con urea en baja concentración como fuente alternativa de nitrógeno.

Para el proceso de eliminación del marcador *amdS* en un transformante delecionado se partió de colonias aisladas y puras obtenidas como se indica en el Apartado 3.9.1. Se inocularon 20 colonias de este transformante en placas de medio con fluoroacetamida y, en paralelo, en placas de medio con acetamida. Como control, en cada placa se incluyó una cepa conteniendo el gen *amdS* y una cepa que no. Se incubaron las placas a 35 °C durante 4-5 días.

Una vez seleccionados los clones que crecían en presencia de fluoroacetamida y no en presencia de acetamida, se confirmó la pérdida del gen marcador *amdS* mediante test nutricional y PCR.

- El test nutricional consistió en confirmar que dichos clones eran incapaces de crecer en acetamida como única fuente de nitrógeno y que sí lo hacían en medio con fluoroacetamida.
- El test por PCR comprueba la ausencia del gen *amdS* mediante amplificación. Para ello se utilizó la polimerasa GoTaq (Promega) con la reacción estándar de la polimerasa. Para la PCR 1 se utilizaron los oligos 11-F y 11-R que amplifican el casete REP-*amdS*-REP de aproximadamente 3,8 Kb en el caso de la presencia del casete y de aproximadamente 1 kb en el caso de su ausencia (condiciones de PCR en Tabla 10). Para la PCR 2 se utilizaron los oligos 12-F y 12-R que amplifican un fragmento interno del gen *amdS* de aproximadamente 500 pb y que no amplifica en caso de ausencia del gen (condiciones de PCR en Tabla 10).

Tabla 10. Condiciones de PCR1 para la amplificación del casete REP-*amdS*-REP y condiciones de PCR2 para la amplificación del fragmento interno del gen *amdS*.

Paso del ciclo	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	30 s	30 ciclos
Alineamiento	55°C	30 s	
Extensión	72°C	4 min	
Extensión final	72°C	10 min	1

3.8. Construcción de librerías de mutantes de *bgl1*

Con el objetivo de la mejora genética de la enzima Bgl1 de *M. thermophila* C1, se generó una librería de mutantes del gen *bgl1* mediante mutagénesis al azar. La técnica utilizada fue la introducción de mutaciones puntuales al azar en la secuencia del gen mediante PCR propensa a error.

El gen *bgl1* clonado en pABC344 (Apartado 3.5.6.) se sometió a mutagénesis al azar mediante amplificación con PCR usando el kit de mutagénesis *GeneMorph II EZClone Domain mutagenesis Kit* (Agilent Technologies Inc.). La amplificación mutagénica se realizó usando los oligos 15-F y 15-R (Tabla 3). Estos oligonucleótidos amplifican un fragmento de 2553 pb correspondiente a la secuencia del gen *bgl1* excluyendo el péptido señal y el codón de terminación.

El sistema *GeneMorph II EZClone Domain Mutagenesis* usa la técnica de mutagénesis al azar mediante PCR propensa a errores que permite obtener diferentes tasas de mutación ajustando la cantidad de ADN molde (el plásmido pABC344) y los ciclos de amplificación usados durante el proceso. Con estas pautas se generaron dos librerías de mutantes diferentes: la primera con un rango de frecuencia de mutación entre 0-1 mutaciones/kb (Librería A) y la segunda con un rango de frecuencia de mutación entre 1-4,5 mutaciones/kb (Librería B). La cantidad de ADN molde inicial fue 2 µg y 0,8 µg de pABC344 respectivamente para cada librería. Las condiciones para la reacción de amplificación fueron las indicadas en la Tabla 11.

Tabla 11. Condiciones de la PCR propensa a errores para generar las versiones mutadas de *bgl1*.

Paso del ciclo	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	30 s	30 ciclos
Alineamiento	57°C	30 s	
Extensión	72°C	3 min	
Extensión final	72°C	10 min	1

Los productos de PCR correspondientes a versiones mutadas de *bgl1* se purificaron desde gel de agarosa como se describe en el Apartado 3.3.4. y se usaron a su vez como oligonucleótidos (denominados megacebadores) en una segunda PCR para amplificar el plásmido pABC344 completo usando las condiciones que se indican en la Tabla 12.

Tabla 12. Condiciones de PCR para la amplificación del plásmido pABC344 completo utilizando como oligonucleótidos las versiones mutadas del gen *bgl1*.

Paso del ciclo	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	1 min	1
Desnaturalización	95°C	50 s	25 ciclos
Alineamiento	60°C	50 s	
Extensión	68°C	20,5 min	

Tras la reacción de amplificación, conviven versiones del plásmido original, usado como molde y la librería de mutantes obtenida. Para eliminar cualquier resto de plásmido original de la mezcla, se realizó una digestión con *DpnI* (10 U/ μ L) durante 2 horas a 37 °C. Esta enzima *DpnI* se caracteriza porque solo reconoce ADN metilado. El ADN utilizado como molde en esta reacción está metilado, ya que fue obtenido directamente de *E. coli*, mientras que las versiones mutadas, obtenidas in vitro por amplificación mediante PCR, no lo están. Por tanto, solo los plásmidos amplificados durante esta segunda reacción de PCR permanecen tras la digestión con esta enzima de restricción. En la Figura 24 se resumen los pasos principales del proceso descrito para la generación de librerías de mutantes mediante mutagénesis al azar.

Ambas librerías de mutantes se transformaron en células ultracompetentes *E. coli* XL-10 Gold, tal y como se indica en el Apartado 3.4.1., consiguiendo un tamaño de 150.000 colonias para la librería A y 170.000 colonias para la librería B (Tabla 13). Estas colonias se conservaron en viales con glicerol al 20% a una densidad de 6000 colonias/mL para la posterior obtención del ADN plasmídico. El número real de mutaciones por gen obtenido para cada librería se comprobó mediante secuenciación de una muestra de clones representativa de cada una. En concreto, para la librería A se obtuvo un rango de 0 a 2 mutaciones por gen y de 1 a 6 mutaciones por gen para la librería B. Estos valores representan el rango de frecuencia promedio para todos los clones.

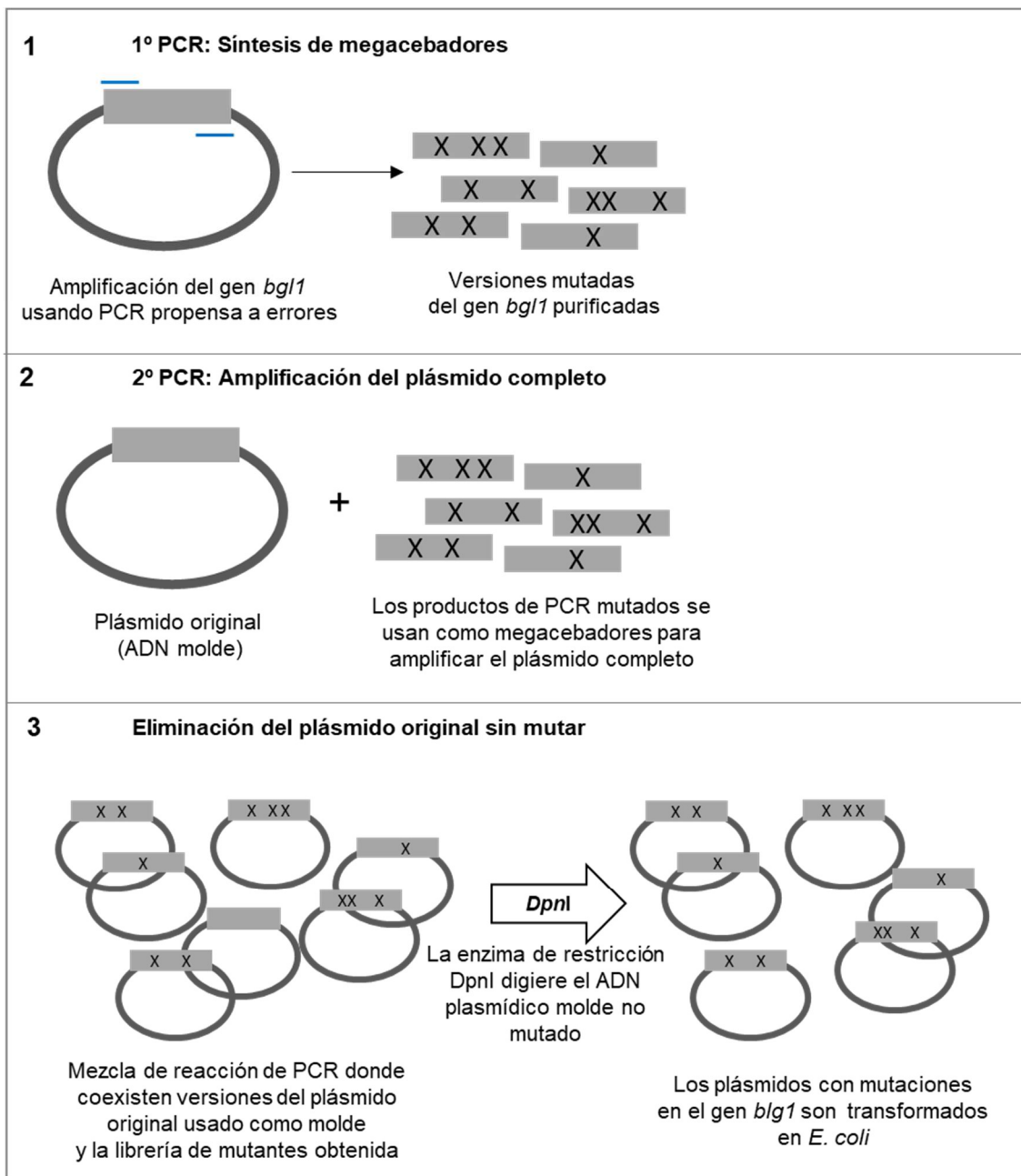


Figura 24. Esquema del proceso seguido para la generación de los bancos de mutantes mediante mutagénesis al azar.

Tabla 13. Características de las librerías de mutantes

Librería	ADN molde por reacción (µg)	Frecuencia de mutación por Kb (teórica)*	Frecuencia de mutación por gen (real)	Eficiencia total (colonias/reacción)
Librería A	2	0 - 1	0 - 2	150.000
Librería B	0,8	1 - 4,5	1- 6	170.000

* Rango de frecuencia promedio de mutación deseada

3.9. Purificación y conservación de esporas de *M. thermophila*

Para facilitar el aislamiento de clones puros en los procesos de selección y el rescate del marcador se realizó la purificación de esporas como se detalla en el Apartado 3.9.1. Para su conservación se procedió como se indica en el apartado 3.9.2.

3.9.1. Purificación de esporas

Para la purificación de esporas las cepas se dejaron crecer y esporular en placas de medio definido durante 4-6 días a 35 °C, con suplemento de uracilo y uridina en los casos de cepas auxótrofas. Transcurridos esos días se recogieron las esporas añadiendo 3 mL de NaCl 0,9% sobre cada placa y reuniéndolas con ayuda de un asa de siembra Digrafsky. Seguidamente, se filtró el volumen recogido usando una jeringa estéril con algodón, a modo de filtro, para obtener una suspensión de esporas libre de restos de micelio. Se sembraron diferentes diluciones (de 10^{-3} a 10^{-7}) de las esporas recuperadas y se plaquearon en el medio de selección adecuado con el fin de obtener colonias aisladas para cuantificar la viabilidad y comprobar la ausencia de contaminación de la suspensión.

3.9.2. Obtención y conservación de esporas

Para la obtención y conservación de esporas de *M. thermophila* se sembraron las cepas de interés en medio de esporulación con suplemento de uracilo y uridina en los casos de cepas auxótrofas. Si el material de partida son esporas congeladas, se deben descongelar previamente en hielo y sembrar 200 μ L por placa. Tras la incubación a 35 °C durante 7-10 días, se obtiene un crecimiento en césped de color blanquecino o parduzco. Las esporas se recogieron añadiendo 3 mL de solución NaCl 0,9% + glicerol 20% a cada placa y rascando con un asa de siembra Digrafsky procurando no levantar partículas de micelio. Se recolectaron las esporas en un tubo Falcon estéril mezclando adecuadamente. El volumen total recogido se repartió en alícuotas de 1 mL en crioviales de conservación de 2 mL. Por último, se congelaron y almacenaron en el ultracongelador de -80°C.

Para comprobar la viabilidad y la pureza (ausencia de contaminación) de las esporas recolectadas se realizó un test de viabilidad y un test de pureza.

3.9.2.1. Test de viabilidad de esporas

Se prepararon diluciones seriadas en un volumen final de 1 mL de solución NaCl 0,9% a partir del stock de esporas a analizar. Se sembraron 100 μ L de las diluciones 10^{-3}

10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} en placas con medio de esporulación, con suplemento de uracilo y uridina en los casos de cepas auxótrofas. Se incubaron a 35 °C durante 5-6 días hasta la aparición de colonias aisladas. El cálculo del número de viables se hizo de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Nº viables (cfu / mL)} = (\text{nº de colonias} * \text{FD}) / \text{V (mL)}$$

FD= factor de dilución

V= volumen plaqueado (en mL)

El número de esporas viables debe de estar entre 10^7 y 10^8 cfu/mL.

3.9.2.2. Test de pureza de esporas

Se sembraron 100 µL de la suspensión de esporas y de las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} en placas de TSA (30 g/L TSB, Trypticase Soy Broth, Merck, 15 g/L agar) y se incubaron a 37°C durante 1-3 días. Se revisaron las placas cada 24 horas para descartar la presencia de colonias contaminantes (bacterias y/o levaduras).

3.10. Producción del cóctel enzimático

La producción del cóctel enzimático de *M. thermophila* se puede realizar a distintas escalas, microplaca o matraz, obteniendo distintas concentraciones de este. Para ello se optimizaron las condiciones de producción a partir de lo descrito en Verdoes y col., 2007 y Visser y col., 2011, usando el desarrollo llevado a cabo por la plataforma industrial para enzimas industriales de *M. thermophila* C1 por Dyadic Netherlands. La producción para cada caso se detalla en los siguientes apartados.

3.10.1. Fermentación en microplaca

La producción de cóctel enzimático a escala microplaca se realizó según lo descrito en la patente Emalfarb y col., 2014 y se realizó en dos etapas o fases de cultivo: fase de crecimiento y fase de producción.

- Fase de crecimiento: se transfirieron colonias aisladas de transformantes de *M. thermophila* a microplacas estériles de 96 pocillos (una colonia por pocillo) conteniendo 220 µL de medio de crecimiento en cada pocillo. Las microplacas se incubaron a 35 °C y 800 rpm durante 72 h. Para minimizar la evaporación del medio de cultivo durante la incubación de las placas, los pocillos del borde de la

placa no se inocularon y las placas se introdujeron en bolsas de plástico auto-sellables.

- Fase de producción: de los cultivos de crecimiento obtenidos de acuerdo con lo descrito anteriormente se transfirieron 5 μ L de cada pocillo a microplacas nuevas estériles conteniendo 220 μ L de medio de producción en cada pocillo. Para asegurar una transferencia homogénea de los inóculos se resuspendieron bien las muestras pipeteando varias veces arriba y abajo. Al igual que en la fase de crecimiento, los pocillos del borde de la placa no se inocularon y las placas se introdujeron en bolsas de plástico auto-sellables. Éstas se incubaron a 35 °C y 800 rpm durante 96 h. Transcurrido ese tiempo, las placas se centrifugaron a 4° C durante 10 min y 1800 g y se recuperó el sobrenadante (aprox. 100 μ L) que contiene el cóctel enzimático producido.

3.10.2. Fermentación en matraz

La producción de cóctel enzimático a escala matraz, al igual que en microplaca, se realizó en dos etapas o fases de cultivo: fase de crecimiento y fase de producción. Igualmente se llevó a cabo en dos etapas con modificaciones del protocolo establecido en la patente Emalfarb y col., 2006.

- Fase de crecimiento: se partió de 100 μ L de una solución de esporas o de una colonia crecida en placa para inocular un matraz de 100 mL que contiene 20 mL de medio de crecimiento. Se incubó durante 48 horas a 35 °C y 250 rpm hasta que el cultivo adquirió un aspecto de compota.
- Fase de producción: transcurrido ese tiempo, se inocularon 2 mL del cultivo obtenido de acuerdo con lo descrito anteriormente en un matraz de 250 mL que contenía 40 mL de medio de producción. Este paso se realizó utilizando una pipeta de 1 mL de capacidad con puntas cortadas y esterilizadas. Previamente, se homogeneizó con esta pipeta el cultivo para asegurar que se inoculaba la misma cantidad en todos los matraces. Estos matraces se incubaron a 35 °C y 250 rpm durante 5 días. El coctel enzimático se obtuvo recuperando el sobrenadante tras centrifugación a 2500 rpm durante 10 min.

3.11. Cuantificación de proteína y análisis del cóctel enzimático

El cóctel enzimático se encuentra en el sobrenadante de las producciones tanto a escala microplaca como matraz (Apartado 3.10.) puesto que todas las enzimas de interés son secretadas al medio. Los métodos utilizados para cuantificar la

concentración de proteínas y su análisis mediante SDS-PAGE se describen a continuación.

3.11.1. Cuantificación de la concentración de proteínas

La determinación de la concentración proteica se llevó a cabo mediante el uso del kit *BCA* (Applichem) y el kit *Compat-Able Protein Assay Preparation Reagent Set* (Thermo Scientific) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

3.11.2. Análisis de proteínas mediante SDS-PAGE

La electroforesis en condiciones desnaturizantes se realizó en geles de poliacrilamida MiniProtean (BioRad) al 7,5% o 12% en presencia de SDS (250 mM Tris-HCl, 930 mM glicina, 1% SDS). Las muestras se mezclaron con tampón de carga 4X (0,5 M Tris-HCl pH 6.8, 5% β -mercaptoetanol, 2% SDS, 20% v/v Glicerol, 0,02% Azul de bromofenol) y fueron hervidas a 100 °C durante 5 min para la completa desnaturización de las proteínas. Se aplicó un amperaje de 20 mA por gel durante 50 minutos a temperatura ambiente. La tinción se desarrolló sumergiendo el gel en Coomassie Brilliant Blue (1% Coomassie Brilliant Blue, 20% etanol y 10% ácido acético glacial) durante 30 minutos en agitación suave. Para desteñir se utilizó una solución con 20% de etanol y 10% de ácido acético glacial durante aproximadamente 2 horas hasta la completa visualización de las bandas.

3.11.3. Electroforesis bidimensional de proteínas

La electroforesis bidimensional es una técnica capaz de separar proteínas de mezclas procedentes de muestras biológicas en dos dimensiones ortogonales, obteniendo un patrón que permite identificarlas y comparar diferentes condiciones de producción o cepas. Para ello se realizan dos separaciones sucesivas. En la primera las proteínas se separan en función de sus puntos isoeléctricos mediante isoelectroenfoque y, posteriormente, estas proteínas separadas por carga se separan en función de su tamaño girando 90° el campo de separación

3.11.3.1. Primera dimensión: Isoelectroenfoque (IEF)

El isoelectroenfoque permite separar las proteínas en función de su punto isoeléctrico al someterlas a la acción de un campo eléctrico en un gradiente de pH estabilizado físicamente en un gel de acrilamida.

En primer lugar, las muestras se dializaron con tampón fosfato sódico 10 mM pH 7.0 y se concentraron con centricones de 10 kDa (Vivaspin 20, Sartorius) con el fin de reducir el contenido de sales y otras impurezas.

Para las muestras de cóctel se cargaron 100 µg más 125 µL de tampón de rehidratación (Urea 8 M, DTT 7,7 g/L, CHAPS 40 g/L, anfolitos BioLyte® 3/10 100x, azul de bromofenol 0,002%). La mezcla se introdujo en una de las calles del sistema PROTEAN® I12™ IEF (Bio-Rad) donde se colocó a continuación una tira ReadyStrip™ de IPG (Bio-Rad) de 7 cm con pH 4-7. Para evitar la evaporación se añadieron 4 mL de aceite mineral y se colocaron unos peines a ambos lados de las tiras para evitar el movimiento. Para favorecer la absorción de las proteínas de mayor peso molecular se llevó a cabo una rehidratación de la tira activa. Para ello se pasó un voltaje suave de 50 V durante 12h a temperatura ambiente. A continuación, se comenzó el IEF donde se utilizó un gradiente con un rango de pH de 4 a 7.

3.11.3.2. Equilibrado de tiras

Una vez transcurrido el IEF se procedió al equilibrado de las tiras de IPG para reducir y alquilar todo puente disulfuro que pueda quedar oxidado y sustituir los detergentes no-iónicos por SDS para que la segunda dimensión pueda tener lugar. Para ello se colocó la tira en el soporte para tal fin de Biorad y se sumergió dicha tira en 2,5 mL de la solución de equilibrado I (Urea 6 M, SDS 0,4%, Glicerol 20%, TrisHCl 250 mM pH 8.8, DTT 20 g/L) durante 10 minutos. A continuación, se descartó la solución de equilibrado I y se sumergió la tira en 2,5 mL de solución de equilibrado II (Urea 6 M, SDS 0,4%, Glicerol 20% (v/v), TrisHCl 250 mM pH 8.8, Iodoacetamida 25 g/L) durante 10 minutos. Por último, se realizó un lavado de la tira en tampón de electroforesis con SDS durante 10 minutos.

3.11.3.3. Segunda dimensión: Electroforesis (SDS-PAGE)

En la segunda dimensión se separan las proteínas en base a su masa molecular mediante electroforesis en gel SDS-PAGE. Esta se realizó tras el equilibrado de las tiras utilizando geles de acrilamida Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels for 2-D Electrophoresis (Biorad). Se cargaron 8 µL de marcador Broad-Range SDS-PAGE Standards aplicados en un papel de filtro Whatman e insertado en el pocillo. Para sellar el pocillo se utilizó una solución de agarosa al 0,8% con azul de bromofenol para visualizar el frente. Se aplicó un amperaje de 20 mA por gel durante aproximadamente 50 minutos a temperatura ambiente.

3.11.3.4. Tinción

La tinción se llevó a cabo sumergiendo el gel en Coomassie Brilliant Blue (Coomassie Brilliant Blue 1%, etanol 20% y ácido acético glacial 10%) durante 30 minutos en agitación suave en un agitador orbital (Multriton II). Para desteñir se utilizó una solución de decoloración (etanol 20% y ácido acético glacial 10%) durante aproximadamente 2 horas hasta la completa visualización de las bandas.

3.12. Hidrólisis enzimática

La biomasa lignocelulósica utilizada para las hidrólisis enzimáticas fue rastrojo de maíz pretratado (*pretreated corn stover*, PCS) procedente de la planta piloto de Abengoa Bioenergy de York (Nebraska, USA). Este material fue obtenido mediante pretratamiento de la biomasa molida mediante ácido sulfúrico diluido y explosión con vapor, siguiendo el procedimiento descrito por Alcántara y col., 2016.

3.12.1. Hidrólisis enzimática de producciones a escala microplaca

Para el análisis de la liberación de azúcares fermentables de *M. thermophila* C1 a escala microplaca se llevó a cabo una hidrólisis de biomasa, también denominada sacarificación, utilizando el cóctel enzimático producido por la cepa en cuestión (obtenido como se indica en el Apartado 3.10.1.). Como sustrato para esta hidrólisis se empleó biomasa pretratada de maíz, PCS.

Con objeto de su uso en la hidrólisis, la biomasa fue neutralizada con NaOH 2 M ajustándose a un pH de 5.5, se congeló y se liofilizó durante 48 h en un liofilizador LyoQuest (Telstar). Tras este tiempo la biomasa se molió con un tamaño de partícula de 250 μm y los sólidos totales de la biomasa se analizaron mediante una balanza de humedad (Sartorius MA35). Para el proceso de hidrólisis enzimática se suspendió la biomasa molida a una concentración final de 100 g/L en tampón citrato sódico (0,1 M citrato sódico, 0,052% Azida sódica a pH 5,0 ajustado con NaOH 2M) en un agitador magnético durante 30 minutos, se ajustó el pH a 5.0 y se mantuvo en agitación otros 30 minutos adicionales.

Para el proceso de hidrólisis enzimática se transfirieron 25 μL de las muestras del cóctel enzimático a ensayar a microplacas estériles de 96 pocillos conteniendo 75 μL de la suspensión de biomasa preparada de acuerdo con el apartado anterior. Las microplacas se incubaron a 50 °C y 850 rpm durante 72 h en un incubador orbital (Multriton II). Para minimizar la evaporación de la mezcla durante la incubación de las

placas, los pocillos del borde de la placa no se utilizaron. Las placas se cubrieron con láminas adhesivas de aluminio (Adhesive Foil for 96 Well Plate, VWR) y se introdujeron en bolsas de plástico auto-sellables. Transcurrido el periodo de incubación se transfirió la mezcla de sacarificación a microplacas con filtro (AcroPrep 96 Filter Plate 0,45 μm GHP, Pall-Life Science) y se centrifugaron 1 min a 1800 g y 4 °C. El sobrenadante obtenido, que contenía los azúcares liberados tras el proceso de sacarificación, se utilizó para determinar la concentración de glucosa de cada muestra por el método GOPOD.

3.12.1.1. Determinación de la concentración de glucosa por el método de la glucosa oxidasa/peroxidasa

Para la determinación de la concentración de glucosa en disoluciones en microplaca se siguió el método colorimétrico de la glucosa oxidasa/peroxidasa con el kit GOPOD (Megazyme). Para ello se mezclaron en cada pocillo de una microplaca 280 μL de reactivo GOPOD y 20 μL del sobrenadante obtenido tras el proceso de sacarificación en microplaca (Apartado 3.12.1). Como control se utilizaron las muestras de referencia patrón de glucosa 0,25 g/L y 0,5 g/L suministradas con el kit. Estas placas se incubaron durante 20 min a 50 °C y se leyó la absorbancia a 510 nm. El cálculo de la concentración de glucosa se calculó por interpolación de la absorbancia de los estándares de glucosa.

3.12.2. **Hidrólisis enzimática de producciones a escala matraz**

Para el análisis de la liberación de azúcares fermentables de *M. thermophila* C1 a escala matraz se llevó a cabo una hidrólisis de biomasa utilizando el cóctel enzimático producido por la cepa en cuestión (obtenido como se indica en el Apartado 3.10.2.). Como sustrato para esta hidrólisis se empleó biomasa pretratada de maíz, PCS.

Con objeto de su uso en la hidrólisis, la biomasa fue previamente neutralizada, aunque a esta escala se usó sin moler, liofilizar ni tamponar para reproducir más fielmente el proceso industrial. Para el proceso de hidrólisis enzimática se usaron frascos ISO de 100 mL con 20 g de la mezcla de biomasa al 20% (p/p) de sólidos totales y suplementada con 12 mg de proteína del cóctel procedente de la cepa en cuestión por g de glucano. Los frascos con la mezcla se incubaron durante 72 h a 50 °C con una agitación de 150 rpm en un incubador orbital (Multitron II). Una vez realizado el proceso, el contenido de glucosa en las muestras resultantes del hidrolizado (*slurry*) se analizó mediante cromatografía líquida de alta resolución, HPLC (Agilent Technologies, 1200 Series), usando una columna Aminex HPX-87 H de 300 mm x 7,8 mm con un tamaño de partícula de 9 μm (BioRad, California, EE.UU.). Los análisis se realizaron a 60 °C en condiciones isocráticas con H_2SO_4 5 mM como fase móvil a una velocidad de flujo de 0,6 mL/min con un volumen de inyección de 20 μL . Los carbohidratos (glucosa, xilosa y arabinosa) se analizaron usando un detector de índice de refracción (DIR).

3.13. Ensayos enzimáticos

La medida de las actividades enzimáticas se realizó sobre las mezclas enzimáticas producidas a escala microplaca, obtenidas como se describe en el Apartado 3.10.1.) o a escala matraz, obtenidas como se describe en el Apartado 3.10.2.

3.13.1. Determinación de actividad β -glucosidasa (BGL)

La determinación de la actividad β -glucosidasa (BGL) de una muestra problema (enzima o mezcla enzimática) se basa en la determinación colorimétrica de p-nitrofenol liberado por acción catalítica de la enzima β -glucosidasa sobre el sustrato p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (pNGP, Sigma). pNGP es un sustrato análogo susceptible de ser hidrolizado por la enzima β -glucosidasa.

Este ensayo puede realizarse a escala de microplaca o microtubo.

La determinación de la actividad β -glucosidasa se realizó sobre muestras de cócteles enzimáticos obtenidos como se indica en el Apartado 3.10. Las condiciones estándar del ensayo fueron a 50 °C y pH 5,0. La concentración de sustrato durante el ensayo fue de 0,1 g/L de pNGP.

- Escala de microplaca: En microplacas de 96 pocillos se mezclaron 50 μ L de muestra enzimática, diluida previamente en agua destilada hasta la zona lineal del ensayo, con 50 μ L de sustrato pNGP 0,2 g/L preparado en tampón sodio acetato 100 mM pH 5,0. Las muestras, preparadas por duplicado, se incubaron a 50 °C durante 10 min en un termobloque (Thermomixer Comfort, Eppendorf). Se incluyeron muestras control a las que se adicionó agua en lugar de muestra enzimática y se sometieron al mismo procedimiento. Transcurrido el tiempo de incubación, se detuvo la reacción con 100 μ L de carbonato sódico 1 M. Finalmente, se evaluó la absorbancia a una longitud de onda de 410 nm en un lector de placas (UVM340, Asys).
- Escala microtubo: En microtubos de 1,5 mL (Eppendorf) se mezclaron 250 μ L de muestra enzimática, diluida previamente en agua destilada hasta la zona lineal del ensayo, con 250 μ L de sustrato pNGP 0,2 g/L preparado en tampón sodio acetato 200 mM pH 5,0. Las muestras, preparadas por duplicado, se incubaron a 50 °C durante 10 min en un termobloque (Thermomixer Comfort, Eppendorf) junto a controles a los que se adicionó agua en lugar de muestra enzimática. Transcurrido el tiempo de incubación, se detuvo la reacción con 500 μ L de carbonato sódico 1 M. Finalmente, se evaluó la absorbancia a una longitud de onda de 410 nm en el espectrofotómetro (Genesys 6, Thermo Scientific).

En ambos casos los resultados de actividad enzimática se expresaron en unidades por mL de muestra (U/mL) aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad BGL (U/mL)} = [(\text{Abs-BC}) * \text{DE} * \text{FD} * 10^3] / [\epsilon * l * t]$$

Donde:

Abs-BC = absorbancia corregida para el blanco.

DE = dilución de la muestra problema al final del ensayo. Viene dado por el cociente VF/VE donde VF es el volumen final de la dilución y VE es el volumen de muestra problema en la mezcla de ensayo

FD = factor de dilución de la enzima previa al ensayo.

ϵ = coeficiente de extinción molar del nitrofenol = 15200 M⁻¹ cm⁻¹.

l = paso de luz. En el ensayo en microtubo viene dado por la anchura de la cubeta

t = 1 cm. En el ensayo en microplaca viene dado por el cociente VF/300.

3.13.2. Ensayo de actividad con cóctel mínimo de *M. thermophila* C1

El cóctel mínimo (CM) consiste en una mezcla de varias enzimas clave purificadas que permite emular la liberación de glucosa en hidrólisis de biomasa lignocelulósica mediada por el cóctel completo secretado por *M. thermophila* C1 de manera simplificada. Este cóctel fue optimizado y puesto a punto por el grupo de Bioquímica de Abengoa Bioenergía Nuevas Tecnologías (Benítez y col., 2017) y está compuesto por las cuatro celulasas principales: Bgl1, Cbh1, Cbh4 y Eg2.

La dosis utilizada de cada enzima para degradar el sustrato PCS se detalla en la Tabla 14. Estas dosificaciones están basadas en las cuantificaciones de estas enzimas en el cóctel nativo y están ajustadas a las proporciones óptimas. La dosis total fue de 8,64 mg/g.

Tabla 14. Dosificación de las celulasas componentes del cóctel mínimo expresada en miligramos de proteína por gramo de glucano (mg/g).

Cóctel mínimo (CM)	Dosis por enzima (mg/g)
Eg2	2,27
Cbh1	3,99
Cbh4	1,30
Bgl1	1,08

Con objeto de valorar la calidad de un cóctel enzimático con y sin Eg6, se llevaron a cabo hidrólisis de PCS con el CM en dos ensayos:

- Suplementación de Eg6 en el CM

La enzima purificada Eg6 se suplementó, a una dosis de 2 mg/g, en el CM con dosis 8,64 mg/g. Esta muestra estaba a una dosis final de 10,64 mg/g. Como control se usó el cóctel mínimo sin suplementar, compensando la dosis de las demás enzimas para alcanzar la misma dosis final de 10,64 mg/g que la muestra. La compensación se hizo de manera proporcional manteniendo los porcentajes de representación de cada enzima.

- Reemplazo de Eg2 por la enzima Eg6 en el cóctel mínimo

Se reemplazó la dosis de la enzima Eg2 (2,27 mg/g) por la misma dosis de la enzima Eg6. Como control se utilizó el CM establecido conteniendo Eg2. Ambas muestras a la dosis final definida de 8,64 mg/g. En ambos ensayos se realizó una hidrólisis de biomasa molida con PCS siguiendo el protocolo descrito en el Apartado 3.12.2.

3.13.3. Determinación de actividad de transglicosilación

Para la determinación de la actividad de transglicosilación de la enzima β -glucosidasa 1 se estableció un ensayo indirecto de actividad que permitía estimar la capacidad de transglicosilación de la misma. Este ensayo consistía en la medida de la actividad hidrolítica de la enzima β -glucosidasa sobre pNGP 0,1 g/L, como se detalla en el Apartado 3.13.1. en presencia y ausencia de celobiosa 5,5 mM. La celobiosa, además de sustrato para la acción hidrolítica de las β -glucosidasas, es aceptor preferencial en la actividad transglicosilasa de la enzima (Bohlin y col., 2013). Este ensayo puede realizarse igualmente a escala de microplaca o microtubo.

Para la determinación del comportamiento transglicosilante a concentraciones crecientes de celobiosa, se estableció el mismo ensayo indirecto de medida de actividad BGL sobre pNGP y se utilizaron concentraciones de celobiosa de 0 a 15 mM.

Para la determinación de formación real de oligómeros (glucosa, celobiosa y/o celotriosa), se llevó a cabo una reacción en un volumen final de 1 mL conteniendo celobiosa 138 mM (50 g/L), tampón de acetato sódico 100 mM pH 5.0 y 0,1 U (actividad de la celobiosa) de enzima. Estas mezclas se incubaron a 50 °C durante 24 horas. Las reacciones se detuvieron tras 24 horas de incubación mediante la adición de 100 μ g de carbonato a las mezclas de reacción. Para analizar los tiempos de retención y el pico de las áreas obtenidas, estas mezclas se analizaron mediante HPLC (Agilent Technologies, 1200 Series) usando un detector del índice de refracción (DIR) y una columna Aminex HPX-87 H.

4 RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Eliminación de enzimas no contributivas en la cepa AB2

M. thermophila se caracteriza por secretar una amplia variedad de enzimas celulolíticas al medio de cultivo. Sin embargo, en las condiciones industriales de hidrólisis de biomasa sólo unas pocas enzimas van a ser capaces de contribuir a la eficiencia del proceso. Por tanto, no es deseable la producción de enzimas redundantes o con poca actividad que disminuyan la producción de las que sí lo son (Introducción, Apartado 1.8.1.).

En el cóctel enzimático producido por AB2 existen enzimas no contributivas que pueden ser: (1) enzimas celulolíticas redundantes con rangos de temperatura y pH óptimos fuera de las condiciones industriales o (2) enzimas no celulolíticas que disminuyen la proporción en la que se producen las enzimas más eficientes o contributivas. Con la eliminación de estas enzimas o actividades, la eficiencia de hidrólisis enzimática aumentaría al contar con mayor representación de las enzimas contributivas. Con esta premisa, se decidió generar una cepa capaz de expresar un cóctel en el cual predominen las enzimas más eficientes en el proceso de hidrólisis eliminando aquellas que son redundantes o ineficientes. Las candidatas fueron dos enzimas muy representadas en el cóctel enzimático, la enzima no celulolítica quitinasa 2 (Chi2) carente de actividad para la hidrólisis de biomasa lignocelulósica y la enzima celulolítica endoglucanasa 6 (Eg6), abundante en el cóctel, pero poco eficiente.

La técnica utilizada para ambas deleciones fue el uso del casete de deleción basada en el intercambio del gen por un casete conteniendo el marcador de selección reciclable *amdS* mediante recombinación homóloga (Introducción, Apartado 1.8.1.). Este marcador se encuentra flanqueado por fragmentos aguas arriba y abajo del gen objeto de deleción que permiten la recombinación homóloga con el genoma de la célula huésped y contiene secuencias REP que permiten el reciclado del marcador, como se detalla en el Apartado 3.5.5. de Materiales y Métodos.

4.1.1. Eliminación de la enzima no celulolítica quitinasa 2

Las quitinasas son enzimas no celulolíticas capaces de hidrolizar el carbohidrato quitina, uno de los polímeros naturales más abundantes después de la celulosa, en sus componentes oligo y monoméricos. Sin embargo, esta enzima carece de actividad para la hidrólisis de biomasa lignocelulósica pretratada y, por tanto, no es necesaria para la

aplicación industrial del cóctel enzimático a la producción de etanol de segunda generación.

La composición del cóctel secretado por la cepa AB2 ha sido caracterizada en trabajos previos de nuestro laboratorio mediante la identificación y purificación de las enzimas principales, así como caracterización del conjunto del secretoma mediante huella peptídica tanto a partir de bandas de electroforesis SDS-PAGE como bidimensionales (Benítez, 2017) y mediante análisis LC-MS/MS (Reyes-Sosa y col., 2017). En base a estos estudios se conocía que la quitinasa 2 (Chi2) tiene una representación de aproximadamente un 9 % en la composición de enzimas secretada por la cepa AB2 (Figura 25). No obstante, su presencia puede provocar la disminución de la calidad del cóctel enzimático. Idealmente, la eliminación de esta enzima improductiva con significativa presencia extracelular daría lugar a un incremento de la concentración de las enzimas productivas al redistribuirse la capacidad productiva del organismo, lo que conllevaría a su vez a una mayor calidad del cóctel celulolítico.

En base a esta hipótesis se decidió realizar la delección del gen *chi2* que codifica para la enzima quitinasa 2.

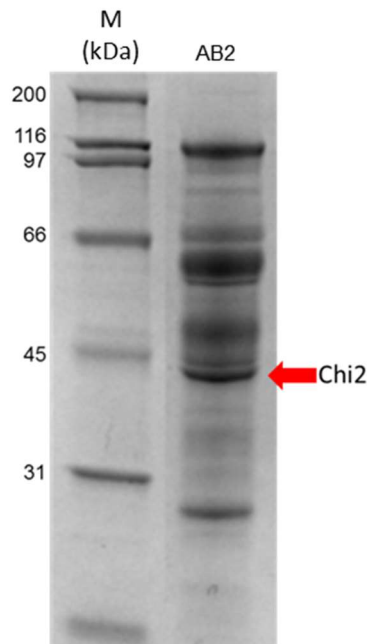


Figura 25. Fotografía de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 7,5%) donde se muestran las celulasas presentes en la composición enzimática secretada por la cepa AB2 que contiene la enzima Chi2 en fermentación de 30 L. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: composición enzimática con Chi2. La flecha indica la banda de proteína que corresponde a la enzima Chi2.

4.1.1.1. Deleción del gen *chi2*

En primer lugar se llevó a cabo la identificación de la secuencia del gen *chi2* y su entorno genético en el genoma de *M. thermophila* mediante la búsqueda de la secuencia del gen en la base de datos JGI (<http://genome.jgi.doe.gov/>). El número de acceso del gen *chi2* en NCBI es GI_367028749 NC_016474.1. Una vez localizado se anotaron las secuencias aguas arriba y abajo de este gen para poder generar la construcción del plásmido necesario para la deleción como se describe en el Apartado 3.5.5.2. de Materiales y Métodos. Con esta construcción se realizaron múltiples transformaciones de la cepa AB2 para la obtención de transformantes delecionados *chi2* ($\Delta chi2$) por el método de transformación de protoplastos siguiendo el procedimiento descrito en el Apartado 3.4.2. de Materiales y Métodos.

4.1.1.2. Escrutinio y selección de mutantes delecionados *chi2*

El escrutinio se hizo mediante selección en medio con acetamida y el posterior análisis genético de cada transformante seleccionado, tal y como se describe en el Apartado 3.6.1. de Materiales y Métodos.

Se analizaron un total de 2300 transformantes de los cuales dos presentaron los resultados esperados para las distintas PCR, el clon 2223 y el 2225, tal y como se muestra en la Figura 26. Los resultados mostrados en esta figura indican el correcto reemplazo del gen *chi2* por el marcador de selección *amdS*.

Es importante señalar que la mayoría de los fragmentos se integran por recombinación no homóloga al azar en el genoma y sólo un pequeño porcentaje, en torno al 1-2 %, lo hace por recombinación homóloga (Visser y col, 2011).

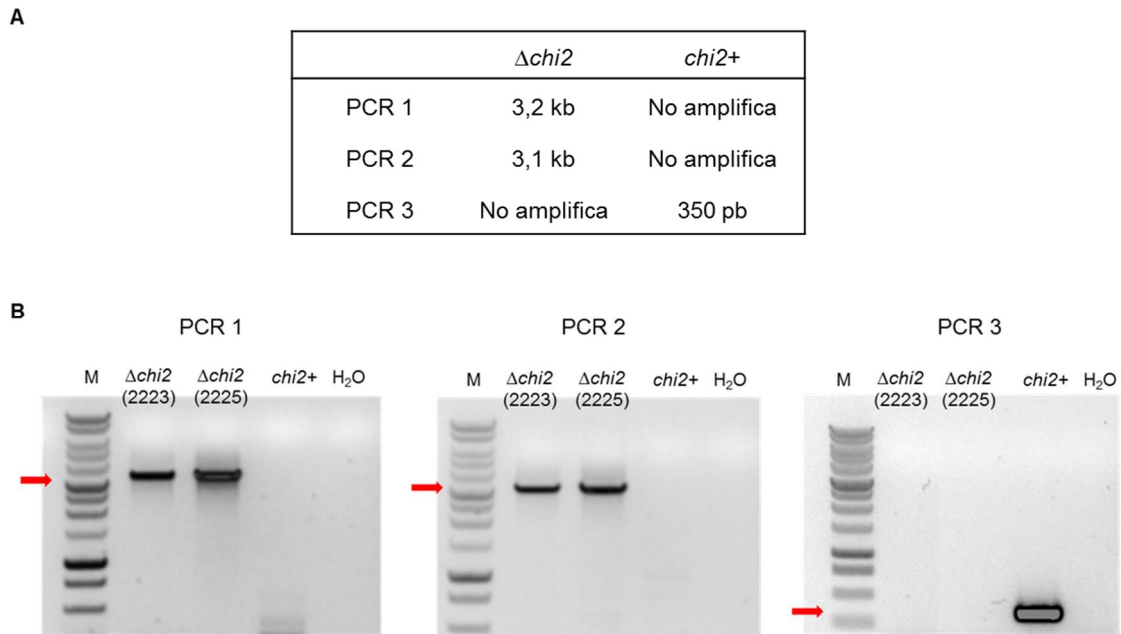


Figura 26. Análisis genético mediante PCR de los transformantes delecionados de *chi2* ($\Delta chi2$). A) Resultados esperados para las distintas PCR en la selección de transformantes delecionados. Se indica el tamaño esperado para cada PCR. B) PCR1, amplificación del extremo 5' (amplificación positiva para $\Delta chi2$). PCR 2, amplificación del extremo 3' (amplificación positiva para $\Delta chi2$). PCR 3, amplificación del fragmento interno del gen *chi2* (amplificación negativa para $\Delta chi2$). $\Delta chi2$: transformante con el gen *chi2* delecionado. $chi2+$: cepa sin modificar que contiene el gen *chi2*, control de la reacción. M: marcador *DNA ladder* 1Kb. Las flechas en rojo indican la banda esperada para cada PCR. Para detalles adicionales ver Apartado 3.6.1 de Materiales y Métodos.

4.1.1.3. Evaluación del cóctel enzimático producido por AB2 $\Delta chi2$

Con el fin de confirmar la ausencia de la proteína Chi2 en el cóctel enzimático producido por AB2 $\Delta chi2$ se realizó una electroforesis en gel de acrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Para ello se utilizaron los cócteles enzimáticos producidos a escala matraz por las dos cepas seleccionadas AB2 $\Delta chi2$ (clon 2223 y 2225) y su cepa parental AB2 $\Delta chi2$ siguiendo el procedimiento descrito en el Apartado 3.11.2 de Materiales y Métodos. Como se observa en la Figura 27, se confirma la ausencia de la proteína Chi2 en el cóctel enzimático producido por ambos clones seleccionados de la cepa AB2 $\Delta chi2$, lo que indica que la deleción es correcta y refuerza los resultados del análisis genético realizado anteriormente.

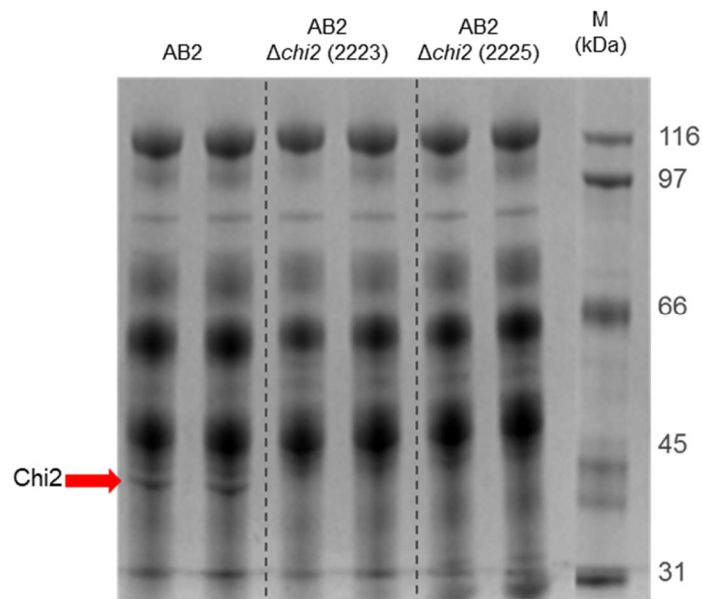


Figura 27. Fotografía de la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 7,5%) de la composición enzimática de los transformantes seleccionados AB2 $\Delta chi2$ (2223 y 2225) y de su cepa parental AB2 (control). Las tres son producciones enzimáticas de fermentaciones en matraz. Carril 1 y 2: AB2; Carril 2 y 3: AB2 $\Delta chi2$ (2223); Carril 4 y 5: AB2 $\Delta chi2$ (2225). Carril 7: Marcador de peso molecular. La flecha indica el tamaño donde debe aparecer la banda de proteína que corresponde a la enzima Chi2.

4.1.1.4. Hidrólisis enzimática de los clones seleccionados AB2 $\Delta chi2$

Con el objetivo de comprobar si la delección del gen *chi2* se traducía en una mejora del rendimiento de hidrólisis y estos transformantes delecionados conseguían liberar una mayor cantidad de azúcares fermentables que su cepa parental, se llevó a cabo una hidrólisis enzimática sobre PCS y se analizó la glucosa liberada a 72 h como se describe en el Apartado 3.13.1. de Materiales y Métodos. Ambos clones AB2 $\Delta chi2$ seleccionados presentan prácticamente la misma capacidad de sacarificación con respecto a su cepa parental AB2, en torno a 60 g/Kg de glucosa liberada (Figura 28). Esta delección no parece ser perjudicial para la secreción de otras proteínas ni para la actividad de hidrólisis, pero no se puede concluir un resultado claro sobre el efecto positivo en el rendimiento de hidrólisis a esta escala.

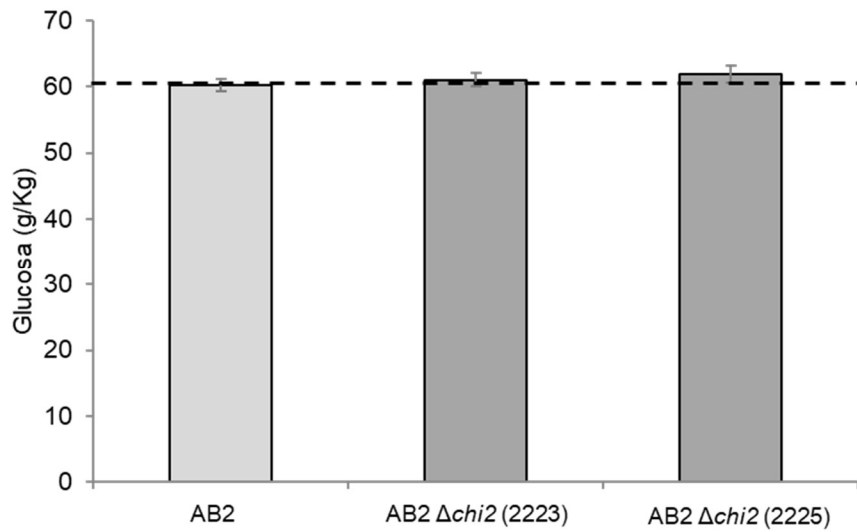


Figura 28. Evaluación de la hidrólisis de PCS por el cóctel enzimático $\Delta chi2$ obtenido a partir de fermentación en matraz. Se representa la concentración de glucosa liberada (g/Kg de hidrolizado) a tiempo final 72 h. Se compara la actividad del cóctel enzimático producido por transformantes delecionados de AB2 que no expresan el gen de la quitinasa 2 (AB2 $\Delta chi2$ clon 2223 y AB2 $\Delta chi2$ clon 2225) y el producido por la cepa parental AB2. Los datos son la media de dos repeticiones.

Con el mismo fin, se hizo una hidrólisis enzimática utilizando cócteles enzimáticos producidos en fermentador de 30 L (facilitadas por el laboratorio de bioquímica de Abengoa Bioenergía Nuevas Tecnologías) tanto de la cepa delecionada, AB2 $\Delta chi2$ como de su cepa parental. A esta escala solo se analizó el clon 2223 de la cepa delecionada ya que ambos daban resultados muy similares a escala matraz (Figura 29).

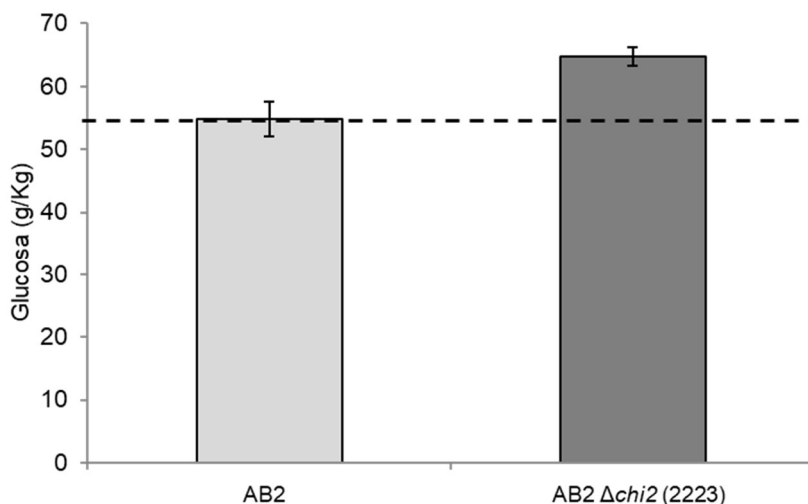


Figura 29. Evaluación de la hidrólisis de PCS por el cóctel enzimático $\Delta chi2$ producido en fermentador 30 L. Se representa la concentración de glucosa liberada (g/Kg de hidrolizado) a tiempo final 72 h. Se compara la actividad del cóctel enzimático producido por el transformante seleccionado AB2 $\Delta chi2$ clon 2223 que no expresa el gen quitinasa 2 y el producido por la cepa parental AB2. Los datos son la media de dos repeticiones.

Como se observa en la Figura 29, la cepa AB2 $\Delta chi2$ (2223) es capaz de liberar en torno a 10 g/kg más de glucosa que la cepa parental conteniendo la enzima Chi2. Por tanto, la ausencia de esta enzima en el cóctel enzimático parece beneficiar al rendimiento de hidrólisis enzimática de biomasa.

Con los mismos cócteles enzimáticos se llevó a cabo una electroforesis en gel de acrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) para comparar el perfil proteico de ambas cepas, con y sin la enzima Chi2 (Figura 30). En la cepa AB2 $\Delta chi2$ se observa de nuevo la ausencia de la banda correspondiente a la proteína Chi2. Cabe destacar que la cantidad de Chi2 producida a esta escala es superior a la producida a escala de fermentación en matraz y, por tanto, la mejora tras eliminar la proteína Chi2 se ve claramente traducida en la mayor capacidad de liberación de glucosa en comparación con el resultado obtenido a escala matraz.

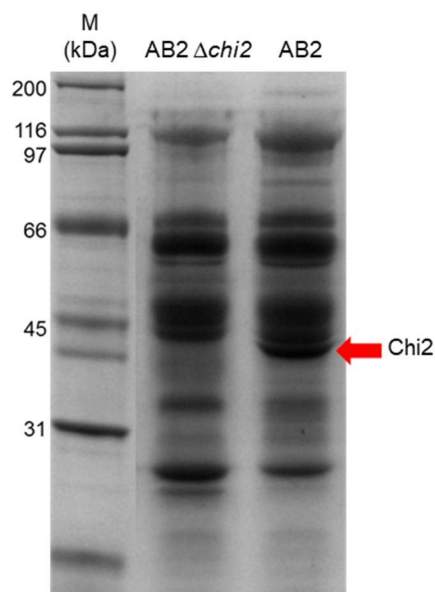


Figura 30. Perfil de proteínas de la cepa delecionada AB2 $\Delta chi2$ y su cepa parental AB2 de producciones en fermentador de 30L (SDS-PAGE 7,5%). Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: composición enzimática sin Chi2 (AB2 $\Delta chi2$); Carril 3: composición enzimática con Chi2 (AB2). La flecha indica la banda de proteína correspondiente a la enzima quitinasa 2.

4.1.1.5. Eliminación del marcador en AB2 $\Delta chi2$

Como ya se avanzó en la Introducción (Apartado 1.8.1.), el gen *amdS* es un marcador de selección bidireccional y reciclable. Permite la reutilización del marcador en varios eventos de deleción consecutivos. Por tanto, para poder reutilizarlo en un nuevo proceso de deleción se requiere su eliminación mediante contraselección con fluoroacetamida.

El marcador *amdS*, además de su posible selección positiva en medio mínimo con acetamida para seleccionar su presencia, también permite su selección negativa (contraselección) para probar su pérdida o ausencia. Esto es posible mediante el cultivo en medio conteniendo fluoroacetamida. Si el gen *amdS* se expresa, la fluoroacetamida es convertida por la acetamidasa en el compuesto tóxico fluoracetato provocando la muerte celular. Este método se desarrolló como se indica en el Apartado 3.7. de Materiales y Métodos y permitió la selección de aquellos clones que habían perdido el marcador de selección para el reciclaje de este y su posible reutilización en la misma cepa (Figura 31).

Una vez seleccionados estos clones, se confirmó la pérdida del gen marcador *amdS* mediante test nutricional y por PCR como se detalla también en el Apartado 3.7. El resultado obtenido se muestra en la Figura 32.

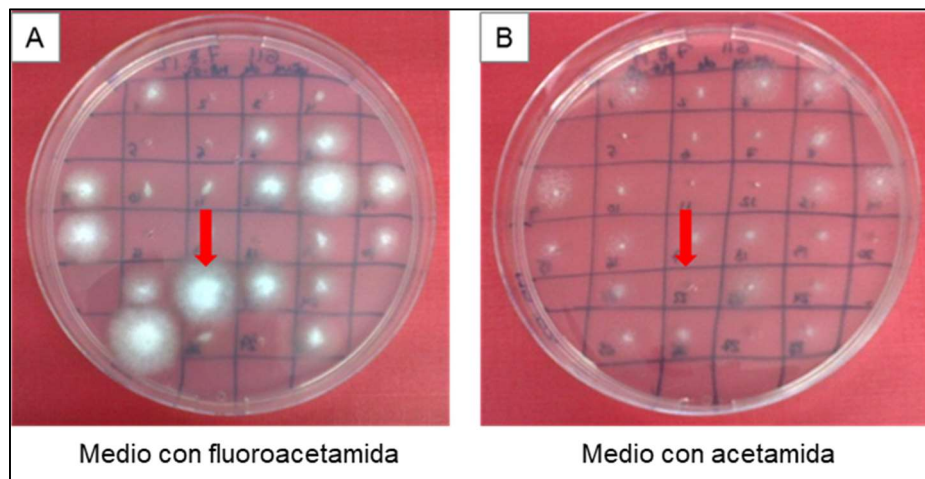


Figura 31. Contraselección del marcador *amdS*. A) Cultivo en placa de los clones AB2 $\Delta chi2$ en medio con fluoroacetamida para seleccionar aquellos clones que han perdido el gen *amdS* (crecen en presencia de fluoroacetamida). B) Cultivo en placa de los clones AB2 $\Delta chi2$ en medio con acetamida. Control de confirmación de los seleccionados en (A) los cuales no deben crecer con acetamida como única fuente de carbono. La flecha indica un ejemplo de clon candidato de haber perdido el marcador *amdS*.

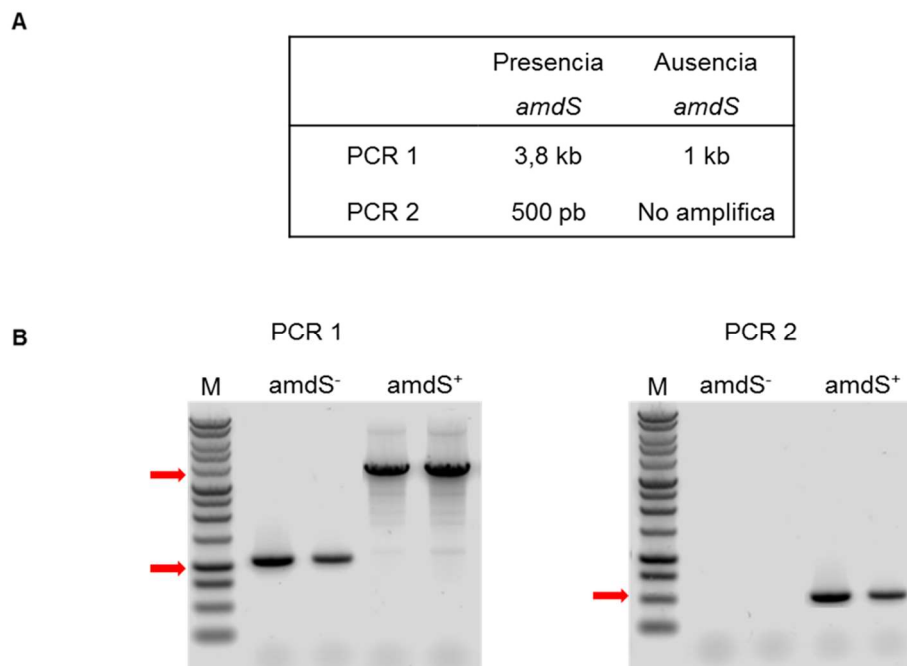


Figura 32. A) Resultados esperados para las distintas PCR en la selección de clones que han eliminado el gen *amdS* tras el proceso de contraselección. Se indica el tamaño esperado para cada PCR. B) Análisis genético mediante PCR de los clones del transformante deleciónado ($\Delta chi2$) para comprobar la pérdida del gen *amdS*. En ambas PCR el orden es, carril 1: marcador *DNA ladder* 1 kb; carriles 2 y 3: clones que han perdido el gen *amdS*, carriles 4 y 5: clones que mantienen el gen *amdS*. PCR 1, amplificación del casete *REP-amdS-REP*. En el caso de ausencia de *amdS* la amplificación es de aproximadamente 1 kb y de 3,8 kb en el caso de su presencia. PCR 2, amplificación de una región interna del gen *amdS* de aproximadamente 500 pb (amplificación negativa en caso de ausencia del gen *amdS*). Las flechas indican la banda esperada para cada PCR. Para detalles adicionales ver Apartado 3.7 de Materiales y Métodos.

De esta forma se confirmaron 2 clones AB2 $\Delta chi2$ que habían perdido el gen *amdS* de su genoma mediante recombinación homóloga de las secuencias repetidas REP. Esta cepa libre de marcador será la utilizada para la siguiente deleción.

4.1.2. Eliminación de la enzima celulolítica endoglucanasa 6

La actividad catalítica de las enzimas endoglucanasas consiste en la hidrólisis de los enlaces glucosídicos β -(1,4) internos de los polímeros de celulosa, de manera aleatoria. Estas actúan en las regiones amorfas liberando cadenas para la acción procesiva de las celobiohidrolasas.

En el cóctel producido por *M. thermophila* C1 se han identificado varias enzimas con actividad β -1,4 endoglucanasa entre las cuales la Eg2 es la enzima más activa en las condiciones industriales de hidrólisis de biomasa. En términos de abundancia, la

enzima Eg6 es, junto con la Eg2, la endoglucanasa que se encuentran en mayor proporción en el cóctel de enzimas secretado por AB2. El resto de endoglucanasas tiene una representación bastante menor. En concreto, Eg2 y Eg6 tienen una representación de aproximadamente un 6% y 4%, respectivamente, en la composición total de enzimas extracelulares producida a escala de fermentador de 30 L (Figura 33).

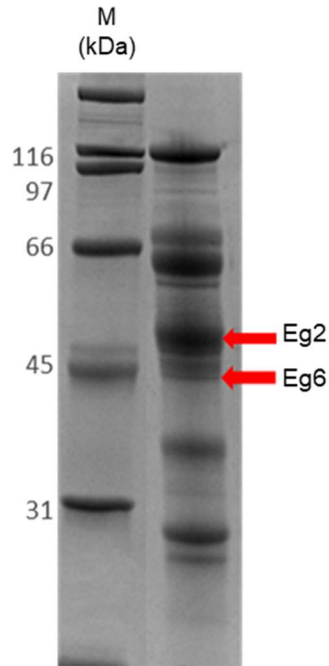


Figura 33. Fotografía de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 7,5%) donde se muestran las celulasas presentes en el cóctel enzimático secretado por AB2 en fermentación en fermentación a escala 30 L. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: composición enzimática con Eg6. Las flechas indican las bandas correspondientes a la enzima Eg2 y Eg6.

Como se ha mencionado en la introducción, la expresión y producción de enzimas redundantes, con similar actividad o actividad limitada no son deseables ya que diluyen la presencia de aquellas que aportan mayor rendimiento, reduciendo la eficacia del cóctel completo. Debido a que el cóctel ya contiene una endoglucanasa altamente eficiente, la Eg2, se evaluó la contribución de Eg6 con el objetivo de valorar su posible eliminación como actividad redundante y conseguir mayor representación de las enzimas más contributivas para mejorar la eficiencia del cóctel.

Para determinar la contribución de esta enzima de la manera más representativa posible, se realizaron ensayos de suplementación del cóctel con la enzima Eg6 purificada bajo condiciones que reproducían la reacción de hidrólisis industrial, es decir, con el material lignocelulósico PCS a 50 °C durante 72 h. El cóctel enzimático utilizado fue una mezcla de enzimas purificadas denominado cóctel mínimo compuesto por las celulasas principales Bgl1, Cbh1, Cbh4 y Eg2 con objeto de emular, de manera simplificada, la liberación de glucosa en hidrólisis de biomasa lignocelulósica mediada por el cóctel completo secretado por *M. thermophila* C1.

Se hicieron dos ensayos: (1) la suplementación de Eg6 en el cóctel mínimo completo y (2) el reemplazo de Eg2 por la enzima Eg6 en el cóctel mínimo. La metodología de este ensayo se detalla en el apartado 3.13.2. de Materiales y Métodos. Los resultados se muestran en la Figura 34.

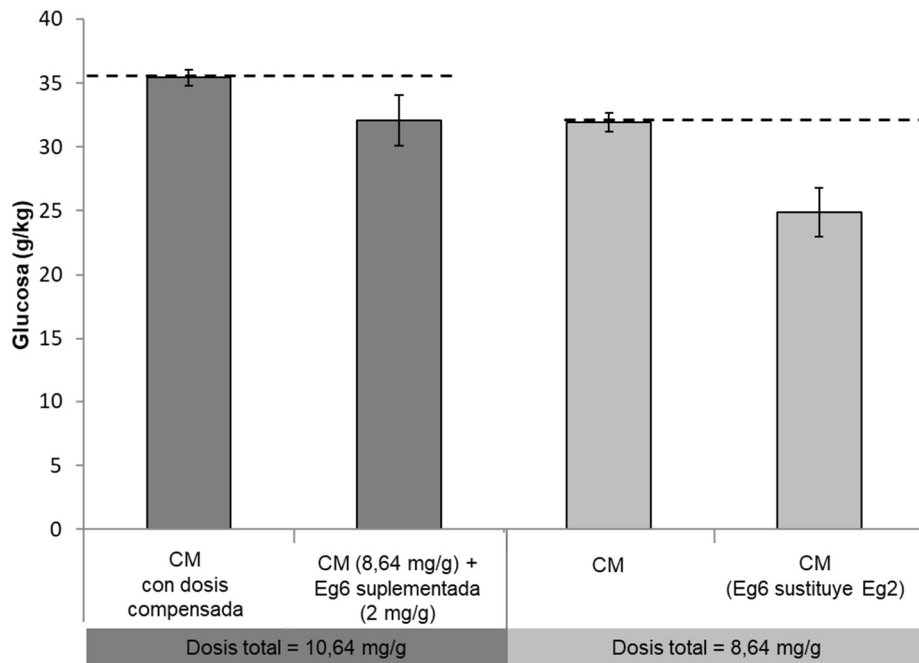


Figura 34. Liberación de glucosa en hidrólisis de PCS a 72 h para la evaluación funcional de la enzima Eg6. En gris oscuro se representa el cóctel mínimo (CM) suplementado con 2 mg/g de Eg6 en una dosis total de 10,64 mg/g y el CM sin suplementar, pero compensando la dosis proporcionalmente para mantener la dosis total de 10,64 mg/g. En gris claro se representa la sustitución de Eg2 por Eg6 en el CM y el CM sin modificar, es decir, CM conteniendo Eg2. Ambas muestras a dosis final de 8,64 g/mg.

En el ensayo de suplementación, la adición de Eg6 a la reacción junto con el cóctel mínimo no resultó en un aumento de la liberación de glucosa después de 72 h. En cambio, se observó una bajada del rendimiento de más de un 3 g/kg de glucosa liberada en comparación con el cóctel mínimo sin suplementar. En el ensayo de sustitución, el reemplazo de Eg2 por Eg6 en el cóctel mínimo supuso una bajada de rendimiento de más de un 7 g/kg de glucosa con respecto al control, cóctel mínimo conteniendo Eg2 (Figura 34).

En base a estos resultados se optó por eliminar la enzima Eg6 del cóctel mediante deleción del gen que la codifica. Para esta deleción se desarrollaron los experimentos que se detallan en los siguientes apartados: identificación del gen codificante de la endoglucanasa 6 (*eg6*), construcción genética y transformación, escrutinio genético y la evaluación funcional de la cepa delecionada.

4.1.3.1. Delección del gen *eg6*

En primer lugar se llevó a cabo la identificación de la secuencia del gen *eg6* y su entorno genético en el genoma de *M. thermophila* mediante la búsqueda de la secuencia del gen en la base de datos JGI (<http://genome.jgi.doe.gov/>). El número de acceso del gen *eg6* en NCBI es GI_367028749 NC_016473.1. Una vez localizado se anotaron las secuencias aguas arriba y abajo de este gen para poder generar la construcción del plásmido necesario para la delección como se describe previamente en Material y Métodos, Apartado 3.5.5.3. Con esta construcción se transformó la cepa AB2 $\Delta chi2$ para la obtención de transformantes delecionados *eg6* ($\Delta eg6$) por el método de transformación en protoplastos siguiendo el procedimiento descrito en el Apartado 3.4.2. de Materiales y Métodos.

4.1.3.2. Escrutinio genético y selección de mutantes delecionados *eg6*

El escrutinio se hizo mediante selección en medio con acetamida y el posterior análisis genético de cada transformante seleccionado, tal y como se describe en el apartado 3.6.2. de Materiales y métodos.

Se analizaron un total de 200 transformantes de los cuales uno de ellos presentó los resultados esperados para las distintas PCR, tal y como se muestra en la Figura 35. Los resultados mostrados en esta figura indican el correcto reemplazo del gen *eg6* por el marcador de selección *amdS*.

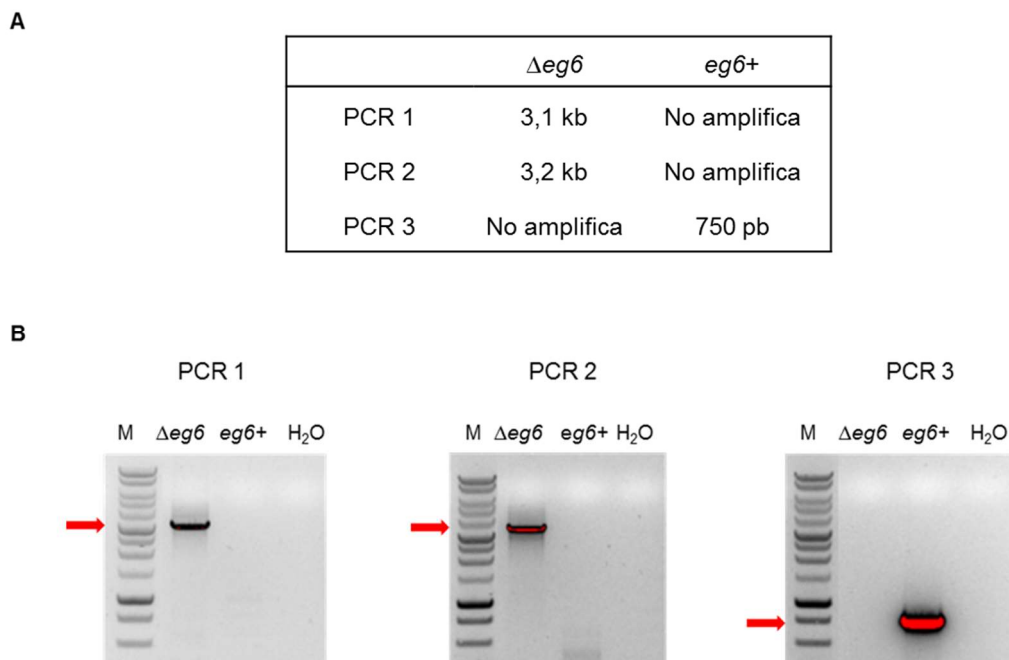


Figura 35. Análisis genético mediante PCR del transformante deleciónado de *eg6* ($\Delta eg6$). A) Resultados esperados para las distintas PCR en la selección de transformantes deleciónados. Se indica el tamaño esperado para cada PCR. PCR 1, amplificación del extremo 5' (amplificación positiva para $\Delta eg6$). PCR 2, amplificación del extremo 3' (amplificación positiva para $\Delta eg6$). PCR 3, amplificación del fragmento interno del gen *eg6* (amplificación negativa para $\Delta eg6$). $\Delta eg6$: transformante con el gen *eg6* deleciónado. $eg6^+$: cepa sin modificar que contiene el gen *eg6* (control de la reacción). M: marcador *DNA ladder* 1 Kb. Las flechas en rojo indican la banda esperada para cada PCR. Para detalles adicionales ver Apartado 3.6.2. de Materiales y Métodos.

4.1.3.3. Evaluación del cóctel enzimático producido por AB2 $\Delta chi2 \Delta eg6$

Con el fin de confirmar la ausencia de la proteína Eg6 en el cóctel enzimático producido por AB2 $\Delta chi2 \Delta eg6$ se llevó a cabo una electroforesis en gel de acrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Para ello se utilizaron los cócteles enzimáticos producidos a escala matraz por la cepa seleccionada AB2 $\Delta chi2 \Delta eg6$ y su cepa parental AB2 $\Delta chi2$ siguiendo el procedimiento descrito en el Apartado 3.11.2 de Materiales y Métodos. En la Figura 36 se muestra el resultado de electroforesis y el perfil de proteínas de estas composiciones enzimáticas. Como se puede observar, a esta escala no se aprecia la banda correspondiente a la proteína Eg6. Esto puede ser debido a que la producción de esta proteína a esta escala es demasiado baja para verla en el gel.

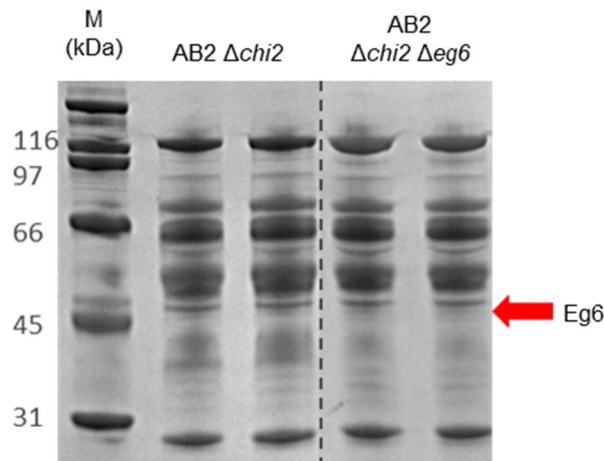


Figura 36. Fotografía de la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 7,5%) de la composición enzimática del transformante seleccionado AB2 $\Delta chi2 \Delta eg6$ y de su cepa parental AB2 $\Delta chi2$ (control) en producción en matraz. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2 y 3: AB2 $\Delta chi2 \Delta eg6$; Carril 4 y 5: AB2 $\Delta chi2$. La flecha indica el tamaño donde debe aparecer la banda de proteína que corresponde a la enzima Eg6.

A continuación, se comprobó si en una producción a mayor escala, en fermentador de 30 L, se observaba la presencia de la enzima Eg6 en la cepa parental y la ausencia de esta en el transformante deletado $\Delta eg6$. Para ello se realizó un análisis bidimensional convencional (IEF/SDS-PAGE) utilizando cócteles enzimáticos de ambas cepas producidos en fermentador de 30 L (facilitados por el laboratorio de bioquímica de Abengoa Bioenergía Nuevas Tecnologías). Las proteínas presentes en estas muestras se separaron por electroforesis bidimensional siguiendo el protocolo descrito en el Apartado 3.11.3 de Materiales y Métodos.

El análisis mediante esta técnica corrobora la ausencia de la proteína Eg6 en el cóctel enzimático producido por la cepa AB2 $\Delta chi2 \Delta eg6$ (Figura 37). Por otro lado, la identificación de la proteína Eg6 se confirmó mediante huella peptídica en el Servicio de Análisis de Proteínas del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis de Sevilla. Estos resultados muestran que la delección del gen fue correcta y refuerza los resultados del análisis por PCR realizado anteriormente (Apartado 4.1.3.2.).

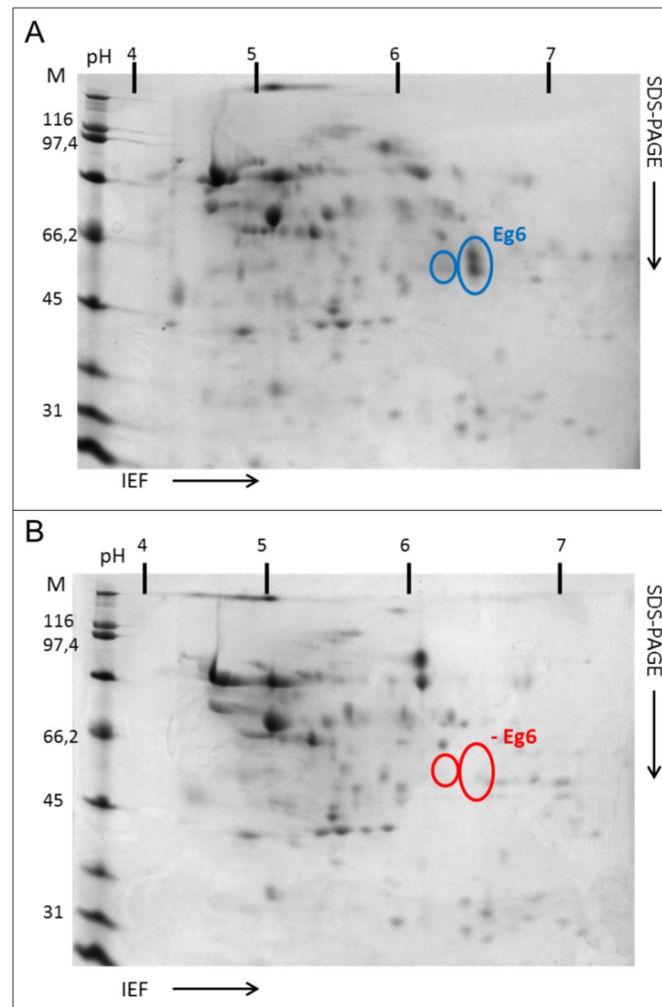


Figura 37. Electroforesis bidimensional comparativa de proteínas presentes en los cócteles enzimáticos producidos por AB2 $\Delta chi2 \Delta eg6$ frente a su cepa parental AB2 $\Delta chi2$. En la primera dimensión las proteínas se han separado mediante isoelectroenfoco en un rango de pI de 4-7 (IEF). Tras su desnaturalización se llevó a cabo la separación por tamaño en la segunda dimensión (SDS-PAGE). Se muestran geles teñidos con azul Coomassie. A) Imagen correspondiente al perfil de proteínas del cóctel producido por la cepa parental sin modificar, AB2 $\Delta chi2$. Se señala la mancha correspondiente a la proteína Eg6 (en azul). B) Imagen correspondiente al perfil de proteínas del cóctel producido por la cepa delecionada AB2 $\Delta chi2 \Delta eg6$. Se señala la ausencia de la mancha correspondiente a la proteína Eg6 (en rojo). M, marcador de peso molecular.

4.1.3.4. Hidrólisis enzimática de AB2 $\Delta chi2 \Delta eg6$

Para evaluar si la deleción del gen *eg6* se traducía en un incremento del rendimiento de liberación de glucosa con respecto a su cepa parental, se realizó una hidrólisis enzimática sobre PCS y se analizó la glucosa liberada a 72 h como se describe en el Apartado 3.12.2. de Materiales y Métodos. En primer lugar, se comparó la

liberación de azúcares fermentables de la cepa AB2 $\Delta chi2 \Delta eg6$ con su cepa parental a escala matraz.

Como se muestra en la Figura 38, la cepa AB2 $\Delta chi2 \Delta eg6$ consiguió liberar 2 g/Kg más de azúcares fermentables que su cepa parental AB2 $\Delta chi2$. Esto es un aumento poco significativo estadísticamente por lo que no se pudo evidenciar el efecto de la delección sobre el rendimiento de hidrólisis a esta escala.

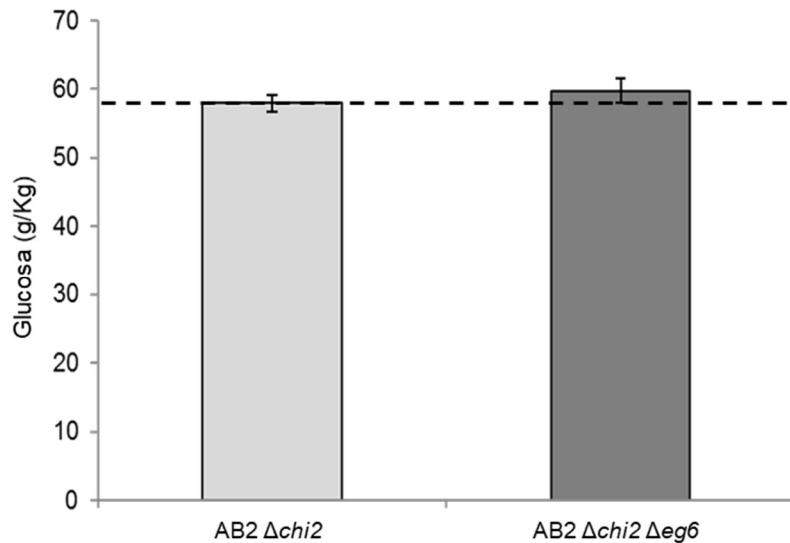


Figura 38. Evaluación de la hidrólisis de PCS por el cóctel enzimático $\Delta eg6$ obtenido de fermentación en matraz. Se representa la concentración de glucosa liberada (g/Kg de hidrolizado) a tiempo final 72 h. Se compara la actividad del cóctel enzimático producido por el transformante seleccionado AB2 $\Delta chi2 \Delta eg6$ que no expresa el gen de la endoglucanasa 6 y el producido por la cepa parental AB2. Los datos son la media de dos repeticiones.

Debido a que la producción de la enzima Eg6 en matraz es demasiado baja, para comprobar el efecto de la delección en el rendimiento de hidrólisis se procedió al mismo análisis usando los cócteles producidos en fermentador de 30 L. A esta escala la enzima Eg6 se produce en mayor cantidad y se puede apreciar la banda correspondiente a Eg6 en el gen SDS-PAGE (Figura 39).

Los resultados de liberación de glucosa por ambas cepas se muestran en la Figura 40. Se observa cómo la cepa AB2 $\Delta chi2 \Delta eg6$ es capaz de liberar en torno a 8 g/Kg más de glucosa que su cepa parental que contiene la enzima Eg6. Por tanto, la eliminación de esta enzima del cóctel supone la subida de aproximadamente un 11% de rendimiento en liberación de glucosa.

En las condiciones utilizadas, la delección de Eg6 tiene efecto positivo en el rendimiento del proceso de hidrólisis. Estos resultados parecen confirmar la relación directa entre la cantidad de proteína Eg6 en la composición enzimática y el efecto

negativo que produce en el rendimiento de sacarificación y apoyan los estudios previos con cóctel mínimo descritos en el Apartado 4.1.3.1.

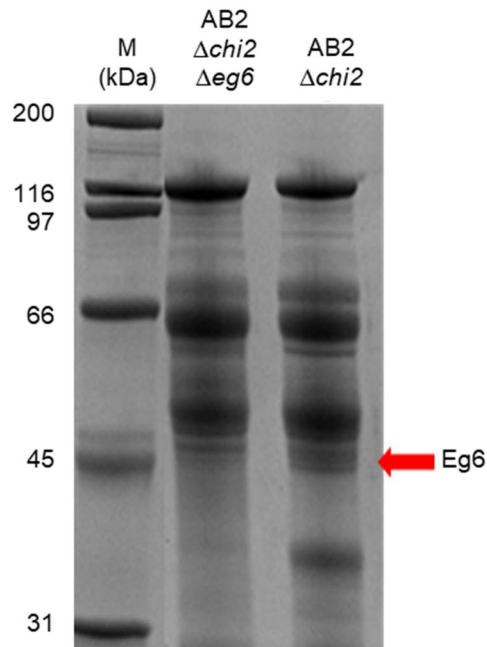


Figura 39. Perfil de proteínas (SDS-PAGE 7,5%) de la cepa delecionada AB2 $\Delta chi2 \Delta eg6$ y su cepa parental AB2 $\Delta chi2$ provenientes de producciones en fermentador de 30L. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: composición enzimática sin Eg6 (AB2 $\Delta chi2 \Delta eg6$); Carril 3: composición enzimática con Eg6 (AB2 $\Delta chi2$). La flecha indica la banda de proteína correspondiente a la enzima Eg6.

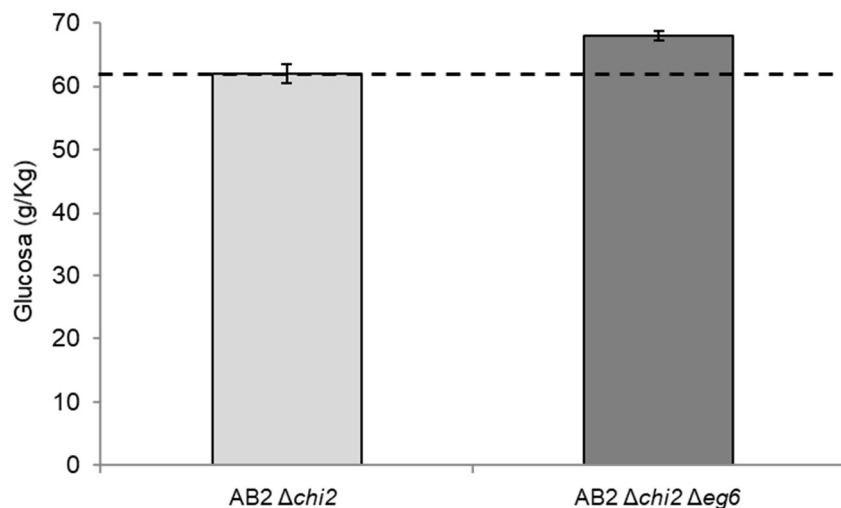


Figura 40. Evaluación de la hidrólisis de PCS por el cóctel enzimático $\Delta eg6$ producido en fermentador 30 L. Se representa la concentración de glucosa liberada (g/Kg de hidrolizado) a tiempo final 72 h. Se compara la actividad del cóctel enzimático producido por el transformante seleccionado AB2 $\Delta chi2 \Delta eg6$ que no expresa el gen endoglucansa 6 y el producido por la cepa parental AB2 $\Delta chi2$. Los datos son la media de dos repeticiones.

4.2. Mejora genética de *bgl1*

La β -glucosidasa 1 (Bgl1) producida por *M. thermophila* C1 es una enzima celulolítica que posee un péptido señal como parte de su secuencia que, al procesarse, permite la secreción de la proteína al medio extracelular. Esta enzima participa en el último paso del proceso de degradación de biomasa lignocelulósica y es la responsable de la liberación final de azúcares fermentables a etanol.

Sin embargo, tal y como se describe en la Introducción, Apartado 1.4.3.1., entre las enzimas BGL que actúan mediante el mecanismo de retención (*retaining*) pueden darse los fenómenos de inhibición y transglicosilación. Esto quiere decir que, a concentraciones elevadas de sustrato o producto, estas BGL tienen actividad hidrolítica reducida favoreciéndose la reacción de transglicosilación y disminuyendo así el rendimiento final de liberación de glucosa.

De acuerdo con Bohlin (2013), el nivel de transglicosilación puede medirse sobre el sustrato pNGP en presencia de concentraciones crecientes de celobiosa. Dependiendo de la actividad que tiene la enzima sobre pNGP en presencia de celobiosa, ésta puede presentar un perfil desde alta transglicosilación, cuando su actividad sobre el sustrato pNGP resulta muy reducida, hasta insensibilidad a la celobiosa cuando la actividad sobre pNGP no resulta afectada por la celobiosa (Figura 41).

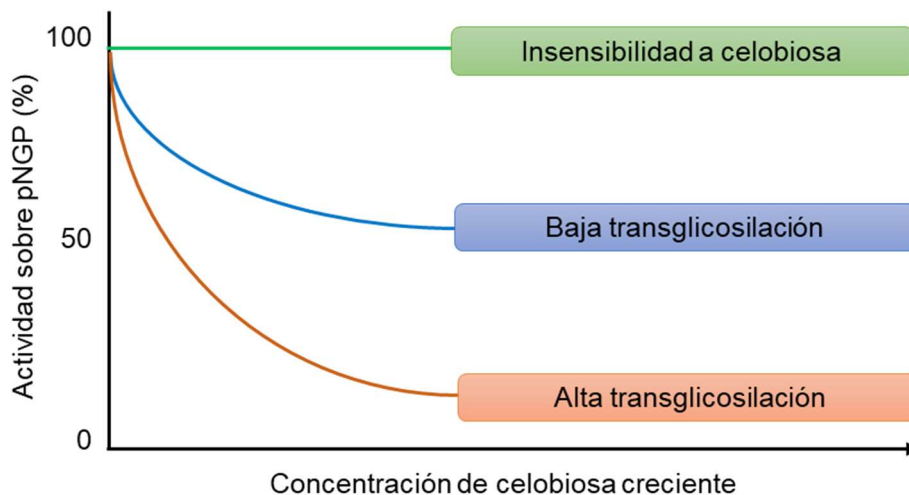


Figura 41. Esquema teórico del comportamiento de BGL con diferente perfil de transglicosilación utilizando pNGP en presencia de celobiosa como sustrato (Bohlin y col., 2013). Perfiles: a) Insensibilidad a celobiosa (verde): la actividad frente a pNGP es la misma en presencia y en ausencia de celobiosa; b) Baja transglicosilación (azul): la actividad frente a pNGP disminuye alrededor de un 50% en presencia de celobiosa; c) Alta transglicosilación (rojo): la actividad frente a pNGP cae hasta alrededor de un 10% en presencia de celobiosa (Díez y col., 2015).

En el caso de la Bgl1 de *M. thermophila* C1, estudios previos en nuestro laboratorio habían manifestado que esta enzima muestra un perfil de transglicosilación alto (Díez y col., 2015), de modo que el objetivo principal era la búsqueda de una variante de esta enzima con una actividad de transglicosilación reducida.

Para ello, se planteó la construcción de un banco de mutantes del gen *bgl1* de *M. thermophila* C1 mediante mutagénesis al azar con el fin de obtener una versión con la capacidad de transglicosilación reducida aumentando por consiguiente la actividad hidrolítica de la misma frente a celobiosa (principal aceptor en la reacción de transglicosilación).

4.2.1. Generación de librerías de mutantes de *bgl1*

Con la finalidad de generar variantes de la enzima Bgl1 con menor actividad de transglicosilación, se construyó una librería de mutantes sometiendo el gen *bgl1* a mutagénesis al azar mediante la técnica de PCR propensa a error, siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos el Apartado 3.8. El sistema utilizado para la generación de estas librerías permitió obtener dos librerías de mutantes con diferentes tasas de mutación: Librería A, con una frecuencia de mutación entre 0-1 mutaciones/kb y un tamaño de 150.000 colonias y librería B con una frecuencia de mutación entre 1-4,5 mutaciones/kb y un tamaño de 170.000 colonias (Tabla 15).

Tabla 15. Características de las librerías de mutantes

Librería	Frecuencia de mutación por Kb	Tamaño (colonias / reacción)
Librería A	0 – 1	150.000
Librería B	1 - 4,5	170.000

4.2.2. Transformación de las librerías de mutantes de *bgl1* en AB1

El ADN plasmídico de las librerías de mutantes que contenían las diferentes versiones mutadas de *bgl1* se transformó en la cepa huésped auxótrofa AB1 *pyr5*- (Materiales y Métodos, Apartado 3.1.1.1.) mediante transformación de protoplastos como se indica en el Apartado 3.4.2. de Materiales y Métodos. Se transformaron las dos librerías generadas, A y B. Los transformantes se sembraron en placas de agar sin suplemento de uridina. Tras 5 días de incubación a 35°C se obtuvieron los transformantes prototróficos (que expresan el gen *pyr5*) que serán analizados.

4.2.3. Escrutinio y selección de versiones mejoradas de *bgl1*

El objetivo del escrutinio era identificar las versiones mutadas de *bgl1* con baja actividad de transglicosilación. Por tanto, los transformantes obtenidos tras la transformación en *M. thermophila* C1, descrito en el apartado anterior, fueron analizados llevando a cabo una detección selectiva de alto rendimiento o *high throughput screening* (Emalfarb y col., 2006).

Para el análisis funcional de los transformantes, se estableció un ensayo indirecto midiendo la actividad hidrolítica BGL que permitía estimar la capacidad de transglicosilación de la enzima Bgl1. Como se detalla en el Apartado 3.13.3. de Materiales y Métodos, la actividad hidrolítica en pNGP se midió en presencia y ausencia de celobiosa 5,5 mM (2 g/L).

La estrategia seguida para detectar las mejores variantes fue un escrutinio funcional en dos etapas secuenciales en microplaca de 96 pocillos: una primera etapa de preselección y una segunda etapa de selección definitiva. Los seleccionados a escala microplaca fueron los escogidos para analizar posteriormente a escala matraz.

Para todos los transformantes analizados se estableció un criterio de selección: se seleccionaron aquellos mutantes que, en presencia de celobiosa, mantuvieron una capacidad hidrolítica sobre pNGP entre 30-70% en comparación con su actividad hidrolítica en ausencia de celobiosa. Es decir, se consideró que una baja actividad de transglicosilación correspondía a la disminución de la actividad hidrolítica sobre pNGP entre 30-70% cuando había celobiosa en la reacción (Figura 41).

Los transformantes obtenidos como se describe en el Apartado 4.2.2. se inocularon en cultivos de microplaca de 96 pocillos para realizar la detección selectiva de alto rendimiento.

Se exploraron transformantes de ambas librerías, A y B, y se analizó la actividad hidrolítica de un total de 6900 clones en presencia y en ausencia de celobiosa, como se ha descrito anteriormente. Teniendo en cuenta el criterio de selección planteado, se seleccionaron aquellos que presentaron una disminución de actividad frente a pNGP en presencia de celobiosa del 30 al 70%.

Con el fin de confirmar los resultados, los transformantes seleccionados en la primera etapa se volvieron a analizar en una segunda etapa utilizando el mismo ensayo de actividad y el mismo criterio de selección. Entre los clones seleccionados tras la segunda etapa de selección destacaba el clon 31L2D manteniendo más del 60% de actividad relativa sobre pNGP en presencia de celobiosa y el clon 18L3E manteniendo en torno al 40% de actividad.

Los mejores transformantes, incluyendo el clon 31L2D y el clon 18L3E se escogieron para llevar a cabo una producción en matraz siguiendo el procedimiento indicado en el Apartado 3.10.2. de Materiales y Métodos. De todos ellos se midió la actividad BGL en presencia y en ausencia de celobiosa a escala microtubo siguiendo la metodología descrita en el Apartado 3.13.3. de Materiales y Métodos. De acuerdo a estas condiciones, se confirmó que el transformante 31L2D mostraba el mejor perfil, manteniendo un 62% de actividad BGL en presencia de celobiosa. El mutante 18L3E resultó ser un falso positivo ya que no reprodujo los resultados previamente obtenidos y su actividad β -glucosidasa en presencia de celobiosa cayó por debajo del 30% (Figura 42). Como control se utilizó el tipo parental *bgl1* sin mutar.

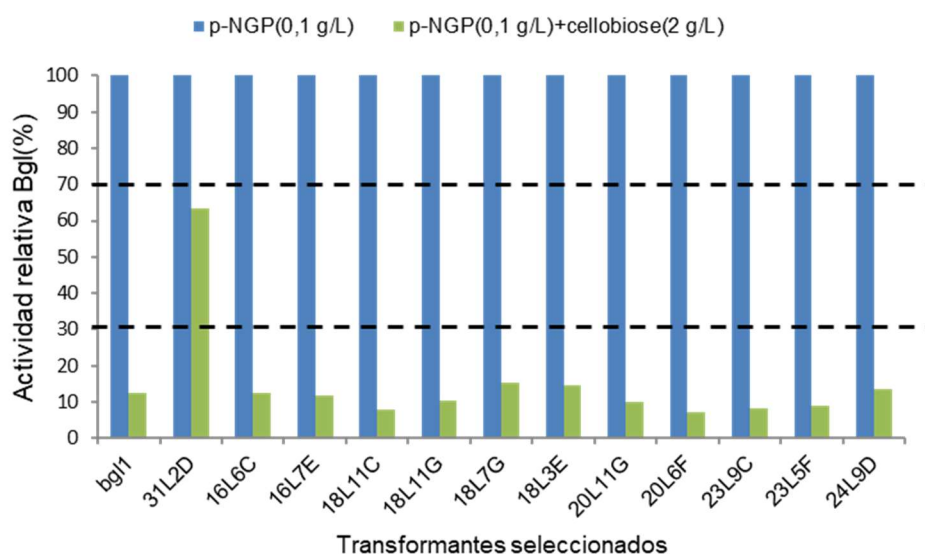


Figura 42. Actividad BGL relativa (%) a escala matraz de los transformantes seleccionados tras la segunda etapa del escrutinio usando el sustrato pNGP (0,1 g/L) en presencia y en ausencia de celobiosa (2g/L). *bgl1*: transformante con el gen nativo como referencia y control interno de cada placa.

4.2.4. Determinación de la secuencia del mutante 31L2D

Para determinar la secuencia del gen *bgl1* expresado en el mutante seleccionado 31L2D, se amplificó el gen a partir del ADN genómico usando los oligos 16-F y 16-R (Tabla 3) y se clonó en el vector de expresión pBASE1, descrito en el Apartado 3.5.6. de Materiales y Métodos, mediante las enzimas de restricción *SacI* y *BamHI*. Desde este plásmido se secuenció el gen *bgl1*.

El gen secuenciado mostró una única mutación: la guanina de la posición 633 de la secuencia de nucleótidos de *bgl1* nativo se había mutado a timina, dando como

resultado una secuencia de nucleótidos que codificaba una proteína en la que la glutamina (Q) en el residuo 211 se había sustituido por histidina (H). Por tanto, el clon 31L2D expresa una versión mutada de Bgl1 denominada a partir de ahora Bgl1Q211H. En la Figura 43 se muestra el residuo mutado en la secuencia de nucleótidos de *bgl1Q211H* y en su secuencia de aminoácidos deducida.

A

```

Bgl1          TTTATTGGAAACGAGCAGGAGCACTTCAGACAG633STGCCAGAAGCCCAGGGATACGGTTAC 660
Bgl1Q211H    TTTATTGGAAACGAGCAGGAGCACTTCAGACAT633STGCCAGAAGCCCAGGGATACGGTTAC 660
*****
  
```

B

```

Bgl1          GMSETIKGIQDAGVIACAKHFIGNEQE211HF211QVPEAQGYGYNISETLSSNIDDKTMHELYL 240
Bgl1Q211H    GMSETIKGIQDAGVIACAKHFIGNEQE211HF211HVPEAQGYGYNISETLSSNIDDKTMHELYL 240
*****
  
```

Figura 43. A) Zona de alineamiento de secuencia de nucleótidos de *bgl1Q211H* (del mutante 31L2D) con *bgl1* (nativo) donde se encuentra el residuo mutado. Se señala la mutación de guanina (G) a timina (T) en la posición 633 (en rojo y enmarcado). B) Zona de alineamiento de secuencias de aminoácidos de Bgl1Q211H y Bgl1 nativa donde se encuentra el cambio de aminoácido. Se señala la sustitución de glutamina (Q) por histidina (H) en el residuo 211 (en rojo y enmarcado). Alineamientos realizados con el programa Clustal Omega (Sievers y col., 2011).

Con el fin de confirmar el fenotipo observado en la cepa 31L2D de baja actividad de transglicosilación, se transformó el plásmido pABC410 en AB1. La transformación y la medida de actividad de transglicosilación se realizaron como se describe en los apartados de Materiales y Métodos 3.4.2. y 3.13.3., respectivamente.

Todos los transformantes que expresaban *bgl1Q211H* mostraron menor actividad de transglicosilación al igual que la cepa 31L2D (Figura 44).

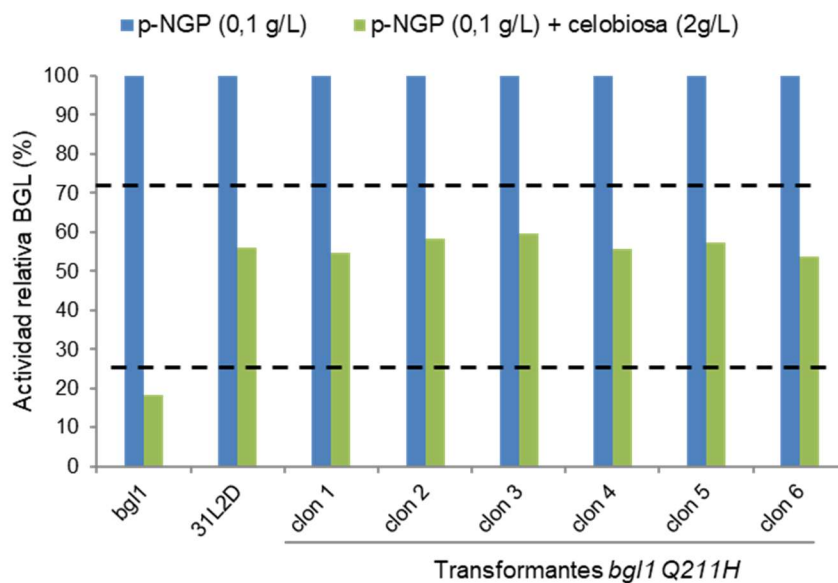


Figura 44. Actividad BGL relativa (%) a escala matraz de los transformantes que expresaban *bgl1Q211H* usando el sustrato pNGP (0,1 g/L) en presencia y en ausencia de celobiosa (2g/L). *bgl1*: transformante con el gen nativo como referencia y control interno de cada placa.

4.2.5. Análisis comparativo de Bgl1 nativa y Bgl1Q211H mutante

4.2.5.1. Purificación de las enzimas Bgl1 y Bgl1Q211H

Ambas enzimas, la enzima nativa Bgl1 y la Bgl1Q211H mutante se purificaron con el fin de llevar a cabo un análisis comparativo entre ellas. Las enzimas purificadas fueron cedidas por el departamento de Bioquímica de Abengoa Bioenergía Nuevas Tecnologías.

Como comprobación, las BGL purificadas se cargaron en electroforesis en gel (SDS-PAGE) al 7,5% de acrilamida (Figura 45). De acuerdo con la secuencia Bgl1, se espera que esta enzima tenga un tamaño molecular de 93 kDa, sin embargo, para ambas muestras se detecta una sola banda de 116 kDa. Esto puede ser debido a que las glicosil hidrolasas fúngicas, al igual que otras enzimas, a menudo están glicosiladas. De hecho, la glicosilación es la modificación postraduccional más frecuente en estas proteínas (Karnaouri y col., 2014).

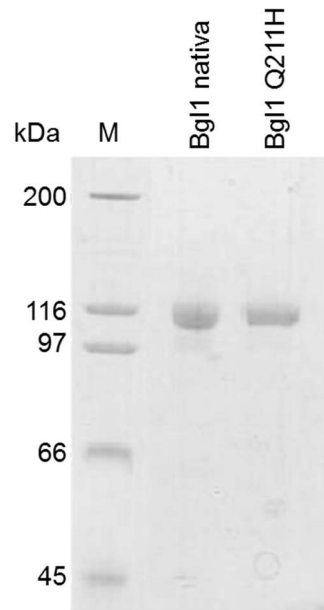


Figura 45. SDS-PAGE de las enzimas β -glucosidasas purificadas. Se cargaron 20 μ g de proteína en cada carril. Carril 1: Marcador; Carril 2: proteína Bgl1 nativa; Carril 3: proteína madura Bgl1Q211H.

4.2.5.2. Perfiles de transglicosilación de la enzima Bgl1 nativa y la Bgl1Q211H

El estudio comparativo de transglicosilación de ambas enzimas, Bgl1 nativa y Bgl1Q211H mutante, se realizó mediante el ensayo de actividad descrito en el Apartado 3.13.3. de Materiales y Métodos. Este ensayo permitía estimar la capacidad de transglicosilación de la enzima mediante la medida de la actividad BGL en presencia y ausencia del sustrato celobiosa. Para una evaluación más profunda se midió esta actividad a concentraciones crecientes de celobiosa (Figura 46). Ambas enzimas disminuyeron su actividad conforme aumentaba la concentración de celobiosa, pero la enzima mutante Bgl1Q211H mantuvo su actividad BGL en torno a un 30% más que la enzima nativa a todas las concentraciones de celobiosa probadas.

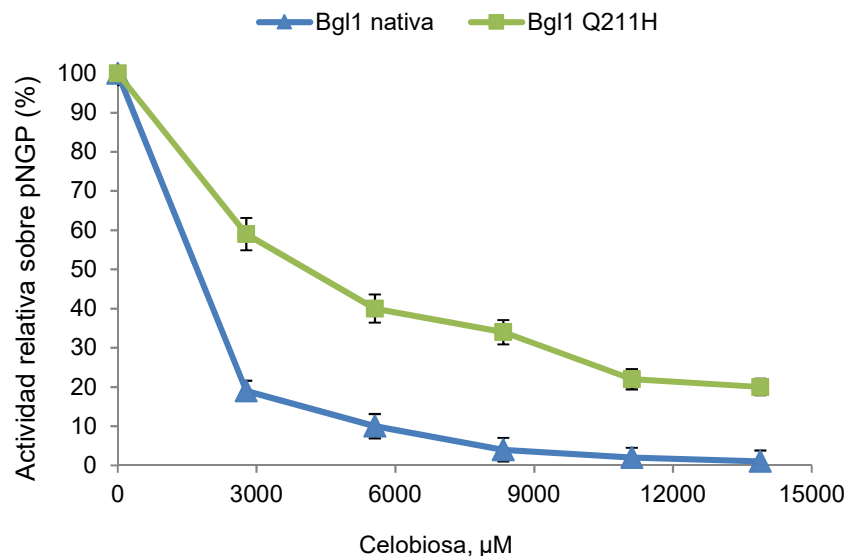


Figura 46. Perfiles de transglicosilación de la enzima Bgl1 y la proteína madura de Bgl1Q211H. Todas las mediciones se analizaron por triplicado y las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Con el fin de comprobar si estos resultados se correlacionaban con la capacidad de transglicosilación real, se desarrollaron ensayos de medición de la formación real de oligómeros. Para ello se realizó un ensayo de actividad de ambas enzimas en presencia de celobiosa acoplado a HPLC directo como se detalla en el Apartado 3.13.3. de Materiales y Métodos. Los tiempos de retención y el pico de las áreas obtenidas debido a la formación de cada azúcar se muestran en la Figura 47.

La glucosa es el producto de hidrólisis de las β -glucosidasas sobre el sustrato real, la celobiosa. La celotriosa solo se puede formar dentro de una reacción de transglicosilación en la cual una molécula de celobiosa actúa como aceptor para la glucosa retenida en el sitio activo de la enzima Bgl1. La celobiosa puede ser el resultado de (1) sustrato no hidrolizado que permanece en la mezcla de reacción o (2) el producto de una reacción de transglicosilación, siendo la glucosa tanto el aceptor como el donante. Tras la incubación de la proteína mutante de Bgl1Q211H con celobiosa no se determinó celotriosa y, además, se determinó una concentración significativamente menor de celobiosa y mayor de glucosa en comparación con la Bgl1 nativa. Estos resultados demuestran que esta enzima mutante, en comparación con la nativa, tiene una capacidad de transglicosilación reducida al mismo tiempo que una actividad hidrolítica mejorada a concentraciones elevadas de celobiosa.

Azúcar	Tiempo de retención (min)	Área relativa (%)	
		Bgl1	Bgl1Q211H
Glucosa	9,23	59,13	78,81
Celobiosa	7,49	38,36	21,18
Celotriosa	6,79	2,50	0,00

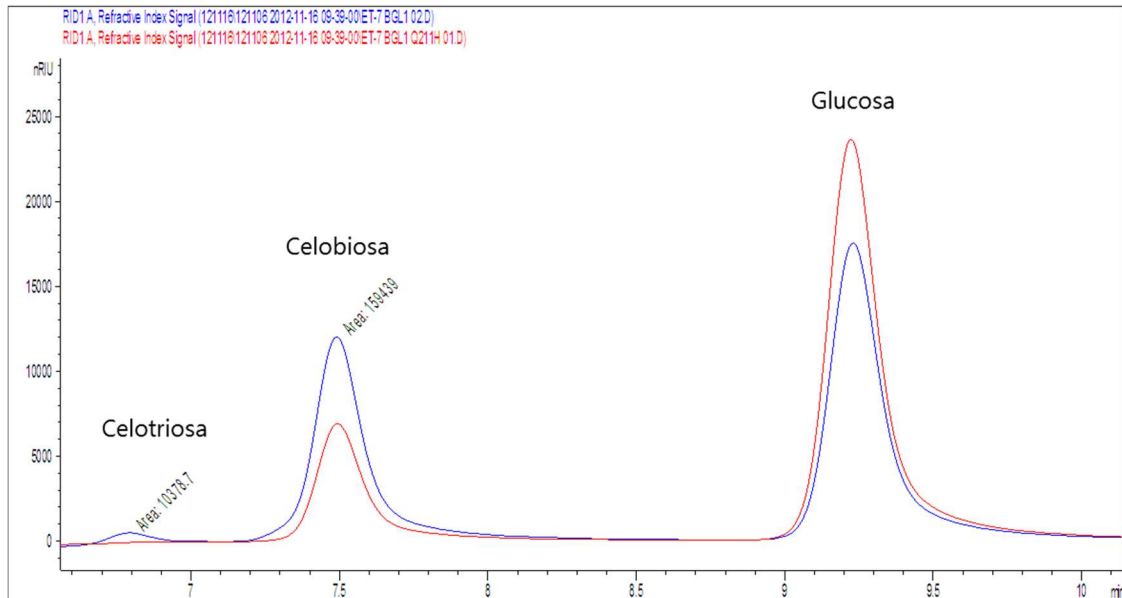


Figura 47. Tiempos de retención y áreas relativas para los azúcares detectados tras el ensayo de transglicosilación. El área relativa representa el porcentaje de cada azúcar en la concentración total en la mezcla de reacción tras el ensayo de transglicosilación. Línea azul: Bgl1 nativa; Línea roja: Bgl1Q211H.

4.2.5.3. Determinación de la temperatura de desnaturalización y estudios de estabilidad en condiciones de hidrólisis de biomasa.

La enzima Bgl1 y Bgl1Q211H mutante purificadas se analizaron en términos de estabilidad térmica en base al ensayo con el sustrato pNGP. Se llevaron a cabo dos tipos de ensayos para la determinación de: (1) la temperatura de desnaturalización y (2) la estabilidad en condiciones de hidrólisis de la biomasa.

Para la determinación de la temperatura de desnaturalización, las enzimas purificadas se incubaron durante 10 minutos a temperaturas que variaban entre 30 y 80 °C, después, se realizaron ensayos convencionales de actividad hidrolítica sobre pNGP (Materiales y Métodos, Apartado 3.13.1.). La actividad se representó como porcentaje relativo. Con estos estudios se puede calcular un parámetro característico, la temperatura media de desnaturalización ($T_{1/2}$) por el cual se determina la temperatura responsable de un 50% de pérdida de actividad enzimática. Los resultados se muestran en la Figura 48.

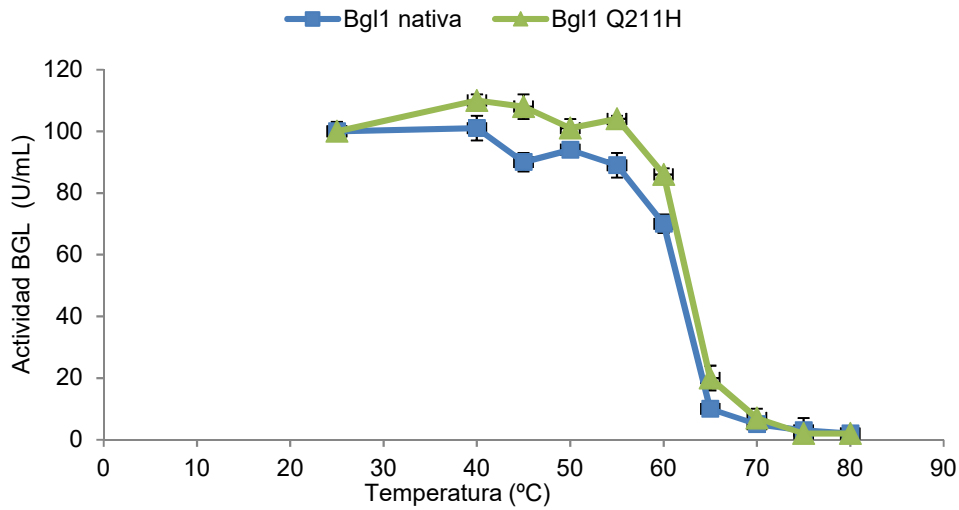


Figura 48. Determinación de la temperatura de desnaturalización de la enzima Bgl1 nativa y la proteína mutante Bgl1Q211H

En el estudio de estabilidad en condiciones de hidrólisis de la biomasa, las mezclas de reacción conteniendo 0,1 mg de enzima purificada y 100 μ mol de tampón acetato sódico (pH 5,0) se incubaron a 50 °C durante 72 horas y en condiciones de agitación. Se tomaron muestras a 24 y 48 horas y se realizaron ensayos de actividad BGL sobre pNGP como se indica en el apartado 3.13.1. de Materiales y Métodos convencionales. Los resultados se muestran en la Figura 49.

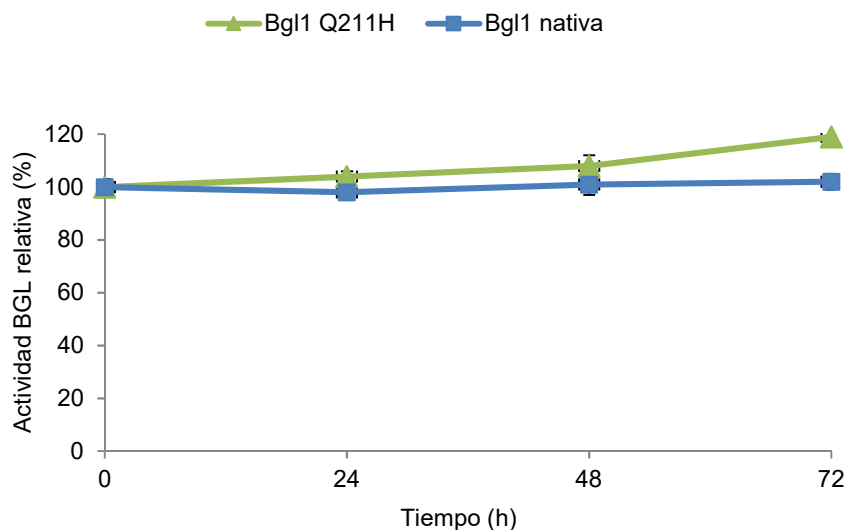


Figura 49. Resistencia térmica en condiciones de hidrólisis de la biomasa de la enzima Bgl1 nativa y la proteína mutante Bgl1Q211H. Todas las mediciones se analizaron por triplicado y las barras de error corresponden a la desviación estándar.

No se observaron diferencias significativas en términos de temperatura de desnaturalización entre Bgl1 y la proteína madura de Bgl1Q211H. La $T_{1/2}$ fue de 65 °C para la enzima Bgl1 nativa y 62°C para la proteína Bgl1Q211H madura, ambas por encima de 50 °C, que es la temperatura de hidrólisis de la biomasa. Respecto a la estabilidad térmica en las condiciones de hidrólisis de biomasa ambas enzimas permanecieron activas tras 72 h a 50 °C.

5 DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. Optimización de la composición enzimática de *M. thermophila* C1 para la hidrólisis de biomasa lignocelulósica

Como se ha mencionado en la Introducción, la biomasa lignocelulósica, que consiste principalmente en celulosa, hemicelulosa y lignina, es la fuente renovable más abundante para la producción de biocombustible y productos de biorrefinería. El uso industrial de la biomasa vegetal implica pasos previos de pretratamiento fisicoquímico para hacer que el material sea más susceptible a la hidrólisis enzimática. Esta etapa de hidrólisis y el costo de producción de enzimas sigue representando el mayor cuello de botella, principalmente porque los cócteles enzimáticos producidos por los organismos degradadores de celulosa no están optimizados para las condiciones industriales (Kubicek y col., 2016). Este trabajo de Tesis se centra en la mejora de la etapa de hidrólisis enzimática, y más concretamente en aumentar la eficiencia del cóctel enzimático para incrementar los rendimientos de azúcares fermentables con la menor dosis de enzima posible. Las estrategias que se han seguido por otros investigadores para mejorar la eficiencia de los cócteles se basan principalmente en: (1) la mejora de la eficiencia individual de las enzimas celulolíticas y (2) la optimización de los cócteles enzimáticos que contienen dichas enzimas (Zhao y col., 2016).

De cara a la mejora del cóctel enzimático de *M. thermophila* es importante considerar que la secuenciación de su genoma permitió identificar un gran número de genes que codifican enzimas industrialmente relevantes. Entre ellas, se determinaron más de 200 secuencias de enzimas degradadoras de pared celular de plantas: celulasas, hemicelulasas y enzimas accesorias. En estudios recientes de nuestro laboratorio sobre el cóctel celulolítico producido por la cepa industrial *M. thermophila* C1 se han identificado 27 proteínas reconocidas claramente como glicosil hidrolasas extracelulares (Tabla 16) de un total de 79 proteínas (Reyes-Sosa y col., 2017). En cuanto a masa, las glicosil hidrolasas identificadas representaron más del 81,4% del total de proteínas en el cóctel mientras que el resto de proteínas representaron el 18,6%.

A pesar de que anteriormente se había descrito que *M. thermophila* producía un cóctel de celulasas muy diverso (Berka y col., 2011), este análisis muestra que el cóctel producido por la cepa C1 en condiciones industriales optimizadas no es tan diverso como el de la cepa silvestre. De cualquier forma, estos análisis no muestran la diversidad de isoformas funcionales que pueden encontrarse tras modificaciones postraduccionales como la glicosilación. Estas proteínas fueron identificadas por su secuencia de aminoácidos (LC-MS/MS) y es muy posible la existencia de varias isoformas, como se describe para muchas proteínas secretadas por hongos (Gusakov y col., 2008).

Tabla 16. Enzimas identificadas en *M. thermophila* C1 activas para carbohidratos (Extraído de Reyes-Sosa y col., 2017).

Actividad principal	Familia glicosil hidrolasa
β -glucosidasas/ β -xilosidasas	3
Endoglucanasas	5
Endoglucanasas/Celobiohidrolasas tipo II	6
Celobiohidrolasas tipo I	7
Endoxilanasas	10
Endoglucanasas/xiloglucanasas	12
β -N-acetil-glucosaminidasas	18
Endoglucanasas	45
Polisacárido monooxigenasas	61
α -glucanasas	71
Xiloglucanasas	74
Arabinobiosidasas	93

Tradicionalmente, los estudios para la mejora de cócteles celulolíticos han ido dirigidos a la obtención de organismos modificados genéticamente que presenten una expresión incrementada de las principales enzimas, respecto a las cepas parentales o silvestres no modificadas, para incrementar el rendimiento del proceso de degradación de la biomasa. No obstante, esta estrategia puede tener su obstáculo en la diversidad natural de los microorganismos productores. En general, estos microorganismos expresan toda una variedad de enzimas celulolíticas con actividades enzimáticas a menudo solapantes y redundantes, que permiten al microorganismo adaptarse a las condiciones cambiantes de su medio ambiente (Glass y col., 2013). Sin embargo, en las condiciones industriales en las que se emplean estos cócteles enzimáticos no hay tal variedad de condiciones cambiantes, sino que, por el contrario, son controladas y predefinidas. En las condiciones de reacción industrial sólo unas pocas de las enzimas van a ser capaces de contribuir a la eficiencia de la reacción. Por tanto, para llevar a cabo la hidrólisis de biomasa lignocelulósica a escala industrial no es necesaria esta diversidad enzimática. Por este motivo, la expresión del resto de enzimas redundantes y con limitada actividad es prescindible y se podría eliminar. Desde un punto de vista económico del proceso, si se eliminaran estas enzimas ineficientes, se conseguiría reducir la cantidad (y por ello el coste) necesario de cóctel enzimático para los procesos industriales o, lo que es lo mismo, la eficiencia del cóctel enzimático aumentaría al contar con mayor representación de las enzimas eficientes.

Un ejemplo de este planteamiento se puede ver en los estudios realizados por Kumar y Murthy (2016) donde se estableció un cóctel enzimático óptimo y hecho a medida para un sustrato específico al probar diferentes combinaciones y proporciones de un reducido número de enzimas puras de diferentes organismos. Además, otros estudios como el de Gusakov y col. (2011) ya demostraron que los cócteles naturales tienen un rango de mejora amplio y que no están optimizados para materiales o condiciones específicas.

Por tanto, para aplicaciones industriales es deseable generar microorganismos que expresen una menor diversidad de enzimas celulolíticas para dar lugar a un cóctel enzimático óptimo, con menor número de enzimas ineficientes (no contributivas) y mayor proporción de las eficientes (contributivas) para mejorar el rendimiento del proceso de degradación de la biomasa en comparación con los cócteles naturales con mayor diversidad, pero menor eficiencia. Además, una mayor eficiencia conlleva el uso de menor dosis de cóctel enzimático para la obtención de los mismos rendimientos en dichos procesos (Díez y col., 2016)

En este trabajo se diseñó un programa de mejora del organismo productor *M. thermophila* C1 basado en este planteamiento donde se abordó la eliminación de enzimas menos eficientes del cóctel para favorecer la proporción de las enzimas contributivas y aumentar el rendimiento del proceso de hidrólisis de biomasa celulósica.

5.1.1. La enzima Chi2 en el cóctel enzimático de *M. thermophila* C1

En el cóctel extracelular de *M. thermophila* C1 se han identificado numerosas proteínas no celulolíticas. Visser y col. (2011) identificaron algunas de estas proteínas secretadas en gran cantidad. Las principales fueron una serín proteasa (Alp1) de 31 kDa, una endoquitinasa (Chi1) de 45 kDa y una exoquitinasa (Chi2) de 70 kDa. Las quitinasas son enzimas no celulolíticas capaces de hidrolizar la quitina, uno de los polímeros naturales más abundantes después de la celulosa, en sus componentes oligo y monoméricos (Krolicka, 2015). En concreto catalizan la hidrólisis de uniones N-acetil- β -D-glucosaminida y β -1,4 en quitina y quitodextrinas pero no en polímeros de celulosa. Tras esta identificación, este grupo delecionó la proteasa Alp1 y la endoquitinasa Chi1 con la intención de reducir el fondo de proteína extracelular que no participa en la degradación de biomasa celulósica. Con el mismo propósito, en esta Tesis se decidió llevar a cabo la deleción de la enzima exoquitinasa 2 (Chi2) en la cepa AB2 derivada de *M. thermophila* C1. Según la cuantificación llevada a cabo en estudios previos por nuestro grupo, la quitinasa 2 era una de las enzimas no celulolíticas más representadas en el cóctel secretado por AB2, suponiendo un 9% de la proteína total presente en el cóctel.

5.1.2. La enzima Eg6 en el cóctel enzimático de *M. thermophila* C1

En el cóctel producido por *M. thermophila* C1 se han identificado varias enzimas con actividad endoglucanasa, entre ellas las tres principales: EG II, V y VI (Bukhtojarov y col., 2004). Gusakov y col. (2007) ya demostraron de manera artificial la calidad de estas enzimas en ensayos de conversión de diferentes sustratos celulósicos en glucosa. La endoglucanasa Eg2 (EG II) es la enzima más activa en las condiciones industriales de hidrólisis de biomasa. En términos de abundancia en el cóctel de enzimas secretado

por *M. thermophila* C1, la enzima Eg6 (EG VI) junto con la Eg2 se encuentran en mayor proporción que el resto de endoglucanasas presentes en el cóctel, cuya presencia es bastante menor. En concreto, Eg6 tienen una representación de aproximadamente un 4% en la composición total de enzimas extracelulares cuando el cóctel se produce conforme a las condiciones industriales en un fermentador de 30 L.

Como parte del programa de desarrollo de un cóctel celulolítico óptimo mediante la eliminación de enzimas que no contribuyan al rendimiento de hidrólisis, se evaluó la contribución de Eg6 en el cóctel enzimático como posible enzima candidata a eliminar por su posible actividad limitada o actividad redundante. Se comparó con la Eg2, la endoglucanasa más eficiente ante el sustrato celulósico utilizado en este trabajo.

Para determinar la contribución de esta enzima a la hidrólisis de biomasa lignocelulósica, se realizaron ensayos de suplementación del cóctel mínimo con la enzima Eg6 purificada en condiciones que reproducían la reacción de hidrólisis industrial. El cóctel mínimo estaba compuesto por las celulasas principales purificadas, Bgl1, Cbh1, Cbh4 y Eg2 (también denominadas en otras publicaciones como BGL I, CBH Ia, CBH IIb y Eg II respectivamente (Gusakov y col., 2007)), que comprendían las actividades mínimas necesarias para la hidrólisis de biomasa y, ajustadas en la dosis y combinación óptimas para reproducir el cóctel enzimático completo de forma más simplificada (Benítez, 2017).

Para este trabajo, se consideró contributiva aquella enzima que suplementada al cóctel era capaz de liberar al menos la misma cantidad de glucosa que un suplemento con la misma dosis de cóctel mínimo. Una enzima que rinde menos que el cóctel mínimo a la misma dosis se consideró no contributiva. El resultado de estos ensayos se resume en la Figura 34 de Resultados donde se observa que, por un lado, la adición de Eg6 a la reacción no resultó en un incremento de liberación de glucosa produciendo asimismo un efecto negativo, es decir, liberó un 7% menos de glucosa que el cóctel sin suplementar. Este resultado puede ser debido a que la enzima no es contributiva o es poco eficiente, o que la adición de Eg6 en exceso provoca un efecto negativo en la reacción. Por otro lado, la sustitución de la endoglucanasa Eg2 por Eg6 se tradujo en una bajada de más de un 21% de rendimiento de glucosa. Este resultado confirma que la Eg6 es una endoglucanasa menos eficiente y menos activa que Eg2 ante el sustrato de interés y en las condiciones de reacción industrial.

Cabe recordar que otros parámetros como la sinergia entre enzimas, una composición diferente del cóctel, la dosis, las condiciones del proceso y sustratos específicos puede cambiar la contribución o la eficiencia de una enzima (Woodward, 1991; Gusakov y col., 2007).

En base a estos resultados y considerando su alta representación en el cóctel secretado por AB2, la enzima celulolítica Eg6 fue considerada como candidata a eliminar

del cóctel debido a su actividad redundante y baja eficiencia con el fin de favorecer la presencia de las enzimas contributivas que existen en el cóctel.

5.2. Eliminación de los genes *chi2* y *eg6* que codifican enzimas no contributivas en el cóctel enzimático producido por *M. thermophila* C1

La estrategia usada para la eliminación de ambos genes en el genoma de AB2 fue la deleción dirigida y secuencial mediante el uso de construcciones genéticas (casetes de deleción) usando el marcador de selección reutilizable *amdS*. Esta herramienta permitió la eliminación del gen mediante el intercambio del marcador *amdS* por el gen diana mediante recombinación de secuencias homólogas. La ventaja del uso del marcador de selección *amdS* en esta estrategia es que tras la selección de la cepa delecionada en medio con acetamida, este marcador pudo ser eliminado mediante contraselección en fluoroacetamida dando como resultado una cepa delecionada libre de marcadores (Debets y col., 1990). Además, esto permitió la posibilidad de reutilizar el marcador en la misma cepa para llevar a cabo las dos deleciones de forma secuencial. Para este mismo fin se pueden seguir otras estrategias comparables descritas en la bibliografía, como la eliminación del marcador *pyr4* o *pyr5* mediante contraselección en 5-FOA (Hartl y Seiboth, 2005). Otra estrategia similar muy utilizada por los investigadores es el sistema de eliminación de una secuencia específica de ADN mediante el uso de una recombinasa, como por ejemplo el sistema Cre/loxP (Martínez-Anaya y col., 2008).

El uso de la recombinación homóloga como estrategia para la deleción de genes en *M. thermophila* tiene el inconveniente de las bajas frecuencias de recombinación, en torno al 1-2%, debido a la integración de los casetes de deleción de forma no homóloga en el genoma. Para mejorar la tasa de deleción o disrupción dirigida de genes, Visser y col. (2011) generaron cepas de C1 defectuosas en el componente KU70 ($\Delta ku70$) de la vía de recombinación no homóloga (en inglés, *nonhomologous end-joining*, NHEJ). Esta ruta repara roturas en la doble cadena de ADN mediante unión de extremos no homólogos mientras que la recombinación homóloga requiere de secuencias homólogas para realizar esta reparación (Moore y col., 1996). Usando estas cepas $\Delta ku70$, se han demostrado casos en otros hongos de la mejora de las tasas de recombinación con integración homóloga de hasta un 78% y sin recombinación no homóloga observada (Meyer y col., 2008). El inconveniente de usar cepas $\Delta ku70$ es que no facilita la introducción de múltiples copias de genes debido a su defecto en la vía de recombinación no homóloga (van Zeijl y col., 2009).

5.3. Rendimiento de los cócteles enzimáticos sin las enzimas Chi2 y Eg6

Los genes *chi2* y *eg6* se eliminaron de forma secuencial para probar los efectos en el rendimiento de hidrólisis de biomasa tras la eliminación de estas enzimas que aparentemente son no contributivas o menos eficientes. Para ello, los azúcares fermentables liberados después de la hidrólisis enzimática de PCS usando los cócteles producidos por ambas cepas delecionadas se compararon con el cóctel producido por la cepa parental.

5.3.1. Efecto de la deleción del gen *chi2*

Se comparó la liberación de azúcares fermentables de la cepa AB2 Δ *chi2* con su cepa parental. Los resultados mostraron que la deleción de la enzima no celulolítica Chi2 provoca un incremento en la capacidad de sacarificación de la cepa, en torno a un 15%, con respecto a su cepa parental que sí expresa la Chi2. Este resultado fue visible en producción a escala de 30 L mientras que en matraz, producción en 40 mL, no se observaron diferencias significativas en el rendimiento de liberación de glucosa entre ambas cepas. La posible explicación de esta diferencia de rendimientos a diferentes escalas es la diferente cantidad o proporción de enzima Chi2 producida en ambas escalas. Mientras que la representación de Chi2 en producciones del cóctel en 30 L es de aproximadamente 9% (Figura 30 de Resultados), en producciones llevadas a cabo en 40 mL en matraz es mucho menor (Figura 27 de Resultados). La explicación de este fenómeno puede deberse a las diferentes condiciones del proceso en lote (*batch*) en que se realiza la fermentación en matraz frente al lote alimentado (*fed-batch*) del fermentador, así como otros parámetros como el control de pH, aireación, etc., que pueden afectar a diferencias en la expresión de las enzimas individuales.

De estos resultados se obtienen dos conclusiones principales: (1) la enzima quitinasa 2, además de no participar en la degradación de biomasa celulósica, no aporta nada a la composición enzimática y su eliminación no afecta a la secreción de otras proteínas ni a la actividad de hidrólisis, (2) la eliminación de esta enzima con significativa presencia extracelular da lugar a mayor representación del resto de las enzimas, incluyendo las contributivas y, en consecuencia, mayor eficiencia de hidrólisis enzimática. La posible explicación para este hecho es el aumento proporcional de la concentración de las enzimas secretadas gracias a la redistribución de la capacidad productiva del organismo.

Estos resultados proporcionan una buena expectativa para aumentar la calidad de este cóctel enzimático como parte del programa de mejora, donde la deleción de genes que expresan proteínas que están presentes en el caldo secretado por el hongo, pero que no participan en la hidrólisis de biomasa celulósica, inducen a una

representación mayor de las enzimas contributivas y aumenta el rendimiento de liberación de azúcares fermentables.

5.3.2. Efecto de la delección del gen *eg6*

De la misma forma, se comparó la liberación de azúcares fermentables de la cepa AB2 $\Delta chi2 \Delta eg6$ con su cepa parental. Los resultados obtenidos mostraron que la delección de la enzima celulolítica Eg6 provocó un aumento en el rendimiento de liberación de glucosa de aproximadamente un 10% con respecto a su cepa parental conteniendo Eg6. Al igual que pasó durante la evaluación funcional de la delección de *chi2*, este resultado fue visible en producción a escala de 30 L mientras que en matraz, aunque se intuía un leve aumento de liberación de glucosa por parte de AB2 $\Delta chi2 \Delta eg6$ (en torno a 2 g/Kg más), este resultado era poco significativo estadísticamente y no se pudo concluir un dictamen claro sobre el efecto de la delección a esta escala. La explicación de esta diferencia de rendimientos a diferentes escalas se basa en lo mismo indicado anteriormente, la cantidad de enzima Eg6 producida. En producción en matraz, la banda correspondiente a Eg6 prácticamente no se aprecia en el perfil de proteínas de la composición secretada. Por el contrario, en producción en fermentador a escala de 30 L, la cantidad producida de esta enzima es mayor observándose en el perfil de proteínas correspondiente (Figura 39 frente a 36).

En definitiva, este resultado sugiere que la enzima delecionada Eg6 se identificó correctamente como celulasa no contributiva dando como resultado la producción de un cóctel más eficiente y de mayor calidad. No obstante, el éxito de la modificación de la diversidad de celulasas en un cóctel enzimático como este no depende sólo de la composición del cóctel en sí, sino que también depende en gran medida de las condiciones de hidrólisis y del sustrato utilizado. En este sentido, esta estrategia de eliminación de actividades enzimáticas redundantes y enzimas celulolíticas menos eficientes se confirma como buen planteamiento para optimizar la composición de un cóctel industrial para un sustrato y unas condiciones determinadas.

Esta táctica de adaptación de la composición de la mezcla enzimática para obtener cócteles enzimáticos a medida para un sustrato y unas condiciones específicas, ha sido probada también por este grupo en *M. thermophila* C1 contra otros sustratos como la caña de azúcar pretratada. Estas adaptaciones se han realizado con otras familias de glicosil hidrolasas y en diferentes condiciones de reacción que demuestran que los cócteles con una diversidad de celulasas reducida conteniendo las enzimas más contributivas en detrimento de las menos contributivas, es una estrategia exitosa para el desarrollo de cócteles multienzimáticos para determinadas aplicaciones. Por ejemplo, para aplicaciones como en la industria textil y de lavandería, es particularmente importante la manipulación o eliminación de la producción de ciertos componentes de celulasas que pueden dañar los tejidos (Galante y col., 2014).

5.3.3. Deleción frente a sobreexpresión de genes para la optimización del cóctel enzimático

Aunque muchos de los esfuerzos realizados para mejorar la eficiencia de los cócteles han ido dirigidos a la sobreexpresión de celulasas y se han conseguido grandes resultados (Kanna y col., 2011; Dashtban y Qin, 2012; Zhang y col., 2010), en varias publicaciones se puede ver como este hecho puede conducir a una menor expresión de otras celulasas. Por ejemplo, Miettinen-Oinonen y col. (2005) en su búsqueda de combinaciones de celulasas adecuadas en *T. reesei* para su uso en la industria textil del algodón, construyeron varias cepas con sobreexpresión de celobiohidrolasas y observaron como en los transformantes que sobreexpresaban tanto CBHI como CBHII la cantidad de proteína producida de otras celulasas fue menor que la producida por la cepa nativa. De la misma forma, Zhang y col. (2010) observaron el mismo fenómeno tras la sobreexpresión de una β -glucosidasa extracelular (BLG I) en *T. reesei*, limitante en esta actividad. Aunque sus resultados mostraron que las cepas que sobreexpresaban BGL I dieron lugar a un cóctel enzimático más eficiente en sacarificación del sustrato celulósico, detectaron una actividad celobiohidrolasa más baja en todos los transformantes que sobreexpresaban BGL I. Las razones por las que la sobreexpresión de algunas celulasas disminuye la producción de otras pueden incluir: competencia entre promotores por activadores de la transcripción, limitación de algunos factores de transcripción de un promotor que controla la expresión de varios genes o competencia entre enzimas en procesos de secreción y síntesis de proteína, aunque ninguna se ha evidenciado de forma clara (Liu y col., 2013).

Desde otra perspectiva, Saloheimo y Pakula (2012) vieron reflejado este hallazgo en un análisis del secretoma de *T. reesei* mediante la deleción de cuatro genes principales de celulasas: *cbh1*, *cbh2*, *egl1* y *egl2*. Esto resultó en una mayor producción de otras enzimas lignocelulolíticas en comparación con la cepa parental, indicando que cuando se eliminan los principales genes de las enzimas celulasas, se producen otras enzimas en niveles más altos.

En estos casos también hay que tener en consideración que los transformantes con múltiples copias de un mismo gen en hongos filamentosos, aunque resultan en mayores niveles de producción de proteína, puede haber variaciones considerables en los niveles de producción entre transformantes con número de copias de genes comparables. Esto quiere decir que, además del número de copia de genes, el sitio de integración también puede afectar a la expresión de genes y, por tanto, a los niveles y la eficacia de producción de proteínas (Verdoes y col., 1995).

Estos datos reportados por otros grupos junto con los resultados obtenidos en esta tesis fundamentan que el planteamiento adoptado en este trabajo para optimizar un cóctel enzimático para unas determinadas condiciones es adecuado. Es decir, la eliminación de enzimas con alta representación en el cóctel enzimático y que no contribuyan a la eficiencia de hidrólisis o que sean enzimas prescindibles o con actividad

redundante puede favorecer la producción y secreción de otras enzimas que sí lo son, aumentando de esa manera el rendimiento de sacarificación.

En vista de la dificultad que supone la optimización de un cóctel enzimático para aplicaciones específicas, un diseño apropiado para el desarrollo de cepas con este objetivo puede ser la combinación de ambas estrategias de manera racional, es decir, la combinación de la sobreexpresión de actividades necesarias limitantes y la eliminación de aquellas prescindibles. Además una línea de desarrollo interesante sería contactar la investigación del bioproceso de producción de proteínas con estudios de la capacidad de secreción del microorganismo.

5.4. Mejora de la actividad de la enzima Bgl1 producida por *M. thermophila* C1

Las enzimas β -glucosidasas (BGL) son esenciales para una hidrólisis eficiente de biomasa celulósica ya que actúan hidrolizando la celobiosa a monómeros de glucosa impidiendo además la inhibición por celobiosa de otras celulasas (Sorensen y col., 2013). Sin embargo, como ya se adelantó en la Introducción, las BGL pueden llegar a ser el cuello de botella del proceso a concentraciones elevadas de sustrato (celobiosa) o de producto (glucosa). Desafortunadamente, la mayoría de las BGL fúngicas caracterizadas funcionan mejor a bajas concentraciones de sustrato, con valores de K_m descritos entre 1-3 mM para la celobiosa (Bohlin y col., 2013; Kawai y col., 2004; Christakopoulos y col., 1994). Por otro lado, las BGL son inhibidas por su propio producto, la glucosa, con valores encontrados de K_i entre 1-10 mM (Xiao y col., 2004; Bohlin y col., 2010) limitando también su aplicación en la industria. Mediante estrategias de mejora, se han identificado BGL tolerantes a la glucosa en diferentes especies fúngicas como *Aspergillus* (Gunata y col., 1999), *Penicillium* (Ramani y col., 2015) y *Trichoderma* (Guo y col., 2016), aunque el mecanismo de tolerancia a glucosa todavía no se conoce con claridad. Además de la sensibilidad a la glucosa, la inhibición de la actividad hidrolítica se observa con frecuencia a concentraciones de sustrato por encima de la K_m , donde se producen reacciones de transglicosilación. Esta reacción ocurre simultáneamente a la reacción de hidrólisis. El equilibrio entre la hidrólisis y la transglicosilación tiene importantes consecuencias para las aplicaciones biotecnológicas. En el contexto de la sacarificación de celulosa o biomasa, la transglicosilación conduce a una disminución en el rendimiento de producción de azúcares fermentables. Este es el caso de la Bgl1 de *M. thermophila* C1, la cual se sabe que tiene una actividad hidrolítica reducida a elevadas concentraciones de celobiosa debido a su alta actividad de transglicosilación. Además, esta enzima también muestra inhibición competitiva por el producto glucosa a altas concentraciones (Benítez, 2017), fenómeno muy común en la inhibición de las BGL por glucosa.

Otras enzimas BGL de diferentes especies de hongos han sido estudiadas en su papel de transglicosilación como por ejemplo una BGL de *Fusarium oxysporum* (Christakopoulos y col., 1994) y otra recientemente de *Trichoderma harzianum* (Florindo

y col., 2018). Un estudio muy completo sobre esta función fue el realizado por Bohlin y col. (2013) con enzimas BGL de diferentes especies (*A. fumigatus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *N. crassa*, entre otros) y analizaron en todas ellas las actividades simultáneas de hidrólisis y transglicosilación. Demostraron que la tasa del proceso hidrolítico, que convierte una celobiosa en dos moléculas de glucosa, disminuye conforme aumenta la concentración de sustrato. En la concentración de sustrato más alta investigada (100 mM de celobiosa), la actividad hidrolítica para las diferentes enzimas disminuyó entre un 10 y un 55% con respecto a su valor máximo. Esta disminución en el proceso de hidrólisis era consecuencia del incremento de la transglicosilación, que convierte dos celobiosas en una glucosa y un trisacárido. Por tanto, concluyeron que la ralentización de la actividad hidrolítica a altas concentraciones de sustrato solamente dependía de un incremento en la actividad de transglicosilación y no una inhibición que retrasara el proceso catalítico.

En la hidrólisis industrial de biomasa se llevan a cabo sacarificaciones con alta carga de sólidos y se generan altas concentraciones de glucosa y celobiosa que pueden inhibir significativamente las BGL. Evitar esta fuerte reducción en la actividad hidrolítica a concentraciones altas de sustrato es crucial para la optimización del proceso y aumentar el rendimiento final.

En base a esto y a que la enzima Bgl1 muestra un elevado perfil de transglicosilación, se decidió buscar una variante de esta enzima con baja capacidad transglicosilante mediante una estrategia de mutagénesis. El objetivo principal de la mutagénesis era reducir la capacidad de transglicosilación sin afectar a la actividad hidrolítica de la β -glucosidasa *per se*.

Cabe mencionar que, aunque la propiedad de transglicosilación de las BGL es una actividad perjudicial para la aplicación industrial de producción de bioetanol de segunda generación, algunas BGL con esta actividad pueden usarse para sintetizar y producir oligosacáridos de alto valor añadido para otras aplicaciones, como por ejemplo los galactooligosacáridos, que son compuestos prebióticos que estimulan el crecimiento de bacterias intestinales beneficiosas (Hassan y col., 2015).

5.4.1. Búsqueda de una enzima Bgl1 mutante con baja capacidad de transglicosilación

Como parte del programa de mejora del cóctel enzimático producido por *M. thermophila* C1 se planteó el reto de obtener una enzima Bgl1 con baja capacidad de transglicosilación sin afectar a su actividad hidrolítica. La estrategia elegida para conseguir este objetivo fue la evolución dirigida de la enzima mediante mutagénesis aleatoria para la generación de librerías génicas y la posterior exploración de las propiedades deseadas. El uso de la evolución dirigida para modificar las celulasas para

aplicaciones industriales se ha demostrado en múltiples casos, como por ejemplo en CBH (Ito y col., 2012), en EG (Wang y col., 2005) y en BGL (Batra y col., 2013; Pei y col., 2011), donde los objetivos de mejora más habituales han sido el incremento de la estabilidad térmica, la actividad a elevadas temperaturas y la modificación del pH óptimo.

Las librerías génicas creadas mediante mutagénesis aleatoria permiten identificar mutaciones beneficiosas cuando no se tiene información estructural o cuando tales mutaciones son difíciles de predecir a partir de la estructura de la proteína para una función determinada. En el caso de la Bgl1, dado que no se conocían cuáles eran los aminoácidos implicados en la función de transglicosilación esta estrategia se consideró como la más adecuada para abordar la mejora de este fenotipo, gracias a su independencia del conocimiento de la estructura proteica o de la interacción entre la enzima y el sustrato.

De manera general, la mutagénesis aleatoria se considera una estrategia adecuada para llevar a cabo experimentos de evolución dirigida y modificar las proteínas para mejorar o alterar sus características. Los requisitos más importantes a la hora de desarrollar esta estrategia son:

- Un organismo hospedador adecuado para la expresión funcional de la enzima a optimizar.
- Un método de generación de diversidad génica lo suficientemente variado como para afrontar el estudio de manera eficaz.
- Un diseño eficiente y sólido del método de exploración (*screening*) para seleccionar de manera fiable la característica enzimática de interés.

5.4.1.1. *M. thermophila* C1 como hospedador para la expresión funcional

Históricamente, los organismos hospedadores más utilizados en experimentos de evolución dirigida han sido *E. coli* y *S. cerevisiae* por su eficiencia de transformación y su tasa de crecimiento. Sin embargo, la expresión de enzimas fúngicas en estos organismos tiene una complicación añadida y es que, muchas de estas enzimas durante su expresión pueden sufrir modificaciones postraduccionales como la glicosilación, el procesamiento proteolítico y, además, muchas de ellas se secretan al medio extracelular. En este sentido, *E. coli* no es un buen candidato para hospedar enzimas fúngicas debido a que su sistema de expresión está limitado en este aspecto y pueden causar bajos niveles de expresión, plegamiento inadecuado y generar cuerpos de inclusión. Por su parte, la levadura *S. cerevisiae* tiene una maquinaria celular más próxima a la del hongo y ha sido profusamente utilizada como organismo hospedador para expresar enzimas fúngicas. La levadura tiene la ventaja de que posee una maquinaria de expresión eucariota y tiene la habilidad de glicosilar y secretar proteínas al medio. Un ejemplo de evolución dirigida llevada a cabo en *S. cerevisiae* es el descrito

por Larue y col. (2016) sobre una BGL de *A. niger* con el objetivo de obtener una variante mejorada en su capacidad de hidrólisis de biomasa celulósica. Sin embargo, la utilización de levaduras para la evolución de enzimas de hongos filamentosos posee limitaciones importantes como el bajo nivel de expresión y el diferente patrón de glicosilación que afecta a la actividad de la enzima.

Teniendo en cuenta estas limitaciones y dado que se dispone de un sistema de transformación eficiente para *M. thermophila* C1, se decidió realizar la expresión funcional de los mutantes de *bgl1* en el mismo organismo productor, utilizando la cepa AB1 debido a su bajo nivel de Bgl1 endógena, para evitar interferencia con la detección de las versiones mutadas. Esto facilitaría además mantener las modificaciones post-traduccionales necesarias y asegurar la correcta y abundante secreción de la enzima. Aunque los hongos filamentosos no han sido frecuentemente utilizados para afrontar este tipo de experimentos, los avances en las técnicas de transformación y en los métodos de *screening* están haciendo visible su enorme potencial para ser empleados como huéspedes en la expresión de genes heterólogos (Record y col., 2002; Selig y col., 2008; Singh y col., 2015).

5.4.1.2. Generación de librerías de mutantes de *bgl1*

La enzima Bgl1 de *M. thermophila* C1 tiene una secuencia génica que consta de 2613 pb y codifica un polipéptido de 870 aminoácidos que conforman un dominio N terminal, un dominio C terminal y un dominio tipo fibronectina tipo III (Zhao y col., 2015). Los primeros 19 aminoácidos corresponden a un péptido señal que dirige a la preproteína hacia la ruta de secreción y que es procesado posteriormente dando lugar a la proteína extracelular madura.

En la presente Tesis Doctoral se planteó la generación de librerías de mutantes del gen *bgl1* mediante mutagénesis al azar usando la PCR propensa a errores. Esta es una técnica de mutagénesis aleatoria para generar sustituciones de aminoácidos en proteínas, dominios u otros elementos como promotores mediante la introducción de mutaciones durante la PCR. Sin embargo, esta puede ser una técnica laboriosa y difícil debido a la generación de mutaciones en los extremos que interfieran en la clonación basada en restricción y/o debido a una síntesis ineficaz de las secuencias completas.

En este trabajo, la utilización del kit de mutagénesis *GeneMorph II EZClone Domain mutagenesis* para la construcción de las librerías permitió generar mutaciones aleatorias en la secuencia de interés y generar una librería completa sin necesidad de sitios de restricción o subclonación. Para ajustar la frecuencia de mutaciones deseada sólo se necesitó variar la cantidad de ADN de entrada añadida a la reacción y para evitar mutaciones en el péptido señal y en el codón de terminación del gen *bgl1*, se usaron oligonucleótidos que amplificaban el gen *bgl1* excluyendo ambas secuencias. El uso de los productos de PCR mutados como cebadores para la amplificación del plásmido

completo original en una segunda reacción de PCR permitieron sustituir el paso de subclonación realizado en la generación de genotecas clásicas. Esto tiene además la ventaja de minimizar las mutaciones secundarias no deseadas durante el proceso de clonación. Por otro lado, una digestión de las reacciones finales de PCR con la enzima *DpnI* capaz de reconocer ADN metilado permitió eliminar el ADN parental utilizado como molde y así reducir el porcentaje de transformantes con el gen nativo sin mutar.

El éxito en la optimización de una proteína mediante mutagénesis al azar depende en gran parte de su calidad, es decir, de la frecuencia y el tipo de mutaciones introducidas y del tamaño de la genoteca, que debe ajustarse a la capacidad de *screening* (Alcalde, 2012). En cuanto a la frecuencia de mutación, para el estudio de la relación estructura-función lo ideal es generar un único cambio de aminoácido permitiendo identificar el papel de cada mutación en las propiedades de la enzima. Sin embargo, para estudios de modificación de actividad de enzimas se suelen utilizar frecuencias mayores, induciendo de 1-4 cambios de aminoácidos lo que implica de 2-7 sustituciones nucleotídicas (Cirino y col., 2003).

No obstante, hay que tener en cuenta la degeneración del código genético ya que el cambio de un nucleótido no siempre se traduce en un cambio de aminoácido. Dependiendo del tipo de mutación génica introducida, en la proteína podemos encontrar mutaciones silenciosas donde el cambio de nucleótido o nucleótidos da lugar a tripletes que codifican para el mismo aminoácido y no produce cambio en el fenotipo. Por otro lado, existen otro tipo de mutaciones deletéreas que conllevan a que la proteína pierda su función como las mutaciones de cambio de sentido o las mutaciones sin sentido donde la mutación da lugar a un triplete de terminación.

Teniendo en consideración que la mayoría de las mutaciones son neutras o deletéreas, las mutaciones beneficiosas que permitan adquirir la propiedad enzimática deseada son poco frecuentes (Vanhercke y col., 2005). De aquí la importancia de la elección de una frecuencia de mutación adecuada. Una frecuencia de mutación muy baja conlleva la presencia de mayor número de mutaciones silenciosas y por tanto numerosas versiones nativas del gen lo que puede conllevar la necesidad de un *screening* más amplio. Por otro lado, una frecuencia de mutación muy alta aumenta la presencia de mutaciones perjudiciales y de la pérdida de función de la proteína. Las frecuencias de mutación elegidas en este trabajo fueron de 0-2,5 mutaciones por gen en la librería A y de 2,5 a 8 mutaciones por gen en la librería B. Por otro lado, el tamaño de estas librerías fue de 150.000 transformantes para la librería A y de 170.000 para la librería B.

5.4.1.3. Método de *screening* y selección de variantes mejoradas de *bgl1*

El diseño de un sistema de exploración sensible y reproducible que permita detectar variaciones en la función o propiedad deseada es probablemente el factor más importante. En este sentido, se diseñó un procedimiento para la detección de variantes de Bgl1 que nos permitía seleccionar en un mismo mutante las dos propiedades deseadas: (1) actividad de transglicosilación reducida y (2) actividad hidrolítica mejorada o no afectada, tomando siempre como referencia la Bgl1 nativa sin mutar.

En concreto, este procedimiento consistió en un ensayo que estimaba la capacidad de transglicosilación de los mutantes Bgl1 de forma indirecta midiendo su actividad hidrolítica BGL sobre pNGP en presencia y ausencia del sustrato celobiosa, que es el aceptor preferente en la actividad transglicosilasa de esta enzima. Dicho de otra forma, la actividad hidrolítica sobre pNGP en presencia de celobiosa se utilizó como indicador de la capacidad de transglicosilación.

De esta manera, se determinó la actividad transglicosilante de cada mutante mediante el porcentaje de disminución de actividad hidrolítica en presencia del sustrato celobiosa en comparación con la Bgl1 nativa. Además, el sistema de *screening* de alto rendimiento en microplaca en fase líquida permitió medir de manera cuantitativa y reproducible la actividad de una gran cantidad de transformantes.

En cuanto al criterio de selección de los mutantes, se estableció un rango de porcentaje de actividad en base a la capacidad hidrolítica que eran capaces de mantener en presencia de celobiosa en comparación con la misma actividad en ausencia de celobiosa. El rango establecido fue de 30-70% de mantenimiento de actividad hidrolítica en presencia de celobiosa en comparación con su actividad hidrolítica en ausencia de este sustrato. Los resultados se expresaron en porcentaje de actividad relativa y siempre con un control interno de actividad de Bgl1 nativa en las mismas condiciones para su comparabilidad. Este criterio de selección se estableció en base a estudios previos donde se determinó que la actividad hidrolítica de la enzima Bgl1 nativa caía hasta alrededor de un 10% en presencia de celobiosa 5,5 mM.

En el proceso de búsqueda de mutantes Bgl1 con actividad transglicosilante reducida, se exploraron 6900 clones. Entre todos los transformantes analizados, uno de ellos mostró una capacidad hidrolítica del 62% en presencia de celobiosa 5,5 mM, el transformante denominado 31L2D. Todos los transformantes seleccionados en la primera ronda del *screening* en microplaca se comprobaron en una segunda ronda de ensayos en microplaca. La producción de proteínas de los mejores transformantes, incluido 31L2D, también se realizó a escala de producción en matraz y se confirmó que el transformante 31L2D mostraba el mejor perfil de acuerdo a las condiciones de *screening*. En concreto, este transformante mostró una mejora en las dos propiedades buscadas en este análisis con respecto a la enzima nativa: (1) mostró un 62% de actividad BGL hidrolítica en presencia de celobiosa indicando una reducción de su

actividad de transglicosilación y (2) mostró ser más activo sobre pNGP que la cepa silvestre indicando un favorecimiento de la actividad hidrolítica al reducirse el efecto inhibitorio por celobiosa (Figura 42 de Resultados).

5.4.2. La variante con baja actividad de transglicosilación Bgl1 Q211H

La determinación de la secuencia del gen *bgl1* expresado en 31L2D permitió identificar una única mutación en la posición 633 de la secuencia de nucleótidos, donde una guanina del gen nativo fue sustituida por una timina en *bgl1* mutado. Esta mutación provocó un único cambio de aminoácido en la secuencia de proteína, una glutamina (Q) en el residuo 211 de la preproteína nativa se había sustituido por histidina (H), dando lugar a la mutación Q211H.

Con el fin de confirmar el fenotipo de actividad de transglicosilación baja observado en la cepa 31L2D, se transformó de nuevo este gen mutado en AB1. La transformación, detección selectiva y medición de la actividad BGL se llevaron a cabo de la misma forma. Todos los transformantes que expresaban Bgl1 Q211H mostraron la misma actividad de transglicosilación baja que la cepa 31L2D confirmando de esta manera que la variante de Bgl1 encontrada tiene un perfil de actividad hidrolítica mejorado.

En cuanto al análisis del tipo de mutación generada, se sabe que la sustitución del aminoácido Q por el aminoácido H en la posición 211 es una sustitución conservativa ya que ambos tienen propiedades fisicoquímicas similares. La glutamina se clasifica como un aminoácido polar sin carga mientras que la histidina es un aminoácido polar con carga y suele ser el catalizador ácido-base por excelencia (Figura 50).

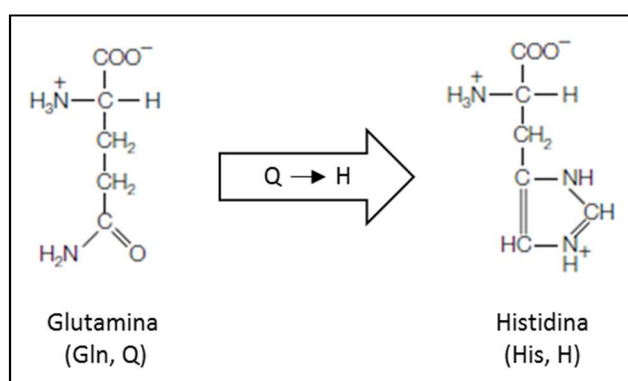


Figura 50. Sustitución de aminoácido Q por H en la secuencia de proteínas de Bgl1. Se muestra la estructura química de los aminoácidos implicados.

A veces, las sustituciones conservativas dan lugar a mutaciones neutras, es decir, que el cambio de aminoácido por otro con propiedades similares no altera la función de la enzima analizada. En este caso, aunque todavía no está claro el papel que tiene esta posición en la estructura y función de esta proteína, sí se puede afirmar que la sustitución del residuo Q en la posición 211 por una H tiene una implicación en la disminución de la capacidad de transglicosilación de la enzima y de la mejora en su función de hidrólisis.

Recientemente, Larue y col. (2016) establecieron la importancia funcional del aminoácido en la posición 305 en una BGL de la familia GH3 para la reducción de la actividad de transglicosilación. En concreto, aplicaron una estrategia de evolución dirigida sobre una Bgl1 de *A. niger*, usando como huésped la levadura *S. cerevisiae*. Tras llevar a cabo un estudio funcional de una librería de mutantes de esta enzima, identificaron una variante con una sustitución en el residuo 305 de tirosina (Tyr, Y) por cisteína (Cys, C) que produjo un cambio significativo en los parámetros cinéticos frente al sustrato sintético pNGP y el sustrato natural celobiosa. Esta variante mostró una reducción de la actividad de transglicosilación a altas concentraciones de sustrato favoreciendo su reacción hidrolítica.

Por otro lado, utilizaron mutagénesis dirigida para analizar otras sustituciones en ese residuo 305 y encontraron que otros grupos funcionales pequeños (Gly, Ala y Val) causaron una disminución de inhibición similar a la de la sustitución Y305C. Sin embargo, alineamientos con otras BGL de otros organismos mostraron que la posición 305 es el residuo menos conservado en el sitio activo. Para aclarar esto, un estudio comparativo de varias BGL mostró que las actividades hidrolíticas y transglicosilasas pueden variar significativamente entre enzimas BGL con sitios activos muy similares.

Con el fin de determinar si el residuo 211 estaba implicado en las actividades hidrolíticas o de transglicosilación se investigó la ubicación relativa de este en algunas de las BGL de la familia GH3 que han sido evaluadas en su capacidad de transglicosilación mediante un alineamiento de sus secuencias de proteínas. Como se muestra en la Figura 51, el aminoácido glutamina (Q) es un residuo conservado en todas las secuencias analizadas excepto para *N. crassa*. Esto podría estar relacionado con el estudio de Bohlin y col. (2011) donde se dedujo que la actividad hidrolítica de la BGL de esta especie se veía débilmente afectada por la actividad de transglicosilación.



Figura 51. Alineamiento de secuencia de aminoácidos de la enzima Bgl1 de *M. thermophila* C1 con otras BGL de la familia GH3 estudiadas en su actividad de transglicosilación. Alineamiento realizado con el programa Clustal Omega (Sievers y col., 2011). Los residuos alineados en la posición 211 de *M. thermophila*, se encuentran resaltados en amarillo. Los residuos alineados en la posición 305 de *A. niger* se encuentran resaltados en azul.

Por otro lado, dado que la secuencia de aminoácidos de la enzima Bgl1 presenta una identidad del 60% con la BGL de *A. niger*, en este mismo alineamiento se ha analizado la conservación de la posición 305 de *A. niger* en *M. thermophila* y en las demás BGL analizadas. Como se observa en la Figura 51, la fenilalanina (Phe, F) fue el aminoácido más prevalente, incluido en la BGL de *M. thermophila*, mientras que la tirosina solo estaba presente en la BGL de *A. niger*. Este mismo fue el resultado del alineamiento realizado por Larue y col. (2016) que encontraron sólo un homólogo de *Rhizopus oryzae* con una tirosina en esa posición. La variante Y305F también fue probada por este grupo y mostró un perfil cinético casi idéntico al de la enzima nativa. Esto puede ser debido a que ambos aminoácidos tienen propiedades muy similares y las diferencias en función sólo se ve con grupos de aminoácidos pequeños como la cisteína, glicina, valina o alanina.

Todos estos resultados en conjunto nos ponen de manifiesto que la actividad de transglicosilación es funcionalmente significativa en los sistemas de celulasas naturales y que posiblemente siga habiendo un margen de mejora para la reducción de esta actividad en Bgl1 de *M. thermophila* C1, mediante la modificación puntual de otros

aminoácidos con potencial implicación en la cinética de inhibición por altas concentraciones de sustrato. Una de las técnicas con más potencial en evolución dirigida es la de acumular y combinar mutaciones puntuales beneficiosas en el mismo gen hasta adquirir la propiedad deseada (Kuchner y Arnold, 1999).

Un futuro estudio para probar la importancia funcional en la actividad de hidrólisis y transglicosilación de esta posición sería la sustitución del aminoácido Q211 por otras variantes de aminoácidos con diferentes propiedades químicas. Estos experimentos podrían realizarse mediante mutagénesis dirigida y podrían ser analizados de forma eficiente por el método aquí descrito. Por otro lado, estudios en la estructura tridimensional para mapear la posición hipotética de la sustitución identificada ayudaría a entender la importancia y la implicación de esta posición en la función de la proteína.

5.4.3. Análisis comparativo de Bgl1 Q211H mutante y Bgl1 nativa

Para el análisis comparativo de la enzima mutante Bgl1 Q211H y la enzima Bgl1 nativa se utilizaron ambas enzimas purificadas. En primer lugar, se comprobó como ambas muestras tenían el mismo tamaño molecular correspondiente a 116 kDa (Figura 45). Hay que destacar que estas son las versiones glicosiladas de las enzimas ya que de acuerdo con la secuencia de Bgl1 cabe esperar que esta enzima tenga un tamaño molecular de 93 kDa. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, las enzimas glicosido hidrolasas fúngicas, como es el caso de Bgl1, suelen sufrir glicosilaciones durante su producción que modifican su tamaño molecular.

El análisis comparativo se realizó a nivel de caracterización cinética de la actividad hidrolítica, de estudios de transglicosilación y de estudios térmicos.

5.4.3.1. Caracterización cinética de la actividad hidrolítica de Bgl1 Q211H

Las BGL purificadas fueron caracterizadas en términos de su actividad enzimática (V_{max}) afinidad por el sustrato (K_m) y efecto sobre la actividad enzimática del producto final glucosa. Los resultados obtenidos probaron que no había un impacto directo de la mutación sobre la afinidad por el sustrato (K_m) pero se consideró un impacto ligeramente significativo sobre la reducción de la dosis para la actividad enzimática (V_{max}). La proteína mutante Bgl1 Q11H mostró un incremento del 25% de actividad específica BGL en comparación con la Bgl1 nativa. Este ensayo con las enzimas purificadas confirmó el resultado anterior que mostraba a Bgl1 Q211H mutante como una enzima más activa.

Para la mayoría de las BGL, la glucosa es un potente inhibidor competitivo (Xiao y col., 2004; Bohlin y col., 2010) y también lo es para la Bgl1 (Benítez, 2017). Los

ensayos en presencia de diferentes concentraciones de glucosa mostraron un perfil de inhibición competitiva similar en ambas proteínas purificadas, como era de esperar.

5.4.3.2. Actividad de transglicosilación de Bgl1 Q211H

La capacidad de transglicosilación de ambas enzimas se determinó de forma indirecta mediante la medida de actividad hidrolítica sobre el sustrato pNGP en presencia de concentraciones crecientes de celobiosa. Se determinó una menor capacidad de transglicosilación para la enzima mutante Bgl1 Q211H en comparación con la Bgl1 nativa que mostró una alta capacidad de transglicosilación (Figura 46 de Resultados).

La correlación entre estos ensayos indirectos y la capacidad de transglicosilación real se comprobó mediante la medición de la formación real de oligómeros por HPLC en un ensayo de actividad hidrolítica de ambas enzimas en presencia de celobiosa. Este ensayo permitió determinar el porcentaje relativo de cada azúcar (glucosa, celobiosa y/o celotriosa) en la concentración total de azúcares presentes en la mezcla final de reacción.

El producto de hidrólisis de celobiosa liberado por las BGL es el monómero de azúcar glucosa. La celotriosa solo se puede formar como producto de una reacción de transglicosilación en la cual una molécula de celobiosa actúa como aceptor para la glucosa retenida en el sitio activo de la enzima Bgl1. La celobiosa presente en la mezcla puede ser el resultado de (1) sustrato no hidrolizado que permanece en la mezcla de reacción o (2) el producto de una reacción de transglicosilación, siendo la glucosa tanto el aceptor como el donante.

En la mezcla de reacción de Bgl1 Q211H se determinó una concentración significativamente menor de celobiosa y mayor de glucosa en comparación con la Bgl1 nativa. Además, no se detectó la formación de celotriosa mientras que en la mezcla de reacción de Bgl1 nativa se determinó un 2,5% de este azúcar (Figura 47). Estos resultados evidencian la capacidad reducida de transglicosilación de la enzima Bgl1 Q211H mutante al mismo tiempo que demuestra una actividad hidrolítica mejorada a concentraciones elevadas de celobiosa.

5.4.3.2. Estabilidad térmica de Bgl1 Q211H

En las condiciones estándar de proceso industrial (alta temperatura y sólidos totales elevados) se necesitan enzimas termorresistentes y estables. Las mutaciones y los cambios de aminoácidos en las enzimas, aunque sean beneficiosas para la función deseada puede afectar a otras propiedades de la enzima. En este sentido, se determinó la estabilidad térmica de la enzima mutante Bgl1 Q211H, en comparación con la Bgl1

nativa, mediante la determinación de la temperatura de desnaturalización y la resistencia térmica en condiciones de hidrólisis de la biomasa. En cuanto a la temperatura de desnaturalización, no se observaron diferencias significativas entre Bgl1 Q211H y Bgl1 nativa siendo la temperatura media de desnaturalización ($T_{1/2}$) de ambas enzimas holgadamente superior a 50 °C (temperatura estándar del proceso de hidrólisis de biomasa). En concreto, Bgl1 Q211H mostró una $T_{1/2}$ de 62°C muy similar a la de la enzima nativa que fue de 65 °C. Este resultado confirmó que la enzima Bgl1 Q211H mutante seguía manteniendo la propiedad de termorresistencia de su enzima nativa. Al mismo tiempo, se confirmó que esta variante de Bgl1 se mantenía estable y permanecía activa tras 72 horas a temperatura de proceso de hidrólisis incluso un 10% más por encima de la actividad que mostró la Bgl1 nativa (Figura 48 y 49 de Resultados).

Por tanto, la variante de Bgl1 encontrada, Bgl1 Q211H, parece una candidata adecuada para solventar las limitaciones que suponía esta enzima a concentraciones elevadas de sustrato.

6 CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. Se ha logrado la delección del gen *chi2* que codifica para la enzima no celulolítica quitinasa 2 en *M. thermophila* C1 utilizando la estrategia de delección dirigida mediante el diseño de un casete de delección con el marcador de selección *amdS*. La cepa AB2 $\Delta chi2$ se identificó con éxito mediante análisis genético y perfil protéico del cóctel producido por esta cepa modificada.
2. La delección del gen *chi2* y, por tanto, la eliminación de la enzima quitinasa 2 del cóctel enzimático producido por *M. thermophila* C1 resultó en la producción de un cóctel más eficiente y de mayor calidad en las condiciones de hidrólisis y del sustrato utilizado. En concreto, se tradujo en un incremento del 15% del rendimiento de liberación de glucosa durante el proceso de hidrólisis de PCS en las condiciones de reacción industrial.
3. Se confirmó que la expresión de la enzima no celulolítica quitinasa 2 era prescindible en el cóctel enzimático de hidrólisis de PCS ya que no contribuía a la eficiencia del rendimiento de liberación de azúcares. La eliminación de esta enzima con significativa presencia extracelular dió lugar a mayor representación del resto de las enzimas y, en consecuencia, mayor eficiencia de hidrólisis enzimática aparentemente debido a la redistribución de la capacidad de producción y secreción del hongo favoreciendo mayor representación de las enzimas eficientes.
4. Se ha logrado la delección del gen *endoglucanasa 6* que codifica para la enzima celulolítica endoglucanasa 6 en *M. thermophila* C1 utilizando la estrategia de delección dirigida mediante el diseño de un casete de delección con el marcador de selección *amdS*. La cepa AB2 $\Delta chi2 \Delta eg6$ se identificó con éxito mediante análisis genético y perfil protéico del cóctel producido por esta cepa modificada.
5. La delección del gen *eg6* y, por tanto, la eliminación de la enzima endoglucanasa 6 del cóctel enzimático producido por *M. thermophila* C1 resultó en la producción de un cóctel más eficiente y de mayor calidad en las condiciones de hidrólisis y del sustrato utilizado. En concreto, se tradujo en un incremento del 10% del rendimiento de liberación de glucosa durante el proceso de hidrólisis de PCS en las condiciones de reacción industrial.
6. Se confirmó que la enzima celulolítica endoglucanasa 6 se identificó correctamente como celulasa con una actividad redundante y con menor actividad en relación a la actividad celulolítica que presenta otra enzima similar presente en el cóctel, la endoglucanasa 2. La eliminación de esta enzima con significativa presencia extracelular dió lugar a mayor representación del resto de las enzimas y, en consecuencia, mayor eficiencia de hidrólisis enzimática aparentemente debido a la redistribución de la capacidad de producción y secreción del hongo favoreciendo mayor representación de las enzimas eficientes.

7. Se demostró que el planteamiento presentado en esta Tesis Doctoral para la mejora del cóctel enzimático mediante la eliminación del fondo de proteína no funcional o redundante para la hidrólisis de PCS ha permitido optimizar el coctel enzimático producido por *M. thermophila* C1 para este sustrato. Esta estrategia es un punto de partida idóneo hacia la ingeniería y el diseño de mezclas enzimáticas óptimas para diferentes aplicaciones biotecnológicas.
8. Se encontró una variante de la enzima Bgl1 de *M. thermophila* C1 con capacidad de transglicosilación reducida para la hidrólisis del material celulósico PCS mediante una estrategia de evolución dirigida usando mutagénesis aleatoria y la posterior exploración de la propiedad deseada. Para ello se diseñaron y generaron dos librerías de mutantes del gen *bgl1* mediante mutagénesis al azar. Asimismo, se diseñó un procedimiento de exploración en formato *high-throughput* basado en la estimación de la capacidad de transglicosilación de forma indirecta mediante la determinación de la actividad hidrolítica sobre pNGP en presencia de celobiosa.
9. Tras la exploración de 6900 clones, se seleccionó la mejor variante, el mutante 31L2D con una capacidad hidrolítica del 62% en presencia de celobiosa. Su secuencia de aminoácidos presentó una única mutación que dio lugar a la sustitución del aminoácido glutamina por el aminoácido histidina en la posición 211 (Q211H).
10. La variante Bgl1 Q211H mostró un incremento del 25% de actividad específica BGL en comparación con la Bgl1 nativa. Asimismo, la medición del porcentaje relativo de cada azúcar tras la reacción enzimática confirmó la reducción de la capacidad real de transglicosilación de la enzima mutante Bgl1 Q211H mostrando una concentración significativamente menor de celobiosa y mayor de glucosa en la mezcla final de reacción.
11. Se confirmó que la mutación no afectó a la estabilidad térmica de la enzima. La enzima mutante Bgl1 Q211H demostró tener una temperatura media de desnaturalización y una resistencia térmica muy similar a la de su enzima nativa en condiciones estándar de hidrólisis.

7 BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aditiya, H. B., Mahlia, T. M. I., Chong, W. T., Nur, H., & Sebayang, A. H. (2016). Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 66, 631-653.
- Agbor, V. B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., & Levin, D. B. (2011). Biomass pretreatment: fundamentals toward application. *Biotechnology advances*, 29(6), 675-685.
- Agrawal, P., Verma, D., & Daniell, H. (2011). Expression of *Trichoderma reesei* β -mannanase in tobacco chloroplasts and its utilization in lignocellulosic woody biomass hydrolysis. *PloS one*, 6(12), e29302.
- Akhtar, N., Aanchal, Goyal, D., & Goyal, A. (2016). Biodiversity of cellulase producing bacteria and their applications. *Cellulose chemistry and technology*, 50(9-10), 983-995.
- Alcalde, M. (2012). Fundamentos de evolución molecular dirigida de enzimas. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*.
- Alcalde, M. (2015). Engineering the ligninolytic enzyme consortium. *Trends in biotechnology*, 33(3), 155-162.
- Alcántara, M. Á. B., Dobruchowska, J., Azadi, P., García, B. D., Molina-Heredia, F. P., & Reyes-Sosa, F. M. (2016). Recalcitrant carbohydrates after enzymatic hydrolysis of pretreated lignocellulosic biomass. *Biotechnology for biofuels*, 9(1), 207.
- Álvarez, C., Reyes-Sosa, F. M., & Díez, B. (2016). Enzymatic hydrolysis of biomass from wood. *Microbial biotechnology*, 9(2), 149-156.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M. J., & Negro, M. J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource technology*, 101(13), 4851-4861.
- An, J., Kwon, H., Kim, E., Lee, Y. M., Ko, H. J., Park, H., ... & Choi, W. (2015). Tolerance to acetic acid is improved by mutations of the TATA-binding protein gene. *Environmental microbiology*, 17(3), 656-669.
- Balat, M. (2007). Global bio-fuel processing and production trends. *Energy Exploration & Exploitation*, 25(3), 195-218.
- Baldrian, P., & Valášková, V. (2008). Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS microbiology reviews*, 32(3), 501-521.

- Bhattacharya, A. S., Bhattacharya, A., & Pletschke, B. I. (2015). Synergism of fungal and bacterial cellulases and hemicellulases: a novel perspective for enhanced bioethanol production. *Biotechnology letters*, 37(6), 1117-1129.
- Batra, J., & Mishra, S. (2013). Organic solvent tolerance and thermostability of a β -glucosidase co-engineered by random mutagenesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 96, 61-66.
- Banerjee, G., Scott-Craig, J. S., & Walton, J. D. (2010). Improving enzymes for biomass conversion: a basic research perspective. *Bioenergy research*, 3(1), 82-92.
- Benítez Casanova, L. (2017). Caracterización de las principales enzimas celulolíticas de *myceliophthora thermophila* implicadas en la degradación de biomasa lignocelulósica y mejora de la hidrólisis de hemicelulosa para la producción de bioetanol de segunda generación (Tesis Doctoral Inédita). Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Benkő, Z., Siika-aho, M., Viikari, L., & Réczey, K. (2008). Evaluation of the role of xyloglucanase in the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(2), 109-114.
- Beeson, W. T., Vu, V. V., Span, E. A., Phillips, C. M., & Marletta, M. A. (2015). Cellulose degradation by polysaccharide monooxygenases. *Annual review of biochemistry*, 84, 923-946.
- Berka, R. M., Grigoriev, I. V., Otilar, R., Salamov, A., Grimwood, J., Reid, I., ... & Henrissat, B. (2011). Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. *Nature biotechnology*, 29(10), 922-927.
- Bhatia, Y., Mishra, S., & Bisaria, V. S. (2002). Microbial β -glucosidases: cloning, properties, and applications. *Critical reviews in biotechnology*, 22(4), 375-407.
- Bhatia, L., Johri, S., & Ahmad, R. (2012). An economic and ecological perspective of ethanol production from renewable agro waste: a review. *Amb Express*, 2(1), 65.
- Bohlin, C., Olsen, S. N., Morant, M. D., Patkar, S., Borch, K., & Westh, P. (2010). A comparative study of activity and apparent inhibition of fungal β -glucosidases. *Biotechnology and bioengineering*, 107(6), 943-952.
- Bohlin, C., Praestgaard, E., Baumann, M. J., Borch, K., Praestgaard, J., Monrad, R. N., & Westh, P. (2013). A comparative study of hydrolysis and transglycosylation activities of fungal β -glucosidases. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(1), 159-169.
- Bothast, R. J., & Schlicher, M. A. (2005). Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. *Applied microbiology and biotechnology*, 67(1), 19-25.

- Bukhtojarov, F. E., Ustinov, B. B., Salanovich, T. N., Antonov, A. I., Gusakov, A. V., Okunev, O. N., & Sinitsyn, A. P. (2004). Cellulase complex of the fungus *Chrysosporium lucknowense*: isolation and characterization of endoglucanases and cellobiohydrolases. *Biochemistry (Moscow)*, *69*(5), 542-551.
- Cai, Y. J., Chapman, S. J., Buswell, J. A., & Chang, S. T. (1999). Production and distribution of endoglucanase, cellobiohydrolase, and β -glucosidase components of the cellulolytic system of *Volvariella volvacea*, the edible straw mushroom. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(2), 553-559.
- Cao, W., & Crawford, D. L. (1993). Purification and some properties of β -glucosidase from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* strain SMF. *Canadian journal of microbiology*, *39*(1), 125-129.
- Chandel, A. K., & da Silva, S. S. (2013). Sustainable degradation of lignocellulosic biomass—Techniques, applications and commercialization. *InTech*
- Christakopoulos, P., Goodenough, P. W., Kekos, D., Macris, B. J., Claeysens, M., & Bhat, M. K. (1994). Purification and characterisation of an extracellular β -glucosidase with transglycosylation and exo-glucosidase activities from *Fusarium oxysporum*. *The FEBS Journal*, *224*(2), 379-385.
- Cirino, P. C., Mayer, K. M., & Umeno, D. (2003). Generating mutant libraries using error-prone PCR. In *Directed evolution library creation* (pp. 3-9). Humana Press.
- Dashtban, M., Schraft, H., & Qin, W. (2009). Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. *Int J Biol Sci*, *5*(6), 578-595.
- Dashtban, M., & Qin, W. (2012). Overexpression of an exotic thermotolerant β -glucosidase in *Trichoderma reesei* and its significant increase in cellulolytic activity and saccharification of barley straw. *Microbial Cell Factories*, *11*(1), 63.
- Debets, A. J., Swart, K., Holub, E. F., Goosen, T., & Bos, C. J. (1990). Genetic analysis of *amdS* transformants of *Aspergillus niger* and their use in chromosome mapping. *Molecular and General Genetics MGG*, *222*(2), 284-290.
- Demeke, M. M., Dietz, H., Li, Y., Foulquié-Moreno, M. R., Mutturi, S., Deprez, S., ... & Verplaetse, A. (2013). Development of a D-xylose fermenting and inhibitor tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with high performance in lignocellulose hydrolysates using metabolic and evolutionary engineering. *Biotechnology for biofuels*, *6*(1), 89.
- Díez, B., Gómez, A., Gil J., Valbuena, N., Moreno A.J., Dueñas R.,...& Martín, L. (2015). *ES Patent No. 2, 521, 940*. Oficina Española de Patentes y Marcas.

- Díez, B., Valbuena, N., Reyes-Sosa, F. M., Moreno, A. J., Pérez, D., Platero, A. I.,...& Ramos J. L. (2016). *ES Patent No. 2, 647, 322*. Oficina Española de Patentes y Marcas.
- Dua, A., Joshi, S., & Satyanarayana, T. (2017). Recombinant exochitinase of the thermophilic mould *Myceliophthora thermophila* BJA: Characteristics and utility in generating N-acetyl glucosamine and in biocontrol of phytopathogenic fungi. *Biotechnology progress*, 33(1), 70-80.
- Druzhinina, I. S., & Kubicek, C. P. (2016). Familiar stranger: ecological genomics of the model saprotroph and industrial enzyme producer *Trichoderma reesei* breaks the stereotypes. In *Advances in applied microbiology* (Vol. 95, pp. 69-147). Academic Press.
- Emalfarb, M. A., Ben-Bassat, A., Burlingame, R. P., Chernoglazov, V. M., Okounev, O. N., Olson, P. T., ... & Solovjeva, I. V. (1998). *U.S. Patent No. 5,811,381*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Emalfarb, M. A., Burlingame, R. P., Olson, P. T., Sinitsyn, A. P., Parriche, M., Bousson, J. C., ... & Van Zeijl, C. M. J. (2003). *U.S. Patent No. 6,573,086*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office
- Emalfarb, M. A., Punt, P. J., Van Zeijl, C., & van den Hondel, C. (2006). *U.S. Patent No. 7,122,330*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Emalfarb, M., Sinitsyn, A., Jundzil, R., Wery, J., Visser, J., Joosten, R., & Koetsier, M. (2013). *Method of improving the activity of cellulase enzyme mixtures in the saccharification (ligno) cellulosic material. U.S. Patent Application No. 13/866,620*.
- Evans CS. Properties of the beta-D-glucosidase (cellobiase) from the wood-rotting fungus, *Coriolus versicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1985; 22:128–131.
- Fang, X., Shen, Y., Zhao, J., Bao, X., & Qu, Y. (2010). Status and prospect of lignocellulosic bioethanol production in China. *Bioresource technology*, 101(13), 4814-4819.
- Faraco, V. (Ed.). (2013). *Lignocellulose conversion: enzymatic and microbial tools for bioethanol production*. Springer Science & Business Media.
- Florindo, R. N., Souza, V. P., Mutti, H. S., Camilo, C., Manzine, L. R., Marana, S. R., ... & Nascimento, A. S. (2018). Structural insights into β -glucosidase transglycosylation based on biochemical, structural and computational analysis of two GH1 enzymes from *Trichoderma harzianum*. *New biotechnology*, 40, 218-227.

- Forment, J. V., Ramón, D., & MacCabe, A. P. (2006). Consecutive gene deletions in *Aspergillus nidulans*: application of the Cre/loxP system. *Current genetics*, 50(3), 217-224.
- Fujii, T., Fang, X., Inoue, H., Murakami, K., & Sawayama, S. (2009). Enzymatic hydrolyzing performance of *Acremonium cellulolyticus* and *Trichoderma reesei* against three lignocellulosic materials. *Biotechnology for Biofuels*, 2(1), 24.
- Galante, Y. M., De Conti, A., & Monteverdi, R. (2014). Application of *Trichoderma* enzymes in the textile industry. *Trichoderma & Gliocladium*, 2, 311-25.
- García-Aparicio, M. P., Ballesteros, M., Manzanares, P., Ballesteros, I., González, A., & Negro, M. J. (2007). Xylanase contribution to the efficiency of cellulose enzymatic hydrolysis of barley straw. *Applied biochemistry and biotechnology*, 353-365.
- Gírio, F. M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Marques, S., & Bogel-Lukasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Bioresource technology*, 101(13), 4775-4800.
- Glass, N. L., Schmoll, M., Cate, J. H., & Coradetti, S. (2013). Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. *Annual review of microbiology*, 67, 477-498.
- Gomi, K., Kitamoto, K., & Kumagai, C. (1992). Transformation of the industrial strain of *Aspergillus oryzae* with the homologous *amdS* gene as a dominant selectable marker. *Journal of fermentation and bioengineering*, 74(6), 389-391.
- Gonzalez-Vogel, A., Eyzaguirre, J., Oleas, G., Callegari, E., & Navarrete, M. (2011). Proteomic analysis in non-denaturing condition of the secretome reveals the presence of multienzyme complexes in *Penicillium purpurogenum*. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(1), 145-155.
- Günata, Z., & Vallier, M. J. (1999). Production of a highly glucose-tolerant extracellular β -glucosidase by three *Aspergillus* strains. *Biotechnology letters*, 21(3), 219-223.
- Guo, B., Amano, Y., & Nozaki, K. (2016). Improvements in glucose sensitivity and stability of *Trichoderma reesei* β -glucosidase using site-directed mutagenesis. *PloS one*, 11(1), e0147301.
- Gupta, V. K., & Tuohy, M. G. (2013). Biofuel technologies. *Recent Developments. Editorial Springer*.
- Gupta, A., & Verma, J. P. (2015). Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, 550-567.
- Gusakov, A. V., Salanovich, T. N., Antonov, A. I., Ustinov, B. B., Okunev, O. N., Burlingame, R., ... & Sinitsyn, A. P. (2007). Design of highly efficient cellulase

- mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology and bioengineering*, 97(5), 1028-1038.
- Gusakov, A. V., Antonov, A. I., & Ustinov, B. B. (2008). N-Glycosylation in *Chrysosporium lucknowense* enzymes. *Carbohydrate research*, 343(1), 48-55.
- Gusakov, A. V., Salanovich, T. N., Antonov, A. I., Ustinov, B. B., Okunev, O. N., Burlingame, R. P., ... & Sinitsyn, A. P. (2011). *Construction of highly efficient cellulase compositions for enzymatic hydrolysis of cellulose*. U.S. Patent No. 7,883,872. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Han, Y., & Chen, H. (2008). Characterization of β -glucosidase from corn stover and its application in simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource technology*, 99(14), 6081-6087.
- Harris, D., & DeBolt, S. (2010). Synthesis, regulation and utilization of lignocellulosic biomass. *Plant biotechnology journal*, 8(3), 244-262.
- Harris, P. V., Xu, F., Kreel, N. E., Kang, C., & Fukuyama, S. (2014). New enzyme insights drive advances in commercial ethanol production. *Current opinion in chemical biology*, 19, 162-170.
- Hartl, L., & Seiboth, B. (2005). Sequential gene deletions in *Hypocrea jecorina* using a single blaster cassette. *Current genetics*, 48(3), 204-211.
- Hassan, N., Nguyen, T. H., Intanon, M., Kori, L. D., Patel, B. K., Haltrich, D., ... & Tan, T. C. (2015). Biochemical and structural characterization of a thermostable β -glucosidase from *Halothermothrix orenii* for galacto-oligosaccharide synthesis. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(4), 1731-1744.
- Hasunuma, T., Okazaki, F., Okai, N., Hara, K. Y., Ishii, J., & Kondo, A. (2013). A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. *Bioresource technology*, 135, 513-522.
- Hasunuma, T., Ishii, J., & Kondo, A. (2015). Rational design and evolutionary fine tuning of *Saccharomyces cerevisiae* for biomass breakdown. *Current opinion in chemical biology*, 29, 1-9.
- Henrissat, Bernard. "A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities." *Biochemical Journal* 280.2 (1991): 309-316.
- Himmel, M. E., Xu, Q., Luo, Y., Ding, S. Y., Lamed, R., & Bayer, E. A. (2010). Microbial enzyme systems for biomass conversion: emerging paradigms. *Biofuels*, 1(2), 323-341.

- Horn, S. J., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., & Eijsink, V. (2012). Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for biofuels*, 5(1), 45.
- Hynes, Michael J. "Regulatory circuits of the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans*." *Antonie Van Leeuwenhoek* 65.3 (1994): 179-182.
- Hynes, M. J., and J. A. J. Pateman. "The genetic analysis of regulation of amidase synthesis in *Aspergillus nidulans*." *Molecular and General Genetics MGG* 108.2 (1970): 97-106.
- IEA, I. E. A. (2017). CO2 Emissions from Fuel Combustion 2017 - Highlights. *International Energy Agency*, 1, 1–162. https://doi.org/10.1787/co2_fuel-2017-en
- Izmirlioglu, G., & Demirci, A. (2016). Strain selection and medium optimization for glucoamylase production from industrial potato waste by *Aspergillus niger*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(8), 2788-2795.
- Ioannis Dogaris, Diomi Mamma, Dimitris Kekos. Biotechnological production of ethanol from renewable resources by *Neurospora crassa*: an alternative to conventional yeast fermentations? *Appl Microbiol Biotechnol* (2013) 97:1457–1473.
- Ishikawa, E., Sakai, T., Ikemura, H., Matsumoto, K., & Abe, H. (2005). Identification, cloning, and characterization of a *Sporobolomyces singularis* β -galactosidase-like enzyme involved in galacto-oligosaccharide production. *Journal of bioscience and bioengineering*, 99(4), 331-339.
- Ito, Y., Ikeuchi, A., & Imamura, C. (2012). Advanced evolutionary molecular engineering to produce thermostable cellulase by using a small but efficient library. *Protein Engineering, Design & Selection*, 26(1), 73-79.
- Jönsson, L. J., & Martín, C. (2016). Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource technology*, 199, 103-112.
- Kanna, M., Yano, S., Inoue, H., Fujii, T., & Sawayama, S. (2011). Enhancement of β -xylosidase productivity in cellulase producing fungus *Acremonium cellulolyticus*. *AMB express*, 1(1), 15.
- Karlsson, J., Saloheimo, M., Siika-aho, M., Tenkanen, M., Penttilä, M., & Tjerneld, F. (2001). Homologous expression and characterization of Cel61A (EG IV) of *Trichoderma reesei*. *The FEBS Journal*, 268(24), 6498-6507.
- Kawai, R., Igarashi, K., Kitaoka, M., Ishii, T., & Samejima, M. (2004). Kinetics of substrate transglycosylation by glycoside hydrolase family 3 glucan (1 \rightarrow 3)- β -glucosidase from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Carbohydrate research*, 339(18), 2851-2857.

- Karnaouri, A., Topakas, E., Antonopoulou, I., & Christakopoulos, P. (2014). Genomic insights into the fungal lignocellulolytic system of *Myceliophthora thermophila*. *Frontiers in microbiology*, 5, 281.
- Kelly, J. M., & Hynes, M. J. (1985). Transformation of *Aspergillus niger* by the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans*. *The EMBO Journal*, 4(2), 475.
- Kim, I. J., Lee, H. J., Choi, I. G., & Kim, K. H. (2014). Synergistic proteins for the enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose by cellulase. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(20), 8469-8480.
- Klein-Marcuschamer, D., Oleskowicz-Popiel, P., Simmons, B. A., & Blanch, H. W. (2012). The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. *Biotechnology and bioengineering*, 109(4), 1083-1087.
- Krappmann, Sven, Özgür Bayram, and Gerhard H. Braus. "Deletion and allelic exchange of the *Aspergillus fumigatus* *veA* locus via a novel recyclable marker module." *Eukaryotic Cell* 4.7 (2005): 1298-1307.
- Krogh, K. B., Harris, P. V., Olsen, C. L., Johansen, K. S., Hojer-Pedersen, J., Borjesson, J., & Olsson, L. (2010). Characterization and kinetic analysis of a thermostable GH3 β -glucosidase from *Penicillium brasilianum*. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(1), 143-154.
- Krolicka, M. (2015). Chitinase Chi1 from *Myceliophthora thermophila* as a potential tool for production of N-Acetylchitooligosaccharides.
- Idiris, A., Tohda, H., Kumagai, H., & Takegawa, K. (2010). Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(2), 403-417.
- Kubicek, C. P., Mikus, M., Schuster, A., Schmoll, M., & Seiboth, B. (2009). Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. *Biotechnology for biofuels*, 2(1), 19.
- Kubicek, C. P. (2013). Systems biological approaches towards understanding cellulase production by *Trichoderma reesei*. *Journal of biotechnology*, 163(2), 133-142.
- Kubicek, C. P., & Kubicek, E. M. (2016). Enzymatic deconstruction of plant biomass by fungal enzymes. *Current opinion in chemical biology*, 35, 51-57.
- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & engineering chemistry research*, 48(8), 3713-3729.
- Kumar, D., & Murthy, G. S. (2016). Enzymatic hydrolysis of cellulose for ethanol production: fundamentals, optimal enzyme ratio, and hydrolysis modeling. In *New*

and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering (pp. 65-78).

- Kuchner, O., & Arnold, F. H. (1999). Directed evolution of enzyme catalysis. *BioFutur*, (185), B1-B11.
- Lambertz, C., Heesel, D., Klose, H., Klinger, J., Garvey, M., Fischer, R., & Commandeur, U. (2014). Challenges and advances in the heterologous expression of cellulolytic enzymes: a review. *Biotechnology for biofuels*, 7(1), 135.
- Larue, K., Melgar, M., & Martin, V. J. (2016). Directed evolution of a fungal β -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for biofuels*, 9(1), 1.
- Laurichesse, S., & Averous, L. (2014). Chemical modification of lignins: Towards biobased polymers. *Progress in Polymer Science*, 39(7), 1266-1290.
- Liguori, R., Soccol, C. R., Porto de Souza Vandenberghe, L., Woiciechowski, A. L., & Faraco, V. (2015). Second generation ethanol production from brewers' spent grain. *Energies*, 8(4), 2575-2586.
- Liu, G., Qin, Y., Li, Z., & Qu, Y. (2013). Development of highly efficient, low-cost lignocellulolytic enzyme systems in the post-genomic era. *Biotechnology advances*, 31(6), 962-975.
- Liu, W., Hong, J., Bevan, D. R., & Zhang, Y. H. P. (2009). Fast identification of thermostable beta-glucosidase mutants on cellobiose by a novel combinatorial selection/screening approach. *Biotechnology and bioengineering*, 103(6), 1087-1094.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2013). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic acids research*, 42(D1), D490-D495.
- Lynd, L. R., Van Zyl, W. H., McBride, J. E., & Laser, M. (2005). Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Current opinion in biotechnology*, 16(5), 577-583.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*, 66(3), 506-577.
- Martínez-Anaya, C., Balcázar-López, E., Dantán-González, E., & Folch-Mallol, J. L. (2008). Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 50(3), 119-131.

- Maki, M., Leung, K. T., & Qin, W. (2009). The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *International journal of biological sciences*, 5(5), 500.
- McCarthy, J. K., Uzelac, A., Davis, D. F., & Eveleigh, D. E. (2004). Improved catalytic efficiency and active site modification of 1, 4- β -D-glucan glucohydrolase A from *Thermotoga neapolitana* by directed evolution. *Journal of Biological Chemistry*, 279(12), 11495-11502.
- Maitan-Alfenas, G. P., Visser, E. M., & Guimarães, V. M. (2015). Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: converting food waste in valuable products. *Current Opinion in Food Science*, 1, 44-49.
- McCann, M. C., Buckeridge, M. S., & Carpita, N. C. (Eds.). (2014). *Plants and bioenergy*. Springer.
- McMillan, J. D. (1994). Pretreatment of lignocellulosic biomass.
- Medie, F. M., Davies, G. J., Drancourt, M., & Henrissat, B. (2012). Genome analyses highlight the different biological roles of cellulases. *Nature Reviews Microbiology*, 10(3), 227-234.
- Merino, S. T., & Cherry, J. (2007). Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. In *Biofuels* (pp. 95-120). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Meyer, V. (2008). Genetic engineering of filamentous fungi—progress, obstacles and future trends. *Biotechnology advances*, 26(2), 177-185.
- Miettinen-Oinonen, A., Paloheimo, M., Lantto, R., & Suominen, P. (2005). Enhanced production of cellobiohydrolases in *Trichoderma reesei* and evaluation of the new preparations in biofinishing of cotton. *Journal of biotechnology*, 116(3), 305-317.
- Millati, R., Syamsiah, S., Niklasson, C., Cahyanto, M. N., Ludquist, K., & Taherzadeh, M. J. (2011). Biological pretreatment of lignocelluloses with white-rot fungi and its applications: a review. *BioResources*, 6(4), 5224-5259.
- Mood, S. H., Golfeshan, A. H., Tabatabaei, M., Jouzani, G. S., Najafi, G. H., Gholami, M., & Ardjmand, M. (2013). Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 77-93.
- Moore JK, Haber JE. Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1996 May;16(5):2164-73.
- Morais, H., Ramos, C., Matos, N., Forgács, E., Cserhádi, T., Almeida, V., ... & Illés, Z. (2002). Liquid chromatographic and electrophoretic characterisation of

- extracellular β -glucosidase of *Pleurotus ostreatus* grown in organic waste. *Journal of Chromatography B*, 770(1-2), 111-119.
- Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K., & Dalai, A. K. (2010). Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(2), 578-597.
- Nevalainen, K. H., & Te'o, V. S. J. (2003). Enzyme production in industrial fungi-molecular genetic strategies for integrated strain improvement. *Applied Mycology and Biotechnology*, 3, 241-259.
- Olofsson, K., Bertilsson, M., & Lidén, G. (2008). A short review on SSF—an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for biofuels*, 1(1), 7.
- Payne, C. M., Knott, B. C., Mayes, H. B., Hansson, H., Himmel, M. E., Sandgren, M., ... & Beckham, G. T. (2015). Fungal cellulases. *Chemical reviews*, 115(3), 1308-1448.
- Pei, X. Q., Yi, Z. L., Tang, C. G., & Wu, Z. L. (2011). Three amino acid changes contribute markedly to the thermostability of β -glucosidase BglC from *Thermobifida fusca*. *Bioresource technology*, 102(3), 3337-3342.
- Pereira, F. B., Romani, A., Ruiz, H. A., Teixeira, J. A., & Domingues, L. (2014). Industrial robust yeast isolates with great potential for fermentation of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, 161, 192-199.
- Petersen, Thomas Nordahl, et al. "SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions." *Nature methods* 8.10 (2011): 785-786.
- Poovaliah, C. R., Nageswara-Rao, M., Soneji, J. R., Baxter, H. L., & Stewart, C. N. (2014). Altered lignin biosynthesis using biotechnology to improve lignocellulosic biofuel feedstocks. *Plant biotechnology journal*, 12(9), 1163-1173.
- Quiroz-Castañeda, R. E., & Folch-Mallol, J. L. (2013). Hydrolysis of biomass mediated by cellulases for the production of sugars. In *Sustainable degradation of lignocellulosic biomass-techniques, applications and commercialization*. InTech.
- Ramani, G., Meera, B., Vanitha, C., Rajendhran, J., & Gunasekaran, P. (2015). Molecular cloning and expression of thermostable glucose-tolerant β -glucosidase of *Penicillium funiculosum* NCL1 in *Pichia pastoris* and its characterization. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 42(4), 553-565.
- Rabemanolontsoa, H., & Saka, S. (2016). Various pretreatments of lignocellulosics. *Bioresource technology*, 199, 83-91.

- Record, E., Punt, P. J., Chamkha, M., Labat, M., van den Hondel, C. A., & Asther, M. (2002). Expression of the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase gene in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. *The FEBS Journal*, 269(2), 602-609.
- Renewable Fuels Association. (2017). 2017 Ethanol Industry Outlook. *Big River Resources W*, 1–32.
- Reyes-Sosa, F. M., Morales, M. L., Gómez, A. I. P., Crespo, N. V., Zamorano, L.S., Rocha-Martín, J., ... & García, B. D. (2017). Management of enzyme diversity in high-performance cellulolytic cocktails. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 156.
- Rubin, E. M. (2008). Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, 454(7206), 841.
- Saha, B. C. (2003). Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(5), 279-291.
- Saloheimo, M., & Pakula, T. M. (2012). The cargo and the transport system: secreted proteins and protein secretion in *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*). *Microbiology*, 158(1), 46-57.
- Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology advances*, 27(2), 185-194.
- Sánchez, O. J., & Cardona, C. A. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource technology*, 99(13), 5270-5295.
- Sandgren M, Stahlberg J and Mitchinson C (2005). Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 89: 246-291.
- Sanderson, K. (2011). Lignocellulose: A chewy problem. *Nature*, 474(7352), S12.
- Schmoll, M., & Dattenböck, C. (Eds.). (2016). *Gene Expression Systems in Fungi: Advancements and Applications*. Springer.
- Seiboth, B., Ivanova, C., & Seidl-Seiboth, V. (2011). *Trichoderma reesei*: a fungal enzyme producer for cellulosic biofuels. In *Biofuel production-recent developments and prospects*. InTech.
- Selig, M. J., Knoshaug, E. P., Decker, S. R., Baker, J. O., Himmel, M. E., & Adney, W. S. (2008). Heterologous Expression of *Aspergillus niger* β -D-Xylosidase (XlnD): Characterization on lignocellulosic substrates. *Applied biochemistry and biotechnology*, 146(1-3), 57-68.

- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., ... & Thompson, J. D. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology*, 7(1), 539.
- Silveira, M. H. L., Morais, A. R. C., da Costa Lopes, A. M., Oleksyszyn, D. N., Bogel-Łukasik, R., Andreus, J., & Pereira Ramos, L. (2015). Current pretreatment technologies for the development of cellulosic ethanol and biorefineries. *ChemSusChem*, 8(20), 3366-3390.
- Spyridon, A., Euverink, W., & Jan, G. (2016). Consolidated briefing of biochemical ethanol production from lignocellulosic biomass. *Electronic Journal of Biotechnology*, 19(5), 44-53.
- Steiger, M. G., Vitikainen, M., Uskonen, P., Brunner, K., Adam, G., Pakula, T., ... & Mach-Aigner, A. R. (2011). Transformation system for *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) that favors homologous integration and employs reusable bidirectionally selectable markers. *Applied and environmental microbiology*, 77(1), 114-121.
- Teeri, T. T., Koivula, A., Linder, M., Wohlfahrt, G., Divne, C., & Jones, T. A. (1998). *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose?
- Vanhercke, T., Ampe, C., Tirry, L., & Denolf, P. (2005). Reducing mutational bias in random protein libraries. *Analytical biochemistry*, 339(1), 9-14.
- van Zeijl, C. M., van Muijlwijk, M., Heerikhuisen, M., Verdoes, J. C., & Punt, P. J. (2009). Gene targeting in *Chrysosporium lucknowense* using a retrievable mutation in the KU70 gene. *Fungal Genet Rep S*, 56.
- Vasco-Correa, J., Ge, X., & Li, Y. (2016). Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. In *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery* (pp. 561-585).
- Verdoes, J. C., Punt, P. J., & Van den Hondel, C. A. M. J. J. (1995). Molecular genetic strain improvement for the overproduction of fungal proteins by filamentous fungi. *Applied microbiology and biotechnology*, 43(2), 195-205.
- Verdoes, Jan C., et al. "A dedicated vector for efficient library construction and high throughput screening in the hyphal fungus *Chrysosporium lucknowense*." *Industrial Biotechnology* 3.1 (2007): 48-57.
- Viikari, L., Alapuranen, M., Puranen, T., Vehmaanperä, J., & Siika-Aho, M. (2007). Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis. In *Biofuels* (pp. 121-145). Springer Berlin Heidelberg.
- Visser, H., Joosten, V., Punt, P. J., Gusakov, A. V., Olson, P. T., Joosten, R., ... & Verdoes, J. C. (2011). RESEARCH: Development of a mature fungal technology and production platform for industrial enzymes based on a *Myceliophthora*

- thermophila isolate, previously known as *Chrysosporium lucknowense* C1. *Industrial Biotechnology*, 7(3), 214-223.
- Vohra, M., Manwar, J., Manmode, R., Padgilwar, S., & Patil, S. (2014). Bioethanol production: feedstock and current technologies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(1), 573-584.
- Wang, T., Liu, X., Yu, Q., Zhang, X., Qu, Y., Gao, P., & Wang, T. (2005). Directed evolution for engineering pH profile of endoglucanase III from *Trichoderma reesei*. *Biomolecular engineering*, 22(1), 89-94.
- Woodward, J. (1991). Synergism in cellulase systems. *Bioresource technology*, 36(1), 67-75.
- Wu, I., & Arnold, F. H. (2013). Engineered thermostable fungal Cel6A and Cel7A cellobiohydrolases hydrolyze cellulose efficiently at elevated temperatures. *Biotechnology and bioengineering*, 110(7), 1874-1883.
- Xiao, Z., Zhang, X., Gregg, D. J., & Saddler, J. N. (2004). Effects of sugar inhibition on cellulases and β -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. In *Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 4–7, 2003, in Breckenridge, CO* (pp. 1115-1126). Humana Press, Totowa, NJ.
- Yennamalli, R. M., Rader, A. J., Kenny, A. J., Wolt, J. D., & Sen, T. Z. (2013). Endoglucanases: insights into thermostability for biofuel applications. *Biotechnology for biofuels*, 6(1), 136.
- Zabed, H., Sahu, J. N., Suely, A., Boyce, A. N., & Faruq, G. (2017). Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 71, 475-501.
- Zhang, J., Zhong, Y., Zhao, X., & Wang, T. (2010). Development of the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* strain with enhanced β -glucosidase and filter paper activity using strong artificial cellobiohydrolase 1 promoter. *Bioresource technology*, 101(24), 9815-9818.
- Zhang, Z., Donaldson, A. A., & Ma, X. (2012). Advancements and future directions in enzyme technology for biomass conversion. *Biotechnology advances*, 30(4), 913-919.
- Zhang, Z., Liu, B., & Zhao, Z. K. (2012). Efficient acid-catalyzed hydrolysis of cellulose in organic electrolyte solutions. *Polymer degradation and stability*, 97(4), 573-577.

- Zhang, Yi-Heng Percival, and Lee R. Lynd. "Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems." *Biotechnology and bioengineering* 88.7 (2004): 797-824.
- Zhao, J., Guo, C., Tian, C., & Ma, Y. (2015). Heterologous expression and characterization of a GH3 β -glucosidase from thermophilic fungi *Myceliophthora thermophila* in *Pichia pastoris*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 177(2), 511-527.
- Zhao, X., Xiong, L., Zhang, M., & Bai, F. (2016). Towards efficient bioethanol production from agricultural and forestry residues: Exploration of unique natural microorganisms in combination with advanced strain engineering. *Bioresource technology*, 215, 84-91.

