



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

INSTITUTO DE AGROQUÍMICA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Laboratorio de Estructura y Función de Enzimas

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Doctorado en Ciencia, Tecnología y Gestión Alimentaria

CARACTERIZACIÓN DE GLICOSIDASAS Y PERMEASAS FÚNGICAS IMPLICADAS EN EL TRANSPORTE Y METABOLISMO DE AZÚCARES

Mary Fernanda Casa Villegas

Dirigida por: Dr. Julio Polaina

Dra. Julia Marín Navarro

Valencia, Junio de 2018

El Dr. Julio Polaina, Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos y la Dra. Julia Marín Navarro, profesora de la Universitat de València.

CERTIFICAN

Que la tesis doctoral titulada **“Caracterización de glicosidasas y permeasas fúngicas implicadas en el transporte y metabolismo de azúcares”**, presentada por **Mary Fernanda Casa Villegas** para optar al grado de Doctor por la Universitat Politècnica de València, ha sido realizada en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC) bajo su dirección, y que reúne los requisitos legales establecidos para ser defendida por su autora.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente documento en Paterna, a 29 de mayo de 2018.

Fdo. Dr. Julio Polaina

Fdo. Dra. Julia Marín Navarro

*A mis padres y
al niño de mis ojos.*

AGRADECIMIENTOS

Luego de cuatro años dedicados a culminar este trabajo, y con él una etapa de mi vida, hay mucho y muchas personas a las que agradecer. Empezaré agradeciendo a mi director, al Dr. Julio Polaina, gracias por darme la oportunidad de formar parte del Laboratorio de Estructura y Función de Enzimas del IATA, por su predisposición para compartir su amplia experiencia y conocimientos.

Un agradecimiento inmenso a Julia, que más que una codirectora ha sido una amiga, una gran maestra de la que he aprendido muchísimo, uno de esos ángeles que mi padre va poniendo en mi camino.

Gracias Lola, no solo por tu ayuda técnica, sino también por el buen ambiente que generas, por el buen humor, las charlas y los cafés, y por enseñarme que, si el medio se riega al plaquear, “no pasa nada, se limpia y ya está”. Esa frase tan sencilla encierra mucho.

A los compañeros del laboratorio 003, a todos aquellos que conocí durante este tiempo y recordaré con mucho cariño, les agradezco por su ayuda y compañía en el día a día, de manera especial a David, gracias por los inóculos a la madrugada y por el ojo artístico.

A todas las personas que conocí en el IATA, investigadores, técnicos, estudiantes, personal de servicio, personal de recepción, a todos muchas gracias. A mi tutor, el Dr. Fidel Toldrá, gracias por la ayuda con los trámites administrativos de la universidad.

También debo reconocer a las instituciones de la República del Ecuador que hicieron posible mi formación, a la Secretaría de Educación Superior,

Ciencia, Tecnología e Innovación por la beca de estudios que me otorgó, y a la Escuela Politécnica Nacional por concederme la licencia.

Un agradecimiento muy sentido a mi familia, a mi padre, que aunque físicamente no está, siempre me cuida, me protege, y con su carácter fuerte me recuerda que la vida sigue; a mi madre por sus bendiciones, por ser mi ejemplo de trabajo, por ser el alma de la familia; a mis hermanos por el apoyo y sincero interés.

Muchas gracias a mi familia política, en particular a mis suegros, gracias por su apoyo, por su paciencia con todos los trámites. Su ayuda ha sido vital para llegar a este punto.

Finalmente, un agradecimiento especial a mis “compañeros de piso”, o mejor dicho a mis compañeros de vida, Bolívar y Agustín. Gracias Bolito por la comprensión, por el tiempo, por embarcarte conmigo en esta aventura. Gracias a mi adorado niño Agustín, por ser el compañero más alegre, el más colaborador, por ser mi hijo, *thank you so much for your kindness*.

RESUMEN

En el presente trabajo se caracterizaron glicosil hidrolasas (GHs) y permeasas fúngicas implicadas en el metabolismo y transporte de azúcares, con dos aplicaciones diferentes: la producción de etanol y la síntesis de isomaltooligosacáridos (IMOS). Se han abordado tres objetivos específicos: 1) desarrollar un proceso eficiente de sacarificación y fermentación simultánea (SSF) de celulosa; 2) comparar distintas estrategias para la fermentación de celobiosa, paso crítico en la fermentación de celulosa; 3) sintetizar IMOS utilizando como material catalítico células de levadura que producen una α -glucosidasa de *Aspergillus niger*.

En el proceso propuesto de sacarificación y fermentación simultánea celulosa, el material de partida (papel de filtro) se digirió con una preparación enzimática de *Trichoderma reesei*, y se fermentó con una cepa recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* (T500) que secreta una β -glucosidasa de *Saccharomycopsis fibuligera*. La actividad β -glucosidasa, deficitaria en el cóctel celulolítico de *T. reesei*, mejoró el progreso de la hidrólisis de la celulosa y la fermentación, ya que disminuye el efecto inhibitorio causado por la acumulación de celobiosa. Con este proceso se alcanzaron rendimientos de etanol por encima de 70 g/L.

Se han comparado estrategias de hidrólisis extracelular o intracelular de celobiosa. Para ello, se utilizó la cepa T500 y nuevas cepas recombinantes generadas en este estudio. En una primera aproximación para la hidrólisis intracelular, se ensayaron tres β -glucosidasas distintas y una permeasa de celobiosa de *Penicillium oxalicum*. En los transformantes resultantes, la tasa de crecimiento en celobiosa se vio limitada por β -glucosidasas con baja actividad

celobiosa, pero por encima de cierto valor de actividad el principal cuello de botella fue el transporte del azúcar. Por esta razón, buscamos nuevos transportadores de celobiosa procedentes de *T. reesei*. De 107 secuencias designadas como transportadores de azúcares en el genoma de *T. reesei*, se seleccionaron diez por su mayor similitud de secuencia con permeasas de celobiosa de otros hongos caracterizadas funcionalmente y se probaron experimentalmente. Solo una de ellas (Tr_StrC) fue capaz de facilitar el transporte de celobiosa y permitir el crecimiento de *S. cerevisiae*. Finalmente, se comparó la capacidad de fermentar celobiosa de los dobles transformantes de levadura, con capacidad de transportar e hidrolizar intracelularmente el disacárido, con la del transformante T500. La estrategia extracelular permitió una tasa de fermentación más rápida y mayores rendimientos de etanol en comparación con la estrategia intracelular. La cepa T500 también fue más eficiente en un sistema SSF de celulosa.

Se han construido y analizado cepas recombinantes de *S. cerevisiae* que expresan un gen (*aglA*) que codifica una α -glucosidasa de *A. niger*. Los transformantes de levadura produjeron actividad α -glucosidasa extracelularmente, la mitad de la cual quedó asociada a células y la otra mitad fue liberada al medio de cultivo. Usando maltosa como único sustrato de partida, tras 8 h de incubación, el principal producto de transglicosilación fue panosa, pero tras 24 h el producto predominante fue isomaltosa. La isomaltosa también predominó a tiempos cortos de reacción, si en lugar de sólo maltosa se utilizaba de partida una mezcla de maltosa y glucosa. Para facilitar la síntesis de IMOS se diseñó un proceso en el cual las células de levadura pueden ser utilizadas directamente como material catalítico. Para ello, se expresaron en *S. cerevisiae* construcciones génicas del gen *aglA* fusionado con el gen de levadura *SED1*, en versión completa o truncada, que posee la secuencia GPI

(glicosilfosfatidil inositol) de anclaje a pared celular. Las enzimas híbridas resultantes se fijaron de forma estable a la superficie celular. Las células provenientes de los cultivos recombinantes que expresan las construcciones *aglA-SED1* se pudieron reciclar para producir IMOS en reacciones sucesivas.

ABSTRACT

In the present work, glycosyl hydrolases (GHs) and fungal permeases involved in the metabolism and transport of sugars were characterized, with two different applications: the production of ethanol and the synthesis of isomaltooligosaccharides (IMOS). Three specific objectives have been addressed in order to: 1) develop an efficient process of saccharification and simultaneous fermentation (SSF) of cellulose; 2) compare different strategies for cellobiose fermentation, a critical step in cellulose fermentation; 3) synthesize IMOS using, as catalytic material, yeast cells that produce *Aspergillus niger* α -glucosidase.

Strategies for extracellular or intracellular hydrolysis of cellobiose have been compared. To this end, the T500 strain and new recombinant strains generated in this study were used. In a first approach for intracellular hydrolysis, three different β -glucosidases and a cellobiose permease from *Penicillium oxalicum* were tested. In the resulting transformants, growth rate in cellobiose was limited by β -glucosidases with low cellobiase activity, but above a certain activity value the main bottleneck was sugar transport. For this reason, we searched novel cellobiose transporters from *T. reesei*. Among 107 sequences designated as sugar transporters in the genome of *T. reesei*, ten were selected based on their higher sequence similarity with functionally characterized cellobiose permeases from other fungi and experimentally tested. Only one of them (Tr_StrC) was able to facilitate cellobiose transport and to allow growth of *S. cerevisiae*. Finally, the ability to ferment cellobiose of the double yeast transformants, capable of transporting and hydrolyzing the disaccharide intracellularly, was compared with that of the transformant T500. The extracellular strategy allowed a faster fermentation rate and higher ethanol

yields compared to the intracellular approach. The T500 strain was also more efficient in a cellulose SSF system.

Recombinant strains of *S. cerevisiae* expressing a gene (*aglA*) encoding an α -glucosidase from *A. niger* have been constructed and analyzed. The yeast transformants produced α -glucosidase activity extracellularly, half of which was cell-associated and the other half was released into the culture medium. Using maltose as the only initial substrate, after 8 h of incubation, the main product of transglycosylation was panose, but after 24 h the predominant product was isomaltose. Isomaltose also predominated at short reaction times, if a mixture of maltose and glucose was used instead of maltose alone. In order to facilitate the synthesis of IMOS, a process was designed in which the yeast cells can be used directly as catalytic material. For this purpose, the *aglA* coding region was fused to full-length or truncated versions of the yeast gene *SED1*, containing the GPI (glycosylphosphatidyl inositol) sequence for anchoring to the cell wall, and expressed in *S. cerevisiae*. The resulting hybrid enzymes were fixed stably to the cell surface. Cells from the recombinant cultures expressing the *aglA-SED1* constructs could be recycled to produce IMOS in successive reactions.

RESUM

En aquest treball es van caracteritzar glicosil hidrolases (GHs) i permeases fúngiques implicades en el metabolisme i transport de sucres, amb dos aplicacions diferents: la producció d'etanol i la síntesi d'isomaltooligosacàrids (IMOS). S'han abordat tres objectius específics: 1) desenvolupar un procés eficient de sacarificació i fermentació simultània (SSF) de cel·lulosa; 2) comparar distintes estratègies per a la fermentació de celobiosa, pas crític en la fermentació de cel·lulosa; 3) sintetitzar IMOS utilitzant com a material catalític cèl·lules de llevat que produeixen una α -glucosidasa de *Aspergillus niger*.

En el procés proposat de sacarificació i fermentació simultània cel·lulosa, el material de partida (paper de filtre) es va digerir amb una preparació enzimàtica de *Trichoderma reesei*, i es va fermentar amb una soca recombinant de *Saccharomyces cerevisiae* (T500), la qual secreta una β -glucosidasa de *Saccharomycopsis fibuligera*. La activitat β -glucosidasa, deficitària en el còctel cel·lulolític de *T. reesei*, va millorar el progrés de la hidròlisi de la cel·lulosa i la fermentació, ja que disminueix l'efecte inhibitori causat per la acumulació de celobiosa. Amb aquest procés es van assolir rendiments d'etanol per damunt de 70 g/L.

S'han comparat estratègies d'hidròlisi extracel·lular o intracel·lular de celobiosa. Per a això, es va utilitzar la soca T500 i noves soques recombinants generades en aquest estudi. En una primera aproximació per a la hidròlisi intracel·lular, s'assajaren tres β -glucosidases distintes i una permeasa de celobiosa de *Penicillium oxalicum*. Als transformants resultants, la tasa de creixement amb celobiosa va estar limitada per β -glucosidases amb baixa

activitat celobiasa, però per damunt d'un cert valor d'activitat el principal coll d'ampolla va ser el transport del sucre. Per aquesta raó, cercàrem nous transportadors de celobiosa procedents de *T. reesei*. De 107 seqüències designades com a transportadors de sucres en el genoma de *T. reesei*, es van seleccionar deu per la seua major similitut de seqüència amb permeases de celobiosa d'altres fongs caracteritzades funcionalment i es van provar experimentalment. Només una d'elles (Tr_StrC) va ser capaç de facilitar el transport de celobiosa i permetre el creixement de *S. cerevisiae*. Finalment, es va comparar la capacitat de fermentar celobiosa dels dobles transformants de llevat, amb capacitat de transportar i hidrolitzar intracel·lularment el disacàrid, amb la del transformant T500. La estratègia extracel·lular va permetre una tasa de fermentació més ràpida i majors rendiments d'etanol en comparació amb la estratègia intracel·lular. La soca T500 també va ser més eficient en un sistema SSF de cel·lulosa.

S'han construït i analitzat soques recombinants de *S. cerevisiae* que expresen un gen (*aglA*) que codifica una α -glucosidasa de *A. niger*. Els transformants de llevat produïren activitat α -glucosidasa extracel·lularment, la meitat de la qual va quedar associada a cèl·lules i l'altra meitat va ser alliberada al medi de cultiu. Utilitzant maltosa com a únic substrat de partida, després de 8 h d'incubació, el principal producte de transglicosilació va ser panosa, però després de 24 h el producte predominant va ser isomaltosa. La isomaltosa també va predominar a temps curts de reacció, si en lloc de només maltosa s'utilitzava de partida una combinació de maltosa i glucosa. Per a facilitar la síntesi de IMOS es va dissenyar un procés en el qual les cèl·lules de llevat poden ser utilitzades directament com a material catalític. Per a això, s'expressaren en *S. cerevisiae* construccions gèniques del gen *aglA* fusionat amb el gen de llevat *SED1*, en versió completa o truncada, el qual conté la seqüència GPI

(glicosilfosfatidil inositol) d'ancoratge a paret cel·lular. Els enzims híbrids resultants es van fixar de forma estable a la superfície cel·lular. Les cèl·lules provinents dels cultius recombinants que expressen les construccions *aglA-SED1* es pugueren reciclar per a produir IMOS en reaccions succesives.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	XI
ABREVIATURAS.....	XIII
1 INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 Carbohidratos	3
1.1.1 Disacáridos	4
1.1.2 Oligosacáridos	6
1.1.3 Polisacáridos.....	12
1.2 Glicosil hidrolasas	16
1.2.1 Clasificación.....	17
1.2.2 Mecanismo de hidrólisis de las glicosil hidrolasas	18
1.2.3 Glicosil hidrolasas implicadas en la hidrólisis de celulosa.....	22
1.2.3.1 Celulasas	22
1.2.3.2 β -glucosidasas (BGLs)	26
1.2.4 Glicosil hidrolasas implicadas en la hidrólisis de almidón.....	30
1.2.4.1 Amilasas	30
1.2.4.2 α -Glucosidasas.....	32
1.3 Proteínas transportadoras de azúcares	34
1.4 Biotecnología de carbohidratos	38
1.4.1 Producción de biocombustibles.....	39
1.4.2 Síntesis de oligosacáridos.....	46

2 OBJETIVOS	59
2.1 Objetivo general	61
2.2 Objetivos específicos	61
3 MATERIALES Y MÉTODOS	63
3.1 Cepas utilizadas	65
3.2 Medios y condiciones de cultivo	65
3.2.1 Cultivo de <i>E. coli</i>	65
3.2.2 Cultivo de levaduras y hongos.....	66
3.3 Construcciones génicas	68
3.3.1 Vectores utilizados	68
3.3.2 Cebadores utilizados	69
3.3.3 Obtención de DNA molde.....	71
3.3.4 Plásmidos generados.....	72
3.4 Cepas transformantes de levadura generadas.....	76
3.5 Obtención de enzimas a partir de <i>T. reesei</i>	77
3.6 Obtención de enzimas a partir de <i>S. cerevisiae</i>	78
3.6.1 Obtención de β -glucosidasas	78
3.6.2 Obtención de α -glucosidasa.....	79
3.7 Ensayos de crecimiento y fermentación	79
3.7.1 Crecimiento en celobiosa	79
3.7.2 Ensayos de fermentación	80

3.8 Ensayos enzimáticos.....	80
3.8.1 Ensayo de actividad β -glucosidasa.....	80
3.8.1.1 Actividad hidrolítica con β -pNPG como sustrato.....	81
3.8.1.2 Celobiosa como sustrato.....	81
3.8.2 Ensayo de actividad celulasa.....	82
3.8.2.1 FPA (filter paper assay).....	82
3.8.2.2 Caracterización de los azúcares liberados en la hidrólisis de papel.....	83
3.8.3 Ensayo de actividad α -glucosidasa.....	83
3.8.3.1 Actividad hidrolítica con α -pNPG como sustrato.....	83
3.8.3.2 Actividad transglicosilante.....	84
3.9 Cuantificación de azúcares.....	85
3.10 Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE).....	85
3.11 Análisis bioinformático.....	86
3.11.1 Modelización y análisis estructural de proteínas.....	86
3.11.2 Análisis filogenético.....	87
4 CAPÍTULO I: Sinergias en la sacarificación y fermentación simultánea de celulosa.....	89
4.1 Resultados.....	91
4.1.1 Producción de enzimas celulolíticas de <i>Trichoderma reesei</i>	91
4.1.2 Hidrólisis de papel usando el complejo celulolítico de <i>T. reesei</i>	92

4.1.3 Comparación de la actividad β -glucosidasa del cóctel enzimático de <i>T. reesei</i> y la producida por <i>S. cerevisiae</i> T500.....	94
4.1.4 Sacarificación y fermentación simultánea de celulosa	96
4.2 Discusión.....	98
5 CAPÍTULO II: Fermentación de celobiosa por <i>S. cerevisiae</i> : análisis comparativo de hidrólisis intra y extracelular.....	103
5.1 Resultados	105
5.1.1 Caracterización de β -glucosidasas intracelulares	105
5.1.2 Caracterización de proteínas transportadoras de azúcares.....	107
5.1.3 Fermentación de celobiosa: análisis comparativo de hidrólisis intra y extracelular.....	111
5.2 Discusión.....	115
6 CAPÍTULO III: Producción de IMOS.....	125
6.1 Resultados	127
6.1.1 Expresión del gen <i>aglA</i> de <i>A. niger</i> en <i>S. cerevisiae</i>	127
6.1.2 Análisis de la formación de IMOS.....	129
6.1.3 Anclaje de AgIA a la superficie celular de <i>S. cerevisiae</i>	133
6.1.4 Síntesis de panosa o isomaltosa por transglucosilación en función del aceptor del grupo glucosilo.....	135
6.1.5 Síntesis de otros productos de transglucosilación usando diferentes aceptores.....	137
6.2 Discusión.....	139

7 CONCLUSIONES	143
8 BIBLIOGRAFÍA	149
9 ANEXOS.....	197

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Configuraciones α y β de los monosacáridos y formación de un enlace glicosídico	4
Figura 1.2 Representación de las moléculas de maltosa y celobiosa.....	5
Figura 1.3 Estructuras de polisacáridos. Almidón y celulosa	15
Figura 1.4 Representación simplificada de la hidrólisis del enlace glicosídico de los carbohidratos.....	16
Figura 1.5 Glicosil hidrolasas según el sitio de hidrólisis en el sustrato.....	18
Figura 1.6 Subsitios de unión a sustrato de una glicosil hidrolasa.....	19
Figura 1.7 Mecanismos de hidrólisis del enlace glicosídico	20
Figura 1.8 Mecanismos de hidrólisis y transglicosilación en función de la molécula aceptora.....	21
Figura 1.9 Diferencias en la forma de los sitios catalíticos entre EGs y CBHs	23
Figura 1.10 Estructuras terciarias de β -glucosidasas	27
Figura 1.11 Estructuras tridimensionales de amilasas	32
Figura 1.12 Estructura terciaria de la α -glucosidasa de <i>Beta vulgaris</i>	33
Figura 1.13 Proteínas transportadoras.....	36
Figura 1.14 Permeasa de lactosa de <i>E. coli</i> de la superfamilia.....	37
Figura 1.15 Estructura común de un ancla GPI y de la señal de unión en la proteína	56
Figura 3.1 Esquemas de los vectores pEMBLyex4 y YEplac112-AK	68

Figura 3.2 Esquemas de los plásmidos HgBgl_YepAK, NcBgl_YepAK y PpBglA_YepAK	73
Figura 3.3 Esquema de las construcciones obtenidas a partir del vector pEMBLyex4.	76
Figura 4.1 Producción de celulasas por <i>T. reesei</i> por fermentación líquida o sólida.....	91
Figura 4.2 Análisis del perfil de azúcares solubles.....	92
Figura 4.3 Cinética de producción de azúcares solubles a partir de la digestión de celulosa con el cóctel enzimático de <i>T. reesei</i>	93
Figura 4.4 Actividad β -glucosidasa con celobiosa como sustrato a diferentes concentraciones	94
Figura 4.5 Inhibición por glucosa de la actividad β -glucosidasa de T500 y del cóctel enzimático de <i>T.reesei</i>	95
Figura 4.6 Fermentación de papel filtro por <i>S. cerevisiae</i> T500, que expresa el gen de la β -glucosidasa de <i>S. fibuligera</i> , y por la cepa parental BY4741, acoplada a la hidrólisis de celulosa por enzimas de <i>T. reesei</i>	97
Figura 4.7 Análisis comparativo de los centros activos de las β -glucosidasas Cel 3A de <i>T. reesei</i> y BGL1 de <i>S. fibuligera</i>	100
Figura 5.1 Actividad β -glucosidasa de levaduras transformantes simples (expresan NcBgl, HgBgl o PpBglA) o dobles (co-expresan una β -glucosidasa y la permeasa Po_CdtC)	106
Figura 5.2 Crecimiento en medio con celobiosa al 2 % de los dobles transformantes de levadura que expresan el gen de la permeasa Po_CdtC y diferentes genes de β -glucosidasas.....	107

Figura 5.3 Análisis filogenético de transportadores de azúcares de diferentes organismos	110
Figura 5.4 Crecimiento en medio con celobiosa al 2 % de los dobles transformantes de levadura que expresan el gen de la NcBgl y diferentes genes de permeasas	111
Figura 5.5 Análisis de la capacidad fermentativa de cepas de levadura con una β -glucosidasa intracelular o extracelular	113
Figura 5.6 Sacarificación y fermentación simultánea de celulosa usando enzimas celulolíticas de <i>T. reesei</i> y diferentes cepas de <i>S. cerevisiae</i>	114
Figura 5.7 Alineamiento de las secuencias polipeptídicas de las permeasas utilizadas para el análisis filogenético	120
Figura 6.1 Análisis SDS-PAGE de las proteínas recuperadas del sobrenadante del medio de cultivo de <i>S. cerevisiae</i> BY4741_AglA, y de la cepa control transformada con el vector de clonación.....	127
Figura 6.2 Análisis de los potenciales sitios de glicosilación de la α -glucosidasa de <i>A. niger</i>	128
Figura 6.3 Perfil de productos obtenidos con <i>S. cerevisiae</i> BY4741_AglA y la cepa control transformada con el vector de clonación, a partir de maltosa.....	129
Figura 6.4 Cinética de la síntesis/hidrólisis de diferentes azúcares por la cepa BY4741_AglA a partir de maltosa.....	131
Figura 6.5 Modelo del sitio catalítico de la α -glucosidasa de <i>A. niger</i> en complejo con isomaltosa y con panosa	132

Figura 6.6 Actividad enzimática de células de levadura que expresan la α -glucosidasa de <i>A. niger</i> en las versiones silvestre o híbridas fusionadas a la secuencia Sed1 completa (Sed1A) o parcial (Sed1B)	134
Figura 6.7 Cinética de producción de isomaltosa y panosa por células de levadura transformadas con AgIA_Sed1B	136
Figura 6.8 Perfil de productos obtenidos por transglicosilación tras incubación de AgIA_Sed1B con diferentes mezclas de maltosa y potenciales aceptores.	138

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Diversidad química de oligosacáridos y sus aplicaciones	8
Tabla 1.2 Isomaltooligosacáridos (IMOS) lineales.....	12
Tabla 1.3 Enzimas celulolíticas y xilanolíticas secretadas por <i>T. reesei</i>	25
Tabla 1.4 β -glucosidasas de diferentes organismos.....	28
Tabla 1.5 Diferentes configuraciones del proceso de producción de bioetanol a partir de materiales celulósicos	41
Tabla 1.6 Estrategias recientes para la producción de bioetanol usando celulasas de <i>Trichoderma reesei</i>	42
Tabla 1.7 Utilización de <i>S. cerevisiae</i> ingenierizadas para la hidrólisis intracelular de celobiosa y su fermentación a etanol.....	44
Tabla 1.8 IMOS producidos en diferentes procesos	51
Tabla 3.1 Medios de cultivo utilizados para levaduras y hongos.....	66
Tabla 3.2 Suplementos de los medios sintéticos para el cultivo de levaduras.....	67
Tabla 3.3 Lista de cebadores utilizados.....	69
Tabla 3.4 Procedimiento para la obtención de las distintas construcciones génicas utilizadas en este trabajo.	74
Tabla 3.5 Levaduras transformantes obtenidas.....	77
Tabla 5.1 Secuencias proteicas correspondientes a transportadores de azúcares, caracterizados o putativos, utilizadas en el análisis filogenético.....	108
Tabla 6.1 Capacidad transglicosilante de AgIA utilizando nuevos aceptores ..	137

ABREVIATURAS

ABC	ATP-binding cassette
ATP	Adenosín trifosfato
BGLs	β -glucosidasas
CAZy	Carbohydrate Active Enzyme (base de datos)
CBHs	Celobiohidrolasas
CBM	Módulo de unión a azúcares
CBP	Bioproceso consolidado
CDs	Ciclodextrinas
CECT	Colección española de cultivos tipo
Cis	Cicloisomaltooligosacáridos
CITasa	Cicloisomaltooligosacárido glucano transferasa
COS	Quitooligosacáridos
CTS	Tetraoligosacáridos cíclicos
DNS	Ácido dinitrosalicílico
DP	Grado de polimerización
EC	Enzyme Commision
EDR	Enzyme dilution rate
EGs	Endoglucanasas
EI	Complejo enzima-inhibidor
ES	Complejo enzima-sustrato

FeXOS	Feruloil xilooligosacáridos
FOS	Fructooligosacáridos
FPU	Filter paper units
G	Glucosa
G2	Celobiosa
G418	Geneticina
GHs	Glicosil hidrolasas
GOS	Galactooligosacáridos
GPI	Glicosilfosfatidil inositol
GTs	Glicosiltransferasas
HMOS	Oligosacáridos de la leche humana
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IMOS	Isomaltooligosacáridos
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
JCBN	Joint Commission on Biochemical Nomenclature
MFS	Major facilitator superfamily
NC-IUBMB	Nomenclature Committee de la International Union of Biochemistry and Molecular Biology
OD	Densidad óptica
PEP	Fosfoenol piruvato

PTS	Phosphoenolpyruvate carbohydrate phosphotransferase system
SDS-PAGE	Electroforesis en un gel de poliacrilamida
SHF	Hidrólisis y fermentación por separado
SSF	Sacarificación y fermentación simultáneas
XOS	Xilooligosacáridos
α -pNPG	<i>p</i> -nitrofenil- α -D-glucopiranosido
β -pNPG	<i>p</i> -nitrofenil- β -D-glucopiranosido

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Carbohidratos

Los carbohidratos son las biomoléculas más abundantes de la naturaleza y suponen la vía de entrada del C inorgánico (en forma de CO₂) a la biósfera. Sus funciones son almacenar energía y ser el componente estructural en la pared celular, en el exoesqueleto de artrópodos y en órganos de otros animales. Los carbohidratos son el componente principal de productos básicos de la dieta como maíz, arroz, trigo y patatas, pero también son abundantes en materiales vegetales no comestibles como algodón y madera.

El papel asignado a los carbohidratos en la dieta humana ha ido variando desde ser considerados únicamente fuentes de energía a ser valorados como elementos clave en el desarrollo y mantenimiento de la microbiota intestinal (Porter & Martens 2017), papel a su vez muy importante en la prevención y tratamiento de enfermedades (Mima et al. 2017; Wang et al. 2017; Slavin 2013; Sekirov et al. 2010). En la industria no alimentaria sus aplicaciones también han ido ampliándose, desde las más tradicionales en empresas textiles y de papel hasta aplicaciones menos convencionales como la producción de biocombustibles (Favaro et al. 2017; Goldemberg 2008).

La unidad estructural de los carbohidratos son los azúcares simples o monosacáridos. Los más abundantes son las pentosas y las hexosas, algunos de los cuales se pueden encontrar libres en la naturaleza, aunque más frecuentemente forman parte de carbohidratos más complejos. La D-glucosa, una hexosa, es un monosacárido fundamental para la vida por ser la principal fuente de energía para las células, y es también la base estructural de dos de los principales carbohidratos, almidón y celulosa (Ghazarian et al. 2011). Dependiendo de la orientación espacial de su carbono anomérico puede tener

INTRODUCCIÓN GENERAL

una configuración α o β (Figura 1.1A,B), lo cual incide directamente en las propiedades físicas de la glucosa y del carbohidrato que a partir de ella se forme.

Cuando los monosacáridos se conectan entre sí mediante enlaces O-glicosídicos (enlaces covalentes entre la forma cíclica hemiacetal o hemicetal de un monosacárido y un grupo alcohol de otro azúcar) (Figura 1.1C), dan origen a carbohidratos más complejos. Dependiendo del grado de polimerización se pueden formar disacáridos, oligosacáridos o polisacáridos.

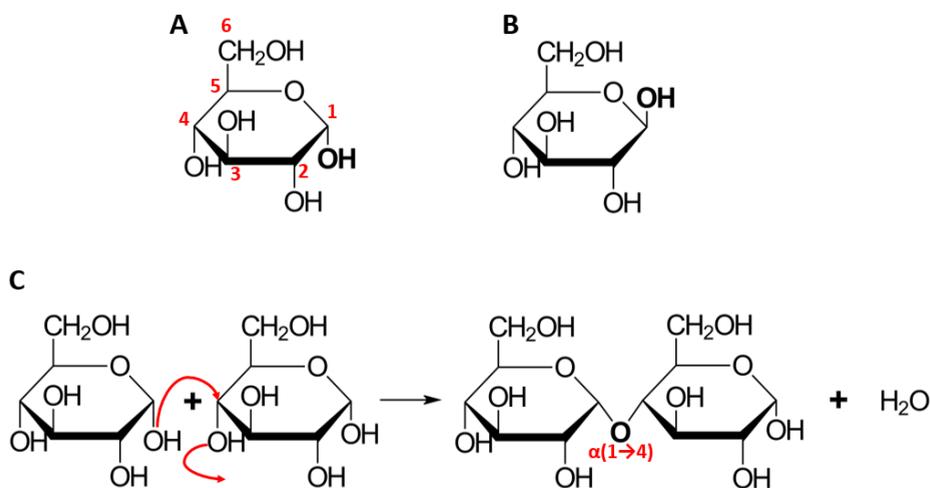


Figura 1.1 Configuraciones α y β de los monosacáridos y formación de un enlace glicosídico. El carbono 1 (anomérico) teóricamente puede formar enlaces glicosídicos con cualquiera de los grupos funcionales alcohólicos de otro monosacárido. (A) α -D-glucosa con sus carbonos numerados. (B) β -D-glucosa. (C) Enlace glicosídico $\alpha(1\rightarrow4)$ entre dos moléculas de α -D-glucosa.

1.1.1 Disacáridos

Son el resultado de la unión de dos monosacáridos, iguales o diferentes, mediante un enlace O-glicosídico. Estos azúcares pueden ser reductores o no reductores dependiendo de si el carbono anomérico está libre o no, respectivamente (Ghazarian et al. 2011). Entre los disacáridos más importantes

desde el punto de vista de su abundancia e interés industrial están: lactosa, sacarosa, maltosa y celobiosa.

La lactosa es el resultado de la unión de una β -D-galactosa mediante un enlace $\beta(1\rightarrow4)$ a una D-glucosa (Adam et al. 2004). Se encuentra en la naturaleza en la leche de los mamíferos y su interés en la industria alimentaria se centra en dos aspectos: su hidrólisis para la generación de productos sin lactosa destinados a consumidores con intolerancia a este azúcar, o su utilización como sustrato para la generación de oligosacáridos prebióticos como se describe más adelante. La sacarosa se forma por una D-glucosa unida mediante un enlace $\alpha(1\rightarrow2)$ a una β -D-fructosa. En la naturaleza está presente en muchas plantas como por ejemplo la caña de azúcar, una materia prima usada a gran escala para la producción de etanol (Goldemberg 2008). Es de amplio uso en la alimentación humana como edulcorante, y en menor medida se utiliza como sustrato para la síntesis de prebióticos. Otros disacáridos relevantes son la maltosa y la celobiosa. Cuando una molécula de glucosa se une a otra mediante un enlace O-glucosídico $\alpha(1\rightarrow4)$ se forma maltosa, pero cuando el enlace es $\beta(1\rightarrow4)$ se forma celobiosa (Figura 1.2). Tanto maltosa como celobiosa no se encuentran libres en la naturaleza, sino que aparecen como productos de hidrólisis del almidón y de la celulosa, respectivamente.

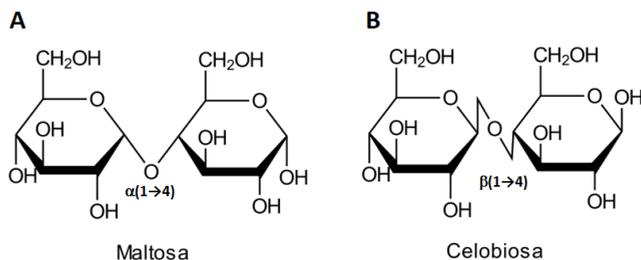


Figura 1.2 Representación de las moléculas de (A) maltosa y (B) celobiosa, cuya diferencia básica es la orientación espacial del enlace glucosídico.

1.1.2 Oligosacáridos

Están constituidos por cadenas cortas de monosacáridos que contienen entre 2 y 10 unidades, unidas por enlaces glicosídicos. Pueden ser lineales, ramificados o cíclicos. También se presentan unidos a péptidos y lípidos formando glicoproteínas y glicolípidos, respectivamente. Las características físicas y químicas de los oligosacáridos, y por ende sus aplicaciones, dependen del tipo de monómero, del tipo de enlace y del grado de polimerización (DP) (Weijers et al. 2008; Raman et al. 2005).

Los oligosacáridos a nivel industrial se obtienen por procedimientos químicos o enzimáticos, a partir de la hidrólisis de polisacáridos o mediante la condensación de otros azúcares precursores con menor grado de polimerización. Las enzimas utilizadas son glicosido hidrolasas (GHs) y glicosiltransferasas (GTs) (Talens-Perales et al. 2016).

Los oligosacáridos cumplen un papel importante en el reconocimiento biológico, en procesos como las interacciones célula-célula, las infecciones celulares por patógenos y la unión a toxinas, entre otros (Weijers et al. 2008). Desde el punto de vista industrial, los oligosacáridos despiertan interés en las áreas alimentarias y farmacéuticas por sus propiedades edulcorantes, gelificantes, antioxidantes y humectantes. Además, algunos de ellos son capaces de transportar y liberar fármacos, y otros tienen carácter prebiótico (Talens-Perales et al. 2016). Los oligosacáridos prebióticos son aquellos que no son digeridos en el tracto gastrointestinal humano, sino que son fermentados por la microbiota del colón, estimulando selectivamente el crecimiento de bacterias beneficiosas y mejorando la salud del organismo hospedador (Louis et al. 2016). Existe una gran variedad química de oligosacáridos dependiendo del tipo de monosacáridos que los forman, del tipo de enlace y del grado de polimerización.

Entre los oligosacáridos destacan por su extensa penetración en la industria de alimentos los fructooligosacáridos (FOS) y los galactooligosacáridos (GOS). Los fructooligosacáridos son cadenas cortas de unidades fructosilo conectadas en muchos casos por su extremo reductor a una molécula de sacarosa. Las unidades fructosilo pueden estar conectadas entre sí por enlaces $\beta(2\rightarrow1)$ como en la 1-kestosa, o por enlaces $\beta(2\rightarrow6)$ como en la 6-kestosa. También existen FOS con los 2 tipos de enlaces como la bifurcosa. Otra alternativa es que la rama de fructosa esté conectada a través de un enlace $\beta(2\rightarrow6)$ al residuo de glucosa de la sacarosa como en la neokestosa (Vijn & Smeekens 1999). La producción por vía enzimática se consigue normalmente mediante síntesis a partir de sacarosa (Linde et al. 2012; Lafraya et al. 2011; Bali et al. 2015) o mediante la hidrólisis de inulina (Wang et al. 2016). Los FOS tienen efecto prebiótico (Kim et al. 2017), ayudan a reducir el estreñimiento (Closa-Monasterolo et al. 2017; Sabater-Molina et al. 2009), tienen efecto antiinflamatorio e inciden en el metabolismo de lípidos (Merino-Aguilar et al. 2014).

Los galactooligosacáridos (GOS) son cadenas de D-galactosa con un grado de polimerización que varía entre 3 y 6 (Vera et al. 2016), unidas por enlaces $\beta(1\rightarrow3)$, $\beta(1\rightarrow4)$ o $\beta(1\rightarrow6)$ que en la mayoría de casos se conectan por su extremo reductor a una molécula de glucosa. Normalmente se obtienen por vía enzimática a partir de lactosa (Marín-Navarro et al. 2014). Tienen efecto prebiótico (Hong et al. 2016), estimulan el sistema inmune (Vulevic et al. 2015; Alizadeh et al. 2016), tienen efectos anti-adhesivos contra toxinas (Sinclair et al. 2009) y patógenos (Shoaf et al. 2006), mejoran la absorción de minerales como el calcio (Takasugi et al. 2016; Weaver et al. 2011), alivian el estreñimiento y mejoran la función intestinal (Niittynen et al. 2007). Otros oligosacáridos derivados de la lactosa son los HMOS, que influyen en la mucosa neonatal y

Tabla 1.1 Diversidad química de oligosacáridos y sus aplicaciones^a

OLIGOSACÁRIDO	DESCRIPCIÓN	SUSTRATO	APLICACIONES	REFERENCIAS
Palatinosa o isomaltulosa	Disacárido: D-glucosa unida por enlace $\alpha(1 \rightarrow 6)$ a D-fructosa	Sacarosa	Edulcorante de bajo índice glicémico. Simbiótico con <i>Lactobacillus</i> y <i>Lactococcus</i>	(Wu et al. 2017; Maresch et al. 2017; Pranckute et al. 2014)
Lactulosa	Disacárido: D-galactosa unida por un enlace $\beta(1 \rightarrow 4)$ a D-fructosa	Lactosa y fructosa	Se usa para tratar la encefalopatía hepática y el estreñimiento. Es beneficiosa en casos de insuficiencia crónica renal ya que disminuye en el suero los productos relacionados con el nitrógeno. En condiciones <i>in vitro</i> en dosis clínicas relevantes mejora el crecimiento de <i>Bifidobacterium</i> y <i>Lactobacillus</i> .	(Cardelle-Cobas et al. 2011; Guenero et al. 2015; Mendes et al. 2017; Portalin & Winstead 2012; Lin et al. 2016; Bothe et al. 2017)
Lu-GOS	Galactooligosacáridos (GOS) que en el extremo reductor tienen fructosa en lugar de glucosa	Lactulosa	Prebiótico	(Hernandez-Hernandez et al. 2012)
Lactosucrosa	Trisacárido: D-galactosa unida mediante un enlace $\beta(1 \rightarrow 4)$ al residuo glucosilo de la sacarosa	Lactosa y sacarosa	Prebiótico. Incrementa la absorción del calcio. Atenúa la inflamación intestinal. Ha sido efectiva en la supresión de la infección del virus de la gripe A(H1N1) en ratones.	(Li et al. 2015; Díez-Munición et al. 2014; Mu et al. 2013; Teramoto et al. 2006; Kishino et al. 2015; Zhou et al. 2015)
Oligosacáridos de la familia de la rafinosa (RFOS): rafinosa, estaquirosa y verbascosa	Tri, tetra y pentasacáridos que se forman por la unión de una, dos o tres moléculas de galactosa, respectivamente, mediante enlaces $\alpha(1 \rightarrow 6)$ al residuo glucosilo de la sacarosa	Sacarosa y galactosa	Actividad bifidogénica	(Baik 2010; Martínez-Villaluenga & Gómez 2007)
Xilooligosacáridos (XOS)	Oligosacáridos formados por unidades de xilosa unidas por enlaces $\beta(1 \rightarrow 4)$. DP 2 – 6.	Xilano	Promueven el crecimiento de bifidobacterias y la producción de ácidos orgánicos. Tienen actividad antimicrobiana, propiedades inmunomoduladoras y efectos cosméticos.	(Ho et al. 2018; Samanta et al. 2015; Aachary & Prapulla 2011)

OLIGOSACÁRIDO	DESCRIPCIÓN	SUSTRATO	APLICACIONES	REFERENCIAS
Ferulóil xilooligosacáridos (FeXOS)	Xilooligosacáridos esterificados con ácido trans-ferúlico en la posición O-4 de algunos residuos α -D-xilopiranosilo	Xilano	Inhiben la oxidación inducida por lipoproteínas de baja densidad. Reducen la hemólisis de los eritrocitos en condiciones <i>in vitro</i> . Protegen contra el estrés oxidativo.	(Yao et al. 2014; Katapodis & Christakopoulos 2008; Yuan et al. 2005; Katapodis et al. 2003)
Quitooligosacáridos (COS)	Cadenas de D-glucosamina conectadas por enlaces $\beta(1\rightarrow4)$	Quitosano, quitina	Tienen efectos antimicrobianos, hipocolesterolémicos, antitumorales e inmunostimulantes. Mejoran la absorción de calcio y hierro. Liberación de fármacos. En condiciones <i>in vitro</i> tienen efecto neuroprotector.	(Jiang et al. 2017; Santos-Moriano et al. 2017; Jung & Park 2014; Xia et al. 2011)
POS	Oligosacáridos derivados de la pectina	Pectina	Algunos tienen potencial prebiótico y otros tienen efecto bacteriostático.	(Zhang et al. 2018; Babbar et al. 2017; Martinov et al. 2017)
β -glucano oligosacáridos	Cadenas de D-glucosa unidas por enlaces $\beta(1\rightarrow3)$	Laminarina	Tienen un efecto inmunogénico. En peces koi (<i>Cyprinus carpio</i>) mejoran el crecimiento, la supervivencia y la respuesta inmune.	(Mélida et al. 2017; Liao et al. 2015; Lin et al. 2011)

^a Los oligosacáridos denominados FOS, GOS, maltooligosacáridos e IMOS se describen en el texto

INTRODUCCIÓN GENERAL

en la inmunidad sistémica (Donovan & Comstock 2017). Las unidades estructurales son D-glucosa, D-galactosa, N-acetilglucosamina, L-fucosa y ácido siálico, unidas por distintos tipos de enlaces α y β , (Grabarics et al. 2017; Bode 2012) lo cual los convierte en un grupo muy heterogéneo desde el punto de vista químico. Esta complejidad dificulta su síntesis a nivel industrial, aunque a escala de laboratorio diferentes estrategias de síntesis enzimática han resultado exitosas para obtener distintos tipos de fucosil-oligosacáridos (Rodríguez-Díaz et al. 2011; Wada et al. 2008; Albermann et al. 2001).

Además de FOS y GOS, derivados respectivamente de sacarosa y lactosa, existen otros oligosacáridos de interés creciente en los últimos años. Entre ellos se encuentran oligosacáridos derivados de la maltosa como los maltooligosacáridos y los isomaltooligosacáridos (IMOS), además de otros con una amplia diversidad química y funcional (Tabla 1.1).

Los maltooligosacáridos son cadenas de D-glucosa unidas por enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$, con un DP de 2 a 10, que se obtienen a partir de la hidrólisis del almidón (Pan et al. 2017), y se usan como edulcorantes (Hofman et al. 2016). Las ciclodextrinas (CDs) son maltooligosacáridos cíclicos con un DP de 6 a 12. Son producidas como resultado de la reacción de transglucosilación intramolecular (ciclación) durante la degradación del almidón. Dependiendo del número de residuos de glucosa pueden ser α (6 unidades), β (7 unidades) o γ (8 unidades) (Rajput et al. 2016). Las CDs mejoran la solubilidad de ciertas drogas, facilitando el transporte y la biodisponibilidad (Jansook et al. 2017). Además, se ha demostrado que las β CDs mejoran la viabilidad de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* GG (Singh et al. 2017).

Los isomaltooligosacáridos son glucooligosacáridos que tienen en su estructura al menos un enlace $\alpha(1\rightarrow6)$, $\alpha(1\rightarrow3)$ o $\alpha(1\rightarrow2)$. La estructura de los

IMOS está caracterizada por el grado de polimerización (de 2 a 10 glucosas), los tipos de enlaces (α -1 \rightarrow 2, 3, 4 o 6) y por la proporción y posición de cada tipo de enlace (Goffin et al. 2011). En la [Tabla 1.2](#) se muestran los IMOS lineales más abundantes y su estructura química. También se han descrito IMOS cíclicos como los cicloisomaltooligosacáridos (CIs) y ciertos tetraoligosacáridos cíclicos (CTS). Los CIs o ciclodextranos consisten en moléculas cíclicas de 7 a 12 unidades de glucosa unidas con enlaces α (1 \rightarrow 6) (Funane et al. 2008; Oguma et al. 1994; Funane et al. 2007a; Funane et al. 2007b). Los CIs son capaces de inhibir a la glucosil transferasa de *Spreptococcus mutans* evitando así la formación de glucano insoluble, lo que sugiere una función cariostática de los CIs (Funane et al. 2007a; Funane et al. 2007b). El CI de 10 unidades ha sido usado para formar complejos de inclusión, específicamente para estabilizar el colorante azul Victoria B (Funane et al. 2007b). Por otro lado, se han sintetizado CTS con distintos tipos de enlaces. La maltosilmaltosa cíclica (CMM) que consiste en 4 glucosas unidas por enlaces alternos α (1 \rightarrow 4) y α (1 \rightarrow 6) (Mukai et al. 2006; Mukai et al. 2005), y un CTS formado por 4 glucosas unidas mediante enlaces alternos α (1 \rightarrow 3) y α (1 \rightarrow 6) (Aga et al. 2002; Nishimoto et al. 2002).

Distintos estudios refuerzan el carácter prebiótico de los IMOS, ya que los enlaces glucosídicos presentes en su estructura no son fácilmente hidrolizados por las enzimas intestinales (Shi et al. 2016; Goffin et al. 2011), pero sí son metabolizados por bacterias de la microbiota intestinal como *Lactobacillus* y bifidobacterias. Un aspecto importante para la digestibilidad y metabolismo de los IMOS por la microbiota intestinal es el grado de polimerización y el ratio entre enlaces α (1 \rightarrow 4) y α (1 \rightarrow 6) (Hu et al. 2017; Hu et al. 2013; Ketabi et al. 2011). Además, los IMOS tienen un potencial uso como edulcorantes con bajo aporte calórico (Kohmoto et al. 1992).

Tabla 1.2 Isomaltooligosacáridos (IMOS) lineales

NOMBRE	ESTRUCTURA QUÍMICA
Isomaltosa	$\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{6)-}\alpha\text{-D-Glcp}$
Isomaltotriosa	$\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{6)-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{6)-D-Glcp}$
Isomaltotetraosa	$\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{6)-}(\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{6))}_2\text{-D-Glcp}$
Panosa	$\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{6)-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)-D-Glcp}$
Glucosa - panosa	$\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{6)-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{6)-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)-D-Glcp}$
Glucosa - maltotriosa	$\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{6)-}(\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4))}_2\text{-D-Glcp}$
Kojibiosa	$\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{2)-D-Glcp}$
Nigerosa	$\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{3)-D-Glcp}$
Centosa	2,4-di-O-(α -glucosil)-glucosa

Adaptado de Goffin et al. (2011)

1.1.3 Polisacáridos

Son moléculas con un alto grado de polimerización, lineales o ramificadas. Al igual que los oligosacáridos sus propiedades dependen del tipo y número de unidades estructurales, así como del tipo de enlace que los una. Dos de los ejemplos más paradigmáticos son la celulosa y el almidón, polisacáridos formados únicamente por unidades de D-glucosa, unidas por enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ o $\alpha(1\rightarrow4)$, respectivamente. Esta única diferencia es la responsable de las distintas estructuras y funciones que presentan estos polisacáridos.

El almidón está constituido por dos tipos de polímeros: la amilosa (15 - 35 %), polisacárido lineal de unidades de glucosa conectadas por enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$, y la amilopectina (65 - 85 %), que a partir del mismo esqueleto contiene ramificaciones de glucosa unidas por enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ cada 25 -30 monómeros (Figura 1.3A) (Magallanes-Cruz et al. 2017; Pérez & Bertoft 2010). Su función biológica es el almacenamiento de energía en las células vegetales, siendo el

principal componente de alimentos como el arroz o las patatas. Las hebras de amilosa son helicoidales, por lo que no pueden empaquetarse fácilmente y lo mismo ocurre con la amilopectina, al tratarse de una estructura ramificada. Como resultado, el almidón es un material de estructura amorfa, y aunque es insoluble en agua fría, puede sufrir procesos de gelatinización al subir la temperatura (Prestegard et al. 2017). La modificación enzimática del almidón, incluyendo la hidrólisis, para la obtención de azúcares fermentables u oligosacáridos funcionales es un proceso muy usado en la industria alimentaria (van Der Maarel & Leemhuis 2013) y no alimentaria. Uno de los ejemplos más importantes es la producción de etanol de primera generación a partir de almidón de maíz (Bothast & Schlicher 2005) o de la caña de azúcar, que genera cierta controversia porque la obtención de combustible compite con la producción de alimentos.

La celulosa es un polímero lineal con función estructural, que constituye el principal componente de la pared celular vegetal. Las cadenas lineales de celulosa interaccionan unas con otras a través de puentes de hidrógeno para formar capas, y éstas a su vez interaccionan con otras mediante fuerzas de van der Waals para formar microfibrillas (Figura 1.3B) (Jordan et al. 2012). Dependiendo del nivel de orden y empaquetamiento pueden existir formas cristalinas y amorfas de celulosa, todas ellas altamente insolubles. Actualmente es de gran interés mejorar la eficiencia de la hidrólisis enzimática de celulosa para la obtención de azúcares fermentables (Druzhinina & Kubicek 2017; Dimarogona et al. 2012), cuyo principal uso es la producción de etanol de segunda generación, un combustible renovable que no compite con la producción de alimentos (Jansen et al. 2017; Favaro et al. 2017; Viikari et al. 2012). En la naturaleza la celulosa normalmente se halla asociada a hemicelulosa y lignina. Desde el punto de vista de su abundancia y sus

INTRODUCCIÓN GENERAL

aplicaciones industriales, además de la celulosa y el almidón, destacan otros polisacáridos relacionados, como la hemicelulosa y el dextrano.

Las hemicelulosas también forman una parte importante de la pared celular vegetal junto con la celulosa. Dependiendo de la estructura del esqueleto central de la molécula se forman tres familias de hemicelulosas: xilanos, mananos y galactanos (Holtzapfle 2003; Ren & Sun 2010). Los monómeros estructurales de las hemicelulosas son xilosa, manosa, glucosa, galactosa y arabinosa. Los residuos de glucosa, manosa y xilosa pueden estar acetilados. La glucosa también puede encontrarse funcionalizada como ácido urónico y como ácido urónico metilado. El xilano normalmente tiene una cadena principal de unidades de xilosa unidas por enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ con ramificaciones en las posiciones 2 o 3, que pueden ser de ácido D-glucorónico o su 4-O-metil éter, L-arabinosa y/o varios oligosacáridos de D- xilosa, L-arabinosa, D- o L- galactosa y D-glucosa. Debido a la alta diversidad y complejidad de los xilanos la variedad de subproductos útiles que pueden generar es bastante amplia (Ren & Sun 2010). Por otro lado, el manano es un polímero de hemicelulosa lineal de unidades de D-manosa unidas por enlaces $\beta(1\rightarrow4)$. Una variante de la molécula de manano es el glucomanano que se forma por unidades de D-glucosa y D-manosa unidas por enlaces $\beta(1\rightarrow4)$. Existen variantes ramificadas de manano y glucomanano que son el galactomanano y el galactoglucomanano, respectivamente, con cadenas laterales $\alpha-(1\rightarrow6)$ -D-galactopiranosas (Holtzapfle 2003; Mano et al. 2017). El galactano o arabinogalactano es un tipo de hemicelulosa con un esqueleto central de moléculas de galactosa unidas mediante enlaces $\beta(1\rightarrow3)$ y con cadenas laterales normalmente de arabinosa (Ren & Sun 2010).

Otro polisacárido de interés por su uso como sustrato para la producción de IMOS es el dextrano. La cadena principal está formada por

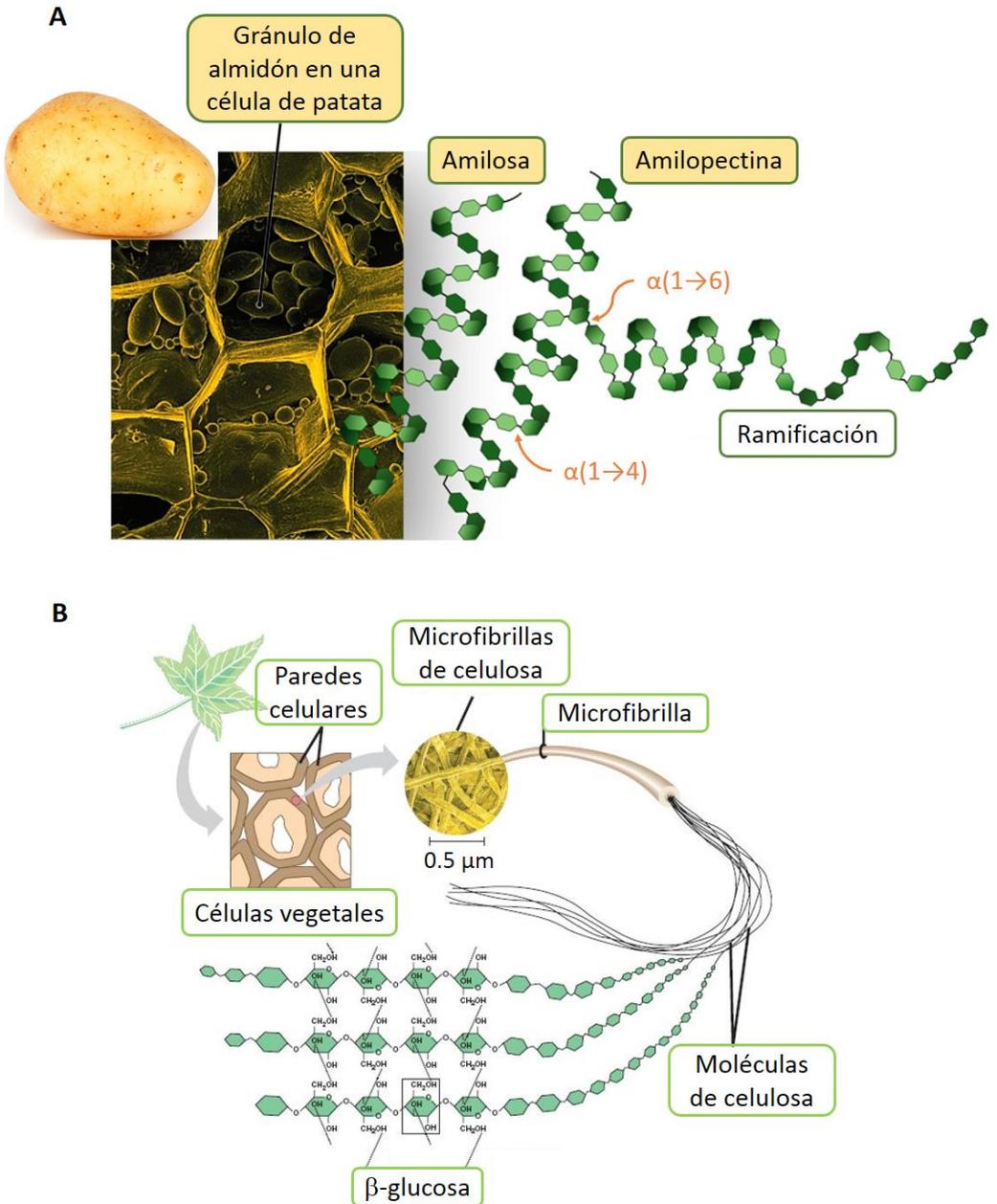


Figura 1.3 Estructuras de polisacáridos. (A) Almidón en sus dos formas, amilosa y amilopectina. (B) Celulosa.

INTRODUCCIÓN GENERAL

moléculas de D-glucosa unidas con enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$. Tiene ramificaciones cortas del mismo monómero unidas con enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$, $\alpha(1\rightarrow2)$ o $\alpha(1\rightarrow3)$. Existen polisacáridos relacionados al dextrano como el mutano, alternano, reuterano y pululano. El mutano tiene un esqueleto central formado por enlaces $\alpha(1\rightarrow3)$ y ramificaciones con enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$. En el alternano la cadena principal contiene enlaces alternos $\alpha(1\rightarrow3)/\alpha(1\rightarrow6)$, y las ramificaciones se forman por enlaces $\alpha(1\rightarrow3)$. En el reuterano la cadena principal contiene enlaces alternos $\alpha(1\rightarrow4)/\alpha(1\rightarrow6)$ (Gangoiti et al. 2017). El pululano se forma por moléculas de maltotriosa unidas de forma consecutiva por enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ (Gozu et al. 2016). Algunas enzimas que sintetizan dextrano pueden sintetizar mutano, alternano y reuterano, mientras que otras enzimas que hidrolizan dextrano podrían hidrolizar pululano.

1.2 Glicosil hidrolasas

Las glicosil hidrolasas (GHs), también llamadas glicosidasas, son un amplio grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace glicosídico de los carbohidratos. Son capaces de romper O-, N- y S- glicósidos (Figura 1.4) (Henrissat 1991).



Figura 1.4 Representación simplificada de la hidrólisis del enlace glicosídico de los carbohidratos

1.2.1 Clasificación

Según el *Nomenclature Committee* de la *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (NC-IUBMB), que clasifica y asigna un código EC (*Enzyme Commission*) a las enzimas según la reacción que catalizan, y en concordancia con la *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) a través de la *IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature* (JCBN), a las glicosil hidrolasas les corresponde el código EC 3.2.1.X. Los tres primeros dígitos indican que son enzimas capaces de hidrolizar O- y S-glicósidos, y el cuarto número hace referencia al tipo de sustrato. Por ejemplo, el código EC 3.2.1.20 le corresponde a una α -glucosidasa y el EC 3.2.1.21 a una β -glucosidasa (<http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>). Cabe indicar que a una misma enzima le puede corresponder más de un código EC si es capaz de hidrolizar más de un tipo de sustrato o incluso catalizar más de un tipo de reacción. Por ejemplo, algunas enzimas pueden actuar como β -glucosidasas (EC 3.2.1.21) y β -galactosidasas (EC 3.2.1.23), con cierta promiscuidad de sustrato. También es frecuente que ciertas glicosil hidrolasas catalicen reacciones de hidrólisis (3.2.1.X) y transglicosilación (2.4.1.X).

Otra clasificación muy útil de las glicosil hidrolasas es de acuerdo con su homología de secuencia de aminoácidos, lo cual a su vez de forma indirecta implica una similitud estructural o de plegamiento de la proteína (Henrissat 1991). En la base de datos Carbohydrate Active Enzyme (CAZy), las carbohidrasas y dentro de ellas las glicosil hidrolasas (GH) están organizadas en familias. Cada familia agrupa enzimas estructural y filogenéticamente relacionadas (Lombard et al. 2014). Actualmente el grupo de las GH abarca 153 familias.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las glicosil hidrolasas también se pueden clasificar como *exo-* o *endo-*, dependiendo de si son capaces de cortar el enlace glicosídico en el extremo o en enlaces internos de la cadena del polisacárido, respectivamente. Las GH *exo-* pueden ser específicas por el extremo reductor o no reductor (Figura 1.5).

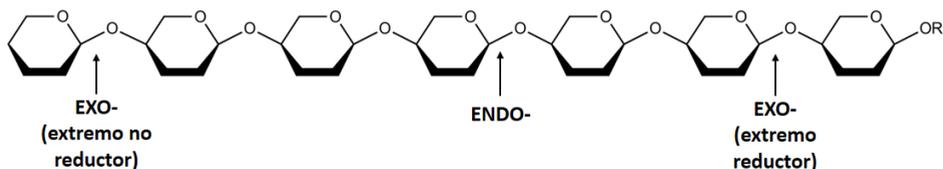


Figura 1.5 Glicosil hidrolasas según el sitio de hidrólisis en el sustrato

1.2.2 Mecanismo de hidrólisis de las glicosil hidrolasas

En términos generales la ruptura del enlace glicosídico de los carbohidratos es una hidrólisis ácida que requiere de dos aminoácidos catalíticos, que normalmente son residuos de ácido aspártico (Asp, D) o ácido glutámico (Glu, E). Los subsitios en una glicosil hidrolasa a los cuales se une el sustrato se etiquetan desde $-n$ hasta $+n$ (donde n es un número entero), $-n$ representa el subsitio de unión al extremo no reductor y $+n$ el correspondiente al extremo reductor. La ruptura del enlace glicosídico tiene lugar entre los subsitios -1 y $+1$ (Davies et al. 1997). Cada uno de los subsitios interacciona con los distintos residuos glicosídicos del sustrato, a un lado y otro ($-n$ y $+n$) del enlace glicosídico (Figura 1.6).

La hidrólisis puede ocurrir por un mecanismo de inversión o de retención dependiendo de si se invierte o se retiene la configuración del carbono anomérico (Davies & Henrissat 1995; Koshland 1953).

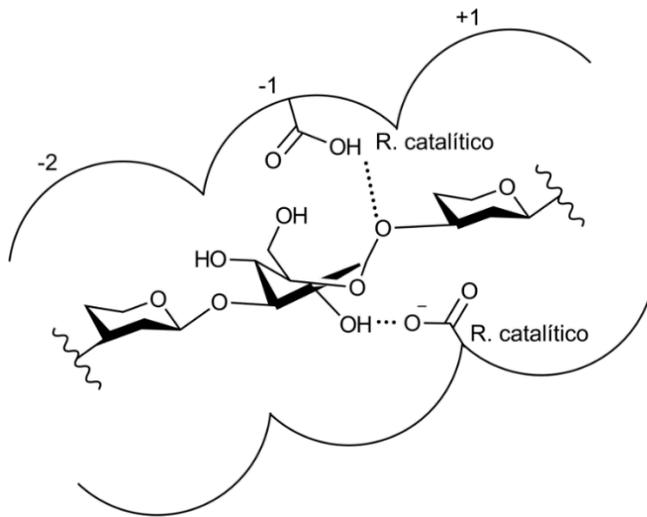


Figura 1.6 Subsitios de unión a sustrato de una glicosil hidrolasa

En las enzimas que utilizan un mecanismo de inversión los dos residuos catalíticos que actúan como ácido y base están bastante separados (9 – 9.5 Å) (Mccarter & Withers 1994). La ruptura del enlace glicosídico se da en un solo paso: el residuo ácido protona al oxígeno del enlace glicosídico y al mismo tiempo la molécula de agua es desprotonada por el residuo base de la enzima. El grupo hidroxilo resultante actúa como nucleófilo sobre el carbono anomérico del azúcar, lo cual termina en la ruptura del enlace y la liberación de un producto con una configuración opuesta al sustrato original (Davies & Henrissat 1995; Koshland 1953). En la [Figura 1.7A](#) se indica el mecanismo de hidrólisis por inversión de una α -glucosidasa.

En las enzimas que utilizan un mecanismo de retención, la distancia entre los dos residuos catalíticos es menor (4.5 - 5.5 Å) (Mccarter & Withers 1994). En este caso uno de los residuos actúa como nucleófilo y el otro como ácido o base. La reacción ocurre en dos pasos. En un primer paso (glicosilación) el ácido/base (actuando como ácido) protona el oxígeno del enlace glicosídico,

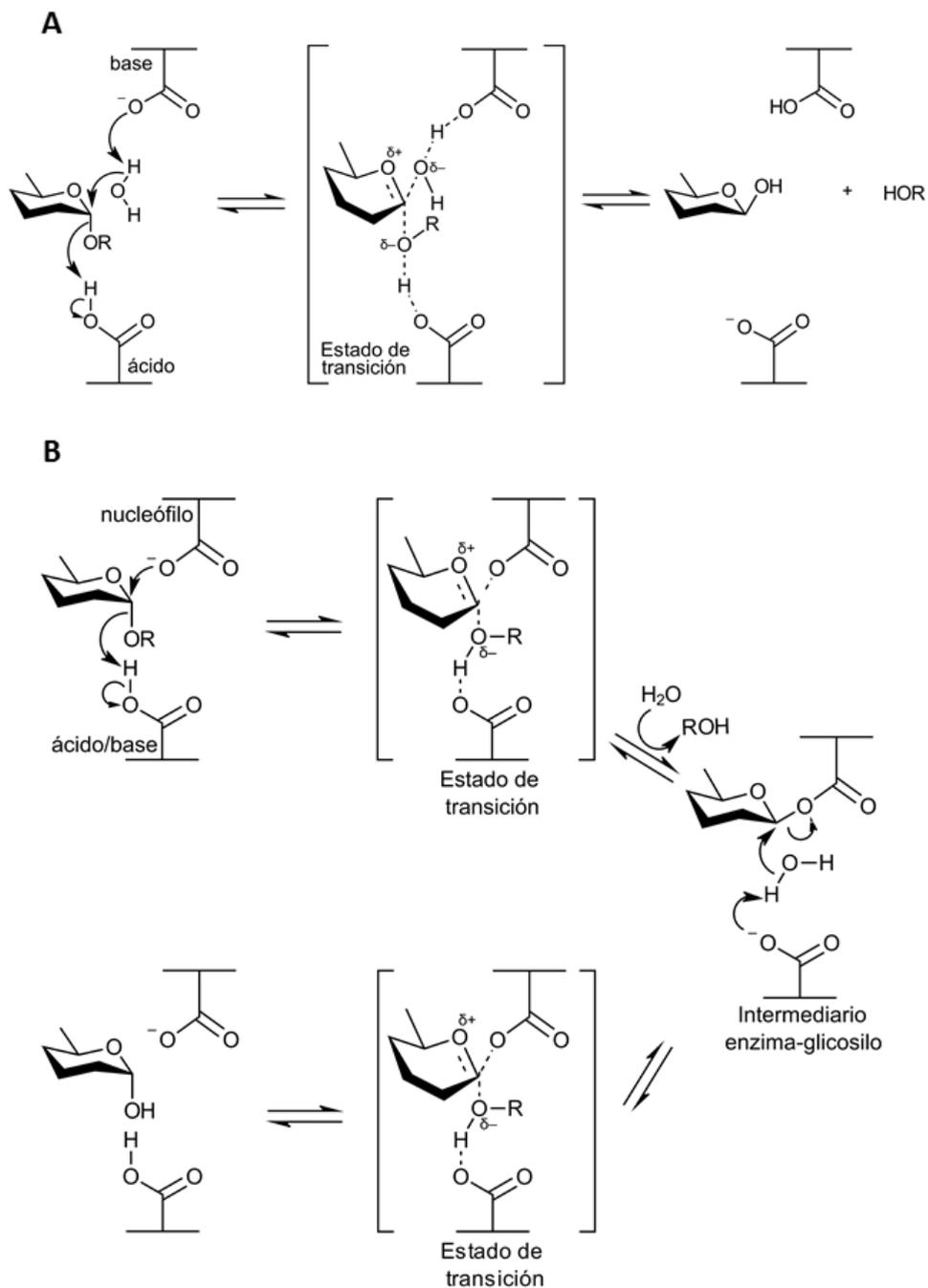


Figura 1.7 Mecanismos de hidrólisis del enlace glicosídico. **(A)** Inversión. **(B)** Retención.

y el nucleófilo ataca al carbono anomérico, rompiendo el enlace glicosídico y formando un intermediario covalente entre el glicósido y la enzima. En un segundo paso (deglicosilación) se rompe el enlace del intermediario enzima-glicosilo por acción de una molécula de agua, que es deprotonada por el residuo ácido/base (actuando como base) y se libera el residuo glicosídico con la misma configuración que el sustrato original (Davies & Henrissat 1995; Koshland 1953). En la [Figura 1.7B](#) se indica el mecanismo de hidrólisis por retención de una α -glucosidasa. Cuando la ruptura del enlace del intermediario enzima-glicosilo es por acción de otra molécula con un grupo funcional OH, como por ejemplo otro azúcar, y no por una molécula de agua, se da lugar a un proceso de transglicosilación, generándose nuevos azúcares que pueden tener un mayor grado de polimerización y/o pueden estar constituidos por enlaces glicosídicos diferentes a los del sustrato original. Las dos reacciones (hidrólisis/transglicosilación) pueden coexistir en la misma enzima ([Figura 1.8](#)) y la competencia entre ellas depende básicamente de la naturaleza de la glicosil hidrolasa y de la concentración de sustratos en el medio. Esta capacidad transglicosilante de algunas glicosil hidrolasas es utilizada para la producción de oligosacáridos con función prebiótica (Mangas-Sánchez & Adlercreutz 2015).

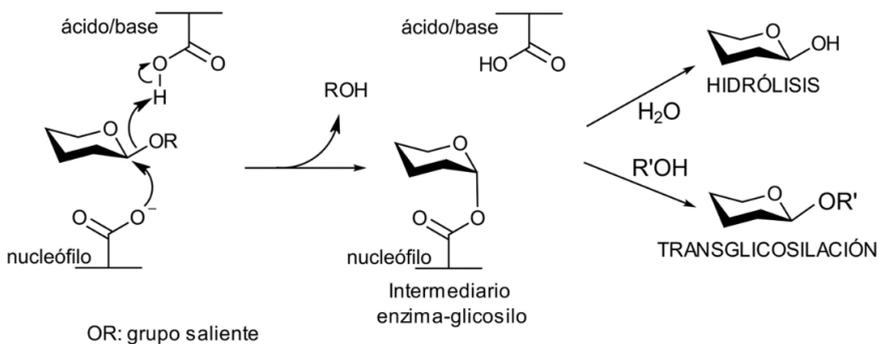


Figura 1.8 Mecanismos de hidrólisis y transglicosilación en función de la molécula aceptora

1.2.3 Glicosil hidrolasas implicadas en la hidrólisis de celulosa

1.2.3.1 Celulasas

Las celulasas son glicosil hidrolasas que catalizan la hidrólisis del enlace $\beta(1\rightarrow4)$ de la celulosa y de otros polisacáridos relacionados (Scheer et al. 2011). Las celulasas incluyen enzimas de tipo endo- y exo- denominadas endoglucanasas (EGs) y celobiohidrolasas (CBHs), respectivamente, que actúan directamente sobre la celulosa. A veces también se incluyen en este grupo las β -glucosidasas, que se describen en detalle en el siguiente apartado, y que hidrolizan las celodextrinas y celobiosa que resultan de la actividad combinada de EGs y CBHs.

Las endoglucanasas (EC 3.2.1.4) tienen un sitio de unión a sustrato tipo hendidura (Figura 1.9A), son capaces de hidrolizar aleatoriamente los enlaces internos de zonas amorfas y desordenadas de la celulosa (tienen baja actividad sobre celulosa cristalina), liberando glucosa, celodextrinas solubles y fragmentos insolubles de celulosa (Kricka et al. 2015; Zhang & Zhang 2013; Orłowski et al. 2015). Las endoglucanasas se encuentran distribuidas principalmente en las familias GH9, GH12, GH45 y GH6, aunque también se encuentran de forma minoritaria en las familias GH44, 51, 74 y 124. La mayoría de endoglucanasas tienen varios subsitios de unión a sustrato. Las enzimas de las familias GH9 y GH12 tienen al menos 6 subsitios que van desde -4 hasta +2 (Henrissat 1991).

Las celobiohidrolasas tienen un sitio catalítico tipo túnel (Figura 1.9B) con muchos subsitios de unión a sustrato. Son capaces de hidrolizar de forma procesiva celulosa cristalina o polisacáridos relacionados, desde el extremo reductor (EC 3.2.1.176) o no reductor (EC 3.2.1.91) liberando celobiosa (Kricka et al. 2015; Zhang & Zhang 2013; Shibafuji et al. 2014). Las que tienen actividad

desde el extremo reductor se encuentran en las familias GH7, 48 y 74, mientras que las que hidrolizan desde el extremo no reductor están incluidas en las familias GH6 y GH9 (Henrissat 1991).

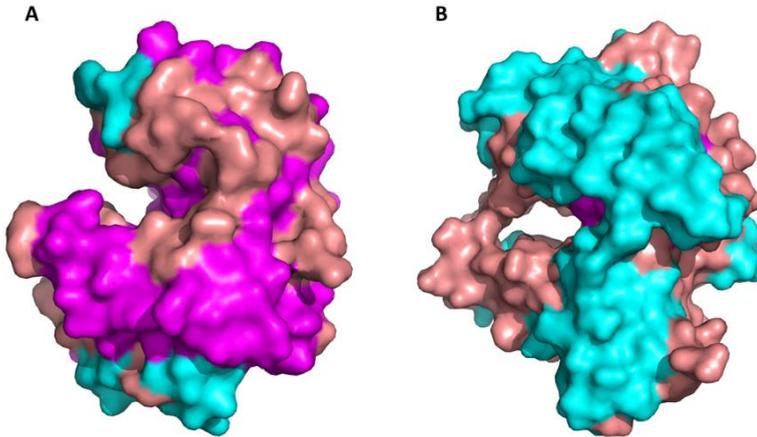


Figura 1.9 Diferencias en la forma de los sitios catalíticos entre EGs y CBHs. **(A)** Endoglucanasa de *Aspergillus niger* (PDB:1KS5) (Khademi et al. 2002); **(B)** Celobiohidrolasa de *Coprinopsis cinerea* (PDB:3A9B) (Liu et al. 2010).

Las endoglucanasas y celobiohidrolasas funcionan *in vivo* de forma coordinada junto con las β -glucosidasas. Cabe indicar que esta acción conjunta de EGs y CBHs se ve facilitada en muchos microorganismos (bacterias y hongos anaerobios) que poseen complejos multienzimáticos denominados celulosomas. En estos complejos se asocian distintas enzimas (celulasas y xilanasas principalmente) que se ensamblan a través de proteínas no catalíticas (*scaffoldins*). La formación de este complejo maximiza la eficiencia del proceso celulolítico (Artzi et al. 2017). Además, en el proceso de celulolisis intervienen otras proteínas accesorias, no catalíticas, como la *swollenin*, proteína no hidrolítica disruptiva que induce la extensión de las paredes celulares vegetales debilitando las interacciones no covalentes que ayudan a mantener la integridad

INTRODUCCIÓN GENERAL

de la pared (Gupta et al. 2016; Herpoël-Gimbert et al. 2008). En *A. nidulans* se ha descrito el papel de la proteína CltB como señalizadora de la presencia de celulosa en el medio (dos Reis et al. 2016). Recientes estudios con el hongo *Trichoderma reesei* indican una alta complejidad en la composición y en la función de la maquinaria celulolítica (Lehmann et al. 2016; Jalak et al. 2012).

Las celulasas juegan un papel muy importante en las industrias biotecnológicas relacionadas con el uso de celulosa, como son las textiles, de alimentos y de forma especial las productoras de biocombustibles (Yan & Wu 2014). En estas últimas, las celulasas tienen un papel clave en la conversión de la celulosa en azúcares fermentables pero su coste es un factor crítico en el proceso (Druzhinina & Kubicek 2017; Cao et al. 2015; Viikari et al. 2012; Klein-Marcuschamer et al. 2012).

Existen celulasas de origen bacteriano (Sethi et al. 2013; Gilkes et al. 1991) y de origen fúngico. Las segundas, más utilizadas comercialmente, se obtienen frecuentemente a partir de estirpes genéticamente modificadas de *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei* y *Trichoderma viride*, entre otras. De estos organismos, *T. reesei* es el más reconocido por el poder celulolítico de sus enzimas (Druzhinina & Kubicek 2017; Bischof et al. 2016). *T. reesei* es la versión anamorfa (asexual) del ascomiceto filamentoso *Hypocrea jecorina*. Su capacidad de degradar materiales lignocelulósicos por acción de las celulasas que secreta es aprovechada a nivel industrial para producir principalmente biocombustibles (Bischof et al. 2016). La producción de celulasas por *T. reesei* no es constitutiva, sino que se induce en presencia de celulosa. Debido a que la celulosa es un polímero insoluble que no puede ser transportado como tal al interior celular, el mecanismo de inducción implica una baja expresión basal de enzimas que al entrar en contacto con la celulosa, producen las moléculas inductoras que activan el sistema de producción (Carle-Urioste et al. 1997). La soforosa

(disacárido de glucosa con un enlace $\beta(1\rightarrow2)$) es uno de los mejores inductores de la expresión de celulasas en *T. reesei* (Sternberg & Mandels 1979), y se forma a partir de la transglucosilación de celobiosa por la β -glucosidasa Cel1A del mismo hongo (Guo et al. 2016a). La lactosa es otro inductor de la producción de celulasas por *Trichoderma* pese a que este no es su sustrato natural (Ivanova et al. 2013).

Tabla 1.3 Enzimas celulolíticas y xilanolíticas secretadas por *T. reesei* (RUT-C30)

CELULASA	DENOMINACIÓN		FAMILIA GH	% TOTAL DE PROTEINA
Celobiohidrolasas	Cel7A	CBHI	7	40 - 60
	Cel6A	CBHII	6	12 - 20
Endoglucanasas	Cel7B	EGI	7	5 - 10
	Cel5A	EGII	5	1 - 10
	Cel12A	EGIII	12	< 1 - 5
	Cel45A	EGV	45	< 5
β -glucosidasas	Cel3A	BGL1	3	1 - 2
Xilanasas	I		11	n.d
	II		11	n.d
	III		10	n.d
	IV		5	n.d
β -xilosidasa			3	n.d

n.d: no determinado

Modificado de Rosgaard et al. (2007)

Entre las enzimas secretadas por *Trichoderma reesei* (RUT-C30) (Bischof et al. 2016), se han identificado 2 celobiohidrolasas, 4 endoglucanasas, 1 β -glucosidasa y otras enzimas xilanolíticas. El porcentaje aproximado de cada tipo de proteínas varía dependiendo de las condiciones de crecimiento y del medio de cultivo (Tabla 1.3) (Rosgaard et al. 2007; Gruno et al. 2004). En *T. reesei* se han identificado diez β -glucosidasas, cinco extracelulares (Cel3A, Cel3B, Cel3E, Cel3F, Cel3G) y cinco intracelulares (Cel1A, Cel1B, Cel3C, Cel3D, Cel3H) (Guo et

INTRODUCCIÓN GENERAL

al. 2016a; Treebupachatsakul et al. 2016), pero Cel3A es la única liberada al medio de cultivo (Karkehabadi et al. 2014; Woodward & Arnold 1981). Esta β -glucosidasa con un aporte de solo el 1 – 2 % del conjunto de enzimas secretadas por *T. reesei*, y su alta sensibilidad a la inhibición por glucosa ($K_i = 0.5$ mM con celobiosa como sustrato (Woodward & Arnold 1981)), es insuficiente para promover una hidrólisis efectiva de celobiosa, en su acción conjunta con EGs y CBHs. Esto limita la hidrólisis de celulosa ya que una pequeña acumulación de celobiosa en el medio provoca la inhibición de CBHs y EGs (Karkehabadi et al. 2014; Rosgaard et al. 2007; Gruno et al. 2004). Se ha descrito que para Cel7A la concentración de celobiosa que reduce su actividad al 50 % (IC_{50}) es de 0.4 – 0.7 mM (Teugjas & Väljamäe 2013a).

1.2.3.2 β -glucosidasas (BGLs)

Las β -glucosidasas son glicosil hidrolasas que pertenecen al grupo EC 3.2.1.21, hidrolizando desde el extremo no reductor β -D-glucósidos de cadena corta, incluyendo disacáridos, oligosacáridos unidos con enlaces β , y alquil y aril β -D-glucósidos. Catalizan la hidrólisis del enlace glicosídico β por un mecanismo de retención y liberan β -D-glucosa (Tiwari et al. 2013; Scheer et al. 2011; Ketudat Cairns & Esen 2010). Dependiendo de las condiciones de reacción y de la naturaleza de cada enzima, pueden tener capacidad transglicosilante como es el caso de las β -glucosidasas Cel3A (BGL1), Cel3B, Cel3E y Cel1A (BGL2) de *T. reesei*, que a partir de celobiosa generan celotriosa y glucobiosas isoméricas (gentiobiosa, soforosa y laminaribiosa). Las tres primeras enzimas sintetizan principalmente gentiobiosa mientras que Cel1A forma básicamente soforosa y laminaribiosa (Guo et al. 2016a). En base a homología de secuencia de aminoácidos, la mayoría de BGLs se agrupan en las familias GH1 y GH3, aunque

también se encuentran en las familias GH 2, 5, 9, 30, 39 y 116 (Henrissat 1991).

La estructura tridimensional de las BGLs de la familia GH1 obedece a un clásico barril TIM (α/β)₈ (Davies & Henrissat 1995). En la [Figura 1.10A](#) se muestra la estructura terciaria de la β -glucosidasa A de *Paenibacillus polymyxa* (BGLA) perteneciente a esta familia (Sanz-Aparicio et al. 1998). Las BGLs de la familia GH3 son enzimas multidominio con una cierta variabilidad en la arquitectura modular. Los dominios comunes a todas ellas son un barril α/β y un α/β sándwich, en la interfase de los cuales se localiza el centro activo. Sobre esta estructura basal, en algunas enzimas se encuentran dominios adicionales con estructura tipo fibronectina (Ramírez-Escudero et al. 2016). En la [Figura 1.10B](#) se observa la estructura terciaria de una β -glucosidasa de *Trichoderma reesei* (BGL1) que pertenece a la familia GH3 (Karkehabadi et al. 2014). Las dos familias presentan algunas diferencias funcionales. Por ejemplo, las BGLs de la familia GH1 son menos sensibles a la inhibición por glucosa (Yang et al. 2015a; de Giuseppe et al. 2014). En la [Tabla 1.4](#) se listan β -glucosidasas de las familias GH3 o GH1 provenientes de diferentes organismos con el valor de sus constantes catalíticas.

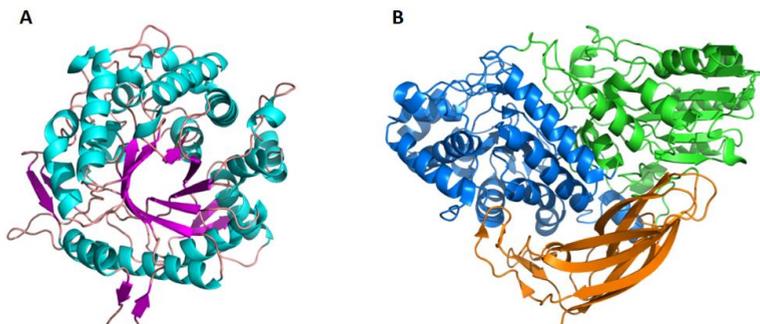


Figura 1.10 Estructuras terciarias de β -glucosidasas. **(A)** Barril TIM (α/β)₈ de BGLA de *Paenibacillus polymyxa*, familia GH1, código PDB 1BGA. **(B)** BGL1 de *Trichoderma reesei*, familia GH3, código PDB 3ZYZ. En azul se muestra el barril α/β , en verde el α/β sándwich y en naranja el dominio de fibronectina.

Tabla 1.4 β-glucosidasas de diferentes organismos

ORGANISMO	DENOMINACIÓN DE LA ENZIMA	CÓDIGO GENE BANK	FAMILIA	UBICACIÓN	K _m (mM) CELOBIOSA	k _{cat} (s ⁻¹)	REFERENCIA
<i>Aspergillus aculeatus</i>	BGLAa	JN121996.1	GH3	Extracelular	6.6	340	(Han-Woo & Ishikawa 2010; Kawaguchi et al. 1996)
<i>Aspergillus niger</i>	BGS ^a	AJ132386	GH3	Extracelular	2.7	100	(Thongpoo et al. 2013; Seidle et al. 2006; Seidle et al. 2004; Dan et al. 2000)
<i>Aspergillus niger</i> A20	Celobiasa A	-	-	Extracelular	0.9	-	(Abdel-Naby et al. 1999)
	Celobiasa B	-	-		1.4	-	
	Celobiasa C	-	-		1	-	
<i>Bacteria no cultivada</i>	Bgl1A ^b	-	GH1	Intracelular	20	-	(Fang et al. 2010)
	Hibg13A	KT203370	GH3	Extracelular	8.4	94	(Xia et al. 2016)
	Hibg13B	KT203371	GH3		-	-	
	Hibg13C	KT203372	GH3		6.6	150	
-	AB073638.2	GH1	3.8		-	(Ni et al. 2007)	
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	BglA	142580	GH1	Intracelular	-	-	(González-Candelas et al. 1990)
	BglB ^c	142582	GH1	Extracelular	100	-	(Isorna et al. 2007)
<i>Penicillium brasilianum</i> ^d	-	EF527403	GH3		1.6	43	(Krogh et al. 2010)
<i>Penicillium decumbens</i>	pBGL1	EU700488.1	GH3	Extracelular	-	-	(Ma et al. 2011; Chen et al. 2010a)
<i>Periconia</i> sp.	BGL1	JQ239427.1	GH3	Extracelular	-	-	(Dashtban & Qin 2012)
	BGL1A	AB253326.2	GH1	Intracelular	6.8	180	(Tsukada et al. 2006)
	BGL1B	AB253327.2	GH1		0.2	-	
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	-	AF036872	GH3	Extracelular	4.0	27.5	(Kawai et al. 2003)
<i>Piromyces</i> sp.	Cel3A ^e	AY172977.1	GH3	Extracelular	1.8	-	(Steenbakkers et al. 2003)
<i>Pyrococcus furiosus</i>	BGLPF	PF0073	GH1	Intracelular	20	594	(Han-Woo & Ishikawa 2010)

ORGANISMO	DENOMINACIÓN DE LA ENZIMA	CÓDIGO GENE BANK	FAMILIA	UBICACIÓN	K _m (mM) CELOBIOSA	k _{cat} (s ⁻¹)	REFERENCIA
<i>Rhizomucor miehei</i>	-	AGBC00000000	GH3	Extracelular	3.7	0.04	(Guo et al. 2015)
<i>Sulfobolbus sulfataricus</i>	-	-	GH116	Intracelular	2.1	1.8	(Ferrara et al. 2014)
<i>Thermophilum pendens</i>	-	NC_008698	GH3	Intracelular	0.2	0.3	(Li et al. 2013a)
<i>Trichoderma reesei</i>	Cel1A (BGL2) ^f	NW_006711151.1	GH1	Intracelular	1.1	78	(Guo et al. 2016a)
	Cel1B	AY281377.1	GH1		-	-	
	Cel3C	NW_006711180.1	GH3		-	-	
	Cel3D	AY281378.1	GH3		-	-	
	Cel3H ^h	LC002809.1	GH3		-	-	
	Cel3A (BGL1) ^g	NW_006711153.1	GH3		0.4 ⁱ	14	
	Cel3B ^g	NW_006711156.1	GH3		0.3	6.7	
	Cel3E ^g	AY281379.1	GH3		0.8	7.9	
	Cel3F	-	GH3		-	-	
	Cel3G	LC002808.1	GH3		-	-	

K_i para glucosa: ^a3mM; ^b1000mM (50 % de inhibición); ^c1.1 mM; ^e30 mM (50 % de inhibición); ^f100 mM (60 % de inhibición); ^g200 mM (70 % de inhibición); ^h100 mM.

K_i para celobiosa: ^a1.8 mM

K_i para tiocelobiosa: ^c21 mM

^h No tiene actividad ni en celobiosa ni en β-pNPG, es una especie inactiva

ⁱ Otros estudios reportan una K_m de 1.9 mM (Woodward & Arnold 1981)

INTRODUCCIÓN GENERAL

Como ya se ha comentado, las β -glucosidasas son esenciales para una eficiente hidrólisis de la celulosa, ya que al hidrolizar la celobiosa reducen su acumulación en el medio y evitan así la inhibición de las celobiohidrolasas y las endoglucanasas (Sørensen et al. 2013). Debido a este papel crítico de las BGLs en la degradación de la celulosa, se han desarrollado varias estrategias para superar la barrera que suponen estas enzimas en la celulolisis, como la adición exógena de BGLs a los cócteles enzimáticos (Del Pozo et al. 2012; Chen et al. 2010a; Kumar & Wyman 2009; Idris et al. 2017), la expresión heteróloga de BGLs en organismos celulolíticos como *Trichoderma reesei* (Gao et al. 2017; Ma et al. 2011; Dashtban & Qin 2012; Colabardini et al. 2016), la búsqueda de BGLs tolerantes a altas concentraciones de glucosa (Cao et al. 2015; Teugjas & Väljamäe 2013b) o la aplicación de ingeniería de proteínas para mejorar la actividad β -glucosidasa (Yao et al. 2016), entre otras.

1.2.4 Glicosil hidrolasas implicadas en la hidrólisis de almidón

1.2.4.1 Amilasas

Son glicosil hidrolasas que catalizan la hidrólisis del enlace $\alpha(1\rightarrow4)$ de los polisacáridos de α -D-glucosa como el almidón o el glucógeno. Las amilasas tienen origen vegetal, animal o microbiano. Las enzimas microbianas, y en concreto las derivadas de hongos o bacterias, tienen mayor demanda y aplicación industrial debido a la facilidad en su producción y a su bajo coste (Saini et al. 2017). Las amilasas pueden ser del tipo α , β , γ , o multifuncionales.

Las α -amilasas (EC 3.2.1.1) catalizan la endohidrólisis del enlace $\alpha(1\rightarrow4)$, cortan de forma aleatoria polisacáridos que tengan tres o más unidades de glucosa y liberando dextrinas y oligosacáridos de configuración α . Las α -amilasas pertenecen mayoritariamente a la familia GH13, pero también se las

encuentra en las familias 57 y 119 (Henrissat 1991). Las α -amilasas de la familia GH13 actúan por un mecanismo de retención y en general son proteínas con tres dominios. El dominio catalítico (dominio A) tiene una estructura de barril $(\beta/\alpha)_8$, con una inserción en uno de los lazos que da lugar a un dominio de estructura irregular (dominio B) y en el extremo C-terminal se encuentra un dominio β -sándwich (dominio C) (Figura 1.11A) (Janeček et al. 2014). Las β -amilasas (EC 3.2.1.2) catalizan la hidrólisis por un mecanismo de inversión, atacando por el extremo no reductor del polisacárido y liberando unidades sucesivas de β -maltosa. Pertenecen a la familia GH14, cuyo dominio catalítico tiene también una estructura de barril $(\beta/\alpha)_8$ (Figura 1.11B). Las γ -amilasas o glucoamilasas (EC 3.2.1.3) actúan desde el extremo no reductor, al igual que las β -amilasas, pero en lugar de maltosa liberan β -D-glucosa. Algunas enzimas de este grupo también pueden romper los enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ (Scheer et al. 2011). Se encuentran en la familia GH15 y en menor medida en la GH97. Las enzimas de la familia GH15 utilizan un mecanismo de inversión y tienen la estructura de barril $(\alpha/\alpha)_6$ (Figura 1.11C).

Las amilasas multifuncionales son capaces de catalizar al menos dos de los siguientes 4 tipos de reacciones: (a) hidrólisis de los enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$, (b) hidrólisis de los enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$, (c) formación de enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ por transglicosilación y (d) formación de enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ por transglicosilación (Wang et al. 2010). Esta versatilidad de las amilasas multifuncionales ha sido empleada en la producción de IMOS a partir de almidón (Cao et al. 2014). Las ciclomaltodextrin glicosiltransferasas (CGTasas) son un tipo de amilasas multifuncionales usadas para la formación de ciclodextrinas a partir de almidón (Reddy et al. 2017).

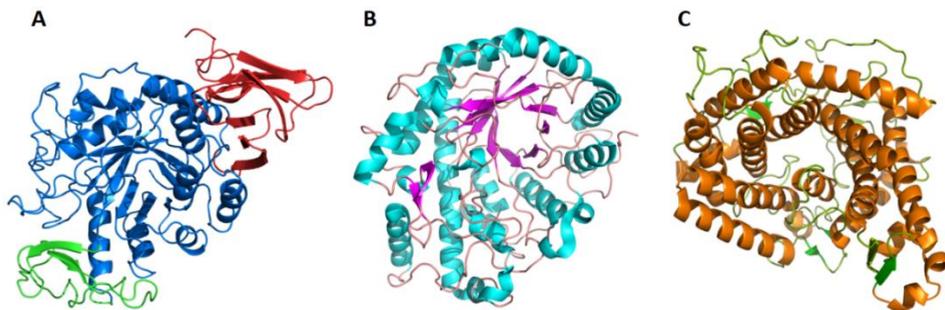


Figura 1.11 Estructuras tridimensionales de amilasas. **(A)** α -amilasa de *Aspergillus oryzae*, familia GH13 (PDB:2TAA). Los dominios A, B y C, se indican en azul, rojo y verde, respectivamente. **(B)** β -amilasa de cebada, familia GH14 (PDB:2XFY). **(C)** γ -amilasa de *Saccharomycopsis fibuligera*, familia GH15 (PDB:2F6D).

Las amilasas tienen diversas aplicaciones en las industrias de detergentes, textiles, papeleras, productoras de bioetanol y sobre todo en la de alimentos. En esta última catalizan la producción de azúcares fermentables necesarios para la elaboración de pan o cerveza, favorecen la obtención de mezclas de oligosacáridos, jarabes de glucosa, fructosa o maltosa, etc. (Saini et al. 2017; van Der Maarel et al. 2002). Otro uso de las amilasas, normalmente en conjunto con glicosil hidrolasas con capacidad transglicosilante, es en la producción de isomaltooligosacáridos (Chockchaisawasdee & Naiyatat 2013).

1.2.4.2 α -Glucosidasas

Son glicosil hidrolasas catalogadas con el código EC 3.2.1.20, que atacan preferentemente al disacárido maltosa por el extremo no reductor, rompiendo el enlace $\alpha(1\rightarrow4)$ y liberando α -D-glucosa. Estas enzimas, aunque más lentamente, también pueden romper el enlace $\alpha(1\rightarrow6)$ (Scheer et al. 2011).

Casi todos los organismos tienen una o más α -glucosidasas, pero su especificidad de sustrato varía entre especies. Según la afinidad por el sustrato,

las α -glucosidasas pueden ser de dos tipos: enzimas que prefieren oligosacáridos de cadena corta (2 - 4 unidades de glucosa) como es el caso de la α -glucosidasa de *Aspergillus niger*, o enzimas que prefieren oligosacáridos de cadena larga (5 – 7 unidades de glucosa, incluso almidón) como ocurre con la α -glucosidasa de *Beta vulgaris* (Tagami et al. 2013; Chiba 1997).

La mayor parte de las α -glucosidasas pertenecen a la familia GH31 y GH13, aunque también se encuentran en las familias GH 4, 63, 97 y 122. Las α -glucosidasas más abundantes (familia 31) son enzimas multidominio. El dominio catalítico presenta la estructura de un barril (β/α)₈ (Figura 1.12) (Henrissat 1991). Las α -glucosidasas de esta familia son enzimas que utilizan un mecanismo de retención. Por tanto, pueden actuar como transferasas, catalizando la transferencia del grupo glucosilo de un α -D-glucooligosacárido donador a un grupo -OH de otra molécula aceptora. La α -glucosidasa de *Aspergillus niger* pertenece a la familia 31 y es capaz de producir IMOS, utilizando maltosa como sustrato (Ma et al. 2017; Mangas-Sánchez & Adlercreutz 2015; Chen et al. 2010b; Duan et al. 1995). La estructura de la enzima y en particular de su

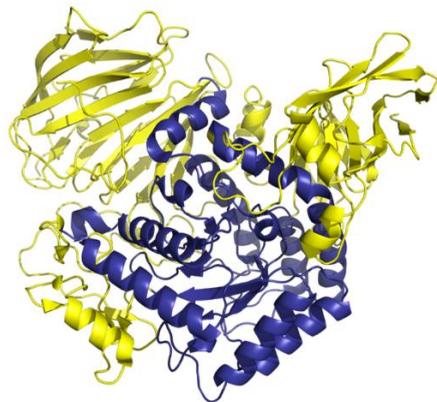


Figura 1.12 Estructura terciaria de la α -glucosidasa de *Beta vulgaris*, familia GH31 (PDB: 3WEO) (Tagami et al. 2013). En azul se muestra el dominio catalítico (β/α)₈.

centro catalítico determinará su actividad transglicosilante, su preferencia por aceptores específicos y por tanto el patrón de los productos de transglicosilación (Song et al. 2013; Fernández-Arrojo et al. 2007; Yamamoto et al. 2004; Kobayashi et al. 2003; Malá et al. 1999).

1.3 Proteínas transportadoras de azúcares

La membrana plasmática de las células es impermeable a los azúcares. Por ello, su metabolismo requiere la presencia de proteínas especializadas que permitan el tránsito de estas moléculas hacia el interior celular.

El transporte de azúcares en la célula está mediado por proteínas transmembrana llamadas permeasas, con especificidad por la molécula a transportar (Jojima et al. 2010). El mecanismo utilizado por una permeasa para transportar un soluto de un lado a otro de la membrana se asemeja al modelo enzima-sustrato. La permeasa tiene uno o más sitios específicos de unión para el soluto y después de sufrir cambios conformacionales reversibles, que alternan la exposición del sitio de unión del soluto a uno y otro lado de la membrana, liberan el soluto sin ningún tipo de modificación (Yin et al. 2006). Las permeasas pueden actuar impulsadas por el gradiente de concentración de la molécula a transportar (transporte pasivo), o pueden requerir de un suministro de energía (transporte activo). El transporte activo permite llevar moléculas en contra del gradiente químico. La energía necesaria para el transporte puede provenir de la hidrólisis de adenosín trifosfato (ATP) (Wilkens 2015), de la hidrólisis de fosfoenol piruvato (PEP) (Jojima et al. 2010) o de la disipación del gradiente químico de una segunda molécula (Pao et al. 1998). Los transportadores asociados a la hidrólisis de ATP pertenecen a la superfamilia ABC (ATP-binding cassette). Esta superfamilia incluye transportadores activos multicomponentes

capaces de transportar tanto moléculas pequeñas como macromoléculas. Los transportadores ABC están distribuidos en todas las formas de vida (Wilkins 2015). Por otro lado, los transportadores asociados a la hidrólisis de PEP están presentes únicamente en bacterias y se utilizan para transportar azúcares y sus derivados. Actúan dentro de un sistema de transporte denominado PTS (phosphoenolpyruvate carbohydrate phosphotransferase system), en el que además de la proteína transportadora participan otras proteínas citoplasmáticas. En el sistema PTS, monosacáridos, disacáridos y otros derivados son fosforilados y transportados (Jojima et al. 2010; Siebold et al. 2001). Los transportadores cuya energía depende del gradiente electroquímico de una segunda molécula, están incluidos en la superfamilia MFS (Major Facilitator Superfamily). Estos transportadores están ampliamente distribuidos en todas las formas de vida, son capaces de transportar azúcares, iones, lípidos, aminoácidos y péptidos, nucleósidos y otras moléculas (Pao et al. 1998; Yan 2013). La mayor parte de transportadores de azúcares en hongos pertenecen a la superfamilia MFS.

La superfamilia MFS (Major Facilitator Superfamily) o también llamada la familia *uniporter-symporter-antiporter* (Marger & Saier 1993), incluye proteínas facilitadoras o *uniporters* que catalizan la difusión simple de un soluto en favor de su gradiente de concentración (Figura 1.13A), y proteínas de transporte activo que obtienen la energía del potencial electroquímico de un segundo ión o soluto. Estas últimas se diferencian según el transporte de este segundo soluto se haga en la misma dirección (*symporters*) (Figura 1.13B) o en dirección opuesta (*antiporters*) a la molécula a transportar. Las proteínas de la MFS son polipéptidos en la mayoría estructurados en 12 hélices transmembrana que a su vez se organizan en dos dominios (N y C), cada uno con 6 hélices

INTRODUCCIÓN GENERAL

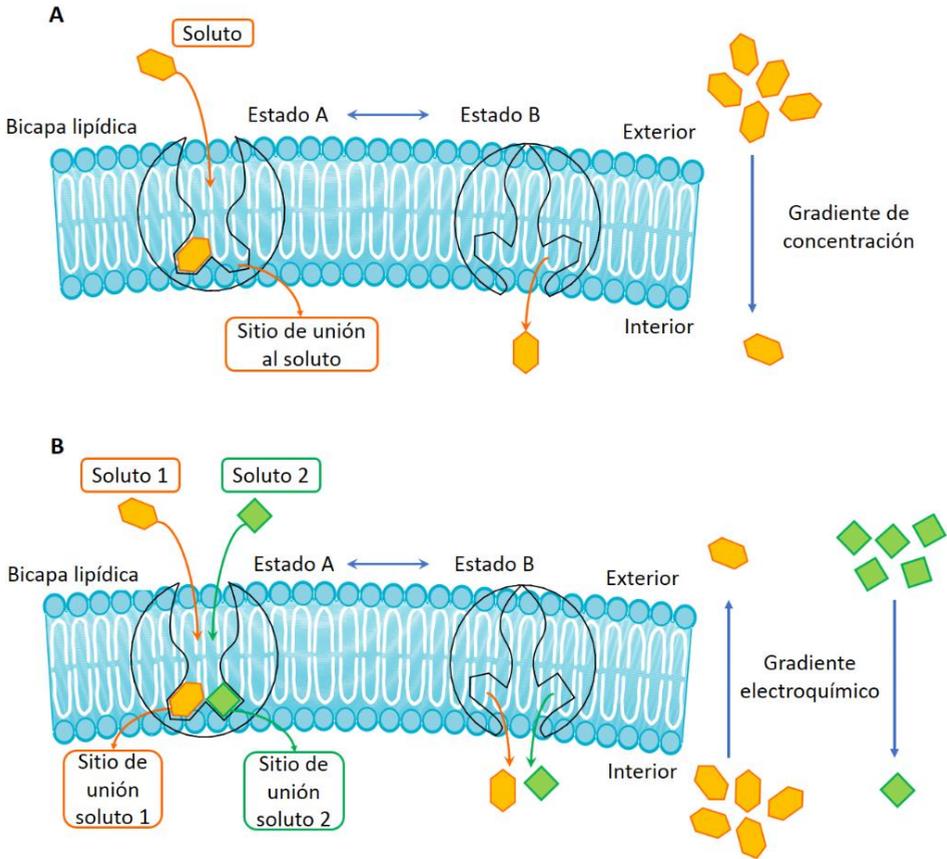


Figura 1.13 Proteínas transportadoras. **(A)** Uniporter. **(B)** Symporter.

transmembrana consecutivas (Figura 1.14). En estas proteínas usualmente los extremos N y C terminales están del lado citoplásmico de la membrana. Los transportadores MFS tienen un solo sitio de unión a sustrato entre los dominios N y C ubicado aproximadamente en la parte central de la proteína. La superfamilia MFS está dividida en 17 familias de las cuales las 1, 5 y 7 están involucradas en el transporte de azúcares (Pao et al. 1998; Yan 2013).

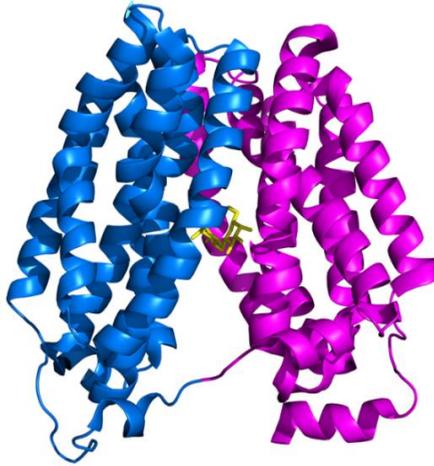


Figura 1.14 Permeasa de lactosa de *E. coli* de la superfamilia MFS (PDB: 1PV7) en complejo con un homólogo de lactosa el β -D-galactopiranosil-1-thio- β -D-galactopiranosido marcado en amarillo. La configuración es abierta hacia adentro (el lado periplásmico de la molécula está orientado hacia arriba y el lado citoplásmico hacia abajo). Los dominios N y C se muestran en azul y violeta, respectivamente (Abramson et al. 2003).

La caracterización de los transportadores de azúcares tiene importancia industrial de manera particular en la producción de etanol de segunda generación, ya que una de las estrategias propuestas con el afán de disminuir la inhibición de la hidrólisis de celulosa por acumulación de celobiosa en el exterior celular, es la expresión heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae* de permeasas de celobiosa junto con una β -glucosidasa intracelular. Esta aproximación permite por un lado el transporte del disacárido, eliminándolo del medio extracelular y limitando su acción inhibitoria, y por otro lado su metabolismo hasta glucosa, la cual a su vez sería metabolizada hasta etanol que es el objetivo final (Bae et al. 2014; Galazka et al. 2010).

En este contexto cabe destacar que algunas permeasas de azúcares son capaces de transportar más de un tipo de soluto. La permeasa de celobiosa CDT1 de *Neurospora crassa* también transporta β -glucósidos más largos, como

INTRODUCCIÓN GENERAL

celotriosa y celotetraosa (Galazka et al. 2010). Además, se ha comprobado que permeasas de otros azúcares, como el transportador de lactosa LAC12 de *Kluyveromyces lactis* (Sadie et al. 2011) y la permeasa de glucosa Stp1 de *Trichoderma reesei* (Zhang et al. 2013) pueden actuar como transportadores de celobiosa. En *Saccharomyces cerevisiae* los transportadores de glucosa también son capaces de transportar xilosa pero lo hacen solamente cuando la glucosa se ha agotado del medio. Es decir, la afinidad del transportador por xilosa es más baja que por glucosa, lo cual supone un cuello de botella en la co-fermentación de mezclas xilosa - glucosa (Ha et al. 2011; Li et al. 2010; Hou et al. 2017).

El genoma de *T. reesei*, uno de los principales hongos celulolíticos, codifica 164 proteínas que pertenecen a la superfamilia MFS (dos Reis et al. 2016), pero los transportadores de azúcares están pobremente caracterizados (Ivanova et al. 2013; Porciuncula et al. 2013; Zhang et al. 2013; Bae et al. 2014). En presencia de paja de trigo o glucosa se ha detectado la inducción o represión, respectivamente, de la expresión de 11 genes que codifican 7 transportadores de la superfamilia MFS, 1 transportador de xilosa, 2 transportadores de oligopéptidos y 1 transportador de hierro (Ries et al. 2013). En *T. reesei* solo tres proteínas están descritas como transportadoras de celobiosa, Trire2_3405, Trire2_67752 (Bae et al. 2014) y Trire2_47710 (Zhang et al. 2013).

1.4 Biotecnología de carbohidratos

Los carbohidratos han sido utilizados en procesos biotecnológicos muy antiguos como la fermentación, cuyo fin era obtener productos de consumo humano como pan, vino o cerveza, pero las demandas de consumo humano han ido cambiando, por lo que la actual biotecnología de carbohidratos busca generar nuevos productos. Dos de las facetas con mayor auge son la obtención

de biocombustibles, o de productos que mejoren la salud humana, como los oligosacáridos prebióticos.

1.4.1 Producción de biocombustibles

El carácter no renovable de los combustibles fósiles y los subproductos contaminantes que se generan durante su combustión son las razones básicas para la búsqueda de nuevas fuentes energéticas, renovables y con menor carga contaminante para el medio ambiente. Dentro de los biocombustibles el etanol es el de mayor producción. A nivel comercial se obtiene principalmente a partir de la fermentación de los carbohidratos de la caña de azúcar y del maíz, siendo Brasil y EE. UU los principales productores. En Brasil aproximadamente el 50 % del cultivo de caña de azúcar se destina a bioetanol (Goldemberg 2008) mientras que en EE. UU alrededor del 30 % de la oferta de maíz es usada para generar este biocombustible, de acuerdo con los datos del Departamento de Agricultura de los EE.UU (<https://www.ers.usda.gov/data-products/us-bioenergy-statistics/>). Por otro lado, el etanol obtenido a partir de estas materias primas o etanol de primera generación, genera controversia por el posible cambio de uso de la tierra y los cultivos, que podrían pasar de fines netamente alimenticios a fines energéticos, lo que actualmente se denomina “Food vs. Fuel” (Tomei & Helliwell 2016; Graham-Rowe 2011; Tenenbaum 2008).

La alternativa al uso de carbohidratos comestibles para producir etanol es usar materias primas lignocelulósicas, abundantes en la naturaleza, muchas de ellas residuos agrícolas o subproductos de la industria alimentaria. Para la obtención de etanol a partir de fuentes lignocelulósicas, o etanol de segunda generación, este material debe ser degradado hasta azúcares fermentables y transformado a etanol con un rendimiento superior al 4.5 – 5 % para que la

INTRODUCCIÓN GENERAL

destilación sea económicamente viable (Lennartsson et al. 2014; Viikari et al. 2012).

En materiales leñosos el principal componente es la celulosa (40-50 %), la cual esta combinada con hemicelulosa (25-35 %), y con el polímero aromático lignina (15-20 %) para formar lignocelulosa (Jordan et al. 2012). Aunque en el tratamiento previo de la lignocelulosa, para degradar la lignina y disminuir el grado de cristalinidad de la celulosa, se utilizan métodos físico-químicos (Alvira et al. 2010; Hendriks & Zeeman 2009), para degradar la celulosa se prefieren métodos enzimáticos. En este proceso intervienen enzimas celulasas producidas por hongos pero su aporte al coste del producto final es crítico (Druzhinina & Kubicek 2017; Cao et al. 2015; Viikari et al. 2012; Klein-Marcuschamer et al. 2012). Por otro lado, la conversión de celulosa a glucosa por los cócteles celulolíticos es ineficiente, básicamente porque la glucosa es un inhibidor de las β -glucosidasas, lo que provoca una acumulación de celobiosa, azúcar que a su vez es un inhibidor de las endoglucanasas y las celobiohidrolasas (Singhania et al. 2013). Este mecanismo de acción en conjunto hace de la hidrólisis de la celulosa un proceso complejo.

Se han utilizado varias estrategias para la obtención de etanol a partir de celulosa, bien manteniendo las etapas de hidrólisis y fermentación en dos pasos (SHF) o bien en un solo paso, es decir sacarificación y fermentación simultánea (SSF) (Paulova et al. 2015; Duwe et al. 2017). La ventaja de esta última es que el consumo de glucosa durante la fermentación alivia la inhibición de β -glucosidasas y celulasas por este azúcar, mejorando por tanto la eficiencia de hidrólisis. Una aproximación más ambiciosa es el llamado bioproceso consolidado (CBP) en el que se pretende combinar en un mismo reactor la producción de celulasas, la hidrólisis de celulosa y su fermentación (Zhang & Zhang 2013). En la [Tabla 1.5](#) se describen las diferentes configuraciones

propuestas para la producción de bioetanol. Una de las formas de llevar a cabo el CBP es la construcción de cepas ingenierizadas de *Saccharomyces cerevisiae* que co-expresen varios genes que codifican enzimas celulolíticas incluyendo endoglucanasas, celobiohidrolasas, β -glucosidasas e incluso proteínas para el ensamblaje de celulosomas (Davison et al. 2016; Liu et al. 2016; Kojima et al. 2013; Matano et al. 2012; Yamada et al. 2011; Wen et al. 2010; Jeon et al. 2009; Tsai et al. 2009; Kotaka et al. 2008; van Zyl et al. 2007; Fujita et al. 2004; Fujita et al. 2002). Sin embargo, debido a la complejidad del proceso celulolítico estas aproximaciones tienen sus limitaciones. Por un lado, la capacidad degradadora de las levaduras ingenierizadas no es tan eficiente como la de los complejos celulolíticos de hongos, y además la sobreexpresión forzada de varios genes puede estresar la fisiología de la levadura. Esto hace que el proceso SSF utilizando extractos celulolíticos fúngicos siga siendo una opción a considerar.

Tabla 1.5 Diferentes configuraciones del proceso de producción de bioetanol a partir de materiales celulósicos

Descripción	Siglas	Producción de enzimas	Hidrólisis de celulosa	Fermentación microbiana	SEPARACIÓN DE ETANOL
Hidrólisis y fermentación por separado	SHF	Producción de celulasas	Hidrólisis enzimática	Fermentación de azúcares	
Sacarificación y fermentación simultánea*	SSF	Producción de celulasas	Hidrólisis enzimática	Fermentación de azúcares	
Bioproceso consolidado	CBP	Producción de celulasas	Hidrólisis enzimática	Fermentación de azúcares	

*Puede contemplar una pre-hidrólisis del material, normalmente a una temperatura diferente a la de fermentación, en cuyo caso se denomina: Pre-hidrólisis, Sacarificación y Fermentación Simultáneas; Sacarificación y Fermentación Simultáneas con inoculación tardía; Sacarificación y Fermentación Semi-Simultáneas; Licuefacción más Sacarificación y Fermentación Simultáneas; o Sacarificación y Fermentación Simultáneas no isotérmicas. Adaptado de Duwe et al. (2017)

Tabla 1.6 Estrategias recientes para la producción de bioetanol usando celulasas de *Trichoderma reesei*

PRODUCCIÓN DE CELULASAS			FERMENTACIÓN			REFERENCIAS
Sustrato	Tipo de fermentación	Estrategia usada para mejorar la actividad celulasa	Sustrato	Tipo de proceso	Etanol	
Salvado de trigo y celulosa	Sólida	Optimización de parámetros del proceso (composición del medio de cultivo, humedad, tamaño del inóculo, pH, tiempo). Adición exógena de una β -glucosidasa de <i>A. niger</i> .	Rastrojo de sorgo con pretratamiento alcalino	SHF	22 g/L	(Idris et al. 2017)
Pasto elefante	Líquida	<i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i> inmovilizados en un biorreactor. <i>A. niger</i> produce β -glucosidasa.	Pasto elefante	CBP ^a	0.5 g/L	(Liu et al. 2017)
Pieles de patata	Líquida	Co-cultivo de <i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i> . <i>A. niger</i> produce β -glucosidasa.	Pieles de patata con pretratamiento hidrotérmico	SHF	30 g/L	(Taher et al. 2017)
Mezcla de azúcares (glucosa, soforosa, gentibiosa, celobiosa) ^b y salvado de trigo.	Líquida	Uso de un sistema fed-batch. Adición exógena de una β -glucosidasa (NS50010) al cóctel de celulasas.	Rastrojo de maíz con pretratamiento alcalino	SHF	45 g/L	(Li et al. 2016)
Paja de trigo pretratada con explosión de vapor	Líquida	Uso de un sistema fed-batch. Adición exógena de una β -glucosidasa (Novozyme 188) al cóctel de celulasas.	Paja de trigo pretratada con explosión de vapor	SHF	22 g/L	(Novy et al. 2015)
Salvado de trigo	Líquida	Adición de β -glucosidasa de <i>A. niger</i> .	Papel de desecho con pretratamiento secuencial de ácido y tritón	SHF	0.4 g/g azúcar	(Guerfali et al. 2015)
Rastrojo de maíz pretratado con explosión húmeda y/o alcalina	Líquida	Cultivo de <i>Aspergillus saccharolyticus</i> para la producción de la β -glucosidasa.	Rastrojo de maíz pretratado con explosión húmeda	SHF	13 – 27 g/L	(Rana et al. 2014)
				SSF	14 – 28 g/L	
			Pino pretratado con explosión húmeda	SHF	9 – 23 g/L	
				SSF	12 – 25 g/L	

^a Producción de celulasas, hidrólisis y fermentación en un mismo bioreactor modificado, que permite la inmovilización de los microorganismos celulolíticos por un lado y fermentadores por otro.

^b Los disacáridos se obtienen a partir de glucosa y la acción transglucosilante de una β -glucosidasa (SUNSON). La enzima es inactivada en la mezcla antes de ser usada como sustrato.

En la [Tabla 1.6](#) se indican algunas estrategias recientes para la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos sacarificados con celulasas de *Trichoderma reesei*. Se observa que los rendimientos de etanol están por debajo del 4 %, lo que dificulta su recuperación. Cabe resaltar también que la mayoría de los procesos complementa las celulasas de *T. reesei* con una β -glucosidasa, para superar la inhibición del proceso celulolítico por la acumulación de celobiosa. La β -glucosidasa se añade directamente, lo que incrementa el coste del proceso, o co-cultivando con otro hongo productor lo que complica las condiciones de crecimiento. Por ello para dar solución al problema puntual de la inhibición por celobiosa, se han propuesto dos estrategias para implementar en *Saccharomyces cerevisiae* la capacidad de metabolizar este disacárido, bien de forma intracelular o extracelular.

La hidrólisis intracelular de la celobiosa en una levadura fermentativa (*Saccharomyces cerevisiae*) requiere la expresión heteróloga de dos proteínas, una permeasa y una β -glucosidasa intracelular que hidrolice el enlace glicosídico de la celobiosa y libere dos moléculas de glucosa (Lian et al. 2014; Bae et al. 2014; Galazka et al. 2010; Ha et al. 2011; dos Reis et al. 2016). De forma alternativa se pueden expresar una permeasa y una celobiosa fosforilasa (Chomvong et al. 2014; Ha et al. 2013a; Sadie et al. 2011). Esta última enzima rompe la celobiosa y produce glucosa y glucosa-6-fosfato, lo cual reduce el consumo de ATP en la incorporación de la glucosa a la ruta glicolítica. Sin embargo, para que la fosforólisis sea eficiente se requieren altas concentraciones de celobiosa intracelular. Considerando que las concentraciones de este disacárido son relativamente bajas durante un proceso SSF de celulosa (Tang et al. 2013). La mayoría de las aproximaciones se han centrado en la ruta hidrolítica. En la [Tabla 1.7](#) se citan algunos ejemplos de *S. cerevisiae* ingenierizadas que han utilizado este mecanismo intracelular para la

Tabla 1.7 Utilización de *S. cerevisiae* ingenierizadas para la hidrólisis intracelular de celobiosa y su fermentación a etanol

PERMEASA		β-GLUCOSIDASA		CRECIMIENTO			FERMENTACIÓN				REFERENCIA	
Organismo	Notación	Organismo	Notación	% G2 ^a	Medio ^b	OD _{600nm}		% G2	Medio	OD _{600nm} inicio	Etanol (g/L)	
						Inicio	Máxima					
<i>Neurospora crassa</i>	CDT1 ^c	<i>Neurospora crassa</i>	GH1-1	1	SC	0.1	1.5	2	SC	2	10	(Galazka et al. 2010)
				2	SC	0.1	3	2	YP	10	8	(Lian et al. 2014)
		<i>Penicillium chrysogenum</i>	PcBG	4	YP	1	27	4	YP	1	12.1	
				4	YP	1	27	4	YP	1	11.8	(Bae et al. 2014)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	CDT2 ^d	<i>Thielavia terrestris</i>	TtBG	4	YP	1	32	4	YP	1	11.4	
				1	SC	0.1	1	-	-	-	-	(Galazka et al. 2010)
		<i>Neurospora crassa</i>	GH1-1	2	SC	0.1	1.8	2	YP	10	7	(Lian et al. 2014)
				1	SC	5 x 10 ^{-5g}	5 ^h	-	-	-	-	(Sadle et al. 2011)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	PcST	<i>Neurospora crassa</i>	GH1-1	4	YP	1	22	4	YP	1	8	
				4	YP	1	27	4	YP	1	9.6	(Bae et al. 2014)
		<i>Thielavia terrestris</i>	TtBG	4	YP	1	27	4	YP	1	14.6	
				1	SC	0.1	7	-	-	-	-	
<i>Penicillium oxalicum</i>	Po_CdtC	<i>Neurospora crassa</i>	GH1-1	1	SC	0.1	6	-	-	-	-	
	Po_CdtD			1	SC	0.1	6	-	-	-	-	(Li et al. 2013b)
	Po_CdtG			1	SC	0.1	6	-	-	-	-	

PERMEASA		β-GLUCOSIDASA		CRECIMIENTO				FERMENTACIÓN				REFERENCIA
Organismo	Notación	Organismo	Notación	% G2 ^a	Medio ^b	OD _{600nm}		% G2	Medio	OD _{600nm} inicio	Etanol (g/L)	
						Inicio	Máxima					
<i>Thielavia terrestris</i>	TtST	<i>Neurospora crassa</i>	GH1-1	4	YP	1	13	4	YP	1	2	(Bae et al. 2014)
<i>Trichoderma reesei</i>	Stp1 (Tr_Str1 ^f)			1	SC	0.1	0.9	-	-	-	-	(Zhang et al. 2013)
	TrHT (Tr_StrC)	<i>Neurospora crassa</i>	GH1-1	4	YP	1	23	4	YP	1	4.9	(Bae et al. 2014)
	TrST (Tr_StrA)			4	YP	1	21	4	YP	1	4.7	
<i>Aspergillus nidulans</i>	ClfA	<i>Neurospora crassa</i>	GH1-1	0.1	SM	0.1	1	-	-	-	-	(dos Reis et al. 2016)
				1	SM	0.1	2	-	-	-	-	
				2	SM	0.1	2	-	-	-	-	

^a % de celobiosa (p/v)

^b SC: sintético completo; SM: sintético mínimo; YP: extracto de levadura y peptona

También transportan otros azúcares: ^c celotriosa y celotetraosa; ^d celotriosa; ^e lactosa; ^f glucosa

^f Celobiosa fosforilasa

^g Células/mL

^h Dry cellular weight (DWC) en g/L

INTRODUCCIÓN GENERAL

fermentación de celobiosa. Se detallan las permeasas transportadoras de celobiosa y las β -glucosidasas intracelulares usadas para la hidrólisis, así como los resultados de crecimiento y/o fermentación (producción de etanol) obtenidos.

La segunda estrategia implica la hidrólisis extracelular de la celobiosa, para lo cual el organismo fermentador debe expresar un gen de una β -glucosidasa secretable (van Rooyen et al. 2005; Gurgu et al. 2011; Treebupachatsakul et al. 2016; Saitoh et al. 2010; Kricka et al. 2015; Hasunuma & Kondo 2012; Yamada et al. 2013; Njokweni et al. 2012; Nakamura et al. 2008; Katahira et al. 2006). Propuestas en esta línea incluyen la secreción de la β -glucosidasa al medio de cultivo, o la adhesión de la enzima sobre la superficie celular de la levadura.

En este contexto, el presente trabajo plantea el desarrollo de un proceso de hidrólisis y fermentación simultánea de celulosa, con una producción *in situ* de celulasas de *Trichoderma reesei* y el uso de una cepa genéticamente modificada de *Saccharomyces cerevisiae* que expresa una β -glucosidasa extracelular. Además, se evaluarán los procesos de fermentación de celobiosa utilizando las estrategias de hidrólisis de celobiosa intracelular y extracelular de forma comparativa.

1.4.2 Síntesis de oligosacáridos

La síntesis enzimática de oligosacáridos presenta ventajas respecto a la síntesis química debido a su mayor sencillez y menor impacto ambiental. Las enzimas más utilizadas son glicósido hidrolasas (familia GH) con actividad transglicosilante que no requieren sustratos activados (Talens-Perales et al. 2016).

Este trabajo se centra en la producción de un tipo particular de oligosacáridos, los IMOS, con aplicaciones como prebióticos y edulcorantes con bajo aporte calórico. Para la producción de IMOS lineales se puede partir de almidón o dextrano y usar la acción combinada de hidrolasas y transferasas para generar mezclas complejas de α -glucósidos (Madsen et al. 2017; Sorndech et al. 2017a; Basu et al. 2016). Otra alternativa es partir de sustratos menos complejos, como sacarosa o maltosa, para generar mezclas de IMOS de una composición más definida, utilizando α -glucosidasas, dextranosucrasas y otras enzimas con actividad transferasa (Shi et al. 2016; Goffin et al. 2011; Madsen et al. 2017; Gutiérrez-Alonso et al. 2016; Sorndech et al. 2017b; Pan & Lee 2005). Para la síntesis de cicloisomaltooligosacáridos se ha descrito el uso de ciclooligosacárido transferasas utilizando como sustrato dextrano o almidón (Funane et al. 2008; Funane et al. 2007a; Oguma et al. 1994; Mukai et al. 2006; Mukai et al. 2005; Nishimoto et al. 2002; Aga et al. 2002).

La síntesis de IMOS a partir de almidón se ha conseguido utilizando amilasas multifuncionales, enzimas ramificadoras de glucógeno y otras glucanotransferasas. Las amilasas multifuncionales son capaces de hidrolizar enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ y de transglucosilar con alta actividad enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ para generar maltosa, maltotriosa, isomaltotriosa e isomaltotetraosa a partir de almidón. Cuando el sustrato es maltosa el único producto generado es isomaltosa y cuando el sustrato es isomaltosa el perfil de productos es más complejo (maltotriosa, isomaltotriosa, isomaltotetraosa, entre otros) (Wang et al. 2010; Cao et al. 2014).

Las α -glucosidasas de la familia GH31 son las enzimas más empleadas para producir IMOS lineales a partir de azúcares sencillos. Estas enzimas utilizan como sustrato donador principalmente maltosa, y el grupo glucosilo se transfiere a diferentes sustratos aceptores (como la propia maltosa o glucosa).

INTRODUCCIÓN GENERAL

La especificidad de cada enzima por los sustratos donador y aceptor, y por el tipo de enlace que se sintetice, determinará la variedad química de los IMOS producidos en cada caso. Las α -glucosidasas de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Schwanniomyces occidentalis* o *Xanthophyllomyces dendrorhous* se han utilizado para sintetizar IMOS como panosa, isomaltosa e isomaltotriosa, todas ellas con enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ (Chen et al. 2010b; Mangas-Sánchez & Adlercreutz 2015; Wu et al. 2010; Gutiérrez-Alonso et al. 2016; Song et al. 2013). Por otro lado, la α -glucosidasa de *Acremonium implicatum* tiene la capacidad de usar diferentes sustratos donadores como nigerosa, maltosa, isomaltosa, maltotriosa, maltotetraosa e incluso almidón soluble, y es capaz de transglicosilar con enlaces $\alpha(1\rightarrow3)$ y $\alpha(1\rightarrow4)$ con mayor preferencia por los primeros, lo que hace que los productos de síntesis se diversifiquen. Usando solo maltosa como sustrato, esa α -glucosidasa es capaz de formar 8 tipos de moléculas: nigerosa, nigerotriosa (3^2 -O- α -D-glucosil-nigerosa), 4- α -nigerosil-glucosa (3^2 -O- α -D-glucosil-maltosa), 3^2 -O- α -nigerosil-maltosa, 3^2 -O- α -maltosil-maltosa, 4²- α -nigerosil-maltosa (3^2 -O- α -D-glucosil-maltotriosa), maltotriosa y maltotetraosa, de las cuales las seis primeras son IMOS (Yamamoto et al. 2004). Otro ejemplo es la α -glucosidasa de *Paecilomyces lilacinus* que tiene la capacidad de transglicosilar con enlaces $\alpha(1\rightarrow3)$ y $\alpha(1\rightarrow2)$, formando a partir de maltosa los IMOS nigerosa y kojibiosa, con un rendimiento del 16 % y del 8,6 % a partir de 100 g de sustrato, respectivamente (Kobayashi et al. 2003).

Se pueden obtener IMOS lineales a partir de azúcares sencillos como la maltotriosa, utilizando otro tipo de transferasas. Mediante la acción combinada de una amilomaltasa (EC 2.4.1.25) (4- α -glucanotransferasa) bacteriana y una transglucosidasa de *Aspergillus niger* se han producido IMOS con DP de 2 a 6 y con enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ y $\alpha(1\rightarrow6)$ (Rudeekulthamrong et al. 2013).

Las dextranosucrasas (EC 2.4.1.5) del género *Weissella* también han sido utilizadas para la síntesis de IMOS, en este caso a partir de sacarosa. Estas enzimas pertenecen a la familia GH70 y actúan por un mecanismo de retención. En la primera etapa rompen la sacarosa y liberan fructosa, y en la etapa de transglucosilación transfieren la glucosa a una molécula aceptora mediante un enlace por lo general $\alpha(1\rightarrow6)$. La especificidad tanto del aceptor como del tipo de enlace dependerá de las características del sitio catalítico de cada enzima (Henrissat 1991). Usando la dextranosucrasa de *Weissella confusa* y maltosa como molécula aceptora se han generado IMOS lineales y ramificados, con DP de 3 a 8 y con enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ y $\alpha(1\rightarrow2)$, siendo mayoritarios los IMOS lineales de la serie panosa (Shi et al. 2016). También se han generado IMOS lineales con un DP de 3 a 10 usando la dextranosucrasa de *Weissella cibaria* y diferentes α -glucanos (mono, di y trisacáridos) como aceptores. En este caso se comprobó que los α -glucanos de menor tamaño son utilizados preferentemente por la enzima y, dentro de estos, aquellos con enlace $\alpha(1\rightarrow6)$ (Hu et al. 2017).

Para la síntesis de cicloisomaltooligosacáridos (CIs) se han descrito distintas ciclooligosacárido transferasas. Mediante una cicloisomaltooligosacárido glucano transferasa (CITasa) de *Bacillus circulans* T3040 de la familia GH66 que actúa por un mecanismo de retención se han obtenido CIs de 7 a 17 unidades de glucosa. La CITasa usa dextrano como sustrato y por transglucosilación intramolecular (reacción de ciclación) genera moléculas cíclicas con enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ (Funane et al. 2008; Funane et al. 2007a; Oguma et al. 1994). La CITasa de *Bacillus circulans* T3040 contiene un módulo de unión a azúcares (CBM35), que es determinante en el tamaño del CI sintetizado. El extremo no reductor del polisacárido se une al CBM35 y el resto de la cadena se extiende hasta el sitio catalítico, donde se rompe el enlace $\alpha(1\rightarrow6)$. El oligosacárido residual generado permanece temporalmente unido a

INTRODUCCIÓN GENERAL

la enzima (intermedio enzima-sustrato) a través del nucleófilo catalítico, y es liberado por acción de la glucosa del extremo no reductor del mismo oligosacárido, liberado del CBM35, que actúa como aceptor formando un enlace $\alpha(1\rightarrow6)$. Se completa así el proceso de ciclación produciendo una CI de 8 unidades (Suzuki et al. 2014). Otras transferasas producen CIs a partir de almidón (amilosa) o polisacáridos relacionados. La 6- α -maltosiltransferasa de *Arthrobacter globiformis* M6 es capaz de catalizar reacciones de transferencia α -1,6 maltosil tanto inter como intramoleculares, para sintetizar un tetrasacárido cíclico, la maltosilmaltosa cíclica cuya descripción química es: ciclo-{ $\rightarrow6$ }- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow) (Mukai et al. 2006). Por otro lado, dos enzimas de *Bacillus globisporus* C11, la 1,6- α -glucosiltransferasa y la 1,3- α -isomaltosiltransferasa han sido usadas para la síntesis a partir de maltooligosacáridos del tetrasacárido cíclico (CTS): ciclo{ $\rightarrow6$ }- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow) (Nishimoto et al. 2002; Aga et al. 2002). Con el uso combinado de la 1,6- α -glucosiltransferasa y la 1,3- α -isomaltosiltransferasa también se ha descrito la producción de derivados ramificados del CTS (4-O- α -D-glucopiranosil-CTS y 3-O- α -isomaltosil-CTS) (Aga et al. 2002).

En la [Tabla 1.8](#) se resumen las diferentes estrategias usadas para la obtención de IMOS. Para la síntesis de IMOS también se ha aplicado la ingeniería de enzimas, bien para cambiar el perfil químico de los IMOS sintetizados por una α -glucosidasa (Ma et al. 2017; Song et al. 2013) o por una amilasa multifuncional (Cao et al. 2014) o bien para cambiar la especificidad de sustrato a una sacarosa isomerasa para sintetizar isomaltosa a partir de sacarosa y maltosa (Lee et al. 2008).

Tabla 1.8 IMOS producidos en diferentes procesos

MICROORGANISMO	ENZIMA USADA	ID PROTEÍNA	FAMILIA	FUENTE	SUSTRATO	PRINCIPALES PRODUCTOS	REFERENCIA
LINEALES							
<i>Bacillus sp. ZW2531-1</i>	Amilasa multifuncional	ABY71030.1	GH13	Expresada en <i>E. coli</i> y purificada	Almidón	Maltosa, maltotriosa, isomaltotriosa, isomaltotetraosa. En la cepa silvestre y en los mutantes W358N y W358T, los IMOS representan un 51%, 70% y 50%, respectivamente.	(Cao et al. 2014)
	Amilasa multifuncional mutante	ABY71030.1 (W358N ^a)					
		ABY71030.1 (W358T ^a)					
<i>Bacillus sp. ZW2531-1</i>				Purificada	Almidón	Maltosa, maltotriosa, isomaltotriosa, isomaltotetraosa.	(Wang et al. 2009)
	Amilasa multifuncional				Maltosa	Isomaltosa	
						Isomaltosa	Maltotriosa, isomaltotriosa, isomaltotetraosa, tetrasacárido indefinido, panosa o isopanosa en pequeñas concentraciones.
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	Enzima de ramificación del glucógeno	WP_010885475.1	GH57	Expresada en <i>E. coli</i> y purificada	Amilosa	Rompe enlaces endo- α -1,4 y forma ramificaciones con enlaces α -1,6. DP 7 – 12 con la cepa silvestre y DP 10 – 13 con el mutante.	(Na et al. 2017)
	Enzima mutante de ramificación del glucógeno	WP_010885475.1 (delección residuos 238 – 247)					

INTRODUCCIÓN GENERAL

MICROORGANISMO	ENZIMA USADA	ID PROTEÍNA	FAMILIA	FUENTE	SUSTRATO	PRINCIPALES PRODUCTOS	REFERENCIA
<i>Lactobacillus reuteri</i> 121 (GTFBΔN)	4,6- α -glucanotransferasa	AAU08014.2	GH70	Expresada en <i>E. coli</i> y purificada	Amilosa o maltodextrinas	Isomalto / maltopolisacáridos. isomalto / maltooligosacáridos	(Bai et al. 2015; Bai et al. 2017)
						Isomaltosacáridos	
<i>Flavobacterium johnsoniae</i> NBRC 14942	Dextranasa	WP_012026400.1	GH31	Expresada en <i>E. coli</i> y purificada	Dextrano	Isomaltooligosacáridos	(Gozu et al. 2016)
					Pululano	Isopanosas	
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	1,6-glucosidasa	AAV42157.1	GH13_31	Comercial	Isomaltosa	Isomaltooligosacáridos	(Moller et al. 2012)
					IMOS ^b o dextrano	Hidrolizados de IMOS o dextrano	
<i>Penicillium</i> sp	Endodextranasa D8144			Comercial	Dextrano	IMOS con DP de 8 a 10	(Bertrand et al. 2014)
Bacteria del suelo	Amilomaltasa			Expresada en <i>E. coli</i> y purificada	Maltotriosa	IMOS con DP de 2 a 6	(Rudeekulthamrong et al. 2013)
				Comercial purificada			
<i>Aspergillus niger</i>	Transglucosidasa			Comercial purificada			
<i>Aspergillus niger</i>	α -glucosidasa			Comercial	Maltosa	Panosas e isomaltosas	(Mangas-Sánchez & Adlercreutz 2015)
				Purificada a partir de micelio seco		Nigerosas y kojibiosas	(Kobayashi et al. 2003)
<i>Paeciliomyces lilacinus</i>							

MICROORGANISMO	ENZIMA USADA	ID PROTEÍNA	FAMILIA	FUENTE	SUSTRATO	PRINCIPALES PRODUCTOS	REFERENCIA	
<i>Acremonium implicatum</i>	α -glucosidasa	BAD08418.1	GH31	Purificada	Maltosa	Nigerosa, nigerotriosa, 4- α -nigerosil-glucoza, 3'-O- α -nigerosil-maltosa, 3'-O- α -maltosil-maltosa, 4'- α -nigerosil-maltosa	(Yamamoto et al. 2004)	
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>		AL55547.1		Expresada en <i>S. cerevisiae</i> y purificada			Panosa	(Gutiérrez-Alonso et al. 2016)
<i>Aspergillus niger</i>		XP_001402053		Expresada en <i>Picchia pastoris</i> y purificada				Panosa, isomaltosa e isomaltotriosa. En A. <i>niger</i> con un ratio 1:1.13:0.05
<i>Aspergillus oryzae</i>		XM_001820239					(Wu et al. 2010)	
<i>Schwanniomyces occidentalis</i>		BAE20170					(Song et al. 2013)	
<i>Aspergillus niger</i>	α -glucosidasa mutante	XP_001402053 (N694A ^a , N694L ^b , N694F ^a , N694W ^b)	Expresada en <i>Picchia pastoris</i> y purificada	Panosa, isomaltosa e isomaltotriosa con un ratio: N694A: 1:0.75:0.042 N694L: 1:0.55:0.036 N694F: 1:1.6:0.17 N694W: 1:2.5:0.36	Panosa, isomaltosa e isomaltotriosa	(Ma et al. 2017)		
<i>Schwanniomyces occidentalis</i>		BAE20170 (W324Y ^b)					(Song et al. 2013)	
<i>Weissella confusa</i>	Dextranosucrasa	AHU88292.1	GH70	Expresada en <i>Lactococcus lactis</i> y purificada	Mezcla sacarosa - maltosa	Series lineales de panosa. Centosa	(Shi et al. 2016)	
<i>Weissella cibaria</i> 10M		AND77013.1		Expresada en <i>E. coli</i> y purificada			Sacarosa y aceptores ^c	(Hu et al. 2017)

MICROORGANISMO	ENZIMA USADA	ID PROTEÍNA	FAMILIA	FUENTE	SUSTRATO	PRINCIPALES PRODUCTOS	REFERENCIA
<i>Protaminobacter rubrum</i>	Sucrosa isomerasa (SI) mutante	CAF32985.1 (R325Q ^a R325D ^b)	GH13_31	Expresada en <i>E. coli</i> y purificada	Mezcla sacarosa - glucosa	Isomaltulosa, trehalulosa e isomaltosa con un ratio: R325Q: 1.0.87:1.54 R325D: 1.1.65:2.4	(Lee et al. 2008)
cíclicos							
<i>Bacillus spp., cepa T3040</i>	Cicloisomalto oligosacárido glucano transferasa	BAA09604.1	GH66	Purificada	Dextrano	Cis de 7 - 9 glucosas	(Oguma et al. 1994)
<i>Bacillus spp., cepa T3040</i>			GH66	Sobrenadante del cultivo		Cis de 7 - 12 glucosas	(Funane et al. 2007b)
<i>Bacillus circulans T3040</i> ^d			GH66		Cis de 7 - 9 glucosas	(Funane et al. 2007a)	
<i>Bacillus spp.</i>					Cis de 7 - 17 glucosas. Predominan los Cis de 10 - 12.	(Funane et al. 2008)	
<i>Paenibacillus sp.</i>							
<i>Arthrobacter globiformis</i> M6	6- α -maltosiltransferasa	BAE79266.1			Almidón	Maltosilmaltoosa cíclica	(Mukai et al. 2006; Mukai et al. 2005)
<i>Bacillus globisporus</i> C11	1,6- α -glucosiltransferasa 1,3- α -isomaltosiltransferasa			Purificada	Malto oligosacáridos	CTS	(Nishimoto et al. 2002)
					Almidón parcialmente hidrolizado	CTS Subproductos ramificados: 4-O- α -D-glucopiranosil-CTS y 3-O- α -isomaltosil-CTS	(Aga et al. 2002)

^a Sustituciones respecto a secuencia original por mutagénesis dirigida

^b Isomaltosa, isomaltotriosa, isomaltotetraosa, panosa

^c α -glucanos: sacarosa, melibiosa, arabinosa, rafinosa, galactosa, lactosa, maltosa, isomaltosa, nigerosa, kojibiosa, maltotriosa, isomaltotriosa

^d Cepa mutada de forma aleatoria, con mayor actividad transglucosilante que la versión silvestre

En la producción enzimática de IMOS y de oligosacáridos en general, la recuperación de la enzima es un objetivo de interés a nivel industrial. Por un lado, se consigue eliminar la enzima del producto final y por otro, si ésta es suficientemente estable se puede reutilizar, reduciendo costes. La inmovilización de la enzima purificada a un soporte insoluble, mediante interacciones covalentes o electrostáticas ha sido una de las estrategias empleadas para facilitar el paso de recuperación (Datta et al. 2013; Brena et al. 2013). Cuando se utilizan estrategias “one-pot” en las que se evita el paso de purificación de la enzima y se utiliza directamente el organismo productor se puede aplicar también este concepto de inmovilización, fijando la proteína a la superficie celular. Entre los distintos métodos posibles, destaca la unión covalente de la enzima a la membrana o la pared de la célula productora mediante un mecanismo de anclaje a través de un glicosilfosfatidilinositol (GPI). Los GPI actúan como ancla de muchas proteínas a la superficie celular eucariota. En muchos organismos tienen una estructura común formada por un fosfato de etanolamina, tres manosas, una N-acetilglucosamina, y un fosfolípido de inositol. La parte lipídica puede ser un fosfatidilinositol de diacilo o 1-alkilo-2-acilo, o una fosfoceramida inositol. Los GPIs se unen a las proteínas por un enlace amida entre el carbono del grupo carboxilo terminal y el grupo amino de la etanolamina. Las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos de inositol se insertan dentro de la capa externa de la membrana plasmática (Figura 1.15A). En el caso de ciertas proteínas de levadura, el ancla GPI sufre modificaciones, se entrecruza con β -glucanos de la pared celular, y las proteínas quedan ancladas a la pared (Kinoshita & Fujita 2016). El ancla GPI se une a la proteína en el retículo endoplasmático por transamidación, una reacción en la cual la señal de unión GPI en el extremo C-terminal es cortada concomitantemente con la adición del residuo GPI. Las señales de unión GPI están pobremente conservadas

INTRODUCCIÓN GENERAL

a nivel de secuencia, pero todas están compuestas de un segmento polar que incluye el sitio de unión GPI seguido de un segmento hidrofóbico localizado en el extremo C-terminal de la proteína (Figura 1.15B) (Galian et al. 2012). *Saccharomyces cerevisiae* tiene más de 60 proteínas ancladas a la superficie

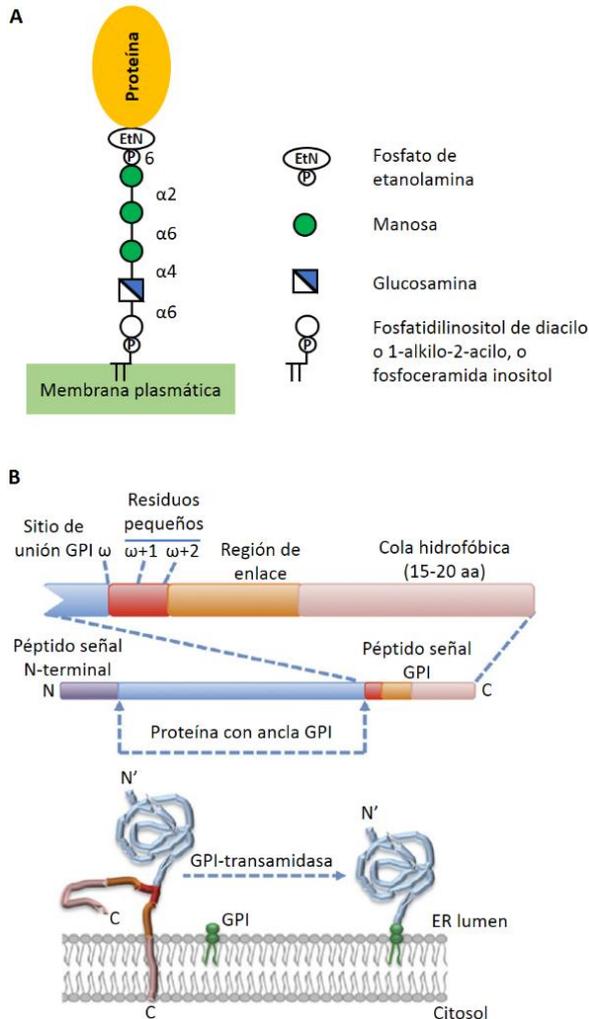


Figura 1.15 (A) Estructura común de un ancla GPI. (B) Estructura de la señal de unión GPI en la proteína. La transamidasa puede actuar independientemente de si la proteína es liberada al lumen o si está atada a la membrana endoplasmática. Adaptado de Galian et al. (2012).

celular mediante GPIs. Entre las proteínas con ancla GPI fusionadas con enzimas para generar híbridos anclados a la superficie celular están: AG α 1, CWP1, CWP2, TIP1, TIR1, YCR89w, FLO1, SAG1, SED1 entre otras. SED1 es una de las proteínas más utilizadas y se ha descrito su uso en forma completa o truncada (Inokuma et al. 2015; Inokuma et al. 2014; Shimoi et al. 1998; Van der Vaart et al. 1997).

Dentro de este contexto, en este trabajo se propone diseñar síntesis de IMOS usando una α -glucosidasa de *Aspergillus niger* inmovilizada en la superficie celular de *Saccharomyces cerevisiae* que facilite su recuperación y reutilización.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Abordar el estudio básico y aplicaciones potenciales de proteínas (enzimas y permeasas) implicadas en el metabolismo de azúcares α - y β -glucosídicos, por levaduras. La principal aplicación relacionada con la utilización de β -glucósidos es la fermentación de celulosa para producir bioetanol de segunda generación. Respecto a la utilización de α -glucósidos, su fermentación da lugar a bioetanol de primera generación, que no es considerado objetivo biotecnológico relevante. Por este motivo, el estudio de una α -glucosidasa de *Aspergillus niger* se ha orientado a la utilización de esta enzima para la biosíntesis de isomaltooligosacáridos, compuestos con posible función prebiótica y distintos usos en la industria alimentaria.

2.2 Objetivos específicos

- 1 Desarrollar un procedimiento de hidrólisis y fermentación acopladas para la producción de etanol a partir de papel, utilizando una preparación enzimática de *Trichoderma reesei*, producida *in situ*, y una cepa genéticamente modificada de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 2 Fermentación de celobiosa por cepas de *Saccharomyces cerevisiae* modificadas genéticamente. Análisis comparativo de la hidrólisis extra o intracelular del disacárido.
- 3 Síntesis de isomaltooligosacáridos por levaduras recombinantes que expresan una α -glucosidasa de *Aspergillus niger*. Análisis estructural y funcional de la enzima.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cepas utilizadas

Escherichia coli XL1-BLUE (Stratagene), con el genotipo: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZΔM15 Tn10* (Tetr)] se utilizó como organismo huésped en la clonación de los distintos plásmidos obtenidos en este trabajo. *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 es isogénica a la cepa silvestre estándar S288C, con genotipo: *MATa AGT1 MAL12 mal13Δ MAL31 MAL32 mal33Δ his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0* y T500 es un transformante obtenido a partir de este huésped que expresa el gen de la β-glucosidasa (Bgl1) de *Saccharomycopsis fibuligera* (Gurgu et al. 2011; Marín-Navarro et al. 2011). *Hanseniaspora guilliermondii* CBS 2574 fue obtenida de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT 11104). *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) CECT 2415, idéntica a ATCC 56764 y a NRRL 11236 y *Aspergillus niger* CECT 2775 fueron obtenidas de la Colección Española de Cultivos Tipo. *Neurospora crassa* FGSC 2489 se obtuvo del Fungal Genetics Stock Center (<http://www.fgsc.net>).

3.2 Medios y condiciones de cultivo

3.2.1 Cultivo de *E. coli*

E. coli se cultivó en medio líquido LB (extracto de levadura 0.5 %, peptona 1 % y cloruro de sodio 0.5 %), con agitación orbital a 200 rpm, o en placas de medio sólido LB con 2 % de agar bacteriológico en estufa a 37 °C durante 20 h aproximadamente. Las bacterias transformantes con plásmidos del gen Amp^R se cultivaron en medio LBA (LB con ampicilina 100 mg/L).

3.2.2 Cultivo de levaduras y hongos

Las levaduras se cultivaron a 30 °C en medios líquidos con agitación orbital a 200 rpm, o sólidos. Los medios sólidos se prepararon con 2 % de agar bacteriológico. En todos los medios el antibiótico y los azúcares diferentes a la glucosa fueron esterilizados por filtración a través de un poro de 0.22 μm . *T. reesei*, *A. niger* y *N. crassa* fueron cultivados y mantenidos en medio sólido PDA (almidón de patata 0.4 %, dextrosa 2 % y agar 2 %) en estufa a 30 °C. En medio líquido, *T. reesei* y *N. crassa* se incubaron a 30 °C y *A. niger* a 26 °C, todos con agitación orbital a 200 rpm. En la tabla [Tabla 3.1](#) se detallan los diferentes medios utilizados.

Tabla 3.1 Medios de cultivo utilizados para levaduras y hongos

DENOMINACIÓN	COMPOSICIÓN	UTILIZACIÓN
Medios ricos		
YP	Extracto de levadura 1 % Bactopeptona 2 %	Hongos
YPD	Medio YP más glucosa 2 %	Levaduras y hongos
YPC	Medio YP más celobiosa 2 %	Levaduras
YP2P	Medio YP más papel de filtro RM13054252, 73 g/m ² , 2 %, cortado en cuadrados de 25 mm ²	Hongos
YP5P	Medio YP más papel de filtro RM13054252, 73 g/m ² , 5 %, cortado en cuadrados de 25 mm ²	Hongos y Levaduras
Medios mínimos		
SD	Base nitrogenada para levadura (YNB) sin aminoácidos 0.17 % Sulfato de amonio 0.5 % Glucosa 2 %	Levaduras
SCD	Medio SD suplementado con los requerimientos de la Tabla 3.2 excepto uracilo y leucina	Levaduras

DENOMINACIÓN	COMPOSICIÓN	UTILIZACIÓN
SCC	Base nitrogenada para levadura (YNB) sin aminoácidos 0.17 % Sulfato de amonio 0.5 % Celobiosa 2 % Suplementos según la Tabla 3.2 excepto uracilo y leucina	Levaduras

Para seleccionar cepas resistentes a geneticina, se añadió G418 a los medios a una concentración de 100 µg/mL (medios ricos) o 250 µg/mL (medios mínimos). En el caso del medio mínimo con G418, la fuente de nitrógeno utilizada fue glutamato monosódico 0.1 % en lugar de sulfato amónico 0.5 %. Para inducir la expresión de genes bajo el control del promotor CYC-GAL se añadió a los medios galactosa 0.1 %.

Tabla 3.2 Suplementos de los medios sintéticos para el cultivo de levaduras

REQUERIMIENTO	ABREVIATURA USADA EN LOS MEDIOS DE CULTIVO	CONCENTRACIÓN EN EL MEDIO DE CULTIVO (mg/L)
Adenina	ade	20
Uracilo	ura	20
Triptófano	trp	20
Histidina	his	20
Arginina	arg	40
Metionina	met	20
Tirosina	tyr	50
Leucina	leu	60
Isoleucina	ile	60
Lisina	lys	50
Fenilalanina	phe	50
Ácido aspártico	asp	100
Ácido glutámico	glu	100
Valina	val	150
Treonina	thr	200
Serina	ser	400

3.3 Construcciones genéticas

3.3.1 Vectores utilizados

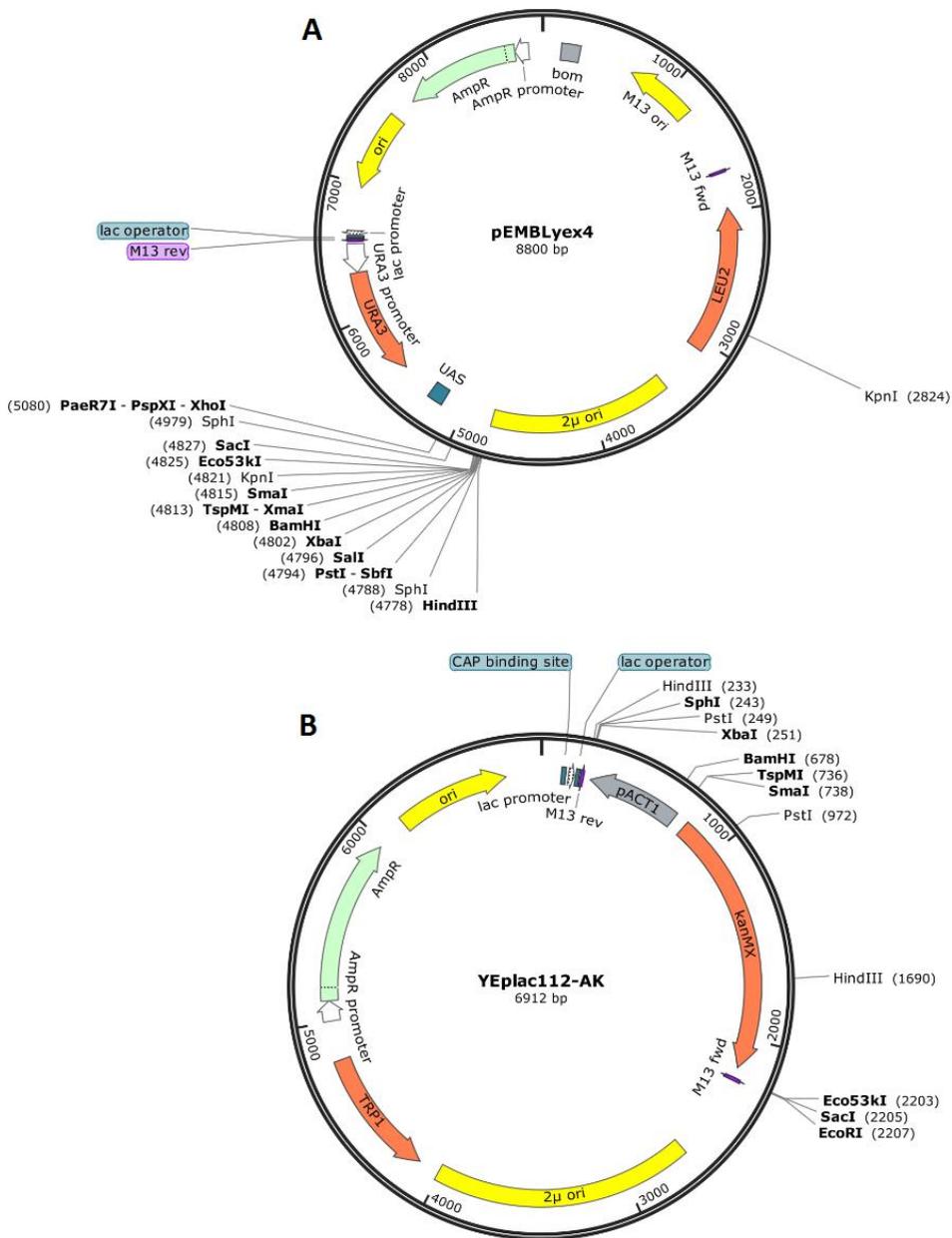


Figura 3.1 Esquemas de los vectores pEMBLyex4 (A) y YEplac112-AK (B)

Los vectores utilizados para la clonación y expresión génica en *S. cerevisiae* fueron pEMBLyex4 y YEplac112-AK. Ambos confieren resistencia a ampicilina a *E. coli*. pEMBLyex4 contiene un promotor de levadura inducible por galactosa (CYC-GAL) y los genes *URA3* y *LEU2^d*, que complementan las auxotrofías para uracilo y leucina, respectivamente, de la cepa S288C. YEplac112-AK es un vector derivado a partir de YEplac112 (Gietz & Sugino 1988) mediante inserción del gen *KanMX*, que confiere resistencia al antibiótico G418, clonado en los sitios *SacI/SmaI*, y el promotor del gen de la actina, clonado en los sitios *SmaI/XbaI*. Ambos fragmentos se obtuvieron del plásmido pACT-Kan descrito previamente (Gurgu et al. 2011). En la [Figura 3.1](#) se muestran los esquemas de estos vectores con los principales sitios de restricción en el sitio de clonación de cada uno de ellos.

3.3.2 Cebadores utilizados

Las secuencias de todos los cebadores utilizados en este trabajo y el gen objetivo de la amplificación en cada caso se detallan en la [Tabla 3.3](#).

Tabla 3.3 Lista de cebadores utilizados

CEBADORES	# bp	SECUENCIA ^a	USOS ^b
Amplificación de β-glucosidasas			
2MC25	37	TGCGGATCCACTTCTACATTTGATCCTGAATATCTTC	HgBgl_Fwd (BamHI)
2MC26	37	CTGTCTAGAAATGACTTCTACATTTGATCCTGAATATC	HgBgl_Fwd (XbaI) + ATG
2MC27	37	AGACAAGCTTCATAAACCTGACCAATAATAGTCATC	HgBgl_Rev (HindIII)
2MC73	34	TCGTCTAGAAATGACTATTTTTCAATTTCCGCAGG	PpBglA_Fwd (XbaI)
2MC74	32	AGCCGTCGACTTAGCGTCTAGTCTCCAACCAG	PpBglA_Rev (Sall)
2MC77	33	TCGTCTAGAAATGTCTCTTCTAAGGATTTCTC	NcBgl_Fwd (XbaI)
2MC78	34	TAGTGCATGCTTAGTCTCTTCTGATCAAAGAGAC	NcBgl_Rev (SphI)

MATERIALES Y MÉTODOS

CEBADORES	# bp	SECUENCIA ^a	USOS ^b
Amplificación de permeasas			
2MC33	28	CTGTCTAGAAATGAAGGAGCCGCCAAGG	Tr_StrA_Fwd (Xbal)
2MC34	37	AGACAAGCTTTAAAGCCTTCTCGATATTGACAATGTC	Tr_StrA_Rev (HindIII)
2MC35	27	CTGTCTAGAAATGGCTCCCTCTGCGGCG	Tr_StrD_Fwd (Xbal)
2MC36	35	AGACAAGCTTTATACAGATGAACCGGAAACCGAC	Tr_StrD_Rev (HindIII)
2MC37	30	CTGTCTAGAAATGGCGGAAAAGGACGAGTCG	Tr_StrC_Fwd (Xbal)
2MC38	31	TACTCTGCAGTCAAACCCGGTCAGCATTGCC	Tr_StrC_Rev (PstI)
2MC54	28	CTGTCTAGAAATGCAAGCCGCGTGCTAC	Tr_StrB_Fwd (Xbal)
2MC55	33	AGACAAGCTTTCAAACATCGTCCCTACCATCTG	Tr_StrB_Rev (HindIII)
2MC91	22	GGGCGTGTGACGAAGCAAAG	Tr_StrB Fwd a partir de de la base 640. Diseñado para eliminar el segundo intrón del gen.
2MC92	23	ATGTTGTACACCATCGTGGGC	Tr_StrB Rev a partir de la base 639. Diseñado para eliminar el segundo intrón del gen.
2MC56	30	CTGTCTAGAAATGGGAATCCTCAAACCCACC	Tr_StrE_Fwd (Xbal)
2MC57	34	AGACAAGCTTCTAACTCGTGGTCTTCTCGTTGTG	Tr_StrE_Rev (HindIII)
2MC58	27	CTGTCTAGAAATGGTCCAGTCCGCCACC	Tr_StrF_Fwd (Xbal)
2MC59	32	AGACAAGCTTTCAGGCCTCATTTGTCTTGAGG	Tr_StrF_Rev (HindIII)
2MC60	37	CTGTCTAGAAATGGCTTACAAAATTAGCAACATTTATG	Tr_StrG_Fwd (Xbal)
2MC61	37	TAGTGCATGCTCAAACCTCATTACGTCAAGCTGAAG	Tr_StrG_Rev (SphI)
2MC88	36	ATCCCGGGATGGCTTACAAAATTAGCAACATTTATG	Tr_StrG_Fwd (SmaI)
2MC89	36	CTGTCTAGATCAAACCTCATTACGTCAAGCTGAAG	Tr_StrG_Rev (Xbal)
2MC62	30	CTGTCTAGAAATGCCATTGGCAACATCTAC	Tr_StrH_Fwd (Xbal)
2MC63	30	AGACAAGCTTCTACTGGGGAGGGGAGTGC	Tr_StrH_Rev (HindIII)
2MC109	28	CTGTCTAGAAATGGCCGACGTCCACGTCG	Tr_SrtI_Fwd (Xbal)
2MC110	32	AGACAAGCTTTTAGACCTCGGCGGTAGGCTTC	Tr_SrtI_Rev (HindIII)
2MC111	31	CTGTCTAGAAATGCGTTTCTCCGAGAAGCTCG	Tr_SrtJ_Fwd (Xbal)
2MC112	37	AGACAAGCTTTTACACTGAAGTCAACTCCTTGCTC	Tr_SrtJ_Rev (HindIII)
Amplificación de α-glucosidasa y construcción de híbridos			
2MC70	29	CTGTCTAGAGCGAGCCAGTCACTCTTATC	AgIA_Fwd(Xbal)

CEBADORES	# bp	SECUENCIA ^a	USOS ^b
2MC90	29	CCAGGATCCGCGAGCCAGTCACTCTTATC	AglA_Fwd (BamHI)
2MC71	35	TCACAAGCTTTTACCATTCCAATACCCAGTTTTCC	AglA_Rev(HindIII)
2MC81	29	CCAGGATCCATGGTGGGACTTAAGAACCC	STA1_AglA_Fwd (BamHI)
2MC82	40	CCTAGTGCATGCAGTGGTCCATTCCAATACCCAGTTTTCC	STA1_AglA sin codón de parada, incluye 2 Thr (en verde) antes del sitio de restricción, Rev (SphI).
2MC83	44	CCTAGTGCATGCAGTGGTAAATTATCAACTGCTCTATTATCTGC	Sed1 completo (sin ATG), incluye una Ser y una Gly (en verde) antes del sitio de restricción, Fw (SphI).
2MC85	38	CCTAGTGCATGCAGTGGTGCTCTTCCAACACTAACGGTAC	Sed1 desde el aminoácido 110 inclusive, incluye una Ser y una Gly (en verde) antes del sitio de restricción, Fw (SphI).
2MC84	35	CACAAGCTTTTATAAGAATAACATAGCAACACCAG	Sed1 completo, Rev (HindIII)

^a Los sitios de restricción están marcados en rojo.

^b Fwd: cebador *forward*. Rev: cebador *reverse*. Entre paréntesis se indica la enzima de restricción que reconoce la secuencia marcada en rojo.

3.3.3 Obtención de DNA molde

Para obtener los cDNAs de *N. crassa* y *A. niger* utilizados como moldes para la amplificación de NcBgl y AglA, respectivamente, los hongos fueron cultivados con agitación a 200 rpm en medio líquido: YPC a 30 °C durante 72 h para *N. crassa*, o YPD a 26 °C durante 36 h para *A. niger*. El micelio se recuperó por filtración, se congeló y se rompió mediante molienda en nitrógeno líquido, en un mortero con una maza. El RNA fue aislado usando RNA PLUS (MP Biomedicals), basado en el procedimiento descrito por Chomczynski & Sacchi (1987). Para la transcripción reversa se utilizó el kit comercial Superscript III First Strand Kit (Invitrogen).

El DNA genómico de *H. guilliermondii*, utilizado como molde para la amplificación de la β -glucosidasa HgBgl, se obtuvo a partir de 4 mL de cultivo en medio YPD siguiendo el método de aislamiento descrito por Polaina y Adam (1991), y modificado por Latorre-García et al. (2007). En el caso de la β -glucosidasa de *Paenibacillus polymyxa* (PpBgIA), el DNA molde se obtuvo a partir del plásmido pLGBGA previamente descrito por Painbeni et al. (1992).

3.3.4 Plásmidos generados

En el vector de expresión constitutiva YEplac112-AK se clonaron las secuencias codificantes de las β -glucosidasas intracelulares de *Neurospora crassa* (NcBgl), *Hanseniaspora guilliermondii* (HgBgl) o *Paenibacillus polymyxa* (PpBgIA), bajo el control del promotor de actina (pACT1) y con el marcador de resistencia a geneticina (kanMX4) (Figura 3.2).

En el vector pEMBLyex4, bajo el control del promotor inducible de galactosa (CYC-GAL) se clonaron los genes de las permeasas de *Penicillium oxalicum* (Po_CdtC) (Figura 3.3A) y de *Trichoderma reesei* (Tr_SrtA a J). El procedimiento para generar estas construcciones se detalla en la Tabla 3.4.

En el plásmido pSSP-GOX (una versión modificada del vector pEMBLyex4) que contiene el promotor inducible de galactosa (CYC-GAL) fusionado a la secuencia señal de la proteína Sta1 de *Saccharomyces cerevisiae* (Marín-Navarro et al. 2011; Marín-Navarro, et al. 2015a), se clonó la región codificante de la α -glucosidasa de *Aspergillus niger* (AglA), dando lugar al plásmido pSSP-AG. Para obtener esta construcción, el gen *aglA* (GeneBank: D45356.1) fue amplificado a partir de cDNA de *A. niger* con los cebadores 2MC70 (*forward*) y 2MC71 (*reverse*), digerido con XbaI/HindIII y clonado en pSSP-GOX en los sitios NheI/HindIII. Por otra parte, mediante fusión del gen *aglA* con dos

versiones del gen *SED1* de *S. cerevisiae*, que contiene la secuencia de anclaje GPI, se generaron dos versiones híbridas de la α -glucosidasa AgIA. Una primera versión (AgIA-*SED1*A) unida al gen completo *SED1*, y una segunda versión (AgIA-*SED1*B) unida a una forma truncada de *SED1* que carece de los primeros 327 nucleótidos (109 aminoácidos). Entre AgIA y *SED1* se insertó el polipéptido Gly-Ser-Ala-Cys-Thr-Thr como espaciador (Figura 3.3B-D). El detalle de la obtención de las construcciones híbridas se muestra en la Tabla 3.4.

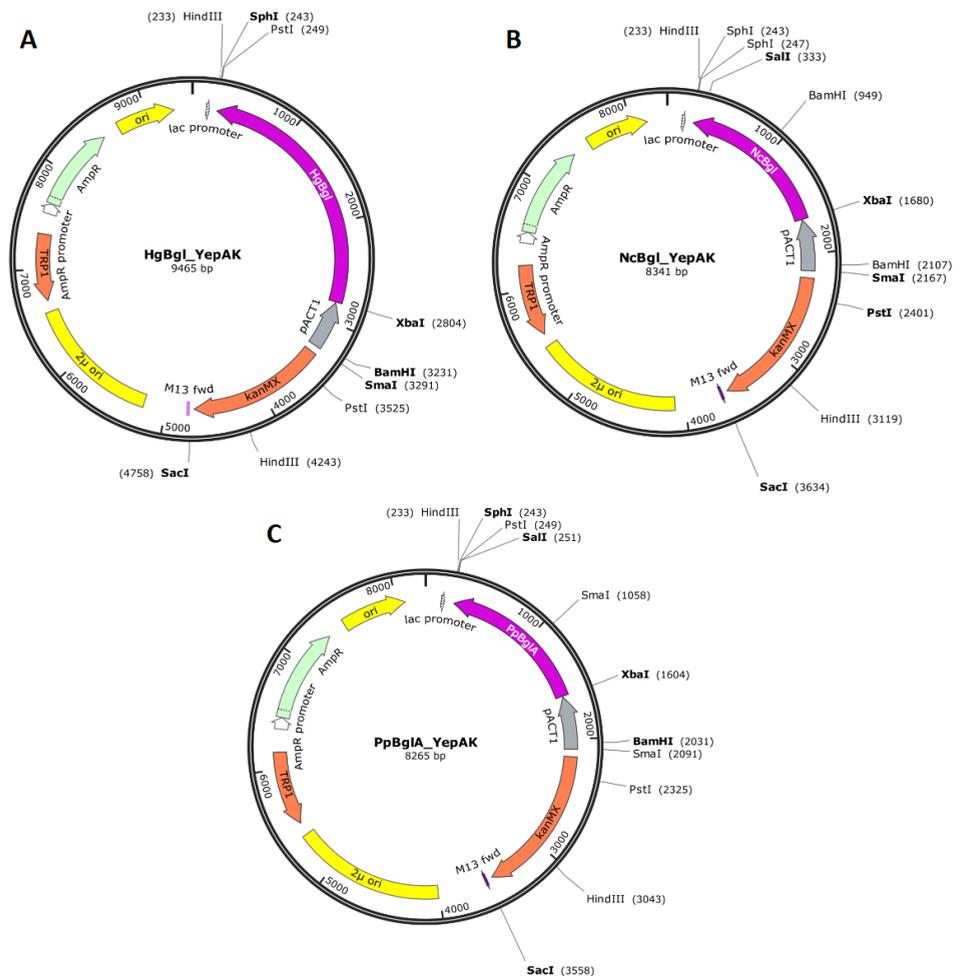


Figura 3.2 Esquemas de los plásmidos HgBgl_YepAK (A), NcBgl_YepAK (B) y PpBglA_YepAK (C)

Tabla 3.4 Procedimiento para la obtención de las distintas construcciones génicas utilizadas en este trabajo

VECTOR	INSERTO	ID PROTEÍNA INSERTADA	ORIGEN DEL INSERTO	CEBADORES	SITIOS DE CLONACIÓN EN EL VECTOR	CONSTRUCCIÓN RESULTANTE
β-glucosidasas						
YEplac112-AK	HgBgl	MG602667	Amplificado por PCR a partir de DNA genómico de <i>H. guilliermondii</i> y sometido a doble digestión, primero con HindIII y luego con XbaI. Antes de la segunda digestión el extremo cohesivo HindIII se convirtió en romo por tratamiento con el fragmento Klenow.	2MC26 2MC27	XbaI/Sall (extremo romo ^a)	HgBgl_YepAK
	NcBgl	XP_011393758.1	Amplificado por PCR a partir de cDNA de <i>N. crassa</i> y digerido con XbaI/SphI	2MC77 2MC78	XbaI/SphI	NcBgl_YepAK
	PpBglA	AAA22263.1	Amplificado por PCR a partir del plásmido pLGBGA (Painbeni et al. 1992) y digerido con XbaI/Sall	2MC73 2MC74	XbaI/Sall	PpBgl_YepAK
Permeasas						
pEMBlyex4	Po_CdtC	EPS25673.1	Gen sintético ^b , digerido con XbaI/PstI.	n.a	XbaI/PstI	PoCdtC_Yex
	Tr_StrA	EGR49861.1		2MC33 2MC34	XbaI/HindIII	TrStrA_Yex
	Tr_StrB ^c	XP_006962589.1		2MC54 2MC55	XbaI/HindIII	TrStrB_Yex
	Tr_StrC	EGR45703.1	Amplificado a partir de cDNA de <i>T. reesei</i> y digerido con XbaI/HindIII o con XbaI/PstI en el caso de Tr_StrC.	2MC37 2MC38	XbaI/PstI	TrStrC_Yex
	Tr_StrD	EGR48924.1		2MC35 2MC36	XbaI/HindIII	TrStrD_Yex
	Tr_StrE	EGR49690.1		2MC57 2MC55	XbaI/HindIII	TrStrE_Yex

VECTOR	INSERTO	ID PROTEÍNA INSERTADA	ORIGEN DEL INSERTO	CEBADORES	SITIOS DE CLONACIÓN EN EL VECTOR	CONSTRUCCIÓN RESULTANTE
pEMBLyex4	Tr_StrF	EGR46982.1	Gen sintético ^d digerido con XbaI/HindIII	2MC58 2MC59	XbaI/HindIII	TrStrF_Yex
	Tr_StrG	EGR44689.1	Gen sintético ^d digerido con SmaI/XbaI	2MC88 2MC89	SmaI/XbaI	TrStrG_Yex
	Tr_StrH	EGR46329.1	Amplificado a partir de cDNA de <i>T. reesei</i> y digerido con XbaI/HindIII	2MC62 2MC63	XbaI/HindIII	TrStrH_Yex
	Tr_StrI	XP_006964877.1		2MC109 2MC110	XbaI/HindIII	TrStrI_Yex
	Tr_StrJ	EGR47382.1	Gen sintético ^e digerido con XbaI/HindIII	2MC111 2MC112	XbaI/HindIII	TrStrJ_Yex
α-glicosidasas híbridas						
pEMBLyex4	STA1_AglA_Sed1A	NP_010362.3 ^e	STA1_AglA se amplificó a partir del plásmido pSSP-AG y se digirió con BamHI/SphI	2MC81 2MC82	BamHI/HindIII	pSSP-AG_Sed1A
			SED1A se amplificó (excluyendo el ATG inicial) a partir de DNA genómico de <i>S. cerevisiae</i> y se digirió con SphI/HindIII	2MC83 2MC84		
	STA1_AglA_Sed1B	-	STA1_AglA se amplificó a partir del plásmido pSSP-AG y se digirió con BamHI/SphI	2MC81 2MC82	BamHI/HindIII	pSSP-AG_Sed1B
			SED1B se amplificó a partir de DNA genómico de <i>S. cerevisiae</i> y se digirió con SphI/HindIII	2MC85 2MC84		

^a Para generar el sitio como en YEplac112-AK se digirió con Sall y se trató con el fragmento Klenow antes de digerir con XbaI.

^b Gen con codones optimizados para *S. cerevisiae* (GeneCust), clonado en los sitios XbaI/PstI de pBluescript II SK (+).

^c Se obtuvo una forma parcialmente procesada que contenía un intrón, éste fue eliminado por PCR con cebadores flanqueantes (2MC91, 2MC92), fosforilación y ligación del producto resultante.

^d DNA lineal con sitios de restricción específicos (Geneblocks, IDT Technology)

^e Código de SED1

Tabla 3.5 Levaduras transformantes obtenidas

CEPA HUÉSPED	PLÁSMIDO TRANSFORMANTE	CEPA TRANSFORMANTE	MEDIO DE SELECCIÓN ^a
BY4741	YEplac112_AK	BY4741_sinBgl	YPD + G418 ó SD + G418 + his / met / ura / leu
	HgBgl_YepAK	BY4741_HgBgl	
	NcBgl_YepAK	BY4741_NcBgl	
	PpBgl_YepAK	BY4741_PpBglA	
BY4741_sinBgl	PoCdtC_Yex	BY4741_sinBgl_PoCdtC	SD + G418 + his / met
BY4741_HgBgl		BY4741_HgBgl_PoCdtC	
BY4741_NcBgl		BY4741_NcBgl_PoCdtC	
BY4741_PpBglA		BY4741_PpBglA_PoCdtC	
BY4741_NcBgl	pEMBLyex4	BY4741_NcBgl_sinStr	SD + G418 + his / met
	TrStrA_Yex	BY4741_NcBgl_TrStrA	
	TrStrB_Yex	BY4741_NcBgl_TrStrB	
	TrStrC_Yex	BY4741_NcBgl_TrStrC	
	TrStrD_Yex	BY4741_NcBgl_TrStrD	
	TrStrE_Yex	BY4741_NcBgl_TrStrE	
	TrStrF_Yex	BY4741_NcBgl_TrStrF	
	TrStrG_Yex	BY4741_NcBgl_TrStrG	
	TrStrH_Yex	BY4741_NcBgl_TrStrH	
	TrStrI_Yex	BY4741_NcBgl_TrStrI	
	TrStrJ_Yex	BY4741_NcBgl_TrStrJ	
BY4741	pEMBLyex4	BY4741_pEMBLyex4	SD + his / met
	pSSP-AG	BY4741_AglA	
	pSSP-AG_Sed1A	BY4741_AglA_Sed1A	
	pSSP-AG_Sed1B	BY4741_AglA_Sed1B	

^a Las concentraciones de antibiótico y requerimientos adicionales son los indicados en el apartado 3.2.2.

3.5 Obtención de enzimas a partir de *T. reesei*

Para la obtención del cóctel celulolítico de *T. reesei*, se inocularon 2 mL de medio YP2P con 10 µL de una solución de esporas de aproximadamente 10⁸ conidios/mL y se mantuvieron en agitación orbital a 200 rpm a 30 °C durante 72 h. Este precultivo fue utilizado para inocular las fermentaciones líquidas o sólidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la fermentación líquida se inocularon 25 mL de medio YP5P, y el cultivo se mantuvo en agitación orbital a 200 rpm a 30 °C durante distintos tiempos (2 – 11 días). A continuación, el cultivo fue centrifugado a 1500 g 5 min y el sobrenadante utilizado como cóctel celulolítico.

Para la fermentación sólida se utilizaron 5 g de papel de filtro (RM13054252) estéril, cortado en cuadrados de 25 mm², en un matraz de 250 mL, humedecido con 8 mL de medio YP suplementado con 0.5 % de almidón. Tras el inóculo, los matraces se incubaron sin agitación a 30 °C durante distintos tiempos (6 - 20 días). Para extraer las enzimas del medio sólido fermentado se añadieron 8 mL de medio YP y se mantuvieron los matraces en agitación orbital a 200 rpm durante 30 min. El material sólido se eliminó mediante filtrado a través de un poro de aproximadamente 1 mm, centrifugación a 1500 g 5 min y un segundo filtrado a través de una membrana de 0.2 µm. El filtrado obtenido se utilizó como fuente de enzimas celulolíticas. Para algunos ensayos el filtrado se dializó en tampón citrato fosfato pH 5.5.

3.6 Obtención de enzimas a partir de *S. cerevisiae*

3.6.1 Obtención de β-glucosidasas

Las β-glucosidasas producidas por *S. cerevisiae* se obtuvieron a partir de extractos celulares crudos o de sobrenadantes del cultivo. En el primer caso, los sedimentos de células, recolectadas por centrifugación, se lavaron con agua y se resuspendieron en agua, o del tampón de ensayo correspondiente, y se rompieron por agitación vigorosa (vórtex) con perlas de vidrio (de 425 a 600 µm de diámetro) durante 3 ciclos de 1 minuto alternados con 1 minuto en hielo. Para clarificar los extractos, se eliminaron los residuos celulares por

centrifugación a 15000 *g* 2 min. Para algunos ensayos se dializaron los sobrenadantes en tampón citrato fosfato pH 5.5.

3.6.2 Obtención de α -glucosidasa

Para la producción de la α -glucosidasa, se inocularon cultivos de YPD con las cepas de *S. cerevisiae* transformantes, con distintas versiones de la α -glucosidasa, a una OD₆₀₀ de 0.5. El cultivo se mantuvo a 30 °C con agitación orbital a 200 rpm hasta que alcanzó una OD₆₀₀ de alrededor de 2.0. En ese momento se añadió el inductor (galactosa) a una concentración final de 1 %. El crecimiento se mantuvo en las mismas condiciones por un periodo adicional de aproximadamente 18 h. El cultivo fue alicuotado y centrifugado para separar las células del sobrenadante. Las células fueron lavadas con tampón citrato fosfato pH 5.5, y resuspendidas finalmente en el mismo tampón.

3.7 Ensayos de crecimiento y fermentación

Se ensayó la capacidad de distintas cepas de *S. cerevisiae* transformadas con β -glucosidasas extracelulares o intracelulares para crecer con celobiosa u otros sustratos celulósicos, así como su capacidad para fermentarlos.

3.7.1 Crecimiento en celobiosa

En un matraz de 50 mL se dispuso un volumen de 25 mL de medio SCC con G418 y galactosa al 0.1 % como inductor. Se inocularon células a una OD₆₀₀ inicial de 0.1 y se mantuvo el cultivo durante varios días a 30 °C con agitación orbital a 200 rpm. Se tomaron muestras a diferentes intervalos de tiempo y se siguió el crecimiento midiendo la OD a 600 nm.

3.7.2 Ensayos de fermentación

Inicialmente, se preparó un cultivo de 10 mL en medio sintético mínimo, suplementado con 0.1 % de galactosa esterilizada por filtración, manteniendo la presión de selección de cada transformante de levadura. Una vez crecido, el cultivo se centrifugó a 1500 g 5 min y el sedimento de células se lavó con agua estéril. Para ensayar la fermentación en celobiosa, el sedimento se resuspendió en 10 mL de medio YPC suplementado con 0.1 % de galactosa. Para ensayar la sacarificación y fermentación simultánea de papel (SSF) se procedió de forma similar, pero las células se resuspendieron en 10 mL del cóctel enzimático de *T. reesei*, obtenido en la fermentación sólida, a los que se añadieron inicialmente 0.5 g de papel filtro cortado en cuadrados. Posteriormente, conforme prosperó la fermentación, se realizaron cargas sucesivas de papel. Las fermentaciones tanto en celobiosa como en la SSF se llevaron a cabo en tubos cerrados con tapón de rosca, con capacidad para 14 mL, para minimizar el espacio de cabeza, y se mantuvieron varios días a 30 °C sin agitación. Se tomaron muestras a diferentes intervalos de tiempo para cuantificar etanol, celobiosa residual y posibles productos de transglicosilación en el medio de cultivo. El etanol generado en la fermentación fue medido utilizando un kit enzimático (Enzytec Fluid Thermo Scientific). Los azúcares presentes en la mezcla se cuantificaron según lo indicado en el apartado 3.9.

3.8 Ensayos enzimáticos

3.8.1 Ensayo de actividad β -glucosidasa

La actividad β -glucosidasa se determinó usando alternativamente *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (β -pNPG) o celobiosa como sustratos. Se definió

1 unidad (U) enzimática como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de glucosa por minuto.

3.8.1.1 Actividad hidrolítica con β -pNPG como sustrato

Se incubaron 50 μL de la solución enzimática a testar con 500 μL de *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (β -pNPG) (Sigma) 5 mM en tampón fosfato 50 mM pH 7.0, o en tampón citrato fosfato pH 5.5 a 37 °C, durante tiempos variables, hasta observar una coloración amarilla producto de la liberación del *p*-nitrofenol tras la hidrólisis del enlace $\beta(1\rightarrow4)$. La reacción se detuvo añadiendo 1 mL de carbonato de sodio 1 M. En el caso de utilizar muestras de extractos crudos, el producto final se centrifugó a 15000 *g* 2 min. Finalmente se midió la absorbancia a 400 nm usando un espectrofómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). La conversión de los valores de absorbancia a concentración se llevó a cabo utilizando el valor del coeficiente de extinción molar del *p*-nitrofenol a pH básico ($18 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.8.1.2 Celobiosa como sustrato

Se incubaron 50 μL de muestra con 150 μL de celobiosa a distintas concentraciones, en tampón fosfato 50 mM pH 7.0, o en tampón citrato fosfato pH 5.5 a 37 °C. La reacción se detuvo por calentamiento de las muestras a 95 °C, 10 min. La glucosa liberada producto de la hidrólisis del enlace $\beta(1\rightarrow4)$ fue cuantificada por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para concentraciones menores de 0.3 mM según lo indicado en el apartado 3.9, o utilizando un kit enzimático comercial (Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA) para concentraciones mayores de 0.3 mM.

Para el cálculo de K_m se determinó la variación de la velocidad inicial en función de la concentración de sustrato y los datos se ajustaron a una hipérbola con la forma $y = \frac{a \cdot x}{b + x}$ donde y es la actividad β -glucosidasa, x es la concentración de celobiosa y a y b son los parámetros de ajuste que corresponden a $V_{m\acute{a}x}$ y K_m , respectivamente, bajo las condiciones de ensayo. El ajuste matemático se realizó con el programa Sigmaplot (Systat Software, San Jose, CA, USA).

3.8.2 Ensayo de actividad celulasa

3.8.2.1 FPA (filter paper assay)

La actividad celulasa se determinó midiendo los azúcares reductores liberados a partir de la hidrólisis de papel de filtro con el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) descrito por Zhang et al. (2009) y adaptado a este trabajo.

El ensayo consistió en incubar a 50 °C aproximadamente 17 mg de papel de filtro con 500 μ L de diferentes diluciones de la solución enzimática, en tampón acetato de sodio 50 mM, pH 4.8. La reacción se detuvo mediante la adición de 250 μ L de DNS (44 mM), e incubación a 95 °C, 15 min, tiempo en el cual se completa la reacción del DNS con los azúcares reductores resultantes. La mezcla final se centrifugó a 15000 g 5 min. Se tomaron alícuotas de 100 μ L del sobrenadante a las que se añadieron 900 μ L de agua. Se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de placas multipocillo (BIO-TEK Power Wave HT). Los azúcares reductores liberados se calcularon por interpolación en una recta patrón de glucosa, tratada con DNS de la misma forma.

La actividad celulasa se calculó en FPU/mL que corresponde al equivalente de los μ moles de glucosa generados por minuto de reacción y por

mL de extracto enzimático. La fórmula usada fue la siguiente: $\frac{FPU}{mL} = \frac{7.4 \cdot EDR}{t}$, donde *EDR* (*enzyme dilution rate*) es la dilución de la enzima con la cual se genera el equivalente a 7.4 mM de glucosa a partir de 17 mg de papel y *t* es el tiempo de reacción en minutos. La EDR se calculó por interpolación en la recta obtenida al graficar las diferentes diluciones de la solución enzimática versus la concentración en mM de la glucosa liberada en cada reacción.

3.8.2.2 Caracterización de los azúcares liberados en la hidrólisis de papel

Usando el cóctel enzimático obtenido en la fermentación sólida, se hidrolizó papel y se cuantificó la glucosa y la celobiosa producidas. Diferentes concentraciones de papel (2.5 %, 5 % y 10 %) fueron incubadas con 500 μ L del cóctel enzimático a 50 °C por diferentes tiempos. Después del tiempo de reacción, las enzimas se inactivaron por calor a 95 °C durante 10 min. Los azúcares liberados se analizaron por HPLC según lo indicado en el apartado 3.9.

3.8.3 Ensayo de actividad α -glucosidasa

3.8.3.1 Actividad hidrolítica con α -pNPG como sustrato

La actividad hidrolítica α -glucosidasa fue medida tanto en células como en el medio de cultivo usando *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (α -pNPG) (Sigma) como sustrato.

El ensayo se realizó incubando a 37 °C 100 μ L de muestra (sobrenadante o células resuspendidas) con 150 μ L de α -pNPG 1.7 mM en tampón citrato fosfato pH 5.5. La reacción se paró con 500 μ L de Na₂CO₃ 1 M, y el *p*-nitrofenol liberado fue medido espectrofotométricamente a 400 nm.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para determinar la estabilidad de la actividad hidrolítica de la α -glucosidasa asociada a células, se usaron sedimentos celulares provenientes de 2 mL de un cultivo inducido. Las células fueron resuspendidas en 200 μ L de tampón citrato fosfato pH 5.5, incubadas a 50 °C durante 24 h y centrifugadas a 1500 *g* 1 min. La actividad enzimática residual se midió con 250 μ L de α -pNPG 1 mM, a 50 °C y pH 5.5. Después del tiempo de reacción las células fueron separadas del sobrenadante por centrifugación. La reacción se detuvo en el sobrenadante con 500 μ L de Na₂CO₃ 1 M y se midió la absorbancia a 400 nm para cuantificar la actividad tras el periodo de incubación. Por otro lado, las células fueron lavadas, resuspendidas en el mismo tampón (sin sustrato) e incubadas nuevamente en las mismas condiciones antes descritas. Este procedimiento se repitió durante varios ciclos sucesivos.

3.8.3.2 Actividad transglicosilante

La actividad transglicosilante de la α -glucosidasa en su versión silvestre (AglA) o modificada (AglA_Sed1B), fue medida en las células provenientes de 10 mL de un cultivo inducido. En el caso del transformante con la construcción AglA_Sed1B, anclada covalentemente a la membrana, las células se incubaron previamente a 50 °C en tampón citrato fosfato pH 5.5 durante 24 h para reducir su actividad metabólica. Para medir la actividad transglicosilante, las células (tratadas o no) se resuspendieron en 1 mL de sustrato en tampón citrato fosfato a pH 5.5 y se incubaron a 50 °C durante diferentes tiempos. A continuación, el sobrenadante resultante de separar las células por centrifugación a 15000 *g* 1 min se calentó a 95 °C 10 minutos para detener la reacción. Los azúcares generados fueron analizados por HPLC según lo indicado en el apartado 3.9. Como sustrato se usaron distintas disoluciones de maltosa, mezclas maltosa-

glucosa o mezclas maltosa con otros aceptores (kanamicina, estreptomycin, sorbitol, celobiosa, lactosa, galactosa, xilosa y fructosa).

3.9 Cuantificación de azúcares

El análisis y cuantificación de azúcares se realizó por cromatografía de intercambio aniónico, usando un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) equipado con una columna CarboPac PA100 y un detector amperométrico pulsado (DIONEX HPAEC-PAD, Thermo Fisher Scientific).

Las muestras de azúcares diluidas y filtradas se inyectaron en una columna PA100. Para la identificación de los azúcares se utilizaron patrones de glucosa, celobiosa, celotriosa, celotetraosa, maltosa, isomaltosa, panosa, isomaltotriosa y maltotriosa (Sigma). La cuantificación de los azúcares se realizó como función de las áreas de los picos respectivos, utilizando rectas patrón construidas al efecto.

3.10 Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)

El sobrenadante de cultivos de BY4741_pEMBLyex4 y BY4741_AglA inducidos con galactosa fue concentrado 65 veces por ultrafiltración a través de una membrana con un tamaño de poro de 30 kDa (Thermo Scientific). La muestra de proteína concentrada fue dividida en 2 alícuotas, una de ellas fue deglicosilada por incubación con Endo H (New England Biolabs) durante 16 h a 37 °C en presencia de un cóctel inhibidor de proteasas (Complete EDTA-free, Roche), y la otra fue incubada bajo las mismas condiciones, sin Endo H. Las muestras de proteína nativa y deglicosilada fueron sometidas a electroforesis en un gel de poliacrilamida. 100 µL de la solución de proteína se añadieron a 100 µL del tampón de carga 2X (Tris-HCl 0.125 M, SDS 4 %, glicerol 20 %, azul de

bromofenol 0.05 % y β -mercaptoetanol al 0.1 %) y se incubó a 95 °C 10 min. Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10 % y se sometieron a 70 V durante 2 a 3 h en un aparato omniPAGE Mini (Cleaver Scientific). El gel se tiñó con plata según un protocolo basado en lo descrito por Merril et al. (1981).

3.11 Análisis bioinformático

3.11.1 Modelización y análisis estructural de proteínas

Para la modelización estructural de HgBgl, SfBgl y AgIA, se utilizó el servidor I-TASSER (Yang et al. 2015b; Roy et al. 2010; Zhang 2008). Los modelos estructurales fueron analizados con el programa PyMOL (Schrödinger, LLC).

El modelo de AgIA fue ajustado para superponer la orientación de los residuos catalíticos putativos (D490 y D660, nucleófilo y ácido/base, respectivamente) con los correspondientes residuos de la α -glucosidasa de *Beta vulgaris* (PDB: 3WEO). El análisis de acoplamiento *docking* entre glucosa, panosa e isomaltosa, y el modelo ajustado de AgIA, se realizó con el programa Maestro 11 (Schrödinger, LLC), tomando como referencia la interacción de la α -glucosidasa de *Beta vulgaris* con acarbosa (Tagami et al. 2015; Tagami et al. 2013).

Para el análisis de los potenciales sitios de N- y O-glicosilación de AgIA se utilizaron los servidores NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) y NetOGlyc 4.0 (Steentoft et al. 2013), respectivamente.

3.11.2 Análisis filogenético

Las secuencias de aminoácidos correspondientes a distintas proteínas transportadoras de azúcares se alinearon con el método ClustalW. Se utilizó el software MEGA6 (Tamura et al. 2013), con el algoritmo Neighbor Joining, matriz JTT y un valor bootstrap de 100 réplicas, para obtener un árbol filogenético. La figura final fue generada con el software FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

4 CAPÍTULO I: Sinergias en la sacarificación y fermentación simultánea de celulosa

4.1 Resultados

4.1.1 Producción de enzimas celulolíticas de *Trichoderma reesei*

Se probaron dos sistemas de producción de enzimas de *T. reesei* ATCC 56764, utilizando papel como sustrato: fermentación en medio líquido y fermentación en medio sólido. En la [Figura 4.1A](#) se observa que la actividad celulolítica del cóctel obtenido por fermentación sólida, es aproximadamente 10 veces mayor que la correspondiente a la fermentación líquida. Independientemente de las consideraciones genéticas y fisiológicas acerca de las diferencias entre los dos tipos de fermentación (Barrios-González 2012), en el sistema sólido la recuperación de las enzimas es más fácil, lo que supone una ventaja considerable para su posterior utilización. En los cócteles enzimáticos también se determinó la actividad β -glucosidasa. El perfil de producción fue similar al de la actividad celulasa ([Figura 4.1B](#)). En el cultivo líquido la actividad β -glucosidasa mostró un ligero incremento desde la inoculación hasta el día 10 y luego decreció. En el cultivo sólido la actividad continuó aumentando durante

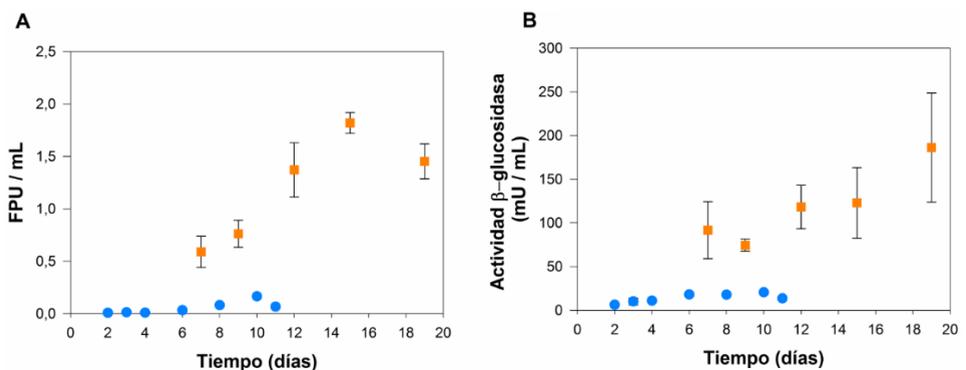


Figura 4.1 Producción de celulasas por *T. reesei* por fermentación líquida (círculos azules) o sólida (cuadrados naranjas). **(A)** Actividad celulasa. **(B)** Actividad β -glucosidasa. Las barras de error indican la desviación estándar de duplicados.

al menos 14 – 16 días. En base a estos resultados se escogió el cóctel enzimático producido en la fermentación en medio sólido para los siguientes ensayos.

4.1.2 Hidrólisis de papel usando el complejo celulolítico de *T. reesei*

La hidrólisis de papel de filtro a una concentración de 5 %, con el cóctel enzimático de *T. reesei* (2 FPU/mL), después de 8 h de incubación a 50 °C, dio lugar a glucosa y celobiosa como únicos productos detectables en cantidad significativa (Figura 4.2). La presencia de celobiosa, aunque en menor cantidad que la glucosa, confirma resultados previos de los que se deducía que la β -glucosidasa es la actividad limitante en los extractos enzimáticos de *T. reesei* (Lehmann et al. 2016; Nieves et al. 1998).

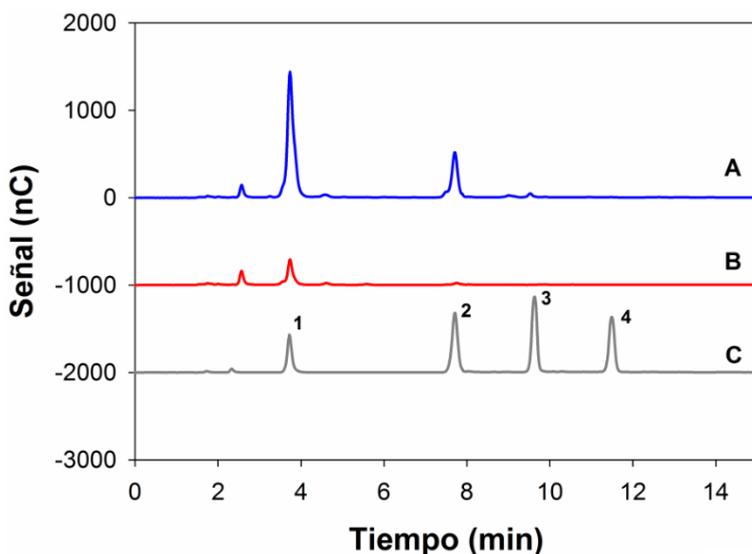


Figura 4.2 Análisis del perfil de azúcares solubles. **(A)** Azúcares liberados por acción del cóctel enzimático (2 FPU/mL) a partir de 5 % de papel de filtro y después de 8 h de incubación a 50 °C. **(B)** Azúcares presentes en el cóctel enzimático de *T. reesei* obtenido por fermentación sólida, antes de la incubación con papel. **(C)** Patrones de azúcares comerciales usados como control: (1) glucosa, (2) celobiosa, (3) celotriosa, (4) celotetraosa.

La cinética de producción de glucosa y celobiosa a partir de tres concentraciones diferentes de papel de filtro (2.5, 5 y 10 %) fue seguida durante 48 h (Figura 4.3). En todos los casos, la concentración de glucosa aumentó continuamente de forma proporcional a la concentración inicial de celulosa. En contraste, la concentración de celobiosa rápidamente alcanzó un valor máximo, proporcional a la cantidad inicial de celulosa. Este valor máximo se mantuvo por algún tiempo, probablemente como resultado de un equilibrio en el cual la velocidad de liberación de celobiosa por parte de las celobiohidrolasas sería equivalente a la velocidad de hidrólisis de celobiosa por parte de las β -glucosidasas. En el punto máximo, la concentración de celobiosa representó una fracción baja pero significativa (alrededor del 10 %) de la concentración inicial de celulosa. Considerando que la celobiosa es un potente inhibidor de las celobiohidrolasas, su presencia puede inhibir significativamente la hidrólisis de celulosa. De hecho, de acuerdo con nuestros datos, la digestión de 5 % de papel

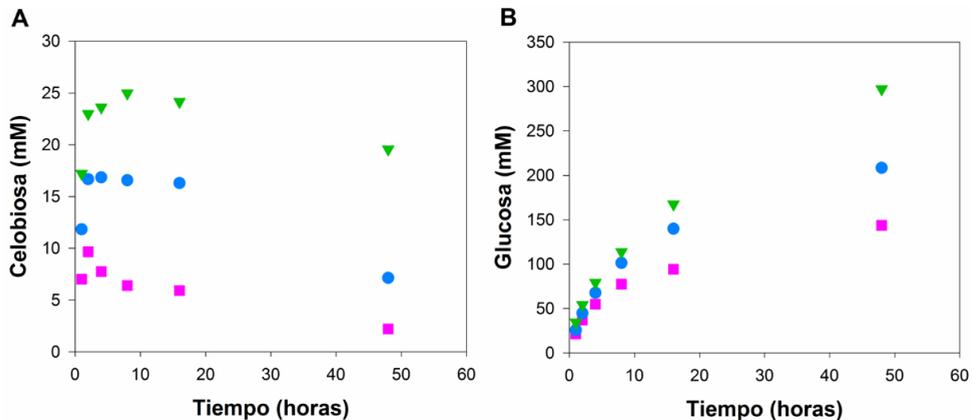


Figura 4.3 Cinética de producción de azúcares solubles a partir de la digestión de celulosa con el cóctel enzimático de *T. reesei*. Papel de filtro a diferentes concentraciones (2.5 % cuadrados rosas; 5 % círculos azules; 10 % triángulos verdes) fue incubado con el cóctel enzimático (2 FPU/mL) a 50 °C durante diferentes tiempos. **(A)** Producción de celobiosa, **(B)** producción de glucosa.

genera un máximo de más de 15 mM de celobiosa después de 20 h, valor que está muy por encima de la concentración de celobiosa que reduce la actividad enzimática al 50 % (IC_{50}) de la celobiohidrolasa Cel7A de *T. reesei* (0.4 – 0.7 mM) (Teugjas & Väljamäe 2013a). Solo después de tiempos prolongados de incubación, la celobiosa se aproxima a su hidrólisis completa.

4.1.3 Comparación de la actividad β -glucosidasa del cóctel enzimático de *T. reesei* y la producida por *S. cerevisiae* T500

Se compararon las propiedades de la actividad β -glucosidasa presente en el cóctel enzimático de *T. reesei* y la secretada por la cepa de levadura recombinante T500 que expresa la enzima SfBgl de *Sacharomycopsis fibuligera*. Se analizaron dos parámetros: la actividad de las enzimas a diferentes concentraciones de celobiosa y su inhibición por glucosa. Con concentraciones de celobiosa en el rango de 5 – 400 mM, a pH 5.5 ambas enzimas tuvieron un comportamiento similar (Figura 4.4). Aunque el genoma de *T. reesei* tiene 10

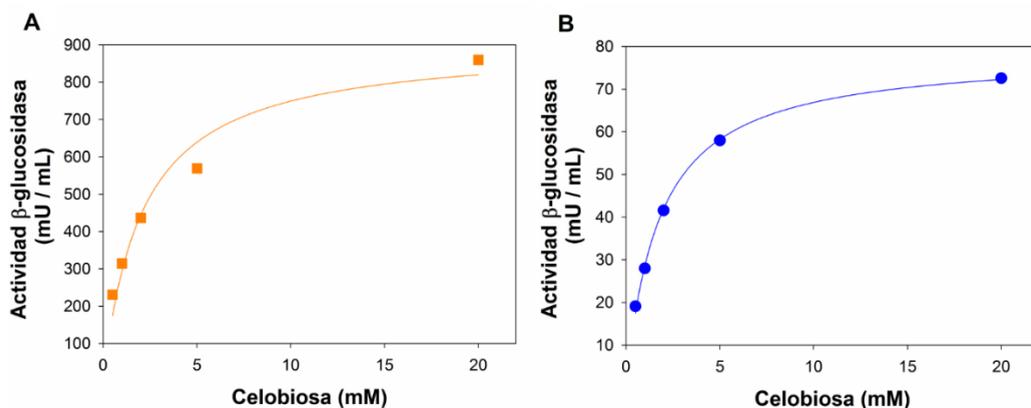


Figura 4.4 Actividad β -glucosidasa con celobiosa como sustrato a diferentes concentraciones, en muestras dializadas a 37 °C, pH 5.5. (A) Córctel celulolítico de *T. reesei*. (B) Sobrenadante del medio de cultivo de T500.

genes que codifican β -glucosidasas, solo una de ellas, denominada Bgl I o Cel 3A, es liberada al medio de cultivo (Guo et al. 2016a; Karkehabadi et al. 2014). Por tanto, la actividad β -glucosidasa medida en el cóctel de *T. reesei* corresponde a esta enzima, para la cual se determinó una K_m para celobiosa de 2.1 ± 0.5 mM, que no difiere significativamente del valor de 1.9 mM descrito en la literatura (Woodward & Arnold 1981). La K_m determinada para la enzima secretada por T500 (SfBgl) fue ligeramente más baja (1.74 ± 0.08 mM).

Los resultados presentados en la [Figura 4.5](#) muestran el efecto inhibitorio de la glucosa sobre la actividad β -glucosidasa, utilizando β -pNPG como sustrato. La β -glucosidasa producida por T500 (SfBgl) es significativamente menos sensible a la inhibición por glucosa que la β -glucosidasa de *T. reesei* a concentraciones entre 5 – 75 mM. Este rango

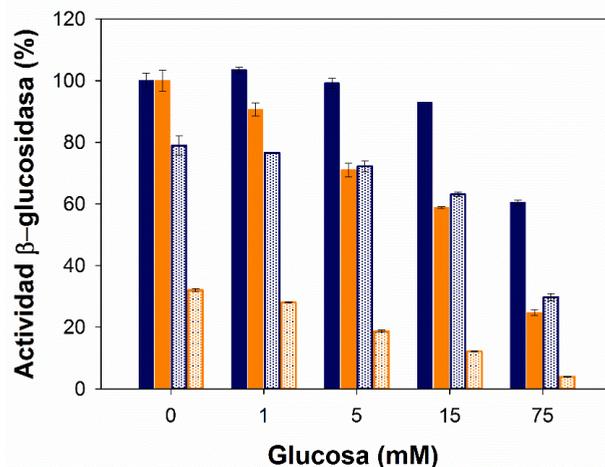


Figura 4.5 Inhibición por glucosa de la actividad β -glucosidasa, medida en muestras dializadas de sobrenadante de medio de cultivo de T500 (azul) y en el cóctel enzimático de *T. reesei* (naranja) a 37 °C, usando β -pNPG como sustrato a pH 5.5 (barras sólidas) o a pH 7.0 (barras punteadas), en concentraciones crecientes de glucosa. El valor de actividad sin glucosa añadida a pH 5.5 fue considerado como 100 %. Las barras de error representan la desviación estándar de triplicados.

corresponde aproximadamente a la misma cantidad de glucosa que se acumula durante la fermentación de papel (ver apartado siguiente). El efecto inhibitorio de la glucosa usando celobiosa como sustrato puede ser ensayado de forma fiable solo a bajas concentraciones de glucosa, puesto que, a altas concentraciones la cantidad de glucosa producto de la hidrólisis de celobiosa no podría ser discriminada de la glucosa añadida como inhibidor. A 1 mM de glucosa, el efecto inhibitorio en la hidrólisis de 20 mM de celobiosa a 37 °C pH 5.5, fue de alrededor del 25 % para ambas enzimas.

4.1.4 Sacarificación y fermentación simultánea de celulosa

La fermentación de celulosa se llevo a cabo utilizando como sustrato papel de filtro que fue digerido con el cóctel celulolítico de *T. reesei*. Se ensayaron dos cepas de levadura, la cepa recombinante T500, secretora de la enzima SfBgl, y su parental, no transformada, BY4741. Debido a que la carga inicial de papel (5 %) era consumida en poco tiempo, se realizaron cargas adicionales de papel como se indica en la [Figura 4.6](#). En la fermentación con la cepa parental, después de aproximadamente 24 h de cada carga, se observó una acumulación transitoria de celobiosa de alrededor de 5 mM, mientras que con la cepa T500 la hidrólisis de celobiosa fue más eficiente y la degradación de papel fue más rápida. Como consecuencia, el rendimiento de etanol con la cepa T500 fue significativamente más alto (35 %) que el obtenido con la cepa parental. Estos resultados indican, en concordancia con nuestras observaciones previas, que incluso la acumulación de pequeñas cantidades de celobiosa llega a ser limitante tanto para el progreso de la celulolisis como para la producción de etanol. Los rendimientos globales de la fermentación en términos de conversión de papel a etanol fueron de 61 % y 45 % para T500 y la cepa parental,

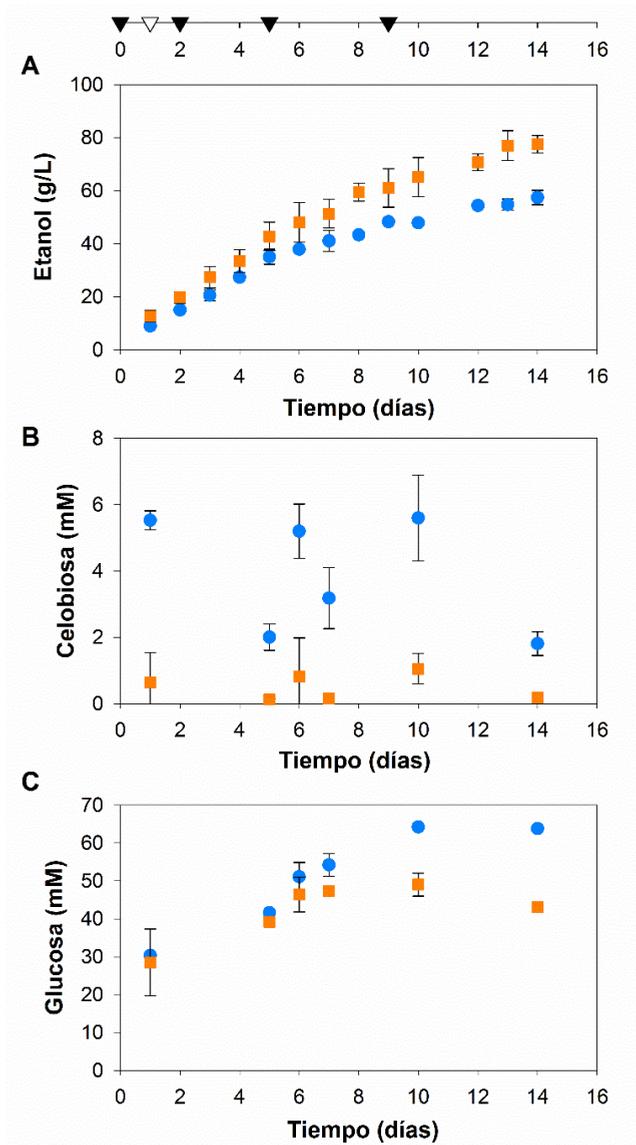


Figura 4.6 Fermentación de papel filtro por *S. cerevisiae* T500, que expresa el gen de la β -glucosidasa de *S. fibuligera* (cuadrados naranjas), y por la cepa parental BY4741 (círculos azules), acoplada a la hidrólisis de celulosa por enzimas de *T. reesei*. La producción de **(A)** etanol, **(B)** celobiososa y **(C)** glucosa fue medida durante la fermentación. Las barras de error indican la desviación estándar de duplicados. Las sucesivas adiciones de papel de filtro a los recipientes de fermentación (0.5 g, triángulos llenos; 0.25 g, triángulos vacíos) se realizaron en los tiempos indicados en la barra superior de la figura.

respectivamente. El diseño experimental usado, acoplando la maquinaria celulolítica de *T. reesei* con la fermentación por parte de una levadura que expresa la SfBgl, produjo concentraciones de etanol considerablemente más altas (7 %) que otras descritas en la literatura, en las que se utilizaban levaduras que expresan una o varias enzimas celulolíticas (Liu et al. 2016; Kojima et al. 2013; Matano et al. 2012; Yamada et al. 2011; Wen et al. 2010; Jeon et al. 2009; Tsai et al. 2009; Kotaka et al. 2008; Fujita et al. 2004; Fujita et al. 2002).

4.2 Discusión

El proceso para la conversión de celulosa en etanol propuesto en este estudio es una alternativa simple y económica. La producción *in situ* de enzimas celulolíticas tiene ventajas obvias sobre la adición de enzimas comerciales. Incluso en el caso aquí descrito, utilizando una cepa de *T. reesei* no manipulada genéticamente, la actividad celulolítica del complejo enzimático obtenido fue suficiente para alcanzar rendimientos de etanol de alrededor del 7 %, valor considerablemente más alto que el mínimo requerido (4.5 – 5 %) para que la destilación sea viable (Lennartsson et al. 2014; Viikari et al. 2012). Como primer objetivo, estudiamos las condiciones para la producción *in situ* de un complejo celulolítico suficientemente activo, que facilitase la fermentación y la producción de etanol con valores superiores al 5 %. Varios estudios han demostrado que el cultivo de hongos en condiciones de fermentación sólida, favorece la producción y el rendimiento de enzimas y otros metabolitos en comparación con la fermentación líquida (Barrios-González 2012). En este trabajo se compararon los rendimientos de enzimas celulolíticas de *T. reesei* CECT 2415 en condiciones de fermentación sólida y líquida. Con la fermentación sólida se obtuvo un cóctel enzimático más concentrado y por tanto, más adecuado para una eficiente digestión de la celulosa.

En el genoma de *T. reesei* se han identificado 10 genes que codifican β -glucosidasas, 2 de ellas pertenecen a la familia GH1 y las restantes a la familia GH3, pero solo una enzima denominada BGL1 (Cel3A), es liberada al medio de cultivo y sería parte del cóctel celulolítico (Guo et al. 2016a). Varios estudios indican que la acción de esta única β -glucosidasa es un cuello de botella en el proceso de obtención de etanol a partir de celulosa (Lehmann et al. 2016; Sørensen et al. 2013; Nieves et al. 1998), por lo que se recurre a la suplementación del cóctel enzimático de *T. reesei* con β -glucosidasas exógenas que mejoran la actividad celulolítica (Del Pozo et al. 2012). La adición de β -glucosidasas es necesaria para consumir la celobiosa, que es un potente inhibidor de las celobiohidrolasas, con una K_i de 1.5 mM (Gruno et al. 2004). Como se ha indicado anteriormente, durante la hidrólisis de papel a concentración del 5 %, por acción del cóctel enzimático de *T. reesei*, se acumula alrededor de 15 mM de celobiosa, por lo que se esperaba que un incremento en la cantidad de β -glucosidasa disminuyese la celobiosa del medio y mejorase la digestión de la celulosa. Otro factor a tener en cuenta es la inhibición por glucosa de la β -glucosidasa, considerando que este azúcar se acumula durante la celulolisis hasta una concentración de 70 mM (Figura 4.3). Diferentes estudios han abordado este problema buscando variantes naturales de β -glucosidasas menos sensibles a la inhibición por glucosa (Teugjas & Väljamäe 2013b), modificando genéticamente una de las β -glucosidasas de *T. reesei* (Guo et al. 2016b), o realizando evolución dirigida de una β -glucosidasa de *Aspergillus niger* expresada en *S. cerevisiae* (Larue et al. 2016).

En este trabajo, como fuente de β -glucosidasa suplementaria para la celulolisis, se utilizó la β -glucosidasa codificada por el gen *BGL1* de *S. fibuligera* (SfBgl), producida por *S. cerevisiae* durante el proceso fermentativo. Esta enzima

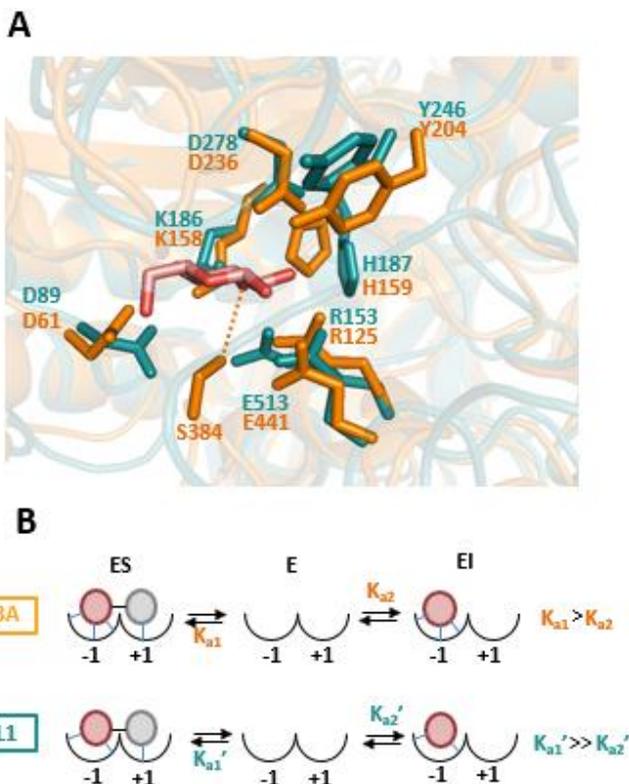


Figura 4.7 Análisis comparativo de los centros activos de las β -glucosidasas Cel 3A de *T. reesei* y BGL1 de *S. fibuligera*. **(A)** La estructura cristalográfica de Cel 3A (naranja) formando complejo con una molécula de glucosa (rojo), se presenta superpuesta con un modelo estructural de BGL1 (azul). Se muestran los residuos que podrían formar puentes de hidrógeno con la glucosa. Estos residuos están conservados en las dos enzimas, excepto el S384 de Cel 3A, que formaría un contacto adicional en el sitio -1 de la enzima. **(B)** Representación esquemática de los sitios activos de las β -glucosidasas de *T. reesei* y *S. fibuligera*, con los sitios -1 (unido a la glucosa por el extremo no reductor del β -glucósido) y +1 (unido al residuo conectado al extremo no reductor). El sitio activo de la enzima (E) puede acomodar las moléculas de sustrato β -pNPG o celobiosa, para formar el complejo enzima-sustrato (ES). Los círculos rojos representan una molécula de glucosa en el extremo no reductor, y los círculos grises el residuo adyacente. El número de contactos en el subsitio -1 es mayor que en el subsitio +1. Por tanto, es de esperar que la unión de la glucosa como inhibidor de la reacción (complejo EI) ocurra en el sitio -1. En ambas enzimas la constante de asociación para el complejo ES (K_{a1} o K_{a1}') sería más alta que para el complejo EI (K_{a2} o K_{a2}'). Sin embargo, el hecho de que en Cel 3A se forme un puente de hidrógeno adicional en el sitio -1, implicaría un valor menor para la relación entre ambas constantes (K_{a1}/K_{a2}) respecto al de BGL1 (K_{a1}'/K_{a2}'). La estructura cristalográfica de *T. reesei* Cel 3A (PDB 3ZYZ) fue descrita por Karkehabadi et al. (2014) y el modelo de *S. fibuligera* BGL1 por Marín-Navarro et al. (2011).

es expresada y secretada bajo el control de un promotor constitutivo y el péptido señal *STA1* (Marín-Navarro et al. 2011). Como fue demostrado previamente, SfBgl confiere a *S. cerevisiae* la capacidad de utilizar celobiosa eficientemente (Gurgu et al. 2011). En la [Figura 4.5](#) se muestra que usando β -pNPG como sustrato, la SfBgl es significativamente más resistente a la inhibición por glucosa que la β -glucosidasa Cel 3A suministrada por el cóctel enzimático de *Trichoderma*. Aunque con este resultado no se puede asegurar que las enzimas tendrían el mismo comportamiento con celobiosa como sustrato, el análisis comparativo de las estructuras tridimensionales de *T. reesei* Cel 3A y *S. fibuligera* BGL1 ([Figura 4.7](#)), sugiere que la afinidad relativa de la glucosa por su sitio de unión sería mayor para Cel 3A, lo cual haría a esta enzima más sensible a la inhibición por glucosa que BGL1. En el proceso de sacarificación y fermentación simultánea propuesto en este estudio, el efecto inhibitorio causado por las elevadas concentraciones de glucosa alcanzadas durante la fermentación es contrarrestado por la producción continua de β -glucosidasa suplementaria, y por un consumo muy activo de glucosa por parte de la levadura. En términos generales y en comparación con la adición de enzimas comerciales, el suministro de actividad celobiasa por parte de la levadura fermentadora es una solución más económica y sencilla para mejorar la acción del cóctel celulolítico de *T. reesei*.

5 CAPÍTULO II: Fermentación de celobiosa por *S. cerevisiae*: análisis comparativo de hidrólisis intra y extracelular del azúcar

5.1 Resultados

5.1.1 Caracterización de β -glucosidasas intracelulares

Como estudio preliminar, se realizó un análisis comparativo *in vitro* e *in vivo* de las propiedades de tres β -glucosidasas diferentes (NcBgl, HgBgl y PpBglA). La secuencia codificante de cada una de estas enzimas fue introducida en *S. cerevisiae* por transformación, y las cepas resultantes fueron posteriormente retransformadas con un gen que codifica la proteína transportadora de celobiosa Po_CdtC (Li et al. 2013b). La expresión de actividad β -glucosidasa fue medida usando β -pNPG como sustrato, en extractos clarificados de cepas portadoras y no portadoras del gen que codifica el transportador Po_CdtC. La co-expresión del transportador no tuvo un gran impacto en la acumulación de la β -glucosidasa intracelular (Figura 5.1A). Los transformantes con HgBgl mostraron la actividad más alta con β -pNPG, mientras que NcBgl y PpBglA tuvieron valores más bajos (45 – 90 %). Las propiedades catalíticas de las tres β -glucosidasas fueron comparadas *in vitro*, usando como sustrato celobiosa a diferentes concentraciones (Figura 5.1B). Las enzimas mostraron diferentes valores de K_m . NcBgl mostró la afinidad más alta por celobiosa ($K_m = 0.163 \pm 0.013$ mM), mientras que para PpBglA (42 ± 8 mM) y HgBgl (135 ± 7 mM) los valores de K_m fueron notablemente más altos. Las velocidades máximas de hidrólisis de celobiosa alcanzadas por las tres β -glucosidasas también fueron diferentes. PpBglA y NcBgl mostraron valores de V_{max} significativamente más altos (35 ± 2 mU/mL y 27.9 ± 0.2 mU/mL, respectivamente) que HgBgl (15.2 ± 0.4 mU/mL).

Para comparar las cinéticas de crecimiento de los dobles transformantes de levadura, portadores de los genes de una β -glucosidasa y de la permeasa Po_CdtC, se inoculó con la cepa respectiva un medio con celobiosa 2 % (60 mM)

como fuente de carbono (Figura 5.2). Además, se inoculó una cepa con Po_CdtC, sin β -glucosidasa, en las mismas condiciones (control negativo), o en un medio con glucosa 2 % (control positivo). Las cepas con NcBgl o con PpBglA crecieron más rápido que la cepa con HgBgl, pero mucho más lento que el control positivo. Este resultado sugiere que una pobre actividad celobiasa, como la de HgBgl (Figura 5.1B) puede limitar el crecimiento con celobiosa (Figura 5.2). Sin embargo, por encima de cierta actividad, como la que presenta PpBglA (Figura 5.1B), un aumento de la competencia catalítica de la β -glucosidasa no implica necesariamente un mejor crecimiento (Figura 5.2). Por tanto, deben ser otros los factores que representen cuellos de botella para la conversión de celobiosa a glucosa. La eficiencia en el transporte del sustrato desde el exterior

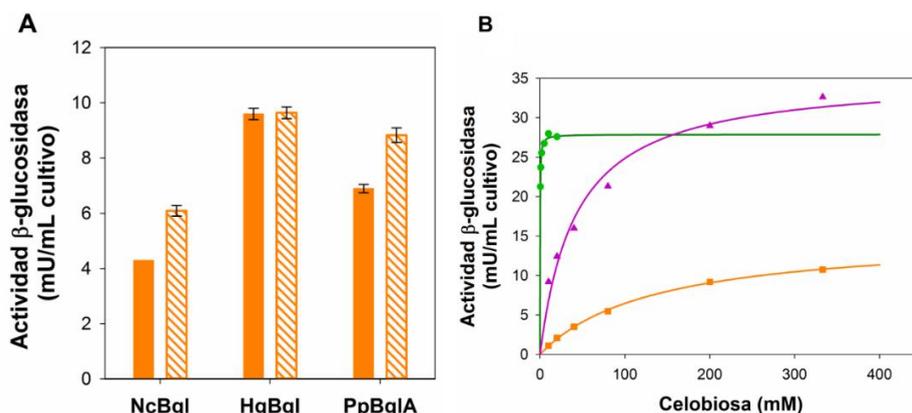


Figura 5.1 Actividad β -glucosidasa de levaduras transformantes simples (expresan NcBgl, HgBgl o PpBglA) o dobles (co-expresan una β -glucosidasa y la permeasa Po_CdtC). Las cepas fueron cultivadas en medio sintético mínimo de selección y en el caso de los transformantes dobles se añadió además galactosa al 0.1 %, como inductor del gen de la permeasa. La actividad β -glucosidasa se midió en el extracto celular clarificado a 37 °C, pH 7.0. **(A)** Actividad con β -pNPG, 5mM, como sustrato, de transformantes simples (barras llenas) o dobles (barras rayadas). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de triplicados. **(B)** Actividad con celobiosa a diferentes concentraciones como sustrato, de transformantes simples (NcBgl, círculos verdes; HgBgl, cuadrados naranjas; PpBglA triángulos morados). Las líneas sólidas corresponden al ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten.

hacia el interior celular, mediante el transportador heterólogo de celobiosa, es probablemente uno de los factores limitantes. Para explorar la eficacia de transportadores alternativos, se evaluó la capacidad de diferentes transportadores de azúcares de *T. reesei* para permitir el crecimiento de *S. cerevisiae* en un medio con 2 % de celobiosa. Para estos estudios se seleccionó la β -glucosidasa de NcBgl por tener la actividad más alta a concentraciones de celobiosa iguales o inferiores a 60 mM.

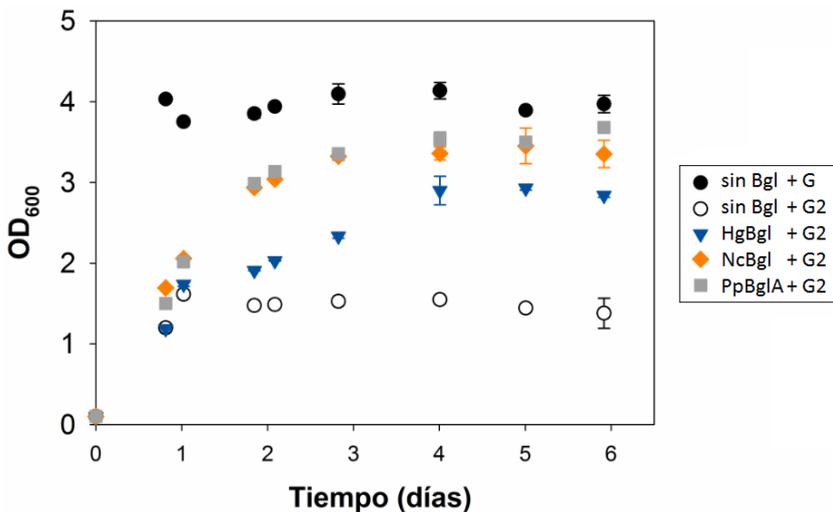


Figura 5.2 Crecimiento en medio con celobiosa al 2 % (SCC + G418 + galactosa al 0.1 %) de los dobles transformantes de levadura que expresan el gen de Po_CdtC y distintas β -glucosidasas. En círculos vacíos se muestra el crecimiento de una cepa con Po_CdtC sin β -glucosidasa en el mismo medio (control negativo), y en círculos llenos la misma cepa, pero en un medio con glucosa al 2 % (SCD + G418 + galactosa al 0.1 %) (control positivo). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de duplicados.

5.1.2 Caracterización de proteínas transportadoras de azúcares

Como primer paso, se realizó un análisis de las 107 secuencias proteicas codificadas en el genoma de *T. reesei* (Nordberg et al. 2014), buscando aquellas que tuviesen un alto grado de identidad con permeasas previamente descritas

CAPÍTULO II

como transportadores de celobiosa (Tabla 1.7) y se seleccionaron 10 posibles transportadores de azúcares. Estas proteínas se denominaron en este estudio Tr_StrA – Tr_StrJ. Se realizó un análisis filogenético con estas secuencias de *T. reesei* (Figura 5.3), incluyendo también las de transportadores funcionalmente caracterizados (Tabla 1.7), tres homólogos estructurales cercanos a transportadores de celobiosa y un transportador de glucosa utilizado como *outgroup*. En la Tabla 5.1 se recogen los códigos GeneBank de todas ellas.

Tabla 5.1 Secuencias proteicas correspondientes a transportadores de azúcares, caracterizados o putativos, utilizadas en el análisis filogenético

ORGANISMO	NOTACIÓN	ID PROTEÍNA	LOCUS TAG
<i>Neurospora crassa</i>	CDT1	XP_963801.1	NCU00801
	CDT2	XP_963873.1	NCU08114
<i>Trichoderma reesei</i>	Tr_StrA	EGR49861.1	Trire2_3405
	Tr_StrB	XP_006962589.1	Trire2_56684
	Tr_StrC	ETS01940.1	Trire2_67752*
	Tr_StrD	EGR48924.1	Trire2_77517
	Tr_StrE	EGR49690.1	Trire2_46819
	Tr_StrF	EGR46982.1	Trire2_4774
	Tr_StrG	EGR44689.1	Trire2_69901
	Tr_StrH	EGR46329.1	Trire2_22912
	Tr_StrI	XP_006964877.1	Trire2_47710
	Tr_StrJ	EGR47382.1	Trire2_63966
<i>Penicillium oxalicum</i>	Po_CdtB	EPS32297.1	PDE_07257
	Po_CdtC	EPS25673.1	PDE_00607
	Po_CdtD	EPS25817.1	PDE_00753
	Po_CdtE	EPS33073.1	PDE_08035

ORGANISMO	NOTACIÓN	ID PROTEÍNA	LOCUS TAG
	Po_CdtF	EPS27166.1	PDE_02109
	Po_CdtG	EPS34431.1	PDE_09395
	Po_CdtH	EPS27955.1	PDE_02900
	Po_CdtJ	EPS34570.1	PDE_09534
	Po_CdtK	EPS29907.1	PDE_04857
<i>Kluyveromyces lactis</i>	LAC12	CAA30053.1	-
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Pc_ST	XP_002559288.1	Pc13g08630
<i>Thielavia terrestris</i>	Tt_ST	XP_003656976.1	THITE_2122280
<i>Aspergillus nidulans</i>	An_CIA	XP_660418.1	AN2814.2
<i>Staphylococcus epidermis</i>	Se_4LDS	WP_083320016.1	-
<i>Escherichia coli</i>	Ec_4GBY	WP_089616118.1	-
<i>Homo sapiens</i>	Hs_5EQG	BAD92224.1	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sc_HXT	NP_011962.1	YHR094C

* La secuencia ensamblada por el Joint Genome Institute como parte del proyecto de secuenciación del genoma completo (ID 3435777) corresponde a EGR45703.1 y difiere de la utilizada en el presente trabajo (ETS01940.1). En la primera, se predice el splicing de un intrón entre las posiciones 479756 (5') y 479853 (3') del DNA genómico, pero las evidencias experimentales actuales muestran que el splicing en el sitio 3' ocurre en la posición 479820 y no en 479853 (es decir, el intrón real es algo más corto que el predicho teóricamente).

En la [Figura 5.3](#) se muestra que las secuencias Tr_StrA a Tr_StrC, se agrupan en la misma rama del árbol filogenético (marcado en azul) que varios transportadores de celobiosa, entre los que están CDT1 de *N. crassa* y Po_CdtC de *P. oxalicum*. En una rama distinta (marcada en naranja) se agrupan las permeasas Tr_StrD a Tr_StrF junto al CDT2 de *N. crassa* y al Po_CdtD de *P. oxalicum*, los cuales pueden transportar celobiosa pero con menor eficiencia que sus homólogos CDT1 y Po_CdtC (Galazka et al. 2010; Li et al. 2013b). Tr_StrG a Tr_StrJ se localizaron en diferentes nodos del árbol filogenético.

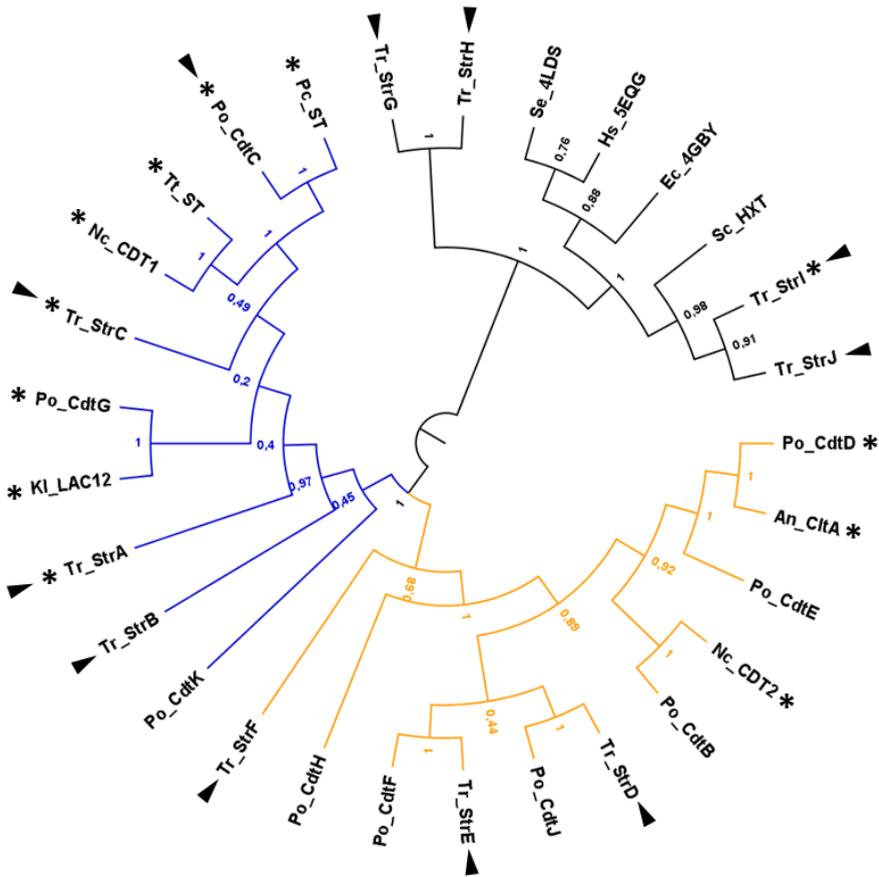


Figura 5.3 Análisis filogenético de transportadores de azúcares de diferentes organismos: Nc (*N. crassa*), Po (*P. oxalicum*), Tr (*T. reesei*), Tt (*T. terrestris*), Kl (*K. lactis*), Pc (*P. chrysogenum*), Sc (*S. cerevisiae*), Se (*S. epidermidis*), Hs (*H. sapiens*), Ec (*E. coli*). Los transportadores identificados con los códigos PDB: Se_4LDS del *symporter* H⁺/glucosa; Hs_5EQG transportador GLUT1; y Ec_4GBY del *symporter* H⁺/xilosa, son los homólogos estructurales más cercanos a los transportadores de celobiosa. El transportador de glucosa Sc_HXT fue incluido como “outgroup”. Las proteínas marcadas con un asterisco han sido descritas como transportadoras de celobiosa, y aquellas marcadas con una flecha fueron seleccionadas para este estudio. Las ramas azules y naranjas indican los agrupamientos con CDT1 y CDT2, respectivamente.

Se construyeron cepas dobles transformantes de *S. cerevisiae* con capacidad potencial de hidrolizar celobiosa intracelularmente, por expresión de la enzima NcBgl, y cada uno de los presuntos transportadores de *T. reesei* a

estudiar. Solo la cepa con Tr_StrC mostró crecimiento en un medio con celobiosa como única fuente de carbono, hasta densidades celulares superiores a las del control negativo sin permeasa (Figura 5.4), aunque su tasa de crecimiento fue algo menor que la alcanzada por el transformante que expresaba Po_CdtC. Las otras cepas dieron un resultado equivalente al del control negativo. En base a estos resultados, se seleccionaron los dobles transformantes NcBgl/Po_CdtC y NcBgl/Tr_StrC para analizar su capacidad de fermentar celobiosa.

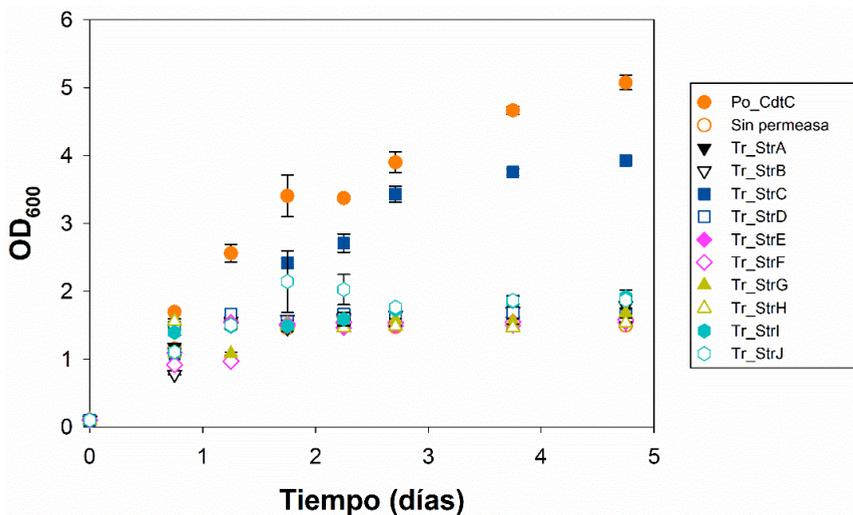


Figura 5.4 Crecimiento en medio con celobiosa al 2 % (SCC + G418 + galactosa al 0.1 %) de los dobles transformantes de levadura que expresan el gen de la NcBgl y diferentes genes de permeasas (excepto la cepa control negativo que carece de permeasa). En el recuadro lateral de la figura se muestran los códigos de colores de las cepas de acuerdo con la permeasa que expresan. Las barras de error indican la desviación estándar de duplicados.

5.1.3 Fermentación de celobiosa: análisis comparativo de hidrólisis intra y extracelular

Se compararon dos estrategias diferentes para convertir la celobiosa en etanol usando diferentes cepas de *S. cerevisiae* manipuladas genéticamente. La

CAPÍTULO II

hidrólisis extracelular de la celobiosa se realizó con la cepa transformante T500 que expresa el gen de la β -glucosidasa de *Saccharomycopsis fibuligera* (SfBgl) fusionado a un péptido señal de *S. cerevisiae* (Gurgu et al. 2011; Marín-Navarro et al. 2011). Dicha cepa secreta la β -glucosidasa al medio de cultivo, pero alrededor de un 70 % de la enzima permanece unida a la superficie celular (Gurgu et al. 2011). La hidrólisis intracelular de la celobiosa se realizó con las cepas previamente seleccionadas en este trabajo que expresan la β -glucosidasa intracelular de *N. crassa* y una permeasa de celobiosa (NcBgl/Po_CdtC o NcBgl/Tr_StrC).

Las tres cepas a caracterizar y una cuarta, utilizada como control negativo, carente de β -glucosidasa y permeasa, fueron inicialmente inoculadas en un medio mínimo de selección, con glucosa, y cultivadas hasta fase estacionaria. En esta etapa, se recogieron las células y se utilizaron para determinar la actividad celobiasa *in vitro* o para analizar la capacidad fermentativa de celobiosa de cada cepa. La actividad celobiasa *in vitro* fue determinada en extractos de células rotas con el objetivo de comparar el aporte inicial de β -glucosidasa a la fermentación. Bajo estas condiciones, la actividad celobiasa de las tres cepas estuvo en el mismo orden de magnitud (Figura 5.5A). Sin embargo, cuando las células fueron inoculadas en un medio con celobiosa como fuente de carbono, las tasas de consumo de este disacárido fueron muy diferentes (Figura 5.5B). La cepa con la β -glucosidasa extracelular hidrolizó alrededor del 80 % de la celobiosa inicial, después de 2 días de fermentación, mientras que en las cepas con la β -glucosidasa intracelular, este consumo no se alcanzó hasta pasados 24 días. La tasa de producción de etanol también fue más rápida en la cepa con SfBgl (Figura 5.5C), con un rendimiento final cercano al máximo teórico (10 g/L). En contraste, las cepas con la β -glucosidasa intracelular alcanzaron 6.6 g/L de etanol después de 45 días de fermentación. Paralelamente

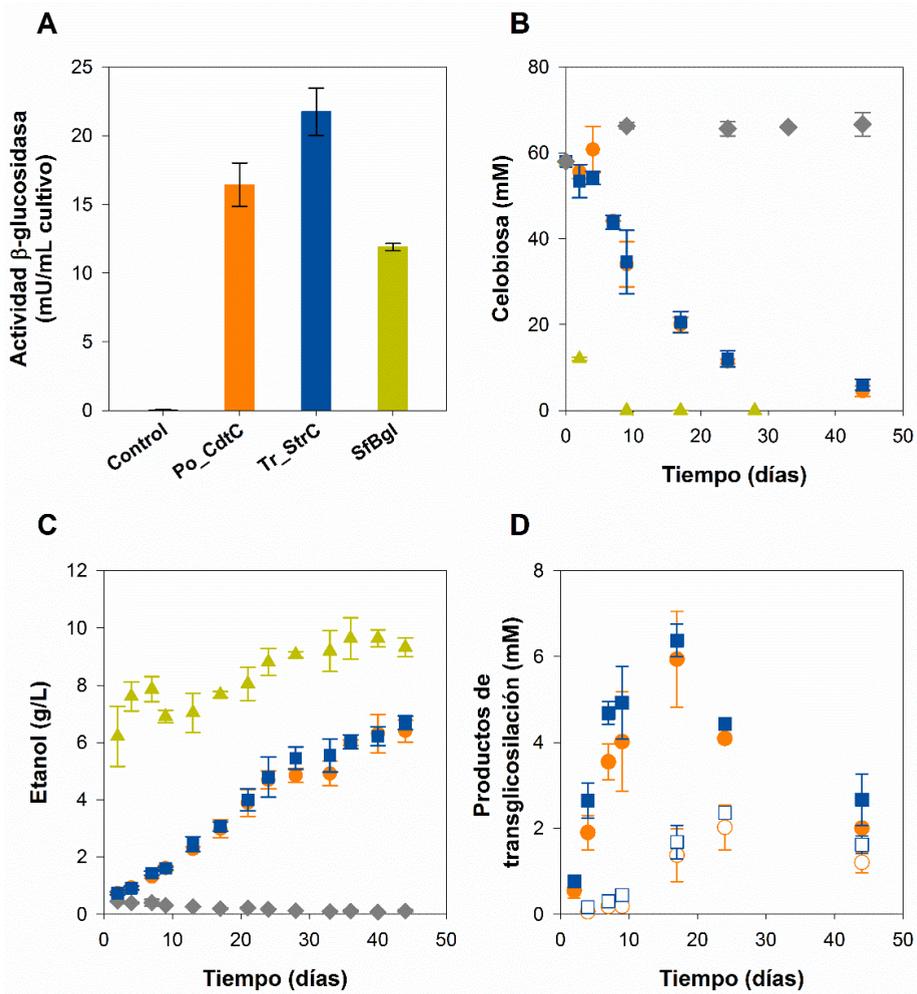


Figura 5.5 Análisis de la capacidad fermentativa de cepas de levadura con una β -glucosidasa intracelular o extracelular. Los transformantes NcBgl/Po_CdtC, barras o círculos naranjas; NcBgl/Tr_StrC, barras o cuadrados azules; SfBgl, barras o triángulos verdes; y el control negativo sin Bgl/sin permeasa, barras o diamantes grises, fueron inicialmente cultivados en un medio con glucosa al 2 % (medio SD de selección, con galactosa al 0.1 %). El sedimento celular fue usado para determinar la actividad β -glucosidasa en los extractos celulares, con celobiosos 60 mM como sustrato (**A**), o para inocular un medio con celobiosos al 2 % (YPC con galactosa al 0.1 %) bajo condiciones fermentativas. Durante la fermentación se midió el consumo de celobiosos (**B**), la producción de etanol (**C**), y la formación de productos de transglucosilación (celotriosa círculos llenos, celotetraosa círculos vacíos) (**D**). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de triplicados (A) o duplicados (B, C y D).

CAPÍTULO II

al consumo de celobiosa, en la estrategia intracelular se detectó la síntesis de oligosacáridos (celobiosa y celotriosa) con perfiles similares (Figura 5.5D), no así en la estrategia extracelular. Dichas celodextrinas se acumularon hasta un máximo, probablemente como resultado de la actividad transglucosilante de la NcBgl, y fueron degradadas después de tiempos de incubación más prolongados. La cantidad máxima de oligosacáridos sintetizados, tras 17 días de fermentación, representó el 30 % de la celobiosa consumida hasta ese tiempo.

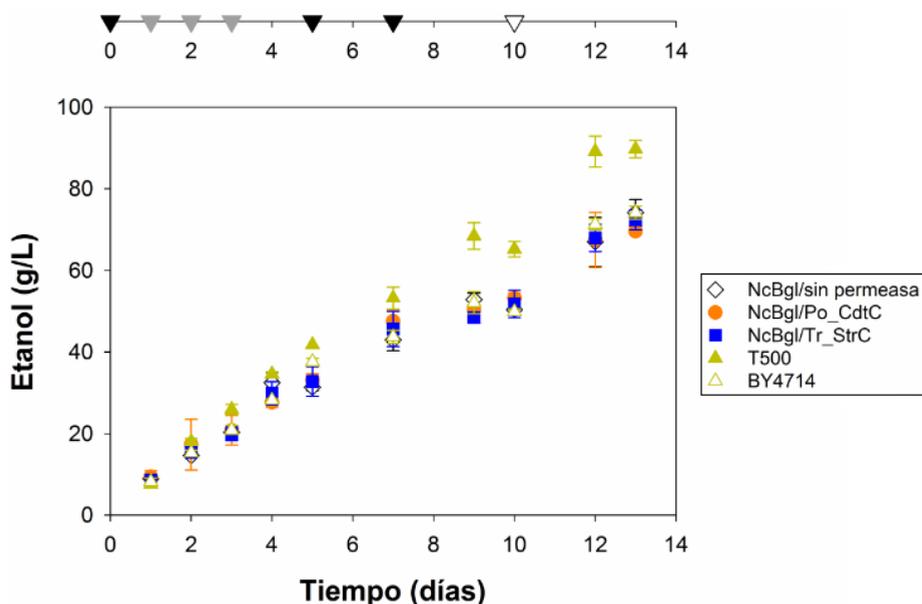


Figura 5.6 Sacarificación y fermentación simultánea de celulosa usando enzimas celulolíticas de *T. reesei* y diferentes cepas de *S. cerevisiae*. NcBgl/Po_CdtC; NcBgl/Tr_StrC; NcBgl/sin permeasa; T500. Como controles negativos se usaron dos cepas, una que expresa el gen de la NcBgl pero carece de permeasa y la cepa silvestre BY4714. Se realizaron adiciones sucesivas de papel filtro según lo indicado en la parte superior de la figura: triángulos llenos (0.5 g); triángulos grises (0.25 g); triángulos vacíos (0.125 g). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de duplicados.

Aunque la cepa T500 claramente mostró una eficiencia fermentativa más alta que las cepas que realizan hidrólisis intracelular, cuando se usó

celobiosa como único azúcar fermentable, los resultados podrían ser diferentes en el caso de la sacarificación y fermentación simultánea de otros sustratos celulósicos más complejos. Bajo estas condiciones y en comparación con el experimento previo, la concentración de celobiosa es mucho más baja (alrededor de 8 mM) y la concentración de glucosa es mucho más alta (puede llegar a 50 mM) (Figura 4.6). Esto representa una clara desventaja para T500, ya que SfBgl tiene una baja afinidad por celobiosa (Figura 4.4), y es mucho más sensible a la inhibición por glucosa (Figura 4.5) que NcBgl (Meleiro et al. 2015; Yang et al. 2015a; de Giuseppe et al. 2014). Por tanto, comparamos nuevamente las dos estrategias usando celulosa (papel de filtro) como material fermentable. A pesar de las características desfavorables de SfBgl, la SSF de celulosa usando T500 generó rendimientos de etanol más altos que cualquiera de las otras dos cepas (NcBgl/Po_CdtC o NcBgl/Tr_StrC), las cuales tuvieron un comportamiento similar a la cepa silvestre (Figura 5.6).

5.2 Discusión

La hidrólisis de la celobiosa es un punto clave en la conversión de material lignocelulósico en etanol. En los últimos años, con el propósito de disminuir el coste que supone la adición de enzimas exógenas a los cócteles celulolíticos, se han construido cepas transformantes de *S. cerevisiae*, capaces de hidrolizar y fermentar celobiosa mediante diferentes estrategias. Las dos principales propuestas han sido la hidrólisis extracelular de la celobiosa mediante una β -glucosidasa secretada al medio (van Rooyen et al. 2005; Gurgu et al. 2011; Treebupachatsakul et al. 2016; Saitoh et al. 2010; Kricka et al. 2015; Hasunuma & Kondo 2012; Yamada et al. 2013), o la conversión intracelular de celobiosa en glucosa mediada por un transportador del azúcar (Lian et al. 2014;

CAPÍTULO II

Bae et al. 2014; Ha et al. 2011; Zhang et al. 2013; Galazka et al. 2010; dos Reis et al. 2016; Li et al. 2013b; Ha et al. 2013b; Hu et al. 2016).

Como primera aproximación, en este capítulo se analizó el efecto del transporte de celobiosa y la hidrólisis intracelular del disacárido, en la capacidad de *S. cerevisiae* para crecer en un medio con este azúcar como fuente de carbono. Se compararon tres β -glucosidasas intracelulares, NcBgl y PpBglA de la familia GH1, y HgBgl de la familia GH3, las cuales mostraron un comportamiento cinético muy diferente (Figura 5.1B). A concentraciones de celobiosa iguales o inferiores a 60 mM ($\approx 2\%$), la actividad β -glucosidasa de NcBgl fue la más alta, y la de HgBgl la más baja, mientras que PpBglA mostró una actividad intermedia. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en las cinéticas de crecimiento de los transformantes con NcBgl y PpBglA, lo que indica que, por encima de cierto nivel de actividad β -glucosidasa, ésta no limita la asimilación de celobiosa, y que por lo tanto el principal cuello de botella es el transporte del disacárido.

En la búsqueda de transportadores adecuados de celobiosa, realizamos un estudio de potenciales permesas de azúcares, entre secuencias de *T. reesei* con elevada similitud con transportadores de celobiosa previamente caracterizados. Como resultado de este análisis seleccionamos diez potenciales permeasas (Tabla 5.1). Sin embargo, solo una de ellas (Tr_StrC) fue capaz de favorecer el crecimiento de *S. cerevisiae* en un medio con celobiosa como fuente de carbono (Figura 5.4). Según el análisis filogenético (Figura 5.3), Tr_StrC se agrupa con CDT1 de *N. crassa*, CdtC de *P. oxalicum* (Po_CdtC), y otros transportadores de azúcares como TtST de *T. terrestris*, PcST de *P. chrysogenum*, CdtG de *P. oxalicum* y LAC12 de *K. lactis*, previamente descritos por conferir a *S. cerevisiae* la capacidad de crecer en celobiosa (Tabla 1.7). Tr_StrA, Tr_StrB y CdtK de *P. oxalicum* (Po_CdtK) también están dentro de este nodo, pero más

alejadas de CDT1 y Po_CdtC. Según nuestros resultados ni Tr_StrA ni Tr_StrB permiten el transporte de celobiosa en *S. cerevisiae*, y según Li et al. (2013b) Po_CdtK tampoco. Sin embargo, según Bae et al. (2014) un transformante de *S. cerevisiae* que expresa Tr_StrA/NcBgl fue capaz de crecer en un medio con celobiosa (40 g/L) hasta una densidad similar a la del transformante Tr_StrC/NcBgl (Tabla 1.7). Estas discrepancias podrían ser debidas a diferencias en los sistemas experimentales. En nuestro trabajo, la expresión del gen de la permeasa fue controlada por un promotor inducible por galactosa, mientras que en el estudio antes mencionado utilizaron un promotor constitutivo (GPD: glicerol-3-fosfato deshidrogenasa) (Mumberg et al. 1995). Una menor expresión de Tr_StrA (en nuestras condiciones) podría explicar la pérdida de la capacidad de transportar celobiosa del transformante. Además, en este trabajo se usó una concentración de celobiosa más baja (20 g/L), que podría ser insuficiente para permeasas con baja afinidad. En cualquier caso, nuestros resultados indican que Tr_StrC es un transportador de celobiosa más eficiente que Tr_StrA. Por otro lado, Tr_StrD, Tr_StrE y Tr_StrF se agruparon con CDT2 de *N. crassa* y CdtD de *P. oxalicum*. Estas dos permeasas habían demostrado capacidad para transportar celobiosa en *S. cerevisiae*, pero con menor eficiencia que sus respectivos homólogos, CDT1 y CdtC (Galazka et al. 2010; Li et al. 2013b). Dentro de este nodo también se ubican otros transportadores de *P. oxalicum* (CdtB, CdtE, CdtF, CdtH y CdtJ) que no permitieron el transporte de celobiosa en *S. cerevisiae* (Li et al. 2013b). En términos generales, se puede decir que los transportadores relacionados con CDT2 son menos competentes que los relacionados con CDT1 para promover la fermentación de celobiosa en levadura. Finalmente, Tr_StrG, Tr_StrH, Tr_StrI y Tr_StrJ, que se agrupan fuera de los dos nodos principales, también fueron incapaces de favorecer el crecimiento en celobiosa de *S. cerevisiae*. Aunque Tr_StrI ha sido descrita como

CAPÍTULO II

permeasa de celobiosa (Stp1), su eficiencia fue mucho más baja que la de CDT1, mostrando un crecimiento significativamente tardío (Zhang et al. 2013). Tal comportamiento podría reflejar que para promover el crecimiento en celobiosa con Stp1 son necesarias mutaciones de la proteína.

Otro aspecto a ser considerado es el mecanismo de transporte utilizado por las permeasas de celobiosa. Mientras CDT1 es un H⁺-*symporter*, CDT2 es un facilitador simple (Kim et al. 2014). En CDT1 el transporte del azúcar disipa parte del gradiente de protones generado por la H⁺-ATPasa plasmática, lo cual implica un gasto energético. En base a este hecho algunos autores han propuesto que un transportador pasivo como CDT2 podría ser energéticamente más favorable, especialmente en condiciones anaerobias donde el suministro de ATP es más bajo (Lian et al. 2014). La evolución dirigida de CDT2 ha mejorado su eficiencia hasta niveles similares a los del CDT1 silvestre (Lian et al. 2014). Las versiones mejoradas de CDT2 introducidas en *S. cerevisiae*, y usando celobiosa (20 g/L) como fuente de carbono, dan lugar a rendimientos de etanol significativamente más altos que CDT1, lo cual apoya la teoría de la ventaja del transporte pasivo. Sin embargo, se debe tener en cuenta que en un sistema SSF las concentraciones de celobiosa en el medio extracelular son significativamente más bajas, por lo que un transportador activo podría ser ventajoso ya que podría aumentar la concentración de celobiosa intracelular y favorecer el funcionamiento de la β-glucosidasa.

La predicción del mecanismo de transporte de una permeasa es bastante difícil debido a la alta divergencia en las secuencias de la superfamilia MFS (Madej 2015). Sin embargo, estudios estructurales y funcionales mediante mutagénesis dirigida han revelado algunos aspectos clave. Un residuo ácido (Asp o Glu) conectado a través de un puente salino con una Arg conservada, forma el sitio de unión al protón (H⁺) y es esencial para el transporte activo (Madej et al.

2014). Cuando este residuo fue reemplazado por un residuo neutro en varios *symporters* (azúcar/H⁺), las permeasas conservaron su capacidad para permear el azúcar pero actuando como *uniporters* (Iancu et al. 2013). De igual forma, alineamientos estructurales y de secuencias de permeasas funcionalmente identificadas, mostraron que todos los *symporters* (azúcar/H⁺) tienen el residuo ácido, mientras que muchos *uniporters* tienen un residuo neutro en esa posición (Iancu et al. 2013). Sin embargo, GLUT2, un *uniporter* de glucosa, tiene un Asp en esa posición. Esto se ha explicado, basado en un modelado estructural y estudios de mutagénesis, por la formación de un puente de hidrógeno entre este residuo Asp y una Ser, lo que impediría el intercambio de protones (Iancu et al. 2013). Un análisis de secuencia de las permeasas seleccionadas en la [Figura 5.3](#), indica que todos estos transportadores tienen un residuo Asp en esa posición ([Figura 5.7](#)). Por otro lado, Tr_StrD y Po_CdtJ tienen una Lys en lugar de la Arg conservada que forma el puente salino con el Asp. Se desconoce si esta sustitución afectaría a la unión del protón al residuo de Asp. Como era de esperar, CDT1 y LAC12 de *K. lactis*, ambos identificados como H⁺/*symporters*, tienen un Asp en esa posición (residuos 90 y 89, respectivamente). CDT2 a pesar de ser un *uniporter*, también tiene un Asp en la posición 56, al igual que lo descrito para el *uniporter* GLUT2.

Un tema recurrente en los estudios de la fermentación de celobiosa por *S. cerevisiae*, es la confrontación de las estrategias de hidrólisis extracelular e intracelular. Algunos trabajos concluyen que la hidrólisis intracelular es más eficiente, comparando los rendimientos de etanol obtenidos mediante este método, con los de otros grupos que utilizaban una β-glucosidasa fijada a la superficie celular (Ha et al. 2011), o con una β-glucosidasa extracelular añadida exógenamente (Lee & Jin 2017). La conclusión derivada de esos análisis es cuestionable. En el primer caso, las condiciones experimentales no son

PERMEASA		*				+												
Nc_CDT1	87	N	G	Y	D	G	S	L	93	171	V	V	G	R	F	V	L	177
Nc_CDT2	53	T	G	Y	D	G	M	F	59	136	M	G	G	R	T	M	L	142
Kl_LAC12	86	Q	G	Y	D	G	A	L	92	170	I	G	G	R	W	F	V	176
An_CIA	77	N	G	Y	D	G	S	L	83	161	I	V	G	R	F	I	L	167
Pc_ST	79	N	G	Y	D	G	S	L	85	164	V	V	G	R	F	V	L	170
Tt_ST	80	N	G	Y	D	G	S	L	86	164	V	V	G	R	F	I	L	170
Tr_StrA	29	N	G	Y	D	G	S	L	35	113	M	G	G	R	F	L	L	119
Tr_StrB	34	N	G	F	D	S	N	T	40	116	M	G	G	R	F	I	L	122
Tr_StrC	73	S	G	F	D	G	S	I	79	157	L	G	G	R	F	V	L	163
Tr_StrD	47	L	G	I	D	G	S	M	53	130	I	G	G	K	I	V	L	136
Tr_StrE	53	S	G	F	D	S	Q	M	59	136	I	V	A	R	I	I	L	142
Tr_StrF	7	G	G	Y	D	G	S	M	13	89	V	V	A	R	V	V	L	95
Tr_StrG	22	Q	G	F	D	I	S	S	28	105	I	V	G	R	L	L	C	111
Tr_StrH	20	F	G	F	D	I	S	S	26	117	I	V	A	R	I	I	N	123
Tr_StrI	50	F	G	Y	D	S	G	Y	56	141	V	A	G	R	L	I	A	147
Tr_StrJ	36	Y	G	Y	D	T	G	T	42	129	L	A	G	R	F	F	A	135
Po_CdtB	52	T	G	Y	D	G	M	M	58	135	V	A	G	R	L	F	L	141
Po_CdtC	79	N	G	Y	D	G	S	L	85	163	V	V	G	R	F	I	L	169
Po_CdtD	41	N	G	Y	D	G	S	L	47	124	V	C	G	R	I	V	L	130
Po_CdtE	59	N	G	F	D	G	S	M	65	142	V	A	A	R	L	L	I	148
Po_CdtF	52	S	G	F	D	S	Q	I	58	120	I	V	A	R	M	L	L	126
Po_CdtG	72	N	G	F	D	S	S	L	78	156	M	G	G	R	F	L	L	162
Po_CdtH	54	Q	G	F	D	A	S	M	60	137	V	F	S	R	F	L	V	143
Po_CdtJ	47	L	G	I	D	G	S	M	53	130	I	G	G	K	V	I	L	136
Po_CdtK	68	F	G	I	D	W	G	V	74	151	M	A	G	R	F	F	M	157

Figura 5.7 Alineamiento de las secuencias polipeptídicas de las permeasas usadas para el análisis filogenético. El residuo de Asp que representa el sitio de unión a los H⁺ en los H⁺/symporters y el de Arg que esta muy conservado y forma un puente salino con dicho Asp están marcados con un * y un +, respectivamente, y resaltados en rojo. El residuo de Lys que difiere de la Arg muy conservada está marcado en verde.

comparables, y en el segundo, la adición exógena es una situación diferente a la síntesis y secreción genéticamente controlada por una levadura transformante. También se ha intentado comparar las dos estrategias expresando la misma secuencia de una β-glucosidasa extracelular, con y sin su péptido señal (Njokweni et al. 2012). En este caso, el transformante representativo de la estrategia intracelular (sin péptido señal) mostró un crecimiento limitado en

celobiosa, similar al control negativo sin β -glucosidasa, incluso con la co-expresión de una permeasa del disacárido. Una explicación a este resultado negativo, puede ser un inadecuado plegamiento de la proteína en el citoplasma, considerando que de forma natural la β -glucosidasa seleccionada es secretada al medio. De igual forma, forzar la secreción de enzimas intracelulares adicionando un péptido señal, normalmente compromete el plegamiento de la proteína. Además, en el caso de que la proteína fuese estructuralmente viable, estas enzimas son altamente inestables en el medio extracelular en comparación con las enzimas secretadas de forma natural. Por lo tanto, un mejor abordaje para la confrontación de las estrategias de hidrólisis de celobiosa intracelular y extracelular en *S. cerevisiae*, sería mediante la expresión heteróloga de β -glucosidasas que, en los organismos de origen, sean traducidas en el citosol o liberadas a la ruta de secreción, respectivamente. Además, considerando que la capacidad fermentativa de las levaduras depende del fondo genético de la cepa (Gurgu et al. 2011), es muy importante llevar a cabo la confrontación de las estrategias con transformantes provenientes del mismo huésped. Estas son las consideraciones utilizadas en este estudio.

En el presente trabajo comparamos la capacidad de fermentar celobiosa de dos cepas transformantes de *S. cerevisiae* (Po_CdtC/NcBgl y Tr_StrC/NcBgl), ambas portadoras de una permeasa y una β -glucosidasa intracelular, con otra cepa de *S. cerevisiae* (T500) que secreta una β -glucosidasa (SfBgl) de *S. fibuligera*. La cepa T500 retiene en la superficie celular alrededor del 70 % de la β -glucosidasa secretada (Gurgu et al. 2011). La actividad β -glucosidasa asociada a células de este transformante, fue más baja que la de las cepas con la β -glucosidasa intracelular (Figura 5.5A). Además, la K_m de SfBgl ($1.74 \text{ mM} \pm 0.08 \text{ mM}$) es alrededor de 10 veces más alta que la de NcBgl ($0.163 + 0.013 \text{ mM}$). A pesar de eso, la cepa de SfBgl fue capaz de fermentar el 80 % de la celobiosa

inicial en un tiempo mucho más corto que los transformantes con la β -glucosidasa intracelular (Figura 5.5B). Estos resultados indican que ni los niveles de expresión ni las características de la β -glucosidasa, son responsables del consumo más bajo de celobiosa por parte de las cepas Po_CdtC/NcBgl y Tr_StrC/NcBgl, por lo que el principal cuello de botella estaría en la actividad de los transportadores de celobiosa. Esta limitación podría ser reducida con versiones mejoradas de permeasas. De hecho, se ha incrementado la capacidad de transporte de celobiosa de diferentes permeasas con métodos de evolución dirigida, que a su vez han mejorado la fermentación de celobiosa (Lian et al. 2014; Ha et al. 2013b; Ha et al. 2013a). Por otro lado, la eficiencia de conversión de celobiosa en etanol en las cepas con la β -glucosidasa intracelular (55 %) fue más bajo que en la cepa con SfBgl (76 %). Esto podría estar relacionado con el hecho de que parte de la celobiosa consumida es transitoriamente secuestrada en forma de celodextrinas (celotriosa y celotetraosa) como resultado de la actividad transglicosilante de NcBgl (Figura 5.5D). Así, otro aspecto para mejorar la fermentación de celobiosa sería la reducción de esta actividad secundaria en las β -glucosidasas. En el proceso de SSF de celulosa (Figura 5.6) también se observó mayor eficiencia de la estrategia de hidrólisis extracelular de la celobiosa. Este es un resultado significativo, considerando que bajo esas condiciones (baja concentración de celobiosa y alta concentración de glucosa) (Figura 4.6), las características intrínsecas de SfBgl (baja afinidad por celobiosa y fuerte inhibición por glucosa), comparadas con las de NcBgl, significan una clara desventaja para la estrategia extracelular. De hecho, a pesar de que la fermentación con T500 resulta en una reducción drástica (10 veces) de los niveles de celobiosa durante la SSF de celulosa (Figura 4.6), la concentración de este disacárido es todavía inhibitoria para la celulasas (Teugjas & Våljamäe 2013a). Así, la aproximación extracelular podría ser mejorada usando variantes

de β -glucosidasas con alta afinidad por celobiosa y tolerancia a glucosa, también conseguible por evolución dirigida (Guo et al. 2016b).

La hidrólisis intracelular de celobiosa ha sido propuesta como una estrategia ventajosa para la co-fermentación con xilosa, ya que esto evitaría la acción represiva e inhibitoria de la glucosa sobre el transporte y metabolismo de xilosa (Ha et al. 2011; Chomvong et al. 2014; dos Reis et al. 2016). Sin embargo, se debería considerar que en un sistema de SSF de celulosa, la glucosa es producida extracelularmente a altas concentraciones, con o sin β -glucosidasa añadida (Figura 4.6) (Tang et al. 2013). Por tanto, en un proceso de SSF, ambas estrategias de hidrólisis de celobiosa podrían ser mejoradas por la co-expresión de transportadores de xilosa de alta afinidad (Leandro et al. 2006). Un paso más en el desarrollo de un método para la fermentación de celulosa es el bioproceso consolidado (CBP), en el cual la síntesis de las enzimas celulolíticas, la hidrólisis de la celulosa y la fermentación son realizadas por un mismo microorganismo (den Haan et al. 2015; Parisutham et al. 2014; Yamada et al. 2013; Hasunuma et al. 2013; Olson et al. 2012). Aunque estas estrategias aún requieren considerable mejora, representan un nuevo contexto para la re-evaluación de la eficiencia de la hidrólisis de celobiosa intracelular y extracelular.

En conclusion, nuestros resultados indican que la fermentación de celobiosa por *S. cerevisiae*, tras hidrólisis extracelular, supera en las condiciones experimentales ensayadas, a la estrategia intracelular. En otras condiciones, la estrategia alternativa podría ser más ventajosa. Algunos aspectos específicos para mejorar ambas aproximaciones serían la selección de β -glucosidasas con alta afinidad por celobiosa y tolerancia a glucosa, y con baja actividad transglicosilante.

6 CAPÍTULO III: Producción de IMOS

6.1 Resultados

6.1.1 Expresión del gen *aglA* de *A. niger* en *S. cerevisiae*

La cepa BY4741 de *S. cerevisiae* usada como huésped, es isogénica a la cepa silvestre S288C, y contiene en su genoma genes funcionales que codifican permeasas de maltosa (*AGT1* y *MAL31*) y α -glucosidasas intracelulares (*MAL12* y *MAL32*) pero carece del gen (*MAL13* o *MAL33*) que codifica la proteína activadora requerida para la expresión de la permeasa y la α -glucosidasa (Naumov et al. 1994; Charron et al. 1989). Por lo tanto, la cepa BY4741 es fenotípicamente maltosa negativa, una característica deseable ya que evita la interferencia en el análisis de la actividad de la enzima heteróloga.

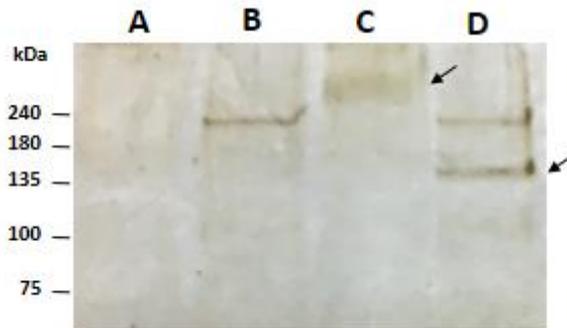


Figura 6.1 Análisis SDS-PAGE de las proteínas recuperadas del medio de cultivo de *S. cerevisiae* BY4741_AglA (C,D), y de la cepa control transformada con el vector de clonación (A,B). Las muestras tratadas con la glicosidasa EndoH se muestran en las líneas B y D, y las no tratadas en las líneas A y C. Las flechas indican las bandas diferenciales, presentes en la cepa que expresa la AglA extracelular y ausentes en el control.

La cepa BY4741 fue transformada con el plásmido pSSP-AG, que lleva el gen *aglA* de *A. niger*. Los cultivos inducidos con galactosa de estos transformantes mostraron actividad α -glucosidasa (1.4 mU/mL), la cual se encuentra distribuida tanto en el medio de cultivo (53 %) como asociada a

CAPÍTULO III

células (47 %). Un cultivo control de la misma cepa transformada con el vector de clonación (pEMBLyex4) no presentó actividad enzimática detectable. La expresión extracelular de la α -glucosidasa por la levadura transformante fue visualizada por electroforesis en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), como una banda difusa correspondiente a una proteína de alto peso molecular, por encima de 240 kDa, indicando un alto grado de glicosilación (Figura 6.1, línea C). Después del tratamiento con EndoH (Figura 6.1, línea D) la masa de la proteína bajó a aproximadamente 135 kDa, y migró en el gel de electroforesis como una banda más definida. Esto indica que la proteína no fue completamente deglicosilada ya que la masa esperada para el monómero es de 106 kDa. Esto puede deberse a que las Asn modificadas por glicosilación no son accesibles estructuralmente a la EndoH o a que la proteína es ampliamente modificada por O-glicosilación, no reversible por EndoH. El análisis de secuencia de AglIa indica que efectivamente hay varios sitios potenciales de O-glicosilación accesibles estructuralmente y agrupados en una misma zona de la proteína (Figura 6.2). La imposibilidad de EndoH de deglicosilar estos sitios explicaría por qué el tamaño de la proteína es mayor al teórico esperado.

A

```

1  MKVLTHLLAR  AWLVPLAYGA  SQSLLSYTAP  SQPQFTIPAS  ADVGAQLIAN  IDDPQAADAQ
61  SVCPGYKASK  VQHNRSRGFTA  SLQLAGRPCN  VYGTDVESLT  LSVEYQSDSR  LNIQILPTHV
121  DSTNASWYFL  SENLIVRPKA  SLNASVSQSD  LFSVSNSEPS  FNFKVIRKAT  GDALFSTEGT
181  VLVYENQFIE  FVTALPEEYN  LYGLGEHITQ  FRLQRNANLT  IYPSDDGTPI  DQNLYGQHPF
241  YLDTYYKGD  RQNGSYIPVK  SSEADASQDY  ISLSHGVLFR  NSHGLEILLR  SQKLIWRTLG
301  GGIDLTFYSG  PAPADVTRQY  LTTSTVGLPAM  QQYNTLGFHQ  CRWGYNNWSD  LADVVFANFEK
361  FEIPLYEYWT  DIDYMHGYRN  FDNQHRFSY  SEGDEFSLKL  HESGRYVYPI  VDAALYIPNP
421  ENASDAYATY  DRGAADDVFL  KNPDGSLYIG  AVWPGYTVFP  DWHHPKAVDF  WANELVIWSK
481  KVAFDGVWYD  MSEVSSFCVG  SCGTCNLTIN  PAHPSFLLPG  EPGDIIYDYP  EAFNNTNAE
541  AASSASGASSS  QAANATTTS  TSSSVLRTTP  TPGVRNVEHP  PVIINHDEG  HDLSVHAYSP
601  NATHVDGVEE  YDVHGLYGHQ  GLNATYQGLL  EVWSHKRPF  IIGRSTFAGS  GKWAGHWGGD
661  NYSKWSMYMY  SISQALSFSL  FGIPMGADT  CGFNGNSDEE  LCNRWMLSA  FFPFYRNHNE
721  LSTIPQEPYR  WASVIEATKS  AMRIRYAILP  YFYTLFDLAH  TTGSTVMRAL  SWEFPNPTL
781  AAVETQFMVG  PAIMVVVPLE  PLVNTVRGVF  PGVGHGEVWY  DWYTAQAVDA  KPGVNTTISA
841  PLGHIPVYVR  GGNILPMQEP  ALTTREAROT  PWALLAALGS  NGTASGQLYL  DDGESIYNNA
901  TLHVDFTASR  SSLRSSAQGR  WKERNPLANV  TVLGVNKEPS  AVTLNGQAVF  PGSVTYNSTS
961  QVLFVGGGLN  LTRKGAWAEN  WVLEW

```

B

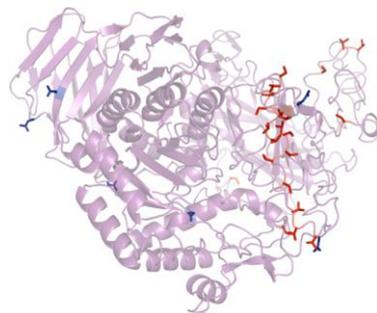


Figura 6.2 Análisis de los potenciales sitios de glicosilación de la α -glucosidasa de *A. niger*. En la secuencia de aminoácidos (**A**) y en el modelo de la estructura tridimensional (**B**) se resaltan los potenciales sitios de N- y O-glicosilación en azul y rojo, respectivamente.

6.1.2 Análisis de la formación de IMOS

En la **Figura 6.3** se muestran los productos recuperados de la incubación de células de *S. cerevisiae* que expresan el gen *aglA* con maltosa al 30 % como sustrato. Después de 8 horas de incubación, el único producto de reacción detectable en concentraciones significativas fue panosa. Este trisacárido se forma por transglucosilación entre dos moléculas de maltosa, una de ellas actuando como donadora de glucosa y la otra como aceptora. El residuo glucosilo escindido de la maltosa donadora se transfiere a la maltosa aceptora

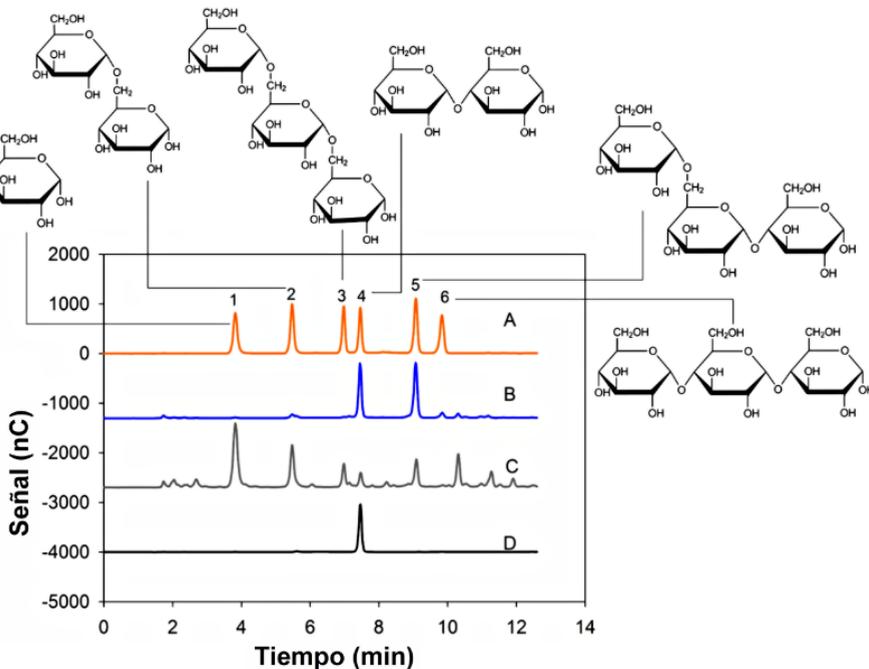


Figura 6.3 Perfil de productos obtenidos con *S. cerevisiae* BY4741_AglA y la cepa control transformada con el vector de clonación, a partir de maltosa. Las células fueron incubadas con maltosa al 30 %, a 50 °C, durante diferentes tiempos. Los azúcares recuperados en el sobrenadante fueron analizados por HPLC. **(A)** Compuestos patrones. **(B,C)** BY4741_AglA después de 8 y 24 h, respectivamente. **(D)** Cepa control después de 8 h. Los picos de los patrones corresponden a: (1) glucosa, (2) isomaltosa, (3) isomaltotriosa, (4) maltosa, (5) panosa y (6) maltotriosa.

formando un enlace $\alpha(1\rightarrow6)$. A pesar de que glucosa y panosa se producen en concentraciones equimolares en la reacción de transglicosilación, es de resaltar que no detectamos glucosa entre los productos, lo que indica que el monosacárido es consumido por la levadura durante este primer periodo. Tras un periodo más largo de incubación, 24 h, el producto predominante de transglicosilación fue isomaltosa. Adicionalmente se detectaron panosa e isomaltotriosa, en cantidades más bajas pero significativas. En este punto también se detectó la acumulación de una cantidad significativa de glucosa, probablemente porque tras 24 h de incubación a 50 °C, las células ya no estaban metabólicamente activas y no podían continuar consumiéndola. Además, otros compuestos, correspondientes a picos no identificados, eluyeron a tiempos de retención más largos. Presumiblemente se trata de IMOS de tipo $\alpha(1\rightarrow6)$ de mayor grado de polimerización.

Se realizó un seguimiento de la cinética de producción de IMOS a diferentes concentraciones de maltosa. La [Figura 6.4A](#) muestra que la producción inicial de panosa incrementa rápidamente, a velocidades similares para las diferentes concentraciones de maltosa, alcanzando un máximo (400 mM después de 20 h para 60 % de maltosa) que luego decrece. La cinética de consumo de la maltosa mostró una caída inicial lineal, con pendientes similares para las diferentes concentraciones de sustrato ([Figura 6.4B](#)). La formación de isomaltosa y glucosa solo se detectó usando altas concentraciones de maltosa y con tiempos de incubación largos ([Figura 6.4C,D](#)). Después de un retraso inicial, ambos azúcares se acumularon progresivamente. El hecho de que la isomaltosa se forme en el punto en que comienza la acumulación de glucosa, sugiere que la isomaltosa es un producto de transglicosilación con la glucosa como molécula aceptora, y no un resultado de isomerización de la maltosa, lo que sería un mecanismo alternativo posible. Además, usando enzima purificada, condición

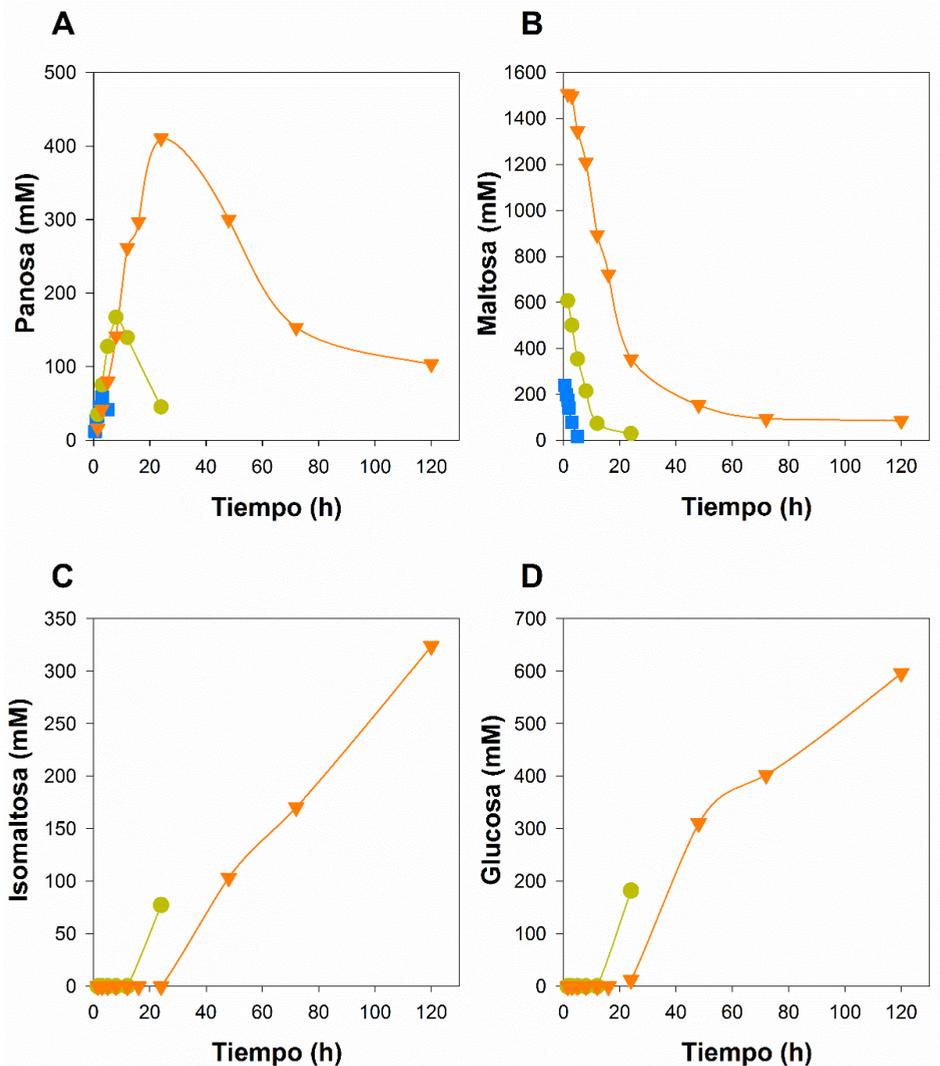


Figura 6.4 Cinética de la síntesis/hidrólisis de diferentes azúcares por la cepa BY4741_AglA a partir de maltosa. Las células de levadura fueron incubadas con tres concentraciones de maltosa: 10 % (280 mM), cuadrados azules; 30 % (800 mM), círculos verdes; y 60 % (1.6 M), triángulos naranjas. Los azúcares resultantes fueron analizados por HPLC. **(A)** Panosa, **(B)** maltosa, **(C)** isomaltosa, y **(D)** glucosa.

en la que a diferencia de lo que ocurre cuando se utiliza la levadura, la glucosa no es secuestrada del medio, no se observó el retraso en la síntesis de isomaltosa en comparación con la producción de panosa (Ma et al. 2017; Mangas-Sánchez & Adlercreutz 2015).

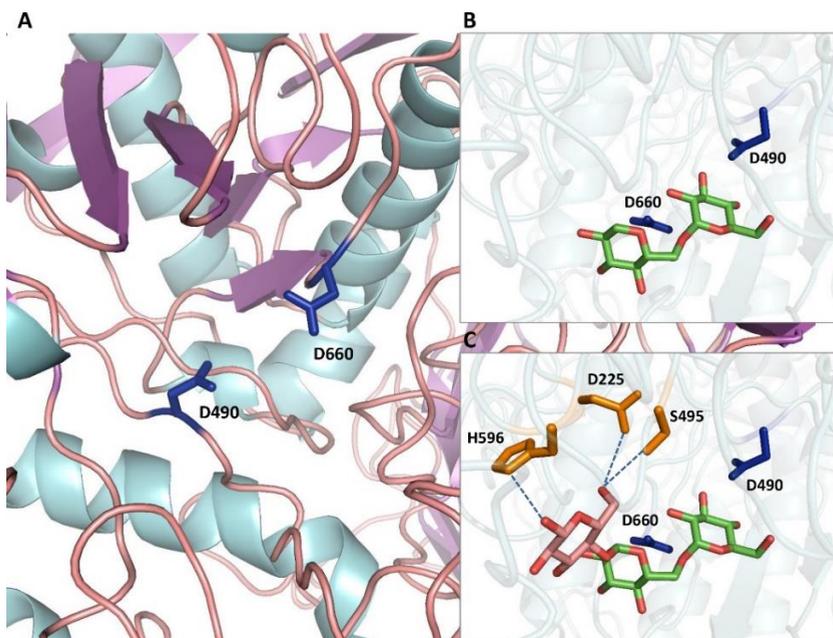


Figura 6.5 (A) Modelo del sitio catalítico de la α -glucosidasa de *A. niger*. Los residuos catalíticos D660 (nucleófilo putativo) y D490 (ácido/base putativo) están resaltados en azul. **(B)** Complejo con isomaltosa. **(C)** Complejo con panosa. La glucosa en el extremo reductor está coloreada en rosa, y los potenciales puentes de hidrógeno con este residuo están resaltados con líneas discontinuas.

En la **Figura 6.5** se muestra un modelo de la α -glucosidasa de *A. niger* acoplada con isomaltosa o panosa en el centro activo de la enzima. El modelo fue ajustado para superponer la orientación de los residuos catalíticos (Asp490 y Asp660, nucleófilo y ácido/base putativos, respectivamente) con los correspondientes residuos de la α -glucosidasa de la remolacha (*Beta vulgaris*; PDB id 3WEO). Se asumió que la disposición de los residuos catalíticos debe ser

la misma en ambas proteínas porque catalizan la misma reacción, y el grado de identidad de ambas secuencias (37 %) aumenta a un valor cercano al 80 % si solo se consideran los residuos probablemente involucrados en la interacción directa con el sustrato. El modelo muestra la formación de isomaltosa y panosa y sugiere un sitio para el acoplamiento de la molécula aceptora (glucosa o maltosa).

6.1.3 Anclaje de AglA a la superficie celular de *S. cerevisiae*

Los cultivos transformantes de la cepa BY4741 que expresan el gen *aglA* secretan la α -glucosidasa al exterior celular. La actividad enzimática aparece distribuida aproximadamente en partes iguales en el sobrenadante y asociada a células, lo que dificulta la recuperación de la enzima en cantidades útiles para su uso posterior. La fijación de la enzima a la superficie celular permite un uso directo de la biomasa de levadura como un agente catalítico en la síntesis de IMOS, una metodología que ha sido descrita para la síntesis de otros oligosacáridos (Marín-Navarro et al. 2015b). Para conseguir una fijación cuantitativa y estable, en este trabajo se construyeron dos versiones de AglA, fusionada con la secuencia completa o parcial de la proteína Sed1 de *S. cerevisiae*. Sed1 es una proteína anclada a la pared celular, mediante un mecanismo mediado por glicosilfosfatidilinositol (GPI). Se trata de una proteína abundante, inducida por estrés, que ha sido usada de forma satisfactoria como vehículo para fijar otras proteínas a la pared celular de levaduras (Van der Vaart et al. 1997; Inokuma et al. 2015; Shimoi et al. 1998). En la [Figura 6.6A](#) se observa que en las cepas que producen las α -glucosidasas híbridas con Sed1, casi la totalidad de la actividad enzimática apareció unida a las células y solo una cantidad mínima fue detectada en el medio de cultivo. La cepa transformante con la versión híbrida más corta de Sed1 (AglA_Sed1B) mostró

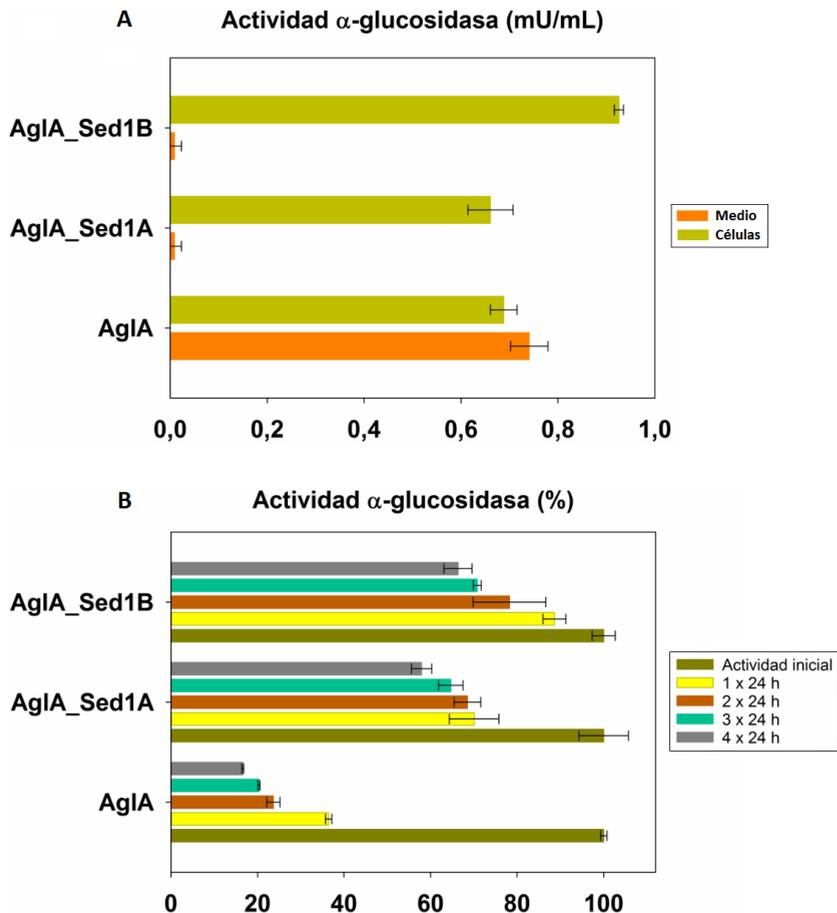


Figura 6.6 Actividad enzimática de células de levadura que expresan la α -glucosidasa de *A. niger* en las versiones silvestre o híbridas fusionadas a la secuencia Sed1 completa (Sed1A) o parcial (Sed1B). **(A)** Análisis de la actividad α -glucosidasa, secretada al medio de cultivo (barras naranjas) o asociada a células (barras verdes). **(B)** Actividad α -glucosidasa asociada a células, inicial y remanente, después de varios periodos de 24 h de incubación de las células a 50 °C y pH 5.5. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de triplicados.

una actividad enzimática más alta comparada con la versión completa de Sed1 (AgIA_Sed1A). Una consecuencia práctica de la unión covalente de la enzima a la superficie celular se presenta en la [Figura 6.6B](#). Las células que expresan las α -glucosidasas híbridas con Sed1 pueden ser reutilizadas en reacciones

consecutivas tipo batch sin mayor pérdida de la actividad, en comparación con las cepas que expresan la versión silvestre de AgIA, cuya interacción con la superficie celular es menos fuerte.

6.1.4 Síntesis de panosa o isomaltosa por transglicosilación en función del aceptor del grupo glucosilo

Como se ha mencionado anteriormente, los resultados de la [Figura 6.4](#) indican que la glucosa y la maltosa pueden actuar como aceptores del grupo glucosilo en la reacción de transglicosilación. Es decir, cuando la maltosa es usada como sustrato a tiempos cortos de reacción, es el único aceptor disponible y se produce panosa como producto de transglicosilación. Cuando la reacción progresa y se acumula glucosa en el medio, este monosacárido también puede actuar como molécula aceptora y se produce isomaltosa. Para confirmar que la isomaltosa se forma por transglicosilación, con la glucosa como aceptor, y no por isomerización directa de la maltosa, se ensayó la producción de IMOS a diferentes ratios iniciales de glucosa a maltosa ([Figura 6.7](#)). Para este análisis, las levaduras transformantes que expresaban AgIA_Sed1B fueron preincubadas a 50 °C durante 24 h, para evitar la interferencia del consumo de glucosa por el metabolismo celular. Como muestra la [Figura 6.6B](#), la α -glucosidasa producida por AgIA_Sed1B se mantiene unida de forma estable a la superficie celular y permanece activa tras largos periodos de incubación a 50 °C, por lo que las células pretratadas, con un metabolismo atenuado, pueden ser utilizadas como fuente de enzima. Con las células pretratadas a 50 °C, y posteriormente incubadas durante 5 h con maltosa, se acumuló una gran cantidad de glucosa (≈ 200 mM) y se obtuvo un alto rendimiento de isomaltosa (≈ 60 mM), incluso en ausencia de glucosa exógena añadida. Si la isomaltosa se formara por isomerización de la maltosa, un incremento en la concentración

inicial de glucosa no mejoraría la producción de isomaltosa. Nuestros resultados (Figura 6.7A y Figura 6.4C) indican una correlación directa entre la formación de isomaltosa y la concentración de glucosa en el medio, lo que apunta a un mecanismo de transglucosilación. Usando células pretratadas, después de 1 h de incubación con maltosa, el ratio de isomaltosa a panosa fue de 0.2 y el mismo valor se obtuvo para el ratio de glucosa a maltosa. Cuando el ratio inicial de glucosa a maltosa se incrementó a 1:1 o 4:1, el rendimiento de panosa bajó y el de isomaltosa subió (Figura 6.7). En ambos casos, el ratio de isomaltosa a panosa después de 1 h de incubación fue equivalente al de glucosa a maltosa. Estos resultados sugieren que glucosa y maltosa compiten por el mismo sitio de unión en la enzima, actuando como aceptores del residuo glucosilo para sintetizar isomaltosa y panosa, respectivamente. Sin embargo, ambos productos tienen cinéticas diferentes a tiempos prolongados de incubación. La panosa alcanzó una concentración máxima antes de ser degradada (Figura 6.4A y Figura 6.7B), y la isomaltosa se acumuló progresivamente (Figura 6.7A), lo que indica que la panosa es mejor sustrato para la enzima.

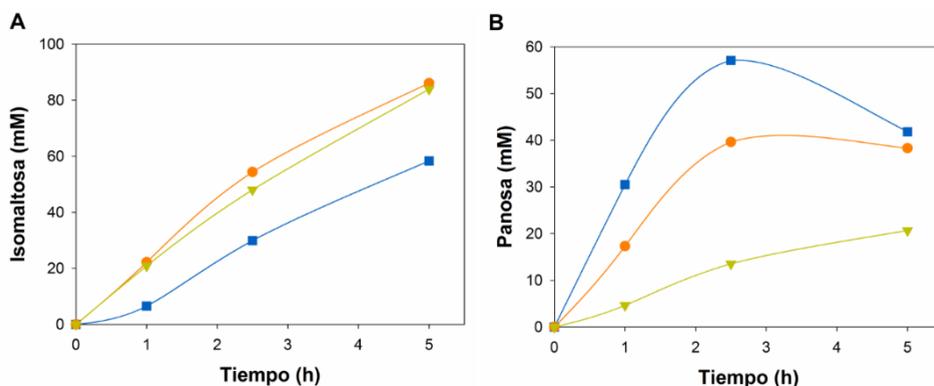


Figura 6.7 Cinética de producción de isomaltosa (A) y panosa (B) por células de levadura transformadas con AgIA_Sed1B. Las reacciones se realizaron por incubación de células pretratadas (50 °C, pH 5.5 durante 24 h) con diferentes mezclas de maltosa y glucosa: 300 mM de maltosa (cuadrados azules), 300 mM de maltosa y 300 mM de glucosa (círculos naranjas), y 300 mM de maltosa y 1.2 M de glucosa (triángulos verdes).

6.1.5 Síntesis de otros productos de transglucosilación usando diferentes aceptores

Se ensayó la capacidad transglucosilante de la α -glucosidasa de *A. niger* incubando células tratadas (por preincubación a 50 °C pH 5.5 durante 24 h) de la cepa transformante AglA_Sed1B con diferentes moléculas aceptoras. Como aceptores a probar se utilizaron dos antibióticos (kanamicina y estreptomycin), un polialcohol (sorbitol), dos disacáridos (celobiosa y lactosa) y diferentes monosacáridos (galactosa, xilosa y fructosa). En la [Tabla 6.1](#) se presenta un resumen cualitativo de los resultados obtenidos.

Tabla 6.1 Capacidad transglucosilante de AglA utilizando nuevos aceptores

ACEPTOR	TRANSGLICOSILACIÓN	# PRODUCTOS NUEVOS ^a
Kanamicina	No	No
Estreptomycin	No	No
Sorbitol	Si	1
Celobiosa	Si	2
Lactosa	No	No
Galactosa	Si	1
Xilosa	Si	1
Fructosa	Si	1

^a Productos de transglucosilación diferentes de panosa, isomaltosa e isomaltotriosa.

La kanamicina no dio lugar a ningún tipo de producto de reacción. El resultado obtenido indica que el antibiótico inhibe por completo la actividad de la enzima. El efecto inhibitorio de ciertos antibióticos sobre glicosidasas, específicamente α -glucosidasas, ha sido descrito en otros estudios (Lee et al. 2007). La estreptomycin dio un perfil de productos igual al que genera la enzima a partir de maltosa, sin aparición de ningún producto nuevo. Esto indica que el

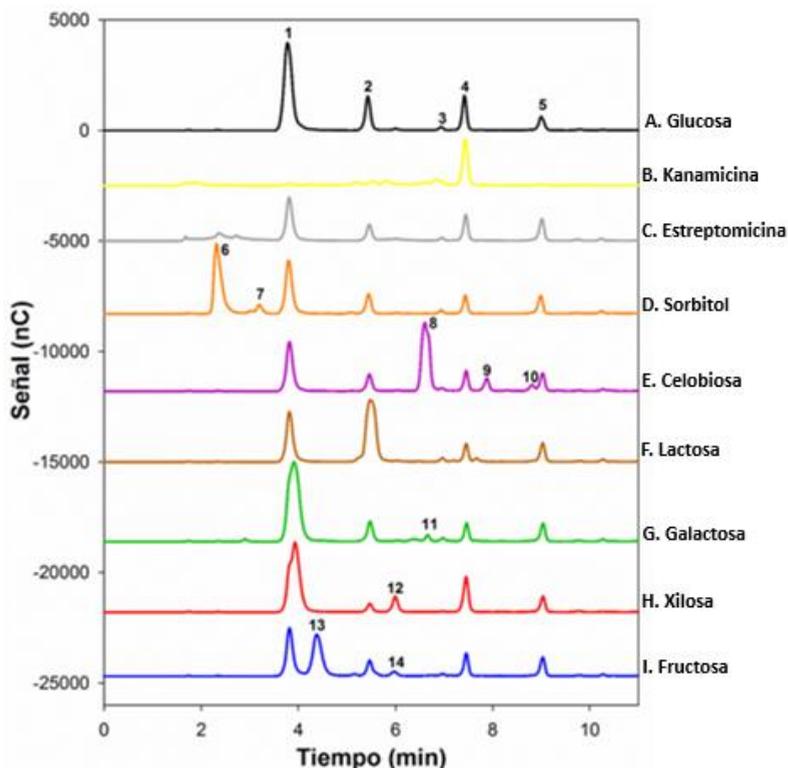


Figura 6.8 Perfil de productos obtenidos por transglucosilación tras 1 h de incubación a 50 °C, pH 5.5, de AglA_Sed1B con diferentes mezclas de maltosa 100 mM – y cada uno de los potenciales aceptores indicados junto al gráfico a una concentración de 200 mM. Los números sobre los picos corresponden a los siguientes compuestos: glucosa (1); isomaltosa (2); maltotriosa (3); maltosa (4); panosa (5); sorbitol (6); celobiosa (8); productos de transglucosilación con celobiosa (9 y 10); sorbitol (7), galactosa (11), xilosa (12), fructosa (14); fructosa (13). En F el disacárido lactosa co-eluye con isomaltosa, y en G y H los monosacáridos galactosa y xilosa, respectivamente, co-eluyen con glucosa.

antibiótico no funciona como aceptor del grupo glucosilo, pero tampoco afecta a la actividad de la enzima. Los demás aceptores probados, excepto la lactosa, generaron nuevos productos de transglucosilación. El perfil de los productos obtenidos, incluyendo los productos de hidrólisis y transglucosilación con una mezcla de maltosa y glucosa se muestran en la Figura 6.8.

6.2 Discusión

La producción industrial de IMOS es llevada a cabo por la acción combinada de enzimas hidrolíticas y transferasas que actúan sobre almidón produciendo una mezcla compleja de α -glucósidos (Madsen et al. 2017; Sorndech et al. 2017a; Basu et al. 2016). Aunque en términos generales se considera que los IMOS tienen efectos prebióticos y otros beneficios para la salud (Goffin et al. 2011; Sorndech et al. 2017b; Li et al. 2009), la naturaleza heterogénea y variable de las preparaciones comerciales dificulta atribuir los efectos benéficos a compuestos específicos. El desarrollo de nuevos procedimientos para la producción de IMOS de composición definida, específicamente panosa e isomaltosa, es un objetivo biotecnológico importante, debido a los usos actuales y aplicaciones potenciales de estos compuestos (Fernandes & Rodrigues 2007; Erhardt et al. 2017; Mäkeläinen et al. 2009). En este trabajo se plantea un procedimiento para la producción a bajo coste de panosa e isomaltosa de grado alimenticio, usando una cepa de levadura ingenierizada que lleva una α -glucosidasa unida covalentemente a la pared celular. Además, la producción de panosa o isomaltosa puede ser modulada por el ratio de los azúcares aceptores (maltosa o glucosa) presentes en la reacción.

A partir de los resultados obtenidos se concluye que la isomaltosa se forma por transglicosilación y no por isomerización intramolecular de la maltosa. El residuo glucosilo unido a la enzima en el complejo intermediario de reacción, puede ser transferido a otra molécula aceptora. Dependiendo de si ésta es glucosa o maltosa, se sintetizarán isomaltosa o panosa, respectivamente. Este es un resultado reseñable, ya que otras glicosil hidrolasas que actúan por un mecanismo de retención, tienen actividad isomerasa, como por ejemplo la trehalosa sintasa que cataliza la isomerización intramolecular de maltosa a

trehalosa, pero es incapaz de incorporar glucosa añadida de forma exógena (Zhang et al. 2011). Un caso relevante es el de la α -galactosidasa LacZ de *Escherichia coli*. Esta enzima convierte la lactosa en alolactosa por una reacción de isomerización, en la cual la glucosa y la galactosa producidas por la hidrólisis de lactosa, antes de dejar el sitio activo de la enzima, son unidas nuevamente pero con un enlace distinto (Wheatley et al. 2013). LacZ también es capaz de catalizar la transglicosilación de un residuo galactosilo a glucosa exógena añadida a altas concentraciones. La diferencia entre los mecanismos de isomerización y transglicosilación es importante desde un punto de vista biotecnológico. Si la síntesis de isomaltosa fuese por isomerización, isomaltosa y panosa se formarían a la vez. Sin embargo, nuestros resultados indican que, en ausencia de glucosa, la panosa es el único producto de transglicosilación (Figura 6.4), pero cuando la concentración de glucosa incrementa, desplaza el mecanismo hacia la producción de isomaltosa (Figura 6.7).

El rendimiento de panosa e isomaltosa a diferentes ratios de glucosa a maltosa, indica que ambas moléculas, maltosa y glucosa, compiten con similar eficiencia como aceptores glucosilo a las concentraciones ensayadas. Sin embargo, una vez formadas panosa e isomaltosa, su evolución posterior es notablemente diferente. La panosa alcanza un máximo y luego declina, mientras que la isomaltosa incrementa con el tiempo (Figura 6.7). Este resultado se explica por la alta afinidad de AglA por panosa como un sustrato para hidrólisis, en comparación con la isomaltosa (Ma et al. 2017). Otros datos refuerzan esta observación. La Figura 6.5 muestra el modelo estructural de la α -glucosidasa de *A. niger* acoplada con panosa en el centro activo. El residuo glucosilo en el extremo reductor de la panosa puede formar tres puentes de hidrógeno putativos con D225, S495 y H596, lo que favorecería una estabilización adicional para la formación del complejo enzima-sustrato, en comparación con la

molécula de isomaltosa, la cual es equivalente a la panosa excepto por el mencionado extremo glucosilo. Estos tres residuos están conservados en la α -glucosidasa de *Schwanniomyces occidentalis*, la cual tiene un perfil de productos similar a AgIA (Song et al. 2013). Curiosamente, H596 es sustituido por Ser en la α -glucosidasa de *Xanthophyllomyces dendrorhous*, la cual sintetiza panosa y maltotriosa con eficiencias similares (Gutiérrez-Alonso et al. 2016). Esto sugiere que el subsitio representado por estos residuos está involucrado en la especificidad de producto de la enzima. Los resultados indican además que el sitio activo de AgIA es lo suficientemente flexible como para utilizar diferentes aceptores del grupo glucosilo (distintos de maltosa y glucosa). El perfil de productos de transglicosilación de la enzima se ha ampliado al usar sorbitol, celobiosa, galactosa, xilosa y fructosa como aceptores. Los resultados obtenidos son solo semicuantitativos, ya que no se dispone de los patrones de los productos de transglicosilación.

En conclusión, este estudio presenta un procedimiento simple para la producción de IMOS (específicamente panosa e isomaltosa) con alto rendimiento. El sistema de unión de la enzima a la superficie celular permite la implementación de un proceso “one-pot”, en el cual la biomasa de levaduras puede ser utilizada y reciclada como un agente catalítico para la producción de IMOS y otros productos de transglicosilación.

7 CONCLUSIONES

1. Se ha obtenido y analizado el complejo de enzimas celulolíticas producido por *Trichoderma reesei* en condiciones de fermentación sólida. Dicho complejo hidroliza celulosa generando glucosa y celobiosa como productos finales. La acumulación transitoria de celobiosa confirma estudios previos en los que se concluía que la actividad β -glucosidasa secretada por el hongo es limitante para la hidrólisis total de la celulosa.
2. La sacarificación y fermentación simultánea de papel, utilizando el cóctel celulolítico de *T. reesei* y una levadura recombinante que secreta una β -glucosidasa de *Saccharomycopsis fibuligera*, produjo rendimientos de etanol significativamente superiores a los obtenidos en las mismas condiciones, con una cepa de levadura silvestre. Los niveles de celobiosa acumulados con la levadura silvestre fueron bajos, pero aún a concentraciones inhibitorias para las celobiohidrolasas. Sin embargo, la cepa recombinante hidroliza eficazmente la celobiosa, consiguiendo una degradación de papel más rápida.
3. La metodología de sacarificación y fermentación acopladas propuesta en esta tesis produce rendimientos de etanol mayores al 7 %, sensiblemente superiores al 5 %, valor considerado como límite inferior para que la destilación del alcohol sea económicamente viable.
4. Se han obtenido distintos transformantes de levadura que coexpresan el gen de una β -glucosidasa intracelular y el de un transportador de azúcares. La baja actividad celobiosa de la β -glucosidasa de *Hanseniaspora guillermondii* resultó limitante para el crecimiento en

CONCLUSIONES

celobiosa del transformante correspondiente, mientras que el crecimiento de cepas con las β -glucosidasas de *Paenibacillus polymixa* y *Neurospora crassa* se vio limitado por el transportador de celobiosa.

5. Se ha analizado la capacidad de distintos transportadores de azúcares de *Trichoderma reesei* para conferir a transformantes de *S. cerevisiae* que expresan una β -glucosidasa intracelular, la propiedad de crecer en celobiosa y se compararon los resultados con los del transportador de celobiosa PoCdtC de *Penicillium oxalicum*. De las diez permeasas analizadas, sólo una de ellas (Tr_StrC) mostró capacidad significativa para conferir crecimiento en celobiosa.
6. Se ha comparado la capacidad de fermentar celobiosa de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* que produce la β -glucosidasa extracelular de *Saccharomycopsis fibuligera* con las de otras cepas que expresan una β -glucosidasa intracelular y un transportador de celobiosa. La hidrólisis extracelular dio lugar a un consumo más rápido de celobiosa y a mayores rendimientos de etanol que la intracelular. Asimismo, la hidrólisis extracelular fue más eficiente para la sacarificación y fermentación simultánea de celulosa.
7. Se han obtenido y caracterizado transformantes de *Saccharomyces cerevisiae* que expresan el gen de la α -glucosidasa de *Aspergillus niger*. Estos transformantes secretan la enzima al medio extracelular, si bien la mitad de la actividad permanece adherida a la superficie celular. Se han establecido condiciones en las que la actividad enzimática

producida por la levadura produce cantidades elevadas de isomaltooligosacáridos, particularmente panosa e isomaltosa.

8. Se ha conseguido fijar la α -glucosidasa de *Aspergillus niger* a la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* mediante la fusión con la proteína SED1 portadora de una secuencia de anclaje por glicosilfosfatidilinositol. Esta estrategia permitió una inmovilización estable de la enzima y la reutilización de las células de levadura como material catalítico.

9. Las cepas de levaduras que expresan la α -glucosidasa de *Aspergillus niger* sintetizan isomaltooligosacáridos mediante un mecanismo de transglicosilación, utilizando como sustrato donador maltosa y como sustratos aceptores maltosa o glucosa, para generar específicamente panosa o isomaltosa, respectivamente. La panosa sintetizada es a su vez sustrato de la enzima lo que hace que su producción alcance un máximo en el tiempo para después degradarse. El perfil de productos obtenidos se puede modificar en función de si la cepa de levadura se encuentra metabólicamente activa o no, del tiempo de incubación y de los ratios de maltosa a glucosa utilizados. Además, el enzima puede utilizar aceptores alternativos como sorbitol, celobiosa, galactosa, xilosa y fructosa, abriendo la posibilidad de generar una amplia variedad de productos de transglicosilación.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Aachary, A. A., Prapulla, S. G., **2011**. Xylooligosaccharides (XOS) as an emerging prebiotic: microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10:2–16.
- Abdel-Naby, M. A., Osman, M. Y., Abdel-Fattah, A. F., **1999**. Purification and properties of three cellobiases from *Aspergillus niger* A20. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 76:33–44.
- Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H. R., Iwata, S., **2003**. Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science*, 301:610–615.
- Adam, A. C., Rubio-Teixeira, M., Polaina, J., **2004**. Lactose: The milk sugar from a biotechnological perspective. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 44:553–557.
- Aga, H., Higashiyama, T., Watanabe, H., Sonoda, T., Nishimoto, T., Kubota, M., Fukuda, S., Kurimoto, M., Tsujisaka, Y., **2002**. Production of cyclic tetrasaccharide from starch using a novel enzyme system from *Bacillus globisporus* C11. *J. Biosci. Bioeng.*, 94:336–342.
- Albermann, C., Piepersberg, W., Wehmeier, U. F., **2001**. Synthesis of the milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose using recombinant bacterial enzymes. *Carbohydr. Res.*, 334:97-103.
- Alizadeh, A., Akbari, P., Difilippo, E., Schols, H. A., Ulfman, L. H., Schoterman, M. H. C., Garssen, J., Fink-Gremmels, J., Braber, S., **2016**. The piglet as a model for studying dietary components in infant diets: effects of galacto-oligosaccharides on intestinal functions. *Br. J. Nutr.*, 115:605–618.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M. J., **2010**. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour. Technol.*, 101:4851–4861.
- Artzi, L., Bayer, E.A., Moraïs, S., **2017**. Cellulosomes: bacterial nanomachines for dismantling plant polysaccharides. *Nat. Rev. Microbiol.*, 15:83–95.
- Babbar, N., Dejonghe, W., Sforza, S., Elst, K., **2017**. Enzymatic pectic oligosaccharides (POS) production from sugar beet pulp using response surface methodology. *J. Food Sci. Technol.*, 54:3707–3715.
- Bae, YH., Kang, KH., Jin, YS., Seo, JH., **2014**. Molecular cloning and expression of fungal cellobiose transporters and β -glucosidases conferring efficient cellobiose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.*, 169:34–41.
- Bai, Y., van der Kaaij, R. M., Leemhuis, H., Pijning, T., van Leeuwen, S. S., Jin, Z., Dijkhuizen, L., **2015**. Biochemical characterization of the *Lactobacillus reuteri* glycoside hydrolase family 70 GTFB type of 4,6- α -glucanotransferase enzymes that synthesize soluble dietary starch fibers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81:7223–7232.
- Bai, Y., Gangoiti, J., Dijkstra, B. W., Dijkhuizen, L., Pijning, T., **2017**. Crystal structure of 4,6- α -glucanotransferase supports diet-driven evolution of GH70 enzymes from α -amylases in oral bacteria. *Structure*, 25:231–242.
- Baik, S. H., **2010**. Synthesis of raffinose by fungal α -galactosidase from *Absidia corymbifera*. *Food Sci. Biotechnol.*, 19:83–87.
- Bali, V., Panesar, P. S., Bera, M. B., Panesar, R., **2015**. Fructo-oligosaccharides: production, purification and potential applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 55:1475–1490.

- Barrios-González, J., **2012**. Solid-state fermentation: physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Process Biochemistry*, 47:175–185.
- Basu, A., Mutturi, S., Prapulla, S.G., **2016**. Production of isomaltooligosaccharides (IMO) using simultaneous saccharification and transglucosylation from starch and sustainable sources. *Process Biochemistry*, 51:1464–1471.
- Bertrand, E., Pierre, G., Delattre, C., Gardarin, C., Bridiau, N., Maugard, T., Štrancar, A., Michaud, P., **2014**. Dextranase immobilization on epoxy CIM disk for the production of isomaltooligosaccharides from dextran. *Carbohydr. Polym.*, 111:707–713.
- Bischof, R. H., Ramoni, J., Seiboth, B., **2016**. Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. *Microb. Cell Fact.*, 15:106.
- Bode, L., **2012**. Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*, 22:1147–1162.
- Bothast, R. J., Schlicher, M. A., **2005**. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67:19–25.
- Bothe, M. K., Maathuis, A. J. H., Bellmann, S., van der Vossen, J. M. B. M., Berressem, D., Koehler, A., Schwejda-Guettes, S., Gaigg, B., Kuchinka-Koch, A., Stover, J. F., **2017**. Dose-dependent prebiotic effect of lactulose in a computer-controlled in vitro model of the human large intestine. *Nutrients*, 9:767.

BIBLIOGRAFÍA

- Brena, B., González-Pombo, P., Batista-Viera, F., **2013**. Immobilization of enzymes: a literature survey. In *Methods Mol. Biol.*, Guisan, J. M., Ed, Springer: New York, 15–31.
- Cao, H., Gao, G., Gu, Y., Zhang, J., Zhang, Y., **2014**. Trp358 is a key residue for the multiple catalytic activities of multifunctional amylase OPMA-N from *Bacillus sp.* ZW2531-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98:2101–2111.
- Cao, L., Wang, Z., Ren, G., Kong, W., Li, L., Xie, W., Liu, Y., **2015**. Engineering a novel glucose-tolerant β -glucosidase as supplementation to enhance the hydrolysis of sugarcane bagasse at high glucose concentration. *Biotechnol. Biofuels*, 8:202.
- Cardelle-Cobas, A., Corzo, N., Olano, A., Peláez, C., Requena, T., Ávila, M., **2011**. Galactooligosaccharides derived from lactose and lactulose: Influence of structure on *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium* growth. *Int. J. Food Microbiol.*, 149:81–87.
- Carle-Urioste, J. C., Escobar-Vera, J., El-Gogary, S., Henrique-Silva, F., Torigoi, E., Crivellaro, O., Herrera-Estrella, A., El-Dorry, H., **1997**. Cellulase induction in *Trichoderma reesei* by cellulose requires its own basal expression. *J. Biol. Chem.*, 272:10169–10174.
- Charron, M. J., Read, E., Haut, S. R., Michels, C. A., **1989**. Molecular evolution of the telomere-associated MAL loci of *Saccharomyces*. *Genetics*, 122:307–316.
- Chen, M., Qin, Y., Liu, Z., Liu, K., Wang, F., Qu, Y., **2010a**. Isolation and characterization of a β -glucosidase from *Penicillium decumbens* and improving hydrolysis of corncob residue by using it as cellulase supplementation. *Enzyme Microb. Technol.*, 46:444–449.

- Chen, DL., Tong, X., Chen, SW., Chen, S., Wu, D., Fang, SG., Wu, J., Chen, J., **2010b**. Heterologous expression and biochemical characterization of α -glucosidase from *Aspergillus niger* by *Pichia pastoris*. *J. Agric. Food Chem.*, 58:4819–4824.
- Chiba, S., **1997**. Molecular mechanism in α -glucosidase and glucoamylase. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 6:1233–1239.
- Chockchaisawasdee, S., Naiyatat, P., **2013**. Production of isomaltooligosaccharides from banana flour. *J. Sci. Food. Agric.*, 93:180–186.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., **1987**. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162:156–159.
- Chomvong, K., Kordić, V., Li, X., Bauer, S., Gillespie, A. E., Ha, SJ., Oh, E. J., Galazka, J. M., Jin, YS., Cate, J. H. D., **2014**. Overcoming inefficient cellobiose fermentation by cellobiose phosphorylase in the presence of xylose. *Biotechnol. Biofuels*, 7:85.
- Closa-Monasterolo, R., Ferré, N., Castillejo-DeVillasante, G., Luque, V., Gispert-Llaurado, M., Zaragoza-Jordana, M., Theis, S., Escribano, J., **2017**. The use of inulin-type fructans improves stool consistency in constipated children. A randomised clinical trial: pilot study. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 68:587–594.
- Colabardini, A. C., Valkonen, M., Huuskonen, A., Siika-aho, M., Koivula, A., Goldman, G. H., Saloheimo, M., **2016**. Expression of two novel β -glucosidases from *Chaetomium atrobrunneum* in *Trichoderma reesei*

BIBLIOGRAFÍA

- and characterization of the heterologous protein products. *Mol. Biotechnol.*, 58:821–831.
- Dan, S., Marton, I., Dekel, M., Bravdo, B. A., He, S., Withers, S. G., Shoseyov, O., **2000**. Cloning, expression, characterization, and nucleophile identification of family 3, *Aspergillus niger* β -glucosidase. *J. Biol. Chem.*, 275:4973–4980.
- 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. *Microb. Cell Fact.*, 11:63.
- Datta, S., Christena, L. R., Rajaram, Y. R. S., **2013**. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech.*, 3:1-9.
- Davies, G., Henrissat, B., **1995**. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Current Biology Ltd.*, 3:853–859.
- Davies, G. J., Wilson, K. S., Henrissat, B., **1997**. Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem. J.*, 321:557–559.
- Davison, S. A., den Haan, R., van Zyl, W. H., **2016**. Heterologous expression of cellulase genes in natural *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100:8241–8254.
- de Giuseppe, P. O., Souza, T. A. C. B., Souza, F. H. M., Zanphorlin, L. M., Machado, C. B., Ward, R. J., Jorge, J. A., Furriel, R. P. M., Murakami, M. T., **2014**. Structural basis for glucose tolerance in GH1 β -glucosidases. *Acta Cryst.*, 70:1631–1639.
- Del Pozo, M. V., Fernández-Arrojo, L., Gil-Martínez, J., Montesinos, A., Chernikova, T. N., Nechitaylo, T. Y., Waliszek, A., Tortajada, M., Rojas, A.,

- Huws, S. A., Golyshina, O. V., Newbold, C. J., Polaina, J., Ferrer, M., Golyshin, P. N., **2012**. Microbial β -glucosidases from cow rumen metagenome enhance the saccharification of lignocellulose in combination with commercial cellulase cocktail. *Biotechnol. Biofuels*, 5:73.
- den Haan, R., van Rensburg, E., Rose, S. H., Görgens, J. F., van Zyl, W. H., **2015**. Progress and challenges in the engineering of non-cellulolytic microorganisms for consolidated bioprocessing. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 33:32–38.
- Díez-Municio, M., Herrero, M., Olano, A., Moreno, F. J., **2014**. Synthesis of novel bioactive lactose-derived oligosaccharides by microbial glycoside hydrolases. *Microb. Biotechnol.*, 7:315–331.
- Dimarogona, M., Topakas, E., Christakopoulos, P., **2012**. Cellulose degradation by oxidative enzymes. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2:e201209015.
- Donovan, S. M., Comstock, S. S., **2017**. Human milk oligosaccharides influence neonatal mucosal and systemic immunity. *Ann. Nutr. Metab.*, 69:42–51.
- dos Reis, T. F., de Lima, P. B. A., Parachin, N. S., Mingossi, F. B., de Castro Oliveira, J. V., Ries, L. N. A., Goldman, G. H., **2016**. Identification and characterization of putative xylose and cellobiose transporters in *Aspergillus nidulans*. *Biotechnol. Biofuels*, 9:204.
- Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P., **2017**. Genetic engineering of *Trichoderma reesei* cellulases and their production. *Microb. Biotechnol.* 10:1485-1499.

BIBLIOGRAFÍA

- Duan, KJ., Sheu, DC., Lin, CT., **1995**. Transglucosylation of a fungal α -glucosidase. The enzyme properties and correlation of isomaltooligosaccharide production. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 750:325–328.
- Duwe, A., Tippokötter, N., Ulber, R., **2017**. Lignocellulose-biorefinery: ethanol-focused. In *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* Springer: Berlin, Heidelberg.
- Erhardt, F. A., Rosenstock, P., Hellmuth, H., Jördening, HJ., **2017**. Development of a multiphase reaction system for integrated synthesis of isomaltose with a new glucosyltransferase variant. *Biocatal. Biotransform.*, 28:72–78.
- Fang, Z., Fang, W., Liu, J., Hong, Y., Peng, H., Zhang, X., Sun, B., Xiao, Y., **2010**. Cloning and characterization of a β -glucosidase from marine microbial metagenome with excellent glucose tolerance. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 20:1351–1358.
- Favaro, L., Cagnin, L., Basaglia, M., Pizzocchero, V., van Zyl, W. H., Casella, S., **2017**. Bioresource technology production of bioethanol from multiple waste streams of rice milling. *Bioresour. Technol.*, 244:151–159.
- Fernandes, F. A. N., Rodrigues, S., **2007**. Evaluation of enzymatic reactors for large-scale panose production. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 142:95–104.
- Fernández-Arrojo, L., Marín, D., Gómez De Segura, A., Linde, D., Alcalde, M., Gutiérrez-Alonso, P., Ghazi, I., Plou, F. J., Fernández-Lobato, M., Ballesteros, A., **2007**. Transformation of maltose into prebiotic isomaltooligosaccharides by a novel α -glucosidase from *Xantophyllomyces dendrorhous*. *Process Biochemistry*, 42:1530–1536.
- Ferrara, M. C., Cobucci-Ponzano, B., Carpentieri, A., Henrissat, B., Rossi, M., Amoresano, A., Moracci, M., **2014**. The identification and molecular

- characterization of the first archaeal bifunctional exo- β -glucosidase/N-acetyl- β -glucosaminidase demonstrate that family GH116 is made of three functionally distinct subfamilies. *Biochim. Biophys. Acta*, 1840:367–377.
- Fujita, Y., Takahashi, S., Ueda, M., Tanaka, A., Okada, H., Morikawa, Y., Kawaguchi, T., Arai, M., Fukuda, H., Kondo, A., **2002**. Direct and efficient production of ethanol from cellulosic material with a yeast strain displaying cellulolytic enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 26:668–673.
- Fujita, Y., Ito, J., Ueda, M., Fukuda, H., Kondo, A., **2004**. Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70:1207–1212.
- Funane, K., Tokashiki, T., Gibu, S., Kawabata, Y., Oguma, T., Ito, H., Nakachi, M., Miyagi, S., Kobayashi, M., **2007a**. Finding of cyclodextrins and attempts of their industrialization for cariostatic oligosaccharides. *J. Appl. Glycosci.*, 54:103–107.
- Funane, K., Terasawa, K., Mizuno, Y., Ono, H., Miyagi, T., Gibu, S., Tokashiki, T., Kawabata, Y., Kim, Y.M., Kimura, A., Kobayashi, M., **2007b**. A novel cyclic isomaltooligosaccharide (cycloisomaltodecaose, CI-10) produced by *Bacillus circulans* T-3040 displays remarkable inclusion ability compared with cyclodextrins. *J. Biotechnol.*, 130:188–192.
- Funane, K., Terasawa, K., Mizuno, Y., Ono, H., Gibu, S., Tokashiki, T., Kawabata, Y., Kim, Y.M., Kimura, A., Kobayashi, M., **2008**. Isolation of *Bacillus* and *Paenibacillus* bacterial strains that produce large molecules of cyclic isomaltooligosaccharides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72:3277–3280.

BIBLIOGRAFÍA

- Galazka, J. M., Tian, C., Beeson, W. T., Martinez, B., Glass, N. L., Cate, J. H. D., **2010**. Cellodextrin transport in yeast for improved biofuel production. *Science*, 330:84–86.
- Galian, C., Björkholm, P., Bulleid, N., von Heijne, G., **2012**. Efficient glycosylphosphatidylinositol (GPI) modification of membrane proteins requires a C-terminal anchoring signal of marginal hydrophobicity. *J. Biol. Chem.*, 287:16399–16409.
- Gangoiti, J., van Leeuwen, S. S., Gerwig, G. J., Duboux, S., Vafiadi, C., Pijning, T., Dijkhuizen, L., **2017**. 4,3- α -Glucanotransferase, a novel reaction specificity in glycoside hydrolase family 70 and clan GH-H. *Sci. Rep.*, 7:39761.
- Gao, J., Qian, Y., Wang, Y., Qu, Y., Zhong, Y., **2017**. Production of the versatile cellulase for cellulose bioconversion and cellulase inducer synthesis by genetic improvement of *Trichoderma reesei*. *Biotechnol. Biofuels*, 10:272.
- Ghazarian, H., Idoni, B., Oppenheimer, S. B., **2011**. A glycobiology review: carbohydrates, lectins, and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochem.*, 113:236–247.
- Gietz, R. D., Sugino, A., **1988**. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene*, 14:527–534.
- Gietz, R. D., Woods, R. A., **2002**. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.*, 350:87–96.

- Gilkes, N. R., Kilburn, D. G., Miller, R. C., Warren, R. A. J., **1991**. Bacterial Cellulases. *Bioresour. Technol.*, 36:21–35.
- Goffin, D., Delzenne, N., Blecker, C., Hanon, E., Deroanne, C., Paquot, M., **2011**. Will isomalto-oligosaccharides, a well-established functional food in Asia, break through the european and american market? The status of knowledge on these prebiotics. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 51:394–409.
- Goldemberg, J., **2008**. The Brazilian biofuels industry. *Biotechnol. Biofuels*, 1:6.
- González-Candelas, L., Ramón, D., Polaina, J., **1990**. Sequences and homology analysis of two genes encoding β -glucosidases from *Bacillus polymyxa*. *Gene*, 95:31–38.
- Gozu, Y., Ishizaki, Y., Hosoyama, Y., Miyazaki, T., Nishikawa, A., Tonozuka, T., **2016**. A glycoside hydrolase family 31 dextranase with high transglucosylation activity from *Flavobacterium johnsoniae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 80:1562–1567.
- Grabarics, M., Csernák, O., Balogh, R., Béni, S., **2017**. Analytical characterization of human milk oligosaccharides – potential applications in pharmaceutical analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 146:168–178.
- Graham-Rowe, D., **2011**. Agriculture: Beyond food versus fuel. *Nature*, 474.
- Gruno, M., Våljamäe, P., Pettersson, G., Johansson, G., **2004**. Inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulases by cellobiose is strongly dependent on the nature of the substrate. *Biotechnol. Bioeng.*, 86:503–511.
- Guerfali, M., Saidi, A., Gargouri, A., Belghith, H., **2015**. Enhanced enzymatic hydrolysis of waste paper for ethanol production using separate saccharification and fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 175:25–42.

BIBLIOGRAFÍA

- Guerrero, C., Vera, C., Acevedo, F., Illanes, A., **2015**. Simultaneous synthesis of mixtures of lactulose and galacto-oligosaccharides and their selective fermentation. *J. Biotechnol.*, 209:31–40.
- Guo, B., Sato, N., Biely, P., Amano, Y., Nozaki, K., **2016a**. Comparison of catalytic properties of multiple β -glucosidases of *Trichoderma reesei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100:4959–4968.
- Guo, B., Amano, Y., Nozaki, K., **2016b**. Improvements in glucose sensitivity and stability of *Trichoderma reesei* β -glucosidase using site-directed mutagenesis. *PLoS ONE*, 11:e0147301.
- Guo, Y., Yan, Q., Yang, Y., Yang, S., Liu, Y., Jiang, Z., **2015**. Expression and characterization of a novel β -glucosidase, with transglycosylation and exo- β -1,3-glucanase activities, from *Rhizomucor miehei*. *Food Chem.*, 175:431–438.
- Gupta, V. K., Steindorff, A. S., de Paula, R. G., Silva-Rocha, R., Mach-Aigner, A. R., Mach, R. L., Silva, R. N., **2016**. The post-genomic era of *Trichoderma reesei*: What's Next? *Trends Biotechnol.*, 34:970–982.
- Gurgu, L., Lafraya, Á., Polaina, J., Marín-Navarro, J., **2011**. Fermentation of cellobiose to ethanol by industrial *Saccharomyces* strains carrying the β -glucosidase gene (BGL1) from *Saccharomycopsis fibuligera*. *Bioresour. Technol.*, 102:5229–5236.
- Gutiérrez-Alonso, P., Gimeno-Pérez, M., Ramírez-Escudero, M., Plou, F. J., Sanz-Aparicio, J., Fernández-Lobato, M., **2016**. Molecular characterization and heterologous expression of a *Xanthophyllomyces dendrorhous* α -glucosidase with potential for prebiotics production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100:3125–3135.

- Ha, S.J., Galazka, J. M., Oh, E. J., Kordić, V., Kim, H., Jin, Y.S., Cate, J. H. D., **2013a**. Energetic benefits and rapid cellobiose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* expressing cellobiose phosphorylase and mutant cellodextrin transporters. *Metab. Eng.*, 15:134–143.
- Ha, S.J., Galazka, J. M., Kim, S. R., Choi, J.H., Yang, X., Seo, J.H., Glass, N. L., Cate, J. H. D., Jin, Y.S., **2011**. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 108:504–509.
- Ha, S.J., Kim, H., Lin, Y., Jang, M. U., Galazka, J. M., Kim, T.J., Cate, J. H. D., Jin, Y.S., **2013b**. Single amino acid substitutions in HXT2.4 from *Scheffersomyces stipitis* lead to improved cellobiose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79:1500–1507.
- Han-Woo, K., Ishikawa, K., **2010**. Complete saccharification of cellulose at high temperature using endocellulase and β -glucosidase from *Pyrococcus sp.* *J. Microbiol. Biotechnol.*, 20:889–892.
- 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. *Bioresour. Technol.*, 135:513–522.
- Hasunuma, T., Kondo, A., **2012**. Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering. *Biotechnol. Adv.*, 30:1207–1218.
- Hendriks, A. T. W. M., Zeeman, G., **2009**. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.*, 100:10–18.

BIBLIOGRAFÍA

- Henrissat, B., **1991**. A classification of glycosyl hydrolases based sequence similarities amino acid. *Biochem. J.*, 280:309–316.
- Hernandez-Hernandez, O., Marin-Manzano, M. C., Rubio, L. A., Moreno, F. J., Sanz, M. L., Clemente, A., **2012**. Monomer and linkage type of galacto-oligosaccharides affect their resistance to ileal digestion and prebiotic properties in rats. *J. Nutr.*, 142:1232–1239.
- Herpoël-Gimbert, I., Margeot, A., Dolla, A., Jan, G., Molle, D., Lignon, S., Mathis, H., Sigoillot, J.C., Monot, F., Asther, M., **2008**. Comparative secretome analyses of two *Trichoderma reesei* RUT-C30 and CL847 hypersecretory strains. *Biotechnol. Biofuels*, 1:18.
- Ho, A. L., Kosik, O., Lovegrove, A., Charalampopoulos, D., Rastall, R. A., **2018**. In vitro fermentability of xylo-oligosaccharide and xylo-polysaccharide fractions with different molecular weights by human faecal bacteria. *Carbohydr. Polym.*, 179:50–58.
- Hofman, D. L., van Buul, V. J., Brouns, F. J. P. H., **2016**. Nutrition, health, and regulatory aspects of digestible maltodextrins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 56:2091–2100.
- Holtzapple, M. T., **2003**. Hemicelluloses. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 207–214.
- Hong, K. B., Kim, J. H., Kwon, H. K., Han, S. H., Park, Y., Suh, H. J., **2016**. Evaluation of prebiotic effects of high-purity galactooligosaccharides in vitro and in vivo. *Food Technol. Biotechnol.*, 54:156–163.
- Hou, J., Qiu, C., Shen, Y., Li, H., Bao, X., **2017**. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the efficient co-utilization of glucose and xylose. *FEMS Yeast Res.*, 17:4.

- Hu, ML., Zha, J., He, LW., Lv, YJ., Shen, MH., Zhong, C., Li, BZ., Yuan, YJ., **2016**. Enhanced bioconversion of cellobiose by industrial *Saccharomyces cerevisiae* used for cellulose utilization. *Front. Microbiol.*, 7:241.
- Hu, Y., Winter, V., Chen, X. Y., Gänzle, M. G., **2017**. Effect of acceptor carbohydrates on oligosaccharide and polysaccharide synthesis by dextransucrase DsrM from *Weissella cibaria*. *Food Res. Int.*, 99:603–611.
- Hu, Y., Ketabi, A., Buchko, A., Gänzle, M. G., **2013**. Metabolism of isomalto-oligosaccharides by *Lactobacillus reuteri* and bifidobacteria. *Let. Appl. Microbiol.*, 57:108–114.
- Iancu, C. V., Zamoon, J., Woo, S. B., Aleshin, A., Choe, Jy., **2013**. Crystal structure of a glucose/H⁺ symporter and its mechanism of action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 110:17862–17867.
- Idris, A. S. O., Pandey, A., Rao, S. S., Sukumaran, R. K., **2017**. Cellulase production through solid-state tray fermentation, and its use for bioethanol from sorghum stover. *Bioresour. Technol.*, 242:265–271.
- Inokuma, K., Yoshida, T., Ishii, J., Hasunuma, T., Kondo, A., **2015**. Efficient co-displaying and artificial ratio control of α -amylase and glucoamylase on the yeast cell surface by using combinations of different anchoring domains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 99:1655–1663.
- Inokuma, K., Hasunuma, T., Kondo, A., **2014**. Efficient yeast cell-surface display of exo- and endo-cellulase using the SED1 anchoring region and its original promoter. *Biotechnol. Biofuels*, 7:8.
- Isorna, P., Polaina, J., Latorre-García, L., Cañada, F. J., González, B., Sanz-Aparicio, J., **2007**. Crystal Structures of *Paenibacillus polymyxa* β -Glucosidase B complexes reveal the molecular basis of substrate

BIBLIOGRAFÍA

- specificity and give new insights into the catalytic machinery of Family I glycosidases. *J. Mol. Biol.*, 371:1204–1218.
- Ivanova, C., Bååth, J. A., Seiboth, B., Kubicek, C. P., **2013**. Systems analysis of lactose metabolism in *Trichoderma reesei* identifies a lactose permease that is essential for cellulase induction. *PLoS ONE*, 8:e62631.
- Jalak, J., Kurašin, M., Teugjas, H., Väljamäe, P., **2012**. Endo-exo synergism in cellulose hydrolysis revisited. *J. Biol. Chem.*, 287:28802–28815.
- Janeček, Š., Svensson, B., MacGregor, E. A., **2014**. α -Amylase: An enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases. *Cell. Mol. Life Sci.*, 71:1149–1170.
- Jansen, M. L. A., Bracher, J. M., Papapetridis, I., Verhoeven, M. D., de Bruijn, H., de Waal, P. P., van Maris, A. J. A., Klaassen, P., Pronk, J. T., **2017**. *Saccharomyces cerevisiae* strains for second-generation ethanol production: from academic exploration to industrial implementation. *FEMS Yeast Res.*, 17:5.
- Jansook, P., Ogawa, N., Loftsson, T., **2017**. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm.*, 535:272–284.
- Jeon, E., Hyeon, J. E., Eun, L. S., Park, B. S., Kim, S. W., Lee, J., Han, S. O., **2009**. Cellulosic alcoholic fermentation using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* engineered for the production of *Clostridium cellulovorans* endoglucanase and *Saccharomycopsis fibuligera* beta-glucosidase. *FEMS Microbiol. Lett.*, 301:130–136.
- Jiang, Y., Fu, C., Wu, S., Liu, G., Guo, J., Su, Z., **2017**. Determination of the deacetylation degree of chitooligosaccharides. *Marine Drugs*, 15:332.

- Jojima, T., Omumasaba, C. A., Inui, M., Yukawa, H., **2010**. Sugar transporters in efficient utilization of mixed sugar substrates: Current knowledge and outlook. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85:471–480.
- Jordan, D. B., Bowman, M. J., Braker, J. D., Dien, B. S., Hector, R. E., Lee, C. C., Mertens, J. A., Wagschal, K., **2012**. Plant cell walls to ethanol. *Biochem. J.*, 442:241–252.
- Jung, W. J., Park, R. D., **2014**. Bioproduction of chitooligosaccharides: present and perspectives. *Marine Drugs*, 12:5328–5356.
- Karkehabadi, S., Helmich, K. E., Kaper, T., Hansson, H., Mikkelsen, N. E., Gudmundsson, M., Piens, K., Fuldala, M., Banerjee, G., Scott-Craig, J. S., Walton, J. D., Phillips, G. N., Sandgren, M., **2014**. Biochemical characterization and crystal structures of a fungal family 3 β -glucosidase, Cel3A from *Hypocrea jecorina*. *J. Biol. Chem.*, 289:31624–31637.
- Katahira, S., Mizuike, A., Fukuda, H., Kondo, A., **2006**. Ethanol fermentation from lignocellulosic hydrolysate by a recombinant xylose- and cellooligosaccharide-assimilating yeast strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 72:1136–1143.
- Katapodis, P. et al., **2003**. Enzymic production of a feruloylated oligosaccharide with antioxidant activity from wheat flour arabinoxylan. *Eur. J. Nutr.*, 42:55–60.
- Katapodis, P., Christakopoulos, P., **2008**. Enzymic production of feruloyl xylo-oligosaccharides from corn cobs by a family 10 xylanase from *Thermoascus aurantiacus*. *LWT - Food Sci. Technol.*, 41:1239–1243.

BIBLIOGRAFÍA

- Kawaguchi, T., Enoki, T., Tsurumaki, S., Sumitani, Ji., Ueda, M., Ooi, T., Arai, M., **1996**. Cloning and sequencing of the cDNA encoding β -glucosidase 1 from *Aspergillus aculeatus*. *Gene*, 173:287–288.
- Kawai, R., Yoshida, M., Tani, T., Igarashi, K., Ohira, T., Nagasawa, H., Samejima, M., **2003**. Production and characterization of recombinant *Phanerochaete chrysosporium* β -glucosidase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67:1–7.
- Ketabi, A., Dieleman, L. A., Gänzle, M. G., **2011**. Influence of isomaltoligosaccharides on intestinal microbiota in rats. *J. Appl. Microbiol.*, 110:1297–1306.
- Ketudat Cairns, J. R., Esen, A., **2010**. β -Glucosidases. *Cell. Mol. Life Sci.*, 67:3389–3405.
- Khademi, S., Zhang, D., Swanson, S. M., Wartenberg, A., Witte, K., Meyer, E. F., **2002**. Determination of the structure of an endoglucanase from *Aspergillus niger* and its mode of inhibition by palladium chloride. *Acta Cryst.*, 58:660–667.
- Kim, H., Lee, WH., Galazka, J. M., Cate, J. H. D., Jin, YS., **2014**. Analysis of cellodextrin transporters from *Neurospora crassa* in *Saccharomyces cerevisiae* for cellobiose fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98:1087–1094.
- Kim, HJ., Lee, SH., Go, HN., Ahn, JR., Kim, HJ., Hong, SJ., **2017**. Effects of kestose on gut mucosal immunity in an atopic dermatitis mouse model. *J. Dermatol. Sci.* 1: 27-32.
- Kinoshita, T., Fujita, M., **2016**. Biosynthesis of GPI-anchored proteins: special emphasis on GPI lipid remodeling. *J. Lipid Res.*, 57:6–24.

- Kishino, E., Takemura, N., Masaki, H., Ito, T., Nakazawa, M., **2015**. Dietary lactosucrose suppresses influenza A (H1N1) virus infection in mice. *Biosci. Microbiota. Food Health*, 34:67–76.
- Klein-Marcuschamer, D., Oleskowicz-Popiel, P., Simmons, B. A., Blanch, H. W., **2012**. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. *Biotechnol. Bioeng.*, 109:1083–1087.
- Kobayashi, I., Tokuda, M., Hashimoto, H., Konda, T., Nakano, H., Kitahata, S., **2003**. Purification and characterization of a new type of α -glucosidase from *Paecilomyces lilacinus* that has transglucosylation activity to produce α -1,3- and α -1,2-linked oligosaccharides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67:29–35.
- Kohmoto, T., Tsuji, K., Kaneko, T., Shiota, M., Fukui, F., Takaku, H., Nakagawa, Y., Ichikawa, T., Kohmoto, T., Tsuji, K., Kaneko, T., Shiota, M., Fukui, F., **1992**. Metabolism of ¹³C-isomaltooligosaccharides in healthy men. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56:937–940.
- Kojima, M., Okamoto, K., Yanase, H., **2013**. Direct ethanol production from cellulosic materials by *Zymobacter palmae* carrying *Cellulomonas* endoglucanase and *Ruminococcus* β -glucosidase genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97:5137–5147.
- Koshland, D. E., **1953**. Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. *Biological Reviews*, 28:416–436.
- Kotaka, A., Bando, H., Kaya, M., Kato-Murai, M., Kuroda, K., Sahara, H., Hata, Y., Kondo, A., Ueda, M., **2008**. Direct ethanol production from barley β -glucan by sake yeast displaying *Aspergillus oryzae* β -glucosidase and endoglucanase. *J. Biosci. Bioeng.*, 105:622–627.

BIBLIOGRAFÍA

- Kricka, W., Fitzpatrick, J., Bond, U., **2015**. Challenges for the production of bioethanol from biomass using recombinant yeasts. *Adv. Appl. Microbiol.*, 92:89–125.
- Krogh, K. B. R. M., 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*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 86:143–154.
- Kumar, R., Wyman, C. E., **2009**. Effect of enzyme supplementation at moderate cellulase loadings on initial glucose and xylose release from corn stover solids pretreated by leading technologies. *Biotechnol. Bioeng.*, 102:457–467.
- Lafraya, Á., Sanz-Aparicio, J., Polaina, J., Marín-Navarro, J., **2011**. Fructo-oligosaccharide synthesis by mutant versions of *Saccharomyces cerevisiae* invertase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77:6148–6157.
- Larue, K., Melgar, M., Martin, V. J. J., **2016**. Directed evolution of a fungal β -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels*, 9:52.
- Latorre-García, L., Del Castillo-Agudo, L., Polaina, J., **2007**. Taxonomical classification of yeasts isolated from kefir based on the sequence of their ribosomal RNA genes. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 23:785–791.
- Leandro, M. J., Gonçalves, P., Spencer-Martins, I., **2006**. Two glucose/xylose transporter genes from the yeast *Candida intermedia*: first molecular characterization of a yeast xylose–H⁺ symporter. *Biochem. J.*, 395:543–549.

- Lee, DS., Lee, JM., Kim, SU., Chang, KT., Lee, SH., **2007**. Ceftezole, a cephem antibiotic, is an α -glucosidase inhibitor with in vivo anti-diabetic activity. *Int. J. Mol. Med.*, 20:379–383.
- Lee, H. C., Kim, J. H., Kim, S. Y., Lee, J. K., **2008**. Isomaltose production by modification of the fructose-binding site on the basis of the predicted structure of sucrose isomerase from “*Protaminobacter rubrum*.” *Appl. Environ. Microbiol.*, 74:5183–5194.
- Lee, WH., Jin, YS., **2017**. Evaluation of ethanol production activity by engineered *Saccharomyces cerevisiae* fermenting cellobiose through the phosphorolytic pathway in simultaneous saccharification and fermentation of cellulose. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 27:1649–1656.
- Lehmann, L., Rønneest, N. P., Jørgensen, C. I., Olsson, L., Stocks, S. M., Jørgensen, H. S., Hobbey, T., **2016**. Linking hydrolysis performance to *Trichoderma reesei* cellulolytic enzyme profile. *Biotechnol. Bioeng.*, 113:1001–1010.
- Lennartsson, P. R., Erlandsson, P., Taherzadeh, M. J., **2014**. Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products. *Bioresour. Technol.*, 165:3–8.
- Li, D., Li, X., Dang, W., Tran, P. L., Park, SH., Oh, BC., Hong, WS., Lee, JS., Park, KH, **2013a**. Characterization and application of an acidophilic and thermostable β -glucosidase from *Thermofilum pendens*. *J. Biosci. Bioeng.*, 115:490–496.
- Li, J., Liu, G., Chen, M., Li, Z., Qin, Y., Qu, Y., **2013b**. Cellodextrin transporters play important roles in cellulase induction in the cellulolytic fungus *Penicillium oxalicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97:10479–10488.

BIBLIOGRAFÍA

- Li, S., Du, J., Sun, J., Galazka, J. M., Glass, N. L., Cate, J. H. D., Yang, X., Zhao, H., **2010**. Overcoming glucose repression in mixed sugar fermentation by co-expressing a cellobiose transporter and a β -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. BioSyst.*, 6:2129–2132.
- Li, W., Yu, S., Zhang, T., Jiang, B., Stressler, T., Fischer, L., Mu, W., **2015**. Efficient biosynthesis of lactosucrose from sucrose and lactose by the purified recombinant levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC. *J. Agric. Food Chem.*, 63:9755–9763.
- Li, Y., Liu, C., Bai, F., Zhao, X., **2016**. Overproduction of cellulase by *Trichoderma reesei* RUT C30 through batch-feeding of synthesized low-cost sugar mixture. *Bioresour. Technol.*, 216:503–510.
- Li, YJ., Zhao, GY., Du, W., Zhang, TJ., **2009**. Effect of dietary isomaltooligosaccharides on nutrient digestibility and concentration of glucose, insulin, cholesterol and triglycerides in serum of growing pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 151:312–315.
- Lian, J., Li, Y., Hamedirad, M., Zhao, H., **2014**. Directed evolution of a cellodextrin transporter for improved biofuel production under anaerobic conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*, 111:1521–1531.
- Liao, G., Zhou, Z., Burgula, S., Liao, J., Yuan, C., Wu, Q., Guo, Z., **2015**. Synthesis and immunological studies of linear oligosaccharides of β -glucan as antigens for antifungal vaccine development. *Bioconjugate Chem.*, 26:466–476.
- Lin, CJ., Pan, CF., Ju, SY., Tzeng, HK., Chen, SW., Syu, JT., Wu, CJ., **2016**. Assessment of the pharmacokinetics, removal rate of hemodialysis, and

- safety of lactulose in hemodialysis patients. *J. Food Drug Anal.*, 24:876–880.
- Lin, S., Pan, Y., Luo, L., Luo, L., **2011**. Effects of dietary β -1,3-glucan, chitosan or raffinose on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*). *Fish Shellfish Immunol.*, 31:788–794.
- Linde, D., Rodríguez-Colinas, B., Estévez, M., Poveda, A., Plou, F. J., Fernández Lobato, M., **2012**. Analysis of neofructooligosaccharides production mediated by the extracellular β -fructofuranosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Bioresour. Technol.*, 109:123–130.
- Liu, Y., Yoshida, M., Kurakata, Y., Miyazaki, T., Igarashi, K., Samejima, M., Fukuda, K., Nishikawa, A., Tonzuka, T., **2010**. Crystal structure of a glycoside hydrolase family 6 enzyme, CcCel6C, a cellulase constitutively produced by *Coprinopsis cinerea*. *FEBS J.*, 277:1532–1542.
- Liu, Y. K., Chen, W. C., Huang, Y. C., Chang, Y. K., Chu, I. M., Tsai, S. L., Wei, Y. H., **2017**. Production of bioethanol from *Napier grass* via simultaneous saccharification and co-fermentation in a modified bioreactor. *J. Biosci. Bioeng.*, 124:184–188.
- Liu, Z., Ho, S.H., Sasaki, K., den Haan, R., Inokuma, K., Ogino, C., van Zyl, W. H., Hasunuma, T., Kondo, A., **2016**. Engineering of a novel cellulose-adherent cellulolytic *Saccharomyces cerevisiae* for cellulosic biofuel production. *Sci. Rep.*, 6:24550.
- Lombard, V., Ramulu, H. G., Drula, E., Coutinho, P. M., Henrissat, B., **2014**. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.*, 42:490–495.

BIBLIOGRAFÍA

- Louis, P., Flint, H. J., Michel, C., **2016**. How to manipulate the microbiota: prebiotics. In *Adv. Exp. Med. Biol.* Schwiertz, A., Ed. Springer: Switzerland, pp. 119–142.
- Ma, L., Zhang, J., Zou, G., Wang, C., Zhou, Z., **2011**. Enzyme and microbial technology improvement of cellulase activity in *Trichoderma reesei* by heterologous expression of a beta-glucosidase gene from *Penicillium decumbens*. *Enzyme Microb. Technol.*, 49:366–371.
- Ma, M., Okuyama, M., Sato, M., Tagami, T., Klahan, P., Kumagai, Y., Mori, H., Kimura, A., **2017**. Effects of mutation of Asn694 in *Aspergillus niger* α -glucosidase on hydrolysis and transglucosylation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 101:6399–6408.
- Madej, M. G., **2015**. Comparative sequence-function analysis of the major facilitator superfamily: The “mix-and-match” method. *Methods Enzymol.*, 557:521–549.
- Madej, M. G., Sun, L., Yan, N., Kaback, H. R., **2014**. Functional architecture of MFS D-glucose transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 111:E719–E727.
- Madsen, L. R. 2nd., Stanley, S., Swann, P., Oswald, J., **2017**. A survey of commercially available isomaltooligosaccharide-based food ingredients. *J. Food Sci.*, 82:401–408.
- Magallanes-Cruz, P. A., Flores-Silva, P. C., Bello-Perez, L. A., **2017**. Starch structure influences its digestibility: a review. *J. Food Sci.*, 82:2016–2023.
- Mäkeläinen, H., Hasselwander, O., Rautonen, N., Ouwehand, A. C., **2009**. Panose, a new prebiotic candidate. *Lett. Appl. Microbiol.*, 49:666–672.

- Malá, S., Dvoráková, H., Hrabal, R., Králová, B., **1999**. Towards regioselective synthesis of oligosaccharides by use of α -glucosidases with different substrate specificity. *Carbohydr. Res.*, 322:209–218.
- Mangas-Sánchez, J., Adlercreutz, P., **2015**. Enzymatic preparation of oligosaccharides by transglycosylation: A comparative study of glucosidases. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 122:51–55.
- Mano, M. C. R., Neri-Numa, I. A., da Silva, J. B., Paulino, B. N., Pessoa, M. G., Pastore, G. M., **2017**. Oligosaccharide biotechnology: an approach of prebiotic revolution on the industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 102:17-37.
- Maresch, C. C., Petry, S. F., Theis, S., Bosy-Westphal, A., Linn, T., **2017**. Low glycemic index prototype isomaltulose—update of clinical trials. *Nutrients*, 9:381.
- Marger, M. D., Saier, M. H., **1993**. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends Biochem. Sci.*, 18:13–20.
- Marín-Navarro, J., Gurgu, L., Alamar, S., Polaina, J., **2011**. Structural and functional analysis of hybrid enzymes generated by domain shuffling between *Saccharomyces cerevisiae* (var. diastaticus) Sta1 glucoamylase and *Saccharomycopsis fibuligera* Bgl1 β -glucosidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 89:121–130.
- Marín-Navarro, J., Roupain, N., Talens-Perales, D., Polaina, J., **2015a**. Identification and structural analysis of amino acid substitutions that increase the stability and activity of *Aspergillus niger* glucose oxidase. *PLoS ONE*, 10:e0144289.

BIBLIOGRAFÍA

- Marín-Navarro, J., Talens-Perales, D., Oude-Vrielink, A., Cañada, F. J., Polaina, J., **2014**. Immobilization of thermostable β -galactosidase on epoxy support and its use for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides biosynthesis. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 30:989–998.
- Marín-Navarro, J., Talens-Perales, D., Polaina, J., **2015b**. One-pot production of fructooligosaccharides by a *Saccharomyces cerevisiae* strain expressing an engineered invertase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 99:2549–2555.
- Martínez-Villaluenga, C., Gómez, R., **2007**. Characterization of bifidobacteria as starters in fermented milk containing raffinose family of oligosaccharides from lupin as prebiotic. *International Dairy Journal*, 17:116–122.
- Martinov, J., Krstić, M., Spasić, S., Miletić, S., Stefanović-Kojić, J., Nikolić-Kokić, A., Blagojević, D., Spasojević, I., Spasić, M. B., **2017**. Apple pectin-derived oligosaccharides produce carbon dioxide radical anion in Fenton reaction and prevent growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Res. Int.*, 100:132–136.
- Matano, Y., Hasunuma, T., Kondo, A., **2012**. Display of cellulases on the cell surface of *Saccharomyces cerevisiae* for high yield ethanol production from high-solid lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.*, 108:128–133.
- Mccarter, J. D., Withers, S. G., **1994**. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Current Biology Ltd.*, 4:885–892.
- Meleiro, L. P., Salgado, J. C. S., Maldonado, R. F., Alponi, J. S., Zimbardi, A. L. R. L., Jorge, J. A., Ward, R. J., Furriel, R. P. M., **2015**. A *Neurospora crassa* β -glucosidase with potential for lignocellulose hydrolysis shows strong

- glucose tolerance and stimulation by glucose and xylose. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 122:131-140.
- Mélida, H., Sopeña-Torres, S., Bacete, L., Garrido-Arandia, M., Jordá, L., López, G., Muñoz, A., Pacios, L. F., Molina, A., **2017**. Non-branched β -1,3-glucan oligosaccharides trigger immune responses in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 93:34–49.
- Mendes, N. F., Mariotti, F. F. N., de Andrade, J. S., de Barros Viana, M., Céspedes, I. C., Nagaoka, M. R., Le Sueur-Maluf, L., **2017**. Lactulose decreases neuronal activation and attenuates motor behavioral deficits in hyperammonemic rats. *Metabolic Brain Disease*, 32:2073–2083.
- Merino-Aguilar, H., Arrieta-Baez, D., Jiménez-Estrada, M., Magos-Guerrero, G., Hernández-Bautista, R. J., Susunaga-Notario, A. C., Almanza-Pérez, J. C., Blancas-Flores, G., Román-Ramos, R., Alarcón-Aguilar, F. J., **2014**. Effect of fructooligosaccharides fraction from *Psacalium decompositum* on inflammation and dyslipidemia in rats with fructose-induced obesity. *Nutrients*, 6:591–604.
- Merril, C. R., Goldman, D., Sedman, S. A., Ebert, M. H., **1981**. Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science*, 211:1437–1438.
- Mima, K., Ogino, S., Nakagawa, S., Sawayama, H., Kinoshita, K., Krashima, R., Ishimoto, T., Imai, K., Iwatsuki, M., Hashimoto, D., Baba, Y., Sakamoto, Y., Yamashita, Y., Yoshida, N., Chikamoto, A., Ishiko, T., Baba, H., **2017**. The role of intestinal bacteria in the development and progression of gastrointestinal tract neoplasms. *Surg. Oncol.*, 26:368–376.

BIBLIOGRAFÍA

- Moller, M. S., Fredslund, F., Majumder, A., Nakai, H., Poulsen, J. C. N., Leggio, L. L., Svensson, B., Hachem, M. A., **2012**. Enzymology and structure of the GH13_31 glucan 1,6- α -glucosidase that confers isomaltooligosaccharide utilization in the probiotic *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *J. Bacteriol.*, 194:4249–4259.
- Mu, W., Chen, Q., Wang, X., Zhang, T., Jiang, B., **2013**. Current studies on physiological functions and biological production of lactosucrose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97:7073–7080.
- Mukai, K., Watanabe, H., Oku, K., Nishimoto, T., Kubota, M., Chaen, H., Fukuda, S., Kurimoto, M., **2005**. An enzymatically produced novel cyclic tetrasaccharide, cyclo- $\{\rightarrow 6\}$ - α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow) (cyclic maltosyl-(1 \rightarrow 6)-maltose), from starch. *Carbohydr. Res.*, 340:1469–1474.
- Mukai, K., Watanabe, H., Kubota, M., Chaen, H., Fukuda, S., **2006**. Purification, characterization, and gene cloning of a novel maltosyltransferase from an *Arthrobacter globiformis* strain that produces an alternating α -1,4- and α -1,6-cyclic tetrasaccharide from starch. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72:1065–1071.
- Mumberg, D., Müller, R., Funk, M., **1995**. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene*, 156:119–122.
- Na, S., Park, M., Jo, I., Cha, J., Ha, N.C., **2017**. Structural basis for the transglycosylase activity of a GH57-type glycogen branching enzyme from *Pyrococcus horikoshii*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 484:850–856.

- Nakamura, N., Yamada, R., Katahira, S., Tanaka, T., Fukuda, H., Kondo, A., **2008**. Effective xylose/cellobiose co-fermentation and ethanol production by xylose-assimilating *S. cerevisiae* via expression of β -glucosidase on its cell surface. *Enzyme Microb. Technol.*, 43:233–236.
- Naumov, G. I., Naumova, E. S., Michels, C. A., **1994**. Genetic variation of the repeated MAL loci in natural populations of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus*. *Genetics*, 136:803–812.
- Ni, J., Tokuda, G., Takehara, M., Watanabe, H., **2007**. Heterologous expression and enzymatic characterization of β -glucosidase from the drywood-eating termite, *Neotermes koshunensis*. *Appl. Entomol. Zool.*, 42:457–463.
- Nieves, R. A., Ehrman, C. I., Adney, W. S., Elander, R. T., Himmel, M. E., **1998**. Technical communication: survey and analysis of commercial cellulase preparation suitable for biomass conversion to ethanol. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 14:301–304.
- Niittynen, L., Kajander, K., Korpela, R., **2007**. Galacto-oligosaccharides and bowel function. *Scandinavian Journal of Food and Nutrition*, 51:62–66.
- Nishimoto, T., Aga, H., Mukai, K., Hashimoto, T., Watanabe, H., Kubota, M., Fukuda, S., Kurimoto, M., Tsujisaka, Y., **2002**. Purification and characterization of glucosyltransferase and glucanotransferase involved in the production of cyclic tetrasaccharide in *Bacillus globisporus* C11. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66:1806–1818.
- Njokweni, A. P., Rose, S. H., van Zyl, W. H., **2012**. Fungal β -glucosidase expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 39:1445–1452.

BIBLIOGRAFÍA

- Nordberg, H., Cantor, M., Dusheyko, S., Hua, S., Poliakov, A., Shabalov, I., Smirnova, T., Grigoriev, I. V., Dubchak, I., **2014**. The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 updates. *Nucleic Acids Res.*, 42:26–31.
- Novy, V., Longus, K., Nidetzky, B., **2015**. From wheat straw to bioethanol: integrative analysis of a separate hydrolysis and co-fermentation process with implemented enzyme production. *Biotechnol. Biofuels*, 8:46.
- Oguma, T., Tobe, K., Kobayashi, M., **1994**. Purification and properties of a novel enzyme from *Bacillus spp.* T-3040, which catalyzes the conversion of dextran to cyclic isomaltooligosaccharides. *FEBS Lett.*, 345:135–138.
- Olson, D. G., McBride, J. E., Shaw, A. J., Lynd, L. R., **2012**. Recent progress in consolidated bioprocessing. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 23:396–405.
- Orłowski, A., Róg, T., Paavilainen, S., Manna, M., Heiskanen, I., Backfolk, K., Timonen, J., Vattulainen, I., **2015**. How endoglucanase enzymes act on cellulose nanofibrils: role of amorphous regions revealed by atomistic simulations. *Cellulose*, 22:2911–2925.
- Painbeni, E., Valles, S., Polaina, J., Flors, A., **1992**. Purification and characterization of a *Bacillus polymyxa* β -glucosidase expressed in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 174:3087–3091.
- Pan, S., Ding, N., Ren, J., Gu, Z., Li, C., Hong, Y., Cheng, L., Holler, T. P., Li, Z., **2017**. Malttooligosaccharide-forming amylase: Characteristics, preparation, and application. *Biotechnol. Adv.*, 35:619–632.

- Pan, YC., Lee, WC., **2005**. Production of high-purity isomalto-oligosaccharides syrup by the enzymatic conversion of transglucosidase and fermentation of yeast cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 89:797–804.
- Pao, S. S., Paulsen, I. T., Saier, M. H., **1998**. Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62:1–34.
- Parisutham, V., Kim, T. H., Lee, S. K., **2014**. Feasibilities of consolidated bioprocessing microbes: From pretreatment to biofuel production. *Bioresour. Technol.*, 161:431–440.
- Paulova, L., Patakova, P., Branska, B., Rychtera, M., Melzoch, K., **2015**. Lignocellulosic ethanol: technology design and its impact on process efficiency. *Biotechnol. Adv.*, 33:1091–1107.
- Pérez, S., Bertoft, E., **2010**. The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. *Starch*, 62:389–420.
- Polaina, J., Adam, A. C., **1991**. A fast procedure for yeast DNA purification. *Nucleic Acids Res.*, 19:5443.
- Porciuncula, J. O., Furukawa, T., Shida, Y., Mori, K., Kuhara, S., Morikawa, Y., Ogasawara, W., **2013**. Identification of major facilitator transporters involved in cellulase production during lactose culture of *Trichoderma reesei* PC-3-7. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77:1014–1022.
- Portalatin, M., Winstead, N., **2012**. Medical management of constipation. *Clin. Colon Rectal Surg.*, 25:12–19.
- Porter, N. T., Martens, E. C., **2017**. The critical roles of polysaccharides in gut microbial ecology and physiology. *Annu. Rev. Microbiol.*, 71:349–369.

BIBLIOGRAFÍA

- Pranckute, R., Kaunietis, A., Kuisiene, N., Čitavičius, D., **2014**. Development of synbiotics with inulin, palatinose, α -cyclodextrin and probiotic bacteria. *Pol. J. Microbiol.*, 63:33–41.
- Prestegard, J. H., Liu, J., Widmalm, G., **2017**. Oligosaccharides and Polysaccharides. In *Essentials of Glycobiology*. Consortium of Glycobiology, Ed. Cold Spring Harbor: NY, pp. 31–40.
- Rajput, K. N., Patel, K. C., Trivedi, U. B., **2016**. β -cyclodextrin production by cyclodextrin glucanotransferase from an alkaliphile *Microbacterium terrae* KNR 9 using different starch substrates. *Biotechnol. Res. Int.*, 2034359.
- Raman, R., Raguram, S., Venkataraman, G., Paulson, J. C., Sasisekharan, R., **2005**. Glycomics: An integrated systems approach to structure-function relationships of glycans. *Nat. Methods*, 2:817–824.
- Ramírez-Escudero, M., Del Pozo, M. V., Marín-Navarro, J., González, B., Golyshin, P. N., Polaina, J. Ferrer, M., Sanz-Aparicio, J., **2016**. Structural and functional characterization of a ruminal β -glycosidase defines a novel subfamily of glycoside hydrolase family 3 with permuted domain topology. *J. Biol. Chem.*, 291:24200–24214.
- Rana, V., Eckard, A. D., Ahring, B. K., **2014**. Comparison of SHF and SSF of wet exploded corn stover and loblolly pine using in-house enzymes produced from *T. reesei* RUT C30 and *A. saccharolyticus*. *Springerplus*, 3:516.
- Reddy, S. V., More, S. S., Annappa, G. S., **2017**. Purification and properties of beta-cyclomalto-dextrin glucanotransferase from *Bacillus flexus* SV 1. *J. Basic Microbiol.*, 57:974–981.

- Ren, J.L., Sun, R.C., **2010**. Hemicelluloses. In *Cereal straw as a resource for sustainable biomaterials and biofuels*. Sun, R., Ed. Elsevier, pp. 131-167.
- Ries, L., Pullan, S. T., Delmas, S., Malla, S., Blythe, M. J., Archer, D. B., **2013**. Genome-wide transcriptional response of *Trichoderma reesei* to lignocellulose using RNA sequencing and comparison with *Aspergillus niger*. *BMC Genomics*, 14:541.
- Rodríguez-Díaz, J., Monedero, V., Yebra, M. J., **2001**. Utilization of natural fucosylated oligosaccharides by three novel α -L-fucosidases from a probiotic *Lactobacillus casei* strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77:703-705.
- Rosgaard, L., Pedersen, S., Langston, J., Akherhielm, D., Cherry, J. R., Meyer, A. S., **2007**. Evaluation of minimal *Trichoderma reesei* cellulase mixtures on differently pretreated barley straw substrates. *Biotechnol. Prog.*, 23:1270–1276.
- Roy, A., Kucukural, A., Zhang, Y., **2010**. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.*, 5:725–738.
- Rudeekulthamrong, P., Sawasdee, K., Kaulpiboon, J., **2013**. Production of long-chain isomaltooligosaccharides from maltotriose using the thermostable amyломaltase and transglucosidase enzymes. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 18:778–786.
- Sabater-Molina, M., Larqué, E., Torrella, F., Zamora, S., **2009**. Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health. *J. Physiol. Biochem.*, 65:315–328.

BIBLIOGRAFÍA

- Sadie, C. J., Rose, S. H., den Haan, R., van Zyl, W. H., **2011**. Co-expression of a cellobiose phosphorylase and lactose permease enables intracellular cellobiose utilisation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 90:1373–1380.
- Saini, R., Saini, H. S., Dahiya, A., **2017**. Amylases: characteristics and industrial applications. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6:1865–1871.
- Saitoh, S., Hasunuma, T., Tanaka, T., Kondo, A., **2010**. Co-fermentation of cellobiose and xylose using beta-glucosidase displaying diploid industrial yeast strain OC-2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 87:1975–1982.
- Samanta, A. K., Jayapal, N., Jayaram, C., Roy, S., Kolte, A. P., Senani, S., Sridhar, M., **2015**. Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 5:62–71.
- Santos-Moriano, P., Fernandez-Arrojo, L., Mengibar, M., Belmonte-Reche, E., Peñalver, P., Acosta, F. N., Ballesteros, A. O., Morales, J. C., Kidibule, P., Fernandez-Lobato, M., Plou, F. J., **2017**. Enzymatic production of fully deacetylated chitoooligosaccharides and their neuroprotective and anti-inflammatory properties. *Biocatal. Biotransform*, 1–11.
- Sanz-Aparicio, J., Hermoso, J. A., Martínez-Ripoll, M., Lequerica, J. L., Polaina, J., **1998**. Crystal structure of β -glucosidase A from *Bacillus polymyxa*: insights into the catalytic activity in family 1 glycosyl hydrolases. *J. Mol. Biol.*, 275:491–502.

- Scheer, M., Grote, A., Chang, A., Schomburg, I., Munaretto, C., Stelzer, M., Thiele, J., Rother, M., So, C., Schomburg, D., **2011**. BRENDA, the enzyme information system in 2011. *Nucleic Acids Res.*, 39:670–676.
- Seidle, H. F., Marten, I., Shoseyov, O., Huber, R. E., **2004**. Physical and kinetic properties of the family 3 β -glucosidase from *Aspergillus niger* which is important for cellulose breakdown. *Protein J.*, 23:11–23.
- Seidle, H. F., Allison, S. J., George, E., Huber, R. E., **2006**. Trp-49 of the family 3 β -glucosidase from *Aspergillus niger* is important for its transglucosidic activity: Creation of novel β -glucosidases with low transglucosidic efficiencies. *Arch. Biochem. Biophys.*, 455:110–118.
- Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, C. M., Finlay, B. B., **2010**. Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev.*, 90:859–904.
- Sethi, S., Datta, A., Gupta, B. L., Gupta, S., **2013**. Optimization of cellulase production from bacteria isolated from soil. *ISRN Biotechnol.*, 985685.
- Shi, Q., Hou, Y., Juvonen, M., Kajala, I., Shukla, S., Goyal, A., Maaheimo, H., Katina, K., Tenkanen, M., **2016**. Optimization of isomaltooligosaccharide size distribution by acceptor reaction of *Weissella confusa* dextransucrase and characterization of Novel α -(1 \rightarrow 2)-branched isomaltooligosaccharides. *J. Agric. Food Chem.*, 64:3276–3286.
- Shibafuji, Y., Nakamura, A., Uchihashi, T., Sugimoto, N., Fukuda, S., Watanabe, H., Samejima, M., Ando, T., Noji, H., Koivula, A., Igarashi, K., Iino, R., **2014**. Single-molecule imaging analysis of elementary reaction steps of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I (Cel7A) hydrolyzing crystalline cellulose Ia and III. *J. Biol. Chem.*, 289:14056–14065.

BIBLIOGRAFÍA

- Shimoi, H., Kitagaki, H., Ohmori, H., Iimura, Y., Ito, K., **1998**. Sed1p is a major cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase and is involved in lytic enzyme resistance. *J. Bacteriol.*, 180:3381–3387.
- Shoaf, K., Mulvey, G. L., Armstrong, G. D., Hutkins, R. W., **2006**. Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to tissue culture cells. *Infect. Immun.*, 74:6920–6928.
- Siebold, C., Flükiger, K., Beutler, R., Erni, B., **2001**. Carbohydrate transporters of the bacterial phosphoenolpyruvate: Sugar phosphotransferase system (PTS). *FEBS Lett.*, 504:104–111.
- Sinclair, H. R., De Slegte, J., Gibson, G. R., Rastall, R. A., **2009**. Galactooligosaccharides (GOS) inhibit vibrio cholerae toxin binding to its GM1 receptor. *J. Agric. Food Chem.*, 57:3113–3119.
- Singh, P., Medronho, B., Valente, A. J. M., Miguel, M. G., Lindman, B., **2017**. Exploring the prebiotic effect of cyclodextrins on probiotic bacteria entrapped in carboxymethyl cellulose-chitosan particles. *Colloids Surf. B Biointerfaces*.
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Sukumaran, R. K., Larroche, C., Pandey, A., **2013**. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresour. Technol.*, 127:500–507.
- Slavin, J., **2013**. Fiber and prebiotics: Mechanisms and health benefits. *Nutrients*, 5:1417–1435.
- Song, KM., Okuyama, M., Nishimura, M., Mori, H., Kimura, A., **2013**. Aromatic residue on $\beta \rightarrow \alpha$ loop 1 in the catalytic domain is important to the transglycosylation specificity of glycoside hydrolase family 31 α -glucosidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77:1759–1765.

- Sørensen, A., Lübeck, M., Lübeck, P. S., Ahring, B. K., **2013**. Fungal beta-glucosidases: a bottleneck in industrial use of lignocellulosic materials. *Biomolecules*, 3:612–631.
- Sorndech, W., Sagnelli, D., Blennow, A., Tongta, S., **2017a**. Combination of amylase and transferase catalysis to improve IMO compositions and productivity. *LWT - Food Sci. Technol.*, 79:479–486.
- Sorndech, W., Tongta, S., Blennow, A., **2017b**. Slowly digestible- and non-digestible α -glucans: an enzymatic approach to starch modification and nutritional effects. *Starch*, 1700145.
- Steenbakkens, P. J. M., Harhangi, H. R., Bosscher, M. W., van der Hoof, M. M. C., Keltjens, J. T., van der Drift, C., Vogels, G. D., op den Camp, H. J. M., **2003**. β -glucosidase in cellulosome of the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2 is a family 3 glycoside hydrolase. *Biochem. J.*, 370:963–970.
- Steenoft, C., Vakhrushev, S. Y., Joshi, H. J., Kong, Y., Vester-Christensen, M. B., Schjoldager, K. T-BG., Lavrsen, K., Dabelsteen, S., Pedersen, N. B., Marcos-Silva, L., Gupta, R., Bennett, E. P., Mandel, U., Brunak, S., Wandall, H. H., Lavery, S. B., Clausen, H., **2013**. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO J.*, 32:1478–1488.
- Sternberg, D., Mandels, G. R., **1979**. Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose. *J. Bacteriol.*, 139:761–769.
- Suzuki, N., Fujimoto, Z., Kim, Y.M., Momma, M., Kishine, N., Suzuki, R., Suzuki, S., Kitamura, S., Kobayashi, M., Kimura, A., Funane, K., **2014**. Structural elucidation of the cyclization mechanism of α -1,6-Glucan by *Bacillus*

BIBLIOGRAFÍA

- circulans* T-3040 cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase. *J. Biol. Chem.*, 289:12040–12051.
- Tagami, T., Yamashita, K., Okuyama, M., Mori, H., Yao, M., Kimura, A., **2013**. Molecular basis for the recognition of long-chain substrates by plant α -glucosidases. *J. Biol. Chem.*, 288:19296–19303.
- Tagami, T., Yamashita, K., Okuyama, M., Mori, H., Yao, M., Kimura, A., **2015**. Structural advantage of sugar beet α -glucosidase to stabilize the Michaelis complex with long-chain substrate. *J. Biol. Chem.*, 290:1796–1803.
- Taher, I. B., Fickers, P., Chniti, S., Hassouna, M., **2017**. Optimization of enzymatic hydrolysis and fermentation conditions for improved bioethanol production from potato peel residues. *Biotechnol. Prog.*, 33:397–406.
- Takasugi, S., Shioyama, M., Kitade, M., Nagata, M., Yamaji, T., **2016**. Effects of proton pump inhibitor administration and intake of a combination of yogurt and galactooligosaccharides on bone and mineral metabolism in rats. *Nutrients*, 8:653.
- Talens-Perales, D., Polaina, J., Marín-Navarro, J., **2016**. Enzyme engineering for oligosaccharide biosynthesis. In *Frontier Discoveries and Innovations in Interdisciplinary Microbiology*. Shukla P., Ed. Springer: India, pp. 9–31.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., Kumar, S., **2013**. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 30:2725–2729.
- Tang, H., Hou, J., Shen, Y., Xu, L., Yang, H., Fang, X., Bao, X., **2013**. High β -glucosidase secretion in *Saccharomyces cerevisiae* improves the efficiency of cellulase hydrolysis and ethanol production in

- simultaneous saccharification and fermentation. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 23:1577–1585.
- Tenenbaum, D. J., **2008**. Food vs. fuel diversion of crops could cause more hunger. *Environ. Health Perspect.*, 116:254–257.
- Teramoto, F., Rokutan, K., Sugano, Y., Oku, K., Kishino, E., Fujita, K., Hara, K., Kishi, K., Fukunaga, M., Morita, T., **2006**. Long-term administration of 4G- β -D-galactosylsucrose (lactosucrose) enhances intestinal calcium absorption in young women: a randomized, placebo-controlled 96-wk study. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 52:337–346.
- Teugjas, H., Våljamäe, P., **2013a**. Product inhibition of cellulases studied with ¹⁴C-labeled cellulose substrates. *Biotechnol. Biofuels*, 6:104.
- Teugjas, H., Våljamäe, P., **2013b**. Selecting β -glucosidases to support cellulases in cellulose saccharification. *Biotechnol. Biofuels*, 6:105.
- Thongpoo, P., McKee, L. S., Araújo, A. C., Kongsaree, P. T., Brumer, H., **2013**. Identification of the acid/base catalyst of a glycoside hydrolase family 3 (GH3) β -glucosidase from *Aspergillus niger* ASKU28. *Biochim. Biophys. Acta*, 1830:2739–2749.
- Tiwari, P., Misra, B. N., Sangwan, N. S., **2013**. β -glucosidases from the fungus *Trichoderma*: an efficient cellulase machinery in biotechnological applications. *Biomed. Res. Int.*, 203735.
- Tomei, J., Helliwell, R., **2016**. Food versus fuel? Going beyond biofuels. *Land Use Policy*, 56:320–326.
- Treebupachatsakul, T., Nakazawa, H., Shinbo, H., Fujikawa, H., Nagaiwa, A., Ochiai, N., Kawaguchi, T., Nikaido, M., Totani, K., Shioya, K., Shida, Y., Morikawa, Y., Ogasawara, W., Okada, H., **2016**. Heterologously

BIBLIOGRAFÍA

- expressed *Aspergillus aculeatus* β -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae* is a cost-effective alternative to commercial supplementation of β -glucosidase in industrial ethanol production using *Trichoderma reesei* cellulases. *J. Biosci. Bioeng.*, 121:27–35.
- Tsai, S. L., Oh, J., Singh, S., Chen, R., Chen, W., **2009**. Functional assembly of minicellulosomes on the *Saccharomyces cerevisiae* cell surface for cellulose hydrolysis and ethanol production. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75:6087–6093.
- Tsukada, T., Igarashi, K., Yoshida, M., Samejima, M., **2006**. Molecular cloning and characterization of two intracellular β -glucosidases belonging to glycoside hydrolase family 1 from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73:807–814.
- van Der Maarel, M. J. E. C., Leemhuis, H., **2013**. Starch modification with microbial alpha-glucanotransferase enzymes. *Carbohydr. Polym.*, 93:116–121.
- van Der Maarel, M. J. E. C., van Der Veen, B., Uitdehaag, J. C. M., Leemhuis, H., Dijkhuizen, L., **2002**. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *J. Biotechnol.*, 94:137–155.
- Van der Vaart, J. M., te Biesebeke, R., Chapman, J. W., Toschka, H. Y., Klis, F. M., Verrips, C. T., **1997**. Comparison of cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae* as anchors for cell surface expression of heterologous proteins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:615–620.
- van Rooyen, R., Hahn-Hägerdal, B., La Grange, D. C., van Zyl, W. H., **2005**. Construction of cellobiose-growing and fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J. Biotechnol.*, 120:284–295.

- van Zyl, W. H., Lynd, L. R., den Haan, R., McBride, J. E., **2007**. Consolidated bioprocessing for bioethanol production using *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.*, 108:205–235.
- Vera, C., Córdova, A., Aburto, C., Guerrero, C., Suárez, S., Illanes, A., **2016**. Synthesis and purification of galacto-oligosaccharides: state of the art. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 32:197.
- Viikari, L., Vehmaanperä, J., Koivula, A., **2012**. Lignocellulosic ethanol: From science to industry. *Biomass and Bioenergy*, 46:13–24.
- Vijn, I., Smeekens, S., **1999**. Fructan: more than a reserve carbohydrate?. *Plant Physiology*, 120:351–360.
- Vulevic, J., Juric, A., Walton, G. E., Claus, S. P., Tzortzis, G., Toward, R. E., Gibson, G. R., **2015**. Influence of galacto-oligosaccharide mixture (B-GOS) on gut microbiota, immune parameters and metabonomics in elderly persons. *Br. J. Nutr.*, 114:586–595.
- Wada, J., Honda, Y., Nagae, M., Kato, R., Wakatsuki, S., Katayama, T., Taniguchi, H., Kumagai, H., Kitaoka, M., Yamamoto, K., **2008**. 1,2- α -L-Fucosynthase: A glycosynthase derived from an inverting α -glycosidase with an unusual reaction mechanism. *FEBS Lett.*, 582:3739–3743.
- Wang, B., Yao, M., Lv, L., Ling, Z., Li, L., **2017**. The human microbiota in health and disease. *Engineering*, 3:71–82.
- Wang, D., Li, F. L., Wang, S. A., **2016**. A one-step bioprocess for production of high-content fructo-oligosaccharides from inulin by yeast. *Carbohydr. Polym.*, 151:1220–1226.

BIBLIOGRAFÍA

- Wang, Y., Li, F., Gao, CH., Zhang, YJ., **2009**. Characterization of a novel mesophilic bacterial amylase secreted by ZW2531-1, a strain newly isolated from soil. *Chem. Res. Chinese Universities*, 25:198–202.
- Wang, Y., Li, F., Zhang, Y., **2010**. Preliminary investigation on the action modes of an oligosaccharide- producing multifunctional amylase. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 160:1955–1966.
- Weaver, C. M., Martin, B. R., Nakatsu, C. H., Armstrong, A. P., Clavijo, A., McCabe, L. D., McCabe, G. P., Duignan, S., Schoterman, M. H. C., van Den Heuvel, E. G. H. M., **2011**. Galactooligosaccharides improve mineral absorption and bone properties in growing rats through gut fermentation. *J. Agric. Food Chem.*, 59:6501–6510.
- Weijers, C. A. G. M., Franssen, M. C. R., Visser, G. M., **2008**. Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides. *Biotechnol. Adv.*, 26:436–456.
- Wen, F., Sun, J., Zhao, H., **2010**. Yeast surface display of trifunctional minicellulosomes for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76:1251–1260.
- Wheatley, R. W., Lo, S., Jancewicz, L. J., Dugdale, M. L., Huber, R. E., **2013**. Structural explanation for allolactose (lac operon inducer) synthesis by lacZ β -galactosidase and the evolutionary relationship between allolactose synthesis and the lac repressor. *J. Biol. Chem.*, 288:12993–13005.
- Wilkins, S., **2015**. Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Reports*, 7:14.

- Woodward, J., Arnold, S. L., **1981**. The inhibition of β -glucosidase activity in *Trichoderma reesei* C30 cellulase by derivatives and isomers of glucose. *Biotechnol. Bioeng.*, 23:1553–1562.
- Wu, K. Y., Huang, S. H., Zhang, Y. K., Chen, G. G., Liang, Z. Q., **2010**. Expression, purification and characterization of recombinant α -glucosidase in *Pichia pastoris*. *Folia Microbiol.*, 55:582–587.
- Wu, L., Wu, S., Qiu, J., Xu, C., Li, S., Xu, H., **2017**. Green synthesis of isomaltulose from cane molasses by *Bacillus subtilis* WB800-pHA01-pall in a biologic membrane reactor. *Food Chem.*, 229:761–768.
- Xia, W., Liu, P., Zhang, J., Chen, J., **2011**. Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydrocolloids*, 25:170–179.
- Xia, W., Bai, Y., Cui, Y., Xu, X., Qian, L., Shi, P., Zhang, W., Luo, H., Zhan, X., Yao, B., **2016**. Functional diversity of family 3 β -glucosidases from thermophilic cellulolytic fungus *Humicola insolens* Y1. *Sci. Rep.*, 6:27062.
- Yamada, R., Taniguchi, N., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., Kondo, A., **2011**. Direct ethanol production from cellulosic materials using a diploid strain of *Saccharomyces cerevisiae* with optimized cellulase expression. *Biotechnol. Biofuels*, 4:8.
- Yamada, R., Hasunuma, T., Kondo, A., **2013**. Endowing non-cellulolytic microorganisms with cellulolytic activity aiming for consolidated bioprocessing. *Biotechnol. Adv.*, 31:754–763.
- Yamamoto, T., Unno, T., Watanabe, Y., Yamamoto, M., Okuyama, M., Mori, H., Chiba, S., Kimura, A., **2004**. Purification and characterization of *Acremonium implicatum* α -glucosidase having regioselectivity for α -1,3-glucosidic linkage. *Biochim. Biophys. Acta*, 1700:189–198.

BIBLIOGRAFÍA

- Yan, N., **2013**. Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transporters. *Trends Biochem. Sci.*, 38:151–159.
- Yan, S., Wu, G., **2014**. Signal peptide of cellulase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98:5329–5362.
- Yang, Y., Zhang, X., Yin, Q., Fang, W., Fang, Z., Wang, X., Zhang, X., Xiao, Y., **2015a**. A mechanism of glucose tolerance and stimulation of GH1 β -glucosidases. *Sci. Rep.*, 5:17296.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., Arbor, A., Arbor, A., **2015b**. The I-TASSER suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods*, 12:7–8.
- Yao, G., Wu, R., Kan, Q., Gao, L., Liu, M., Yang, P., Du, J., Li, Z., **2016**. Production of a high-efficiency cellulase complex via β -glucosidase engineering in *Penicillium oxalicum*. *Biotechnol. Biofuels.*, 9:78.
- Yao, S. W., Wen, X. X., Huang, R. Q., He, R. R., Ou, S. Y., Shen, W. Z., Huang, C. H., Peng, X. C., **2014**. Protection of feruloylated oligosaccharides from corn bran against oxidative stress in PC 12 cells. *J. Agric. Food Chem.*, 62:668–674.
- Yin, Y., Jensen, M., Tajkhorshid, E., Schulten, K., **2006**. Sugar binding and protein conformational changes in lactose permease. *Biophysic. J.*, 91:3972–3985.
- Yuan, X., Wang, J., Yao, H., **2005**. Antioxidant activity of feruloylated oligosaccharides from wheat bran. *Food Chem.*, 90:759–764.
- Zhang, R., Pan, Y. T., He, S., Lam, M., Brayer, G. D., Elbein, A. D., Withers, S. G., **2011**. Mechanistic analysis of trehalose synthase from *Mycobacterium smegmatis*. *J. Biol. Chem.*, 286:35601–35609.

- Zhang, S., Hu, H., Wang, L., Liu, F., Pan, S., **2018**. Preparation and prebiotic potential of pectin oligosaccharides obtained from citrus peel pectin. *Food Chem.*, 244:232–237.
- Zhang, W., Kou, Y., Xu, J., Cao, Y., Zhao, G., Shao, J., Wang, H., Wang, Z., Bao, X., Chen, G., Liu, W., **2013**. Two major facilitator superfamily sugar transporters from *Trichoderma reesei* and their roles in induction of cellulase biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 288:32861–32872.
- Zhang, XZ., Zhang, YH., P., **2013**. Cellulases: characteristics, sources, production, and applications. In *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers*. Yang, ST., Ed, John Wiley, Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, pp. 131–146.
- Zhang, Y., **2008**. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9:40.
- Zhang, Y. H. P., Hong, J., Ye, X., **2009**. Cellulase assay. *Biofuels: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*, 581:213–231.
- Zhou, Y., Ruan, Z., Zhou, X., Huang, X., Li, H., Wang, L., Zhang, C., Deng, Z., Wu, G., Yin, Y., **2015**. Lactosucrose attenuates intestinal inflammation by promoting Th2 cytokine production and enhancing CD86 expression in colitic rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 79:643–651.

9 ANEXOS

PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS DOCTORAL

Casa-Villegas M, Marín-Navarro J, Polaina J (2017). Synergies in coupled hydrolysis and fermentation of cellulose using a *Trichoderma reesei* enzyme preparation and a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain. *World J Microbiol Biotechnol.* 33:140. DOI:10.1007/s11274-017-2308-4.

Casa-Villegas M, Marín-Navarro J, Polaina, J (2017). Synthesis of isomaltooligosaccharides by *Saccharomyces cerevisiae* cells expressing *Aspergillus niger* α -glucosidase. *ACS Omega.* 2(11):8062-8068. DOI: 10.1021/acsomega.7b01189.

Casa-Villegas M, Marín-Navarro J, Polaina, J (2018). Amylases and related glycoside hydrolases with transglycosylation activity used for the production of isomaltooligosaccharides. *Amylase.* 2(1). (ACEPTADO)

Casa-Villegas M, Polaina J, Marín-Navarro J (2018). Cellobiose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: comparative analysis of intra versus extracellular sugar hydrolysis. *Process Biochemistry.* (ENVIADO)

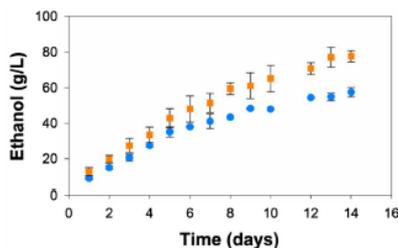
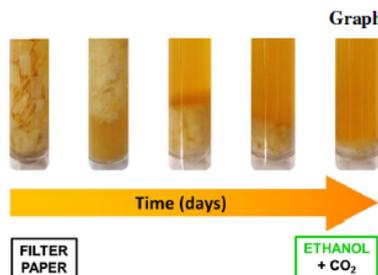
Synergies in coupled hydrolysis and fermentation of cellulose using a *Trichoderma reesei* enzyme preparation and a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain

Mary Casa-Villegas¹ · Julia Marín-Navarro^{1,2} · Julio Polaina¹

Received: 4 May 2017 / Accepted: 1 June 2017
© Springer Science+Business Media B.V. 2017

Abstract We describe a procedure by which filter paper is digested with a cellulolytic enzyme preparation, obtained from *Trichoderma reesei* cultivated under solid state fermentation conditions and then fermented by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain. The yeast strain produces a β -glucosidase encoded by the *BGL1* gene from *Saccharomycopsis fibuligera* that quantitatively and qualitatively

complements the limitations that the *Trichoderma* enzyme complex shows for this particular activity. The supplemental β -glucosidase activity fuels the progression of cellulose hydrolysis and fermentation by decreasing the inhibitory effects caused by the accumulation of cellobiose and glucose. Fermentation of filter paper by this procedure yields ethanol concentrations above 70 g/L.



Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11274-017-2308-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Julio Polaina
jpolaina@iata.csic.es
Mary Casa-Villegas
mary.casa@iata.csic.es
Julia Marín-Navarro
jumana@iata.csic.es

¹ Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC, Valencia, Spain

² Departamento de Bioquímica, Facultad de Biología, Universidad de Valencia, Valencia, Spain

Keywords Bioethanol · Cellobiose · β -Glucosidase · Glucose inhibition · Second generation biofuels

Introduction

Cellulose, because of its chemical composition, abundance in nature and the fact that it does not have a direct use as food, is the primary substrate for second generation bioethanol. Standard, industrially implemented processes, to produce ethanol from cellulolytic substrates, comprise an enzymatic step, in which commercial enzymes are used to render fermentable sugar (i.e. glucose) and a fermentative step carried out by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

In a widely disseminated but oversimplified vision, enzymatic hydrolysis of cellulose is considered to be carried out by the combined action of endo and exo glucanases, that yield cellobiose and glucose as major products, and β -glucosidase, which splits cellobiose into glucose. However, cellulose digestion by highly efficient cellulolytic microorganisms is a considerably more complex process. In addition to the action of different type of enzymes that act coordinately, there are also non-catalytic proteins that play essential roles. For instance, in bacterial cellulosomes the association of catalytic (cellulolytic enzymes) and non-catalytic (scaffoldins) proteins assure an arrangement of the enzymatic machinery that maximizes the efficiency of the cellulolytic process (Artzi et al. 2017). Recent studies with the fungus *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*), from which most commercial cellulolytic enzyme preparations are derived, show intricate complexities in both composition and function of the cellulolytic machinery (Lehmann et al. 2016; Jalak et al. 2012). Proteomic analysis reveals the importance of non-catalytic, accessory enzymes, such as cellulose induced proteins and swollenin, in cellulolysis (Gupta et al. 2016; Herpöel-Gimbert et al. 2008).

The industrial production of ethanol from cellulosic substrates makes use of high amounts of enzymes, required for yielding fermentable sugar (glucose). Cellulose digestion and fermentation can be carried out in a single step in simultaneous saccharification and fermentation processes or sequentially, as separate hydrolysis and fermentation steps (Paulova et al. 2015). An approach proposed to eliminate the cost burden of enzymes has been the construction of engineered *S. cerevisiae* strains that co-express various genes coding for cellulolytic enzymes (Davison et al. 2016; Liu et al. 2016; Matano et al. 2012; Yamada et al. 2011; Wen et al. 2010; Tsai et al. 2009; van Zyl et al. 2007; Fujita et al. 2004). However, because of the aforementioned inherent complexity of enzymatic hydrolysis of cellulose, this approach has clear limitations and in consequence the cellulose degrading capability of the engineered yeast strains is not as efficient as the enzyme complexes produced by *Trichoderma* or other fungi. Additionally concomitant forced expression of multiple genes can overstress the physiology of the host yeast.

The aim of this work was to set up a cost-effective procedure for ethanol production from cellulose. This has been carried out by coupling hydrolysis using crude *Trichoderma* enzymes and fermentation with a selected yeast strain. It is known that *Trichoderma* cellulolytic complex is deficient in β -glucosidase activity (Lehmann et al. 2016; Sørensen et al. 2013; Nieves et al. 1998). Structural and functional features of the GH1 and GH3 β -glucosidases responsible for the hydrolysis of cellobiose have been characterized in detail (Sanz-Aparicio et al. 1998; Pozzo et al. 2010). Based on this information, we choose a *S. cerevisiae* strain that

expresses extracellular β -glucosidase from *Saccharomyces fibuliger*, and has been shown to ferment cellobiose with high efficiency (Tang et al. 2013; Gurgu et al. 2011).

Materials and methods

Microbial strains and culture media

Trichoderma reesei (*H. jecorina*) CECT2415 (identical to ATCC 56764 and NRRL 11236) was obtained from Colección Española de Cultivos Tipo (<http://www.uv.es/cect>). Recombinant *S. cerevisiae* T500 that expresses a β -glucosidase gene from *S. fibuliger* and its parental strain BY4741 have been described (Gurgu et al. 2011; Marin-Navarro et al. 2011).

Culture media used were: YPD: 1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose; YP2P and YP5P: same composition as YPD but with 2 or 5% filter paper (RM13054252, 73 g/m², Filtros Anioia, Barcelona Spain), cut into 25 mm² squares, instead of glucose, respectively (% refers to weight/volume).

Trichoderma cellulolytic enzyme complex preparation

Trichoderma precultures (2 mL) were prepared in YP2P medium supplemented with 0.5% starch and 0.5 g/L Tween 80, and incubated under agitation for 72 h, at 30 °C. For submerged fermentation, 25 mL of YP5P with 0.5% starch medium were inoculated with the preculture and incubated at 30 °C with aeration by vigorous shaking (200 rpm) for several days. The cultures were centrifuged and the supernatant used as enzyme source. For solid state fermentation, 5 g of filter paper squares in a 250 mL Erlenmeyer flask were soaked with 8 mL of YP supplemented with 0.5% starch, inoculated with 2 mL of preculture, and incubated at 30 °C for several days. To extract the enzymes from the solid state fermentation, the mycelium grown in the flask was thoroughly mixed with 8 mL of extracting solution (1% yeast extract, 2% peptone) and squeezed. The recovered slurry was clarified by centrifugation, filtered through a 220 nm membrane and then used as enzyme source.

The filter paper assay for cellulose hydrolysis and enzyme assays

Enzymatic digestion of filter paper was assayed by measuring reducing sugars with the dinitrosalicylic (DNS) acid method, as described by Zhang et al. (2009). Two assays, hydrolysis of the chromogenic *p*-nitrophenyl β -D-glucopyranoside (PNPG) substrate and hydrolysis of cellobiose, were used to monitor β -glucosidase activity. PNPG hydrolysis was assayed as described (Arrizubieta and Polaina 2000). Hydrolysis of

cellulose was carried out under the same conditions, but the activity was determined by measuring the amount of free glucose with a commercial kit (Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA).

Production of glucose, cellobiose and other soluble sugars resulting from enzymatic digestion of filter paper by the action of *Trichoderma* enzymes was analyzed by ion exchange chromatography using a CarboPac PA-100 column in a HPLC instrument equipped with a pulsed amperometric detector (Dionex, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Mono, di, tri and tetrasaccharides: glucose, cellobiose, celotriose and celotetraose (Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA) were used as standards.

For determination of K_m , dialyzed samples of β -glucosidase from either, *S. cerevisiae* T500 culture supernatant or *T. reesei* solid state fermentation enzyme preparation, were incubated with cellobiose at different concentrations in the range 0.5–20 mM, at 37°C, pH 5.5. Glucose released in these reactions was measured by HPLC and used to calculate values of initial velocity, which were plotted versus substrate concentration. To calculate K_m values, the data were adjusted to a rectangular hyperbola.

Inhibition of β -glucosidase activity by glucose was measured using as enzyme source samples of the *Trichoderma* enzyme cocktail or the supernatant of a *S. cerevisiae* T500 culture, dialyzed against citrate–phosphate buffer, pH 5.5, or phosphate buffer, pH 7.0.

Fermentations

Precultures of recombinant *S. cerevisiae* T500 were grown overnight at 30°C in liquid YPD medium supplemented with the antibiotic geneticin (G418) at 100 μ g/mL to select for the maintenance of the plasmid harboring the gene coding for *S. fibuligera* β -glucosidase. Fermentation vessels were prepared as follows. The cells (*S. cerevisiae*) from a 10 mL preculture were collected by centrifugation and added to the mixture of digested paper and *Trichoderma* enzymes obtained from the solid state fermentation, making a final volume of 10 mL. This mixture was transferred to a 14 mL tube, to which 0.5 g of filter paper squares were added. The tube was then closed, leaving a minimum headspace, and incubated at 30°C. Successive paper loads were added to the fermentation tube. Samples were removed at different intervals. Ethanol was measured using an enzymatic kit (Thermo Scientific) and residual glucose and cellobiose by HPLC.

Results

Production of *Trichoderma* enzyme preparation and sugar profile resulting from its action on cellulose

We compared the strength of the cellulolytic enzyme complex recovered after growing *T. reesei* ATCC 56764 under two different culture conditions: Fig. 1A shows that solid state fermentation gave a cellulolytic cocktail whose activity is about ten times higher than the maximal activity obtained from the supernatant of submerged fermentation. Regardless of genetic and physiological considerations about differences in the synthesis or secretion of enzymes between submerged and solid state fermentations (Barrios-González 2012), the second procedure makes enzyme recovery easier. In addition to measuring cellulose digestion, we determined β -glucosidase

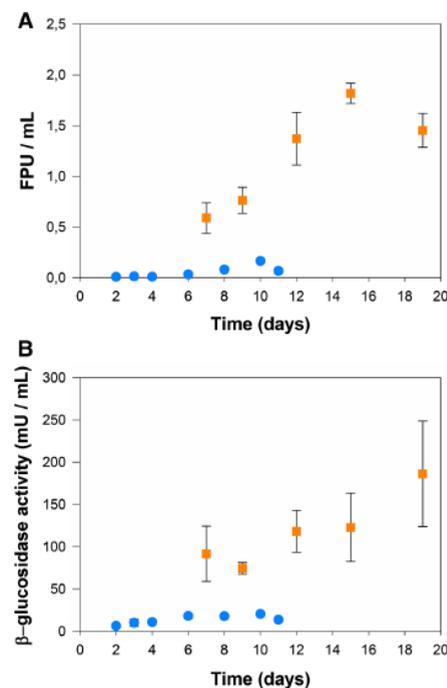


Fig. 1 Production of cellulolytic enzymes by *T. reesei* under submerged fermentation (blue circles) or solid state fermentation (orange squares) conditions. **A** Cellulase activity, expressed in Filler Paper Units (FPU)/mL. **B** β -glucosidase activity. Error bars indicate standard deviation of duplicates. (Color figure online)

activity present in the *T. reesei* cocktail. The profile of β -glucosidase production (Fig. 1B) was similar to that of cellulase activity. Submerged cultures showed a slow increase of β -glucosidase activity for about 10 days after the inoculation and then decreased. The activity of solid state cultures continued to increase for at least 14–16 days. On the basis of these results, cellulolytic enzymes produced by solid state fermentation were used for further experiments.

Hydrolysis of cellulose (5% filter paper) by the *T. reesei* enzyme cocktail (2 FPU/mL), after 8 h of incubation at 50 °C, yielded glucose and cellobiose as the only two significant products. (Fig. 2). The presence of cellobiose, although in lesser amount than glucose, confirms previous reports that β -glucosidase is the limiting cellulolytic activity in the extract (Lehmann et al. 2016; Nieves et al. 1998). Kinetics of cellobiose and glucose release from cellulose by the action of *T. reesei* enzymes was monitored for 48 h, using filter paper at different concentrations (2.5, 5 and 10%) as the substrate (Fig. 3). In all cases glucose concentration increased steadily up to different values, proportional to the initial amount of cellulose. In contrast, cellobiose concentration quickly reached a maximum, proportional to cellulose amount, which was maintained for some time, probably as a result of an equilibrium in which the velocity of cellobiose release by cellobiohydrolases matched that of hydrolysis by β -glucosidases. Cellobiose concentration at this point represented a low but significant fraction (around 10%) of the initial amount of cellulose. Since cellobiose is a potent inhibitor of cellobiohydrolases, its presence must significantly restrict cellulose hydrolysis. According to our data, digestion at 5%

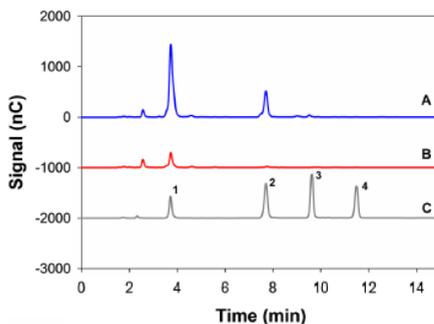


Fig. 2 Analysis of the soluble sugar profile. **A** Sugars released by the action of the enzyme cocktail (2 FPU/mL) with 5% filter paper, after 8 h at 50 °C. **B** Sugars present in the *T. reesei* enzyme cocktail obtained by solid state fermentation, before incubation with the substrate. **C** Commercial sugar standards used as control: (1) glucose, (2) cellobiose, (3) cellotriose, (4) cellotetraose

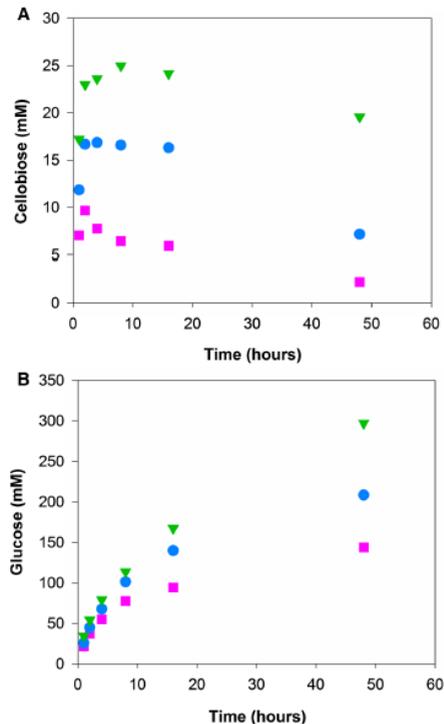


Fig. 3 Time-course analysis of soluble sugars released from cellulose digestion with the *T. reesei* enzyme preparation. Filter paper at different concentrations (2.5%, pink squares; 5%, blue circles; 10%, green triangles) was incubated at 50 °C with the enzyme cocktail (2 FPU/mL) for different times. Reaction was stopped by heating at 95 °C for 10 min. **A** Cellobiose production, **B** glucose production. (Color figure online)

paper leads to an accumulation of cellobiose of over 15 mM after 20 h, much higher than the concentration of inhibitor that reduces enzyme activity by 50% (IC_{50}) reported for *T. reesei* Cel7A cellobiohydrolase: 0.4–0.7 mM (Teugas and Välijamäe 2013a). Only after prolonged incubation times cellobiose approaches complete hydrolysis.

Comparison of β -glucosidase activity in the *Trichoderma* enzyme preparation with that produced by *S. cerevisiae* T500

We have analyzed and compared the properties of the β -glucosidase activity present in the *Trichoderma* enzyme

cocktail with that secreted by the recombinant yeast, by two criteria: their performance at different concentrations of cellobiose and their inhibition by glucose. Both enzymes behaved similarly at different concentrations of cellobiose in the range 5–400 mM. Although *T. reesei* genome has ten gene sequences encoding β -glucosidases, only one of these enzymes, Bgl I, also termed Cel 3A, is released to the culture medium among the proteins that constitute the cellulolytic enzyme complement (Guo et al. 2016a; Karkehabadi et al. 2014). Therefore, the observed β -glucosidase activity determined for *Trichoderma* must reflect the action of this enzyme, for which we have determined a K_m value for cellobiose of 2.07 ± 0.5 mM, not significantly different from the 1.9 mM reported in the literature (Woodward and Arnold 1981). The K_m for cellobiose of the yeast enzyme was slightly lower: 1.74 ± 0.08 mM (experimental data for K_m determinations are given as supplementary material, Figure S1).

Results of the inhibitory effect of glucose presented in Fig. 4 show that at glucose concentration in the range 5–75 mM, about the same at which glucose is accumulated during the fermentation, the *S. fibuligera* β -glucosidase produced by recombinant *S. cerevisiae* T500, with PNPG as the substrate, is significantly less sensitive to inhibition by glucose than the *Trichoderma* β -glucosidase. The inhibitory effect of glucose when measured with cellobiose as the substrate could only be reliably assayed at low glucose concentration, since at higher concentrations the relative amount of glucose (inhibitor) and glucose (product) could

not be estimated. At 1 mM, glucose inhibited cellobiose hydrolysis by both enzymes similarly, ca. 25%.

Cellulose conversion into ethanol

Cellulose fermentation was carried out with filter paper digested with the *T. reesei* cellulolytic cocktail. Two fermenting *S. cerevisiae* strains were assayed: β -glucosidase producing recombinant T500 and its untransformed parental strain BY4741. As the initial 5% load of paper present in the medium was consumed, additional paper loads were added, as indicated in Fig. 5. Transient cellobiose accumulation (ca. 5 mM) was observed with the control strain about 24 h after each paper load, whereas T500 strain hydrolyzed cellobiose more efficiently. We also observed that paper degradation proceeded more rapidly with strain T500. Accordingly, ethanol yield obtained in the fermentation with T500 was significantly (35%) higher than that obtained with the control strain. These results indicate, in agreement with our previous observation, that even a small cellobiose accumulation becomes a limiting factor for both cellulolysis progression and ethanol production. Overall fermentation yields in terms of paper conversion to ethanol were 61% and 45% for T500 and the parental strain, respectively. The experimental design used here, in which we have coupled the cellulolytic machinery produced by *T. reesei*, with fermentation by a β -glucosidase producing *S. cerevisiae* strain, yields considerably higher ethanol concentrations (about 7%) than any previous report using recombinant yeast strains that express one or several cellulolytic enzymes.

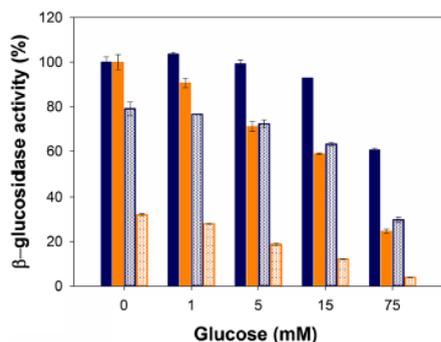


Fig. 4 Inhibition of β -glucosidase activity by glucose. Activities of dialyzed samples of *S. fibuligera* (blue) and *T. reesei* (orange) β -glucosidases were assayed with PNPG as the substrate at pH 5.5 (solid bars) or pH 7 (dotted bars), in the presence of increasing concentrations of glucose. Value of activity without added glucose, at pH 5.5, was taken as 100%. Error bars indicate standard deviation of triplicates. (Color figure online)

Discussion

The aim of this work was to work out a simple, basic, reliable and cost-effective model system for the conversion of cellulose into ethanol. In situ production of cellulolytic enzymes has obvious advantages over the addition of commercial ones. Beyond economic considerations, the composition of the enzyme complex can be tailored, monitored and manipulated at will. Even using a non-engineered *T. reesei* strain, the cellulolytic activity of the resulting enzyme preparation was enough to achieve an ethanol yield of about 7%, considerably higher than the minimal 4.5–5.0% threshold considered to make distillation profitable (Lennartsson et al. 2014; Viikari et al. 2012). As a first objective, we studied the conditions for in situ production of a cellulolytic enzyme complex sufficiently powerful to drive fermentation to an ethanol concentration higher than 5%. Different reports show that fungal cultivation under solid state fermentation conditions sharply increases the production yield of enzymes and other metabolites,

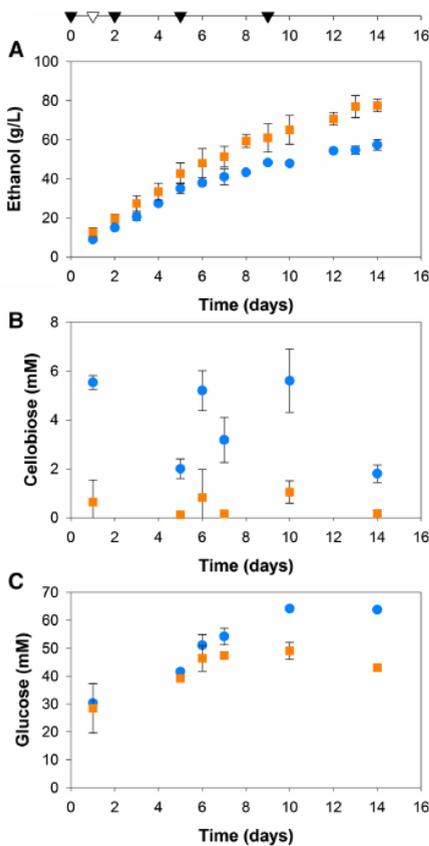


Fig. 5 Fermentation of filter paper by *S. cerevisiae* T500, expressing the *S. fibuligera* BGLI gene (orange squares), and parental strain BY4741 (blue circles), coupled to cellulose hydrolysis by *T. reesei* enzymes. **A** Ethanol, **B** cellobiose, and **C** glucose, were monitored during the fermentation. Error bars indicate standard deviation of duplicates. Additions of filter paper to the fermentation vessels (0.5 g, filled triangles; 0.25 g, open triangle) were carried out at the times indicated on the top of the figure. (Color figure online)

compared to alternative submerged fermentation (Barrios-González 2012). We compared the performance of *T. reesei* CECT 2415 under either cultivation conditions and found that solid state fermentation gave an enzyme cocktail with the required properties for efficient cellulose digestion.

According to genome annotations, *T. reesei* has ten gene sequences encoding β -glucosidases, two of which belong to family GH1 and the other eight to family GH3, but only

one of these enzymes, Bgl I (Cel3A), is released to the culture medium and therefore becomes part of the cellulolytic enzyme cocktail (Guo et al. 2016a). Diverse reports show that the action of this single β -glucosidase represents a bottleneck for the production of cellulosic ethanol (Lehmann et al. 2016; Sørensen et al. 2013; Nieves et al. 1998). Accordingly, cellulolytic strength of the *Trichoderma* enzyme cocktail was increased by supplementation with exogenous β -glucosidases (Del Pozo et al. 2012). One of the reasons that explain this effect is that cellobiose is a potent inhibitor of cellobiohydrolase, with a K_i ca. 1.5 mM (Gruno et al. 2004). As we have shown, cellobiose accumulates during the action of *T. reesei* enzyme cocktail (up to 15 mM on 5% paper). Therefore an increase in the amount of β -glucosidase is expected to improve cellulose digestion. Inhibition of β -glucosidase by glucose is another factor that needs to be considered since glucose accumulates during cellulolysis up to a concentration of 70 mM (Fig. 3). Different studies have addressed this problem either looking for natural variants of the enzyme less prone to glucose inhibition (Teugjas and Väljamäe 2013b), or by engineering one of *T. reesei* β -glucosidases (Guo et al. 2016b). Improvement of glucose inhibition has also been achieved by directed evolution of an *Aspergillus niger* β -glucosidase expressed in *S. cerevisiae* (Larue et al. 2016).

In this work we have used the enzyme encoded by the *S. fibuligera* BGLI gene, produced by *S. cerevisiae* during the fermentation process, as a source of supplemental β -glucosidase for cellulolysis. This enzyme is expressed and secreted under control of a constitutive promoter and the *STA1* gene secretion signal (Marín-Navarro et al. 2011) and, as it was shown previously, confers to *S. cerevisiae* the capability of utilizing cellobiose very efficiently (Gurgu et al. 2011). Our results show that with PNPg as the substrate, this enzyme is significantly more resistant to inhibition by glucose than the β -glucosidase (Cel3A) supplied by the *Trichoderma* enzyme cocktail (Fig. 4). Although we cannot assure that this is also true for cellobiose, comparative analysis of the three-dimensional structures of *T. reesei* Cel 3 A and *S. fibuligera* Bgl I (see Supplementary material, Figure S2) suggests that the relative affinity of glucose for its binding site would be higher for Cel 3A which would therefore be more sensitive than Bgl I to the inhibitory effect of the monosaccharide. Because of the coupled hydrolysis fermentation setup used here, the inhibitory effect exerted by high glucose concentration values attained during fermentation is counteracted by continuous production of supplemental β -glucosidase and a very active consumption of glucose by the yeast. Overall, the supply of cellobiose activity provided by the fermenting yeast represents a cheaper and easier solution than supplementation of the *Trichoderma* enzyme preparation with a commercial enzyme.

Conclusion

This communication describes a simple and economical procedure by which cellulose is converted into ethanol with high efficiency. Digestion of filter paper with a crude *T. reesei* enzyme preparation coupled to fermentation by a *S. cerevisiae* strain expressing β -glucosidase from *S. fibuligera*, is synergic for various reasons: (i) supplementary β -glucosidase activity relieves cellobiohydrolase inhibition by cellobiose improving cellulose digestion; (ii) functionally, the yeast β -glucosidase is complementary to that of *Trichoderma* and (iii) continual production of β -glucosidase during glucose fermentation counteracts the inhibitory effect of glucose. Consequently, this procedure allows ethanol yields higher than 7%, a level that can render distillation profitable.

Acknowledgements This work was funded by Grants EU H2020-634486-INMARE, and BIO2013-48779-C4-3-R from Spain's 'Secretaría de Estado de Investigación, Desarrollo e Innovación', MC-V was supported by a SENESCYT predoctoral fellowship from the Government of República del Ecuador. We thank Lola Abolafo for technical assistance and Simon Gough for critical reading of the manuscript.

References

- Arrizubieta MJ, Polaina J (2000) Increased thermal resistance and modification of the catalytic properties of a β -glucosidase by random mutagenesis and in vitro recombination. *J Biol Chem* 275:28843–28848
- Artzi L, Bayer EA, Morais S (2017) Cellulosomes: bacterial nanomachines for dismantling plant polysaccharides. *Nat Rev Microbiol* 2:83–95
- Barrios-González J (2012) Solid-state fermentation: physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Process Biochem* 47:175–185
- Davison SA, den Haan R, van Zyl WH (2016) Heterologous expression of cellulase genes in natural *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:8241–8254
- Del Pozo MV, Fernández-Arrojo L, Gil-Martínez J, Montesinos A, Chernikova TN, Nechitaylo TY, Waliszek A, Tortajada M, Rojas A, Huws SA, Golyshina OV, Newbold CJ, Polaina J, Ferrer M, Golyshin PN (2012) Microbial β -glucosidases from cow rumen metagenome enhance the saccharification of lignocellulose in combination with commercial cellulase cocktail. *Biotechnol Biofuels* 5:73
- Fujita Y, Ito J, Ueda M, Fukuda H, Kondo A (2004) Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme. *Appl Environ Microbiol* 70:1207–1212
- Gruno M, Välijämäe P, Pettersson G, Johansson G (2004) Inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulases by cellobiose is strongly dependent on the nature of the substrate. *Biotechnol Bioeng* 86:504–511
- Guo B, Sato N, Biely P, Amano Y, Nozaki K (2016a) Comparison of catalytic properties of multiple β -glucosidases of *Trichoderma reesei*. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:4959–4968
- Guo B, Amano Y, Nozaki K (2016b) Improvements in glucose sensitivity and stability of *Trichoderma reesei* β -glucosidase using site-directed mutagenesis. *PLoS One* 11(1):e0147301
- Gupta V, Steindorff AS, de Paula RG, Silva-Rocha R, Mach-Aigner AR, Mach RL, Silva RN (2016) The post-genomic era of *Trichoderma reesei*: what's next? *Trends Biotechnol* 34:970–982
- Gurgu L, Lafraja A, Polaina J, Marín-Navarro J (2011) Fermentation of cellobiose to ethanol by industrial *Saccharomyces* strains carrying the β -glucosidase gene (*BGL1*) from *Saccharomycopsis fibuligera*. *Bioresour Technol* 102:5229–5236
- Herpoël-Gimbert I, Margeot A, Dolla A, Jan G, Mollé D, Lignon S, Mathis H, Sigoillot JC, Monot F, Asther M (2008) Comparative secretome analyses of two *Trichoderma reesei* RUT-C30 and CL847 hypersecretory strains. *Biotechnol Biofuels* 1:18
- Jalak J, Kurašin M, Teugas H, Välijämäe P (2012) Endo-exo synergism in cellulose hydrolysis revisited. *J Biol Chem* 287:28802–28815
- Karkehabadi S, Helmich KE, Kaper T, Hansson H, Mikkelsen NE, Gudmundsson M, Piens K, Fujidala M, Banerjee G, Scott-Craig JS, Walton JD, Phillips GN, Sandgren M (2014) Biochemical characterization and crystal structures of a fungal family 3 beta-glucosidase, Cel3A from *Hypocrea jecorina*. *J Biol Chem* 289:31624–31637
- Larue K, Melgar M, Martin VJ (2016) Directed evolution of a fungal β -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels* 9:52
- Lehmann L, Rønnest NP, Jørgensen CI, Olsson L, Stocks SM, Jørgensen HS, Hobley T (2016) Linking hydrolysis performance to *Trichoderma reesei* cellulolytic enzyme profile. *Biotechnol Bioeng* 113:1001–1010
- Lennartsson PR, Erlandsson P, Taherzadeh MJ (2014) Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products. *Bioresour Technol* 165:3–8
- Liu Z, Ho SH, Sasaki K, den Haan R, Inokuma K, Ogino C, van Zyl W, Hasunuma T, Kondo A (2016) Engineering of a novel cellulose-adherent cellulolytic *Saccharomyces cerevisiae* for cellulosic biofuel production. *Sci Rep* 6:24550
- Marín-Navarro J, Gurgu L, Alamar S, Polaina J (2011) Structural and functional analysis of hybrid enzymes generated by domain shuffling between *Saccharomyces cerevisiae* (var. *diastaticus*) Stal glucoamylase and *Saccharomycopsis fibuligera* Bgl1 β -glucosidase. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:121–130
- Matano Y, Hasunuma T, Kondo A (2012) Display of cellulases on the cell surface of *Saccharomyces cerevisiae* for high yield ethanol production from high-solid lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* 108:128–133
- Nieves RA, Ehrman CI, Adney WS, Elander RT, Himmel ME (1998) Survey and analysis of commercial cellulase preparations suitable for biomass conversion to ethanol. *World J Microbiol Biotechnol* 14:301–304
- Paulova L, Patakova P, Branska B, Rychtera M, Melzoch K (2015) Lignocellulosic ethanol: technology design and its impact on process efficiency. *Biotechnol Adv* 33:1091–1107
- Pozzo T, Pasten JL, Karlsson EN, Logan DT (2010) Structural and functional analyses of β -glucosidase 3B from *Thermotoga neopolitana*: a thermostable three-domain representative of glycoside hydrolase 3. *J Mol Biol* 397:724–739
- Sanz-Aparicio J, Hermoso JA, Martínez-Ripoll M, Lequerica JL, Polaina J (1998) Crystal structure of β -glucosidase A from *Bacillus polymyxa*: insights into the catalytic activity of family 1 glycosyl hydrolases. *J Mol Biol* 275:491–502
- Sørensen A, Lübeck M, Lübeck PS, Ahring BK (2013) Fungal beta-glucosidases: a bottleneck in industrial use of lignocellulosic materials. *Biomolecules* 3:612–631
- Tang H, Hou J, Shen Y, Xu L, Yang H, Fang X, Bao X (2013) High β -glucosidase secretion in *Saccharomyces cerevisiae* improves

- the efficiency of cellulase hydrolysis and ethanol production in simultaneous saccharification and fermentation. *J Microbiol Biotechnol* 23:1577–1585
- Teugjas T, Väljamäe P (2013a) Product inhibition of cellulases studied with 14 C-labeled cellulose substrates. *Biotechnol Biofuels* 6:104
- Teugjas H, Väljamäe P (2013b) Selecting β -glucosidases to support cellulases in cellulose saccharification. *Biotechnol Biofuels* 6:105
- Tsai SL, Oh J, Singh S, Chen R, Chen W (2009) Functional assembly of minicellulosomes on the *Saccharomyces cerevisiae* cell surface for cellulose hydrolysis and ethanol production. *Appl Environ Microbiol* 75:6087–6093
- van Zyl WH, Lynd LR, den Haan R, McBride JE (2007) Consolidated bioprocessing for bioethanol production using *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 108:205–235
- Viikari L, Vehmaanperä J, Koivula A (2012) Lignocellulosic ethanol: from science to industry. *Biomass Bioenerg* 46:13–24
- Wen F, Sun J, Zhao H (2010) Yeast surface display of trifunctional minicellulosomes for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol. *Appl Environ Microbiol* 76:1251–1260
- Woodward J, Arnold SL (1981) The inhibition of β -Glucosidase activity in *Trichoderma reesei* C30 cellulase by derivatives and isomers of glucose. *Biotechnol Bioeng* 23:1553–1562
- Yamada R, Taniguchi N, Tanaka T, Ogino C, Fukuda H, Kondo A (2011) Direct ethanol production from cellulosic materials using a diploid strain of *Saccharomyces cerevisiae* with optimized cellulase expression. *Biotechnol Biofuels* 4:8
- Zhang YH, Hong J, Ye X (2009) Cellulase assays. *Methods Mol Biol* 581:213–231



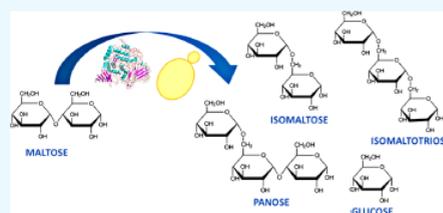
Synthesis of Isomaltooligosaccharides by *Saccharomyces cerevisiae* Cells Expressing *Aspergillus niger* α -Glucosidase

Mary Casa-Villegas,[†] Julia Marín-Navarro,^{†,‡} and Julio Polaina^{*,†,‡}

[†]Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC, 46980-Paterna, Valencia, Spain

[‡]Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Valencia, 46100-Burjassot, Valencia, Spain

ABSTRACT: The α -glucosidase encoded by the *aglA* gene of *Aspergillus niger* is a secreted enzyme belonging to family 31 of glycoside hydrolases. This enzyme has a retaining mechanism of action and displays transglycosylating activity that makes it amenable to be used for the synthesis of isomaltooligosaccharides (IMOs). We have expressed the *aglA* gene in *Saccharomyces cerevisiae* under control of a galactose-inducible promoter. Recombinant yeast cells expressing the *aglA* gene produced extracellular α -glucosidase activity about half of which appeared cell bound whereas the other half was released into the culture medium. With maltose as the substrate, panose is the main transglycosylation product after 8 h of incubation, whereas isomaltose is predominant after 24 h. Isomaltose also becomes predominant at shorter times if a mixture of maltose and glucose is used instead of maltose. To facilitate IMO production, we have designed a procedure by which yeast cells can be used directly as the catalytic agent. For this purpose, we expressed in *S. cerevisiae* gene constructs in which the *aglA* gene is fused to glycosylphosphatidylinositol anchor sequences, from the yeast *SED1* gene, that determine the covalent binding of the hybrid protein to the cell membrane. The resulting hybrid enzymes were stably attached to the cell surface. The cells from cultures of recombinant yeast strains expressing *aglA-SED1* constructions can be used to produce IMOs in successive batches.



INTRODUCTION

Oligosaccharides are important compounds for the food and pharmaceutical industries because of their growing use as prebiotics and antioxidants and for drug delivery.¹ A relevant type of oligosaccharides are isomaltooligosaccharides (IMOs), roughly defined from a chemical point of view as short glucose oligomers (between two and nine units) containing α -(1 \rightarrow 6), α -(1 \rightarrow 3), or α -(1 \rightarrow 2) linkages. Examples are isomaltose, panose, isomaltotriose, nigerosylglucose, and kojibiosylglucose, among others. While α -(1 \rightarrow 4) linkages that constitute the backbone of starch and glycogen molecules are readily digested by intestinal enzymes, α -(1 \rightarrow 6) linkages, as well as α -(1 \rightarrow 3) and α -(1 \rightarrow 2), are not so easily hydrolyzed, one of the characteristics that confer to these compounds their recognized status of prebiotics.^{2,3}

Enzymatic synthesis has become a preferred procedure for oligosaccharide production over alternative chemical synthesis or polysaccharide hydrolysis. Transferases and retaining glycoside hydrolases which are naturally endowed with transferase activity and do not require activated substrates are generally used.¹ In the specific case of IMO synthesis, the enzymes used are dextranases or alternansucrases from lactic acid bacteria, or fungal transferases and α -glucosidases.^{2–6} The use of glycoside hydrolases, belonging to family GH31, for IMO synthesis is possible because these are retaining enzymes, whose catalytic mechanism allows them to act as transferases. The reactions mediated by these enzymes comprise two consecutive steps. In the first one, a nucleophilic residue (Asp or Glu) attacks a

glycosidic bond, forming a covalent bond with the split glycoside. In the second step, another (acid/base) catalytic residue (again Asp or Glu) mediates the transference of the glycosyl moiety to an acceptor molecule, most commonly water, in which case hydrolysis is accomplished. If a molecule other than water, frequently the glycoside substrate itself, acts as the acceptor, the result of the reaction is a transglycosylation. The structure of a glycoside hydrolase enzyme, in particular its catalytic center, determines its transglycosylating activity, its preference for specific acceptors, and therefore the pattern of transglycosylation products that it may produce.^{7–11}

IMO synthesizing capability has been reported for the α -glucosidase produced by *Aspergillus niger*. Panose and isomaltose are the main transglycosylation products when maltose is used as the substrate.^{12–15} Both glycosides show prebiotic properties^{16,17} and can be used as low calorie sweeteners.^{4,18} Therefore, the development of efficient procedures for large scale synthesis of IMOs is a significant biotechnological goal. The cost of IMO production at the industrial level is largely determined by enzyme production, recovery and purification. A simpler and cheaper alternative relies on the direct use of the producer microorganism in a "one pot" process.¹⁹ To apply this concept to the production of IMOs, we have constructed *Saccharomyces cerevisiae* strains

Received: August 16, 2017

Accepted: November 6, 2017

Published: November 16, 2017

that display *A. niger* α -glucosidase covalently attached to the cell surface. Our results show that the engineered yeast provides an efficient procedure for the production of panose and isomaltose with high yield.

RESULTS

Expression of *A. niger aglA* Gene in *S. cerevisiae*. *S. cerevisiae* BY4741, used as the host strain, is isogenic to the wild type S288C. It carries in its genome functional genes encoding maltose permease (*AGT1* and *MAL31*) and intracellular α -glucosidase (*MAL12* and *MAL32*) but lacks a gene (*MAL13* or *MAL33*) encoding the activator protein required for the expression of the permease and the glucosidase.^{20,21} Consequently, strain BY4741 is phenotypically maltose negative, a desirable characteristic because it avoids interference with the analysis of heterologous enzyme activity.

Galactose induced cultures of strain BY4741 transformed with plasmid pSSP-AG harboring the *aglA* gene showed α -glucosidase activity, ca. 1.4 mU/mL, almost equally distributed between the supernatant fraction (53%) and cell-bound (47%). A control culture of the same strain transformed with the cloning vector, assayed as a control, showed no detectable enzyme activity. Production of secreted α -glucosidase by the *aglA* yeast transformant could be visualized by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) as a diffused protein band of high molecular mass (above 240 kDa), indicating a high degree of glycosylation (Figure 1, lane C). The protein

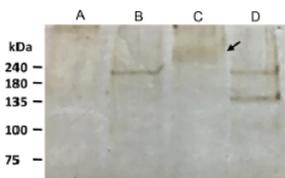


Figure 1. SDS-PAGE analysis of proteins recovered from the culture supernatant of *S. cerevisiae* BY4741 [pMCAG1] (C,D) and a control of the same strain transformed with the cloning vector (A,B) and with (B,D) or without (A,C) treatment with Endo H glucosidase. The arrows point differential bands present in the pSSP-AG-transformed strain, which produces extracellular α -glucosidase activity.

mass decreased to ca. 135 kDa, after treatment with Endo H (Figure 1, lane D). This indicates effective albeit not complete deglycosylation because the expected mass of the protein monomer, as deduced from the amino acid sequence, is 106 kDa.

Analysis of IMO Formation. Figure 2 shows the products recovered from the incubation of *S. cerevisiae* cells, expressing the *aglA* gene with 30% maltose as the substrate. After 8 h incubation, the only reaction product present at a significant concentration was panose. This trisaccharide is formed by transglycosylation between two maltose molecules, one of them acting as the glucosyl donor and the other as the acceptor. The glucosyl residue from the donor maltose is transferred to the acceptor, forming an α -(1 \rightarrow 6) linkage. It is noteworthy that the absence of glucose, despite the fact that panose and glucose are produced at equimolar concentrations in the transglycosylation reaction, indicates that the monosaccharide is consumed by the yeast during this initial period. After 24 h incubation, the predominant transglycosylation product is isomaltose, with lower but significant amounts of panose and isomaltotriose. At this stage,

maltose is detectable although in residual amounts. Glucose accumulates, likely as the cells are no longer metabolically active after such an extended incubation period at 50 °C. Other unidentified peaks eluting at higher retention times likely correspond to α -(1 \rightarrow 6) IMOs of higher degrees of polymerization.

Time course of IMO production at different concentrations of maltose was monitored. Figure 3A shows that panose production increases rapidly, at similar rates for different maltose concentrations, up to a maximum (400 mM after 20 h for 60% maltose), and then decreases. As it could be expected, maltose kinetics showed an initial linear decay with similar slopes for different substrate concentrations (Figure 3B). Isomaltose and glucose formation was only detectable using the higher maltose concentrations at long incubation times (Figure 3C,D). After an initial delay, both products were progressively accumulated. The fact that isomaltose was only formed upon glucose accumulation suggests that isomaltose is formed by transglycosylation with glucose as the acceptor molecule and not by a possible alternative mechanism (i.e. isomerization). Moreover, such a delay in isomaltose synthesis compared to panose production was not observed when using a purified enzyme, in which glucose is not sequestered from the medium.^{12,13}

Figure 4 shows a model of *A. niger* α -glucosidase with isomaltose and panose docked at the active site of *A. niger* α -glucosidase. The model was adjusted to superimpose the orientation of the catalytic residues (Asp490 and Asp660, putative nucleophile and acid/base catalytic residues) with the corresponding residues of sugar beet α -glucosidase (PDB id 3WEO). We assume that the disposition of the catalytic residues must be the same in both proteins because they catalyze the same reaction, and the degree of sequence identity (37%) becomes nearly 80% if only the residues likely involved in direct interaction with the substrate are considered. The model shows the formation of isomaltose and panose and suggests a site for the coupling of the acceptor molecule (glucose or maltose).

Anchoring of AglA to the *S. cerevisiae* Cell Surface.

Transformant cultures of strain BY4741, expressing the *aglA* gene, secrete α -glucosidase which appears distributed approximately in equal amounts, in the cell-bound and the supernatant fractions of the culture. This makes the recovery of the enzyme in useful amounts for IMO synthesis difficult. Attachment of the enzyme to the yeast cell surface allows a direct use of the yeast biomass as the catalytic agent, a methodology that has been reported for the production of other oligosaccharides.¹⁹ Therefore, we carried out two constructions in which AglA was fused to full length or partial versions of *S. cerevisiae* Sed1. This is an abundant, stress-induced, glycosylphosphatidylinositol-anchored cell wall protein, proved to be useful for the attachment of proteins to the yeast cell wall.^{22–24} Figure 5A shows that in contrast to the strain that expressed the *aglA* gene in the two strains producing hybrid AglA-Sed1 α -glucosidase, the enzyme activity appeared attached to the cells, with no significant activity detected as the free enzyme in the culture supernatant. The strain expressing the hybrid with the shorter version of Sed1 (AglA_Sed1B) showed higher α -glucosidase activity than that with the full-length Sed1 (AglA_Sed1A). A practical consequence of the covalent attachment of the enzyme to the cell surface is reported in Figure 5B. The cells expressing Sed1 hybrid α -glucosidase can be reused in consecutive reaction batches without major reduction of activity.

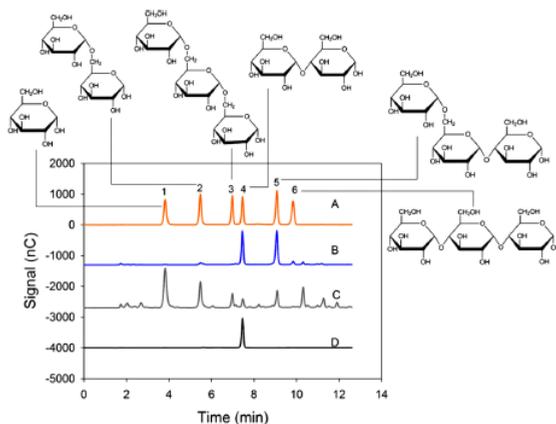


Figure 2. Product profile of *S. cerevisiae* BY4741 [pSSP-AG] and the control strain, after incubation with maltose. Cells were incubated with 30% maltose at 50 °C for different times, and the sugars recovered in the supernatant fraction were analyzed by HPLC. (A) Molecular standards and (B,C) BY4741 [pSSP-AG] after 8 and 24 h, respectively. (D) Control strain, after 8 h. The peaks in the chromatogram of the standards correspond to: (1) glucose, (2) isomaltose, (3) isomaltotriose, (4) maltose, (5) panose, and (6) maltotriose.

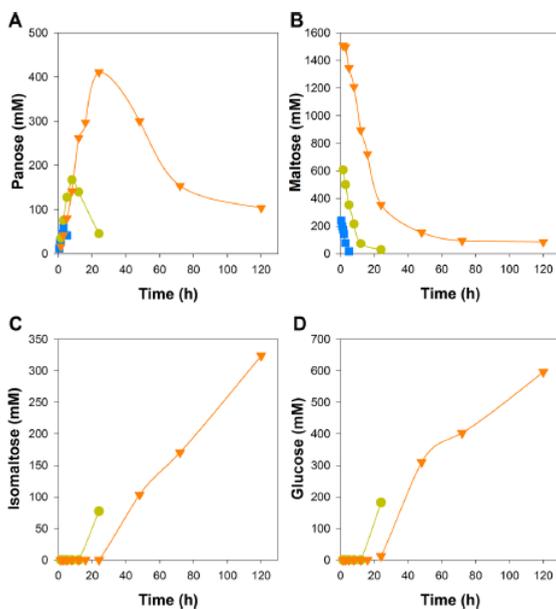


Figure 3. Kinetics of synthesis/hydrolysis of different sugars resulting from the incubation of strain BY4741 [pSSP-AG] with maltose. The cells were incubated with three different concentrations of maltose: 10% (280 mM), blue squares; 30% (800 mM), green circles; and 60% (1.6 M), orange triangles. The resulting sugars were analyzed by HPLC. (A) Panose, (B) maltose, (C) isomaltose, and (D) glucose.

Synthesis of Panose or Isomaltose by Transglycosylation as a Function of the Glucosyl Acceptor. As it has been mentioned before, the results reported in Figure 3 indicate that

both maltose and glucose can act as glucosyl acceptors in the transglycosylation reaction. Thus, when maltose is used as the substrate, at shorter reaction times, maltose is the only available

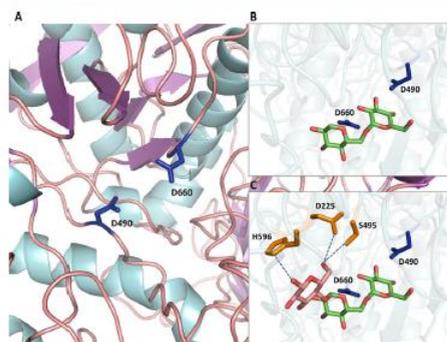


Figure 4. (A) Model of the catalytic site of *A. niger* α -glucosidase. Catalytic residues D660 (putative nucleophile) and D490 (putative acid/base catalyst) are depicted in blue. (B) Complex with isomaltose. (C) Complex with panose. The glucose at the reducing end is colored in pink. Putative hydrogen bonds with this residue are highlighted with dashed lines.

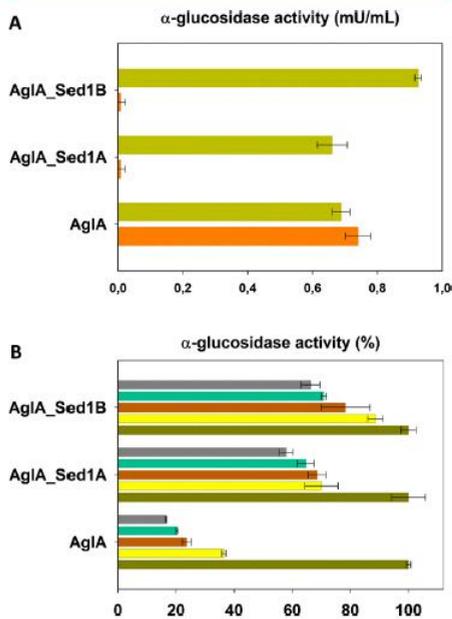


Figure 5. Enzyme activity of yeast cells expressing wild type or Sed1 hybrid versions of *A. niger* α -glucosidase. (A) Analysis of α -glucosidase activity, secreted into the culture medium (orange bars) or cell-associated (green bars). (B) Initial or remaining cell-associated α -glucosidase activity after several 24 h periods of incubation of the cells at 50 °C and pH 5.5. Initial activity (green bars), 1 × 24 h (yellow bars), 2 × 24 h (brown bars), 3 × 24 h (turquoise bars), and 6 × 24 h (gray). Error bars correspond to standard deviation of triplicates.

acceptor yielding panose as the transglycosylation product. As the reaction progresses, the glucose concentration increases, becoming available as the acceptor to produce isomaltose. To confirm that isomaltose is formed by transglycosylation with glucose as the acceptor, and not by the direct isomerization of maltose, we assayed the production of IMO, at different initial ratios of glucose to maltose (Figure 6). For this analysis, yeast

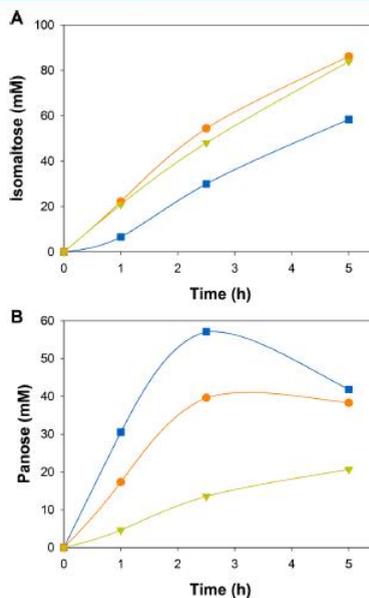


Figure 6. Kinetics of isomaltose (A) and panose (B) production. The reactions were carried out by incubation of pretreated cells (at 50 °C, pH 5.5 for 24 h) of transformant yeast strain (AgIA_Sed1B) with different amounts of maltose and glucose: 300 mM maltose and 300 mM of glucose (blue squares), 300 mM maltose and 300 mM of glucose (orange circles), and 300 mM of maltose and 1.2 M of glucose (green triangles).

transformants expressing AgIA_Sed1B were preincubated at 50 °C during 24 h to avoid the interference of glucose consumption by cell metabolism. Because this α -glucosidase is stably attached to the cell surface and remains active (Figure 5B), pretreated cells with an attenuated metabolism could be used as the enzyme source. Compared to the previous experiment (Figure 3), cell pretreatment at 50 °C allowed, after 5 h of incubation with maltose, a higher accumulation of glucose (ca. 200 mM) and a higher yield of isomaltose (ca. 60 mM), even in the absence of exogenously added glucose. An increase in the glucose concentration is not expected to enhance the isomaltose production if this disaccharide is formed by isomerization of maltose. Therefore, positive correlation between isomaltose production and initial glucose concentration (compare Figures 6A and 3C) indicates a transglycosylation mechanism. Using pretreated cells, after 1 h incubation with maltose, the ratio of isomaltose to panose was 0.2 and the ratio of glucose to maltose had the same value. When the initial ratio of glucose to maltose

was increased (Figure 6), the panose yield decreased while isomaltose increased. In both cases, the ratio of isomaltose to panose after 1 h incubation was equivalent to that of glucose to maltose. These results suggest that glucose and maltose compete for the same binding site in the enzyme, acting as acceptors of the glucosyl residue, to synthesize isomaltose and panose, respectively. However, both products showed different kinetics at longer incubation times. Although panose reached a maximum concentration before being degraded (Figures 3A and 6B), isomaltose was progressively accumulated (Figure 6A), indicating that panose is a better substrate for the enzyme.

DISCUSSION

Industrial production of IMO is carried out by the combined action of hydrolytic and transferase enzymes on starch, which yields a complex mixture of α -glucosides.^{4,25,26} Although in general terms, IMOs are considered to have prebiotic and other health promoting properties,^{3,6,27} the heterogeneous and variable nature or commercial preparations makes it difficult to ascribe observed effects to specific compounds. The development of new procedures for the production of IMOs of defined composition, specifically, panose and isomaltose, is a significant biotechnological goal because of present and potential applications of these compounds.^{18,28,29} Our results provide a procedure for inexpensive, food-grade production of panose and isomaltose, using an engineered yeast strain that displays a cell wall-linked α -glucosidase. The production of panose or isomaltose can be modulated by the ratio of the acceptor sugars (maltose or glucose) present in the reaction.

A conclusion derived from our results is that the formation of isomaltose takes place by transglycosylation and not by intramolecular isomerization of maltose. The enzyme-bound glucosyl residue formed as a reaction intermediate can be transferred to the acceptor molecule, either glucose or maltose, to synthesize isomaltose or panose, respectively. This is a significant result because other retaining glycosyl hydrolases have isomerase activity. For example, trehalase synthase catalyzes the isomerization of maltose to trehalose through an intramolecular isomerization of the substrate, whereas the enzyme is unable to incorporate exogenously added glucose.³⁰ A conspicuous case is that of the LacZ α -galactosidase from *Escherichia coli*. This enzyme converts lactose into allolactose through an isomerization reaction, in which glucose and galactose, resulting from the hydrolysis of lactose, are bound again, through a different linkage, before leaving the active site.³¹ LacZ is also able to catalyze transglycosylation of a galactosyl moiety to exogenous glucose added at high concentrations. The mechanistic difference between isomerization and transglycosylation is important from a biotechnological point of view. If isomaltose synthesis was carried out by isomerization, isomaltose would be formed together with panose. However, our results show that in the absence of glucose, panose is the sole transglycosylation product. On the other hand, increasing the glucose concentration displaces the mechanism toward the production of isomaltose.

Panose and isomaltose yield at different ratios of glucose to maltose indicate that both maltose and glucose compete with efficiency similar to glucosyl acceptors. However, once formed, the fate of the two products is notably different. Although panose reaches a maximum and then declines, isomaltose keeps increasing (Figure 6). This result is explained by the higher affinity of AglA for panose as a substrate for hydrolysis, compared to isomaltose.¹² Structural modeling of *A. niger* α -glucosidase with panose docked at the active site supports this observation.

As shown in Figure 4, the glucosyl residue at the reducing end of panose may form three putative hydrogen bonds to D225, S495, and H596. This would represent an additional stabilization for the formation of the enzyme–substrate complex, as compared to the isomaltose molecule, which is equivalent to panose except for this glucosyl end. These three residues are conserved in the α -glucosidase from *Schwanniomycetes occidentalis*, which has a product profile similar to that of AglA.⁷ Interestingly, H596 is substituted by Ser in the α -glucosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous*, which synthesizes panose and maltotriose with similar efficiencies.⁵ This suggests that the subsite represented by these residues is involved in the product specificity of the enzyme.

In conclusion, this study presents a simple procedure to synthesize IMOs (specifically, panose and isomaltose) with high yield. The cell surface display system used here allows the implementation of a one-pot procedure by which yeast biomass can be used and recycled as the catalytic agent for IMO production.

MATERIALS AND METHODS

Microbial Strains and Culture Media. *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (MATa AGT1 MAL12 mal13Δ MAL31 MAL32 mal33Δ his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0), used as the yeast host strain, is isogenic to the standard wild type S288C (<http://www.yeastgenome.org>). *A. niger* CECT 2775 was obtained from Colección Española de Cultivos Tipo (<http://cect.org>). Composition of complete (yeast extract peptone dextrose, YPD) and minimal (synthetic defined) media is described by Sherman.³²

Cloning Procedures. The *A. niger* *aglA* gene (GenBank: D45356.1) encodes an α -glucosidase (EC 3.2.1.20) belonging to family 31 of glycoside hydrolases. For cloning of this gene, *A. niger* was cultured in liquid YPD for 36 h at 26 °C. The mycelium was recovered by filtration, frozen, and disrupted by grinding in liquid nitrogen with a mortar and pestle. RNA was isolated using RNA PLUS (MP Biomedicals), based on a procedure described by Chomczynski and Sacchi.³³ Reverse transcription was carried out with the SuperScript III First-Strand Kit (Invitrogen). The coding gene sequence, excluding its signal peptide, was amplified from the complementary DNA using primers 2MC70 (forward): CTGCTAGAGCGAGCCAGTCACCTTTATC (XbaI site underlined) and 2MC71 (reverse): TCACAAGCTTTAC-CATTCCAATACCCAGTTTCC (HindIII site underlined). The amplified DNA fragment was cloned in NheI/HindIII sites of plasmid pSSP-GOX, a modified version of the yeast expression vector pEMBLyex4, that carries the coding region of the *STA1* gene signal peptide,^{34,35} under control of a galactose inducible promoter (CYC-GAL). The resulting plasmid (pSSP-AG) was used to transform *S. cerevisiae* BY4741. The same yeast strain was also transformed with vector pEMBLyex4 to be used as a negative control.

Hybrid genes of *A. niger* *aglA* and *S. cerevisiae* *SED1* were constructed as follows. The coding sequence of the *aglA* gene version that includes a 5' extension corresponding to the *S. cerevisiae* *STA1* signal peptide was amplified with primers 2MC81 (forward): CCAGGATCCATGGTGGGACTTAAGAACC (BamHI site underlined) and 2MC82 (reverse): CCTAGTG-CATGCAGTGGTCCATTCCAATACCCAGTTTCC (SphI site underlined). The *STA1-aglA* gene was fused to two versions of the *S. cerevisiae* *SED1* gene. The first version (*SED1A*) contains the entire coding region of the gene (GenBank/NCBI sequence NM_001180385.3), whereas the second one (*SED1B*)

lacks the first 109 amino acids.²² For *SED1_A* synthesis, the gene, excluding the initial ATG, was amplified from *S. cerevisiae* genomic DNA with primers 2MC83 (forward): CCTAGTGCATGTCAGTGGTAAATTTATCAACTGTCCTATTATCTGC (SphI site underlined) and 2MC84 (reverse): CACAAGCTTTTATAAGATAACATAGCAACACCAG (HindIII site underlined). *SED1B* was amplified using primers 2MC85 (forward): CCTAGTGCATGTCAGTGGTCTCTTCCAACCTAACGGTAC (SphI site underlined) and 2MC84 (reverse): CACAAGCTTTTATAAGATAACATAGCAACACCAG (HindIII site underlined). The hybrid fusions of *STA1-agIA* to either *SED1A* or *SED1B* were cloned at BamHI/HindIII sites of pEMBLyex4, under the control of the *CYC-GAL* galactose inducible promoter (plasmids pSSP-AG_Sed1A and pSSP-AG_Sed1B, respectively).

Determination of α -Glucosidase Production and Activity. Enzyme (α -glucosidase) activity was measured with *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (pNPG) as the substrate, in cells collected by centrifugation from galactose-induced cultures of transformed *S. cerevisiae* strains and in the supernatant of the cultures. Cultures were inoculated in liquid YPD medium at a cell density equivalent to A_{600} of ca. 0.5 and cultivated under agitation at 30 °C up to an A_{600} of around 2.0. At this point, galactose was added at 1% final concentration and the cultures were grown for an additional period of approximately 18 h. Cell and supernatant fractions of 1 mL aliquots from the induced cultures were separated by centrifugation. The cells were resuspended in 250 μ L of citrate phosphate buffer pH 5.5. To 100 μ L of sample (either supernatant or cell fraction), 150 μ L of a pNPG solution in citrate phosphate buffer pH 5.5 was added, making the final concentration of the substrate 1 mM. The reaction mixtures were incubated at 37 °C. The reactions were stopped at different time intervals by adding 500 μ L of 1 M sodium carbonate. Released *p*-nitrophenol was measured spectrophotometrically at A_{400} .

Extracellular α -glucosidase produced by *S. cerevisiae* was also analyzed by SDS-PAGE. The protein in the supernatant of the induced yeast cultures was concentrated about 65 times by ultrafiltration, using a Pierce protein concentrator 30k (Thermo Scientific). The concentrated protein samples were split in two and one of them was deglycosylated by treatment with Endo H (Biolabs) for 16 h at 37 °C in the presence of a protease inhibitor cocktail (Complete EDTA-free, Roche), whereas the other was incubated under the same conditions without Endo H. Native, and deglycosylated protein samples were subjected to acrylamide gel electrophoresis and silver stained.

IMO Determination. Production of IMOs was assayed using maltose, or a mixture of maltose and glucose, as the substrate and *S. cerevisiae* cells, expressing different versions of the *aglA* gene, as the enzyme source. The yeast cells collected from 10 mL of induced culture were resuspended in citrate phosphate buffer pH 5.5 with the substrate at different concentrations and incubated at 50 °C. In the case of yeast transformants expressing *AglA-Sed1* hybrid enzymes, the cells were initially resuspended in the same buffer without any substrate and incubated at 50 °C for 24 h to reduce their metabolic activity (glucose consumption). After this time, the cells were incubated with the substrate (maltose or a mixture of maltose and glucose) at the same temperature. Samples were taken at different time intervals. The soluble fraction was collected by centrifugation and heated at 95 °C for 10 min to stop the reaction. IMO synthesis was analyzed by ion exchange chromatography using an high-performance liquid chromatography (HPLC) instrument equipped with CarbonPac PA100 columns and a pulsed amperometric detector (Dionex,

Thermo Fisher Scientific) as previously described.³⁶ Sugars were identified by their chromatographic retention times. The sugar concentration was calculated by interpolation of their peak areas. Glucose, isomaltose, isomaltotriose, maltose, panose, and maltotriose (Sigma) were used as standards.

Protein Structure Analysis. A structural model of *A. niger* α -glucosidase was obtained using I-TASSER.³⁷ The model was adjusted to superimpose the orientation of the putative catalytic residues (D490 and D660, nucleophile and acid/base, respectively) with the corresponding residues of the sugar beet α -glucosidase (PDB id 3WEO). The protein structure was analyzed with the PyMOL Molecular Graphics System (Schrödinger, LLC). Molecular docking of glucose, panose, and isomaltose was carried out with Maestro 11 (Schrödinger, LLC), taking as a reference the interaction of sugar beet α -glucosidase with acarbose.^{38,39}

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: jpolaina@iata.csic.es (J.P.).

ORCID

Julio Polaina: 0000-0001-9912-0640

Author Contributions

M.C.-V., J.M.-N. and J.P. designed the research, M.C.-V. and J.M.-N. performed the experimental work, M.C.-V., J.M.-N. and J.P. analyzed the data, and J.P. and J.M.-N. wrote the article.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank David Talens-Perales for valuable assistance with the docking analysis. This work was funded by grants AGL2016-75245-R and BIO2013-48779-C4-3-R from Spain's "Secretaría de Estado de Investigación, Desarrollo e Innovación". M.C.-V. was supported by a SENESCYT predoctoral fellowship from the Government of República del Ecuador.

REFERENCES

- Talens-Perales, D.; Polaina, J.; Marín-Navarro, J. Enzyme engineering for oligosaccharide biosynthesis. In *Frontier Discoveries and Innovations in Interdisciplinary Microbiology*; Shukla, P., Ed; Springer: India, 2016; pp 9–31.
- Shi, Q.; Hou, Y.; Juvonen, M.; Tuomainen, P.; Kajala, I.; Shukla, S.; Goyal, A.; Maaheimo, H.; Katina, K.; Tenkanen, M. Optimization of isomaltooligosaccharides size distribution by acceptor reaction of *Weissella confusa* dextranucrase and characterization of novel α -(1 \rightarrow 2)-branched isomaltooligosaccharides. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 3276–3286.
- Goffin, D.; Delzenne, N.; Blecker, C.; Hanon, E.; Deroanne, C.; Paquot, M. Will isomalto-oligosaccharides, a well-established functional food in Asia, break through the European and American market? The status of knowledge on these prebiotics. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2011**, *51*, 394–409.
- Madsen, L. R.; Stanley, S.; Swann, P.; Oswald, J. A Survey of commercially available isomaltooligosaccharide-based food ingredients. *J. Food Sci.* **2017**, *82*, 401–408.
- Gutiérrez-Alonso, P.; Gimeno-Pérez, M.; Ramírez-Escudero, M.; Plou, F. J.; Sanz-Aparicio, J.; Fernández-Lobato, M. Molecular characterization and heterologous expression of a Xanthophyllomyces dendrorhous α -glucosidase with potential for prebiotics production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 3125–3135.
- Sorndech, W.; Tongta, S.; Blennow, A. Slowly digestible- and non-digestible α -glucans: An enzymatic approach to starch modification and nutritional effects. *Starch* **2017**, DOI: 10.1002/star.201700145.

- (7) Song, K.-M.; Okuyama, M.; Nishimura, M.; Tagami, T.; Mori, H.; Kimura, A. Aromatic residue on β - α loop 1 in the catalytic domain is important to the transglucosylation specificity of glycoside hydrolase family 31 α -glucosidase. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2013**, *77*, 1759–1765.
- (8) Fernández-Arrojo, L.; Marín, D.; Gómez De Segura, A.; Linde, D.; Alcalde, M.; Gutiérrez-Alonso, P.; Ghazi, I.; Plou, F. J.; Fernández-Lobato, M.; Ballesteros, A. Transformation of maltose into prebiotic isomaltooligosaccharides by a novel α -glucosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Process Biochem.* **2007**, *42*, 1530–1536.
- (9) Yamamoto, T.; Unno, T.; Watanabe, Y.; Yamamoto, M.; Okuyama, M.; Mori, H.; Chiba, S.; Kimura, A. Purification and characterization of *Acremonium implicatum* α -glucosidase having regioselectivity for α -1,3-glycosidic linkage. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1700*, 189–198.
- (10) Kobayashi, I.; Tokuda, M.; Hashimoto, H.; Konda, T.; Nakano, H.; Kitahata, S. Purification and characterization of a new type of α -glucosidase from *Paecilomyces lilacinus* that has transglucosylation activity to produce α -1,3- and α -1,2-linked oligosaccharides. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2003**, *67*, 29–35.
- (11) Malá, Š.; Dvořáková, H.; Hrabal, R.; Králová, B. Towards regioselective synthesis of oligosaccharides by use of α -glucosidases with different substrate specificity. *Carbohydr. Res.* **1999**, *322*, 209–218.
- (12) Ma, M.; Okuyama, M.; Sato, M.; Tagami, T.; Klahan, P.; Kumagai, Y.; Mori, H.; Kimura, A. Effects of mutation of *Asn694* in *Aspergillus niger* α -glucosidase on hydrolysis and transglucosylation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101*, 6399–6408.
- (13) Mangas-Sánchez, J.; Adlercreutz, P. Enzymatic preparation of oligosaccharides by transglucosylation: A comparative study of glucosidases. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2015**, *122*, 51–55.
- (14) Chen, D.-L.; Tong, X.; Chen, S.-W.; Chen, S.; Wu, D.; Fang, S.-G.; Wu, J.; Chen, J. Heterologous expression and biochemical characterization of alpha-glucosidase from *Aspergillus niger* by *Pichia pastoris*. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 4819–4824.
- (15) Duan, K.-J.; Sheu, D.-C.; Lin, C.-T. Transglucosylation of a fungal α -glucosidase. The enzyme properties and correlation of isomaltooligosaccharide production. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1995**, *750*, 325–328.
- (16) Kaneko, T.; Kohmoto, T.; Kikuchi, H.; Shiota, M.; Iino, H.; Mitsuoka, T. Effects of isomaltooligosaccharides with different degrees of polymerization on human fecal Bifidobacteria. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **1994**, *58*, 2288–2290.
- (17) Kohmoto, T.; Fukui, F.; Takaku, H.; Machida, Y.; Arai, M.; Mitsuoka, T. Effect of isomaltoligosaccharides on human fecal flora. *Bifidobact. Microflora* **1988**, *7*, 61–69.
- (18) Fernandes, F. A. N.; Rodrigues, S. Evaluation of enzymatic reactors for large-scale panose production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2007**, *142*, 95–104.
- (19) Marín-Navarro, J.; Talens-Perales, D.; Polaina, J. One-pot production of fructooligosaccharides by a *Saccharomyces cerevisiae* strain expressing an engineered invertase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 2549–2555.
- (20) Naumov, G. I.; Naumova, E. S.; Michels, C. A. Genetic variation of the repeated MAL loci in natural populations of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus*. *Genetics* **1994**, *136*, 803–812.
- (21) Charron, M. J.; Read, E.; Haut, S. R.; Michels, C. A. Molecular evolution of the telomere-associated MAL loci of *Saccharomyces*. *Genetics* **1989**, *122*, 307–316.
- (22) Van der Vaart, J. M.; te Biesebeke, R.; Chapman, J. W.; Toschka, H. Y.; Klis, F. M.; Verrips, C. T. Comparison of cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae* as anchors for cell surface expression of heterologous proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 615–620.
- (23) Inokuma, K.; Yoshida, T.; Ishii, J.; Hasunuma, T.; Kondo, A. Efficient co-displaying and artificial ratio control of α -amylase and glucoamylase on the yeast cell surface by using combinations of different anchoring domains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 1655–1663.
- (24) Shimoi, H.; Kitagaki, H.; Ohmori, H.; Iimura, Y.; Ito, K. Sed1p is a major cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase and is involved in lytic enzyme resistance. *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 3381–3387.
- (25) Sorndech, W.; Sagnelli, D.; Blennow, A.; Tongta, S. Combination of amylase and transferase catalysis to improve IMO compositions and productivity. *LWT—Food Sci. Technol.* **2017**, *79*, 479–486.
- (26) Basu, A.; Mutturi, S.; Prapulla, S. G. Production of isomaltooligosaccharides (IMO) using simultaneous saccharification and transglucosylation from starch and sustainable sources. *Process Biochem.* **2016**, *51*, 1464–1471.
- (27) Li, Y.-J.; Zhao, G.-Y.; Du, W.; Zhang, T.-J. Effect of dietary isomaltoligosaccharides on nutrient digestibility and concentration of glucose, insulin, cholesterol and triglycerides in serum of growing pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2009**, *151*, 312–315.
- (28) Erhardt, F. A.; Rosenstock, P.; Hellmuth, H.; Jördening, H.-J. Development of a multiphase reaction system for integrated synthesis of isomaltose with a new glucosyltransferase variant. *Biocatal. Biotransform.* **2010**, *28*, 72–82.
- (29) Mäkeläinen, H.; Hasselwander, O.; Rautonen, N.; Ouwehand, A. C. Panose, a new prebiotic candidate. *Letts. Appl. Microbiol.* **2009**, *49*, 666–672.
- (30) Zhang, R.; Pan, Y. T.; He, S.; Lam, M.; Brayer, G. D.; Elbein, A. D.; Withers, S. G. Mechanistic analysis of trehalose synthesis from *Mycobacterium smegmatis*. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 35601–35609.
- (31) Wheatley, R. W.; Lo, S.; Jancewicz, L. J.; Dugdale, M. L.; Huber, R. E. Structural explanation for allolactose (lac operon inducer) synthesis by *lacZ* β -galactosidase and the evolutionary relationship between allolactose synthesis and the lac repressor. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 12993–13005.
- (32) Sherman, F. Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* **2002**, *350*, 3–41.
- (33) Chomczynski, P.; Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **1987**, *162*, 156–159.
- (34) Marín-Navarro, J.; Gurgu, L.; Alamar, S.; Polaina, J. Structural and functional analysis of hybrid enzymes generated by domain shuffling between *Saccharomyces cerevisiae* (var. diastaticus) Stal glucoamylase and *Saccharomyces fibuliger* Bgl1 β -glucosidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *89*, 121–130.
- (35) Marín-Navarro, J.; Roupain, N.; Talens-Perales, D.; Polaina, J. Identification and structural analysis of amino acid substitutions that increase the stability and activity of *Aspergillus niger* glucose oxidase. *PLoS One* **2015**, *10*, No. e0144289.
- (36) Lafraja, A.; Sanz-Aparicio, J.; Polaina, J.; Marín-Navarro, J. Fructo-oligosaccharide synthesis by mutant versions of *Saccharomyces cerevisiae* invertase. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 6148–6157.
- (37) Yang, J.; Yan, R.; Roy, A.; Xu, D.; Poisson, J.; Zhang, Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods* **2015**, *12*, 7–8.
- (38) Tagami, T.; Yamashita, K.; Okuyama, M.; Mori, H.; Yao, M.; Kimura, A. Structural advantage of sugar beet α -glucosidase to stabilize the Michaelis complex with long-chain substrate. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 1796–1803.
- (39) Tagami, T.; Yamashita, K.; Okuyama, M.; Mori, H.; Yao, M.; Kimura, A. Molecular basis for the recognition of long-chain substrates by plant α -glucosidases. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 19296–19303.