

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Estudio de nuevas xilanasas de *Talaromyces amestolkiae* :
caracterización, conversión a glicosintasas y mejora de su
producción mediante manipulación genética del hongo**

**Study of novel xylanases from *Talaromyces amestolkiae* :
characterization, conversion into glycosynthases, and
improved production through genetic manipulation of the
fungus**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ana Pozo Rodríguez

DIRIGIDA POR

**María Jesús Martínez Hernández
Jorge Barriuso Maicas**

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

Estudio de nuevas xilanasas de *Talaromyces amestolkiae*: caracterización, conversión a glicosintasas y mejora de su producción mediante manipulación genética del hongo

Study of novel xylanases from *Talaromyces amestolkiae*: characterization, conversion into glycosynthases, and improved production through genetic manipulation of the fungus

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Ana Pozo Rodríguez

DIRECTORES

María Jesús Martínez Hernández

Jorge Barriuso Maicas

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

Estudio de nuevas xilanasas de *Talaromyces amestolkiae*: caracterización, conversión a glicosintasas y mejora de su producción mediante manipulación genética del hongo

Study of novel xylanases from *Talaromyces amestolkiae*: characterization, conversion into glycosynthases, and improved production through genetic manipulation of the fungus

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA EN
BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOMEDICINA

PRESENTADA POR

Ana Pozo Rodríguez

DIRECTORES

María Jesús Martínez Hernández
Jorge Barriuso Maicas

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el grupo Sistemas Microbianos e Ingeniería de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CIB-CSIC). Ha sido financiada por una ayuda de Formación de Profesorado Universitario (FPU2019/04192) y los proyectos RTI2018-093683-B-I00 (GLYSUS) y H2V2021-05-003 (en el marco de la PTI+ TransEner). También me gustaría agradecer al Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (MICIU) y a la Federation of European Microbiological Societies (FEMS) su financiación para realizar mi estancia de investigación en el grupo Bioavailability del Helmholtz Centre for Environmental Research (UFZ, Leipzig, Alemania).

Parece increíble lo mucho que han cambiado las cosas desde que llegué al CIB hace casi cinco años. Los comienzos no fueron sencillos, ya que me incorporé en plena pandemia de la COVID-19, lo que complicó la realización de mis primeros experimentos e impidió que me pudiese integrar con normalidad en mi nuevo grupo. Poco a poco, aquel primer año tan convulso fue quedando atrás, y este doctorado ha acabado convirtiéndose en una etapa profundamente enriquecedora, tanto en lo profesional como en lo personal. Por ello, en las siguientes páginas me gustaría expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que, de una forma u otra, han contribuido a que hoy me encuentre aquí, a punto de terminar el doctorado.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a María Jesús Martínez y a Jorge Barriuso, mis directores de tesis. María Jesús, me acogiste en tu laboratorio sin conocerme de nada, simplemente tras recibir aquel correo en el que tanteaba la posibilidad de realizar el doctorado en alguna de vuestras líneas de investigación. Te estoy muy agradecida por la oportunidad, por haber confiado en mí desde el primer momento y por toda tu ayuda a lo largo de estos años. Gracias, también, por tener siempre la puerta abierta para resolver mis dudas científicas y para escuchar algún que otro drama vital, y por hacerlo siempre con cariño y cercanía. Ha sido un verdadero honor ser tu última doctoranda. También me gustaría agradecer a Jorge Barriuso su guía durante este doctorado. Muchas gracias por tu disponibilidad y por poner un poco de practicidad a mi perfeccionismo. Tu entusiasmo por la ciencia es admirable y tu capacidad para proponer nuevas ideas infinita.

Hay otra científica en el grupo a la que le debo muchísimo. Mil gracias Alicia Prieto (Ali) por el optimismo que transmites a la gente que tienes alrededor y por interesarte siempre por mí cuando tenía algún problema con mis experimentos. Quiero hacer una mención especial a esa habilidad que tienes para mejorar todos los trabajos que caen en tus manos y para detectar hasta la última errata de mis artículos y presentaciones.

Otro científico que ha contribuido a que esta tesis salga adelante y no me vuelva loca lidiando con las peculiaridades de nuestro querido *T. amestolkiae* es Eduardo Espeso. Tu ayuda no solo ha sido fundamental para lograr transformar este hongo, sino que con tus explicaciones ahora sé un poquito más sobre la biología de los hongos filamentosos. Muchas gracias por tu paciencia para responder todas mis preguntas y por sacarme una sonrisa cada vez que lo hacías. También querría agradecer a Miguel Ángel Peñalva su colaboración para pulir el tercer artículo de mi tesis, fue increíble todo lo que aprendí en una tarde al corregir contigo el borrador.

Me gustaría destacar a los/las científicos/as con los que he colaborado para realizar algunos de los experimentos de esta tesis. Muchas gracias a Javier Cañada y Eva Calviño por determinar por RMN las estructuras de los glicósidos, a Andrés Santana por sintetizar los donadores de azúcar activados con flúor y a Tomás Barberán y su grupo por llevar a cabo las fermentaciones colónicas del xilobiósido de resveratrol. También me gustaría dar las gracias a la Unidad de Espectrometría de masas de la UCM por analizar por ESI-MS las reacciones de glicosilación y al Servicio de Bioinformática y Bioestadística del CIB-CSIC por interpretar los datos de secuenciación del genoma de Tam_XInR^{V785F}. Gracias también a Leo del Servicio de Cromatografía de Gases (CIB-CSIC) y a Vivi y Paco del Servicio de Proteómica y Genómica (CIB-CSIC) por procesar mis muestras y por vuestros consejos. Hay otras personas trabajando en el CIB igual de indispensables para que este centro funcione correctamente. Son muchos/as, pero me gustaría mencionar a Raquel por ser una de las personas más eficientes que conozco y alegrarnos el día a día cada vez que la vemos y a María Fresneda por sus palabras de ánimo al entrar al laboratorio todas las tardes.

I would also like to thank Lukas Wick for giving me the opportunity to do my research stay in his lab at UFZ. It was very interesting to learn how to study fungal-bacterial interactions and to measure the hydrophobicity of these microorganisms. I am also grateful to the rest of my colleagues of UFZ and the people I met outside the lab, who made my time in Leipzig a fun and enriching experience.

Gracias también a mi tutor Miguel Arroyo y al director del programa de doctorado Javier Lacadena, de la UCM, por su amabilidad y rapidez a la hora de resolver todas las dudas que me han ido surgiendo a lo largo de estos años de tesis.

Quiero extender mi agradecimiento al resto de jefes de Biolig. A Susana Camarero por su simpatía y disponibilidad para resolver cualquier duda y a Javier Ruiz Dueñas, por sus charlas sobre hongos y por los ánimos que siempre me ha dado al cruzarnos por los pasillos. Gracias también a Marta por ser la amabilidad personificada y preocuparse por cómo me va todo cada vez que coincidimos.

Además del respaldo de todos los responsables de laboratorio y del personal de los servicios del CIB, nunca me ha faltado el apoyo de mis compañeros de grupo. Sin ellos, este doctorado no habría sido ni la mitad de divertido. Más allá de contarnos nuestros éxitos y penurias científicas, también hemos compartido grandes momentos en la poyata, cafés, cervezas después del trabajo, vermutitos en La Violeta o en cualquier otro bar, casas rurales, planes de montaña y escalada, alguna que otra fiesta y viajes. Empezamos por el laboratorio que ha sido mi casa dentro del CIB, el 249.

Lara, después de todos estos años te has convertido en una gran amiga, de esas que siempre están ahí cuando se las necesita. Juntas hemos vivido de todo: alegrías, llores, risas, agobios, dramas existenciales y, por supuesto, salseos. Muchísimas gracias por tu apoyo constante, por animarme en mis momentos de bajón, por soportar mi mala leche cuando no me funcionaban los experimentos, por ayudarme a buscar protocolos entre mis mil cuadernos de laboratorio (prometo añadir un índice en el siguiente) y por darme la oportunidad de ver como son unas fiestas de pueblo. Estoy segura de que llegarás tan lejos como te propongas y espero poder seguir estando cerca de ti para celebrarlo.

Felipe, eres una de las personas más buenas y con la paciencia más infinita que conozco (aunque se te agote en las casas rurales a las 6 am). La verdad es que no sé cómo has aguantado todas mis tonterías durante estos últimos años. Mil gracias por toda tu ayuda en el laboratorio, por las clases particulares de escalada, por las no “fiestas de pijama” en tu casa, por hacer posible que tengamos una familia de Felipitos en el labo (por favor, dame algo de tu buena suerte) y por ser protagonista de las mejores anécdotas que se han contado y se siguen contando en el CIB. Espero seguir organizando planes (cervecitas, conciertos, viajes y lo que se tercie, que ya sabemos que nos apuntamos a un bombardeo) muchos años más.

Laura (Lidem), eres una de las mayores fuentes de sabiduría del CIB y has sido un pilar fundamental en gran parte de mi tesis: siempre dispuesta a aconsejarme cuando me atascaba con los experimentos, a evitar que perdiera el tiempo con alguna de mis ideas poco realistas, y a darme una *masterclass* sobre la importancia del *skincare* al llegar a cierta edad. Aunque te echemos muchísimo de menos, no sabes cuánto me alegro de que estés teniendo la oportunidad de mostrar al mundo la maravillosa científica que eres.

David Sanz, espero que en algún momento me creas cuando te digo que eres uno de los mejores postdoc que conozco y que tus “patitos” tienen una suerte increíble por contar con alguien tan involucrado enseñándoles, aunque luego les tortures con tus famosos exámenes. Muchas gracias por escucharme y darme soluciones a mis experimentos fallidos, y por tus abrazos cuando más los necesitaba.

Isa de la Torre, la otra integrante de Radio Patio junto a Lara y mi compi de sufrimientos con *T. amestolkiae*. Mil gracias por la larga lista de ideas para afrontar mi doctorado, por tu ayuda para cualquier tema, tanto científico como vital, por nuestras conversaciones interminables y, sobre todo, por el apoyo en mis momentos más dramáticos. Aunque ahora ya no pasemos nuestro día a día juntas, me alegro un montón de que te pueda seguir haciendo visitillas en la tercera planta del CIB.

Juan Méndez, fuiste el primer postdoc que me enseñó a desenvolverse en los laboratorios de Biolig. Muchísimas gracias por guiarme en mis primeros experimentos con glicosil hidrolasas y por explicarme como utilizar el HPLC sin desesperar en el intento. Fuera del laboratorio también hemos disfrutado de partidillos de pádel, tardes de juegos de mesa y tu boda este año.

Nacho, compañero de pasillo del laboratorio y primero en escuchar mis refunfuños durante mi última etapa de doctorado. Muchas gracias por entender mis frustraciones, por los momentos de sarcasmo, tus consejos científicos y todas tus recomendaciones sobre posibles salidas laborables.

Dani, última incorporación del 249. No sabes cuanto te agradezco que nos alegres los días con tus chistes, tu imaginación para componer canciones y tus esfuerzos para convencernos de todos los beneficios de la avena.

Cambiando al resto de laboratorios, me gustaría dar millones de gracias a Ale, por tener el corazón más bueno de todo el grupo y estar siempre allí para animarme, por todos los viajes y planes compartidos y por hacer que no quede ni un resto de comida en nuestros platos. A Diego por su entusiasmo, por pegarme todas y cada una de las canciones que tatarea al entrar al 249 y por sorprendernos con sus dotes musicales con el hit “No va el HPLC” en la fiesta de la primavera 2024. A Javi Molpe, estoy esperando con ganas tu siguiente viaje para que subas las mejores *stories* de Instagram contándonos todas las cosas chulas que vas descubriendo. A Carlos por su autenticidad y por tomarse todos los fracasos de laboratorio (sobre todo los de los geles de proteínas) con sentido del humor.

A Lola, por estar siempre dispuesta a ayudar, por los detalles que aparecen de vez en cuando en nuestras mesas, por nuestro intercambio de ropa y por tu risa contagiosa que me hace sonreír cada vez que la escucho por los pasillos. Igual que la de Juan Carro, experto en contar las anécdotas más desternillantes y útiles para entrar con buen pie en Biolig. Mil gracias Marisa por toda tu ayuda para que no desespere en la recta final de la tesis y por estar a punto de conseguir que haga caso a tus recomendaciones de libros. Iván, me acuerdo de que cuando empecé el doctorado mucha gente de Biolig hablaba maravillas de ti, algo que pude comprobar cuando volviste de tu postdoc (aunque me falta todavía ir a alguno de tus conciertos). Muchas

gracias a Rodri, por mostrarnos cómo escalar cualquier pared, incluida la de las casas rurales, y por tus diseños molones de camisetas que tanto han triunfado en el grupo. A Rober, por ser unos de los fichajes estrella más recientes y por todo lo que nos enseñas en tu canal de divulgación. A Aleksandra (he perdido la cuenta de cuántas galletas nos has traído en los últimos meses) y a Natalia por todos los buenos ratos en el café que habéis compartido con los Funguitos.

No me puedo olvidar de los/as compañeros/as que ya no trabajan en el CIB pero que han sido también una parte fundamental de mi tesis. Mil gracias Chema por ser una de las personas más divertidas que conozco, por transmitirnos toda esa energía positiva, por ser el alma de la fiesta y por enseñarnos las maravillas de Cádiz. Te vamos a echar mucho de menos, no te vayas muy lejos de Madrid, porfa. A Javi “postdoc” por ser el mejor guía de montaña, incluso cuando el plan era de domingueros, y por invitarnos a su casa de la sierra (espero que la próxima vez tu madre conserve intacta la vajilla). A Gonzalo, por su característico sentido del humor y por estar siempre disponible para ayudarme a convencer a Felipe de que nos invite a su casa (tenemos la tercera de High School Musical pendiente y esta vez creo que la acompañaremos con pisco sours en vez de con algodón de azúcar). A Guille, por ser garantía de una tarde de risas y por convencernos para avistar tres delfines (como mucho, no sabemos todavía si eran el mismo) en un paseo en barco accidentado. A Julia por entender mis dramas existenciales, ayudarme a tomármelos con humor y por ser la mejor compi de habitación posible en nuestro viaje a Marruecos. A Pablo Aza, por resolverme las dudas de estadística y las de los trámites de la FPU. Junto a Juan Carral, hacíais que soltase una carcajada cada vez que entraba al 200. A Isa Ocampos, por ser un amor de persona. A Miguel, por unirse a las conversaciones del 249, espero que te vaya super bien en el CIEMAT. A Mateo, por su ayuda en mi primer año de tesis y las charletas de camino al metro. A Inés por introducirnos en el vocabulario de las nuevas generaciones. A Elvira Romero, por sus infinitas soluciones cuando me atascaba con algún clonaje. Muchas gracias también a Alba, Javi Guerrero, Jaime, David Rodríguez, Íñigo, Amadeo, Valentina, Ana Serrano, Cris, Blanca, Elvira, Bea, Diego, Pablo, Sandra, Rodri y un largo etc, por contribuir a que recuerde con mucho cariño mi etapa en el CIB.

Además de con los Funguitos, he tenido la suerte de trabajar con los compis del grupo de Biología Celular de *Aspergillus* (Irene, Silvia, Mario, Sara, Ignacio, Marisa, Juan, etc). Muchas gracias por vuestros consejos para transformar hongos filamentosos y por ser tan simpáticos conmigo cada vez que aparecía por la puerta de vuestros laboratorios a preguntar.

Para conseguir terminar el doctorado con un mínimo de cordura, no basta con tener un ambiente de trabajo espectacular, sino que también es imprescindible contar con una buena red de apoyo fuera de él compuesta por amigos/as y familia.

Dani, nos conocimos hace más de siete años en Plantsoen y aquí sigues aguantándome en Madrid. Muchas gracias por estar siempre ahí para escucharme y por darme el empujoncito que me falta en momentos de poca confianza. En breves estaremos brindando por tu doctorado también. Muchas gracias a María (Torri), mi compi de estreses en estos últimos meses de escritura. Que bien me han venido esas tardes de teatro y las cervecitas de desahogo.

I would like to thank my friends from Wageningen, especially Peichan and Jort. I am super happy that, after all these years, we are still in touch. Thanks so much for hosting me every year when I come back to The Netherlands and for letting me add the cultural and nature-loving touch to our surf trips. I cannot wait to see where we will go next! Moltes gràcies Narcis, todavía me acuerdo de las canciones que ponías en el lab de BPE y de esos desayunos maravillosos (tomates del huerto de tu padre incluidos) que preparábamos los fines de semana en Herenstraat. Tengo pendiente una visitilla para que me enseñes el resto de maravillas de “your region”.

A mis compis de piso de estos últimos años. Muchas gracias Laura por la convivencia fantástica en nuestro pequeño pisito de Blasco de Garay. No sabes todo lo que he aprendido de ti y la paz que consigues transmitirme cada vez que nos vemos. Y a las Zafresas por construir el hogar tan bonito que tenemos y por aguantar mis agobios de mi último año de doctorado. Julia y Clau, habéis sido el gran descubrimiento de este año, espero poder compartir muchas más confidencias y cenas premiums con vosotras. Ana, nos conocemos desde hace ya muchos años, pero fue Wageningen, esa pequeña ciudad tan importante para las dos, la que nos unió. Muchas gracias por todo tu apoyo y por animarme a que sea coherente con mi propia línea de investigación comprando productos de proximidad y respetuosos con el medio ambiente.

A mis amigos biotecs. Javi y María, aunque ya no nos veamos tan a menudo, siempre me hace mucha ilusión volver a verlos en Madrid, Londres, Valencia, Alicante o donde sea. Sonia, me encantó coincidir contigo en los congresos de la SEM y espero hacerte una visitilla a Chile pronto. Muchas gracias también a Helena, la mejor compi de Crossfit, Jelen, Fran, etc.

Por último, me gustaría agradecer todo el cariño a mi familia, sobre todo a mi abuela (créeme que mis evaluadores agradecerán que esta tesis no tenga dos tomos) y a mis padres. Muchas gracias, mamá y papá, por vuestros consejos, apoyo incondicional, y ánimos durante todos estos años. La pasión por investigar y aprender que me habéis inculcado desde que tengo uso de razón va a hacer posible que haya otra Doctora en la familia. Espero que estéis tan orgullosos como yo de las metas que poquito a poco estoy alcanzando en mi vida.

ESTRUCTURA DE LA TESIS

La presente memoria para optar al título de Doctora se basa en tres artículos científicos que han sido publicados en revistas internacionales, indexadas y de acceso abierto. Para facilitar la cohesión y legibilidad, esta Tesis Doctoral consta de: i) una introducción general; ii) un apartado con los materiales y métodos empleados; iii) cuatro capítulos en los que se introduce el tema con un prólogo y se exponen los resultados y su discusión, seguidos de sus correspondientes anexos, iv) una discusión integradora que relaciona y sintetiza los resultados más destacados de los distintos capítulos, y v) unas conclusiones en español y en inglés. Además, al inicio se incluyen una lista de abreviaturas y un resumen en español y en inglés y, al final, la bibliografía utilizada.

La lista de publicaciones cuyo contenido se ha adaptado en esta Tesis Doctoral es la siguiente:

- Pozo-Rodríguez A., Méndez-Líter J.A., de Eugenio L.I., Nieto-Domínguez M., Calviño E., Cañada F.J., Santana A.G., Díez J., Asensio J.L., Barriuso J., Prieto A., Martínez M.J. (2022). A Fungal Versatile GH10 Endoxylanase and Its Glycosynthase Variant: Synthesis of Xylooligosaccharides and Glycosides of Bioactive Phenolic Compounds. *International Journal of Molecular Sciences*. 23(3), 1383. doi: 10.3390/ijms23031383.
- Pozo-Rodríguez A., Méndez-Líter J.A., García-Villalba R., Beltrán D., Calviño E., Santana A.G., de Eugenio L.I., Cañada F.J., Prieto A., Barriuso J., Tomás-Barberán F.A., Martínez M.J. (2022). Synthesis and Characterization of a Novel Resveratrol Xylobioside Obtained Using a Mutagenic Variant of a GH10 Endoxylanase. *Antioxidants*. 12(1), 85. doi: 10.3390/antiox12010085.
- Pozo-Rodríguez, A., Peñalva, M.Á., Barriuso, J., Espeso, E.A. & Martínez, M.J. (2025). Improvement of β -Xylosidase and Endoxylanase Activities in *Talaromyces amestolkiae* by Genetic Manipulation of the Transcriptional Activator XlnR. *Microbial Biotechnology*, 18(5), e70166. doi: 10.1111/1751-7915.70166

TABLA DE CONTENIDO

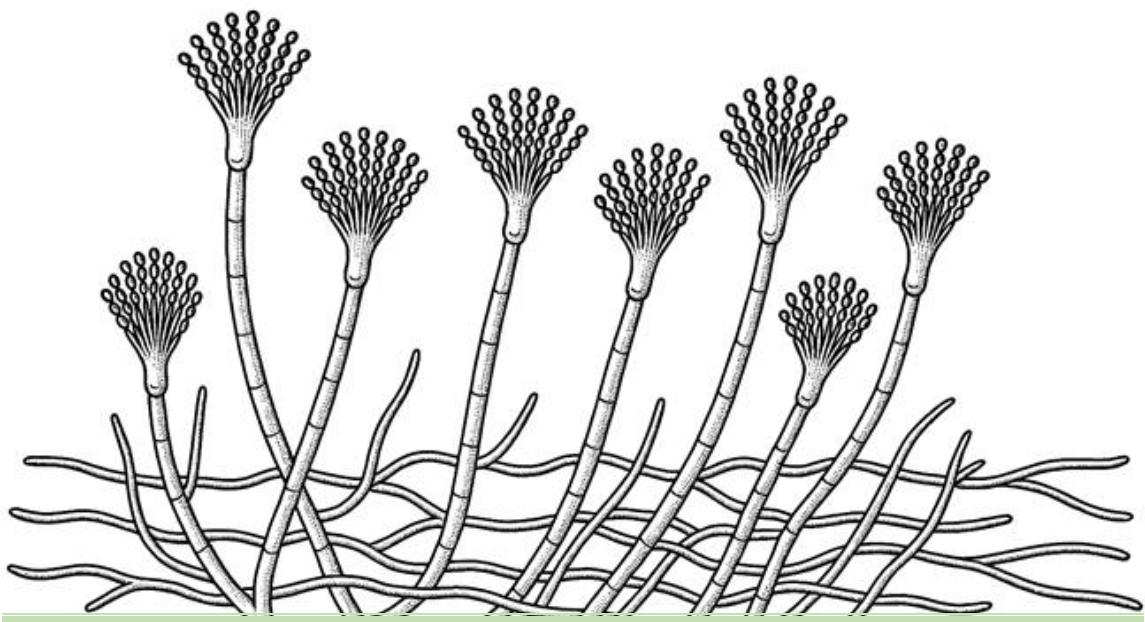
LISTA DE ABREVIATURAS	1
RESUMEN/ SUMMARY	9
INTRODUCCIÓN	17
1. Biomasa lignocelulósica	19
1.1. Celulosa	19
1.2. Hemicelulosa	21
1.3. Lignina	24
1.4. Degradación de la celulosa y hemicelulosa en la naturaleza	25
2. Glicosil hidrolasas	27
2.1. Reacciones de hidrólisis	29
2.2. Reacciones de transglicosilación y desarrollo de variantes glicosintasas y tioglicoligasas	30
3. Xilanasas: hemicelulasas activas sobre xilanos	33
3.1. Endoxilanasas	34
3.2. β -xilosidasas	35
3.3. Enzimas accesorias	36
4. Aplicaciones biotecnológicas de las xilanasas y otras glicosil hidrolasas implicadas en la degradación de lignocelulosa	37
5. Hongos ascomicetos como fuente de xilanasas y otras glicosil hidrolasas degradadoras de biomasa lignocelulósica	40
5.1. <i>Talaromyces amestolkiae</i>	42
6. Manipulación genética de hongos filamentosos	46
6.1. Marcadores de selección: desarrollo de cepas auxótrofas	46
6.2. Métodos de transformación	48
6.3. Plásmidos de replicación autónoma	49
7. Mejora de la producción de glicosil hidrolasas en hongos filamentosos mediante manipulación genética	50
7.1. Regulación de la expresión de glicosil hidrolasas por factores de transcripción	51
OBJETIVOS	55
MATERIALES Y MÉTODOS	59
1. Microorganismos, medios y condiciones de cultivo	61
1.1. Cepas de <i>Talaromyces amestolkiae</i>	61
1.2. Cepas de <i>Pichia pastoris</i>	64
1.3. Cepas de <i>Escherichia coli</i>	65

2.	Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos	65
2.1.	Extracción y purificación de ácidos nucleicos.....	65
2.2.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	66
2.3.	RT-PCR.....	69
2.4.	Electroforesis en geles de agarosa.....	69
2.5.	Construcción de plásmidos.....	70
2.6.	Secuenciación	73
3.	Modificación genética de microorganismos y <i>screening</i> de mutantes	73
3.1.	Transformación de <i>E. coli</i>	73
3.2.	Transformación de <i>P. pastoris</i>	74
3.3.	Aislamiento de mutantes <i>pyr</i> de <i>T. amestolkiae</i> resistentes a ácido 5-fluoroorótico	74
3.4.	Transformación de <i>T. amestolkiae</i>	75
4.	Técnicas de manipulación de proteínas	77
4.1.	Producción de enzimas recombinantes y crudos enzimáticos	77
4.2.	Purificación de enzimas recombinantes.....	77
4.3.	Cuantificación de proteínas.....	78
4.4.	Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	78
4.5.	Isoelectroenfoque.....	79
4.6.	Zimogramas para actividades enzimáticas	79
4.7.	Determinación de masa molecular exacta	80
4.8.	Análisis del estado oligomérico	80
5.	Experimentos de actividades enzimáticas.....	81
5.1.	Cuantificación de actividades hidrolíticas	81
5.2.	Perfiles de temperatura y pH.....	82
5.3.	Estudio de módulos de unión a carbohidratos.....	83
5.4.	Especificidad de sustrato y cinéticas	83
5.5.	Producción de xilooligosacáridos por hidrólisis de xilano	84
5.6.	Ensayos de transglicosilación	84
5.7.	Síntesis de xilooligosacáridos por oligomerización de xilobiosa	85
5.8.	Ensayos de sacarificación	85
6.	Técnicas para el análisis de glicósidos y xilooligosacáridos	86
6.1.	Detección y cuantificación de glicósidos y xilooligosacáridos	86
6.2.	Identificación de glicósidos por resonancia magnética nuclear	87
6.3.	Estudio de la regioselectividad de rXynSOS ^{E236G}	88
6.4.	Optimización de la síntesis del 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol	89

6.5.	Ensayo de solubilidad del 3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -xilobiósido de resveratrol	89
6.6.	Ensayo de actividad antioxidante del 3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -xilobiósido de resveratrol	89
6.7.	Fermentaciones colónicas con el 3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -xilobiósido de resveratrol.....	90
7.	Técnicas para la caracterización de las cepas mutantes de <i>T. amestolkiae</i>	92
7.1.	Microscopía de fluorescencia	92
7.2.	Cuantificación de biomasa.....	92
8.	Herramientas bioinformáticas para el análisis de secuencias.....	93
9.	Análisis estadísticos.....	94
RESULTADOS		95
CAPÍTULO 1: Producción heteróloga, caracterización y aplicaciones biotecnológicas de la endoxilanasas rXynSOS de <i>Talaromyces amestolkiae</i> y su variante glicosintasa rXynSOS ^{E236G}		97
Antecedentes		99
1.	Caracterización de la endoxilanasas rXynSOS.....	99
1.1.	Clonaje, producción y purificación	99
1.2.	Propiedades fisicoquímicas	101
1.3.	Especificidad de sustrato	103
1.4.	Parámetros cinéticos	104
1.5.	Producción de xilooligosacáridos por hidrólisis de xilano	105
1.6.	Capacidad de transglicosilación de rXynSOS	106
2.	Desarrollo y estudio de la glicosintasa rXynSOS ^{E236G}	107
2.1.	Conversión de rXynSOS en sus variantes glicosintasas.....	107
2.2.	Potencial de glicosilación de las variantes glicosintasas de rXynSOS	108
2.3.	Síntesis de xilooligosacáridos por oligomerización de xilobiosa	110
2.4.	Síntesis de glicósidos de compuestos fenólicos bioactivos	112
2.5.	Identificación de glicósidos.....	115
Anexo 1.....		117
CAPÍTULO 2: Síntesis y caracterización de un nuevo xilobiósido de resveratrol obtenido con la glicosintasa rXynSOS ^{E236G}		129
Antecedentes		131
1.	Glicosilación del resveratrol con la glicosintasa rXynSOS ^{E236G}	131
2.	Purificación y análisis por RMN de los glicósidos de resveratrol	133
3.	Optimización de la síntesis de 3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -xilobiósido de resveratrol.....	135
4.	Análisis de la capacidad antioxidante del 3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -xilobiósido de resveratrol	138
5.	Estudio de la solubilidad del 3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -xilobiósido de resveratrol	140
6.	Estudio <i>in vitro</i> de la desglicosilación del 3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -xilobiósido de resveratrol por la microbiota del colon humano	141

Anexo 2.....	143
CAPÍTULO 3: Transformación de <i>T. amestolkiae</i> e implementación de herramientas para su manipulación genética	149
Antecedentes	151
1. Desarrollo de cepas auxótrofas <i>pyr</i>	151
2. Transformación de <i>T. amestolkiae</i> con un plásmido integrativo por complementación de auxotrofia para pirimidinas	154
3. Uso de plásmidos de replicación autónoma en <i>T. amestolkiae</i> para la sobreexpresión de genes de interés	155
CAPÍTULO 4: Mejora de la producción de xilanasas en <i>Talaromyces amestolkiae</i> mediante ingeniería genética de su activador transcripcional XlnR.....	159
Antecedentes	161
1. Identificación del activador transcripcional XlnR en <i>T. amestolkiae</i>	161
2. Sobreexpresión de <i>xlnR</i> y sus variantes mutantes para aumentar la actividad xilanolítica	162
3. Desregulación parcial de la producción de xilanasas en el mutante Tam_XlnR ^{V785F} en presencia de glucosa	167
4. Producción de xilanasas en el mutante Tam_XlnR ^{V785F} a partir de residuos agroindustriales.....	169
5. Sacarificación de xilano utilizando los crudos enzimáticos del mutante Tam_XlnR ^{V785F}	171
Anexo 4.....	174
DISCUSIÓN.....	183
CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS	197
BIBLIOGRAFÍA.....	203
ACTIVIDADES FORMATIVAS DEL PROGRAMA DE DOCTORADO	231

LISTA DE ABREVIATURAS



LISTA DE ABREVIATURAS

Ácidos nucleicos y genes

Código	Significado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADNg	ADN genómico
AMA1	Secuencia de replicación autónoma de plásmidos de hongos
<i>ampR</i>	Gen de resistencia a ampicilina
<i>aox1</i>	Gen de la alcohol oxidasa 1 de <i>Pichia pastoris</i>
ARN	Ácido ribonucleico
CDS	Secuencia codificante
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
<i>his4</i>	Gen de la histidinol deshidrogenasa de <i>P. pastoris</i>
<i>kanR</i>	Gen de resistencia a kanamicina
<i>pyrF</i>	Gen que codifica para la orotato fosforribosil transferasa
<i>pyrG</i>	Gen que codifica para la orotidina-5'-monofosfato descarboxilasa
<i>PgpdA</i>	Promotor del gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de <i>Aspergillus nidulans</i>
<i>TtrpC</i>	Terminador del gen de la proteína multifuncional de biosíntesis de triptófano de <i>A. nidulans</i>

Aminoácidos

Código de 1 letra	Código de 3 letras	Significado
A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteína
D	Asp	Ácido aspártico/aspartato
E	Glu	Ácido glutámico/glutamato
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptófano
Y	Tyr	Tirosina

Bases nitrogenadas

Código	Significado
A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T (o U)	Timina (o uracilo)

Enzimas

Código	Significado
AA	Actividad auxiliar (familia CAZy)
ARA-1	Arabinofuranosidasa 1 de <i>Talaromyces amestolkiae</i>
ARA-2	Arabinofuranosidasa 2 de <i>T. amestolkiae</i>
GH	Glicosil hidrolasa/glicosidasa
β GL	β -glucosidasas
BGL-1	β -glucosidasa 1 de <i>T. amestolkiae</i>
BGL-2	β -glucosidasa 2 de <i>T. amestolkiae</i>
BGL-3	β -glucosidasa 3 de <i>T. amestolkiae</i>
BxTW1	β -xilosidasa de <i>T. amestolkiae</i>
CAZy	<i>Carbohydrate Active Enzyme database</i>
CBH	Celobiohidrolasas
CBM	Módulo de unión a carbohidratos
CE	Carbohidrato esterasas
EC	<i>Enzyme Commission number</i>
EG	Endoglucanasas
EG1	Endoglucanasa 1 de <i>T. amestolkiae</i>
EG2	Endoglucanasa 2 de <i>T. amestolkiae</i>
LPMO	Monooxigenasas degradadoras de polisacáridos
XynM	Endoxilanasas de <i>T. amestolkiae</i>
XynSOS	Endoxilanasas de <i>T. amestolkiae</i>

Equipos y técnicas experimentales

Código	Significado
1D- ¹ H NMR	<i>One-dimensional proton nuclear magnetic resonance</i>
2D ¹ H- ¹ H NMR	<i>Two-dimensional proton-proton nuclear magnetic resonance</i>
2D ¹ H- ¹³ C HMBC	<i>Two-dimensional proton carbon-13 Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
2D ¹ H- ¹³ C HSQC	<i>Two-dimensional proton carbon-13 Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
ESI	Ionización por <i>electrospray</i>
ESI-MS	Ionización por <i>electrospray</i> acoplada a espectrometría de masas
DAD	Detector de matriz de diodo
DIC	Contraste interdiferencial
DOSY	<i>Diffusion Ordered Spectroscopy</i>
FPLC	Cromatografía líquida rápida de proteínas
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia

MALDI-TOF	Desorción/ionización mediante láser asistida por matriz con un analizador de tiempo de vuelo
MS	Espectrometría de masas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pI	Punto isoeléctrico
RID	Detector de índice de refracción
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROESY	<i>Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy</i>
RSM	Metodología de superficie de respuesta
RT-PCR	PCR con transcripción reversa
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
TLC	Cromatografía en capa fina
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>

Medidas experimentales y unidades

Código	Significado
°C	Grados centígrados
aa	Aminoácidos
Å	Angstrom
A ₂₆₀	Absorbancia a 260 nm
A ₂₈₀	Absorbancia a 280 nm
A ₂₆₀ / A ₂₈₀	Ratio de pureza de ácidos nucleicos
A ₃₄₀	Absorbancia a 340 nm
A ₄₁₀	Absorbancia a 410 nm
A ₅₄₀	Absorbancia a 540 nm
cm	Centímetros
DO _{600 nm}	Densidad óptica a 600 nm
ε ₄₁₀	Coeficiente de extinción molar a 410 nm
ε ₃₄₀	Coeficiente de extinción molar a 340 nm
EC50	Concentración de un compuesto necesaria para lograr el 50% de su efecto máximo
g	Gramo
h	Horas
K	Kelvin
k _{cat}	Constante catalítica
k _{cat} / K _m	Eficiencia catalítica
kDa	kiloDalton
kb	Kilobase
K _m	Constante de Michaelis-Menten
L	Litro
min	Minutos
M	Molar (mol/L)
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
ms	Milisegundos
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros

nt	Nucleótidos
p/v	Relación peso-volumen
pb	Pares de bases
ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
Ta	Temperatura de anillamiento
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente al Trolox
U	Unidad de actividad enzimática
UV	Ultravioleta
UA	Unidades arbitrarias
v/v	Relación volumen-volumen
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrometros
µM	Micromolar
<i>V_{max}</i>	Velocidad máxima de la reacción
×g	Fuerza relativa a la gravedad (RCF)

Medios de cultivo, soluciones y tampones

Código	Significado
CSS	Medio de maíz macerado sólido (<i>Corn Steep Solid</i>)
LB	Medio Luria-Bertani
MCA	Medio completo de <i>Aspergillus</i>
PDA	Medio <i>Potato Dextrose Agar</i>
TAE	Tampón Tris-Acetato-EDTA
YEPS	Medio <i>Yeast Extract Peptone Sorbitol</i>
YNB-His	Medio <i>Yeast Nitrogen Base without Histidine</i>
YPD	Medio <i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>
WMM	<i>Watch Minimal Medium</i>

Otras moléculas biológicas y cepas de microorganismos

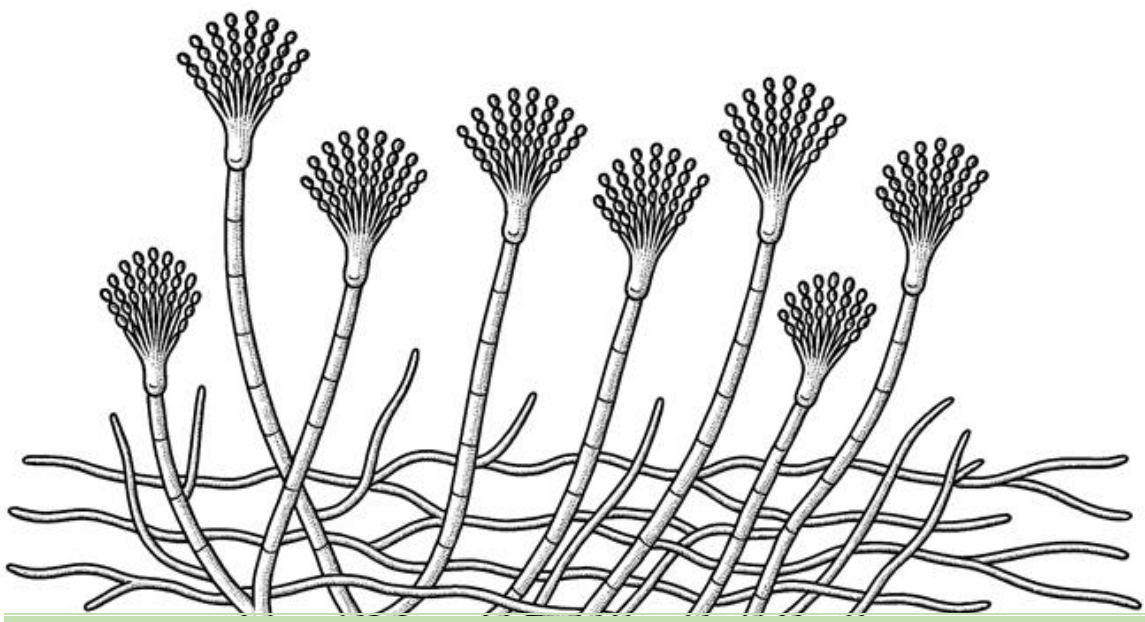
Código	Significado
ADNasa	Desoxirribonucleasa
ARNasa	Ribonucleasa
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BamHI	Enzima de restricción (5' G↓GATCC 3')
CreA	Factor de transcripción que reprime el sistema celulolítico y hemicelulolítico en hongos filamentosos
DpnI	Enzima de restricción (5' GA ^{m6} ↓TC 3', ADN metilado)
DH5α	Cepa de <i>Escherichia coli</i> DH5α
DsRed	Tipo de proteína roja fluorescente
EcoRI	Enzima de restricción (5' G↓AATTC 3')
GFP	Proteína verde fluorescente
GS115	Cepa de <i>P. pastoris</i> GS115
KpnI	Enzima de restricción (5' GGTAC↓C 3')
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido hidrogenada

NotI	Enzima de restricción (5' GC↓GGCCGC 3')
Tam	<i>Talaromyces amestolkiae</i>
WT	Silvestre (<i>wild-type</i>)
XlnR	Factor de transcripción que activa el sistema xilanolítico en hongos filamentosos

Productos químicos

Código	Significado
ABTS	Ácido 2,2'-acino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
Avicel	Celulosa microcristalina
AXOS	Arabinoxilano-oligosacáridos
BSA	Albúmina de suero bovino
CMC	Carboximetilcelulosa
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
DMF	Dimetilformamida
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGCG	Galato de epigallocatequina
FOS	Fructooligosacáridos
G ₂ F	Celobiosa-flúor
G ₄	Celotetraosa
GF	Glucosa-flúor
GOS	Galactooligosacáridos
PEG	Polietilenglicol
<i>p</i> NP	<i>p</i> -nitrofenol
<i>p</i> NPG	<i>p</i> -Nitrofenil-β-D-glucopiranosido
<i>p</i> NPG ₂	<i>p</i> -Nitrofenil-β-D-celobiósido
<i>p</i> NPX	<i>p</i> -Nitrofenil-β-D-xilopiranosido
<i>p</i> NPX ₂	<i>p</i> -Nitrofenil-β-D-xilobiósido
<i>p</i> NPX ₄	<i>p</i> -Nitrofenil-β-D-xilotetraósido
<i>p</i> NPX ₆	<i>p</i> -Nitrofenil-β-D-xilohexaósido
RES	Resveratrol
SDS	Dodecilsulfato sódico
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
UXOS	Xilooligosacáridos con ácido urónico
X	Xilosa
X ₂	Xilobiosa (dos xilasas unidas por enlace β-(1,4) O-glicosídico)
X ₂ F	Xilobiosa-flúor
X ₃	Xilotriosa
X ₄	Xilotetraosa
X ₅	Xilopentaosa
X ₆	Xilohexaosa
X ₇	Xiloheptaosa
X ₈	Xilooctaosa
X ₁₀	Xilodecaosa
XF	Xilosa-flúor
XOS	Xilooligosacáridos

RESUMEN/ SUMMARY



El xilano es el tipo de hemicelulosa más abundante en la naturaleza y uno de los componentes principales de la biomasa vegetal. Está formado por una cadena principal de D-xilopiranosas, unidas por enlace β -(1,4) O-glicosídico, y diferentes cadenas laterales que pueden contener α -L-arabinosa, ácido α -D-glucurónico, α -4-O-metil-D-glucurónico, ácido ferúlico o grupos acetilo. La hidrólisis del xilano ocurre mediante la acción sinérgica y coordinada de las xilanasas, enzimas pertenecientes a diferentes familias de glicosil hidrolasas (GHs) que actúan sobre enlaces glicosídicos entre dos carbohidratos o entre un carbohidrato y un aglicón. Dentro de las xilanasas, destacan las endoxilanasas, que hidrolizan los enlaces β -(1,4) del interior de la cadena principal del xilano, liberando xilooligosacáridos, y las β -xilosidasas, que completan el proceso de degradación hasta xilosa. Además de su capacidad hidrolítica, algunas GHs, son capaces de catalizar reacciones de transglicosilación, uniendo azúcares a distintas moléculas aceptoras. Los rendimientos de estas reacciones de síntesis son generalmente bajos, pero pueden incrementarse mediante el desarrollo de variantes glicosintasas y tioglicoligasas de estas enzimas.

El hongo ascomiceto *Talaromyces amestolkiae* secreta una amplia batería de GHs (incluidas xilanasas) que pueden aplicarse en distintos procesos biotecnológicos. Además, su genoma y secretoma revelan que existen muchas más enzimas de este tipo que aún están por estudiar. En este contexto, el objetivo general de esta Tesis Doctoral fue caracterizar y mejorar una nueva endoxilanasa, perteneciente a la familia GH10, así como aumentar la producción de xilanasas en este hongo mediante su manipulación genética.

En el Capítulo 1 se localizó el gen de la nueva endoxilanasa GH10 en el genoma del *T. amestolkiae* y se expresó en la levadura *Pichia pastoris*. La proteína recombinante (XynSOS) se purificó y caracterizó, determinándose que es una enzima monomérica altamente glicosilada con una masa molecular de ~53 kDa y estable en un amplio rango de pH (de 2,2 a 8). Los estudios cinéticos confirmaron su alta afinidad por xilano de haya y arabinoxilano de trigo. Esta capacidad se aprovechó para producir xilooligosacáridos de bajo grado de polimerización, considerados prebióticos emergentes. rXynSOS también fue capaz de catalizar reacciones de transglicosilación, aunque con bajas eficiencias. Por ello, se desarrolló una variante glicosintasa sustituyendo el residuo catalítico nucleófilo E236 por glicina (rXynSOS^{E236G}), que mostró una actividad de síntesis considerablemente superior a la de la enzima nativa, glicosilando un amplio abanico de compuestos fenólicos con propiedades bioactivas.

En el Capítulo 2 la glicosintasa rXynSOS^{E236G} se utilizó para glicosilar resveratrol, un polifenol con actividad antioxidante y numerosos beneficios para la salud, cuya aplicación está muy limitada por su baja solubilidad en agua y biodisponibilidad. La reacción de glicosilación dio lugar al 3-O- β -D-xilobiósido de resveratrol, como producto principal, y a otros glicósidos

minoritarios. Optimizando las condiciones de reacción se consiguió alcanzar una conversión del 35% para este nuevo xilobiósido, el cual experimentó una impresionante mejora en su solubilidad (~5.000 veces). Esto podría facilitar su administración en dosis más elevadas, aunque para ver su efecto sería necesario que se liberara el aglicón, un proceso que, en humanos, solo puede tener lugar en el colon, donde existen bacterias capaces de hidrolizar el enlace glicosídico entre la xilobiosa y el resveratrol. Un estudio preliminar, realizado con fermentaciones fecales, confirmó que la microbiota de colon es capaz de desglicosilar el 3-*O*- β -D-xilobiósido de resveratrol, lo que representa un primer paso para estudiar su posible acción terapéutica.

En el Capítulo 3 se logró, por primera vez, la modificación genética de *T. amestolkiae* mediante la transformación química de sus protoplastos y utilizando la complementación de auxotrofia para pirimidinas como marcador de selección. Para ello, fue necesario generar una cepa auxótrofa para pirimidinas mediante incubación en ácido 5-fluoroorótico (5-FOA), que induce mutaciones en los genes *pyrG* o *pyrF*, esenciales en la ruta de síntesis *de novo* de pirimidinas. La transformación del hongo permitió introducir con éxito un plásmido integrativo y otro de replicación autónoma, siendo este último empleado para obtener una cepa con fluorescencia roja y, en el siguiente capítulo, como herramienta para sobreexpresar casetes génicos.

El Capítulo 4 abordó la mejora de la producción de xilanasas en *T. amestolkiae* mediante su manipulación genética. La sobreexpresión del gen del regulador XlnR, principal activador transcripcional del sistema xilanolítico en hongos filamentosos, incrementó las actividades β -xilosidasa y endoxilanasas en 1,4 y 2,0 veces, respectivamente, en comparación con la cepa silvestre, en cultivos con xilano. Sin embargo, se consiguieron mejores resultados al introducir las sustituciones Ala788Val o Val785Phe en XlnR. En particular, el mutante Tam_XlnR^{V785F} alcanzó incrementos de 3,3 veces en la actividad β -xilosidasa y de 3,9 veces en la endoxilanasas. Además, esta cepa mejoró en gran medida la producción de estas enzimas utilizando residuos agroindustriales como el glicerol y el bagazo de cerveza. Tam_XlnR^{V785F} también mostró una desregulación parcial del sistema xilanolítico, ya que en presencia de glucosa (condiciones no inductoras), se obtuvieron niveles más elevados de actividad β -xilosidasa (16,9 veces) y endoxilanasas (31,9 veces), en comparación con la cepa silvestre, en la que apenas se detectaron estas actividades. Este aumento de actividad xilanolítica se atribuyó a una mayor producción de las enzimas correspondientes, lo que permitió obtener mejores rendimientos de sacarificación de xilano de haya con los crudos de Tam_XlnR^{V785F} que con los de la cepa silvestre.

En conclusión, los estudios llevados a cabo en esta Tesis Doctoral corroboran el interés de *T. amestolkiae* como productor de xilanasas con gran potencial biotecnológico. Además de caracterizar una nueva endoxilanasas de este hongo, perteneciente a la familia GH10 y capaz de

catalizar tanto reacciones de hidrólisis como de síntesis, se ha comprobado que el desarrollo de variantes glicosintasas a partir de ella permite glicosilar compuestos fenólicos bioactivos de manera más eficiente. En este sentido, cabe destacar que, por primera vez, se ha sintetizado enzimáticamente un xilobiósido de resveratrol, mucho más soluble que su aglicón y con posibles efectos beneficiosos para la salud. Por otra parte, se ha determinado que la manipulación genética y la modificación de factores de transcripción como XlnR, son herramientas muy prometedoras para incrementar la producción de xilanasas en *T. amestolkiae*, incluso en condiciones no inductoras. Todos estos resultados permitirán en un futuro aprovechar este hongo en diversas aplicaciones biotecnológicas para la valorización de residuos agroindustriales.

Xylan is the most abundant type of hemicellulose in nature and a major component of plant biomass. It consists of a backbone of D-xylopyranose units linked by β -(1,4) glycosidic bonds, substituted with various side chains including α -L-arabinose, α -D-glucuronic acid, α -4-O-methyl-D-glucuronic acid, ferulic acid and/or acetyl groups. Xylan hydrolysis is mediated by the synergistic and coordinated action of xylanases, enzymes belonging to different glycoside hydrolase (GH) families that cleave glycosidic bonds between two carbohydrates or between a carbohydrate and an aglycone. Among them, endoxylanases hydrolyze internal β -(1,4) linkages within the xylan backbone, releasing xylooligosaccharides, while β -xylosidases complete the degradation process to xylose. Beyond their hydrolytic activity, some GHs can catalyze transglycosylation reactions, transferring sugars to different acceptor molecules. Although the yield of such synthetic reactions is generally low, it can be increased by engineering glycosynthase and thioglycoligase variants.

The ascomycete fungus *Talaromyces amestolkiae* secretes a broad battery of GHs (including xylanases) with high potential for biotechnological applications. Moreover, genomic and secretomic analyses reveal the presence of many additional, yet uncharacterized, enzymes of this type. In this context, the overall aim of this PhD Thesis was to characterize and improve a novel GH10 endoxylanase, as well as to enhance xylanase production in this fungus through its genetic manipulation.

Chapter 1 describes the identification of the gene encoding the novel GH10 endoxylanase in *T. amestolkiae*'s genome and its heterologous production in the yeast *Pichia pastoris*. The recombinant protein (rXynSOS) was purified and characterized as a monomeric enzyme with a molecular mass of ~53 kDa, high glycosylation levels, and stability across a wide pH range (2.2–8). Kinetic analyses showed high affinity for beechwood xylan and wheat arabinoxylan, enabling the production of low-degree of polymerization xylooligosaccharides with emerging prebiotic potential. rXynSOS was also capable of catalyzing transglycosylation reactions, although with low efficiency. To address this, a glycosynthase variant was developed by substituting the nucleophilic catalytic residue E236 with glycine (rXynSOS^{E236G}). This novel glycosynthase exhibited markedly improved synthetic activity, glycosylating a wide range of bioactive phenolic compounds.

In Chapter 2, the rXynSOS^{E236G} glycosynthase was employed to glycosylate resveratrol, a polyphenol with antioxidant properties and numerous health benefits, but limited in application due to its low water solubility and bioavailability. The glycosylation reaction yielded 3-O- β -D-xylobiosyl resveratrol as the main product, along with minor glycosides. Optimization of reaction conditions resulted in a 35% conversion to this novel xylobioside, which showed a remarkable ~5,000-fold increase in solubility. This could enable higher dosage formulations; however,

release of the aglycone is required, a process that in humans occurs only in the colon, where bacteria can hydrolyze the glycosidic bond between xylobiose and resveratrol. A preliminary study using fecal fermentations confirmed that colon microbiota can deglycosylate 3-O- β -D-xylobiosyl resveratrol, which represents an initial step toward evaluating its potential therapeutic effects.

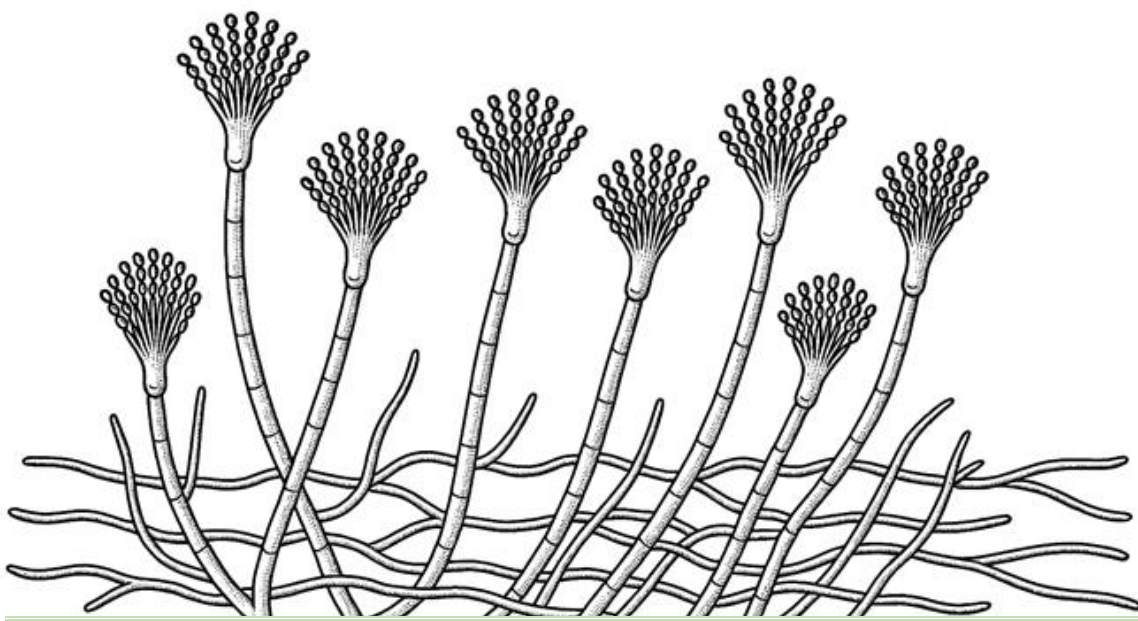
Chapter 3 reports the first successful genetic transformation of *T. amestolkiae* through protoplast-mediated chemical transformation, using uracil auxotrophy complementation as selection marker. In order to achieve this, an auxotrophic strain needed to be obtained by incubation with 5-fluoroorotic acid (5-FOA), which induces mutations in the *pyrG* or *pyrF* genes involved in the *de novo* pyrimidine biosynthesis pathway. Transformation of this fungus enabled the introduction of both integrative and autonomously replicating plasmids, the latter being used to generate a red fluorescent strain and, in the next chapter, as a tool to overexpress gene cassettes.

Chapter 4 focuses on improving xylanase production in *T. amestolkiae* through its genetic manipulation. The overexpression of the gene encoding the XlnR regulator, the major transcriptional activator of the xylanolytic system in filamentous fungi, enhanced β -xylosidase and endoxylanase activities by 1.4- and 2.0-fold, respectively, compared to the wild-type strain, in xylan-containing cultures. Better results were achieved with the introduction of Ala788Val or Val785Phe substitutions in XlnR. Specifically, the Tam_XlnR^{V785F} mutant reached 3.3-fold and 3.9-fold increases in β -xylosidase and endoxylanase activities, respectively. Additionally, this strain substantially improved the production of these enzymes using agro-industrial residues such as glycerol and beer bagasse. Tam_XlnR^{V785F} also exhibited partial desregulation of the xylanolytic system, as under non-inducing conditions (glucose), much higher β -xylosidase (16.9-fold) and endoxylanase (31.9-fold) activities were obtained compared to the wild-type, in which these activities were barely detectable. This enhancement in xylanolytic activity was attributed to an increased production of the corresponding enzymes, leading to better beechwood xylan saccharification yields with Tam_XlnR^{V785F} crudes than with those from the wild-type.

In conclusion, the research conducted in this PhD Thesis underscores the relevance of *T. amestolkiae* as a promising source of xylanases with high biotechnological potential. In addition to characterizing a new endoxylanase from this fungus, which belongs to the GH10 family and was capable of catalyzing both hydrolysis and synthesis reactions, we demonstrated that the development of glycosynthase variants from it allows for more efficient glycosylation of bioactive phenolic compounds. In this sense, a resveratrol xylobioside was enzymatically synthesized for the first time, exhibiting markedly improved solubility and potential health benefits. Furthermore, genetic manipulation and engineering of transcriptional regulators like XlnR

proved to be effective strategies for enhancing xylanase production in *T. amestolkiae*, even under non-inducing conditions. All these findings pave the way for future biotechnological applications of this fungus in the valorization of agro-industrial residues.

INTRODUCCIÓN



1. Biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica es el reservorio de carbono orgánico más abundante de la Tierra, con una producción anual estimada en 181,5 billones de toneladas (Dahmen *et al.*, 2019). Dado que se trata del componente principal de las paredes celulares de plantas, es considerado el recurso renovable más importante para la generación de energía y compuestos de base biológica. La lignocelulosa está constituida, fundamentalmente, por los polisacáridos celulosa y hemicelulosa, y el polímero aromático lignina. El porcentaje en el que se encuentran cada uno de ellos varía en función de la especie de planta e incluso del tejido dentro de ella y de su etapa de desarrollo (Taiz & Zeiger, 2002). Estos tres constituyentes se encuentran entrecruzados formando una estructura compleja y dinámica que confiere a la planta soporte estructural y resistencia a ataques bióticos y abióticos (Figura 1). En algunas plantas también está presente, en grandes cantidades, la pectina, que es un heteropolisacárido compuesto por una cadena de ácido galacturónico altamente sustituido con un amplio abanico de ramificaciones (Shrestha *et al.*, 2021). Entre los componentes minoritarios de la biomasa lignocelulósica destacan proteínas, lípidos, fenoles, polisacáridos de reserva como el almidón, y cenizas (Silva *et al.*, 2024).

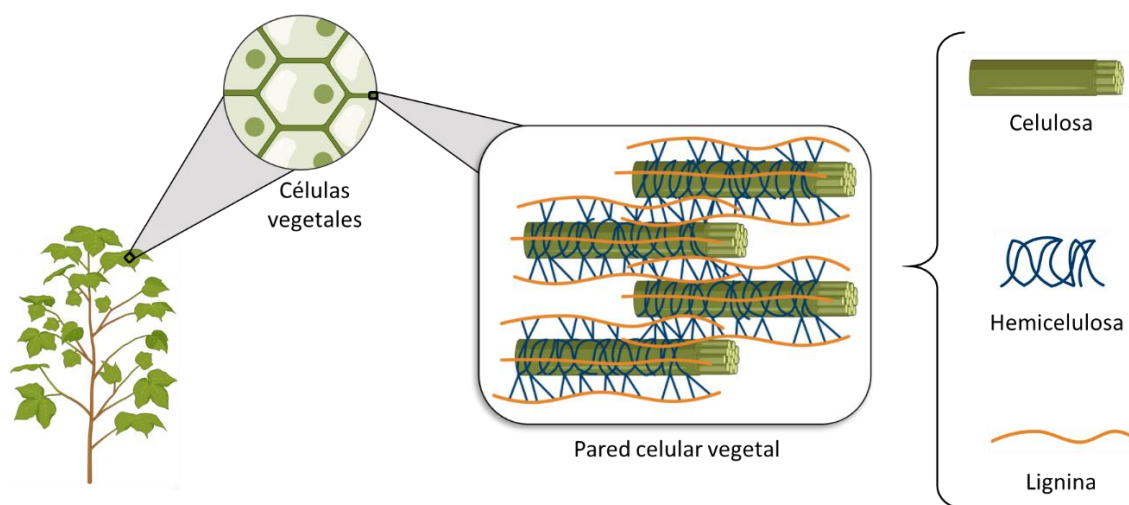


Figura 1. Esquema de la estructura de la biomasa lignocelulósica. Se muestran las microfibrillas de celulosa incrustadas en una matriz de hemicelulosa, fuertemente reforzada por la lignina.

Para comprender el potencial de la biomasa lignocelulósica en distintas aplicaciones biotecnológicas, es fundamental detallar las características de sus componentes principales.

1.1. Celulosa

La celulosa es el componente mayoritario de la biomasa lignocelulósica y el polisacárido más abundante de la bioesfera (Silva *et al.*, 2024). Se trata de un homopolisacárido de alta masa molecular compuesto por largas cadenas lineales de unidades de D-glucopiranosas, unidas entre sí mediante enlaces β -(1,4) O-glucosídicos. La síntesis de estas cadenas tiene lugar a través de

reacciones de condensación sucesivas que involucran al carbono anomérico C-1 de una glucosa y al grupo -OH del carbono C-4 de la siguiente glucosa. Cada cadena de β -(1,4)-D-glucopiranasas presenta dos extremos, uno denominado extremo no reductor, donde el carbono anomérico de la glucosa terminal está involucrado en el enlace glucosídico, y otro conocido como extremo reductor, en el que el carbono anomérico de la glucosa terminal contiene un grupo aldehído que permite la adición de nuevas unidades de glucosa o su oxidación en presencia de agentes específicos (Quiroz-Castañeda *et al.*, 2013).

Como muestra la Figura 2, múltiples cadenas de β -(1,4)-D-glucopiranasas se disponen en paralelo, dando lugar a microfibrillas de celulosa que presentan regiones cristalinas y amorfas. En las regiones cristalinas, las microfibrillas están altamente organizadas, ya que las cadenas de glucopiranosas interactúan entre sí mediante fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno inter- e intramoleculares. Esta cristalinidad confiere fuerza y rigidez a la celulosa, dificultando su degradación. Las regiones amorfas no son tan numerosas y muestran menor cristalinidad porque los enlaces entre las cadenas de glucopiranosas se han roto o su estructura ordenada se ha perdido (Quiroz-Castañeda *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2024).

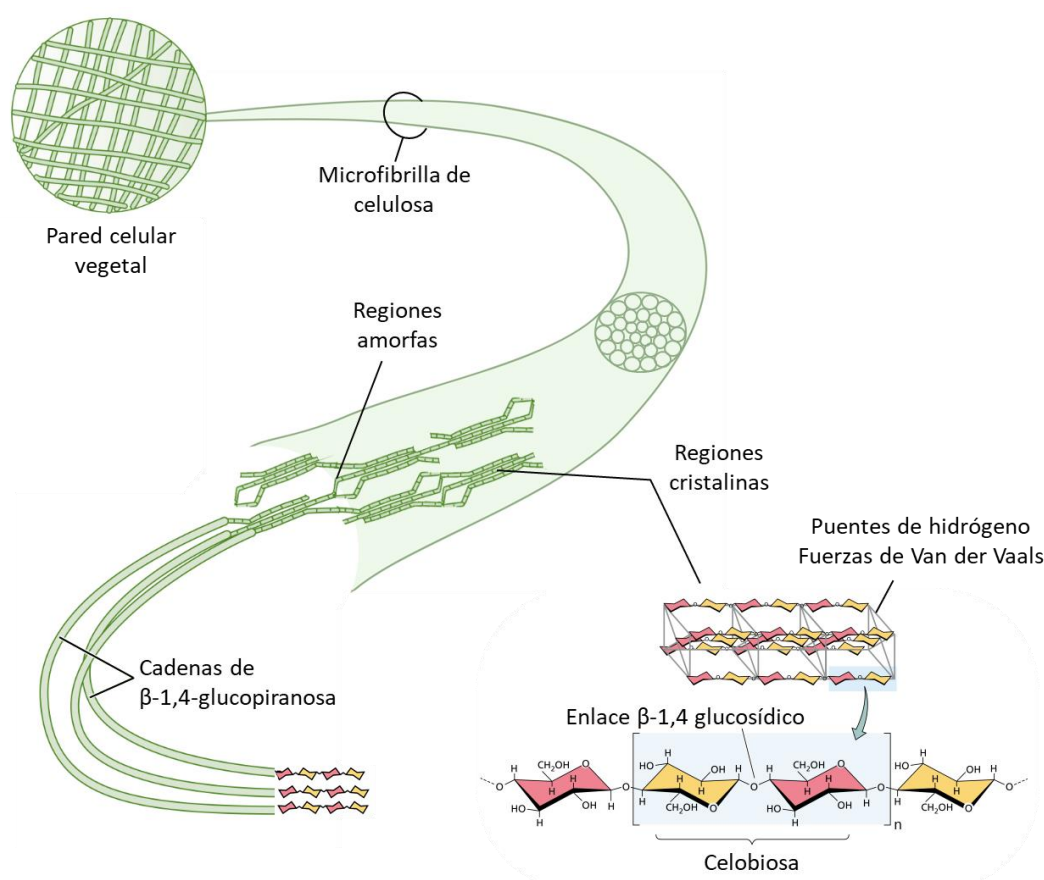


Figura 2. Esquema de la estructura de la celulosa, constituida por microfibrillas que pueden presentar regiones de alta cristalinidad intercaladas con zonas menos organizadas. Las microfibrillas están formadas por múltiples cadenas de β -(1,4)-D-glucopiranosas, dispuestas en paralelo. Figura adaptada de Taiz & Zeiger (2002).

La alta polimerización y cristalinidad de la celulosa, hasta 15.000 unidades de glucosa por cadena y hasta el 70% de su estructura, respectivamente, son las causantes de su insolubilidad en agua, aunque los valores de estos parámetros pueden diferir según el material vegetal del que procede (Acharya *et al.*, 2021; Djafari Petroudy, 2017). Lo mismo ocurre con el número de cadenas de β -(1,4)-D-glucopiranosas y de microfibrillas (Silva *et al.*, 2024). Todos estos factores influyen directamente en las propiedades físicas, químicas y mecánicas de la celulosa, por lo que han de tenerse en cuenta para su degradación o su uso en distintas aplicaciones industriales.

1.2. Hemicelulosa

La hemicelulosa, el segundo polisacárido más abundante de la biomasa lignocelulósica, es un heteropolisacárido amorfo, altamente ramificado, soluble en agua y con bajo grado de polimerización (menos de 200 unidades). Estas características hacen que presente una menor estabilidad térmica y química que la celulosa, lo que aumenta su susceptibilidad en procesos de hidrólisis (Silva *et al.*, 2024). La función biológica más importante de la hemicelulosa es fortalecer la pared celular vegetal mediante su interacción con la celulosa y, en la mayoría de los casos, con la lignina (Scheller & Ulvskov, 2010).

La hemicelulosa está compuesta por varios residuos de azúcar, incluyendo pentosas (xilosa y arabinosa), hexosas (glucosa, manosa y galactosa), desoxihexosas (fucosa) y ácidos urónicos (ácido glucurónico, ácido galacturónico y ácido 4-O-metilglucurónico). Además, es común que sus cadenas posean grupos acetilo y, en algunos casos, ácido ferúlico (Ebringerová *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2024).

El término hemicelulosa engloba una serie de polisacáridos de estructura muy heterogénea que difieren en su cadena principal, ramificaciones, y tipo y distribución de enlaces glicosídicos (Méndez-Líter *et al.*, 2021a). Por lo general, se clasifican en cuatro tipos: xilanos, mananos, xiloglucanos y glucanos de enlaces mixtos, variando mucho su proporción entre diferentes plantas y tejidos (Scheller & Ulvskov, 2010; Taiz & Zeiger, 2002). A continuación se muestran esquemas de estos polisacáridos (Figuras 3-6), elaborados utilizando la Nomenclatura de Símbolos del Sistema de Glicanos (Neelamegham *et al.*, 2019).

Los **xilanos** son el tipo mayoritario de hemicelulosa en la biomasa lignocelulósica y se definen como heteropolisacáridos ramificados compuestos por una cadena principal de D-xilopiranosas unidas por enlace β -(1,4) O-glicosídico y diferentes cadenas laterales que pueden contener α -L-arabinosa, ácido α -D-glucurónico, α -4-O-metil-D-glucurónico, ácido ferúlico y/o grupos acetilo. La abundancia de estos sustituyentes varía según el tipo de biomasa vegetal (Ebringerová *et al.*, 2005). Los xilanos se pueden clasificar en cinco subtipos dependiendo del tipo de ramificaciones que presenten (Figura 3). Cuando el xilano no tiene cadenas laterales se

conoce como homoxilano. En el caso de que contenga arabinosa o ácido glucurónico, se denomina arabinoxilano y glucuronoxilano, respectivamente. Finalmente, si el polisacárido presenta tanto arabinosa como ácido glucurónico, se llama (arabino)glucuronoxilano o (glucurono)arabinoxilano, dependiendo de la proporción de cada uno de ellos. Una particularidad de los residuos de arabinosa es que pueden tener ácido ferúlico unido a través de un enlace éster. Además, todos los subtipos de xilano están acetilados en mayor o menor medida (Ebringerová *et al.*, 2005; Scheller & Ulvskov, 2010). Los xilanos son muy abundantes en angiospermas monocotiledóneas (como cereales y hierbas) y en angiospermas dicotiledóneas (maderas duras) (Polizeli *et al.*, 2005).

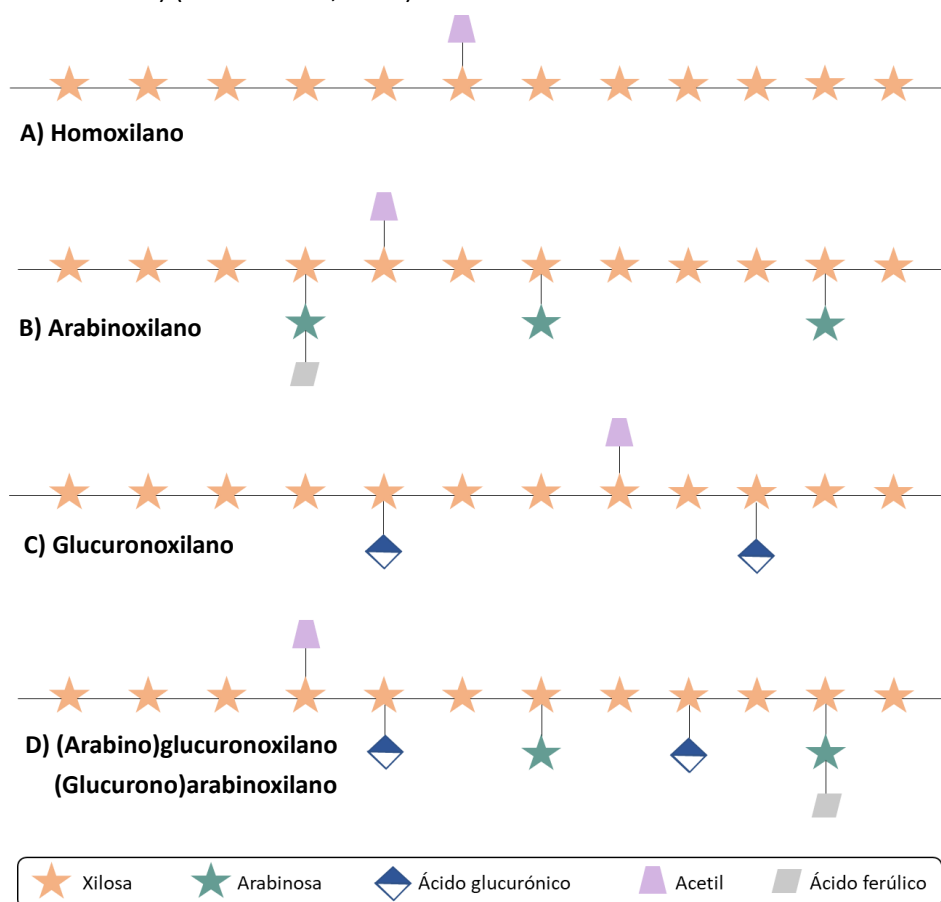


Figura 3. Esquema de la estructura de los cuatro tipos de xilano.

Los **mananos** son heteropolisacáridos ramificados en los que la cadena principal está constituida por D-manopiranosas unidas por enlace β -(1,4) O-glicosídico. En función de su estructura también se pueden clasificar en varios subgrupos (Figura 4). El manano sin cadenas laterales recibe el nombre de manano lineal, mientras que si tiene ramificaciones de α -D-galactosa, se conoce como galactomanano. Otras variedades de mananos denominadas glucomanano y galactoglucomanano incluyen residuos de β -(1,4)-D-glucopiranosas en la cadena principal. Las acetilaciones también están presentes en todos los subtipos de mananos (Ebringerová *et al.*, 2005; Scheller & Ulvskov, 2010). Los galactomananos y los

galactoglucomananos son muy numerosos en gimnospermas (maderas blandas), mientras que los glucomananos predominan en algunas maderas duras junto con los xilanos (Méndez-Líter *et al.*, 2021a).

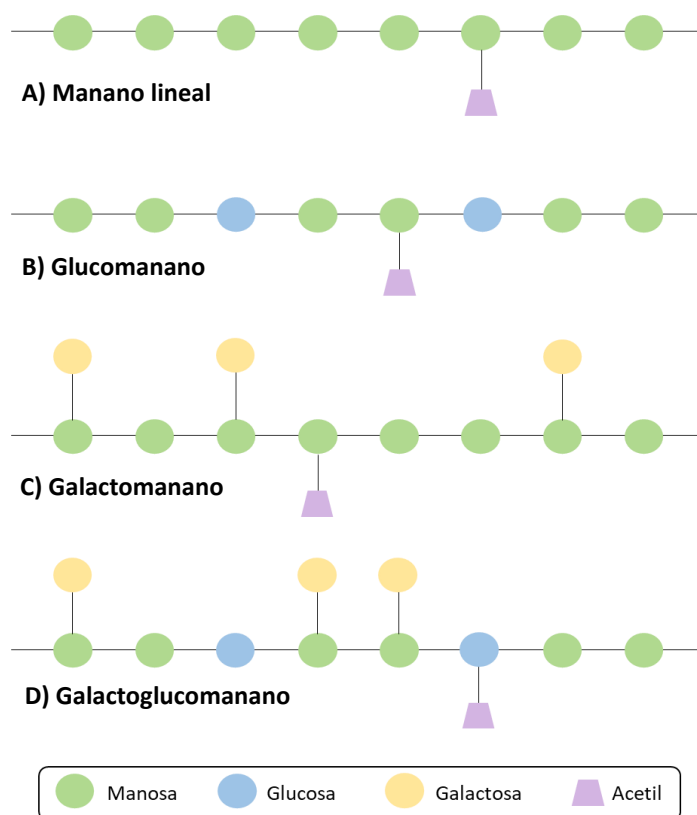


Figura 4. Esquema de la estructura de los cuatro tipos de manano.

Los **xiloglucanos** tienen una cadena principal compuesta por residuos de D-glucopiranosas unidos por enlace β -(1,4) O-glucosídico, a la que se añaden ramificaciones de α -D-xilosa (Figura 5). La distribución y la naturaleza de las cadenas laterales aportan una amplia diversidad estructural, ya que estas también pueden incluir α -L-arabinosa, β -D-galactosa y α -L-fucosa. Además, la cadena principal del xiloglucano puede presentar dos conformaciones principales, XXXG o XXGG, donde X representa una glucopiranosas ramificada con xilosa y G una glucopiranosas no sustituida (Ebringerová *et al.*, 2005; Scheller & Ulvskov, 2010). Los xiloglucanos están presentes en todas las plantas terrestres, pero su porcentaje y composición varían según la especie, teniendo mayor cantidad las angiospermas dicotiledóneas (Méndez-Líter *et al.*, 2021a).

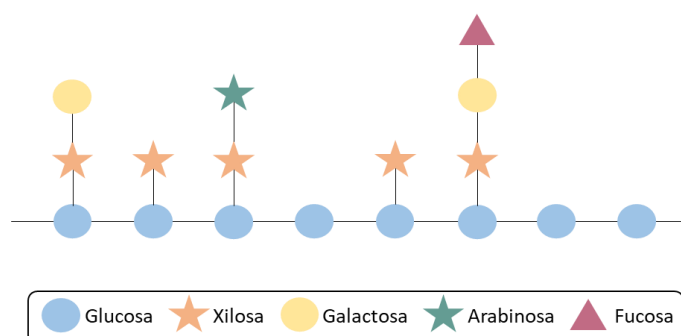


Figura 5. Esquema de la estructura de los xiloglucanos.

Los **glucanos de enlaces mixtos** tienen una cadena lineal sin ramificaciones compuesta por regiones cortas de β -(1,4)-D-glucopiranasas (normalmente de 3 o 4 unidades, aunque en algunos casos se pueden alcanzar hasta 14 unidades) interrumpidas por residuos de β -(1,3)-D-glucopiranosas (Figura 6). La proporción de enlaces β -(1,4) y β -(1,3) es diferente según el organismo de origen (Ebringerová *et al.*, 2005; Scheller & Ulvskov, 2010). Aunque estructuralmente son similares a la celulosa, los glucanos de enlaces mixtos son solubles, ya que los enlaces β -(1,3) alteran la orientación lineal de las fibrillas de glucosa (Méndez-Líter *et al.*, 2021a). Estos polisacáridos lineales se encuentran principalmente en angiospermas monocotiledóneas del orden *Poales*, al que pertenecen los cereales (Ebringerová *et al.*, 2005).

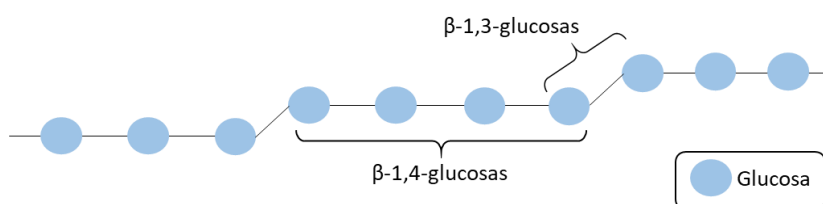


Figura 6. Esquema de la estructura de los glucanos de enlaces mixtos.

1.3. Lignina

La lignina es un polímero aromático, heterogéneo y muy complejo, que se sintetiza de forma natural mediante la polimerización oxidativa de tres tipos de alcoholes *p*-hidroxicinámicos: *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico, los cuales comparten la misma estructura química básica, pero difieren en el grado de sustituciones del anillo fenólico (Silva *et al.*, 2024). Estos monómeros, denominados monolignoles, dan lugar a distintas unidades cuando se incorporan a la macromolécula de la lignina: *p*-hidroxifenilo (H), guaiacilo (G) y siringilo (S) (Figura 7). La proporción de unidades H/G/S, varía mucho dependiendo de la planta y el tejido, determinando el porcentaje de entrecruzamiento, y por lo tanto la rigidez de su lignina (Taiz & Zeiger, 2002). La polimerización de monolignoles genera una gran variedad de enlaces carbono-carbono y éter, los cuales son muy difíciles de romper y contribuyen a que la lignina sea la estructura más recalcitrante de la lignocelulosa (del Río *et al.*, 2020). La lignina tiene como función principal dar rigidez e impermeabilidad a la pared celular vegetal y así proteger a la celulosa y hemicelulosa de la degradación, bien sea química o microbiana (Silva *et al.*, 2024).

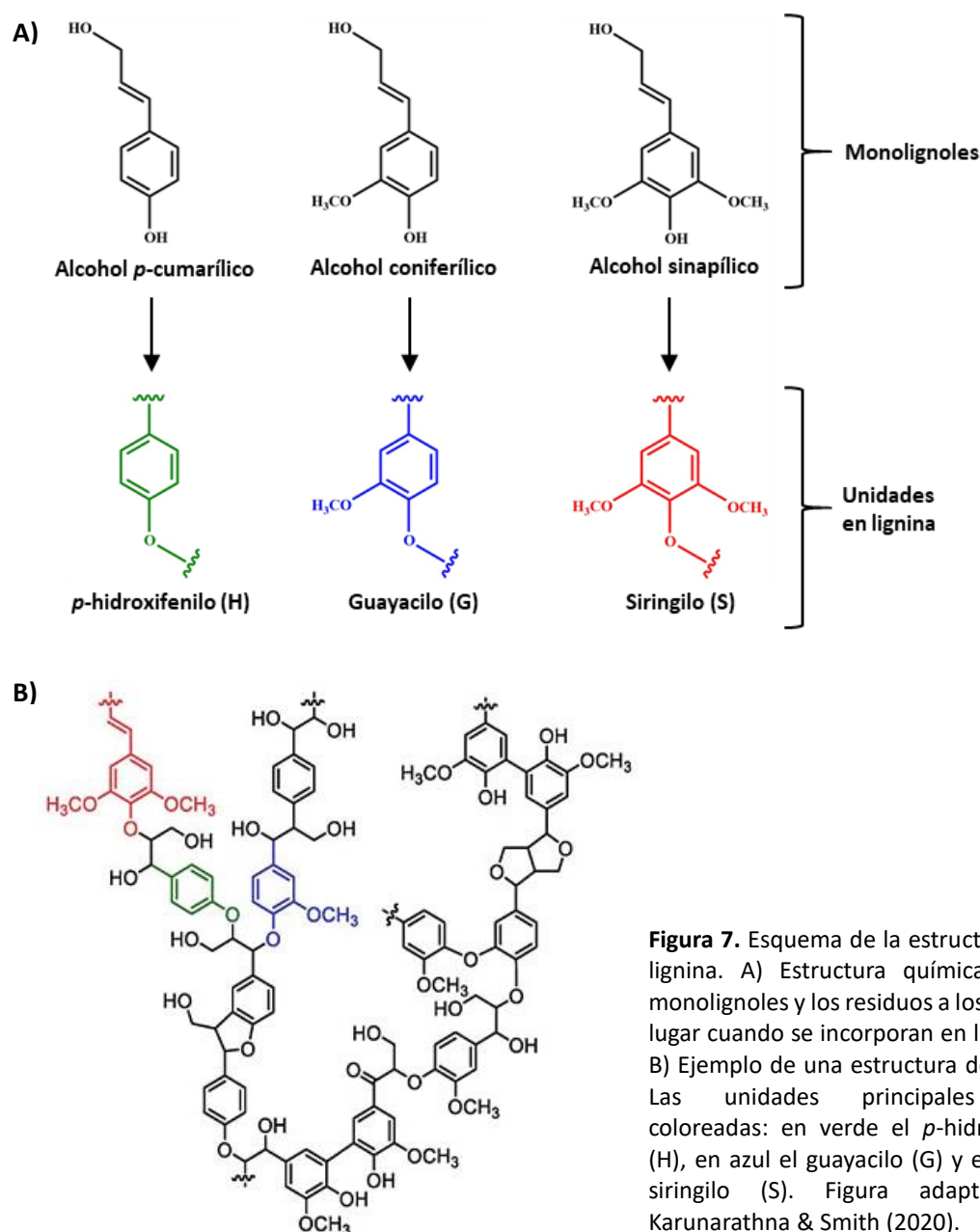


Figura 7. Esquema de la estructura de la lignina. A) Estructura química de los monolignoles y los residuos a los que dan lugar cuando se incorporan en la lignina. B) Ejemplo de una estructura de lignina. Las unidades principales están coloreadas: en verde el *p*-hidroxifenilo (H), en azul el guayacilo (G) y en rojo el siringilo (S). Figura adaptada de Karunarathna & Smith (2020).

1.4. Degradación de la celulosa y hemicelulosa en la naturaleza

En la naturaleza, la degradación de la lignocelulosa es el paso clave para el reciclado de la materia orgánica y en ella intervienen las enzimas de distintos microorganismos, como bacterias y hongos. Una vez la lignina ha sido alterada o completamente eliminada, la celulosa y hemicelulosa pueden ser hidrolizadas en un proceso altamente coordinado, que involucra la acción sinérgica de distintas celulasas, hemicelulasas y otras enzimas accesorias activas sobre carbohidratos (Figura 8).

En el caso de la celulosa, su degradación se lleva a cabo, fundamentalmente, por la acción de tres tipos de celulasas. Las β -(1,4)-endoglucanasas hidrolizan los enlaces β -(1,4) O-

glucosídicos dentro de las cadenas de celulosa, rompiéndolas de manera aleatoria y generando celooligosacáridos. Las β -(1,4)-exoglucanasas, también denominadas celobiohidrolasas, actúan en los extremos de las cadenas de celulosa y celooligosacáridos, tanto en el extremo reductor como en el no reductor, liberando moléculas de celobiosa de manera secuencial. Las β -(1,4)-glucosidasas completan el proceso al hidrolizar la celobiosa y celooligosacáridos de cadena corta, liberando glucosa como producto final (Payne *et al.*, 2015; van den Brink & de Vries, 2011). Las regiones cristalinas de la celulosa son más difíciles de degradar que las amorfas, por lo que se requiere la acción de enzimas auxiliares, como las monooxigenasas degradadoras de polisacáridos (LPMOs, por sus siglas en inglés). Estas enzimas oxidan el sustrato en posiciones específicas, lo que debilita la estructura cristalina de la celulosa, generando zonas más accesibles para el ataque de las celulasas (Ayuso-Fernández *et al.*, 2022).

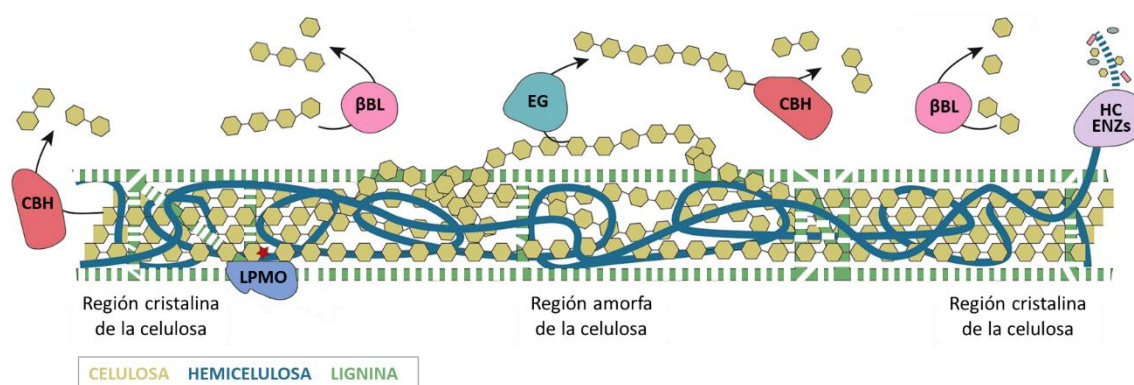


Figura 8. Esquema de la degradación enzimática de celulosa y hemicelulosa. La lignina (líneas discontinuas verdes oscuras) debe ser previamente despolimerizada para facilitar la hidrólisis de los polisacáridos. En la degradación de la hemicelulosa (línea azul) intervienen diferentes enzimas, dependiendo de su composición (HC ENZs). La celulosa (hexágonos amarillos) se hidroliza por la acción de celobiohidrolasas (CBH), endoglucanasas (EG) y β -glucosidasas (β GL). Las monooxigenasas degradadoras de polisacáridos (LPMO) actúan sobre la celulosa cristalina. Figura adaptada de Ayuso-Fernández *et al.* (2022).

Debido a la gran heterogeneidad estructural de la hemicelulosa, su degradación requiere una amplia variedad de hemicelulasas y enzimas accesorias. Estas enzimas incluyen aquellas que actúan directamente sobre la cadena principal de los polisacáridos, así como otras que descomponen las ramificaciones laterales y los grupos funcionales asociados. El proceso culmina en la liberación de una mezcla compleja de azúcares, como xilosa, arabinosa, manosa, galactosa y glucosa (Méndez-Líter *et al.*, 2021a).

En el caso del xilano, las β -(1,4)-endoxilanasas inician la hidrólisis de los enlaces β -(1,4) O-glicosídicos entre las unidades de D-xilopiranosas de la cadena principal, lo que reduce progresivamente su grado de polimerización (Figura 9). Esta acción da lugar a xilooligosacáridos de longitud intermedia, sobre los cuales las mismas enzimas continúan actuando hasta generar compuestos más pequeños, como xilotriosa y xilobiosa. Posteriormente, las β -(1,4)-xilosidasas actúan sobre los extremos no reductores de dichos compuestos, liberando unidades de xilosa.

Adicionalmente, para eliminar las ramificaciones laterales del xilano se necesitan enzimas específicas como α -L-arabinofuranosidasas, α -glucuronosidasas, acetilxilano esterases y feruloil esterases (Méndez-Líter *et al.*, 2021a).

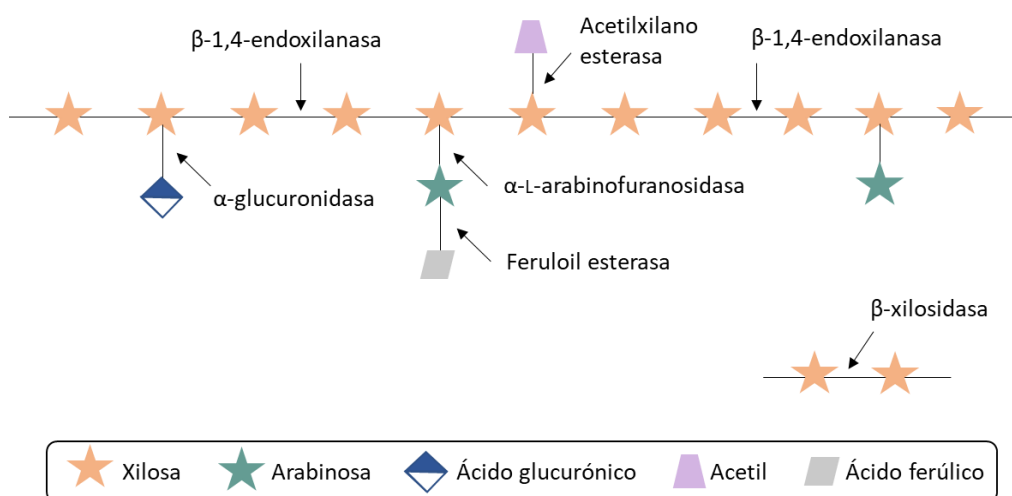


Figura 9. Esquema de la degradación enzimática del xilano por hongos.

La degradación del xiloglucano también requiere un gran número de enzimas debido a su estructura altamente ramificada. La cadena principal es hidrolizada por endoglucanasas, celobiohidrolasas y β -glucosidasas. Las ramificaciones, por su parte, son degradadas por α -D-xilosidasas, α -L-arabinofuranosidasas, β -D-galactosidasas y α -L-fucosidasas (van den Brink & de Vries, 2011). En el caso de los mananos lineales, las β -(1,4)-endomananasas actúan en el interior de la cadena dando lugar a mananoligosacáridos, mientras que las β -(1,4)-manosidasas actúan en los extremos, liberando manosa. Así mismo, para los glucomananos y galactoglucomananos, también se requiere la acción de β -glucosidasas. Las ramificaciones y las acetilaciones en los mananos son eliminadas por α -galactosidasas y acetimanano esterases, respectivamente (Capetti *et al.*, 2023). Por su parte, la despolimerización de los glucanos de enlaces mixtos requiere liquenasas que hidrolizan los enlaces β -(1,4) contiguos a residuos de β -(1,3)-glucosa, endoglucanasas que rompen los enlaces β -(1,4) a lo largo de la cadena, laminarinasas encargadas de hidrolizar los enlaces β -(1,3), y β -glucosidasas que completan el proceso liberando unidades monoméricas de glucosa (Méndez-Líter *et al.*, 2021a).

2. Glicosil hidrolasas

La hidrólisis enzimática de la celulosa y hemicelulosa en sus monómeros correspondientes es un paso determinante para la valorización de residuos vegetales. Las enzimas implicadas en la hidrólisis de estos polisacáridos, introducidas en el apartado anterior como celulasas y hemicelulasas, forman parte de las glicosil hidrolasas (GHs) y se conocen también como glicosidasas. Estas enzimas catalizan la hidrólisis del enlace glicosídico entre dos carbohidratos,

o un carbohidrato y un aglicón (parte no glucídica) (Kötzler *et al.*, 2014). El enlace glicosídico es una de las uniones químicas más estables que se conocen en la naturaleza, con una vida media de aproximadamente 5 millones de años. Las GHs son capaces de acelerar la hidrólisis de estos enlaces 10^{17} veces, por lo que se consideran uno de los biocatalizadores más eficientes de la naturaleza (Wolfenden & Snider, 2001).

Las GHs actúan principalmente sobre los enlaces *O*-glicosídicos de los carbohidratos y, en menor medida, sobre enlaces *S*-glicosídicos (Lombard *et al.*, 2014), y su especificidad de sustrato depende de la configuración anomérica, α o β , de dichos enlaces (Kötzler *et al.*, 2014). Según la región del sustrato que ataquen, estas enzimas pueden presentar actividad exo- cuando hidrolizan los enlaces desde los extremos de la cadena (generalmente desde el extremo no reductor, aunque también pueden hacerlo desde el extremo reductor), o actividad endo-, en el caso de que actúen sobre enlaces internos de la cadena (Davies & Henrissat, 1995).

Las GHs se encuentran clasificadas en la base de datos pública CAZy (*Carbohydrate Active Enzymes database*, <http://www.cazy.org/>), en la que se incluyen también otros biocatalizadores activos sobre carbohidratos como glicosil transferasas, polisacárido liasas, carbohidrato esterasas y otras enzimas con actividades auxiliares que facilitan la degradación de los polisacáridos (Lombard *et al.*, 2014). Todas estas enzimas se agrupan, según su similitud de secuencia, en distintas familias cuyas características se explican en la enciclopedia CAZypedia (<https://www.cazypedia.org>). Las glicosidasas son las enzimas que tienen más familias en CAZy, con un total de 189 familias GH registradas hasta la fecha, lo que muestra su gran diversidad. Dado que el mecanismo de reacción y la topología del sitio activo de las GHs están muy conservados, esta base de datos es muy útil para estudiar nuevas enzimas (Henrissat *et al.*, 1995). Otra forma de agrupar las GHs se basa en los números EC (*Enzyme Commission number*), que indican el tipo de reacción catalizada por las enzimas (Kötzler *et al.*, 2014). Según el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB), las GHs están incluidas en el grupo EC 3.2.1.-, comprendiendo desde el 3.2.1.1 hasta el 3.2.1.227.

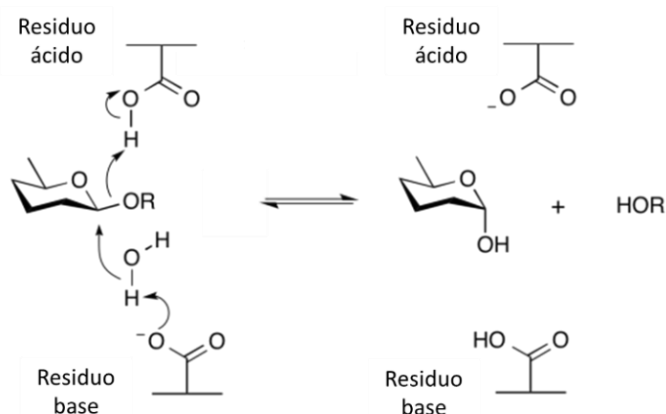
En cuanto a la estructura cristalográfica de su dominio catalítico, las GHs presentan una amplia diversidad de patrones de plegamiento, entre los que destacan el barril (β/α)₈ (también conocido como barril TIM), el rollo de gelatina β (*β -jelly roll*), el propulsor β (*β -propeller*), el barril (α/α)_n, la hélice β (*β -helix*) y el pliegue $\alpha+\beta$ (Kötzler *et al.*, 2014). Es importante aclarar que la especificidad del sustrato y el mecanismo de reacción de estas enzimas dependen más de pequeños detalles en las estructuras tridimensionales de su sitio activo, que de su plegamiento (Davies & Henrissat, 1995). Por otro lado, muchas GHs contienen módulos de unión a carbohidratos (CBMs, por sus siglas en inglés) que facilitan la interacción de la enzima con el sustrato. Sus principales funciones incluyen dirigir a las GHs hacia regiones específicas del

sustrato, incrementar la concentración de enzima en un punto y, en algunos casos, alterar la superficie de polisacáridos de alta cristalinidad (CAZypedia Consortium, 2018; Davies *et al.*, 1997). Los CBMs tienen una gran diversidad estructural y están clasificados en 106 familias, según la base de datos CAZy.

2.1. Reacciones de hidrólisis

La hidrólisis enzimática del enlace glicosídico, realizada por las GHs, ocurre a través de un proceso de catálisis ácida general e implica la participación de dos aminoácidos catalíticos que suelen ser ácidos aspárticos y/o glutámicos en casi todas las familias (Davies & Henrissat, 1995). El mecanismo de reacción por el que las GHs hidrolizan enlaces glicosídicos de manera estereoespecífica fue descrito en 1953 (Koshland Jr., 1953) y, desde entonces, ha sido extensamente estudiado. Dependiendo de la posición y orientación de los residuos catalíticos, la hidrólisis puede ocurrir por los mecanismos de retención o inversión de la configuración, generando productos con diferentes configuraciones en el carbono anomérico (Figura 10).

A) Inversión de la configuración



B) Retención de la configuración

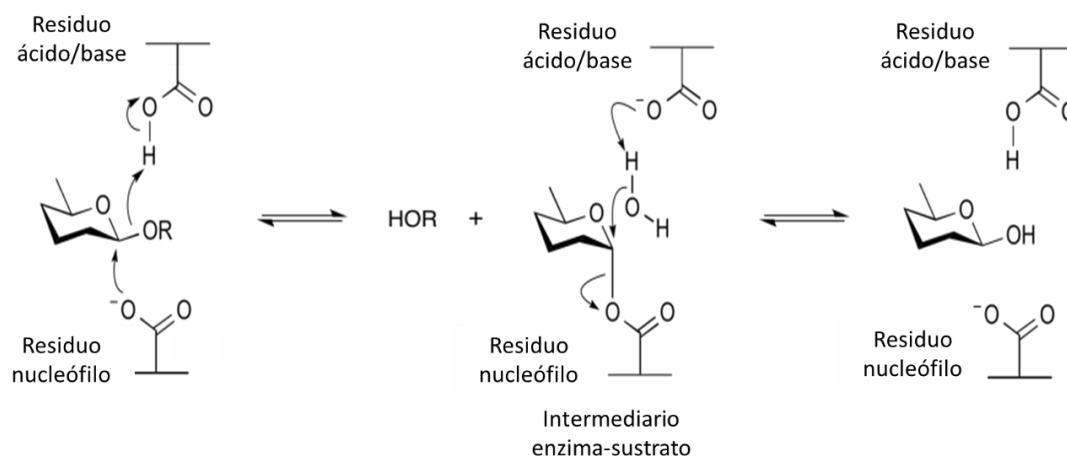


Figura 10. Mecanismos de hidrólisis en las GHs. Figura adaptada de la CAZypedia (<https://www.cazypedia.org>).

En las GHs de **inversión de la configuración**, la hidrólisis tiene lugar en un solo paso de desplazamiento nucleofílico simple. La reacción ocurre con la asistencia de un residuo ácido y un residuo base, que suelen estar separados por aproximadamente 6-12 Å (Kötzler *et al.*, 2014). Cuando una molécula de agua entra en el sitio activo de la enzima, el residuo base la desprotona, activándola, lo que le permite atacar al carbono anomérico del carbohidrato. Este ataque nucleofílico es asistido por el residuo ácido, que transfiere un protón al azúcar o aglicón liberado. Como resultado se obtiene un producto cuya configuración anomérica es opuesta a la del sustrato inicial (Davies & Henrissat, 1995).

Por el contrario, en las GHs de **retención de la configuración**, la hidrólisis se lleva a cabo mediante un mecanismo de doble desplazamiento que involucra un intermediario covalente enzima-sustrato. La reacción ocurre con la asistencia de un residuo ácido/base y un residuo nucleófilo, separados por 5,5 Å (Kötzler *et al.*, 2014). En el primer paso, el residuo nucleófilo ataca el carbono anomérico del carbohidrato, formándose el intermediario enzima-sustrato. Simultáneamente, el residuo ácido/base actúa como catalizador ácido, cediendo un protón para romper el enlace glicosídico, liberando el azúcar o aglicón. En el segundo paso, el intermediario glicosil-enzima es hidrolizado por una molécula de agua. En este caso, el residuo ácido/base funciona como catalizador básico, desprotonando la molécula de agua mientras esta ataca al centro anomérico del sustrato (Davies & Henrissat, 1995; Kötzler *et al.*, 2014). El valor de pKa del residuo ácido/base varía, cíclicamente, entre valores altos y bajos durante la catálisis, para optimizar su función en cada paso del proceso catalítico (McIntosh *et al.*, 1996). Tras esta reacción, el carbohidrato obtenido mantiene la configuración anomérica del sustrato inicial.

Aunque estos dos mecanismos de reacción son los utilizados por la mayoría de las GHs, se han identificado otros mecanismos alternativos en los últimos años. Es el caso de la participación en el ataque nucleofílico de grupos hidroxilo o acetamido presentes en los carbohidratos y de otros posibles residuos catalíticos distintos al ácido aspártico o glutámico. También se ha descrito un mecanismo basado en cofactores redox (CAZypedia Consortium, 2018).

2.2. Reacciones de transglicosilación y desarrollo de variantes glicosintasas y tioglicoligasas

Hasta el momento, se ha hecho referencia a la actividad principal de la mayoría de las GHs, que es la hidrólisis. Sin embargo, algunas de las enzimas de retención de la configuración, también pueden llevar a cabo reacciones de transglicosilación, las cuales son de gran importancia en procesos de síntesis. En estas reacciones tiene lugar la transferencia de residuos glicosilo a compuestos aceptores, formándose un enlace glicosídico (Danby & Withers, 2016; Xu *et al.*, 2015). Como puede observarse en la Figura 11, si la molécula nucleófila que ataca al

intermediario covalente enzima-sustrato es el agua, tiene lugar la reacción de hidrólisis, mientras que si es otro compuesto nucleófilo, ocurre la de transglucosilación (Bissaro *et al.*, 2015). En este proceso, la molécula que cede el residuo glucosilo (monosacáridos activados, oligosacáridos y derivados glicosídicos) se denomina donador, y el compuesto con grupo nucleófilo que lo recibe (normalmente carbohidratos, alcoholes y fenoles con grupos OH) se conoce como aceptor (Xu *et al.*, 2015). Las reacciones de transglucosilación tienen gran interés biotecnológico ya que con ellas se pueden obtener glicósidos de compuestos bioactivos o sintetizar oligosacáridos con distinto grado de polimerización (Danby & Withers, 2016).

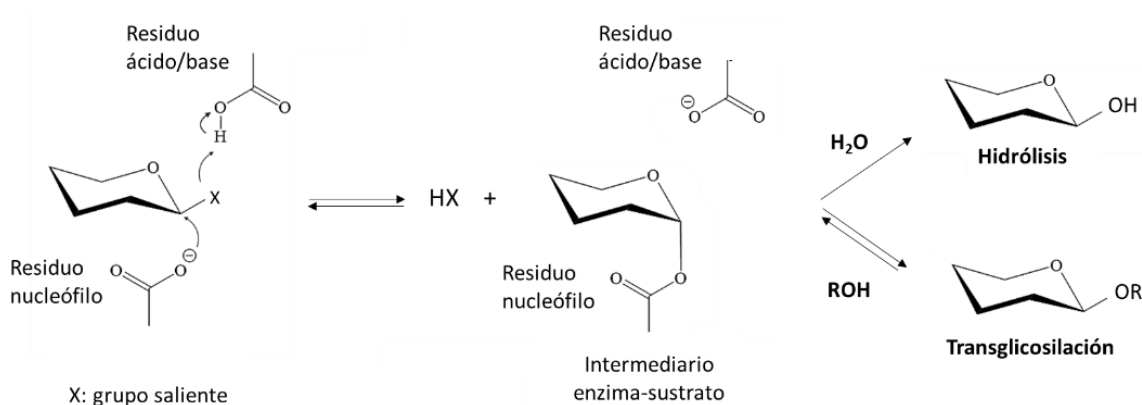


Figura 11. Reacciones de hidrólisis y transglucosilación catalizadas por GHs de retención de configuración.

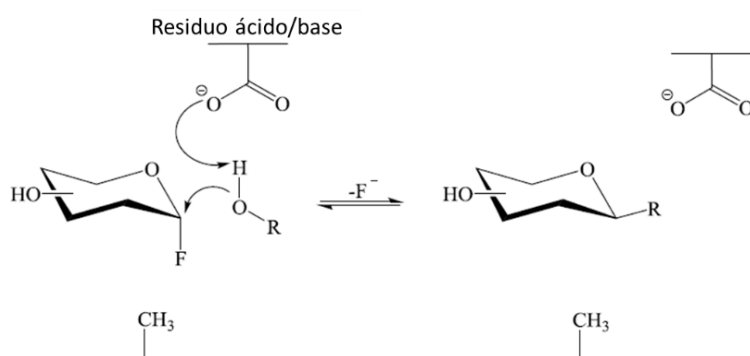
Algunas GHs, localizadas exclusivamente en plantas y cuya caracterización resulta compleja, presentan una preferencia natural por catalizar reacciones de transglucosilación en lugar de hidrólisis. Debido a esta particularidad, se las denomina transglucosilasas (Méndez-Líter *et al.*, 2021a). Sin embargo, los rendimientos de transglucosilación de la mayoría de las GHs son muy bajos, lo que hace difícil su utilización en aplicaciones industriales. Esto se debe, principalmente, a que las transglucosilaciones son reacciones reversibles, por lo que el producto glicosilado también puede actuar como sustrato de la enzima, a medida que aumenta su concentración, y ser hidrolizado (Jahn & Withers, 2003). Para superar estas limitaciones e incrementar los rendimientos de transglucosilación, se han desarrollado diversas estrategias.

La primera aproximación consiste en reducir el contenido de agua en el medio de reacción para desplazar el equilibrio hidrólisis-transglucosilación hacia la reacción de síntesis. Para ello, los ensayos se pueden realizar en solventes orgánicos, aunque en estas condiciones las GHs suelen ser menos estables (Abdul Manas *et al.*, 2018). Para evitar esto, se ha propuesto utilizar líquidos iónicos, que proporcionan un entorno polar en el que la enzima puede mantener su estabilidad, al tiempo que se minimiza la presencia de agua (Gorke *et al.*, 2010). No obstante, esta estrategia, aunque prometedora, sigue siendo poco viable debido al elevado coste de los líquidos iónicos. También se pueden ajustar otros parámetros de reacción para favorecer la transglucosilación,

como añadir el aceptor y el donador en exceso, trabajar a temperaturas más bajas o modificar el pH para buscar el óptimo en este tipo de catálisis (Abdul Manas *et al.*, 2018).

Sin embargo, la solución más exitosa para mejorar los rendimientos de transglicosilación de las GHs es el desarrollo, mediante ingeniería de proteínas, de variantes glicosintasas y tioglicoligasas. En ambas variantes se consigue eliminar o reducir drásticamente su actividad hidrolítica, mediante la sustitución de uno de sus residuos catalíticos por un aminoácido que no pueda participar en el mecanismo de hidrólisis, como la glicina, la serina, la alanina o la glutamina. Las nuevas glicosintasas y tioglicoligasas funcionan mediante los mecanismos de reacción que se muestran en la Figura 12, y necesitan donadores de azúcar activados (Jahn *et al.*, 2003; Perugino *et al.*, 2004).

A) Glicosintasas



B) Tioglicoligasas

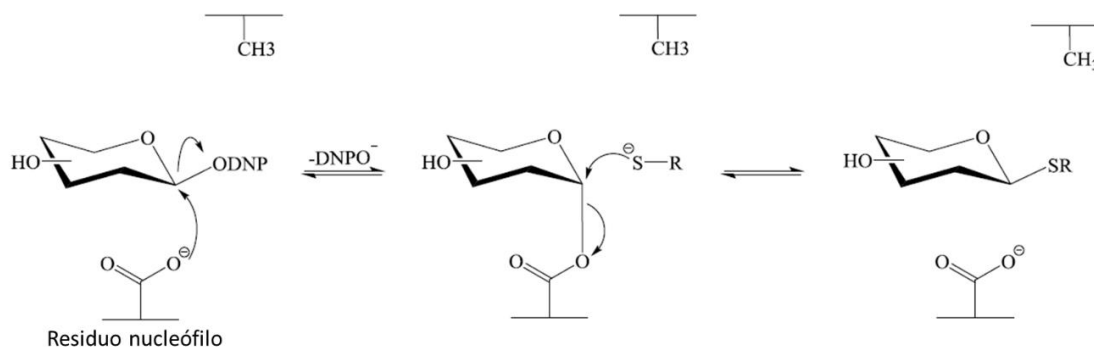


Figura 12. Mecanismos de transglicosilación de las variantes glicosintasas y tioglicoligasas de GHs de retención de la configuración, junto con sus donadores de azúcar activados. Figura adaptada de Nieto Domínguez (2017).

En el caso de las **glicosintasas**, el residuo reemplazado es el nucleófilo, por lo que la enzima ya no es capaz de catalizar, por sí misma, el primer paso del mecanismo de doble desplazamiento, que implica la formación del intermediario enzima-sustrato. Para que tenga lugar la reacción de transglicosilación, las glicosintasas requieren un donador glicosídico activado, generalmente con un grupo saliente como el flúor en posición anomérica. Este

compuesto simula el intermediario enzima-sustrato, facilitando el segundo paso del mecanismo en el que se produce un ataque nucleofílico convencional, por parte de una molécula aceptora, y la transferencia del residuo de azúcar. En estas variantes, la capacidad hidrolítica se elimina, lo que evita que las glicosintasas degraden los productos de reacción, pudiéndose así alcanzar rendimientos de conversión cercanos al 100% (Jahn & Withers, 2003; Perugino *et al.*, 2004).

Por su parte, las **tioglicoligasas** se obtienen sustituyendo el residuo ácido/base, lo que hace que necesiten un donador glicosídico activado con un buen grupo saliente, como un azúcar unido a una molécula de nitrofenol, para poder formar el intermedio enzima-sustrato. El posterior ataque nucleófilo debe ser llevado a cabo por un aceptor, mucho más nucleófilo que los que se utilizan en los procesos de hidrólisis o transglicosilación. Aunque en las tioglicoligasas puede persistir una actividad hidrolítica residual, se consideran herramientas prometedoras para la síntesis de enlaces S-glicosídicos, al transferir un carbohidrato a moléculas que contienen un grupo tiol (Jahn *et al.*, 2003; Jahn & Withers, 2003). Además, se ha observado que algunas tioglicoligasas, que podrían ser consideradas multiligasas, tienen la capacidad de utilizar un espectro más amplio de donadores, lo que les permite sintetizar enlaces O-, N-, S- y Se-glicosídicos (Nieto-Domínguez *et al.*, 2020).

3. Xilanasas: hemicelulasas activas sobre xilanos

La hemicelulosa ha ido ganando relevancia como una fracción de la biomasa lignocelulósica de gran interés para su valorización. Dentro de esta categoría, el xilano destaca como el principal tipo de hemicelulosa, siendo uno de los polisacáridos más abundantes en la biosfera, después de la celulosa. Su degradación requiere la acción sinérgica y coordinada de xilanasas y otras enzimas accesorias como las carbohidrato esterasas (familias CE en CAZy). Como se explicó anteriormente, la cadena principal del xilano, compuesta por D-xilopiranosas unidas por enlace β -(1,4) O-glicosídico, es degradada por endoxilanasas y β -xilosidasas. En el caso de presentar ramificaciones (ver composición en el apartado 1.2), también intervienen enzimas específicas, como arabinofuranosidasas, glucuronosidasas, acetilxilano esterasas y feruloil esterasas (Méndez-Líter *et al.*, 2021a). La Tabla 1 resume las características más importantes de las GHs y carbohidrato esterasas implicadas en la degradación del xilano.

Tabla 1. Características principales de las enzimas que actúan sobre xilano (GH: glicosil hidrolasa, CE: carbohidrato esterasa).

Enzima	Código EC	Familia	Mecanismo	Plegamiento	Sustrato
β-(1,4)-endoxilanasas	3.2.1.8	GH10	Retención	Barril (β/α) ₈	Regiones internas de la cadena principal de los xilanos
		GH11	Retención	Rollo de gelatina β (β -jelly roll)	
		GH30	Retención	Barril (β/α) ₈	
β-xilosidasas	3.2.1.37	GH3	Retención	Barril (β/α) ₈	Xilobiosa y otros xilooligosacáridos de cadena corta
		GH43	Inversión	Propulsor β (β -propeller)	
α-L-arabinofuranosidasas	3.2.1.55	GH43	Inversión	Propulsor β (β -propeller)	Residuos de arabinosa de arabinoxilanos
		GH51	Retención	Barril (β/α) ₈	
		GH54	Retención	Rollo de gelatina β (β -jelly roll)	
		GH62	Inversión	Propulsor β (β -propeller)	
α-glucuronidasas	3.2.1.131	GH67	Inversión	Barril (β/α) ₈	Residuos de ácido glucurónico de glucuronoxilanos
	3.2.1.139	GH115	Inversión	Barril (β/α) ₈	
Acetilxilano esterasas	3.1.1.72	CE1	-	Sándwich ($\alpha/\beta/\alpha$)	Acetilaciones de xilanos
		CE5	-	Sándwich ($\alpha/\beta/\alpha$)	
Feruloil esterasas	3.1.1.73	CE1	-	Sándwich ($\alpha/\beta/\alpha$)	Residuos de ácido ferúlico de arabinoxilanos

3.1. Endoxilanasas

Las β -(1,4)-endoxilanasas (EC 3.2.1.8) se consideran los biocatalizadores más importantes en la degradación del xilano, ya que inician su descomposición al hidrolizar sus enlaces internos. Son muy abundantes en la naturaleza y las producen bacterias y hongos, entre otros microorganismos (Bhardwaj *et al.*, 2019), detectándose, en algunos casos, diferentes isoenzimas en un mismo microorganismo, lo que indica una gran diversidad (Collins *et al.*, 2005; Polizeli *et al.*, 2005). Las endoxilanasas fúngicas se producen extracelularmente en presencia de residuos lignocelulósicos, aunque su máxima expresión, generalmente, se alcanza en cultivos con xilano como fuente de carbono o sustratos que contienen este polisacárido (Méndez-Líter *et al.*, 2021a; Polizeli *et al.*, 2005).

Las endoxilanasas se encuentran en diferentes familias de CAZy, como la GH 3, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 26, 30, 43, 44, 51, 62, 98, y 141, siendo las enzimas de las familias GH10 y GH11 las mejor caracterizadas. Estas endoxilanasas comparten el mecanismo de retención de la configuración, pero difieren en sus propiedades estructurales, fisicoquímicas y catalíticas (Méndez-Líter *et al.*, 2021a). Aun así, se puede generalizar que las endoxilanasas muestran su máxima actividad en un rango de temperatura de 40 a 80 °C y un pH de 4,0 a 6,5. Si bien se han identificado casos en los que estas enzimas son capaces de realizar reacciones de

transglucosilación, dicha actividad es menos frecuente que la detectada en las β -xilosidasas (Kadi & Crouzet, 2008; Polizeli *et al.*, 2005).

Las endoxilanasas de la **familia GH10** presentan un dominio catalítico con estructura de barril (α/β)₈, masas moleculares de más de 30 kDa y puntos isoeléctrico más bajos que las GH11 (Collins *et al.*, 2005). Además, exhiben una amplia especificidad de sustrato, lo que las hace más efectivas en la hidrólisis de xilanos sustituidos. Esta versatilidad se basa en su capacidad para hidrolizar los enlaces β -(1,4) entre residuos de D-xilopiranosas de la cadena principal, estén o no próximos a las ramificaciones del xilano y xilooligosacáridos. Además, se han encontrado especificidades propias de otras enzimas, puesto que algunas endoxilanasas GH10 pueden hidrolizar enlaces β -(1,3) y sustratos celulósicos de baja masa molecular (Biely *et al.*, 1997; Méndez-Líter *et al.*, 2021a).

Las endoxilanasas de la **familia GH11** se caracterizan por tener una estructura del dominio catalítico de tipo rollo de gelatina β (*β -jelly roll*), masas moleculares bajas (<30 kDa), puntos isoeléctricos básicos y una gran tolerancia a un amplio rango de pH (Paës *et al.*, 2012). Son más selectivas, ya que únicamente hidrolizan enlaces β -(1,4) en regiones con al menos tres residuos de D-xilopiranosas no sustituidos. A parte no actuar en la proximidad de ramificaciones, tampoco tienen actividad sobre enlaces glicosídicos β -(1,3), ni degradan sustratos celulósicos. No obstante, son más eficaces que las endoxilanasas GH10 hidrolizando sustratos insolubles y descomponen el xilano en oligosacáridos de mayor tamaño (Biely *et al.*, 1997; Collins *et al.*, 2005; Méndez-Líter *et al.*, 2021a).

3.2. β -xilosidasas

Las β -(1,4)-D-exoxilosidasas (EC 3.2.1.37), comúnmente conocidas como β -xilosidasas, actúan sobre los productos de degradación de las endoxilanasas, evitando su acumulación y la inhibición por producto de estas enzimas, y completando su degradación hasta xilosa (Polizeli *et al.*, 2005). Las β -xilosidasas son un grupo de enzimas estructuralmente diversas, que pueden actuar sobre distintos sustratos. Se encuentran en una amplia variedad de microorganismos, aunque en la mayoría de los procesos industriales en los que se utilizan suelen proceder de hongos y bacterias. A diferencia de las endoxilanasas, que son siempre secretadas al medio extracelular, la localización de las β -xilosidasas varía según el organismo y las condiciones de cultivo. En bacterias y levaduras, estas enzimas suelen ser intracelulares, localizándose en el citosol en forma soluble. Por el contrario, en hongos filamentosos las β -xilosidasas permanecen asociadas al micelio durante las etapas iniciales de crecimiento, y muchas de ellas son posteriormente liberadas al medio extracelular por secreción activa o debido a lisis celular (Knob *et al.*, 2010; Polizeli *et al.*, 2005; Rohman *et al.*, 2019). En cuanto a sus propiedades, estas

enzimas suelen tener masas moleculares altas (entre 60 y 360 kDa), temperaturas óptimas de entre 40 y 80°C (siendo 60°C lo más común) y aunque el rango de pH óptimo es bastante amplio, en la mayoría se encuentra entre 4 y 5 (Polizeli *et al.*, 2005).

La actividad β -xilosidasas en la base de datos CAZy está representada en las familias GH 1, 2, 3, 5, 10, 30, 39, 43, 51, 52, 54, 116 y 120. Sin embargo, la mayoría de β -xilosidasas se encuentran en las familias GH3 y GH43, siendo estas las más utilizadas y comercializadas hasta la fecha (Méndez-Líter *et al.*, 2021a).

Las β -xilosidasas de la **familia GH3** presentan un mecanismo de retención de la configuración y un dominio catalítico con estructura de barril (β/α)₈, seguido normalmente por un dominio sándwich (α/β) y un dominio de fibronectina del tipo III (Rohman *et al.*, 2019). A nivel catalítico, estas β -xilosidasas destacan por su alta afinidad por los sustratos, pudiendo tener también actividad secundaria arabinofuranosidasa. Además, son capaces de catalizar reacciones de transglicosilación, mostrando una gran versatilidad y utilizando una amplia variedad de aceptores (Dilokpimol *et al.*, 2011; Nieto-Domínguez *et al.*, 2015).

Las β -xilosidasas de la **familia GH43** son consideradas las más adecuadas para la sacarificación eficiente de materiales lignocelulósicos porque, al presentar un mecanismo de inversión de la configuración, no pueden catalizar reacciones de transglicosilación. Esto hace que mantengan su actividad hidrolítica incluso en presencia de altas concentraciones de sustrato. Las enzimas de esta familia adoptan una estructura de propulsor β (*β -propeller*) y algunas de ellas presentan dominios adicionales, como un dominio de unión a xilano denominado CBM6, típico en GHs que actúan sobre sustratos insolubles (Knob *et al.*, 2010; Rohman *et al.*, 2019). La gran diversidad de los miembros de la familia GH43 derivó en el establecimiento de 37 subfamilias. Diez de estas subfamilias contienen β -xilosidasas, a menudo junto con arabinofuranosidasas y, en muchos casos, se han identificado enzimas con ambas actividades (Mewis *et al.*, 2016).

3.3. Enzimas accesorias

La naturaleza heterogénea de los xilanos requiere la participación de xilanasas y carbohidrato esterasas para lograr su hidrólisis completa. Estas enzimas son las encargadas de eliminar las ramificaciones de los diferentes tipos de xilanos.

Las **α -L-arabinofuranosidasas** (EC 3.2.1.55) hidrolizan el enlace glicosídico entre un residuo de arabinosa y una unidad de xilosa de la cadena principal de arabinoxilanos y de arabinoxilano-oligosacáridos, liberando unidades de L-arabinofuranosa (Poria *et al.*, 2020). Las arabinofuranosidasas de hongos se ubican en su mayoría en las familias GH43, 51, 54 y 62.

Las **α -glucuronidasas** (EC 3.2.1.131 y EC 3.2.1.139) hidrolizan el enlace glicosídico entre el ácido glucurónico o el ácido 4-O-metilglucurónico y una unidad de xilosa de la cadena principal

de glucuronoxilanos. En hongos, estas enzimas se encuentran en las familias GH67 y GH115 (van den Brink & de Vries, 2011).

Las **acetilxilano esterasas** (EC 3.1.1.72) catalizan la hidrólisis de enlaces éster entre una xilosa y su sustituyente acetilo, y pertenecen a la superfamilia de las carbohidrato esterasas. Las acetilxilano esterasas de hongos están mayormente incluidas en las familias CE1 y CE5 (Méndez-Líter *et al.*, 2021a).

Las **feruloil esterasas** (EC 3.1.1.73) también están clasificadas como carbohidrato esterasas e hidrolizan residuos de ácido ferúlico esterificados a ciertas arabinosas en las cadenas laterales de xilano (Oliveira *et al.*, 2019). Están exclusivamente agrupadas en la familia CE1 junto con las acetilxilano esterasas (Oliveira *et al.*, 2019).

4. Aplicaciones biotecnológicas de las xilanasas y otras glicosil hidrolasas implicadas en la degradación de lignocelulosa

Las GHs no solo son fundamentales en numerosos procesos naturales relacionados con el metabolismo de carbohidratos en organismos vivos, sino que también se ha demostrado que son herramientas muy valiosas en aplicaciones biotecnológicas. Su especificidad para hidrolizar enlaces glicosídicos en una gran variedad de sustratos les permite poder ser utilizadas en distintos sectores industriales. Además, su alta eficiencia, su capacidad para trabajar bajo condiciones controladas, su facilidad para ser producidas a gran escala por microorganismos y el alto número de enzimas identificadas y caracterizadas hasta la fecha, hacen que las GHs se encuentren entre los catalizadores enzimáticos más utilizados a nivel industrial (Hancock *et al.*, 2006; Shrivastava, 2020).

Las GHs desempeñan un papel fundamental en la **industria energética y química**, ya que son esenciales para la obtención de biocombustibles y otros productos de base biológica, tanto de primera generación (a partir de azúcares presentes en granos de cereales, remolacha azucarera o caña de azúcar), como de segunda generación (procedentes de residuos lignocelulósicos que se valorizan en biorrefinerías). En ambos casos, las GHs catalizan la degradación de los polisacáridos en azúcares sencillos, que posteriormente pueden ser utilizados en reacciones químicas o, preferiblemente, como fuente de carbono en fermentaciones microbianas destinadas a la producción de, entre otros, bioetanol, biogas, biohidrógeno, bioplásticos, ácidos orgánicos, lípidos y proteínas (Chandel *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2024). Para lograr una sacarificación eficiente, es necesaria la acción combinada de diversos tipos de GHs, que varían según el material de partida. En procesos de primera generación, se emplean principalmente amilasas e invertasas, mientras que en los de segunda generación se requieren celulasas y xilanasas (Basera *et al.*, 2024; Mondal *et al.*, 2022; Shrivastava, 2020). En el caso de

los residuos lignocelulósicos, es importante destacar que la hemicelulosa está mucho menos aprovechada que celulosa debido a su composición heterogénea y su alta proporción en pentosas (xilosas y arabinosas), los cuales no son sustratos fácilmente fermentables para la mayoría de los microorganismos. Por esta razón se están destinando muchos esfuerzos a desarrollar cepas microbianas por ingeniería metabólica, capaces de transformar estos azúcares en productos de valor añadido (Chandel *et al.*, 2018; Dahmen *et al.*, 2019).

En este contexto, las biorrefinerías han sido definidas por la Agencia Internacional de la Energía como instalaciones que realizan el procesamiento sostenible de biomasa para transformarla en un espectro de productos comercializables y energía, utilizando una amplia variedad de tecnologías de conversión de manera integrada. Constituyen una alternativa prometedora a las refinerías de petróleo, al ofrecer soluciones más respetuosas con el medio ambiente y fomentar el desarrollo de economías circulares (Chandel *et al.*, 2018). En concreto, las biorrefinerías de biomasa lignocelulósica están cobrando un papel cada vez más importante dada la abundancia, bajo coste y diversidad estructural de esta materia prima. Además, su valorización no necesariamente compite con la cadena alimentaria, ni requiere utilizar terrenos que podrían ser destinados a la producción agrícola. Entre las principales fuentes de lignocelulosa destacan los residuos agrícolas, que alcanzan una producción global de 4,6 billones de toneladas al año, de las cuales solo se utiliza el 25% (Dahmen *et al.*, 2019). A partir de la biomasa lignocelulósica el Departamento de Energía de Estados Unidos (DOE) ha estimado que se pueden producir más de 200 productos con valor industrial, lo que resalta su gran versatilidad (Chandel *et al.*, 2018). Algunos ejemplos de estos productos se muestran en la Figura 13. Es importante destacar que, en la mayoría de los casos, es necesario someter los residuos a un pretratamiento previo para alterar la estructura de la lignocelulosa, eliminando o modificando la lignina, con el objetivo de facilitar la accesibilidad a la celulosa y hemicelulosa (Silva *et al.*, 2024). La lignina, por su naturaleza recalcitrante, se ha considerado tradicionalmente un subproducto de las biorrefinerías de lignocelulosa, utilizándose para generar energía a partir de su combustión o pirólisis (Liu *et al.*, 2022). Pese a ello, ha ido despertando cada vez más interés por ser una fuente valiosa de compuestos aromáticos, adhesivos, resinas, surfactantes, bioplásticos, etc., que pueden obtenerse desarrollando tecnologías químicas y enzimáticas que permitan su transformación (Cajanko *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2024).

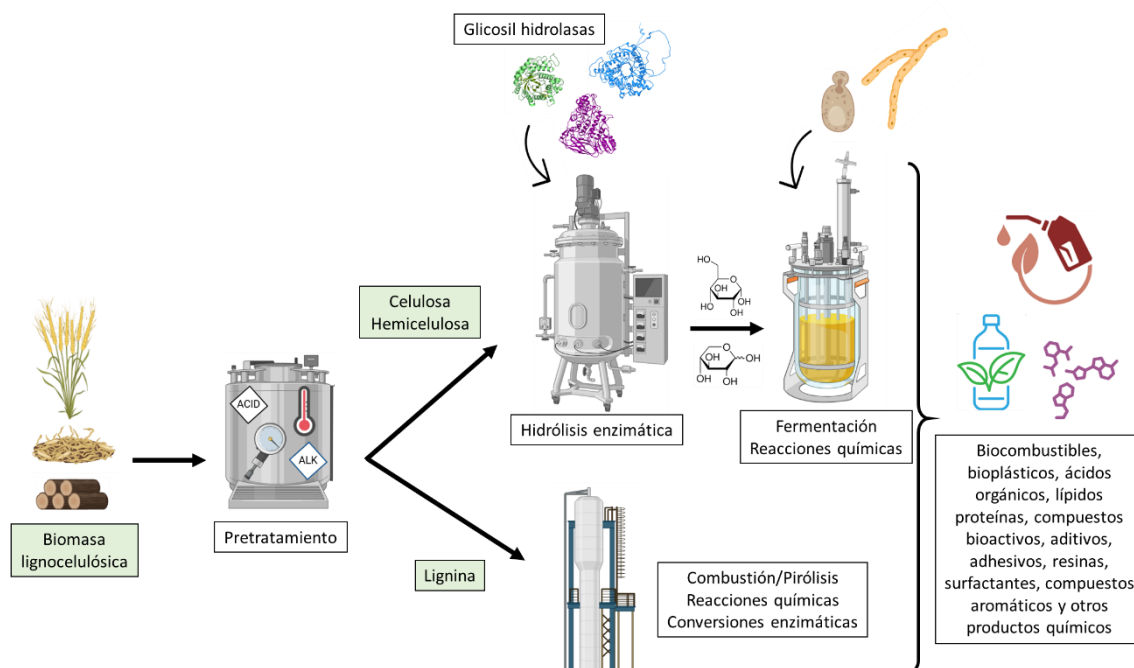


Figura 13. Aprovechamiento de biomasa lignocelulósica llevada a cabo en biorrefinerías. Tras el pretratamiento de la lignocelulosa, sus distintos componentes son convertidos en biocombustibles y productos de base biológica con valor industrial.

Las xilanasas y el resto de GHs también tienen aplicación en muchas otras industrias. Por ejemplo, en la **industria papelera** se pueden emplear endoxilanasas para facilitar el proceso de blanqueo, reduciendo la utilización de productos químicos y el impacto ambiental del proceso (Shrivastava, 2020). En la **industria textil**, las GHs se utilizan en el proceso de "lavado a la piedra" de las telas, en el que actúan sobre las fibras de celulosa, facilitando la eliminación selectiva del tinte para lograr una apariencia envejecida. (Shrivastava, 2020). Además, se incluyen en detergentes para mejorar la limpieza de las prendas, especialmente las de algodón (Kuhad *et al.*, 2011). En cuanto a la **industria agrícola**, contribuyen a mejorar la salud y fertilidad del suelo al acelerar la descomposición de restos vegetales, actuando como biofertilizantes (Dougherty *et al.*, 2012). En el caso de las xilanasas, se pueden usar en la **industria ganadera**, ya que al incorporarse en piensos aumentan la digestibilidad de los polisacáridos vegetales, incrementando la absorción de nutrientes en el ganado (Sureshkumar *et al.*, 2023).

Por otra parte, las GHs se utilizan para mejorar la calidad, accesibilidad y funcionalidad de muchos productos en la **industria alimentaria**. Por ejemplo, las xilanasas incrementan la estabilidad y el volumen de pan y bollos al eliminar el xilano presente en cereales, y las endoglucanasas se emplean en la fabricación de cerveza para reducir su viscosidad y facilitar su filtrado gracias a que hidrolizan los glucanos de la cebada (Shrivastava, 2020). En la **industria biomédica**, las GHs se utilizan para modificar el patrón de glicosilación de glicoproteínas terapéuticas como los anticuerpos, lo que mejora su estabilidad y eficacia y reduce su

inmunogenicidad (Zhang *et al.*, 2016). También son capaces de degradar los exopolisacáridos que constituyen la matriz de los *biofilms* patógenos, facilitando la acción de los antibióticos (Kaplan, 2010).

Una aplicación relacionada con las dos últimas industrias es la producción de **oligosacáridos**, los cuales se consideran prebióticos, es decir, ingredientes alimenticios no digeribles por los humanos que promueven beneficios para la salud. Diversos estudios han demostrado que los oligosacáridos estimulan selectivamente el crecimiento y/o la actividad de bacterias beneficiosas, como las bifidobacterias y los lactobacilos, lo que mejora el bienestar intestinal al tener efectos antiinflamatorios y antioxidantes, fortalece el sistema inmunológico y reduce el riesgo de enfermedades metabólicas y de cáncer (Macfarlane *et al.*, 2008; Pandey *et al.*, 2015). Entre estos compuestos destacan los fructooligosacáridos (FOS), que se producen a partir de la hidrólisis de inulina con endoinulinasas o por glicosilación usando sacarosa y fructofuranosidasas (Vera *et al.*, 2021), los galactooligosacáridos (GOS), que se generan por transglicosilación usando lactosa y galactosidasas (Vera *et al.*, 2021), y los xilooligosacáridos (XOS), que se obtienen por la hidrólisis del xilano usando endoxilanasas (Linares-Pastén *et al.*, 2018).

La capacidad de transglicosilación de las GHs (mejorada en las variantes glicosintasas y tioglicoligasas) se puede aprovechar para sintetizar **glicósidos de compuestos bioactivos**, lo que representa una aplicación muy interesante para las industrias alimentaria, biomédica y cosmética (Jahn *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2015). En este sentido, se ha reportado que la adición de una o dos unidades de carbohidratos a diversos antioxidantes fenólicos, como el alcohol vainillínico, floretina, hidroxitirosol y galato de epigallocatequina, puede mejorar su solubilidad, biodisponibilidad, estabilidad, bioseguridad e incluso sus beneficios terapéuticos, con respecto a sus aglicones (Gonzalez-Alfonso *et al.*, 2021; Méndez-Líter *et al.*, 2019, 2022; Nieto-Domínguez *et al.*, 2017a).

5. Hongos ascomicetos como fuente de xilanasas y otras glicosil hidrolasas degradadoras de biomasa lignocelulósica

En la naturaleza, diversos organismos poseen la capacidad de degradar el xilano, encontrándose xilanasas en bacterias, levaduras, hongos filamentosos, algas marinas, protozoos, moluscos, crustáceos, insectos, plantas, etc. Sin embargo, los hongos filamentosos destacan como la fuente más importante de estas enzimas, debido a su capacidad para producirlas y secretarlas en grandes cantidades (Polizeli *et al.*, 2005). Dentro de los hongos filamentosos, los ascomicetos son considerados los principales productores de xilanasas y otras GHs al ser capaces de crecer en sustratos (hemi)celulíticos. Las especies de los géneros *Trichoderma* y *Aspergillus*

han sido objeto de muchos estudios por su gran potencial biotecnológico, aunque en los últimos años algunas especies del género *Penicillium* han despertado gran interés como fuentes prometedoras de xilanasas (Ferreira *et al.*, 2016; Méndez-Líter *et al.*, 2021a). En la actualidad, la demanda global de xilanasas está aumentando, debido a su aplicación en distintos sectores, y empresas biotecnológicas, como Novozymes, AB Enzymes, DuPont, DSM y Genencor, ya comercializan cócteles enzimáticos que incluyen xilanasas. Entre estos se encuentran algunos producidos por los géneros *Trichoderma* y *Aspergillus*.

El género *Trichoderma*, y en particular la especie *Trichoderma reesei* (anteriormente conocida como *Hypocrea jecorina*), es uno de los más utilizados a nivel industrial. Este hongo saprófito se conoce, principalmente, por producir altos niveles de celulasas y dos endoxilanasas de la familia GH11. No obstante, presenta menor cantidad de otras xilanasas, lo que puede suponer un factor limitante en algunas aplicaciones (Bischof *et al.*, 2016). La capacidad de transglicosilación de este género solo se ha descrito en algunas β -xilosidasas y los ejemplos de esta actividad se restringen, mayoritariamente, a la síntesis de alquilxilósidos a partir de alcoholes (Drouet *et al.*, 1994).

El género *Aspergillus* destaca por sus altos niveles de endoxilanasas (tanto de la familia GH10 como de la GH11) y β -xilosidasas (generalmente de la familia GH3), así como isoformas termoestables de estas enzimas y otras xilanasas con actividades accesorias. Especies como *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae* también son utilizadas como hospedadores para la producción heteróloga de proteínas, gracias a su elevada capacidad de secreción y su aceptación en aplicaciones alimentarias (de Vries & Visser, 2001). Algunas β -xilosidasas de *Aspergillus* tienen una gran versatilidad catalítica y pueden llevar a cabo reacciones de transglicosilación empleando una amplia variedad de aceptores, entre los que se incluyen alcoholes, fenoles, alcoholes de azúcares, monosacáridos y disacáridos, y produciendo también XOS por oligomerización de xilosa (Kurakake *et al.*, 2005).

Por otro lado, aunque el género *Penicillium* es conocido fundamentalmente por su papel en la producción de antibióticos, está cobrando especial interés como fuente alternativa de xilanasas. Muchas de sus especies, sobre todo las que son saprófitos de suelo y patógenos de plantas, secretan altos niveles de endoxilanasas, β -xilosidasas y enzimas accesorias. Algunas de estas enzimas muestran termoestabilidad y/o tolerancia a pH más extremos (Cai *et al.*, 2011; Dutta *et al.*, 2007). La especie más representativa en lo que a xilanasas se refiere, es *Penicillium oxalicum*, dado que produce cócteles enzimáticos con un mejor balance de celulasas y hemicelulasas que *T. reesei* (Méndez-Líter *et al.*, 2021a). *Penicillium subrubescens* también muestra niveles de actividades (hemi)celulolíticas comparables a los de *A. niger* (Mäkelä *et al.*, 2016). Sin embargo, pese al alto número y potencial de las xilanasas de *Penicillium*, todavía hay

pocas bien caracterizadas y no se comercializan. También se ha reportado que las β -xilosidasas de *Penicillium*, mediante transglicosilaciones, pueden producir alquilxilósidos y XOS, aunque esta actividad está menos estudiada que en *Aspergillus* (Ito *et al.*, 2003; Win *et al.*, 1988).

Con estos argumentos, y a pesar de los avances logrados en los últimos años, todavía existe la necesidad de identificar hongos que produzcan xilanasas robustas, en mayores cantidades y con mayor eficacia catalítica (enzimas nativas o mejoradas mediante ingeniería de proteínas) (Ferreira *et al.*, 2016; Méndez-Líter *et al.*, 2021a).

5.1. *Talaromyces amestolkiae*

Talaromyces es un género holomórfico de ascomicetos (incluye reproducción sexual y asexual), estrechamente relacionado, desde un punto de vista taxonómico, con el género *Penicillium* (Prieto *et al.*, 2021). Inicialmente fue descrito como la forma sexual de ciertas especies de *Penicillium* (Benjamin, 1955). Más adelante, los estudios filogenéticos demostraron que *Talaromyces* y el subgénero *Biverticillium* de *Penicillium* conforman un clado monofilético, separado de otros subgéneros de *Penicillium*, lo que confirmó el estatus de *Talaromyces* como género independiente (Samson *et al.*, 2011).

El género *Talaromyces* incluye especies adaptadas a crecer en un amplio rango de sustratos, siendo el suelo el más común de ellos (Sun *et al.*, 2020). Este género destaca por su capacidad para secretar pigmentos solubles y enzimas, especialmente aquellas especies involucradas en la degradación de lignocelulosa, lo que indica su gran potencial biotecnológico (Sun *et al.*, 2020; Yilmaz *et al.*, 2014). Varias de sus especies, como *Talaromyces cellulolyticus* (Fujii *et al.*, 2015), *Talaromyces pinophilus* (C.-X. Li *et al.*, 2017), *Talaromyces funiculosus* (Maeda *et al.*, 2013) o *Talaromyces verruculosus* (Goyari *et al.*, 2015), han demostrado ser excelentes degradadores de biomasa vegetal. Pese a ello, y al igual que ocurre con *Penicillium*, este género sigue estando poco explotado, sobre todo en lo que respecta a la producción y caracterización de hemicelulasas (Méndez-Líter *et al.*, 2021a).

El hongo *Talaromyces amestolkiae*, aislado de residuos de cereales e incluido en la colección del Instituto Ferrán de Microbiología (IJFM) del Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (CIB-CSIC), con el número A795 (Gil Muñoz, 2015), ha sido objeto de estudio en esta Tesis Doctoral. Este hongo forma colonias blanquecinas, con conidios de color verde oscuro y secreta un pigmento rojizo que tiñe el micelio y difunde al medio de cultivo (Figura 14A). Este pigmento se ha identificado en otra cepa de *T. amestolkiae* como un policétido, del tipo azafilonas (de Oliveira *et al.*, 2022). Los conidióforos de *T. amestolkiae* son biverticilados, simétricos y producen conidios de aspecto rugoso (Figura 14B).

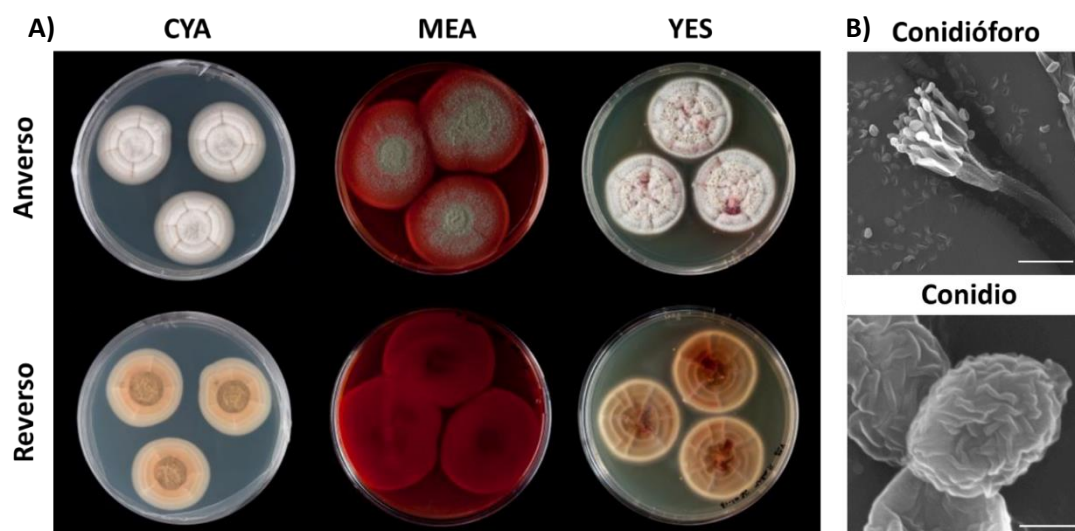


Figura 14. Morfología de *T. amestolkiae*. A) Imágenes del anverso y reverso de placas incubadas a 25 °C durante 7 días en los medios *Czapek Yeast Extract Agar* (CYA), *Malt Extract Agar* (MEA) y *Yeast Extract Sucrose Agar* (YES). B) Imágenes de microscopía electrónica de barrido de conidióforos y conidios. Las barras blancas representan escalas de 10 mm y 1 mm, respectivamente. Figuras adaptadas de Gil Muñoz (2015).

T. amestolkiae fue seleccionado, en un *screening* previo llevado a cabo con hongos de distintas colecciones y nuevos aislamientos, por producir altos niveles de actividad celulasa, similares a los detectados en cepas de *T. reesei* (Gil Muñoz, 2015). Con el fin de explorar en profundidad la batería enzimática de este ascomiceto, su genoma se secuenció, revelando un número muy elevado de genes que codifican para posibles GHs, siendo este incluso mayor que los encontrados en *T. reesei*, *A. niger* y *P. oxalicum* (de Eugenio *et al.*, 2017). Como la expresión de la mayoría de los genes involucrados en la degradación de biomasa lignocelulósica es inducible, se analizaron los secretomas del hongo en presencia de distintas fuentes de carbono (entre ellos celulosa y xilano), comprobando que las GHs eran las proteínas más abundantes en todos ellos (de Eugenio *et al.*, 2017). Estos datos confirmaron el gran potencial de *T. amestolkiae* para producir cócteles enzimáticos con todas las actividades requeridas para la sacarificación de biomasa vegetal.

Tras estos trabajos, varias celulasas y xilanasas de *T. amestolkiae*, así como una LPMO, fueron purificadas, caracterizadas y producidas heterológamente en la levadura *Pichia pastoris* (clasificada actualmente como *Komagataella phaffii*), con el fin de estudiar sus propiedades catalíticas e investigar su participación en diferentes aplicaciones biotecnológicas (Prieto *et al.*, 2021). Las principales características de estas enzimas se resumen en la Tabla 2.

Entre las celulasas, se caracterizaron tres β -glucosidasas y dos endo- β -(1,4)-glucanasas. BGL-1, una enzima minoritaria en los secretomas estudiados, pertenece a la familia GH1 y muestra una glucotolerancia excepcional (Méndez-Líter *et al.*, 2020). BGL-2 pertenece a la

familia GH3, está fuertemente inducida por la presencia de celulosa microcristalina (avicel) en los cultivos y contiene un dominio CBM1, rasgo poco frecuente en este tipo de enzimas (Méndez-Líter *et al.*, 2017). BGL-3, también de la familia GH3, se secreta tanto en presencia de avicel como de glucosa, aunque solo cuando se agotan estas fuentes de carbono (Méndez-Líter *et al.*, 2018). Esta enzima destaca por su alta eficiencia catalítica en la hidrólisis de celooligosacáridos pero, especialmente, porque también actúa sobre laminaribiosa, gentibiosa e incluso laminarina, lo que indica que es muy versátil y además de actuar sobre enlaces β -(1,4), puede hacerlo sobre enlaces β -(1,3). Todas estas GHs se han utilizado con éxito en la transglicosilación de compuestos fenólicos bioactivos (Méndez-Líter *et al.*, 2019, 2020). Para incrementar los rendimientos se diseñó, por mutagénesis dirigida, la variante glicosintasa BGL-1^{E521G}, la cual fue capaz de glicosilar eficientemente galato de epigallocatequina (EGCG), mejorando sus propiedades (Méndez-Líter *et al.*, 2020, 2022). En el caso de las endoglucanasas, la EG2 pertenece a la familia GH5 y es mucho más eficiente en la hidrólisis de celulosa que la EG1, de la familia GH12. Sin embargo, la EG1 destaca por ser más versátil, ya que además de actuar sobre celulosa, también es activa frente a liquenano y laminarina (de Eugenio *et al.*, 2018). Adicionalmente, en el genoma de este hongo se identificó una LPMO (TamAA9A), la cual se expresó eficientemente en *P. pastoris*, confirmando su actividad auxiliar en la hidrólisis de la celulosa (Méndez-Líter *et al.*, 2021b).

Respecto a las hemicelulasas caracterizadas en *T. amestolkiae*, la primera en identificarse fue la endoxilanasas XynM, de la familia GH11 y muy selectiva frente a xilano no ramificado. Esta enzima hidroliza eficientemente dicho sustrato, produciendo XOS con capacidad prebiótica (Nieto-Domínguez *et al.*, 2017b) y pudiendo ser aplicada en cascadas enzimáticas para la síntesis de glicósidos de compuestos con interés farmacológico (Nieto-Domínguez *et al.*, 2019). Por otro lado, la β -xilosidasa BxTW, de la familia GH3, destacó por ser estable en un rango muy amplio de pH, manteniendo más del 80% de su actividad entre pH 2,2 y 9. Su eficacia catalítica frente a xilooligosacáridos es remarcablemente alta y además puede realizar reacciones de transglicosilación (Nieto-Domínguez *et al.*, 2015, 2016, 2017, 2019). También se desarrolló la variante tioglicoligasa BxTW1^{E495A}, la cual consiguió glicosilar con mejores rendimientos un gran número de aceptores, que incluyen antioxidantes vegetales, ácidos grasos cortos, tioles, selenoles, triazoles y compuestos organofosforados (Nieto-Domínguez *et al.*, 2020). Por otro lado, recientemente se han caracterizado dos arabinofuranosidasas de la familia GH62, expresadas en *P. pastoris*, que permiten aumentar la producción de XOS y los rendimientos de sacarificación de arabinoxilano (Méndez-Líter *et al.*, 2023).

Tabla 2. Características principales de las enzimas de *T. amestolkiae* implicadas en la degradación de la celulosa y hemicelulosa: celulasas (β -glucosidasas y endoglucanasas), una monooxigenasa degradadora de polisacáridos (enzima auxiliar) y xilanasas (β -xilosidasas, endoxilanasas y arabinofuranosidasas). Estas enzimas fueron purificadas de los cultivos del hongo y/o producidas heterológicamente en *P. pastoris*

Nombre	Tipo	Familia	Microorganismo	Masa molecular	Estructura cuaternaria	pH óptimo	Temp. óptima	Referencia
rBGL-1	β -glucosidasa	GH1	<i>P. pastoris</i>	88,1 kDa	Monómero	4	60 °C	(Méndez-Líter et al., 2020)
BGL-2	β -glucosidasa	GH3	<i>T. amestolkiae</i>	97,2 kDa	Monómero	4	60 °C	(Méndez-Líter et al., 2017)
rBGL-2	β -glucosidasa	GH3	<i>P. pastoris</i>	102,1 kDa	Monómero	4	60 °C	(Méndez-Líter et al., 2017)
BGL-3	β -glucosidasa	GH3	<i>T. amestolkiae</i>	107,0 kDa	Dímero	4	70 °C	(Méndez-Líter et al., 2018)
rBGL-3	β -glucosidasa	GH3	<i>P. pastoris</i>	-	Dímero	4	70 °C	(Méndez-Líter et al., 2018)
EG1	Endoglucanasa	GH12	<i>T. amestolkiae</i>	25,6 kDa	-	3	40 °C	(de Eugenio et al., 2018)
EG2	Endoglucanasa	GH5	<i>T. amestolkiae</i>	51,8 kDa	-	3-4	40 °C	(de Eugenio et al., 2018)
TamAA9A	LPMO	AA9	<i>P. pastoris</i>	75-100	Monómero	-	-	(Méndez-Líter et al., 2021b)
BxTW1	β -xilosidasa	GH3	<i>T. amestolkiae</i>	102,3 kDa	Dímero	3	70 °C	(Nieto-Domínguez et al., 2015)
rBxTW1	β -xilosidasa	GH3	<i>P. pastoris</i>	~100 kDa	Dímero	3	60 °C	(Nieto-Domínguez et al., 2016)
XynM	Endoxilanasas	GH11	<i>T. amestolkiae</i>	19,8 kDa	Monómero	3	50 °C	(Nieto-Domínguez, de Eugenio, York-Durán, et al., 2017)
rXynM	Endoxilanasas	GH11	<i>P. pastoris</i>	20,0 kDa	Monómero	3-4	50 °C	(Nieto-Domínguez et al., 2019)
rARA-1	Arabinofuranosidasa	GH62	<i>P. pastoris</i>	~37,0 kDa	-	4	50 °C	(Méndez-Líter et al., 2023)
rARA-2	Arabinofuranosidasa	GH62	<i>P. pastoris</i>	50,0 kDa	-	4	60 °C	(Méndez-Líter et al., 2023)

*GH: familia glicosil hidrolasa, AA: familia actividad auxiliar, LPMO: monooxigenasa degradadora de polisacáridos

6. Manipulación genética de hongos filamentosos

La manipulación genética de hongos filamentosos es fundamental para facilitar su caracterización y mejorar su potencial biotecnológico. Por ejemplo, permite modificar genes específicos para estudiar su función, insertar promotores que optimicen la expresión de genes de interés o introducir genes exógenos que confieran nuevas funciones (D. Li *et al.*, 2017). En el caso de *T. amestolkiae*, su manipulación genética podría aplicarse para aumentar la producción de GHs y obtener cócteles enzimáticos más competitivos y “a la carta” para distintas aplicaciones. No obstante, para alcanzar este objetivo, es esencial disponer de un método de transformación eficiente, así como de herramientas de ingeniería genética, como marcadores de selección y plásmidos funcionales.

6.1. Marcadores de selección: desarrollo de cepas auxótrofas

Un requisito esencial para las transformaciones genéticas es contar con marcadores de selección que faciliten la identificación y aislamiento eficiente de las células transformadas. En hongos filamentosos, estos marcadores se dividen principalmente en dos categorías: genes de resistencia a antibióticos y marcadores nutricionales o de complementación de auxotrofías.

Los **genes de resistencia a antibióticos** permiten seleccionar transformantes en medios de cultivo que contienen dichos compuestos tóxicos. Entre los ejemplos más relevantes se encuentran los genes *hphR* (resistencia a higromicina) y *bleR* (resistencia a bleomicina) (Jiang *et al.*, 2013). Uno de los inconvenientes de estos marcadores es que suelen ser costosos y plantean preocupaciones sobre su seguridad, especialmente en las industrias alimentaria y farmacéutica, debido al riesgo potencial de diseminación de cepas resistentes a antibióticos (Mei *et al.*, 2019).

En el caso de los **marcadores nutricionales**, se utilizan genes que proporcionan a los transformantes la capacidad de metabolizar determinados nutrientes. Por ejemplo, el gen *amdS* codifica para una acetamidasa y el gen *niaD* para la nitrato reductasa, lo que permite el crecimiento en medios con acetamida y nitrato, respectivamente, como fuentes de nitrógeno (Mei *et al.*, 2019).

Por otro lado, las estrategias de **complementación de auxotrofías** se basan en mutantes metabólicos que requieren un compuesto específico para su crecimiento. Estos mutantes pueden ser transformados con genes funcionales que complementen el defecto metabólico. Un marcador de este tipo es el gen *argB* (codifica para la ornitina carbamoiltransferasa), cuyos mutantes deficientes solo crecen en medios suplementados con arginina (Jiang *et al.*, 2013). Si bien estos marcadores son más económicos, requieren que las cepas originales carezcan de los genes correspondientes, o que se desarrollen cepas auxótrofas (Mei *et al.*, 2019).

Los genes *pyrF* (Aleksenko *et al.*, 1999) y *pyrG* (Oakley *et al.*, 1987), que codifican para las enzimas orotato fosforribosil transferasa y orotidina-5'-monofosfato descarboxilasa, respectivamente, son marcadores de complementación de auxotrofia para pirimidinas, y los más empleados en hongos filamentosos. Esta auxotrofia ha sido adaptada con éxito en algunas especies de *Talaromyces* (Borneman *et al.*, 2001; Delmas *et al.*, 2014; Inoue *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2022) y será también la estrategia implementada en esta Tesis Doctoral. Para entender su funcionamiento es necesario explicar la ruta de síntesis *de novo* de pirimidinas, esquematizada en la Figura 15.

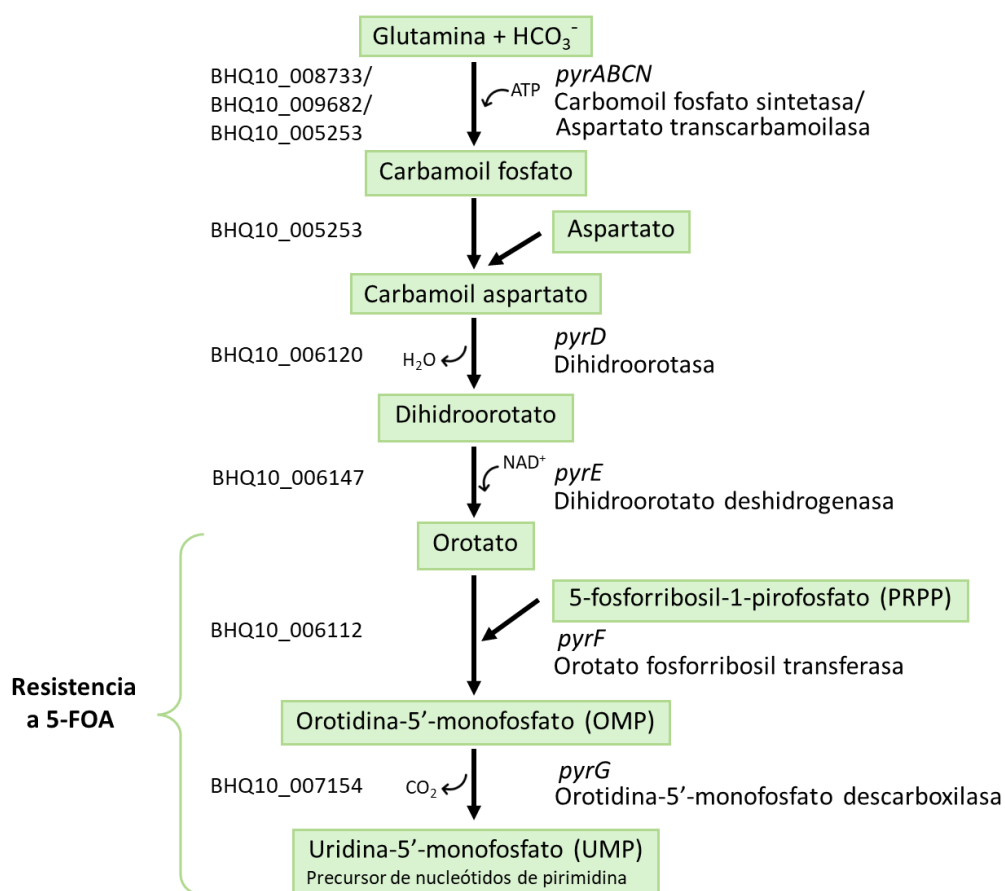


Figura 15. Ruta de síntesis *de novo* de pirimidinas en hongos. Esta ruta da lugar a la formación de uridina-5'-monofosfato (UMP), el precursor de todos los nucleótidos de pirimidina. El esquema muestra a la derecha las enzimas y genes en *A. nidulans* y a la izquierda los códigos de los genes homólogos en *T. amestolkiae* (código de acceso GenBank del genoma: ASM189636v1).

Esta ruta metabólica consta de seis reacciones bioquímicas, iniciándose con aspartato y carbamoil fosfato, el cual es sintetizado a partir de glutamina y bicarbonato. A lo largo del proceso, se generan los intermediarios carbamoil aspartato, dihidroorotato, ácido orótico y orotidina-5'-monofosfato (OMP), hasta culminar en la formación de uridina-5'-monofosfato (UMP), el precursor esencial de todos los nucleótidos de pirimidina. Los dos primeros pasos de esta ruta son realizados por una enzima multifuncional, codificada por el clúster de genes

pyrABCN, que combina las actividades carbamoil fosfato sintetasa y aspartato transcarbamoilasa. Las etapas finales de la ruta son catalizadas por las siguientes enzimas: dihidroorotasa, dihidroorotato deshidrogenasa, orotato fosfoirribosil transferasa y orotidina-5'-monofosfato descarboxilasa (Aleksenko *et al.*, 1999; Díez *et al.*, 1987).

La forma más sencilla de obtener auxótrofos para pirimidinas es mediante la generación de mutantes *pyrF*⁻ y *pyrG*⁻ seleccionándolos por resistencia al ácido 5-fluoroorótico (5-FOA), puesto que este antimetabolito es transformado en el compuesto tóxico 5-fluoro-UMP por la orotato fosfoirribosil transferasa y la orotidina-5'-monofosfato descarboxilasa. Aquellos mutantes que inactiven el gen *pyrG* o el *pyrF* a través de la adquisición de mutaciones, serán resistentes a 5-FOA y presentarán un fenotipo auxótrofo para pirimidinas, requiriendo la adición de uridina y/o uracilo como suplemento nutricional para su crecimiento (Díez *et al.*, 1987; Villarino *et al.*, 2016).

6.2. Métodos de transformación

Existen diferentes tipos de metodologías para la transformación eficiente de hongos filamentosos. La selección de la más apropiada dependerá de la especie y cepa fúngica, ya que debe considerarse la compleja estructura de su pared celular (D. Li *et al.*, 2017; Meyer, 2008).

La **transformación química de protoplastos** es uno de los métodos mejor establecidos, y el más utilizado en las pocas especies del género *Talaromyces* que han sido transformadas (Borneman *et al.*, 2001; Delmas *et al.*, 2014; Inoue *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2022). Este proceso se basa en la eliminación de la pared celular del hongo mediante digestión enzimática, lo que convierte a la célula en un protoplasto, el cual es más permeable al ADN exógeno. Los protoplastos purificados son transformados aplicando calcio, que abre canales en las membranas celulares, y polietilenglicol (PEG), que promueve la fusión de las membranas con el ADN exógeno y facilita su entrada. Finalmente, los protoplastos se regeneran, restaurando la pared celular y permitiendo que se forme una nueva colonia (Ruiz-Díez, 2002; Tilburn *et al.*, 1983). La principal limitación de este método es que no siempre es posible generar protoplastos. Este proceso puede verse afectado por la variabilidad entre los lotes de enzimas encargadas de eliminar la pared celular, así como por la susceptibilidad de los polisacáridos de la pared celular a la digestión. Además, una vez transformados, no todos los protoplastos logran regenerarse con éxito (D. Li *et al.*, 2017).

La **transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*** emplea esta bacteria para transferir ADN exógeno a una amplia gama de hongos. En el caso del género *Talaromyces*, solo *Talaromyces marneffe* ha sido transformado siguiendo este método (Hooykaas *et al.*, 2018). Este método ha ganado popularidad debido a su alta frecuencia de transformación, a la capacidad

para integrar ADN en sitios específicos del genoma y a la generación de transformantes estables. Además, puede utilizarse para transformar tanto protoplastos como hifas y esporas. Sin embargo, su protocolo es difícil de optimizar y requiere el plásmido Ti de *A. tumefaciens*, el cual es tedioso de manipular (Weld *et al.*, 2006).

La **electroporación** es un método rápido, eficiente y reproducible que se ha aplicado exitosamente en múltiples hongos filamentosos. Consiste en aplicar pulsos eléctricos cortos, de alto voltaje, para crear microporos en la membrana celular, permitiendo así la entrada del material genético. Se suele aplicar a protoplastos y algunas veces a esporas en germinación. Este método puede causar cierto daño celular, por lo que es crucial optimizar las condiciones de electroporación (D. Li *et al.*, 2017).

En el **bombardeo de partículas (biobalística)**, se recubren partículas de oro o tungsteno con el material genético y se utilizan para bombardear el tejido fúngico con el objetivo de que alcancen el interior de las células. Se trata de un método fácil de realizar y útil para cepas difíciles de cultivar o de las cuales es complicado generar protoplastos. Sin embargo, es muy costoso, por lo que solo se suele emplear en los casos en que otros métodos de transformación no funcionen (Weld *et al.*, 2006).

6.3. Plásmidos de replicación autónoma

El desarrollo de herramientas de ingeniería genética para la expresión de una o más copias de casetes de expresión es esencial para la manipulación genética de hongos filamentosos. Los casetes de expresión son fragmentos de ADN cuyos componentes básicos son un promotor, la secuencia codificante del gen de interés y un terminador (Mei *et al.*, 2019). Estos casetes de expresión, junto con el marcador de selección, pueden ser expresados en la célula de forma autónoma (plásmidos de replicación autónoma o autorreplicativos), o pueden ser introducidos en el genoma del hongo utilizando diversas estrategias, como la integración aleatoria, la inserción dirigida en un locus específico mediante recombinación homóloga o a través de sistemas de edición genética como CRISPR-Cas (Wang *et al.*, 2017).

La aproximación utilizada en esta Tesis Doctoral para sobreexpresar genes de interés ha sido el empleo de plásmidos autorreplicativos basados en la secuencia AMA1 (*Autonomously Maintained in Aspergillus*) (Figura 16). Esta secuencia, originalmente aislada en *Aspergillus nidulans* y de una longitud de aproximadamente 6 kb, está formada por una repetición invertida que permite la replicación autónoma de los plásmidos que la contienen (Aleksenko & Clutterbuck, 1997). Con el tiempo, los vectores AMA1 se han consolidado como una herramienta fundamental en la ingeniería genética de diversos hongos filamentosos, incluidas algunas especies de *Talaromyces* y otros géneros biotecnológicamente relevantes como *Aspergillus* y

Penicillium (Mózsik *et al.*, 2021; Roux *et al.*, 2024). Estos plásmidos se han utilizado para la expresión de genes reporteros que codifican para proteínas fluorescentes, de componentes del sistema CRISPR/Cas, así como de fragmentos de ADN de gran tamaño, superiores a 100 kb, con el fin de estudiar rutas biosintéticas (Nielsen *et al.*, 2017; Roux *et al.*, 2021; Roux & Chooi, 2022; Villarino *et al.*, 2018).



Figura 16: Esquema del plásmido de replicación autónoma utilizado en esta tesis para introducir casetes de expresión con los genes de interés, junto con un marcador de selección. La secuencia AMA1 de *A. nidulans* permite la replicación autónoma de este tipo de vectores.

Los plásmidos AMA1 presentan diversas ventajas para la manipulación genética de hongos, como la obtención de un número alto de copias del casete de expresión, oscilando entre 10 y 30 copias por núcleo en *A. nidulans* (Aleksenko & Clutterbuck, 1997). Al replicarse de forma autónoma sin integrarse en el genoma del huésped, reducen el riesgo de alteraciones genómicas y minimizan la probabilidad de efectos pleiotrópicos no deseados. Además, estos plásmidos mejoran significativamente la eficiencia de transformación en comparación con otros métodos, y pueden recuperarse del huésped fúngico, lo que permite su posterior análisis y/o reutilización (Aleksenko & Clutterbuck, 1997; Villarino *et al.*, 2018).

7. Mejora de la producción de glicosil hidrolasas en hongos filamentosos mediante manipulación genética

Los hongos filamentosos son ampliamente utilizados en la producción de xilanasas y otras GHs debido a su capacidad natural para secretar estas enzimas en grandes cantidades. Sin embargo, es crucial aumentar su producción para mejorar los rendimientos de las biorrefinerías de lignocelulosa y expandir su aplicación en otros ámbitos industriales.

Una estrategia para alcanzar este objetivo consiste en **optimizar las condiciones de cultivo**, ajustando parámetros críticos como el pH, temperatura, agitación, tamaño de inóculo, concentración de oxígeno y suministro de nutrientes (carbono y nitrógeno). Además, el uso de inductores adecuados que estimulen la expresión enzimática y la utilización de biorreactores capaces de controlar con precisión todas estas variables, permiten maximizar la producción de GHs (Chipeta *et al.*, 2008; Culleton *et al.*, 2013). De esta forma se ha conseguido, recientemente,

uplicar la secreción de β -glucosidasas y endoglucanasas en *T. amestolkiae* empleando biorreactores de 2 L (de Eugenio *et al.*, 2024). No obstante, las fermentaciones fúngicas siguen presentando desafíos, como el uso de sustratos insolubles (celulosa, paja de trigo, bagazo de cerveza, etc.) que dificultan la homogenización del medio, y la morfología del micelio fúngico, la cual afecta la transferencia de oxígeno y nutrientes (Mattam *et al.*, 2022; Veiter *et al.*, 2018).

Otra aproximación que se puede usar, también en combinación con la optimización de las condiciones de cultivo, es el desarrollo de **cepas mejoradas genéticamente**. En este sentido, se han obtenido buenos resultados sobreexpresando genes que codifican para GHs. Por ejemplo, la introducción de más copias de los genes nativos de la celobiohidrolasa II en *T. reesei* o de la β -xilosidasa Bxy3A en *T. cellulolyticus*, ambos bajo el control de promotores *Pcbh1* nativos, aumentó significativamente las actividades enzimáticas correspondientes (Fang & Xia, 2013; Kanna *et al.*, 2011). Esta estrategia es particularmente útil cuando los crudos enzimáticos son deficitarios en una actividad específica. Sin embargo, se vuelve más compleja si se busca mejorar varias actividades, lo cual es recomendable en el caso de la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica, ya que se requiere la acción sinérgica de múltiples enzimas (Mattam *et al.*, 2022). La manipulación genética también ha permitido abordar limitaciones relacionadas con la actividad proteolítica que degrada enzimas extracelulares, como es el caso de la delección de los genes de dos proteasas en *A. niger*, que condujo a una marcada reducción de la actividad proteolítica extracelular, incrementando la estabilidad de las enzimas secretadas (Jin *et al.*, 2007). Otra alternativa interesante es la optimización del sistema de secreción fúngica. Esto incluye, entre otros, el reemplazo de péptidos señal por versiones más eficientes, la mejora en el plegamiento de las proteínas y el transporte intracelular, y el aumento de las ramificaciones en las puntas de las hifas para maximizar la superficie de secreción (Wang *et al.*, 2020). Por último, otra estrategia muy utilizada implica modificar la regulación de la expresión de los genes de las GHs (como se explica en el siguiente apartado), lo que permite aumentar la producción de varias de estas enzimas simultáneamente. Esto requiere un conocimiento profundo de los complejos mecanismos moleculares mediante los cuales cada hongo filamentoso degrada la biomasa lignocelulósica, permitiendo un diseño más preciso y efectivo de cepas mejoradas.

7.1. Regulación de la expresión de glicosil hidrolasas por factores de transcripción

Como se ha mencionado anteriormente, la degradación enzimática de la biomasa lignocelulósica requiere la acción sinérgica y coordinada de diversas GHs. La secreción de estas enzimas está regulada de forma estricta y depende, en gran medida, de la presencia de sustratos específicos en el medio de cultivo (Benocci *et al.*, 2017; Méndez-Líter *et al.*, 2021a). El gran tamaño de los polisacáridos que forman parte de la biomasa lignocelulósica impide que puedan

ser transportados al interior de las células. Por esta razón, los hongos filamentosos deben secretar, de manera constitutiva y/o cuando se agota la fuente de carbono, algunas de las GHs implicadas en la hidrólisis de estos polisacáridos. La producción de estas enzimas es inicialmente baja, pero suficiente para comenzar la hidrólisis, liberando disacáridos y monosacáridos (Benocci *et al.*, 2017). Estos productos, que ya pueden ser transportados al espacio intracelular, actúan como inductores de los sistemas celulolítico y hemicelulolítico mediante la activación de factores de transcripción específicos. Estos factores de transcripción no solo regulan la expresión de las GHs, sino que también controlan la activación de transportadores de azúcares y de las rutas catabólicas necesarias para metabolizar los productos de hidrólisis (Alazi & Ram, 2018; Benocci *et al.*, 2017).

Además de por estos activadores transcripcionales, la expresión de las GHs en hongos filamentosos está controlada por represión catabólica por carbono y por otros represores transcripcionales adicionales. Todos estos reguladores (activadores y represores) han sido objeto de numerosos estudios en *T. reesei*, *Neurospora crassa* y diversas especies del género *Aspergillus*, y sus principales hallazgos se encuentran esquematizados en la Figura 17.

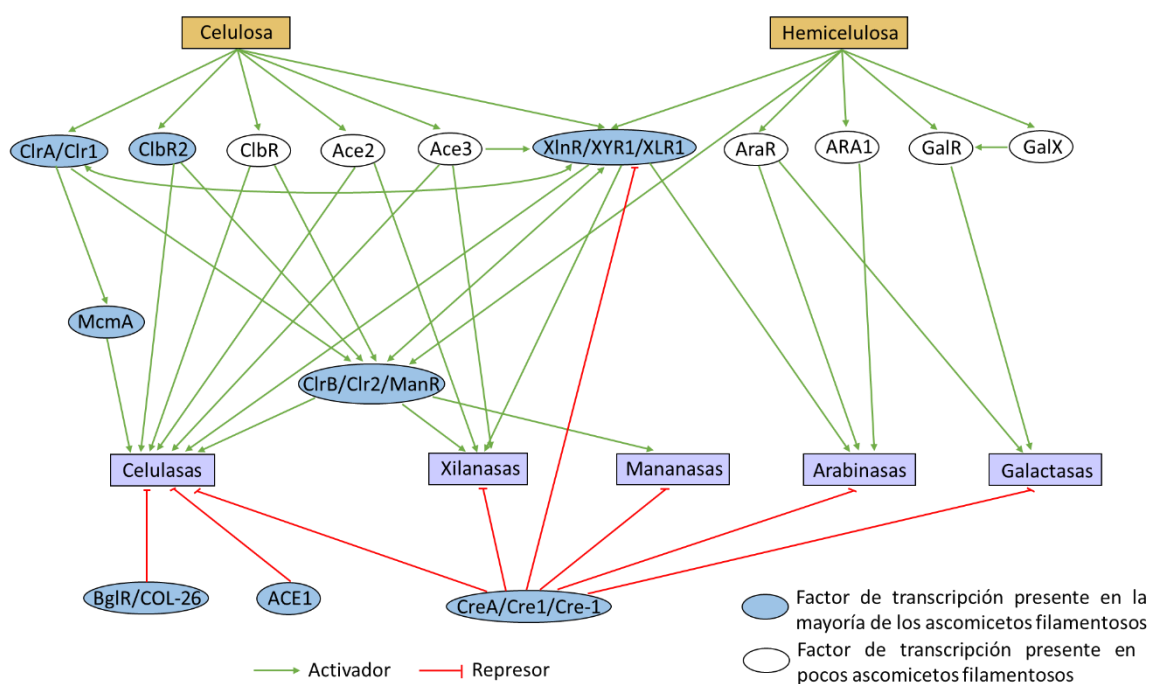


Figura 17. Esquema modelo de la compleja red de factores de transcripción involucrados en la degradación de la celulosa y hemicelulosa, basado en el conocimiento sobre *Aspergillus*, *T. reesei* y *N. crassa*. Figura adaptada de Benocci *et al.* (2017).

Como se puede observar, en la red de regulación de las GHs están involucrados un gran número de factores de transcripción que interactúan entre sí, lo que refleja su alta complejidad. Además, su presencia, funcionamiento e interacciones pueden variar considerablemente entre

distintas especies de hongos y están fuertemente influenciados por las condiciones de cultivo y los inductores empleados (Benocci *et al.*, 2017). Por ejemplo, hay factores de transcripción que solo han sido descritos en determinados hongos como los activadores de celulasas ACE2 y ACE3 en *T. reesei* (Aro *et al.*, 2001; Benocci *et al.*, 2017; Häkkinen *et al.*, 2014), y los activadores de arabinasas AraR y galactasas GalX y GalR en especies de *Aspergillus* (Battaglia *et al.*, 2011; Benocci *et al.*, 2017; Christensen *et al.*, 2011). Otros reguladores están conservados en muchos hongos, pero llevan a cabo funciones diferentes. Es el caso de ClrB/Clr2/ManR, el cual es absolutamente necesario para la actividad celulolítica en *N. crassa*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. oryzae* y *P. oxalicum*, pero no tiene este papel fundamental en *T. reesei* y *T. cellulolyticus* (Kun *et al.*, 2023). También existen otros factores de transcripción (no mostrados en la figura) que responden a condiciones ambientales como, por ejemplo, variaciones en el pH extracelular, la presencia de luz y la disponibilidad de diferentes fuentes de nitrógeno (Benocci *et al.*, 2017; Mattam *et al.*, 2022). A continuación, se explicará en más detalle los factores de transcripción más relevantes en la producción de xilanasas: el represor CreA y el activador XlnR.

- **Represión catabólica por carbono: represor transcripcional CreA**

La represión catabólica por carbono es un mecanismo regulador esencial en hongos y otros microorganismos. Controla negativamente la expresión de enzimas que degradan fuentes de carbono complejas, entre ellas los polisacáridos de la biomasa lignocelulósica, cuando hay disponibles fuentes de carbono más fácilmente utilizables, como la glucosa. En algunos casos, también se activa con la xilosa y la celobiosa a altas concentraciones. Este mecanismo ayuda a evitar el gasto de recursos (enzimas extracelulares y rutas metabólicas) cuando no son necesarios (Alazi & Ram, 2018; Benocci *et al.*, 2017).

En este proceso, el factor de transcripción CreA (conocido también como Cre1 o Cre-1) juega un papel central al inhibir la expresión de los genes que codifican para GHs, así como los de algunos activadores transcripcionales de estas enzimas (Alazi & Ram, 2018; Benocci *et al.*, 2017; Mattam *et al.*, 2022). La delección o mutación de CreA, conservado en la mayoría de hongos, puede desactivar la represión catabólica por carbono, permitiendo la expresión de genes implicados en la degradación de celulosa y hemicelulosa, tanto en condiciones de inducción como de represión (Portnoy *et al.*, 2011; Ries *et al.*, 2016; Sun & Glass, 2011). No obstante, es importante señalar que, en algunos hongos como *Penicillium chrysogenum*, la eliminación de este gen puede ser letal (Cepeda-García *et al.*, 2014; Fernandez *et al.*, 2012). Además, la máxima producción de celulasas y hemicelulasas requiere no solo la ausencia de represión, sino también la inducción por la presencia de determinados metabolitos, mediada por activadores transcripcionales (Benocci *et al.*, 2017).

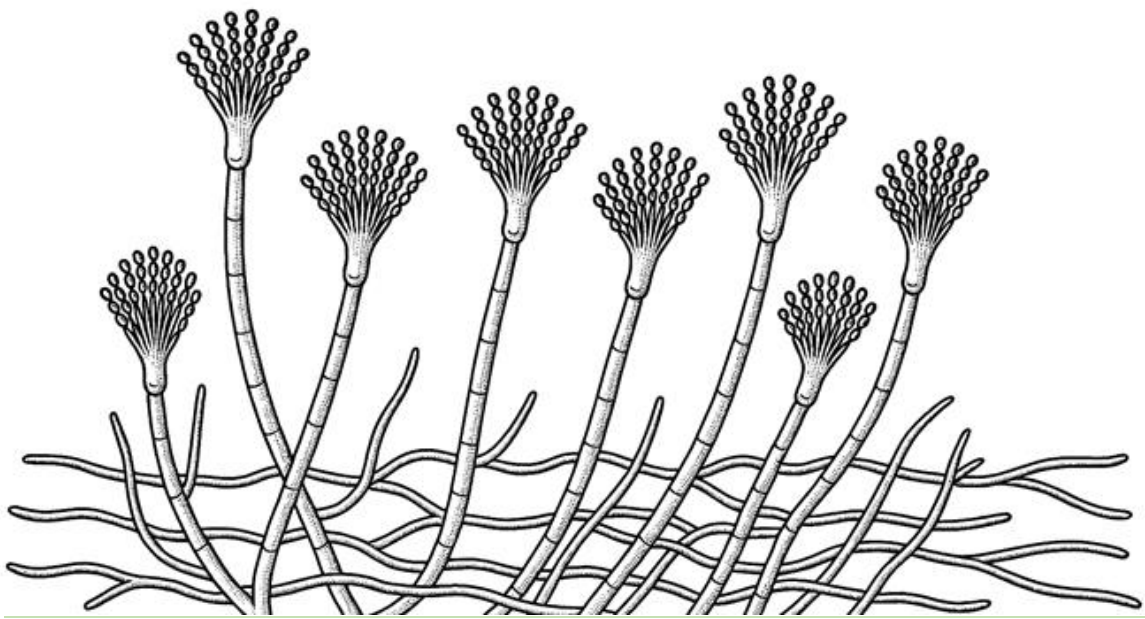
- **Activador transcripcional XlnR**

El principal activador transcripcional implicado en la degradación de xilano y de la utilización de xilosa en hongos filamentosos es XlnR (denominado también XYR1 o XLR1) (Van Peij *et al.*, 1998). Este factor de transcripción, presente en casi todos los ascomicetos filamentosos, contiene un dominio de unión a ADN, tipo dedo de zinc Zn_2Cys_6 , y un dominio conocido como *middle homology region* con funciones reguladoras (Xia *et al.*, 2022). La secuencia consenso reconocida por XlnR en los promotores de los genes que regula es 5'-GGCTAA-3' y está organizada como una repetición invertida con una separación de 10-12 pb. En algunos casos, como en *T. reesei*, también se trata de un único motivo 5'-GGC(A/T)₃-3'. Se cree que este activador transcripcional dimeriza antes de su unión con el ADN, aunque no se ha visto que esto sea esencial para la inducción de las xilanasas (Benocci *et al.*, 2017).

El conjunto de genes regulados por XlnR varía mucho entre hongos (Alazi & Ram, 2018; Benocci *et al.*, 2017). Por ejemplo, en diversas especies de *Aspergillus* y en *T. reesei* (Benocci *et al.*, 2017), este factor de transcripción controla la expresión de los sistemas tanto hemicelulolítico como celulolítico y, sin embargo, en *N. crassa*, *P. oxalicum*, *T. cellulolyticus* y *T. versatilis*, no parece tener una influencia relevante en la expresión de genes que codifican para celulasas (Brunner *et al.*, 2007; Fujii *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Llanos *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2012). Es importante destacar que algunos estudios llegaron a conclusiones diferentes, incluso en las mismas especies, probablemente por la gran influencia que las fuentes de carbono tienen sobre el conjunto de genes controlados por XlnR (Llanos *et al.*, 2019). Por otro lado, *T. reesei* parece ser el único hongo en el que este activador transcripcional también regula algunos genes del sistema de degradación del arabinoxilano (Akel *et al.*, 2009).

La adición de copias de *xlnR* en *A. niger* (Van Peij *et al.*, 1998) y su sobreexpresión mediante promotores constitutivos fuertes en *A. oryzae*, *A. nidulans*, *Myceliophthora thermophila* y *T. cellulolyticus* (Marui *et al.*, 2002; Okuda *et al.*, 2016; Tamayo-Ramos & Orejas, 2014; Wang *et al.*, 2015), dio lugar a un aumento significativo en su producción de xilanasas. Esto indica que la manipulación genética del activador transcripcional XlnR es una estrategia eficaz para potenciar los cócteles enzimáticos de hongos filamentosos y para mejorar su capacidad de degradación del xilano.

OBJETIVOS

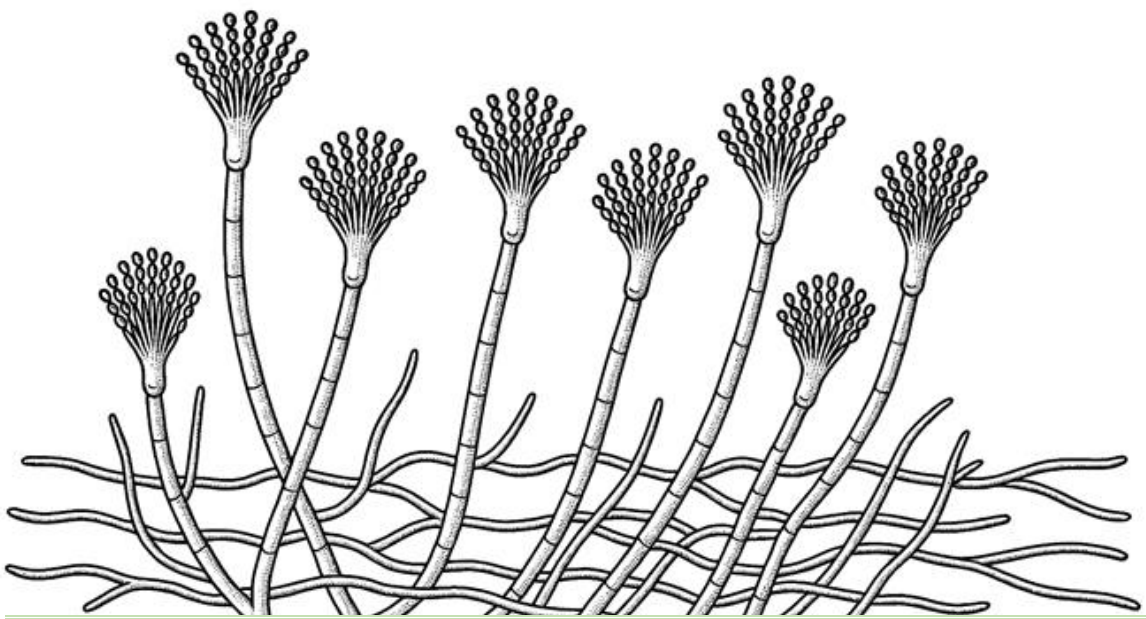


Teniendo en cuenta la gran batería de glicosil hidrolasas presentes en el genoma de *Talaromyces amestolkiae*, entre las que se encuentran distintas xilanasas implicadas en la valorización de residuos vegetales, se propuso continuar con el estudio de estas enzimas, nuevas o mejoradas mediante ingeniería de proteínas. Dado que en los secretomas de este hongo se detectaron dos endoxilanasas (de Eugenio *et al.*, 2017), y una de la familia GH11 ya había sido estudiada, uno de los objetivos generales de esta Tesis Doctoral fue caracterizar y mejorar la otra endoxilanasas, perteneciente a la familia GH10. Esta última resulta especialmente interesante por su mayor versatilidad en comparación con la familia GH11, ya que en ella se incluyen enzimas capaces de hidrolizar enlaces β -(1,4) entre residuos de D-xilopiranosas próximos a las ramificaciones de la cadena principal del xilano (Méndez-Líter *et al.*, 2021a). Además, dado el interés biotecnológico de las xilanasas, se definió otro objetivo general enfocado a manipular genéticamente *T. amestolkiae* con el fin de incrementar los niveles de producción de estas enzimas.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar la nueva endoxilanasas GH10 de *T. amestolkiae*, tras su expresión en *P. pastoris*, y estudiar sus aplicaciones biotecnológicas en reacciones de hidrólisis y transglicosilación.
2. Diseñar variantes glicosintasas de esta endoxilanasas, mediante ingeniería de proteínas, con el fin de aumentar su eficacia catalítica en la síntesis de glicósidos bioactivos.
3. Desarrollar un método de transformación y herramientas de ingeniería genética para *T. amestolkiae*.
4. Incrementar la producción de xilanasas en *T. amestolkiae* mediante la manipulación genética de factores de transcripción que regulen la expresión de los genes que las codifican.

MATERIALES Y MÉTODOS



1. Microorganismos, medios y condiciones de cultivo

En esta tesis doctoral se ha trabajado con distintas cepas del hongo filamentoso *Talaromyces amestolkiae*, de la levadura *Pichia pastoris* y de la bacteria *Escherichia coli*. Todos las soluciones y medios de cultivo empleados se esterilizaron por calor húmedo, en autoclave, a 121°C o 110 °C (en el caso de contener glucosa) y 1 atmósfera de presión, o mediante filtración utilizando filtros estériles de 0,2 µm de tamaño de poro (Millipore). El pH se determinó con un pH-metro (SensION+ pH3, Hach) calibrado con soluciones estándar de pH 4, 7 y 10 (Hach). Todos los microorganismos se cultivaron en estufas de incubación (JP Selecta) en medio sólido, o en agitadores orbitales (New Innova 44/44R, Brunswick Scientific) en medio líquido. El trabajo en condiciones de esterilidad se realizó usando una cabina de flujo laminar (Aeolus V, Telstar) o mediante el uso de mecheros Bunsen.

1.1. Cepas de *Talaromyces amestolkiae*

La cepa de *T. amestolkiae* utilizada en esta tesis fue aislada de residuos de cereales por el grupo de la Dra. Covadonga Vázquez del Departamento de Microbiología de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), identificada por nuestro grupo de investigación y depositada en la colección del Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (CIB-CSIC) con el número de referencia A795. A partir de la cepa silvestre se han generado distintos mutantes cuyas características principales están recogidas en las Tabla 3.

Tabla 3. Cepas de *T. amestolkiae* silvestre y mutantes utilizadas en este trabajo.

Cepa	Características	Referencia
<i>T. amestolkiae</i> (Tam_WT)	Silvestre	Colección CIB
Tam_pyrG	Auxótrofo para pirimidinas y resistente a 5-FOA	Este trabajo
Tam_p1439	Transformado con pFNO3 (p1439)	
Tam_p1393	Transformado con pRG3-AMA1-NotI (p1393), control negativo vector vacío	
Tam_DsRed	Transformado con pRG3-gpdA-DsRed (p1394)	
Tam_XlnR	Transformado con p1393-PgpdA-XlnR-TtrpC	
Tam_XlnR ^{A788V}	Transformado con p1393-PgpdA-XlnR ^{A788V} -TtrpC	
Tam_XlnR ^{V785F}	Transformado con p1393-PgpdA-XlnR ^{V785F} -TtrpC	

Las cepas de *T. amestolkiae* se cultivaron en distintos medios de cultivo: PDA (*Potato Dextrose Agar*) para su mantenimiento, MCA (Medio completo de *Aspergillus*) para su manipulación genética y CSS (*Corn Steep Solids medium*) para la preparación de pre-inóculos. Para la producción de glicosil hidrolasas se utilizó medio Mandels (Mandels & Weber, 1969) suplementado con fuentes de carbono diferentes: 1% (p/v) de xilano de madera de haya (Megazyme), glucosa (Merck), glicerol (ITW Reagents) o bagazo de cerveza (cervecera La Cibeles). Este último residuo fue previamente pretratado para facilitar su hidrólisis. Para ello, se molió y tamizó (0,42 mm), se trató con 0,5% (p/v) de NaOH durante 1 h a 50 °C y 200 rpm, y se

enfrió. Finalmente, se neutralizó hasta un pH de 5-6, se centrifugó para eliminar la mayor parte del líquido y se liofilizó. El medio WMM (*Watch Minimal Medium*) se utilizó para analizar el crecimiento del hongo por microscopía de fluorescencia. La composición de estos medios de cultivo se detalla en las Tablas 4-8. En el caso de la cepa auxótrofa para pirimidinas Tam_{pyrG}, estos medios se suplementaron con 5 mM de uridina (Merck) y 5 mM de uracilo (Merck). Para la transformación de *T. amestolkiae* se usó como medio de regeneración el MCA, añadiendo 1 M de sacarosa (Merck), como estabilizador osmótico. En todos estos medios, *T. amestolkiae* se creció a 28 °C en placa y a 28 °C y 180 rpm en cultivo líquido. Para su conservación, las esporas de las cepas de *T. amestolkiae* se resuspendieron en una solución acuosa con 1% (p/v) de NaCl y 0,1% (v/v) de Tween 80, se determinó su concentración por conteo con una Cámara de Neubauer y se congelaron a -80 °C con 15% (v/v) de glicerol.

Tabla 4. Composición del medio PDA (*Potato Dextrose Agar*)

PDA (Difco, pH 5,6)	
Glucosa	20 g/L
Almidón de patata	4 g/L
Agar	15 g/L

Tabla 5. Composición del medio MCA (Medio Completo de *Aspergillus*)

MCA (pH 6,5)	
Glucosa	10 g/L
Casaminoácidos	1,5 g/L
Peptona	2 g/L
Extracto de levadura	1 g/L
Tartrato amónico dibásico	5 mM
KCl	0,52 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,52 g/L
KH ₂ PO ₄	1,52 g/L
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O ⁽¹⁾	0,04 mg/L
CuCl ₂ ·2H ₂ O ⁽¹⁾	0,4 mg/L
FeCl ₃ ⁽¹⁾	0,8 mg/L
ZnCl ₂ ⁽¹⁾	8 mg/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O ⁽¹⁾	0,8 mg/L
Agar (solo para placas)	15 g/L o 7,5 g/L ⁽²⁾

⁽¹⁾ Todos estos elementos traza se añadieron de un stock preparado previamente a 1000x.

⁽²⁾ El medio de regeneración (MCA suplementado con sacarosa 1 M) se utilizó en las transformaciones de *T. amestolkiae*. Presenta una concentración baja de agar (7,5 g/L) que permite embeber los protoplastos en una fina capa sobre placas del mismo medio que contienen 15 g/L de agar.

Tabla 6. Composición del medio CSS (*Corn Steep Solids*)

CSS (pH 5,6)	
Glucosa	50 g/L
K ₂ HPO ₄	4 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	9 g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,4 g/L
CaCO ₃	7 g/L
<i>Corn steep solids</i> (sólidos de la maceración del maíz, Merck)	26,3 g/L
Aceite de soja	2,8 mL/L

Tabla 7. Composición del medio Mandels.

Mandels (pH 4,5)	
KH ₂ PO ₄	2 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,3 g/L
Urea	0,3 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3 g/L
CaCl ₂ ·7H ₂ O	0,3 g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O ⁽¹⁾	5 mg/L
MnSO ₄ ·H ₂ O ⁽¹⁾	1,6 mg/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O ⁽¹⁾	1,4 mg/L
Peptona	1 g/L
Tween 80	2 mL/L
Xilano, bagazo de cerveza, glucosa, glicerol	1% (p/v, excepto v/v glicerol)

⁽¹⁾ Todos estos elementos traza se añadieron desde un stock preparado previamente a 1000x.

Tabla 8. Composición del medio WMM (*Watch Minimal Medium*)

WMM (pH 6,5)	
Glucosa	1 g/L
Tartrato amónico dibásico	5 mM
KCl	0,52 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,52 g/L
NaH ₂ PO ₄	25 mM
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O ⁽¹⁾	0,04 mg/L
CuCl ₂ ·2H ₂ O ⁽¹⁾	0,4 mg/L
FeCl ₃ ⁽¹⁾	0,8 mg/L
ZnCl ₂ ⁽¹⁾	8 mg/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O ⁽¹⁾	0,8 mg/L

⁽¹⁾ Todos estos elementos traza se añadieron desde un stock preparado previamente a 1000x.

1.2. Cepas de *Pichia pastoris*

P. pastoris GS115 (Invitrogen) se empleó para la producción heteróloga de la endoxilanas rXynSOS y sus variantes glicosintasas, dando lugar a los mutantes de la Tabla 9. Se trata de una cepa auxótrofa para la histidina.

Tabla 9. Cepas de *P. pastoris* GS115 silvestre y mutantes utilizadas en este trabajo.

Cepa	Características	Referencia
<i>P. pastoris</i> GS115	<i>his4</i> / Mut ⁺	Invitrogen
GS115_XynSOS	Transformada con pPIC9_XynSOS	Este trabajo
GS115_XynSOS ^{E236G}	Transformada con pPIC9_XynSOS ^{E236G}	
GS115_XynSOS ^{E236S}	Transformada con pPIC9_XynSOS ^{E236S}	

Las distintas cepas de *P. pastoris* se cultivaron en los medios de cultivo YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) para su mantenimiento y preparación de pre-inóculos, YNB-His (*Yeast Nitrogen Base without Histidine*, Becton Dickinson) para su transformación y YEPS (*Yeast Extract Peptone Sorbitol*) para la producción de proteínas recombinantes. La composición de estos medios de cultivo se indica en las Tablas 10-12. Para la inducción del promotor *Paox1* durante la producción de las enzimas de interés, se adicionaron diariamente 6,5 mL/L de metanol (Merck) a los cultivos. En todos estos medios, *P. pastoris* GS115 se creció a 28 °C en placa y a 28 °C y 250 rpm en cultivo líquido. Las distintas cepas de *P. pastoris* GS115 se conservaron a -80 °C en YPD suplementado con 20% (v/v) de glicerol.

Tabla 10. Composición del medio YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*)

YPD (pH 6,5)	
Glucosa	20 g/L
Extracto de levadura	10 g/L
Peptona	20 g/L

Tabla 11. Composición del medio YNB-His (*Yeast Nitrogen Base without Histidine*)

YNB-His (pH 5,4)	
Glucosa	20 g/L
Medio YNB (Difco)	6,7 /L
Mezcla de aminoácidos esenciales sin histidina (Merck)	1,92 g/L
Agar	15 g/L

Tabla 12. Composición del medio YEPS (*Yeast Extract Peptone Sorbitol*)

YEPS (pH 6)	
Sorbitol	10 g/L
Extracto de levadura	10 g/L
Peptona	20 g/L
K ₂ HPO ₄	2,403 g/L
KH ₂ PO ₄	11,87 g/L

1.3. Cepas de *Escherichia coli*

E. coli DH5 α (Invitrogen) se utilizó para los clonajes y la propagación de los plásmidos. Las células se crecieron durante aproximadamente 16 h en medio LB (Luria Bertani), cuya composición se puede encontrar en la Tabla 13, a 37 °C en placa y a 37 °C y 200 rpm en cultivo líquido. Para seleccionar colonias transformadas, se suplementó el medio con 100 μ g/mL de ampicilina. Las distintas cepas de *E. coli* se conservaron a -80 °C en LB suplementado con 20% (v/v) de glicerol.

Tabla 13. Composición del medio LB (*Luria Bertani*) para el cultivo de *E. coli* DH5 α .

LB (pH 7)	
Triptona	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
NaCl	10 g/L

2. Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos

2.1. Extracción y purificación de ácidos nucleicos

- **ADN plasmídico de cepas de *E. coli* DH5 α**

La purificación de ADN plasmídico se llevó a cabo con el *High Pure Plasmid Purification Kit* (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante, a partir de cultivos de las cepas bacterianas portadoras de los plásmidos de interés. La concentración y pureza del ADN obtenido se analizó espectrofotométricamente, evaluando la A_{260} y la ratio A_{260}/A_{280} ($\sim 1,8$), respectivamente, con un *nanodrop* (NanoPhotometer N60, IMPLEN) y mediante visualización en geles de agarosa.

- **ADN genómico de cepas de *T. amestolkiae***

El ADNg de Tam_WT y sus cepas mutantes se extrajo utilizando dos métodos diferentes en función de la pureza requerida.

Para analizar el genotipo de las distintas cepas mediante PCR, el ADNg se aisló a partir de esporas, recolectadas utilizando palillos de madera estériles después de 3-4 días de crecimiento del hongo en placas de PDA o MCA. Las esporas se resuspendieron en 200 μ L de tampón de ruptura, que contenía 2% (v/v) de Tritón X-100, 1% (p/v) de SDS, 100 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl pH 8 y 1 mM de EDTA pH 8. A continuación, se añadieron 150 mg de esferas de vidrio (0,4-0,6 mm, Merck), para ayudar a romper las esporas. Las muestras se agitaron con un vórtex durante 30 s y posteriormente se incubaron a 70 °C durante 30 min. Se realizaron 3 pasos adicionales de vórtex de 30 s a lo largo de la incubación. Seguidamente, se añadieron 200 μ L de Fenol/Cloroformo/Alcohol Isoamílico (25:24:1 v/v, Merck) y las muestras se mezclaron agitando en un vórtex durante 5 min. Finalmente, las muestras disgregadas se centrifugaron (centrífuga

5424, Eppendorf) a 18.400 ×g durante 5 min, y 50 µL de la solución acuosa, que contenía el ADNg disuelto, se transfirieron a un tubo limpio.

Cuando se requirió una mayor pureza de ADN, como en el caso de la secuenciación de ADNg, este se aisló a partir de micelio crecido en medio MCA líquido durante 2-3 días. El micelio se recolectó por centrifugación del cultivo (centrífuga 5430R, Eppendorf) y 200 mg se lavaron con etanol antes de proceder con la extracción utilizando el *NZY Plant/Fungi gDNA Isolation kit* (NZYtech). Brevemente, el micelio resuspendido en el tampón correspondiente del *kit*, junto con 1 g/L de ARNasa A (Merck) y 1 g/L de proteinasa K (Merck), se sometió a una lisis celular mediante homogenización con 150 mg de esferas de vidrio y 5 pulsos de vórtex de 1 min. A continuación, las muestras se incubaron 30 min a 65 °C, se les añadió 100 µL de cloroformo, se mezclaron con pulsos de vórtex de 10 s y las fases se separaron por centrifugación durante 15 min a 20.000 ×g. La fase superior, que contenía el ADNg, se transfirió a un nuevo tubo y se continuó con el protocolo descrito por la casa comercial basado en columnas de centrifugado.

- **Fragmentos de ADN lineales**

Los fragmentos de ADN, generados por PCR y digestiones con enzimas de restricción, fueron purificados mediante el *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) o el *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen), siguiendo las instrucciones de sus fabricantes.

- **ARN de cepas de *T. amestolkiae***

El ARN de Tam_WT se utilizó para obtener la secuencia nucleotídica de *xynSOS* sin intrones. Este ARN se aisló a partir de micelio crecido en medio Mandels suplementado con 1% (p/v) de xilano como fuente de carbono. El ARN se extrajo utilizando el *RNeasy Plant Mini kit* (Qiagen). Para ello se procedió a la lisis celular de 100 mg de micelio utilizando un mortero y nitrógeno líquido, y se continuó después con el protocolo descrito por el fabricante. Las muestras fueron tratadas con ADNasa (*RNase-free DNase I*, Qiagen) para eliminar el ADN contaminante. La concentración y pureza del ARN se determinó espectrofotométricamente, analizando la A_{260} y la ratio A_{260}/A_{280} (~2,0), con un *nanodrop* (NanoPhotometer N60, IMPLEN) y mediante visualización en geles de agarosa.

2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las amplificaciones de ADN se llevaron a cabo con distintas finalidades, entre las que destacan la generación de fragmentos de ADN para sus clonajes, la comprobación del genotipo correcto tras una ligación o transformación y la introducción de mutaciones en plásmidos. Todas las reacciones se realizaron en el termociclador *T100 Thermal Cycler* (Bio-Rad) y contenían 0,5 µM de oligonucleótidos, 0,2 mM de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs, New England BioLabs),

1,5 mM de MgCl₂ (cuando era necesario), ADN molde y una ADN polimerasa con su tampón correspondiente. Dependiendo del objetivo de la PCR, se utilizaron distintas ADN polimerasas con sus condiciones de reacción específicas. En el caso de PCRs con alto contenido en GC, se añadió también 3% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO, New England BioLabs) para facilitar la amplificación. Los oligonucleótidos empleados fueron adquiridos de la empresa IDT y pueden encontrarse en la Tabla 14. Como molde se añadieron 10 ng de ADN plasmídico, 100 ng de ADNg o biomasa de colonias (para reacciones de 25-50 µL). Todas las mezclas de PCR se prepararon siguiendo las especificaciones de cada fabricante. Las temperaturas de *annealing* (Ta) se calcularon a partir de la secuencia de los oligonucleótidos o se optimizaron por gradiente.

Tabla 14. Oligonucleótidos utilizados en esta tesis junto con su secuencia y la finalidad de su uso.

Oligonucleótido	Secuencia 5' → 3'	Finalidad
pPIC9_XynSOS_fw	<u>gaattc</u> caattgaataaccgccgcaaa ⁽¹⁾	Amplificación del gen <i>xynSOS</i> para clonarlo en pPIC9
pPIC9_XynSOS_rv	<u>gcgccgcg</u> cttacaacattgagagtagtatgg ⁽²⁾	
5'aox1	gactggtccaattgacaagc	Secuenciación del inserto <i>xynSOS</i> y sus variantes mutantes en pPIC9
3'aox1	gcaaatggcattctgacatcc	
PCRmut_XynSOS ^{E236G} _fw	taatgttgccatcactggtctcgacatccgtatga ⁽³⁾	PCR mutagénica para obtener el gen de XynSOS ^{E236G}
PCRmut_XynSOS ^{E236G} _rv	tcatacggatgtcgcagaccagtgtggcaacatta ⁽³⁾	
PCRmut_XynSOS ^{E236S} _fw	taatgttgccatcactctctcgacatccgtatga ⁽⁴⁾	PCR mutagénica para obtener el gen de XynSOS ^{E236S}
PCRmut_XynSOS ^{E236S} _rv	tcatacggatgtcgcagagaagtgtggcaacatta ⁽⁴⁾	
Seq_pyrG_fw	ttccttcaactcaatcaag	Secuenciación del gen <i>pyrG</i> de <i>T. amestolkiae</i>
Seq_pyrG_rv	tagggcttggtgtcccctca	
Seq_pyrF_fw	atttattccgcagtattccg	Secuenciación del gen <i>pyrF</i> de <i>T. amestolkiae</i>
Seq_pyrF_rv	cgtgactatcgcatctcagc	
Seq_p1393-XlnR_1	ggatgtgctgcaaggcgatt	Secuenciación del inserto PgpA::xlnR::TtrpC y sus variantes mutantes clonadas en p1393 y PCR de genotipado de los transformantes Tam_XlnR, Tam_XlnR ^{A788V} y Tam_XlnR ^{V785F}
PCR/Seq_p1393-XlnR_2	ctttgtcatatccatactcc	
Seq_p1393-XlnR_3	agcgactcggaatgatcg	
Seq_p1393-XlnR_4	gtgctagagaccatgtcgca	
Seq_p1393-XlnR_5	tgccgtatgcgacgaccatt	
PCR/Seq_p1393-XlnR_6	gctgacatcgacaccaac	
Seq_p1393-XlnR_7	cgatccacttaacgttactg	
PCR_p1393_fw	cgtaaggagaaaataccg	PCR de genotipado de los transformantes Tam_p1393
PCR_p1393_rv	Tcactggccgctgcttttac	
PCRmut_XlnR ^{A788V} _fw	gccacgccgtcaaggccgtcgaagcagcgtccgat ⁽⁵⁾	PCR mutagénica para obtener el gen de XlnR ^{A788V}
PCRmut_XlnR ^{A788V} _rv	atcggacgctgcttcgacggccttgacggcgtggc ⁽⁵⁾	
PCRmut_XlnR ^{V785F} _fw	cagctatgggccacgccttcaaggccgccgaagc ⁽⁶⁾	PCR mutagénica para obtener el gen de XlnR ^{V785F}
PCRmut_XlnR ^{V785F} _rv	gcttcggcgcccttgaaggcgtggcccatagctg ⁽⁶⁾	
SeqMut_XlnR	gcacgtttacatattctgc	Secuenciación de las mutaciones XlnR ^{A788V} y XlnR ^{V785F}

⁽¹⁾ Diana de restricción para EcoRI, ⁽²⁾ Diana de restricción para NotI, ⁽³⁾ Mutación XynSOS^{E236G}, ⁽⁴⁾ Mutación XynSOS^{E236S}, ⁽⁵⁾ Mutación XlnR^{A788V}, ⁽⁶⁾ Mutación XlnR^{V785F}

- **PCR para clonar fragmentos de ADN**

La ADN polimerasa de alta fidelidad *Phusion* (New England BioLabs) se empleó para sintetizar los fragmentos de ADN requeridos en los clonajes, a partir de ADN plasmídico, ADN_g o ADN_c. Estas PCRs se realizaron en 50 µl y las condiciones de reacción fueron un primer ciclo de 98 °C 30 s, seguido de 32 ciclos de 98 °C 10 s, Ta °C 30 s, 72 °C 30 s/kb, y un ciclo final de 72 °C 10 min.

- **PCR de colonias de *E. coli* y *P. pastoris***

La ADN polimerasa *Taq* (Invitrogen) se usó en las PCRs de colonias para comprobar el correcto ensamblaje de los plásmidos construidos en *E. coli* y el genotipo buscado en *P. pastoris* tras su transformación. Estas PCRs se realizaron en 25 µl y las condiciones de reacción fueron un primer ciclo de 95 °C 10 min, seguido de 30 ciclos de 95 °C 45 s, Ta °C 45 s, 72 °C 1 min/kb, y un ciclo final de 72 °C 10 min.

- **PCR para el genotipado de *T. amestolkiae***

La ADN polimerasa *PrimerSTAR GXL* (Takara) se utilizó con el objetivo de analizar el genotipo de los transformantes de *T. amestolkiae* a partir de su ADN_g. Estas PCRs se realizaron en 50 µl y las condiciones de reacción fueron un primer ciclo de 98 °C 2 min, seguido de 30 ciclos de 98 °C 10 s, Ta °C 30 s, 68 °C 1 min/kb, y un ciclo final de 68 °C 10 min.

- **PCR mutagénica**

La PCR mutagénica es un tipo de mutagénesis dirigida que permite introducir mutaciones en el fragmento de ADN amplificado. Este tipo de PCR mantiene el fundamento de las PCRs tradicionales, pero tienen la particularidad de que los oligonucleótidos utilizados incorporan mutaciones en sus secuencias que posibilitan modificar el ADN amplificado en una posición específica. Para llevar a cabo estas PCRs mutagénicas, se empleó la ADN polimerasa *Expand™ Long Template PCR System* (Roche), en volúmenes de 50 µl. Las condiciones de reacción fueron un primer ciclo de 94 °C 2 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C 30 s, Ta °C 30 s, 68 °C 1 min/kb, y un ciclo final de 68 °C 10 min.

Tal y como muestra la Figura 18, una vez obtenido el fragmento de PCR (plásmido *nickeado* con las mutaciones introducidas), la mezcla de reacción se incubó con la enzima de restricción DpnI. El sitio de corte de esta enzima es la secuencia 5'-GATC-3', exclusivamente en ADN metilado, por lo que se digirá el ADN parental (metilado) y se conservará intacto el ADN recién amplificado (no metilado). Finalmente, los *nicks* del plásmido mutado fueron reparados por *E. coli* tras su transformación.

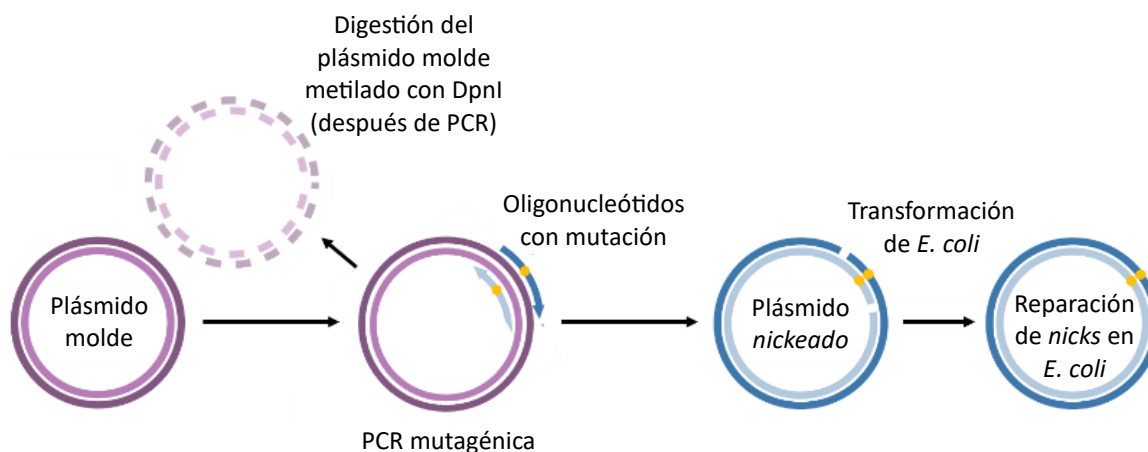


Figura 18. Esquema de la mutagénesis dirigida por PCR.

2.3. RT-PCR

La reacción de RT-PCR (PCR con transcripción reversa) se realizó para obtener la secuencia de nucleótidos de *xynSOS*. Para ello se utilizó el ARN de Tam_WT como molde para sintetizar su ADNc correspondiente, mediante la transcriptasa reversa *Superscript II* (Invitrogen), y hexámeros aleatorios (Invitrogen) como oligonucleótidos. La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 20 μ l con 50 μ M de hexámeros aleatorios, 1 μ g de ARN y 0,5 mM de dNTPs, se calentó a 65 °C 5 min y se enfrió en hielo. Posteriormente se añadió el tampón correspondiente, 10 mM de ditiotritol (DTT), 20 U de inhibidor de ARNasas y 200 U de transcriptasa reversa y, tras una incubación de 25 °C 10 min, la reacción tuvo lugar a 42 °C 50 min. Finalmente, la enzima se inactivó a 70 °C 15 min y se empleó 1 μ l del ADNc obtenido como molde para la PCR de amplificación del fragmento deseado.

2.4. Electroforesis en geles de agarosa

Para visualizar fragmentos de ADN (productos de PCR, digestiones con enzimas de restricción, purificaciones de ADNg, etc.) y determinar la pureza del ADN y ARN extraídos, se prepararon geles de agarosa al 0,7% o al 1,5% (p/v), en tampón TAE (40 mM de Tris-HCl, 20 mM de ácido acético, 2 mM de EDTA pH 8). Las muestras de ADN o ARN se cargaron en los geles junto con el correspondiente volumen de tampón de carga (New England BioLabs). Las electroforesis se desarrollaron en la cubeta *Mupid One system* (Takara), a un voltaje constante de 100 V durante 60 - 90 min, utilizando el tampón TAE como tampón de carrera. Finalmente, los geles se tiñeron con *Gel Red Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium) y las bandas de ADN se visualizaron con luz ultravioleta (UV) en un transiluminador (Gel Doc XR, Bio-Rad). Como marcador de masa molecular se emplearon *1 kb DNA Ladder* (New England BioLabs), *Quick-Load™ 100bp DNA Ladder* (New England BioLabs) o *1 kb DNA Ladder Plus* (NIPPON Genetics).

2.5. Construcción de plásmidos

Los plásmidos utilizados en esta Tesis Doctoral tienen distintas procedencias y pueden encontrarse en la Tabla 15. Como características comunes, todos tienen un origen de replicación para *E. coli*, un gen de resistencia a ampicilina (*amp^R*) y sitios de clonación múltiple (MCS, por sus siglas en inglés).

En el Capítulo 1 se trabajó con plásmidos derivados del vector comercial pPIC9. Los plásmidos p1439, p1393 y p1394 de los Capítulos 3 y 4 fueron proporcionados por el Dr. Eduardo A. Espeso Fernández del Grupo Biología Celular de *Aspergillus* del CIB-CSIC. p1439, conocido en la literatura como pFNO3, es un plásmido integrativo que se ha utilizado en este trabajo para poner a punto el protocolo de transformación de *T. amestolkiae*. Generalmente se usa para marcar con fluorescencia genes específicos, pero en este caso, su propósito fue servir como control de integración de una copia no expresada de GFP en Tam_WT. Por su parte, p1393 es un plásmido autorreplicativo que facilita alcanzar altos niveles de sobreexpresión y que se denomina en la literatura pRG3-AMA1-NotI. Este plásmido sirvió como control negativo de expresión y es el molde del que derivan los plásmidos construidos en el Capítulo 4. Finalmente, p1394 es un plásmido autorreplicativo, diseñado a partir del p1393, que está disponible en la literatura como pRG3-gpdA-DsRed. Se utilizó en el Capítulo 3 para generar una cepa que emitía fluorescencia roja gracias a la expresión constitutiva del gen que codifica para la proteína DsRed-Express (Mikkelsen *et al.*, 2003).

El plásmido pUC18-PgpdA-XlnR-TtrpC del Capítulo 4, está formado por la construcción *PgpdA::xlnR::TtrpC*, sintetizada y clonada en el vector comercial pUC18 por la empresa GenScript. La secuencia de nucleótidos de *xlnR* (intrones incluidos), se obtuvo del genoma previamente secuenciado de *T. amestolkiae*. Para facilitar futuros clonajes, se añadieron 4 mutaciones silenciosas que eliminaban dianas de restricción, y se añadieron otros sitios de corte único flanqueando a la construcción. Este plásmido se utilizó como paso previo para clonar la construcción en p1393.

El resto de plásmidos de esta Tesis Doctoral (Capítulos 1 y 4) fueron construidos utilizando endonucleasas de restricción (New England Biolabs) y ligasas de ADN T4 (Promega para pPIC9-XynSOS y Takara para los plásmidos derivados del p1393) o por PCR mutagénica, siguiendo las especificaciones de los fabricantes. El método para el clonaje de cada uno de estos plásmidos se describe a continuación. En todos los casos, la selección de transformantes de *E. coli* DH5 α se realizó en placas de LB que contenían 100 μ g/mL de ampicilina, el plásmido se aisló de varias colonias y se comprobó su correcto clonaje por PCR de colonias y secuenciación.

Tabla 15. Plásmidos utilizados en esta Tesis Doctoral.

Plásmido	Características	Referencia
pPIC9 (Capítulo 1)	Vector de expresión en <i>P. pastoris</i> (comercial). Está constituido por el promotor inducible por metanol y el terminador del gen <i>aox1</i> , la secuencia señal del factor α de secreción de <i>S. cerevisiae</i> , el gen que complementa la auxotrofia para histidina <i>his4</i> , y un MCS con las dianas de restricción de EcoRI y NotI. Contiene <i>amp^R</i> , <i>oriColE1</i>	Invitrogen (comercial)
pPIC9-XynSOS (Capítulo 1)	Plásmido derivado de pPIC9. Contiene el gen de la endoxilanasas XynSOS, sin intrones ni su péptido señal	Este trabajo (clonaje)
pPIC9-XynSOS ^{E236G} (Capítulo 1)	Plásmido derivado de pPIC9-XynSOS con la sustitución E236G en el gen de XynSOS	Este trabajo (PCR mutagénica)
pPIC9-XynSOS ^{E236S} (Capítulo 1)	Plásmido derivado de pPIC9-XynSOS con la sustitución E236S en el gen de XynSOS	Este trabajo (PCR mutagénica)
p1439 (pFNO3) (Capítulo 3)	Plásmido derivado de pPV472 (Massey <i>et al.</i> , 2013). Está formado por el gen <i>pyrG</i> de <i>Aspergillus fumigatus</i> que complementa la auxotrofia para pirimidinas y la quimera GlyAla5x-sGFP (sin ATG y compuesta por una repetición de cinco residuos de glicina-alanina fusionados en marco con la sGFP). Contiene <i>amp^R</i> , <i>kan^R</i> , <i>oriColE1</i> , <i>lacZα</i>	(Szewczyk <i>et al.</i> , 2006; Yang <i>et al.</i> , 2004)
p1393 (pRG3-AMA1-NotI) (Capítulo 4)	Plásmido derivado de pUC19 (comercial). Está constituido por el gen <i>pyr4</i> de <i>Neurospora crassa</i> que complementa la auxotrofia para pirimidinas, la región AMA1 de <i>Aspergillus nidulans</i> que permite la replicación autónoma del plásmido, y un MCS con las dianas de restricción de KpnI y BamHI. Contiene <i>amp^R</i> , <i>oriColE1</i> , <i>lacZα</i>	(Oshero <i>et al.</i> , 2000)
p1394 (pRG3-PgpdA-DsRed-TrpC) (Capítulo 3)	Plásmido derivado de p1393. Contiene la construcción <i>PgpdA::DsRed::TtrpC</i> (promotor constitutivo del gen <i>gpdA</i> y terminador del gen <i>trpC</i> de <i>A. nidulans</i> , gen de la proteína fluorescente roja DsRed-Express)	(Villarino <i>et al.</i> , 2018)
pUC18 (Capítulo 4)	Vector de clonación en <i>Escherichia coli</i> para el mantenimiento de genes (comercial). Contiene <i>amp^R</i> , <i>oriColE1</i> , <i>lacZα</i>	GenScript (comercial)
pUC18-PgpdA-XlnR-TtrpC (Capítulo 4)	Plásmido derivado de pUC18. Contiene la construcción <i>PgpdA::xlnR::TtrpC</i> (promotor del gen <i>gpdA</i> y terminador del gen <i>trpC</i> de <i>A. nidulans</i> , gen del regulador transcripcional XlnR de <i>T. amestokiae</i>) flanqueada por las dianas de restricción de KpnI, NotI en 5' y BamHI y XmaI en 3'	Este trabajo (sintetizado y clonado por GenScript)
p1393-PgpdA-XlnR-TtrpC (Capítulo 4)	Plásmido derivado de p1393. Contiene la construcción <i>PgpdA::xlnR::TtrpC</i>	Este trabajo (clonaje)
pUC18-PgpdA-XlnR ^{A788V} -TtrpC (Capítulo 4)	Plásmido derivado de pUC18-PgpdA-XlnR-TtrpC con la sustitución A788V en el gen de XlnR	Este trabajo (PCR mutagénica)
p1393-PgpdA-XlnR ^{A788V} -TtrpC (Capítulo 4)	Plásmido derivado de p1393. Contiene la construcción <i>PgpdA::xlnR^{A788V}::TtrpC</i>	Este trabajo (clonaje)
pUC18-PgpdA-XlnR ^{V785F} -TtrpC (Capítulo 4)	Plásmido derivado de pUC18-PgpdA-XlnR-TtrpC con la sustitución V785F en el gen de XlnR	Este trabajo (PCR mutagénica)
p1393-PgpdA-XlnR ^{V785F} -TtrpC (Capítulo 4)	Plásmido derivado de p1393. Contiene la construcción <i>PgpdA::xlnR^{V785F}::TtrpC</i>	Este trabajo (clonaje)

- **Clonaje de pPIC9-XynSOS**

pPIC9-XynSOS (Capítulo 1) es un plásmido integrativo que se empleó para producir la endoxilanasas rXynSOS en *P. pastoris*. La secuencia de nucleótidos de *xynSOS* se obtuvo a partir del genoma de *T. amestolkiae*. Dado que la presencia de intrones y su correcta anotación no estaba confirmada experimentalmente, se procedió al aislamiento de su ARN y a la síntesis del ADNc correspondiente por RT-PCR. La amplificación por PCR de la secuencia de nucleótidos de *xynSOS*, excluyendo la región del péptido señal, se realizó utilizando el ADNc de molde y con oligonucleótidos que incluían los sitios de restricción EcoRI en 5' y NotI en 3' (Tabla 14). El producto de PCR obtenido se digirió con estas enzimas de restricción (New England Biolabs) y se introdujo en el vector de expresión pPIC9 (Invitrogen) mediante ligación, antes de ser transformado en *E. coli* DH5α.

- **Construcción de pPIC9-XynSO^{E236G} y pPIC9-XynSO^{E236G}**

El plásmido pPIC9_XynSOS se utilizó como molde para generar dos variantes glicosintasas de la endoxilanasas rXynSOS mediante mutagénesis dirigida por PCR. Los oligonucleótidos empleados incluían una sustitución en el codón que codifica para el E236, mutando el aminoácido de glutamato a glicina en pPIC9-XynSO^{E236G} y de glutamato a serina en pPIC9-XynSOS^{E236S}. Los productos de la PCR mutagénica se digirieron con DpnI y se purificaron antes de ser transformados en *E. coli* DH5α.

- **Clonaje de p1393-PgpdA-XlnR-TtrpC**

El plásmido p1393-PgpdA-XlnR-TtrpC (Capítulo 4) se diseñó para sobreexpresar el gen del activador transcripcional XlnR en *T. amestolkiae*. Su clonaje consistió en digerir p1393 y pUC18-PgpdA-XlnR-TtrpC con KpnI y BamHI, purificando el *backbone* de p1393 y la construcción *PgpdA::xlnR::ttrpC*, respectivamente. Posteriormente, ambos fragmentos de ADN fueron ligados y transformados en *E. coli* DH5α.

- **Construcción de pUC18-PgpdA-XlnR^{A788V}-TtrpC y pUC18-PgpdA-XlnR^{V785F}-TtrpC y clonaje de p1393-PgpdA-XlnR^{A788V}-TtrpC y p1393-PgpdA-XlnR^{V785F}-TtrpC**

El plásmido pUC18-PgpdA-XlnR-TtrpC se usó como molde para desarrollar dos variantes mutantes del regulador transcripcional XlnR mediante mutagénesis dirigida por PCR. En una variante, la alanina en la posición 788 fue reemplazada por una valina (A788V), y en la otra, la valina en la posición 785 fue sustituida por una fenilalanina (V785F). Las PCR mutagénicas se llevaron a cabo con oligonucleótidos que incorporaban estas mutaciones (Tabla 14). Los productos de PCR se digirieron con DpnI, purificaron y transformaron en *E. coli* DH5α. Tras comprobar por secuenciación que los plásmidos pUC18-PgpdA-XlnR^{A788V}-TtrpC y pUC18-PgpdA-

XlnR^{V785F}-TtrpC contenían las mutaciones introducidas, se digirieron con KpnI y BamHI y se ligaron al plásmido p1393, previamente tratado con las mismas enzimas, para generar los plásmidos p1393-PgpdA-XlnR^{A788V}-TtrpC y p1393-PgpdA-XlnR^{V785F}-TtrpC, siguiendo la misma metodología explicada anteriormente.

2.6. Secuenciación

• Fragmentos de ADN lineales y plásmidos

La secuenciación de fragmentos de ADN lineales y de plásmidos se utilizó, de forma rutinaria, para comprobar el éxito de los clonajes y el genotipo de las cepas mutantes. Los oligonucleótidos empleados se muestran en la Tabla 14. La secuenciación fue realizada por las empresas Secugen (Capítulo 1) y MacroGen (Capítulos 3 y 4). Ambas empresas utilizaron el método Sanger.

• ADN genómico de cepas de *T. amestolkiae*

Para secuenciar el genoma completo de Tam_XlnR^{V785F}, su ADNg se extrajo como se describe en el punto 2.1, obteniéndose >200 ng de ADNg con una pureza de $A_{260}/A_{280} \sim 1,8$. La empresa Novogene realizó la secuenciación de tipo *Illumina paired-end* mediante el secuenciador Novaseq 6000 (Illumina). Novogene también se encargó de eliminar las lecturas de baja calidad y las que mantenían los adaptadores utilizando el *software* Fastp v.0.20.0 (Chen *et al.*, 2018). Como resultado, se obtuvo una biblioteca de ADN, de alta calidad (Q30 de 92,07%), compuesta por 17.434.018 lecturas limpias de 150 pb de longitud. Finalmente, el servicio de Bioinformática y Bioestadística del CIB-CSIC analizó los datos de la secuenciación para determinar el comportamiento del plásmido p1393-PgpdA-XlnR^{V785F}-TtrpC en la cepa mutante. Con este propósito, las lecturas fueron mapeadas utilizando el alineador BWA/0.7.17 (Li & Durbin, 2009) contra los *scaffolds* del genoma de *T. amestolkiae* (código de acceso GenBank ASM189636v1) y la secuencia del plásmido. El análisis se completó con los *softwares* SAMtools/1.14 (Danecek *et al.*, 2021) y R/4.3.2 (<https://www.R-project.org>).

3. Modificación genética de microorganismos y *screening* de mutantes

3.1. Transformación de *E. coli*

La transformación de *E. coli* DH5 α se llevó a cabo por choque térmico utilizando células químicamente competentes obtenidas por tratamiento con RbCl (Green & Sambrook, 2012). Una alícuota de 100 μ L de células competentes se mezcló con 10 ng de plásmido purificado o 5 μ L de mezcla de ligación. Las células se incubaron en hielo 20 min y, a continuación, se aplicó el choque térmico a 42 °C durante 45 s, seguido de una incubación en hielo de 5 min. Pasado este tiempo, se añadió a las células 1 mL de medio LB y se incubaron durante 1 h a 37 °C y 200 rpm.

Finalmente, las células se plaquearon en LB suplementado con ampicilina para seleccionar colonias transformadas, las cuales fueron analizadas por PCR de colonias. En caso de presentar el genotipo esperado, se crecieron durante la noche en medio LB para extraer sus plásmidos y secuenciarlos.

3.2. Transformación de *P. pastoris*

Las células de *P. pastoris* GS115 se transformaron por electroporación siguiendo el protocolo descrito por Invitrogen, ligeramente modificado. Para ello, 100 mL de células se cultivaron en medio YPD hasta alcanzar fase exponencial (OD_{600} de 1,3-1,5). Todas las soluciones utilizadas para la electroporación se mantuvieron a 4 °C. Las células se lavaron con 100 mL y 50 mL de agua estéril y con 5 mL de sorbitol a 1 M, hasta que al final se resuspendieron en 0,5 mL de sorbitol a 1 M. Para cada transformación se emplearon 50 μ L de células a las que se añadieron 10 μ g de ADN plasmídico, linearizado con Sall y purificado, que contenía la secuencia codificante de *xynSOS* o la de sus variantes glicosintasas. La linearización del plásmido se realizó para facilitar su integración en el genoma de la levadura. La digestión con Sall favorece que dicha integración tenga lugar en el gen *his4* nativo. La electroporación se llevó a cabo en cubetas de 0,2 cm, aplicando un pulso de 1,5 kV, 25 μ F y 200 Ω . Inmediatamente después, se añadió 1 mL de sorbitol a 1 M y las células se incubaron en un tubo estéril a 30°C, sin agitación, durante 2 h. Por último, las células se plaquearon en YNB-His para seleccionar colonias transformadas, que se evaluaron por PCR de colonias. Los transformantes se cultivaron en 20 mL de medio YEPS durante 9 días, con la adición diaria de metanol, para seleccionar aquellos que alcanzaban una mayor actividad enzimática frente a AZCL-xilano (apartado 5.1), en el caso de rXynSOS, y una mayor concentración de proteínas (apartado 4.3), para sus variantes glicosintasas rXynSOS^{E236G} y rXynSOS^{E236S} (puesto que en este caso la actividad hidrolítica no puede ser detectada).

3.3. Aislamiento de mutantes *pyr* de *T. amestolkiae* resistentes a ácido 5-fluoroorótico

La generación de mutantes de Tam_WT resistentes a ácido 5-fluoroorótico (5-FOA) se llevó a cabo en placas de MCA suplementadas con 2,5 g/L de 5-FOA (Apollo Scientific), 5 mM de uridina y 5 mM de uracilo. Las esporas de Tam_WT fueron inoculadas, con un palillo estéril abundantemente cargado, en siete puntos uniformemente distribuidos en cada placa. Dado que el palillo se empleó de forma repetida sin recargar, la concentración de esporas fue disminuyendo en cada punto, favoreciéndose la obtención de las condiciones óptimas para la aparición de sectores resistentes a 5-FOA. Se prepararon un total de 16 placas siguiendo este procedimiento, con un total de 112 puntos de inoculación, que se incubaron a 28 °C hasta la aparición de sectores.

Posteriormente, los sectores resistentes a 5-FOA fueron purificados mediante un paso selectivo en placas de MCA que contenían las mismas concentraciones de 5-FOA, uridina y uracilo. Para ello, se recogieron esporas superficiales de las colonias, con un palillo estéril, y se extendieron en líneas en nuevas placas, formando una “rueda de carro”. Para confirmar que estos mutantes tenían el fenotipo esperado, fueron crecidos en placas de MCA, con y sin la adición de uridina y uracilo. Si dichos mutantes no eran capaces de crecer en ausencia de estos dos requerimientos nutricionales, se podía concluir que presentaban auxotrofia para pirimidinas.

Con el objetivo de estudiar el genotipo de los candidatos auxótrofos *pyr⁻*, se extrajo su ADN y se amplificó por PCR los genes *pyrF* y *pyrG*, que codifican para la orotidina-5'-fosfato descarboxilasa y la orotato fosforribosiltransferasa, respectivamente, y que están implicados en la ruta de síntesis *de novo* de pirimidinas. Los fragmentos de ADN obtenidos fueron purificados y secuenciados. Finalmente, se realizaron alineamientos de estos genes *pyrF* y *pyrG* con los nativos para determinar el tipo de mutaciones adquiridas y su posición.

3.4. Transformación de *T. amestolkiae*

El mutante auxótrofo Tam_*pyrG*⁻, obtenido siguiendo el procedimiento explicado en el apartado 3.3, fue transformado como se describe para *A. nidulans* (Tilburn *et al.*, 1983), añadiendo ligeras modificaciones. Este protocolo implica la purificación de protoplastos y su transformación aplicando CaCl₂ y polietilenglicol (PEG), como se puede visualizar en la Figura 19. Las soluciones A-E necesarias se mantuvieron a 4 °C, salvo que se indique lo contrario.

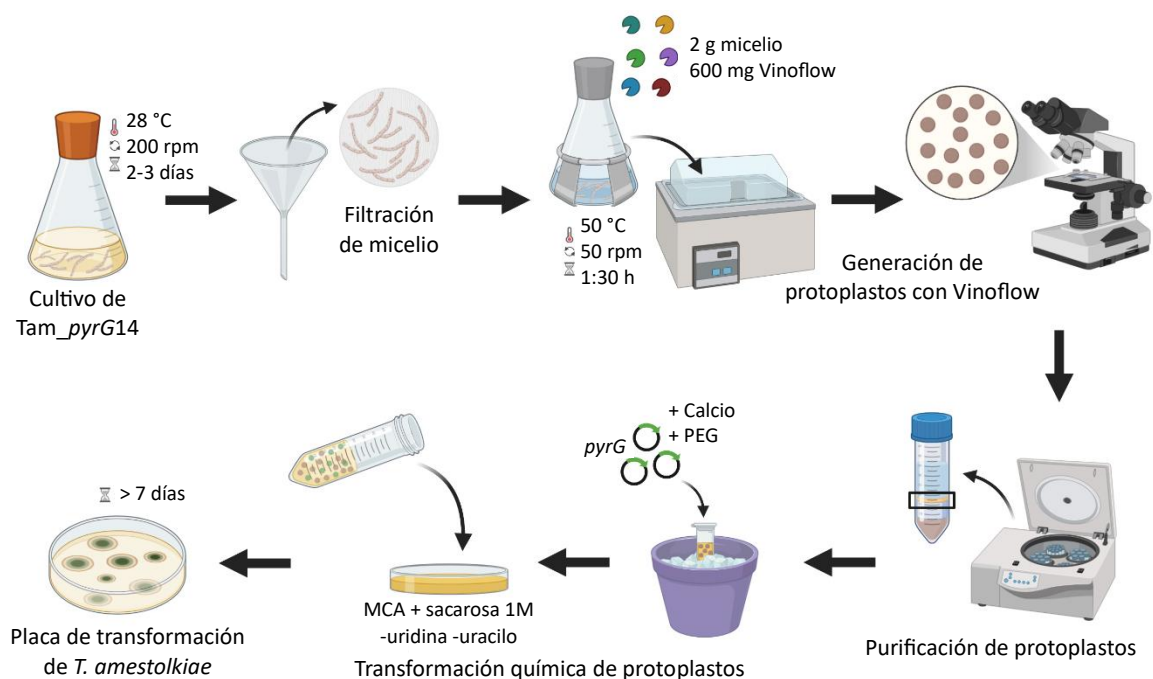


Figura 19. Esquema de la transformación genética de *T. amestolkiae*. Se adaptó el protocolo de transformación química de protoplastos desarrollado por Tilburn *et al.* (1983). En esta Tesis Doctoral se ha utilizado el auxótrofo Tam_*pyrG*⁻, por lo que el marcador de selección introducido revierte la auxotrofia para pirimidinas, no requiriendo, tras su transformación, uridina y/o uracilo para crecer.

Para generar los protoplastos, se filtraron (Miracloth, Merck) y lavaron con agua estéril 2 g de micelio, crecido durante 2 días en medio MCA líquido, suplementado con uridina y uracilo. A continuación, el micelio se resuspendió en 40 mL de solución A (1,2 M de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 7,2 mM de Na_2HPO_4 , 2,8 mM de NaH_2PO_4) y se incubó en hielo 5 min, añadiendo después 600 mg de Vinoflow FCE (Novozymes), una mezcla de enzimas para hidrolizar la pared celular. La muestra se mezcló por inversión y se dejó reposar en hielo 5 min. Después, su volumen fue dividido, a partes iguales, en dos matraces de 100 mL para su incubación en un baño a 30 °C con agitación suave durante 1:30 h, monitorizando la formación de protoplastos por microscopía óptica. Para la purificación de estos protoplastos, los 20 mL de cada matraz se repartieron equitativamente en dos tubos de 50 mL. En ambos tubos se añadieron 10 mL de solución B (0,1 M de Tris-HCl pH 7,5, 0,6 M de sorbitol), evitando mezclar las fases, y se centrifugaron a 4.400 $\times g$ y 4 °C durante 10 min (centrífuga 5810R, Eppendorf). La banda de protoplastos, formada en la interfase, se recogió con una pipeta *Pasteur* y se transfirió a un nuevo tubo, donde se añadió el doble del volumen obtenido de solución C (10 mM de Tris-HCl pH 7,5, 1 M de sorbitol). Tras mezclarse por inversión y centrifugarse en las mismas condiciones, el precipitado de protoplastos se resuspendió en 1 mL de solución C y se transfirió a un tubo de 1,5 mL, el cual se centrifugó a 5.000 $\times g$ y temperatura ambiente durante 3 min, desechando el sobrenadante y resuspendiendo el precipitado de protoplastos en 1 mL de solución C. Este proceso se repitió dos veces más. En el último paso de centrifugación, los protoplastos purificados se resuspendieron en 450 μL de solución D (10 mM de Tris-HCl pH 7,5, 1 M de sorbitol, 13,5 mM de CaCl_2).

A continuación, los protoplastos fueron transformados con los plásmidos circulares de la Tabla 15 mediante la aplicación de CaCl_2 y polietilenglicol (PEG). En el caso del plásmido p1439, se utilizaron 2,5 μg de ADN, mientras que para los plásmidos p1394, p1393 y sus derivados, se emplearon 600 ng. El procedimiento de transformación se llevó a cabo en tubos de 50 mL mezclando 50 μL de solución E (600 g/L de PEG6000, 10 mM de Tris-HCl pH 7,5, 13,5 mM de CaCl_2), 40-45 μL de solución D, los plásmidos disueltos en 5-10 μL de agua estéril y 200 μL de la suspensión de protoplastos. Se incluyó también un control de regeneración de protoplastos en el que no se añadió ADN. Los tubos se mezclaron suavemente y se incubaron 20 min en hielo. Transcurrido ese tiempo se adicionó, a cada tubo, 1 mL de solución E y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Finalmente, se añadió el volumen necesario de solución D hasta 5 mL y de medio de recuperación (MCA con sacarosa a 1 M) al 0,75% (p/v) agar hasta 20 mL, y se mezcló brevemente por inversión para que los protoplastos quedasen embebidos. El volumen de los tubos con plásmidos se repartió entre 4 placas de medio de recuperación al 1,5% (p/v) agar y sin uridina y uracilo (requerimientos nutricionales de la cepa auxótrofa) para seleccionar colonias transformadas. El control sin ADN se repartió en dos placas de medio de recuperación

selectivo (control negativo) y en dos placas con uridina y uracilo (control positivo de regeneración de protoplastos). Las placas se incubaron a 28 °C hasta al menos 7 días.

Una vez crecidas las colonias con potencial de ser transformantes (habrían complementado correctamente la auxotrofia gracias a la introducción del gen *pyrG* heterólogo), se aislaron mediante un paso selectivo en placas de MCA sin uridina ni uracilo. Para ello, se recogieron esporas superficiales de las colonias con un palillo estéril, y se extendieron en líneas en las nuevas placas, formando una “rueda de carro”. Posteriormente, se extrajo el ADN de aquellas que crecieron y se realizó una PCR, para verificar la presencia de los genes de interés contenidos en los plásmidos. En el caso de los mutantes transformados con p1393 y sus derivados, se llevó a cabo un *screening* para seleccionar el mutante con mayores actividades β -xilosidasa y endoxilanasas de cada transformación (apartado 5.1).

4. Técnicas de manipulación de proteínas

4.1. Producción de enzimas recombinantes y crudos enzimáticos

- **Producción de rXynSOS y sus variantes glicosintasas en *P. pastoris***

Los clones de *P. pastoris* que presentaban una mayor actividad endoxilanasas, en el caso de rXynSOS, o concentración de proteínas, en el de las variantes glicosintasas (en estos mutantes no se puede detectar actividad endoxilanasas), fueron crecidos en matraces de 1 L con 200 mL de medio YEPS durante 7 días, añadiendo diariamente metanol a los cultivos. Para monitorizar el crecimiento de la levadura, se midió cada día la DO₆₀₀. La producción de la enzima de interés se evaluó en el sobrenadante determinando la actividad endoxilanasas frente a AZCL-xilano o la concentración de proteínas extracelulares, tal y como se explica en los siguientes apartados.

- **Producción de crudos enzimáticos con *T. amestolkiae***

Los transformantes de Tam_XlnR, Tam_XlnR^{A788V}, Tam_XlnR^{V785F} y Tam_p1393 que mostraban las mayores actividades β -xilosidasa y endoxilanasas, fueron crecidos, junto con Tam_WT, en matraces de 250 mL con 50 mL de medio Mandels suplementado con 1% (p/v) de de xilano, glucosa, glicerol o bagazo de cerveza. Se cogieron, diariamente, muestras de 2 mL que se centrifugaron a 13.000 $\times g$ y 4 °C durante 10 min para obtener los crudos enzimáticos y el precipitado de biomasa. Los crudos enzimáticos se utilizaron para estudiar las actividades enzimáticas y la concentración de proteínas extracelulares, y el precipitado de micelio se usó para determinar el crecimiento de los hongos.

4.2. Purificación de enzimas recombinantes

Los cultivos de *P. pastoris*, produciendo rXynSOS o sus variantes glicosintasas, se centrifugaron durante 20 min a 10.000 $\times g$ y 4 °C (Sorvall LYNX 6000, Thermo Scientific), y el

sobrenadante se filtró, secuencialmente, utilizando una bomba de vacío y filtros de membrana de nitrocelulosa de 0,8, 0,45 y 0,22 μm (Millipore). A continuación, el sobrenadante filtrado se concentró y dializó en tampón fosfato a 10 mM, pH 6, utilizando una célula de ultrafiltración (Amicon, Millipore) con una membrana de polisulfona de 10 kDa (Millipore). rXynSOS y sus variantes glicosintasa se purificaron, en un solo paso cromatográfico, empleando un sistema de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC, Äkta). Los sobrenadantes dializados y concentrados se cargaron en una columna de intercambio aniónico QFF HiTrap de 5 mL (Cytiva), previamente equilibrada en tampón fosfato a 10 mM, pH 6, y se eluyeron a un flujo de 2 mL/min. rXynSOS y sus variantes glicosintasas no se retuvieron en la columna, eluyendo antes de la aplicación de NaCl a 1 M disuelto en tampón fosfato a 10 mM, pH 6. Finalmente, las enzimas purificadas se concentraron por ultrafiltración, usando los tubos de centrifuga Amicon Ultra - 50 mL 10 kDa (Millipore).

4.3. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas producidas por *P. pastoris*, antes y después de su purificación, y de los crudos enzimáticos de las distintas cepas de *T. amestolkiae*, fue cuantificada por el método Bradford (Bradford, 1976), usando el *Bradford Dye Reagent* (Bio-Rad). Para ello, 30 μL de las muestras se añadieron a 770 μL de agua y posteriormente se mezclaron con 200 μL de reactivo. Tras una incubación de 5 min, se midió la absorbancia a 595 nm (espectrofotómetro UV-1800, Shimadzu). Como estándar se empleó albúmina sérica bovina (BSA, Thermo Fisher Scientific).

4.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Los geles SDS-PAGE se llevaron a cabo para estimar la masa molecular y pureza de las enzimas recombinantes producidas por *P. pastoris*. También se emplearon para analizar el patrón de proteínas secretadas por las cepas mutantes y silvestre de *T. amestolkiae*. Los geles se realizaron, en todos los casos, en condiciones desnaturalizantes en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS) (Laemmli, 1970). Para ello, se utilizaron geles de poliacrilamida al 10% (v/v) y el sistema Mini Protean III Cell (Bio-Rad). No fue necesario concentrar los crudos de rXynSOS y sus variantes glicosintasas puesto que su producción en *P. pastoris* fue muy alta. Sin embargo, los crudos de *T. amestolkiae* fueron concentrados 10 veces y dializados en tampón acetato de sodio a 100 mM, pH 5, utilizando una célula de ultrafiltración de 0,5 mL (Amicon, Millipore) con una membrana de celulosa regenerada de 3 kDa (Millipore). Para poder comparar su perfil de proteínas, se usaron 14 μg (concentración de proteínas extracelulares) de cada uno de los crudos concentrados de *T. amestolkiae*.

Antes de cargarse en los geles, las muestras se mezclaron con tampón de ruptura 4x (62,5 mM de Tris-HCl pH 6,8, 2% (v/v) de SDS, 5% (v/v) de β -mercaptoetanol, 10% (v/v) de glicerol, y 0,005% (p/v) de azul de bromofenol) y se hirvieron a 98 °C durante 10 min. Las electroforesis se llevaron a cabo a temperatura ambiente y al voltaje constante de 150 V con los geles sumergidos en tampón de carrera (25 mM de Tris-HCl pH 8,8, 192 mM de glicina, 0,1% (v/v) de SDS). Finalmente, las proteínas se tiñeron con azul brillante *Coomassie Brilliant Blue R-250* (Bio-Rad), diluido al 0,1% (p/v) en una solución de 40% (v/v) de metanol y 10% (v/v) de ácido acético, y se destiñeron en agua. Como estándar se utilizó el marcador de masa molecular de proteínas *Precision Plus Protein™ Dual Color Standard* (Bio-Rad).

4.5. Isoelectroenfoque

El punto isoelectrico (pI) de rXynSOS se determinó por isoelectroenfoque, usando el mismo equipo y protocolo que la electroforesis SDS-PAGE. En este caso se preparó un gel de poliacrilamida al 5% (v/v), con anfolitos de pH 3-10 (GE Healthcare). Los tampones de cátodo y ánodo fueron 50 mM de NaOH y 7 mM de H_3PO_4 , respectivamente. A cada pocillo del gel se añadieron 10 μ L de una solución de 1 g/L de azul de bromofenol disuelto en glicerol al 50% (v/v). La muestra, compuesta por 4,5 μ g de rXynSOS, se mezcló en una proporción 1:1 con glicerol al 50% (v/v) en un volumen final de 20 μ L y se cargó en los pocillos. La separación de proteínas se llevó a cabo en tres etapas: 100 V 1 h, 250 V 1 h y 500 V 30 min. Finalizado el proceso, se midió el gradiente de pH generado al migrar los anfolitos en el gel, utilizando un electrodo de superficie (Crison), y se obtuvo una recta de calibrado. Después, se llevó a cabo un lavado del gel con una solución de metanol al 28% (v/v) y ácido acético al 9% (v/v) y, seguidamente, se tiñó con *Coomassie Brilliant Blue R-250* (Bio-Rad) diluido al 0,005% (p/v) con la misma solución. Tras desteñir el gel en agua, el pI de la banda teñida se calculó por interpolación sobre la recta de calibrado del gradiente de pH.

4.6. Zimogramas para actividades enzimáticas

Esta técnica electroforética permite analizar actividades enzimáticas en gel. Los zimogramas para actividad endoxilanasas se llevaron a cabo con geles SDS-PAGE, renaturalizando después las proteínas. Para ello se añadió 0,2% (p/v) de xilano a geles de poliacrilamida al 10% (v/v), y se cargaron 1,5 μ g de proteínas extracelulares de los crudos concentrados de *T. amestolkiae*. Tras la electroforesis, los geles se lavaron en una solución de Triton X-100 al 5% (v/v) durante 1 h, para eliminar el SDS, y se incubaron en agua durante 30 min a 30 °C, para establecer unas condiciones en las que las endoxilanasas fueran activas. Posteriormente, el xilano presente en los geles se tiñó mediante incubación con 0,1 % (p/v) de Rojo Congo (Sigma-Aldrich) durante 30 min, seguida de lavados con 1 M de NaCl hasta hacer visibles las bandas de

actividad, correspondientes a las zonas donde el xilano fue degradado. Finalmente, los geles se sumergieron en ácido acético al 5% (v/v) para oscurecer el fondo y visualizar mejor las bandas.

Los zimogramas para actividad β -xilosidasa, se realizaron a partir de geles de isoelectroenfoque de poliacrilamida al 5% (v/v) con anfólitos de pH 3–10 (GE Healthcare), y utilizando 1 M de H_3PO_4 y 1 M de NaOH como tampón de ánodo y cátodo, respectivamente. Se cargó 1 μg de proteínas extracelulares para cada crudo concentrado de *T. amestolkiae*. Como se explicó anteriormente, el gradiente de pH se midió directamente en los geles con un electrodo de contacto (Crison). La actividad β -xilosidasa se detectó incubando los geles con 2 mM de *p*-metilumbeliferil- β -D-xilopiranosido (Sigma-Aldrich) durante 10 min a 30 °C, lavándolos con agua y visualizando la fluorescencia del fluoróforo liberado, bajo luz UV, con un transiluminador Gel Doc XR (Bio-Rad).

4.7. Determinación de masa molecular exacta

La masa molecular exacta de rXynSOS se determinó por MALDI-TOF/TOF. MALDI son las siglas en inglés de *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (desorción/ionización láser asistida por matriz) y TOF hace referencia al detector de iones que se acopla al MALDI y cuyo nombre corresponde a *Time-Of-Flight*. Los espectros se obtuvieron con un instrumento Autoflex III (Bruker Daltonics), equipado con un láser Smartbeam y calibrado con BSA (Merck), cubriendo el rango de 20 a 70 kDa. La muestra se preparó diluyendo 2 μl de rXynSOS en 2 μl de ácido trifluoroacético al 2% (v/v) y en 2 μl de solución de matriz, la cual contenía 7,6 mg de 2,5-dihidroxiacetofenona disueltos en 375 μl de etanol y 125 μl de citrato de hidrógeno diamónico a 80 mM. 1 μl de esta mezcla se inyectó en un soporte AnchorChip de 800 μm (Bruker-Daltonics) y se dejó secar a temperatura ambiente. Los espectros se adquirieron utilizando una potencia de láser justo por encima del umbral de ionización y se analizaron en los modos de detección de iones positivos y de extracción retardada en modo lineal. Se sumaron 1.000 disparos de láser en un único espectro de masas. Este estudio fue realizado por el servicio de Proteómica y Genómica del CIB-CSIC.

4.8. Análisis del estado oligomérico

Para determinar si rXynSOS era una enzima monomérica o multimérica se utilizó cromatografía de exclusión molecular. Con esta técnica las proteínas se separan en base a su tamaño molecular a través de las esferas porosas que constituyen la matriz de la columna, eluyendo primero las proteínas de mayor tamaño. Se empleó la columna Superdex 75 10/300 GL (Cytiva), previamente calibrada con un marcador de proteínas estándar (Cytiva) compuesto por quimotripsinógeno A (19,5 kDa), ovoalbúmina (48,2 kDa), BSA (73,5 kDa), aldolasa (170 kDa) y ferritina (460 kDa). La columna se equilibró con un tampón fosfato a 10 mM, pH 6, que contenía

100 mM de NaCl, y el flujo aplicado para analizar la muestra fue de 0,5 mL/min. Se midió la actividad endoxilanasas frente a AZCL-xilano y la concentración de proteínas en todos los picos detectados a 280 nm para localizar la enzima.

5. Experimentos de actividades enzimáticas

5.1. Cuantificación de actividades hidrolíticas

La actividad β -xilosidasa de los crudos enzimáticos se ensayó utilizando 0,1% (p/v) de *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranosido (*p*NPX, Merck) en tampón acetato sódico a 50 mM, pH 5. Se probaron distintas diluciones de las enzimas y crudos para asegurar la linealidad del ensayo. Las reacciones (200 μ L) se incubaron en termobloques (TS-100 thermo-shaker, Biosan), durante 10 min a 50 °C y 1.200 rpm, y se detuvieron añadiendo 500 μ L de 2% (p/v) de Na₂CO₃. Por último, se midió la absorbancia del *p*-nitrofenol (*p*NP) liberado a 410 nm ($\epsilon_{410} = 15200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) con un espectrofotómetro (modelo UV-1800, Shimadzu) y, con la ley de Lambert-Beer (Ecuación 1), se convirtió en concentración de la/s enzima/s. A partir de este valor se calcularon las unidades de actividad enzimática. Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima/s capaz de liberar 1 μ mol de *p*NP por minuto.

Ecuación 1: Ley de Lambert-Beer aplicada para calcular las actividades enzimáticas en las que se emplean sustratos que contienen *p*NP.

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

A: absorbancia medida por el espectrofotómetro (UA)
 ϵ : coeficiente de extinción molar ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
l: longitud del paso óptico (cm)
c: concentración de la/s enzimas/s en la solución (M)

La actividad endoxilanasas se calculó utilizando como sustrato 3% (p/v) de xilano de haya (Megazyme) disuelto en tampón acetato sódico a 50 mM, pH 5. Las reacciones de hidrólisis se realizaron en 500 μ L con la dilución adecuada de las enzimas o crudos. Tras su incubación a 50 °C y 1.200 rpm durante 10 min, las reacciones se detuvieron calentando 5 min a 100 °C. Después de centrifugar 5 min a 20.000 $\times g$ y temperatura ambiente, se midió la liberación de azúcares reductores mediante el método de Somogyi-Nelson (Somogyi, 1945). Para ello, se mezclaron 200 μ L del sobrenadante de las reacciones con 200 μ L de reactivo Somogyi (Tabla 16), y se incubaron durante 17 min en un baño a 100 °C. Tras la incubación, las muestras se enfriaron, se les añadió 200 μ L de reactivo Nelson (Tabla 17) y 2,4 mL de agua y se mezclaron. Por último, se midió la absorbancia a 540 nm y se determinó la actividad utilizando una recta patrón de xilosa. Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima/s capaz de liberar 1 μ mol de azúcares reductores por minuto.

Tabla 16. Composición del reactivo Somogyi para el método Somogyi-Nelson

Solución Somogyi I	
Na ₂ SO ₄	180 g/L
KNaC ₄ H ₄ O ₆ ·4H ₂ O	15 g/L
Na ₂ CO ₃	30 g/L
NaHCO ₃	20 g/L
Solución Somogyi II	
Na ₂ SO ₄	180 g/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	20 g/L

*Para preparar el reactivo Somogyi se mezclan la Solución I y la Solución II en una proporción 4:1.

Tabla 17. Composición del reactivo Nelson para el método Somogyi-Nelson

Solución Nelson I	
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	50 g/L
98% (v/v) de H ₂ SO ₄	42 mL/L
12% (p/v) de Na ₂ HAsO ₄ ·7H ₂ O	50 mL/L
Solución Nelson II	
98% (v/v) de H ₂ SO ₄	0,75 M

*Para preparar el reactivo Nelson se mezclan la Solución I y la Solución II en una proporción 1:2.

En el caso de los *screenings* para seleccionar los transformantes de GS115_XynSOS, Tam_XlnR, Tam_XlnR^{A788V}, Tam_XlnR^{V785F} y Tam_p1393 con mejor rendimiento y algunos experimentos con rXynSOS, la actividad endoxilanasas se determinó utilizando el sustrato comercial AZCL-xilano de haya (Megazyme), compuesto por xilano de madera de haya entrecruzado con un colorante de tipo azo (*Azurine-Cross-Linked*). Las reacciones (200 µL) se llevaron a cabo con 1% (p/v) de AZCL-xilano, disuelto en tampón acetato sódico a 50 mM, pH 5, y la dilución adecuada de los crudos enzimáticos. Estas reacciones se incubaron a 50 °C y 1.200 rpm durante 10 min, se detuvieron añadiendo 500 µL de tampón Tris al 4% (p/v), pH 10, y se centrifugaron 5 min a 20.000 ×g y temperatura ambiente (centrífuga 5424, Eppendorf) para eliminar el AZCL-xilano. La absorbancia de los sobrenadantes que contenían los AZCL-xilooligosacáridos se midió en un espectrofotómetro a 590 nm (UV-1800, Shimadzu). El fundamento de este método se basa en la insolubilidad del AZCL-xilano, el cual al ser hidrolizado por endoxilanasas, libera AZCL-xilooligosacáridos. Estos productos de reacción sí son solubles, por lo que tras la centrifugación se mantienen en el sobrenadante, dándole un color que puede valorarse espectrofotométricamente.

5.2. Perfiles de temperatura y pH

La influencia de la temperatura y el pH en la actividad de rXynSOS se analizó con reacciones standard frente a AZCL-xilano, introduciendo ligeras modificaciones. Para la temperatura óptima se usó tampón acetato sódico a 50 mM, pH 5, y temperaturas que variaban desde 30 a 80 °C, mientras que el pH óptimo se determinó en un rango de 2,2 y 7 a 50 °C.

La termoestabilidad de rXynSOS se estudió incubando la enzima en tampón acetato sódico a 50 mM, pH 5 durante 72 h a temperaturas entre 30 y 80 °C. La estabilidad a distintos pH, de 2,2 a 9, se llevó a cabo incubando la endoxilanasas durante 72 h a 4 °C. Tras la incubación, se determinó la actividad endoxilanasas residual con AZCL-xilano, asignando un valor de 100% a la actividad inicial.

Para cubrir todo el rango de pH se emplearon distintos tampones: 50 mM de glicina-HCl (pH 2,2-3), formato sódico (pH 3-4), acetato sódico (pH 4-5,5), histidina-HCl (pH 5,5-7) y Tris-HCl (pH 8-9). En todos los casos, las reacciones se realizaron por triplicado y añadiendo 0,1% (p/v) de BSA, con el objetivo de evitar la posible pérdida de actividad que se puede experimentar cuando se trabaja con concentraciones bajas de enzima (Nieto-Domínguez *et al.*, 2015).

5.3. Estudio de módulos de unión a carbohidratos

Con el fin de evaluar la funcionalidad del módulo de unión a carbohidratos de rXynSOS, perteneciente a la familia CBM1, se estudió la capacidad de esta enzima para unirse a celulosa. Para ello, la endoxilanasas se incubó, por triplicado, con un 1% (p/v) de celulosa microcristalina (avicel, Merck) y un 0,1% (p/v) de BSA a 4 °C y 1.200 rpm. Pasados 10 min, 1 h y 2 h, se tomaron muestras que se centrifugaron durante 5 min a temperatura ambiente y 20.000 ×g, para precipitar el avicel. Los sobrenadantes obtenidos se usaron para determinar la actividad endoxilanasas frente a AZCL-xilano. La hipótesis planteada en este experimento fue que, si el dominio CBM1 era funcional, la enzima se uniría a la celulosa, provocando una disminución de la actividad detectada en el sobrenadante. Para calcular dicha disminución, se utilizó como control una reacción sin avicel, cuya actividad se consideró como el 100 %.

5.4. Especificidad de sustrato y cinéticas

La actividad de la endoxilanasas rXynSOS se ensayó, por triplicado, frente a diferentes sustratos, añadiendo a las reacciones 0,1% (p/v) de BSA. Para los sustratos que contienen *p*NP, las reacciones se llevaron a cabo usando 0,1% (p/v) de 4-nitrofenil-β-D-xilobiósido (*p*NPX₂, Megazyme), *p*NPX, 4-nitrofenil-β-D-celobiósido (*p*NPG₂, Merck) y *p*-nitrofenil-β-D-glucopiranosido (*p*NPG, Merck), tal y como se ha descrito anteriormente para la medida de actividad β-xilosidasa (apartado 5.1). Para los demás sustratos, las reacciones se prepararon con 0,8% (p/v) de xilano de haya, arabinoxilano de trigo (Megazyme), carboximetilcelulosa de baja viscosidad (CMC, Merck) y avicel, siguiendo la metodología explicada para la actividad endoxilanasas (apartado 5.1), que implica determinar la concentración de azúcares reductores liberados mediante el protocolo de Somogyi-Nelson (Somogyi, 1945). En el caso de la CMC y el avicel, la recta patrón utilizada fue de glucosa, en vez de xilosa.

Las cinéticas de reacción de la enzima rXynSOS se determinaron para varios sustratos. Entre los parámetros estudiados se encuentran: la velocidad máxima de la reacción ($V_{m\acute{a}x}$), la constante de Michaelis-Menten (K_m), que representa la concentración de sustrato a la cual la velocidad de la reacción es la mitad de $V_{m\acute{a}x}$, la constante catalítica o número de recambio (k_{cat}) y la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m). Estos parámetros cinéticos se calcularon aplicando la ecuación de Michaelis-Menten (Ecuación 2), para lo cual es necesario disponer de datos experimentales de velocidad inicial (v_0) para diferentes concentraciones de sustrato ($[S]$), y ajustarlos mediante regresión no lineal o de mínimos cuadrados. Los sustratos y el rango de concentraciones empleados fueron: xilano (0,06–8 g/L), arabinoxilano de trigo (0,12–12 g/L), CMC (4–64 g/L) y p NPX₂ (0,025–2,5 mM). El ajuste de la ecuación de Michaelis-Menten y el cálculo de las constantes cinéticas se llevaron a cabo usando el *software* estadístico SigmaPlot (v11.0, Stat-Ease Inc. MN).

Ecuación 2: Ecuación de Michaelis-Menten (1), constante catalítica (2) y eficiencia catalítica (3) aplicadas para estudiar las cinéticas de rXynSOS con varios sustratos.

$$v_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (1) \quad k_{cat} = \frac{V_{m\acute{a}x}}{[E]} \quad (2) \quad \text{Eficiencia catalítica} = \frac{k_{cat}}{K_m} \quad (3)$$

v_0 : velocidad inicial de la reacción
 $[S]$: concentración de sustrato
 $V_{m\acute{a}x}$: velocidad máxima de la reacción

K_m : constante de Michaelis-Menten
 $[E]$: concentración de enzima pura
 k_{cat} : constante catalítica

5.5. Producción de xilooligosacáridos por hidrólisis de xilano

Las reacciones de hidrólisis (2 mL) para producir xilooligosacáridos (XOS) contenían 20 g/L de xilano de haya y 0,5 o 1 U/mL de rXynSOS en tampón acetato sódico a 50 mM, pH 5. La mezcla de reacción y su control sin enzima se prepararon en duplicado y se incubaron a 50 °C y 600 rpm durante 20 h. Se cogieron muestras a distintos tiempos y se mezclaron con etanol puro (hasta 70%, v/v) para inactivar la enzima y precipitar el xilano restante antes de su análisis por HPLC.

5.6. Ensayos de transglicosilación

La capacidad de transglicosilación de rXynSOS y sus variantes glicosintasas se evaluó mediante reacciones con diferentes donadores y aceptores. La lista de aceptores adquiridos en Merck incluyó alcohol vainillínico, alcohol 2-hidroxibencílico, hidroquinona, ácido gálico y ácido rosmarínico. Por su parte, el galato de epigallocatequina (EGCG), floretina, pterostilbeno y resveratrol fueron proporcionados por el Prof. Francisco J. Plou, del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica (ICP-CSIC).

Para las reacciones con rXynSOS nativa, se utilizó 0,1% (p/v) de p NPX₂ como donador de xilobiosa, 4,6 mg/L de la enzima y 20 mM de los distintos aceptores, excepto el resveratrol que

se añadió a 10 mM. Además, se probaron 0,1% (p/v) de *p*NPX y *p*NPG₂ como donadores de xilosa y celobiosa, respectivamente, con 0,46 g/L del catalizador, al igual que 0,1% (p/v) de *p*NPG como donador de glucosa, con 4,6 g/L de enzima. Todas estas reacciones (100 µL) se ajustaron a pH 5 con tampón acetato sódico 50 mM, se incubaron a 50 °C y 1.200 rpm durante 1 h y se detuvieron calentando durante 5 min a 95 °C.

Para las variantes glicosintasa *rXynSOS*^{E236G} y *rXynSOS*^{E236S}, se empleó 20 mM de xilobiosa-flúor (X₂F) como donador de xilobiosa, 4 g/L de las enzimas y 20 mM de los aceptores en tampón acetato sódico a 50 mM pH 5. La X₂F contenía el átomo de flúor en posición α en el carbono 1 del carbohidrato y fue sintetizado por el Dr. Andrés González Santana, actualmente en el Instituto de Productos Naturales y Agrobiología (IPNA-CSIC), siguiendo la metodología descrita en la literatura (Faijes *et al.*, 2006). Las reacciones (100 µL) se incubaron durante 16 h a 25 °C y 1.000 rpm. En el caso de la glicosilación del resveratrol catalizada por *rXynSOS*^{E236G}, se utilizó una concentración de 10 mM de resveratrol, disuelto en acetonitrilo al 20% (v/v), con la misma concentración de X₂F y el tampón que para los otros aceptores. Previamente se probaron otros solventes como la acetona, etanol, metanol, DMSO y dimetilformamida (DMF), así como distintos porcentajes de los mismos (10-50%, v/v).

5.7. Síntesis de xilooligosacáridos por oligomerización de xilobiosa

Las reacciones de síntesis de XOS (100 µL) contenían 20 mM de X₂F y 4 g/L de *rXynSOS*^{E236G} en tampón acetato sódico a 50 mM, pH 5. Se utilizó como control negativo la misma reacción sin *rXynSOS*^{E236G}. El tiempo de reacción fue de 16 h a 25 °C y 500 rpm. También se estudió el uso de 20 mM de xilosa-flúor (XF), glucosa-flúor (GF) y celobiosa-flúor (G₂F) como donadores de xilosa, glucosa y celobiosa, respectivamente. Todos estos donadores de azúcar fluorados se sintetizaron como se ha explicado en el apartado anterior.

5.8. Ensayos de sacarificación

La eficacia de los crudos enzimáticos de Tam_XlnR^{V785F} y Tam_WT se comparó realizando sacarificaciones de xilano de haya (Megazyme). Para obtener los crudos, ambas cepas se cultivaron en medio Mandels, suplementado con 1% (p/v) de xilano, glucosa, glicerol o bagazo de cerveza. El día en el que la actividad endoxilanasas y/o β-xylosidasas fue máxima, los cultivos se centrifugaron durante 10 min a 7.000 ×g y 4 °C, y los sobrenadantes se filtraron secuencialmente con una bomba de vacío a través de filtros de membrana de nitrocelulosa de 0,8, 0,45 y 0,22 µm (Millipore).

Las reacciones de sacarificación se realizaron, por triplicado, en tubos Eppendorf de 2 mL. Cada reacción contenía 450 µL de crudo enzimático mezclados con 5% (p/v) de xilano y tampón acetato sódico a 50 mM, pH 5, hasta el volumen final de 1 mL. Las reacciones se incubaron a 50

°C y 1.200 rpm durante 24 h, tomando muestras a distintos tiempos (30 min, 1:30 h, 2:30 h, 3:30 h, 4:30 h, 6 h, 8 h y 24 h). Estas muestras se centrifugaron y la xilosa liberada se cuantificó utilizando el *D-Xylose Assay Kit* (Megazyme), siguiendo las especificaciones del fabricante. El fundamento de este *kit* se basa en la oxidación de D-xilosa a ácido xilónico por la xilosa deshidrogenasa. En esta reacción, el NAD⁺ proporcionado se reduce a NADH, cuya concentración se puede determinar espectrofotométricamente a 340 nm y es proporcional a la concentración de D-xilosa de la muestra. Brevemente, se mezclaron 100 µL de tampón pH 7,5, 100 µL de una solución que contiene NAD⁺ y ATP, 500 µL de agua y 25 µL de distintas diluciones de la muestra (para asegurar los 2-100 µg de D-xilosa necesarios para la linealidad del ensayo). Tras una incubación de 5 min a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 340 nm (espectrofotómetro UV-1800, Shimadzu). Para iniciar la reacción se añadieron 12,5 µL de la solución con xilosa deshidrogenasa, se incubó 6 min y se volvió a medir la absorbancia a 340 nm. La concentración de D-xilosa se calculó aplicando la ley de Lambert-Beer con $\epsilon_{340} = 6300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ y el cambio en las absorbancias registradas.

6. Técnicas para el análisis de glicósidos y xilooligosacáridos

6.1. Detección y cuantificación de glicósidos y xilooligosacáridos

- **Cromatografía en capa fina (TLC)**

La primera técnica empleada para evaluar la síntesis de glicósidos y XOS fue la TLC en placas de sílice (G/UV254, Macherey-Nagel), las cuales actúan como fase estacionaria. Las fases móviles utilizadas fueron acetato de etilo:metanol:agua (10:2:1, v/v) en el caso de los glicósidos, y butanol:ácido acético:agua (3:1:1, v/v) para los XOS. Se cargaron en las placas 2 µL de las distintas reacciones enzimáticas de rXynSOS y sus variantes glicosintasas, previamente centrifugadas. Después, la parte inferior de las placas, en la que se habían cargado las muestras, se sumergió en la fase móvil para que comenzase la migración de los sustratos y productos de reacción por capilaridad. El revelado de las placas se llevó a cabo de dos formas distintas. En la primera, las placas se visualizaron bajo luz UV (254 nm) para detectar compuestos fenólicos. En la segunda, las placas se sumergieron en una solución de ácido sulfúrico al 5% (v/v) en metanol, seguida de una incubación de 12 min a 100 °C, para que todos los compuestos carbonizaran y se pudiesen examinar como manchas de distintos colores.

- **Espectrometría de masas de tipo ionización por *electrospray* (ESI-MS)**

Para confirmar la presencia de los productos glicosilados y los XOS, se realizaron análisis de ESI-MS de las reacciones correspondientes. Para ello se empleó una trampa iónica (HCT Ultra, Bruker Daltonics), y metanol como fase ionizante en los modos reflector positivo y negativo. Las mezclas de reacción se centrifugaron y 10 µL de los sobrenadantes se diluyeron en metanol, para

ser inyectadas en el equipo. Los datos obtenidos se procesaron con los *softwares* Masshunter Data Acquisition B.05.01 y Masshunter Qualitative Analysis B.07.00 (Agilent). En la mayoría de los casos, los productos se detectaron en el modo positivo como aductos de sodio de las moléculas, mientras que el resveratrol sin glicosilar fue observado, en el modo negativo, como aducto de hidrógeno. Estos estudios fueron llevados a cabo por la Unidad de Espectrometría de Masas de la UCM.

- **Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)**

La producción y el porcentaje de conversión de los glicósidos obtenidos con rXynSOS y su variante glicosintasa rXynSOS^{E236G} se determinaron por HPLC en un instrumento LC (Serie 1200, Agilent Technologies), equipado con una columna de interacción hidrofóbica y fase reversa ZORBAX Eclipse plus C18 (Agilent). Las muestras se centrifugaron y filtraron a través de filtros de jeringa PTFE de 0,22 µm (Agilent) antes de su inyección en el sistema. Por su parte, la columna se equilibró en una mezcla de acetonitrilo y agua con 0,1% (v/v) de ácido acético, en distintas proporciones según el aceptor utilizado y a un flujo de 2 mL/min. Los productos de reacción se separaron isocráticamente en 8 min empleando las proporciones acetonitrilo:agua de 9:91 para el alcohol vainillínico, 10:90 para el alcohol 2-hidroxibencílico, 6:94 para la hidroquinona y el ácido gálico, 13:87 para el EGCG, 20:80 para el ácido rosmarínico, 33:67 para la floretina, 50:50 para el pterostilbeno y 27:73 para el resveratrol. Tras la elución, la columna se limpió con 95:5 de acetonitrilo:agua (5 min) y el sistema se reequilibró con las condiciones iniciales (3 min). Los productos se identificaron con el detector de matriz de diodo (DAD), monitoreando la absorbancia a 270 nm, y se cuantificaron interpolando las áreas de los picos con las curvas de calibrado de los aceptores no glicosilados.

En el caso de los XOS, liberados por rXynSOS al hidrolizar xilano, estos se detectaron utilizando la columna Aminex HPX-42C (Bio-Rad) y como fase móvil agua a un flujo de 0,5 mL/min. La columna se calentó a 85 °C, la duración de cada carrera fue de 30 min, y el volumen de muestras (previamente centrifugadas y filtradas) que se inyectó fue de 10 µL. Los productos se detectaron con el detector de índice de refracción (RID) a 55 °C, y se cuantificaron comparando las áreas de los picos con las curvas de calibrado de la xilosa (Merck), xilobiosa (Tokyo Chemical Industry), xilotriosa, xilotetraosa y xilopentaosa (Megazyme).

6.2. Identificación de glicósidos por resonancia magnética nuclear

Algunos glicósidos sintetizados por la variante glicosintasa rXynSOS^{E236G} fueron estudiados con más profundidad por resonancia magnética molecular (RMN). Para ello, los glicósidos mayoritarios del alcohol vainillínico, floretina, ácido rosmarínico y resveratrol se purificaron por HPLC, siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior y recogiendo el volumen de elución

correspondiente a los picos de dichos glicósidos. Posteriormente, los glicósidos purificados se liofilizaron y se resuspendieron en agua deuterada a una concentración de 1,5-3 mM. Las muestras de los aceptores sin glicosilar, X₂F y xilobiosa, se prepararon de la misma forma, disolviendo los compuestos en agua deuterada a esa concentración.

Los espectros de RMN se adquirieron a 298 K usando el espectrómetro Bruker AVIII 600 MHz (Bruker Daltonics). Se llevaron a cabo experimentos monodimensionales de protón 1D-¹H, bidimensionales (2D)-homonucleares (¹H-¹H) de correlación dipolar, ROESY (*Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy*) con 300 ms de tiempo de mezcla y de correlación escalar, TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*) con 20 y 70 ms de tiempo de mezcla, y 2D-heteronucleares ¹H-¹³C HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) y HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) para asignar las señales de RMN. En el caso de los glicósidos de resveratrol, se realizaron también experimentos DOSY (*Diffusion Ordered Spectroscopy*), los cuales permiten medir coeficientes de difusión translacional (D) que son dependientes a su vez del tamaño molecular (Groves et al., 2004). Para todos estos espectros se emplearon las secuencias estándar zg (1D-¹H), zgpr (1D-¹H con supresión de agua por presaturación), hsqcedetgp (HSQC), hmbcgpndqf (HMBC), ledbpgp2s (DOSY), roesyphpr (ROESY), y dipsi2phpr (TOCSY), incluidas en el *software* TOPSPIN (Bruker Daltonics). Para determinar los desplazamientos químicos se utilizó como referencia la señal del agua residual, la cual se fijó en 4,77 ppm a 298 K (Gottlieb et al., 1997). En cuanto a los experimentos DOSY, se adquirieron espectros pseudo 2D con 16 intensidades de gradiente de campo diferentes, aumentando linealmente del 2% al 98% % de la intensidad máxima con un tiempo de duración del pulso de gradiente de 1400 μ s (δ , p30) y dejando un tiempo de difusión traslacional entre los pulsos de gradiente de 140 ms (Δ , d20). Estos análisis fueron realizados por el grupo RMN y reconocimiento molecular del CIB-CSIC, liderado por el Prof. Francisco Javier Cañada.

6.3. Estudio de la regioselectividad de rXynSOS^{E236G}

Para analizar la regioselectividad de rXynSOS^{E236G} en la síntesis de XOS, la reacción se monitorizó directamente por RMN mediante la adquisición de series de espectros 1D-¹H. Las mezclas de reacción (200 μ L), que contenían 4 g/L de XynSOS^{E236G} y 20 mM de X₂F en tampón acetato de sodio a 50 mM, pH 5, se prepararon directamente en un tubo de RMN (3 mm de diámetro). El tubo se introdujo en la sonda del espectrómetro RMN termostatzada a 25 °C. El progreso de la reacción se siguió a tiempo real adquiriendo espectros a distintos tiempos de reacción (5 min, 1 h, 3 h y 8 h tras la adición de X₂F). Los espectros de la reacción de síntesis de XOS se compararon con el espectro de la β -(1,4)-D-xilotetraosa comercial (Megazyme).

6.4. Optimización de la síntesis del 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol

Las condiciones de reacción para la síntesis del xilobiósido de resveratrol mayoritario (3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol), producido por la glicosintasa rXynSOS^{E236G}, se optimizaron aplicando la metodología de superficie de respuesta (RSM, por sus siglas en inglés) con una matriz de experimentos Box-Behnken (Candiotti *et al.*, 2014). Para ello, se utilizó el software Design-Expert® (v10.0.1.0, Stat-Ease Inc., MN), el cual permite, siguiendo esta metodología, desarrollar modelos multiparamétricos capaces de describir y predecir cómo las variables experimentales influyen en el comportamiento del proceso, facilitando así la identificación de las condiciones óptimas de operación. Las variables y rangos empleados fueron: concentración de X₂F (5-30 mM), concentración de resveratrol (2-10 mM), concentración de enzima (0,5-4 g/L) y tiempo de reacción (30 min-5 h). El resto de los parámetros: pH, temperatura y porcentaje de acetonitrilo, se fijaron en pH 5, 25 °C y 20% (v/v), respectivamente. Gracias a esta aproximación, los parámetros a optimizar se pudieron estudiar a tres niveles, bajo, medio y alto (-1, 0, +1), para inferir su valor óptimo utilizando un número reducido de experimentos. Después de realizar las reacciones sugeridas por el modelo multiparamétrico, estas se analizaron por HPLC, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.1, para calcular la producción y el porcentaje de conversión del 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol. Con estos datos experimentales el *software* generó ecuaciones polinomiales cuadráticas que mostraban el efecto de cada una de estas variables independientes sobre la respuesta del proceso, así como la mayor producción y porcentaje de conversión esperados. Los modelos desarrollados para la glicosilación del resveratrol se validaron realizando las reacciones predichas para alcanzar la máxima producción y porcentaje de conversión.

6.5. Ensayo de solubilidad del 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol

Para comparar la solubilidad del 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol, con respecto al resveratrol no glicosilado, se prepararon soluciones acuosas saturadas de estos compuestos en agua y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente y 1.000 rpm. Seguidamente, las soluciones se centrifugaron, filtraron y analizaron por HPLC, como se explicó en el apartado 6.1, para determinar la concentración de los compuestos disueltos en los sobrenadantes. Cuando fue necesario, las soluciones saturadas se diluyeron en agua para ajustar la concentración a la curva de calibrado del resveratrol no glicosilado.

6.6. Ensayo de actividad antioxidante del 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol

El método de la sal diamónica del ácido 2,2'-acino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), más conocida como ABTS^{•+}, se empleó para analizar la actividad antioxidante del resveratrol y su xilobiósido, utilizando ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox, Merck)

como compuesto antioxidante de referencia. El ABTS^{•+} se obtuvo incubando 3,5 mM de ABTS (Roche) con 1,22 mM de persulfato de potasio (Merck), durante 16 h a temperatura ambiente y en oscuridad, y diluyéndolo con etanol para obtener una absorbancia de ~0,7 a 734 nm. Este solvente se eligió, en lugar del agua, por la extremadamente baja solubilidad acuosa del resveratrol y la mínima interferencia del etanol con el ensayo. También se prepararon soluciones en etanol de concentraciones crecientes de Trolox (7,8-1000 µM), resveratrol (3,9-3000 µM) y 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol (3,9-3000 µM). El ensayo se realizó, por triplicado, en placas de 96 pocillos mezclando 10 µL de cada antioxidante con 115 µL de ABTS^{•+}. La reducción en la absorbancia del ABTS^{•+} se monitorizó con un lector de microplacas (SpectraMax® M2, Molecular Devices) durante 15 min, midiendo a 734 nm cada minuto. A partir de los datos obtenidos se aplicó la Ecuación 3 para representar la reducción de la absorbancia del ABTS^{•+}.

Ecuación 3. Fórmula para calcular la reducción de la absorbancia del ABTS^{•+}

$$\text{Reducción del ABTS}^{\bullet+} (\%) = \left(\frac{\text{Abs}_{\text{inicial}} - \text{Abs}_{\text{antioxidante}}}{\text{Abs}_{\text{inicial}}} \right) \times 100$$

Finalmente, se representaron las curvas de reducción del ABTS^{•+} (%) para calcular la EC₅₀ (µM) de cada compuesto. La EC₅₀ determina la concentración de antioxidante necesaria para reducir la absorbancia inicial del ABTS^{•+} un 50%. Adicionalmente, se calculó la capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC, por sus siglas en inglés), que se relaciona con la concentración de antioxidante (µM) que reduce la absorbancia del ABTS^{•+} en la misma proporción que 1 µM de Trolox. Los valores de TEAC se calcularon utilizando la EC₅₀ del resveratrol o de su xilobiósido, y la EC₅₀ del Trolox.

6.7. Fermentaciones colónicas con el 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol

Para comprobar si el 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol era hidrolizado por la microbiota del colon humano, permitiendo la liberación del resveratrol, se realizaron fermentaciones colónicas con muestras fecales proporcionadas por dos voluntarios sanos que habían seguido una dieta normal y declararon no haber ingerido antibióticos durante al menos 3 meses antes de la recolección de las muestras. La preparación de la suspensión fecal y su posterior cultivo se llevaron a cabo bajo condiciones anóxicas en una cámara anaeróbica (Don Whitley Scientific Limited) con una atmósfera compuesta por N₂:H₂:CO₂ (80:10:10) a 37 °C. 10 g de muestras fecales se diluyeron 1/10 (p/v) en medio *Nutrient Broth* (NB, Merck), suplementado con 0,06% (p/v) de clorhidrato de L-cisteína, y se homogeneizaron en bolsas de filtro con un homogenizador de paletas. El cultivo de cepas bacterianas colónicas se inició inoculando 50 µL de las suspensiones fecales filtradas en 5 mL de medio de fermentación (*Anaerobe Basal Broth*, ABB, Oxoid), y

añadiendo 40 µL de 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol a 5 mM disuelto en agua. Los tubos se incubaron en cámaras anaeróbicas a 37 °C para simular las condiciones del colon. Se tomaron muestras a las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 h. Se prepararon dos controles para cada tiempo de fermentación: i) cultivos sin 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol ni inóculos fecales, y ii) cultivos con el xilobiósido, pero sin los inóculos.

Después de cada incubación, se cogieron 5 mL del medio de cultivo y se mezclaron con 5 mL de acetato de etilo. Las muestras se centrifugaron a 3.500 ×g y 4 °C durante 10 min. Los sobrenadantes obtenidos (la fase superior) se evaporaron en una centrífuga de vacío (SpeedVac, Thermo Scientific), se disolvieron en 250 µL de metanol y se filtraron a través de un filtro de 0,22 µm antes de su análisis por HPLC. Esta fracción contenía principalmente resveratrol libre. La fracción acuosa restante (después de eliminar la fase de acetato de etilo) se inyectó en una columna Sep-Pack C18 (Waters Corporation) para extraer el xilobiósido de resveratrol y otros metabolitos polares. Antes de cargar las muestras, la columna se limpió con 10 mL de metanol y luego se equilibró con 10 mL de agua. Los compuestos a estudiar se retuvieron en la columna y después se eluyeron con 2 mL de metanol, que finalmente se evaporó. Las muestras se reconstituyeron en 250 µL de metanol y se filtraron a través de un filtro de 0,22 µm antes de su estudio por HPLC.

La liberación de resveratrol, y la concentración del xilobiósido de resveratrol no hidrolizado, se analizaron mediante HPLC-DAD-MS, utilizando un sistema LC (Serie 1200, Agilent Technologies), equipado con detectores de fotodiodo-array y un espectrómetro de masas cuadrupolo simple en serie (6120 Quadrupole, Agilent Technologies). Las separaciones cromatográficas se realizaron en una columna Poroshell 120 EC-C18 (3 × 100 mm y 2,7 µm, Agilent Technologies), usando como fases móviles 0,5% (v/v) de ácido fórmico en agua (A) y acetonitrilo (B) con un flujo de 0,5 mL/min. Se aplicó una elución en gradiente: 0–7 min con 5–18% de fase B, 7–17 min con 18–28% de fase B, 17–22 min con 28–50% de fase B y 22–27 min con 50–90% de fase B, manteniéndose esta durante 1 min y luego volviendo a las condiciones iniciales. El volumen de muestra inyectada fue de 5 µL y las carreras se realizaron a temperatura ambiente. La cuantificación se llevó a cabo monitorizando la absorbancia a 280 nm y comparando las áreas de los picos con estándares de resveratrol y del xilobiósido de resveratrol sintetizado.

Este experimento fue realizado por el grupo Calidad, Seguridad y Bioactividad de Alimentos Vegetales del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC), liderado por el Dr. Francisco A. Tomás Barberán. Se empleó para ello un laboratorio de seguridad nivel 2, equipado para manipular muestras biológicas humanas.

7. Técnicas para la caracterización de las cepas mutantes de *T. amestolkiae*

7.1. Microscopía de fluorescencia

Para comprobar la correcta expresión del gen que codifica para la proteína roja fluorescente DsRed-Express, el mutante Tam_DsRed y Tam_WT se visualizaron en un microscopio de fluorescencia. Previamente, ambas cepas se crecieron en un portaobjetos estéril de 8 pocillos (IBIDI GmbH) con 300 µL de medio WMM, el cual contiene una concentración baja en fosfatos que evita su precipitación e interferencia con la técnica de microscopía. En cada pocillo se inocularon esporas recolectadas con un palillo de madera estéril desde una placa, y el portaobjetos se incubó a 28 °C durante 1 día.

Las imágenes *in vivo* de estas cepas fúngicas fueron capturadas a temperatura ambiente, con un microscopio invertido de epifluorescencia (DMI-6000b, Leica) controlado por el *software* Metamorph Premier (Molecular Dynamics) y equipado con la cámara ORCA-ER (Hamamatsu Photonics), el objetivo HCX 63x 1.4 (Leica), la fuente de luz eEL6000 (Leica) para la excitación y el *set* de filtros TXRED-4040B (Leica) para la detección de fluorescencia roja. Se usó una exposición de 5 ms y se tomaron imágenes multidimensionales constituidas por 13 planos a lo largo del eje Z, a partir de los cuales se realizó una máxima proyección para conseguir el mejor enfoque para cada zona. Siguiendo esta metodología, se adquirieron imágenes de contraste de interferencia diferencial (DIC) y de fluorescencia, que posteriormente se procesaron con el *software* ImageJ (Schneider *et al.*, 2012).

7.2. Cuantificación de biomasa

Para comparar el crecimiento en cultivo líquido de las cepas mutantes Tam_p1393, Tam_XlnR, Tam_XlnR^{A788V} y Tam_XlnR^{V785F} con respecto a Tam_WT, se aplicó un método basado en la extracción y estimación de ergosterol, un esterol específico de las paredes celulares de hongos. Para ello, se cogieron 2 mL de cultivo usando puntas de 5 mL cortadas y estériles con el objetivo de favorecer la homogeneidad de las muestras. Estas se centrifugaron durante 10 min a 13.000 ×g y 4 °C, y la biomasa sedimentada se liofilizó y se transfirió a tubos KIMAX de 8 mL (DWK Life Sciences). A continuación, se añadieron 200 µL de éter de petróleo (Merck) y 800 µL de KOH al 10% (p/v) disuelto en metanol. Las muestras se mezclaron lentamente y se sonicaron durante 15 min en un baño de ultrasonidos. Tras 45 min a temperatura ambiente, las muestras se incubaron a 70 °C durante 90 min. Una vez enfriadas, se añadió 0,4 g/L de colesterol (Merck) como patrón interno, junto con 200 µL de agua y 400 µL de éter de petróleo para la extracción del ergosterol y colesterol. Las muestras se mezclaron 30 s con un vórtex y se dejaron reposar hasta que las fases se separaron. La fase orgánica, que contenía éter de petróleo junto con ergosterol y colesterol, se transfirió a un tubo Eppendorf de 2 mL y se secó por evaporación a 25

°C. Esta extracción se repitió una vez más. En el último paso, las muestras extraídas se resuspendieron en 400 µL de metanol, se mezclaron y se filtraron a través de filtros de jeringa PTFE de 0,22 µm (Agilent).

La detección y cuantificación de ergosterol y colesterol se llevó a cabo por HPLC en un instrumento LC (Serie Agilent 1200, Agilent), equipado con una columna de interacción hidrofóbica y fase reversa ZORBAX Eclipse plus C18 (Agilent). Se utilizó como fase móvil una mezcla de metanol y acetonitrilo (80:20, v/v) y una velocidad de flujo de 1 mL/min. El volumen de muestra inyectado fue de 10 µL. Los picos de ergosterol y colesterol se identificaron monitoreando la absorbancia a 254 nm y 204 nm, respectivamente, en el detector DAD, y se cuantificaron comparando sus áreas con las curvas de calibrado de cada compuesto, preparadas en metanol. Finalmente, la biomasa fúngica se estimó a partir del contenido en ergosterol, empleando una curva de calibrado que relacionaba el contenido en ergosterol por gramo de biomasa liofilizada de *T. amestolkiae*.

8. Herramientas bioinformáticas para el análisis de secuencias

La secuencia de nucleótidos de *xynSOS* (código de acceso en GenBank BHQ10_009513) se obtuvo del genoma de *T. amestolkiae*, previamente secuenciado y anotado (de Eugenio *et al.*, 2017). La presencia del péptido señal en la secuencia de aminoácidos de XynSOS se examinó utilizando el servidor SignalP 5.0 (Almagro Armenteros *et al.*, 2019). Su masa molecular y punto isoeléctrico teóricos se calcularon con la herramienta ProtParam del servidor ExPASy (Gasteiger *et al.*, 2003). La predicción de sitios de *N*- y *O*-glicosilación se realizó con los servidores NetNGlyc 1.0 (Steentoft *et al.*, 2013) y NetOGlyc 4.0 (Steentoft *et al.*, 2013), respectivamente. La determinación del dominio CBM, con su asignación a la familia 1, se efectuó con el servidor dbCAN2 (Zhang *et al.*, 2018). La identificación de los residuos catalíticos de rXynSOS (E129 y E236) se llevó a cabo mediante el alineamiento de su secuencia aminoacídica con las secuencias de las endoxilasas GH10 de los hongos *Penicillium simplicissimum* (Schmidt *et al.*, 1999), *A. nidulans* (Payan *et al.*, 2004) y *Thermoascus aurantiacus* (Lo Leggio *et al.*, 2001), en las cuales el papel catalítico de estos aminoácidos había sido confirmado. Para dicho alineamiento se usó la herramienta Clustal Omega (Madeira *et al.*, 2019). El modelado y análisis de la estructura del dominio GH10 de rXynSOS se realizó con AlphaFold (Jumper *et al.*, 2021) y Chimera (Pettersen *et al.*, 2004), respectivamente. Los plásmidos y clonajes se diseñaron con el *software* Snapgene (www.snapgene.com).

Las secuencias de nucleótidos de *pyrG* (código de acceso en GenBank BHQ10_007154) y *pyrF* (código de acceso en GenBank BHQ10_006112) se identificaron con un análisis BLAST, utilizando como referencia secuencias homólogas de estos genes en especies de *Aspergillus* y

Penicillium, y alineándolas contra el genoma de *T. amestolkiae*. El posterior alineamiento de los genes silvestres con sus correspondientes versiones mutadas tras la adquisición de resistencia a 5-FOA se realizó con el *software* Snapgene (<http://www.snapgene.com>). La estructura de la orotidina-5'-monofosfato descarboxilasa (codificada por *pyrG*) fue predicha por AlphaFold (Jumper *et al.*, 2021) y analizada con Chimera (Pettersen *et al.*, 2004).

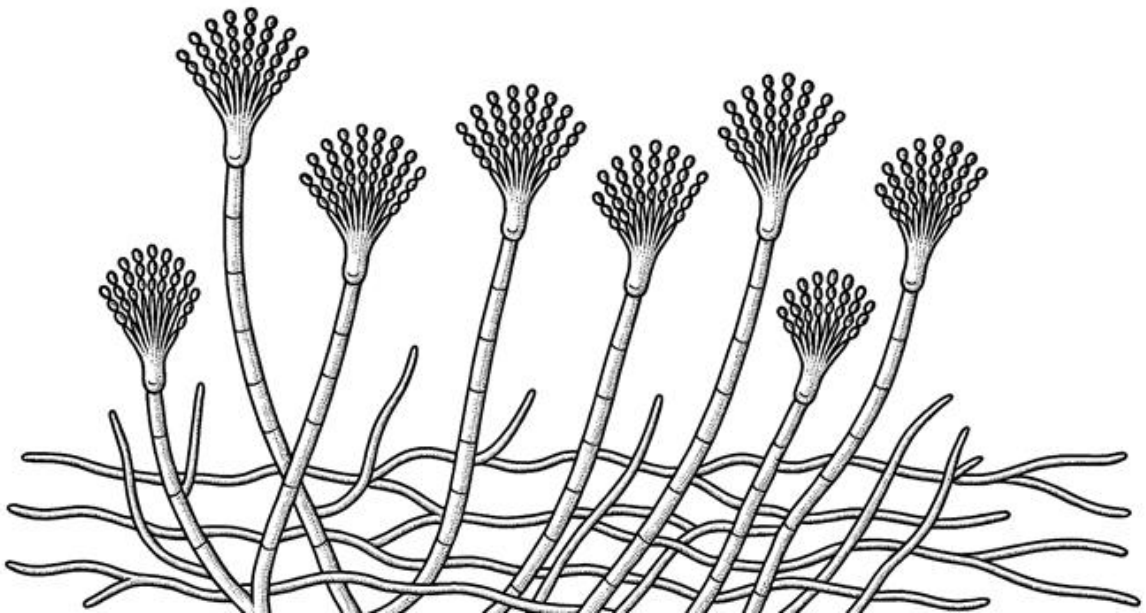
La secuencia de nucleótidos de *xlnR* (código de acceso en GenBank BHQ10_006915) se obtuvo mediante un análisis BLAST usando como referencia secuencias homólogas de este gen en especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, y alineándolas contra el genoma de *T. amestolkiae*. Después, con ayuda de Snapgene (<http://www.snapgene.com>), se diseñó la construcción *PgpdA::xlnR::TrpC*. La identificación de los residuos A788 y V785 del XlnR de *T. amestolkiae* se realizó por alineamiento con Clustal Omega utilizando las secuencias aminoacídicas del XlnR de *P. oxalicum* (Gao *et al.*, 2017), XLR-1 de *N. crassa* (Craig *et al.*, 2015), XlnR de *A. niger* (Hasper *et al.*, 2004), y XYR1 de *T. reesei* (Derntl *et al.*, 2013), en los cuales ya se habían descrito los efectos de estas dos mutaciones en la producción de xilanasas. Para la predicción y análisis de la estructura del XlnR de *T. amestolkiae* se emplearon AlphaFold y Chimera. Los distintos dominios de XlnR se identificaron con InterProScan (Jones *et al.*, 2014).

9. Análisis estadísticos

Todas las medidas para caracterizar Tam_XlnR, Tam_XlnR^{A788V}, Tam_XlnR^{V785F}, Tam_p1393 y Tam_WT (actividades enzimáticas, cuantificación de proteínas extracelulares y determinación de biomasa fúngica) se efectuaron empleando triplicados biológicos y duplicados técnicos. La significancia estadística se estudió con el test *t-Student* ($n=3$, $*p<0,1$, $**p<0,05$) utilizando el *software* estadístico Origin (v2022b, OriginLab).

El análisis de la actividad antioxidante del 3-O- β -D-xilobiósido de resveratrol, con respecto al compuesto original sin glicosilar, se llevó a cabo con el *software* estadístico SigmaPlot (v11.0, Stat-Ease Inc. MN), el cual permitió trazar las curvas de reducción de ABTS^{•+} y calcular las EC50 y TEAC. La significancia estadística se determinó con un test *t-Student* ($n = 3$, $**p < 0,01$).

RESULTADOS



CAPÍTULO 1

Producción heteróloga, caracterización y aplicaciones biotecnológicas de la endoxilanasas rXynSOS de *Talaromyces amestolkiae* y su variante glicosintasa rXynSOS^{E236G}



Adaptado de la publicación:

Pozo-Rodríguez A., Méndez-Líter J.A., de Eugenio L.I., Nieto-Domínguez M., Calviño E., Cañada F.J., Santana A.G., Díez J., Asensio J.L., Barriuso J., Prieto A., Martínez M.J. (2022). A Fungal Versatile GH10 Endoxylanase and Its Glycosynthase Variant: Synthesis of Xylooligosaccharides and Glycosides of Bioactive Phenolic Compounds. *International Journal of Molecular Sciences*. 23(3), 1383. doi: 10.3390/ijms23031383.

Antecedentes

El hongo *Talaromyces amestolkiae* se ha estudiado ampliamente en nuestro laboratorio por su notable producción de glicosil hidrolasas (GHs), habiéndose identificado en su genoma casi 200 genes que codifican para este tipo de enzimas (de Eugenio *et al.*, 2017). Cabe destacar que este número de genes de GHs es significativamente mayor que el encontrado en otros hongos implicados en la degradación de celulosa y hemicelulosa, como *Trichoderma reesei*, *Penicillium oxalicum* o *Aspergillus niger*. Varias GHs de *T. amestolkiae*, incluyendo tres β -glucosidasas, dos endoglucanasas, una β -xilosidasa, una endoxilanasas y dos arabinofuranosidasas, han sido caracterizadas y utilizadas con éxito en procesos de sacarificación, síntesis de oligosacáridos y glicosilación de compuestos bioactivos (Prieto *et al.*, 2021).

En los secretomas de *T. amestolkiae* inducidos con avicel, *slurry* de paja de trigo y xilano de haya, se identificaron dos endoxilanasas (de Eugenio *et al.*, 2017). Una de ellas pertenece a la familia GH11 y ya ha sido caracterizada y producida heterológamente (Nieto-Domínguez *et al.*, 2019, 2017b). La otra endoxilanasas, aunque presente en bajas cantidades, se consideró que podría tener interés por ser de la familia GH10. Las endoxilanasas de esta familia, como se ha mencionado en la Introducción, además de catalizar la ruptura de enlaces β -(1,4) O-glicosídicos entre residuos de D-xilopiranosas de la cadena principal del xilano, actúan sobre estos cuando están cerca de cadenas laterales e, incluso, pueden hidrolizar algunos sustratos celulósicos (Biely *et al.*, 1997; Collins *et al.*, 2005; Méndez-Líter *et al.*, 2021a). En este capítulo, la endoxilanasas GH10 de *T. amestolkiae*, denominada de aquí en adelante XynSOS, fue caracterizada y utilizada en distintas aplicaciones biotecnológicas.

1. Caracterización de la endoxilanasas rXynSOS

1.1. Clonaje, producción y purificación

Con el objetivo de facilitar la producción y purificación de XynSOS, se decidió expresar heterológamente en *P. pastoris* el gen que la codifica. Para ello, *xynSOS* se localizó en el genoma de *T. amestolkiae* en base a la secuencia aminoacídica detectada por proteómica (código de acceso de GenBank BHQ10_009513) (de Eugenio *et al.*, 2017). Este gen tiene una longitud de 1445 pb, 3 intrones y un péptido señal de 19 aminoácidos (Figura 20 y Anexo 1- Figura 1).

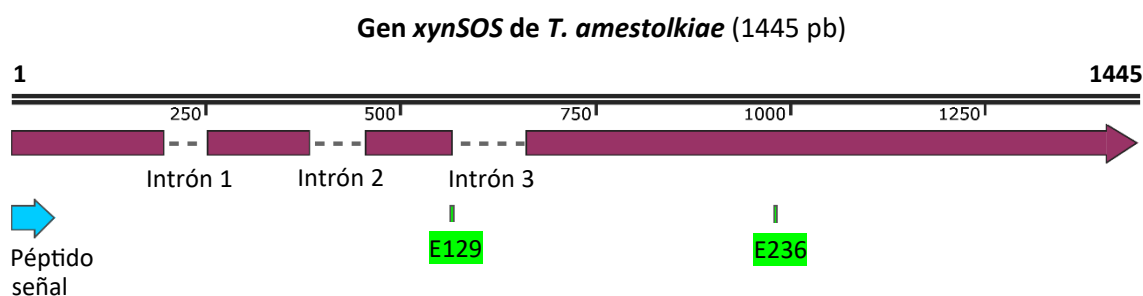
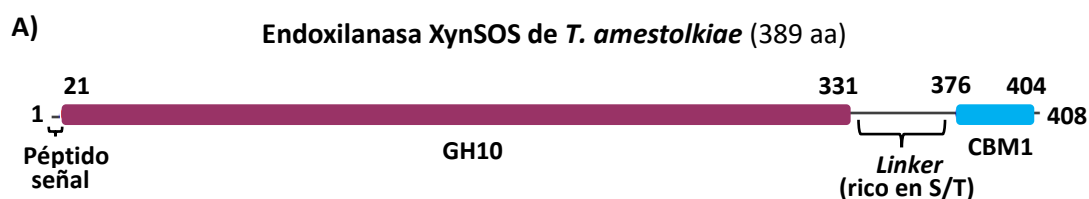


Figura 20. Esquema del gen *xynSOS* de *T. amestolkiae*. La secuencia codificante está representada en granate, los intrones en líneas de puntos, el péptido señal en azul y los codones de los residuos catalíticos ácido/base (E129) y nucleófilo (E236) en verde. La numeración de los aminoácidos para identificar los residuos catalíticos se hizo a partir del inicio de la proteína madura (sin péptido señal).

La proteína madura XynSOS está compuesta por 389 aminoácidos (sin el péptido señal) y contiene un dominio catalítico que muestra alta identidad con otras enzimas GH10 (*e*-valor de $3,6 \times 10^{-98}$ en dbCAN2). También contiene un módulo de unión a carbohidratos (CBM) en el extremo C-terminal, asignado a la familia CBM1 (*e*-valor de $8,4 \times 10^{-17}$ en dbCAN2), y conectado al dominio catalítico por una región rica en Ser/Thr (Figura 21A), de acuerdo con lo descrito en otras endoxilanasas GH10 (Miao *et al.*, 2017).



B)

```
MTLVKSILLALAAGHVAQAQLNTAAKAAGLLYFGTAVDNPDLSDSQYIANLETADFGQITPANAMKWQP
TEPSQGSYFTTQGDQIASLAKSNNDYLRCHNLVWYNQLPSYITSGSWT NATLIAALKEHINGVVTHYKGQ
CYAWDVVNEALNEDGTYRQNVFYQYIGEAYIPIAFAAAAAADPNKLYYNDYIEYAGAKATGAQGIVKLI
QAAGGRIDGVGLQSHFIVGSTPSLATQKANMASFTALGVNVAITELDIRMTLPETTALETQQSTDYQTTTT
ACVQTKGCVGITLWDYTDKYSWVPGTFSGQGDACPWDSSYNKKPAYYGILAGLQSGTSSSSSTSSTLITTT
TPTTTSSSTPTTTTTTSGTSAAHWGQCGGIGWSGPTTCVSPYTCQVLNPYYSQCL
```

Figura 21. Esquema y secuencia de la endoxilanasas XynSOS de *T. amestolkiae*. A) Predicción del dominio catalítico GH10 (granate) y el dominio de unión a carbohidratos CBM1 (azul), unidos por una región rica en Ser/Thr. B) Secuencia de aminoácidos de XynSOS. El péptido señal está subrayado y los residuos catalíticos, ácido/base (E129) y nucleófilo (E236), están resaltados en verde. Los posibles sitios de *N*-glicosilación y *O*-glicosilación se indican en amarillo y gris, respectivamente. La numeración de los residuos catalíticos corresponde a la de la proteína madura (sin péptido señal).

El gen *xynSOS*, sin sus tres intrones ni su péptido señal, fue expresado en *P. pastoris* GS115, organismo que ya se había empleado de manera exitosa para producir otras GHs de *T. amestolkiae* (Prieto *et al.*, 2021). La levadura fue transformada por electroporación con el vector pPIC9, en el que previamente se había clonado *xynSOS* fusionado con el factor α de secreción

de *Saccharomyces cerevisiae* y bajo el control del promotor PAOX1 inducible por metanol, obteniéndose un gran número de transformantes en las placas de YNB deficientes en histidina. Tras confirmar, por PCR de colonias, la presencia del gen *xynSOS* en varios de estos transformantes, se llevó a cabo un *screening* en el que se seleccionó el clon con mayor actividad endoxilanasas frente a AZCL-xilano de haya. Este *kit* comercial se utilizó porque permite detectar, de forma sencilla y rápida, la actividad endoxilanasas, aunque solo se puede cuantificar en unidades arbitrarias (UA).

La producción de rXynSOS se escaló en matraces de 1 L, utilizando el clon seleccionado y monitorizándolo diariamente su crecimiento ($DO_{600\text{ nm}}$) y la actividad endoxilanasas frente a AZCL-xilano. En el octavo día de cultivo se alcanzó la actividad máxima de 180 UA/min (Figura 22A). rXynSOS fue purificada, a partir de estos crudos de *P. pastoris*, en un solo paso de cromatografía de intercambio aniónico (Figura 22B), alcanzándose un buen rendimiento en el proceso (72%).

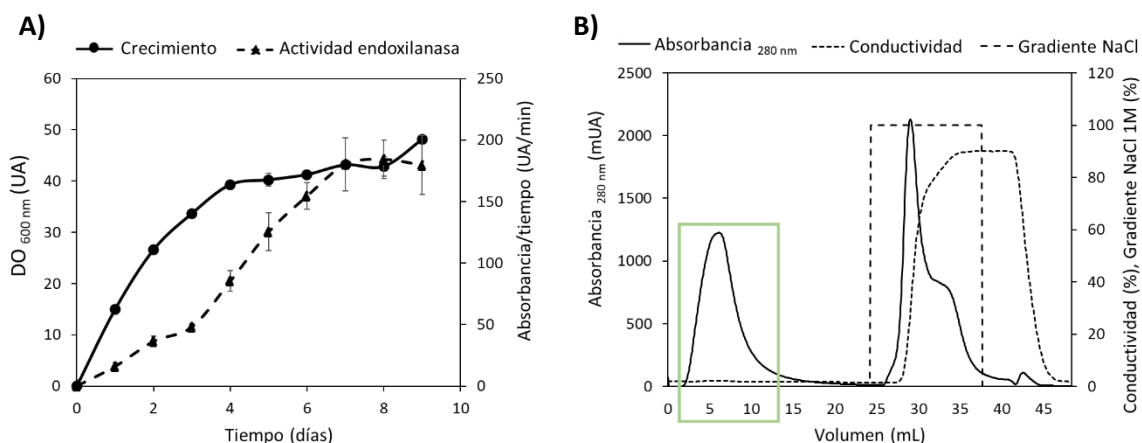


Figura 22. Producción y purificación de rXynSOS. A) Actividad endoxilanasas frente a AZCL-xilano y $DO_{600\text{ nm}}$ del clon de *P. pastoris* GS115 que produce rXynSOS. B) Purificación de rXynSOS mediante cromatografía de intercambio aniónico. La actividad de la enzima se detectó en la fracción no retenida (rectángulo verde).

1.2. Propiedades físicoquímicas

La pureza de rXynSOS se confirmó mediante SDS-PAGE (10% acrilamida). Esta técnica también sirvió para estimar su masa molecular en aproximadamente 58 kDa (Figura 23A). Este valor es mayor que la masa molecular teórica (41,567 kDa), calculada por el servidor ProtParam a partir de la secuencia de aminoácidos de rXynSOS, lo que probablemente se deba a la hiperglicosilación que experimentan las proteínas en *P. pastoris* (Cereghino & Cregg, 2000). La masa molecular exacta de rXynSOS, determinada por MALDI-TOF, fue de 53,259 kDa. El espectro de la Figura 23B muestra un patrón heterogéneo, que corrobora la glicosilación de la proteína. Los sitios de glicosilación se predijeron a partir de la secuencia de aminoácidos (Figura 21B), encontrando 32 posibles sitios de O-glicosilación y 1 de N-glicosilación. Por otro lado, la masa

molecular de rXynSOS obtenida por cromatografía de exclusión molecular, utilizando la columna Superdex 75 (Cytiva), fue de 55 kDa, lo que indica que rXynSOS es una proteína monomérica.

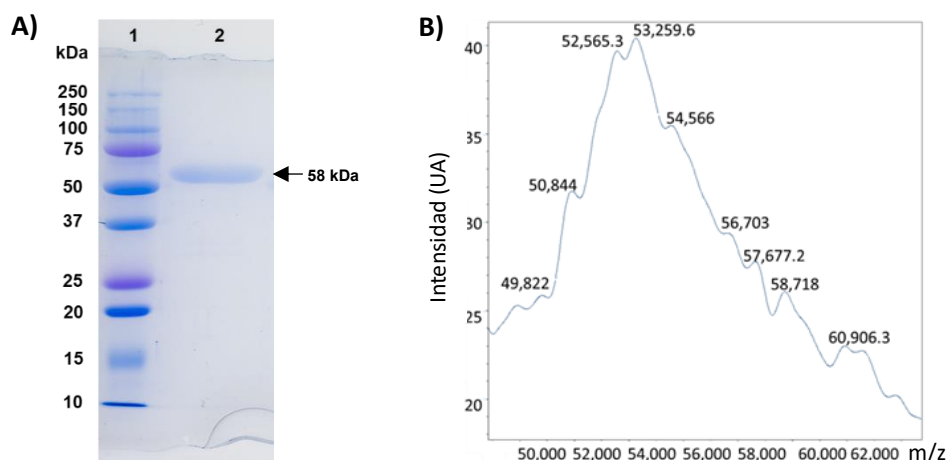


Figura 23. Propiedades de rXynSOS. A) Homogeneidad y masa molecular de la proteína estimada por SDS-PAGE: marcador de masa molecular (carril 1) y rXynSOS (carril 2). B) Espectro de MALDI-TOF de la proteína en el que se observa su masa molecular exacta y un perfil que corresponde a una proteína glicosilada.

El punto isoelectrico de rXynSOS, determinado por isoelectroenfoque, fue de aproximadamente 5,5, un valor similar a los encontrados para otras endoxilanasas fúngicas de la familia GH10 (Lafond *et al.*, 2011). Sin embargo, el valor teórico obtenido a partir de la secuencia de aminoácidos fue de 4,8. Esta diferencia puede deberse, nuevamente, a la hiperglicosilación que presenta la enzima producida por *P. pastoris* (Kumar *et al.*, 2004).

La máxima actividad enzimática de rXynSOS frente a AZCL-xilano se observó a 70 °C y pH 5 (Figura 24). Estos valores de temperatura y pH óptimos son comparables con los descritos para otras endoxilanasas fúngicas de la familia GH10, que oscilan entre 60 y 80 °C y pH 4,5 y 6 (Chen *et al.*, 2009; Lafond *et al.*, 2011; Liao *et al.*, 2015; Ribeiro *et al.*, 2014; Shibata *et al.*, 2017; Velasco *et al.*, 2019). En cuanto a su estabilidad a 72 h, mantuvo la actividad hasta 40 °C, aunque esta fue residual a 50 °C. rXynSOS fue también muy estable en un amplio rango de pH, pero perdió gran parte de su actividad a pH 9 (Figura 24). Esta estabilidad en un amplio rango de pH (2,2-9) es importante porque facilita la aplicación de las enzimas en los procesos industriales (Liu & Kokare, 2017).

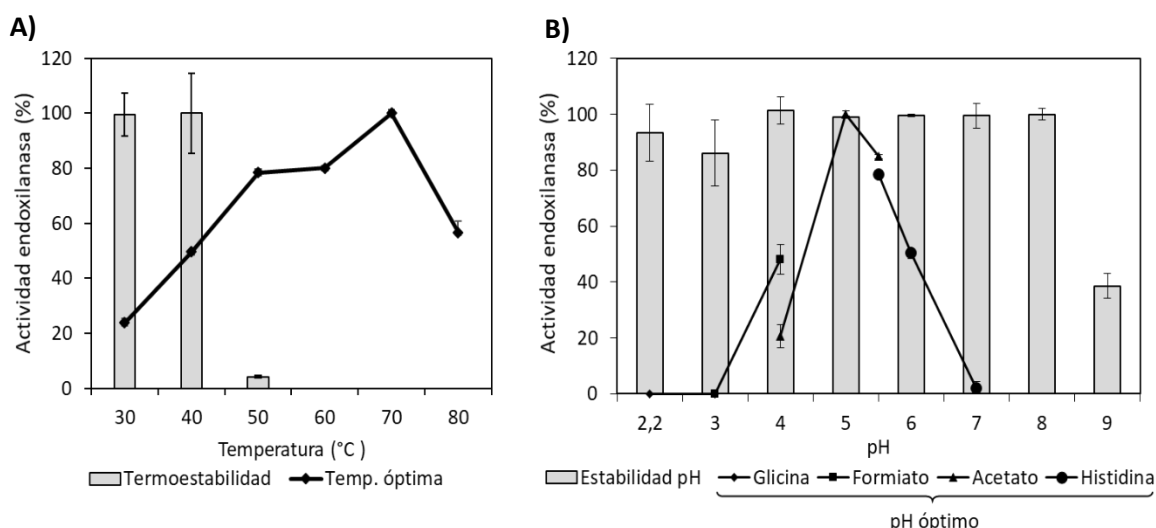


Figura 24. Efecto de la temperatura (A) y del pH (B) en la actividad máxima y estabilidad de rXynSOS. Las líneas indican la temperatura y pH óptimos, y las barras la estabilidad a 72 h en un intervalo de temperaturas de 30 a 80 °C y de pH de 2,2 a 9.

Para evaluar la funcionalidad del dominio CBM1 de unión a celulosa, predicho en el extremo C-terminal de rXynSOS, se incubó la enzima durante 2 h con avicel. De esta forma se pudo comprobar que la actividad endoxilanasas disminuía rápidamente en el sobrenadante, reduciéndose hasta el 27% después de 10 min y hasta el 15% tras 1 h. Este resultado indica una fuerte interacción entre la enzima y el avicel, lo que sugiere que el dominio CBM1 de rXynSOS es funcional. Estudios previos sugieren que el dominio CBM1 facilitaría a las endoxilanasas GH10 interactuar con la biomasa lignocelulósica, permitiendo su unión a la celulosa y favoreciendo la degradación del xilano circundante (Inoue *et al.*, 2015; Miao *et al.*, 2017).

1.3. Especificidad de sustrato

La actividad hidrolítica de rXynSOS se estudió utilizando una amplia gama de sustratos y se muestra en la Tabla 18. La enzima fue muy activa frente a xilano de haya ($132,33 \text{ U mg}^{-1}$) y, especialmente, frente a arabinoxilano de trigo ($149,15 \text{ U mg}^{-1}$). Esta ligera preferencia por xilanos ramificados, también se ha descrito para la endoxilanasas GH10 XynD de *Penicillium funiculosum* (Lafond *et al.*, 2011). rXynSOS también pudo hidrolizar carboximetilcelulosa (CMC), aunque con mucha menos eficiencia que los xilanos, de acuerdo con lo reportado en la endoxilanasas GH10 AFUMN-GH10 de *Aspergillus fumigatus* (Velasco *et al.*, 2019). Sin embargo, rXynSOS, a pesar de tener un dominio de unión a celulosa, no fue capaz de actuar sobre avicel. Por otra parte, utilizando derivados de *p*-nitrofenol de xilosa, glucosa y sus dímeros correspondientes (*p*NPX, *p*NPG, *p*NPG₂ y *p*NPX₂), se comprobó que la enzima podía hidrolizar estos sustratos, detectándose la mayor actividad sobre *p*NPX₂.

Tabla 18. Actividad hidrolítica de la endoxilanasas rXynSOS frente a distintos sustratos.

Sustrato (% p/v)	Actividad específica (U/mg)
Xilano de haya (0,8%)	132,33 ± 11,6
Arabinosilano de trigo (0,8%)	149,15 ± 3,45
Carboximetilcelulosa (CMC, 0,8%)	1,25 ± 0,35
Celulosa microcristalina (avicel, 0,8%)	No activa
pNPX ₂ (0,1%)	56,97 ± 3,96
pNPX (0,1%)	1,81 ± 0,06
pNPG ₂ (0,1%)	0,82 ± 0,01
pNPG (0,1%)	0,03 ± 0,001

Como era de esperar al tratarse de una endoxilanasas, la mayor actividad se observó frente a los xilanos, seguida del dímero de xilosa (pNPX₂). La actividad fue considerablemente menor frente al pNPX y CMC, y se detectó actividad residual frente a pNPG₂ y pNPG. Estos resultados corroboran la versatilidad de sustrato de rXynSOS para actuar, además de sobre sustratos xilanólicos, sobre algunos sustratos celulósicos, conforme a lo reportado en la bibliografía (Collins *et al.*, 2005), aunque su actividad sobre estos sea mucho menor. Por el contrario, la endoxilanasas XynM de *T. amestolkiae*, que pertenece a la familia GH11, no fue capaz de hidrolizar pNPX, pNPG y CMC (Nieto-Domínguez *et al.*, 2017b).

1.4. Parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos se calcularon solo para los mejores sustratos de rXynSOS, así como para CMC como representante de actividad celulolítica. La Tabla 19 refleja que la enzima tiene una alta afinidad por el xilano de haya y el arabinosilano de trigo, con valores de K_m de 1,07 y 1,94 g L⁻¹, respectivamente, mejores que los reportados para otras endoxilanasas GH10 fúngicas (Lafond *et al.*, 2011; Liao *et al.*, 2015; Shibata *et al.*, 2017; Velasco *et al.*, 2019). Respecto a las eficiencias catalíticas (k_{cat}/K_m) de rXynSOS, las obtenidas con xilano de haya (134,69 s⁻¹ g⁻¹ L) y arabinosilano de trigo (84,65 s⁻¹ g⁻¹ L) están en el mismo rango que las de las endoxilanasas GH10 Xyn10A de *Penicillium oxalicum* (Liao *et al.*, 2015), PspXyn10 de *Penicillium sp.* KSM-F532 (Shibata *et al.*, 2017), y XynD de *P. funiculosum* (Lafond *et al.*, 2011). Sin embargo, se han reportado mayores eficiencias catalíticas sobre xilano de haya con las endoxilanasas GH10 Xyn10B de *P. oxalicum* (Liao *et al.*, 2015) y AFUMN-GH10 de *A. fumigatus* (Velasco *et al.*, 2019), aunque las condiciones experimentales empleadas fueron diferentes a las de este trabajo.

Tabla 19. Parámetros cinéticos de la endoxilanasas rXynSOS.

Sustrato	K_m (g L ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ g ⁻¹ L)
Xilano de haya	1,07	144,25	134,69
Arabinosilano de trigo	1,94	163,93	84,65
CMC	51,29	7,90	0,15
pNPX ₂	0,05	102,96	2181,45

En cuanto a la diferencia entre las endoxilanasas GH10 y GH11 de *T. amestolkiae*, los resultados indican que rXynSOS (GH10) es mucho más eficiente que rXynM (GH11) en la hidrólisis del xilano de haya (Nieto-Domínguez *et al.*, 2019), con valores de k_{cat}/K_m de 134,69 y 6,14 $s^{-1} g^{-1} L$, respectivamente. Esto era previsible porque el xilano de haya utilizado en este trabajo (Megazyme) contiene un 10,3% de sustituciones de ácido glucurónico y las enzimas GH10 son más versátiles que las GH11 en la hidrólisis de los enlaces β -(1,4) *O*-glicosídicos entre residuos de D-xilopiranosas que se encuentran cerca de las cadenas laterales del xilano (Collins *et al.*, 2005). Finalmente, la mejor afinidad (0,05 $g L^{-1}$) se obtuvo con *p*NPX₂, un dímero sintético, lo que se tradujo en una mayor eficiencia catalítica (2181,45 $s^{-1} g^{-1} L$) de rXynSOS sobre este sustrato. La alta K_m obtenida con CMC, confirma la baja afinidad que tiene esta enzima para hidrolizar este tipo de sustratos.

1.5. Producción de xilooligosacáridos por hidrólisis de xilano

La producción enzimática de XOS se evaluó con 0,5 U/mL de rXynSOS y 2% (p/v) de xilano de haya. La Figura 25 muestra que la enzima libera una mezcla de XOS de bajo grado de polimerización (2-5 xilasas), los cuales, a medida que avanza la reacción, se hidrolizan hasta xilobiosa. El análisis por espectrometría de masas de tipo ionización por *electrospray* (ESI-MS) reveló que, a los 15 min de reacción, la mezcla también contenía xilohexaosa y xiloheptaosa, y a los 30 min xilohexaosa.

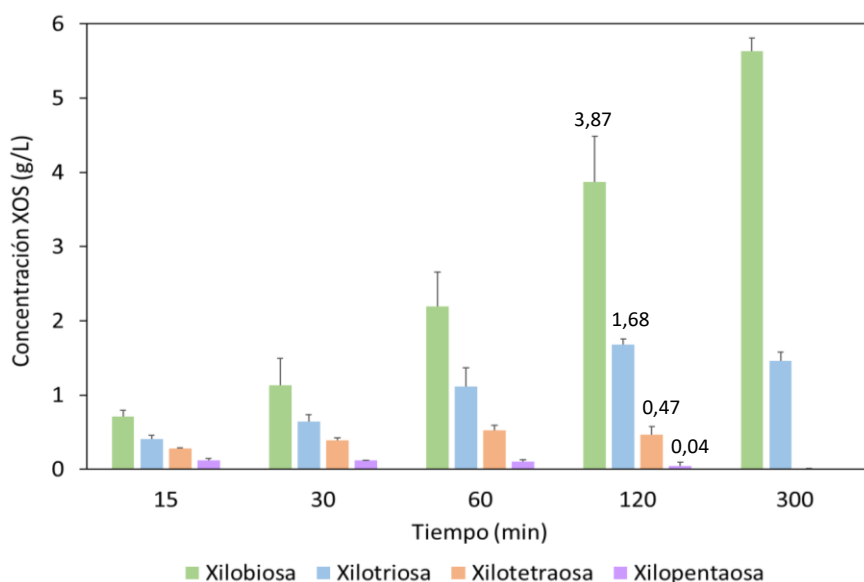


Figura 25. Mezcla de xilooligosacáridos liberados por rXynSOS durante la hidrólisis de 2% (p/v) de xilano de haya, a distintos tiempos de incubación. La concentración de xilobiosa, xilotriosa, xilotetraosa y xilopentaosa se determinó por HPLC.

El rendimiento de la producción de XOS se expresó como un porcentaje de la concentración inicial de xilano y se calculó a partir de la suma de las concentraciones de

xilobiosa, xilotriosa, xilotetraosa y xilopentaosa, determinadas por HPLC con una columna Aminex HPX-42C (Bio-Rad). La mezcla más completa y prometedora se obtuvo a las 2 h de reacción, con un rendimiento total del 30,3% y una alta concentración de XOS con un grado de polimerización de 2 a 4 (3,87 g/L de xilobiosa, 1,68 g/L de xilotriosa y 0,47 g/L de xilotetraosa). Estos XOS, junto con la xilopentaosa y xilohexaosa, son particularmente demandados por la industria alimentaria, ya que se ha demostrado que tienen mejor potencial prebiótico, en comparación con los de mayor grado de polimerización (Poletto *et al.*, 2020; Valladares-Diestra *et al.*, 2023). Si el objetivo es maximizar el rendimiento total de XOS, la reacción podría extenderse hasta las 5 h de reacción, cuando se alcanza un mayor rendimiento de 35,5%, aunque en estas condiciones se favorece la acumulación de xilobiosa, a expensas de los otros oligómeros. La xilobiosa es un XOS de gran interés por su rápida fermentación y mayor dulzor (Amorim, Silvério, Prather, *et al.*, 2019; Corim Marim & Gabardo, 2021). En ambos casos, la producción de XOS se debería optimizar ajustando la concentración de sustrato, dosis de enzima y tiempo de reacción.

Estos resultados son similares a los obtenidos con la endoxilanasas XynM de *T. amestolkiae* durante la hidrólisis de 2% (p/v) de xilano de abedul (Nieto-Domínguez *et al.*, 2017b). En este caso se obtuvo un rendimiento del 28,8%, aunque utilizando una mayor concentración de enzima (1 U/mL) y un tiempo de reacción más largo (10 h). Sin embargo, al contrario de lo observado con rXynSOS, el perfil de XOS generado por XynM fue más equilibrado (1,49 g/L de xilobiosa, 2,01 g/L de xilotriosa, 1,39 g/L de xilotetraosa, 0,33 g/L de xilopentaosa y 0,53 g/L de xilohexaosa) y se mantuvo estable hasta las 24 h, sin llegar a acumularse xilobiosa. Esto sugiere que la inhibición por producto podría ser mucho mayor en XynM que en rXynSOS. También es posible que estas diferencias estén relacionadas con el hecho de que rXynSOS y XynM pertenecen a dos familias de GH distintas, GH10 y GH11, respectivamente. XynM se caracteriza por su alta selectividad hacia xilanos con baja sustitución, lo que podría comprometer su actividad sobre los XOS de menor grado de polimerización, generados al final de la reacción, cuando estos presentan ramificaciones (Hu & Saddler, 2018).

1.6. Capacidad de transglicosilación de rXynSOS

Tras evaluar su actividad hidrolítica, se estudió también la capacidad de transglicosilación de rXynSOS. Para ello se empleó pNPX₂ como donador de xilobiosa y alcohol vainillínico, alcohol 2-hidroxibencílico, hidroquinona y ácido gálico, como aceptores (Figura 26). Estas moléculas se seleccionaron por sus interesantes propiedades antioxidantes y los beneficios que pueden aportar para la salud (Albuquerque *et al.*, 2021; Dai & Mumper, 2010). Los resultados reflejaron que rXynSOS podía transglicosilar todos los aceptores ensayados, pero con bajas eficiencias, ya

que la formación de glicósidos apenas fue detectable por cromatografía en capa fina (TLC) y solo se pudo confirmar por ESI-MS (Anexo 1- Figura 2).

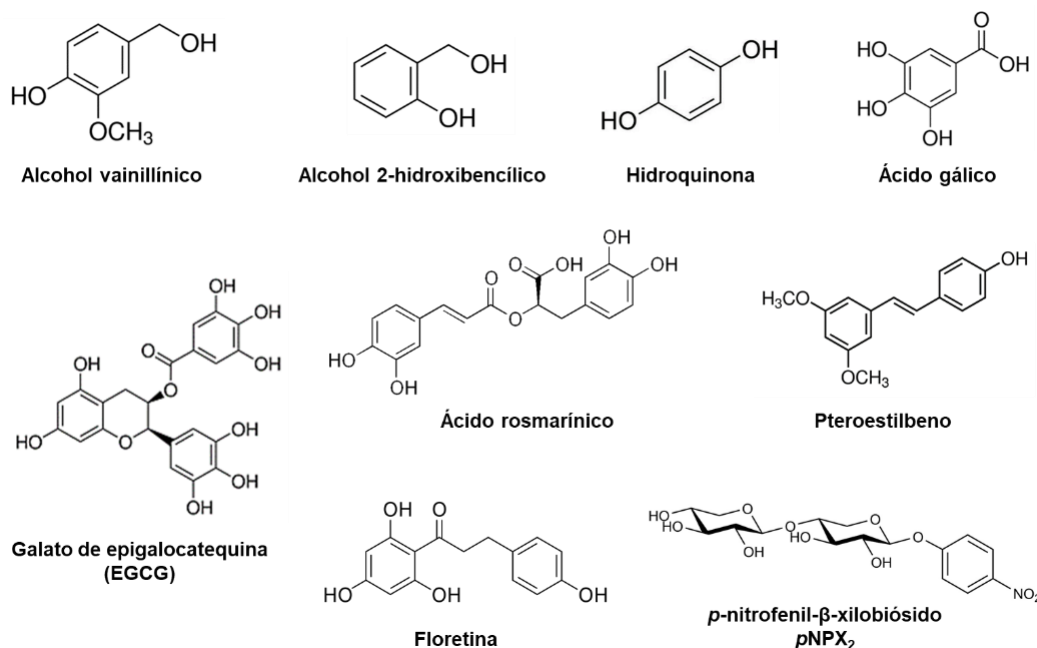


Figura 26. Estructura molecular de los aceptores utilizados en las reacciones de transglicosilación llevadas a cabo con rXynSOS y, más adelante, con su variante glicosintasa rXynSOS^{E236G}. El *pNPX*₂ se empleó como donador de xilobiosa con rXynSOS y como aceptor con rXynSOS^{E236G}.

Considerando la amplia especificidad de sustrato observada en los ensayos de actividad hidrolítica de la enzima, también se probaron *pNPX*, *pNPG* y *pNPG*₂, como donadores de xilosa, glucosa y celobiosa, respectivamente, utilizando alcohol vainillínico como aceptor. A pesar de las bajas eficiencias de reacción, los espectros de ESI-MS revelaron la producción de glicósidos con todos estos donadores alternativos (Anexo 1- Figura 3).

Estos resultados indican que rXynSOS es capaz de transglicosilar con éxito diversos compuestos fenólicos, usando distintos donadores. Sin embargo, para poder utilizar esta propiedad en aplicaciones biotecnológicas, es necesario mejorar la eficiencia de las transglicosilaciones. Aunque las condiciones de reacción se pueden optimizar para aumentar la proporción de transglicosilación/hidrólisis, el desarrollo de variantes glicosintasas, basado en la eliminación o reducción de la actividad hidrolítica de las GHs mediante ingeniería de proteínas, ha demostrado ser un enfoque prometedor para mejorar los rendimientos de estos glicósidos (Abdul Manas *et al.*, 2018; Wen *et al.*, 2018). Por esta razón, se procedió a diseñar variantes glicosintasas de rXynSOS.

2. Desarrollo y estudio de la glicosintasa rXynSOS^{E236G}

2.1. Conversión de rXynSOS en sus variantes glicosintasas

Con el objetivo de desarrollar las variantes glicosintasas de rXynSOS, se substituyó su residuo catalítico nucleófilo (E236) por uno que no puede intervenir en la reacción de hidrólisis.

La identificación de este residuo se llevó a cabo tras el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de XynSOS con las secuencias de tres endoxilasas fúngicas de la familia GH10 bien caracterizadas (Anexo 1- Figura 4). A continuación, el residuo nucleófilo E236 fue sustituido mediante mutagénesis dirigida, por glicina (rXynSOS^{E236G}) y serina (rXynSOS^{E236S}), teniendo en cuenta que estas mutaciones, generalmente, dan lugar a mayores rendimientos de glicosilación (Kim *et al.*, 2006; Perugino *et al.*, 2004). Es necesario resaltar que estas dos variantes glicosintasas de rXynSOS requerirán donadores de azúcar activados, por ejemplo con un átomo de flúor, para catalizar las reacciones de glicosilación (Hayes & Pietruszka, 2017).

Al igual que se hizo con la enzima nativa, las dos variantes glicosintasas, rXynSOS^{E236G} y rXynSOS^{E236S}, se produjeron heterológamente en *P. pastoris* GS115. Tras comprobar que la actividad hidrolítica de estas variantes era prácticamente nula, los mejores clones se seleccionaron valorando la concentración total de proteínas extracelulares. Los clones seleccionados de rXynSOS^{E236G} y rXynSOS^{E236S} se cultivaron a mayor escala, determinando su crecimiento y concentración de proteínas extracelulares, y comparándolos con la cepa silvestre (Figura 27A). Estas variantes glicosintasas fueron purificadas, en un solo paso cromatográfico (siguiendo el mismo protocolo que para la rXynSOS nativa) y su homogeneidad fue confirmada por SDS-PAGE (Figura 27B).

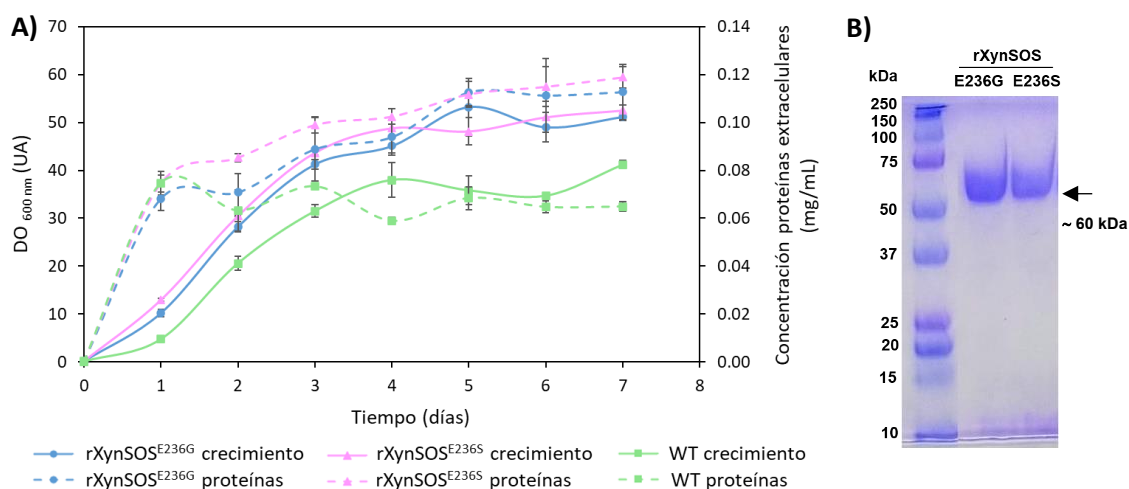


Figura 27. Producción y purificación de las variantes glicosintasas rXynSOS^{E236G} y rXynSOS^{E236S}. A) Concentración total de proteínas extracelulares y DO_{600 nm} de los clones de *P. pastoris* GS115 que producen rXynSOS^{E236G} y rXynSOS^{E236S}, comparados con la cepa silvestre. B) SDS-PAGE de las proteínas purificadas: marcadores de masa molecular (carril 1), rXynSOS^{E236G} (carril 2) y rXynSOS^{E236S} (carril 3).

2.2. Potencial de glicosilación de las variantes glicosintasas de rXynSOS

La actividad de glicosilación de rXynSOS^{E236G} y rXynSOS^{E236S} se estudió en reacciones con xilobiosa flúor (X₂F), como donador de xilobiosa, y pNPX₂, como molécula aceptora. La mayoría de las glicosintasas descritas hasta la fecha han sido capaces de utilizar con éxito azúcares unidos a moléculas de nitrofenol como aceptores de glicosilación, dando lugar a pNP-oligosacáridos de

distinta longitud (Perugino *et al.*, 2004). Sorprendentemente, el $pNPX_2$ no fue una buena molécula aceptora para ninguna de las variantes glicosintasa desarrolladas. En el caso de $rXynSOS^{E236S}$, no se detectaron productos ni por TLC ni por ESI-MS, mientras que, para $rXynSOS^{E236G}$, aunque no se observó por TLC ningún producto de reacción, sí se pudo confirmar la síntesis de $pNPX_4$ y $pNPX_6$ por ESI-MS (Anexo 1- Figura 5A).

Para seguir analizando la capacidad de transglicosilación de estas variantes ($rXynSOS^{E236G}$ y $rXynSOS^{E236S}$), se realizaron las reacciones con alcohol vainillínico como aceptor. Los resultados de TLC revelaron que únicamente en las reacciones catalizadas por $rXynSOS^{E236G}$ aparecían posibles productos glicosilados (Anexo 1- Figura 5B). El análisis por ESI-MS confirmó la síntesis de un producto cuya masa molecular podría corresponder con la del xilobiósido de alcohol vainillínico y otro, minoritario, con una masa equivalente a la del xilotetraósido de alcohol vainillínico (Anexo 1- Figura 5C). Los resultados de $rXynSOS^{E236S}$ corroboraron que esta variante no es capaz de glicosilar ninguna de las moléculas aceptoras ensayadas. Esto también se ha observado con otras glicosintasas, en las que se han obtenido peores resultados con las variantes de serina que con las de glicina (Sugimura *et al.*, 2006). Esto puede deberse a que la cadena lateral de la serina podría estar provocando impedimentos estéricos para la salida del flúor de los donadores, mientras que la ausencia de cadena lateral en la glicina facilitaría que la reacción se desarrolle de manera más eficiente (Perugino *et al.*, 2004). El detalle del sitio activo en el modelo tridimensional de $rXynSOS$ (Figura 28), donde se encuentra el aminoácido catalítico nucleófilo de la proteína, apoyaría esta teoría. Basándose en estos resultados, los siguientes experimentos se realizaron solo con la glicosintasa $rXynSOS^{E236G}$.

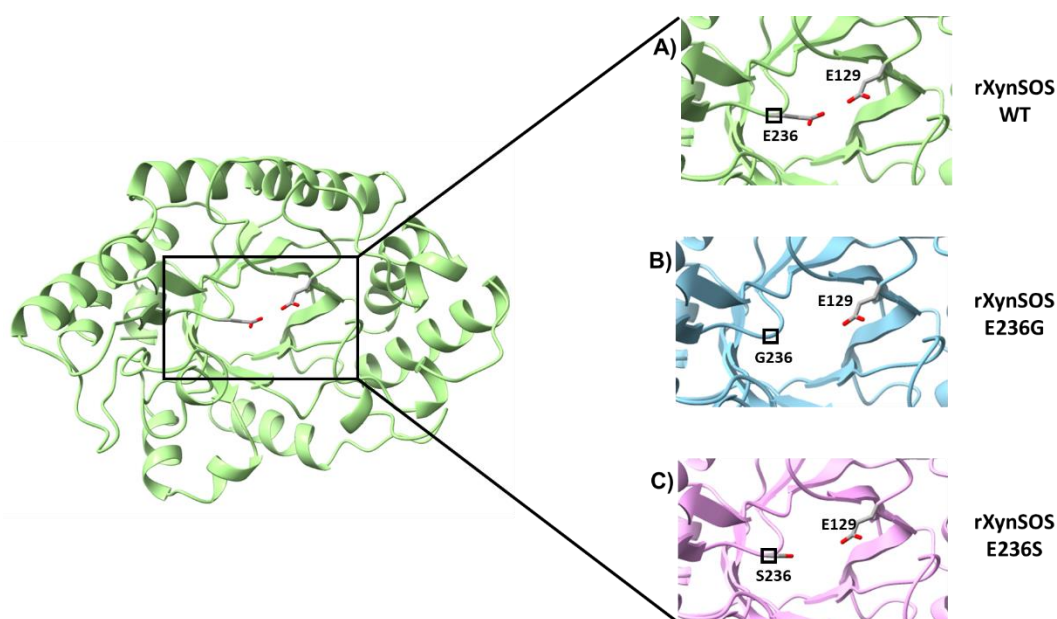


Figura 28. Detalle del sitio activo de $rXynSOS$ y sus variantes glicosintasas. El modelo tridimensional de la estructura fue predicho por AlphaFold. Se muestran los residuos catalíticos E129 (ácido/base) y E236 (nucleófilo) en A) la endoxilanasas nativa, B) en $rXynSOS^{E236G}$ y C) en $rXynSOS^{E236S}$ (donde se observa la cadena lateral de la serina).

2.3. Síntesis de xilooligosacáridos por oligomerización de xilobiosa

En la reacción de $\text{rXynSOS}^{\text{E236G}}$ con $p\text{NPX}_2$ (como aceptor) y X_2F (como donador), descrita en el apartado anterior, se detectaron mediante ESI-MS varios picos de masas correspondientes a distintos XOS (Anexo 1- Figura 5A). Teniendo en cuenta este hallazgo, se formuló la hipótesis de que en esta reacción, la síntesis de XOS se veía favorecida sobre la formación de $p\text{NP-XOS}$. Para comprobar esto, se llevó a cabo una reacción con X_2F como única molécula reactiva, sin añadir aceptor, en la que se confirmó por ESI-MS la síntesis de XOS de diferentes longitudes: cuatro, seis, ocho y diez unidades de xilosa (Figura 29).

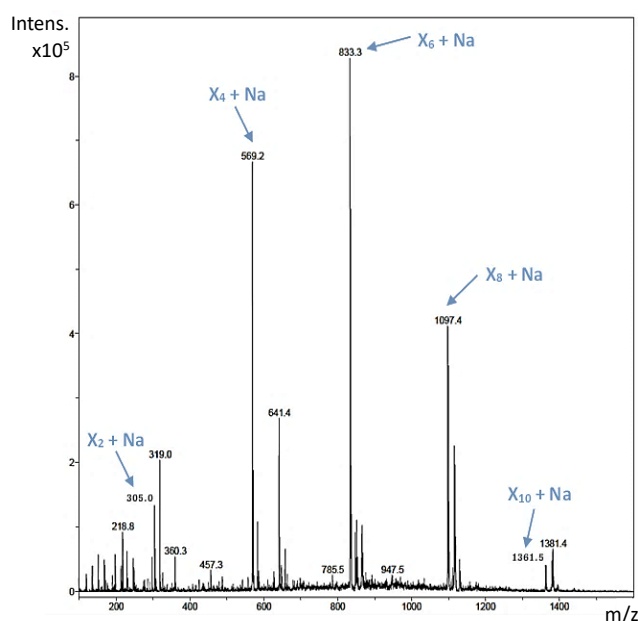


Figura 29. Espectro de ESI-MS de la reacción de síntesis de XOS catalizada por $\text{rXynSOS}^{\text{E236G}}$ con X_2F como única molécula reactiva. El m/z de los iones correspondientes a los aductos de sodio de los XOS (X_4 , X_6 , X_8 y X_{10}) está indicado con flechas azules.

La reacción de síntesis de XOS fue monitorizada por Resonancia Magnética Nuclear (RMN), obteniéndose varios espectros de la mezcla de reacción a distintos tiempos, que se compararon con el espectro de una 1,4- β -D-xilotetraosa comercial. Tras confirmar que los espectros coincidían (Figura 30), se concluyó que la regioselectividad de $\text{rXynSOS}^{\text{E236G}}$, en la síntesis de XOS, se dirigía hacia la formación de este enlace O -glicosídico β -(1,4). Este resultado también confirma el mecanismo de retención de la configuración de la endoxilanasas nativa. Además, se observó que la señal con desdoblamiento “doble doblete” (dd) a 5,6 ppm, correspondiente al protón H1 acoplado al flúor del X_2F , desaparecía con el tiempo, a la vez que aparecían nuevas señales que correspondían a oligómeros de xilobiosa más largos, unidos con enlace β -(1,4) O -glicosídico, confirmándose la síntesis de XOS de mayor grado de polimerización.

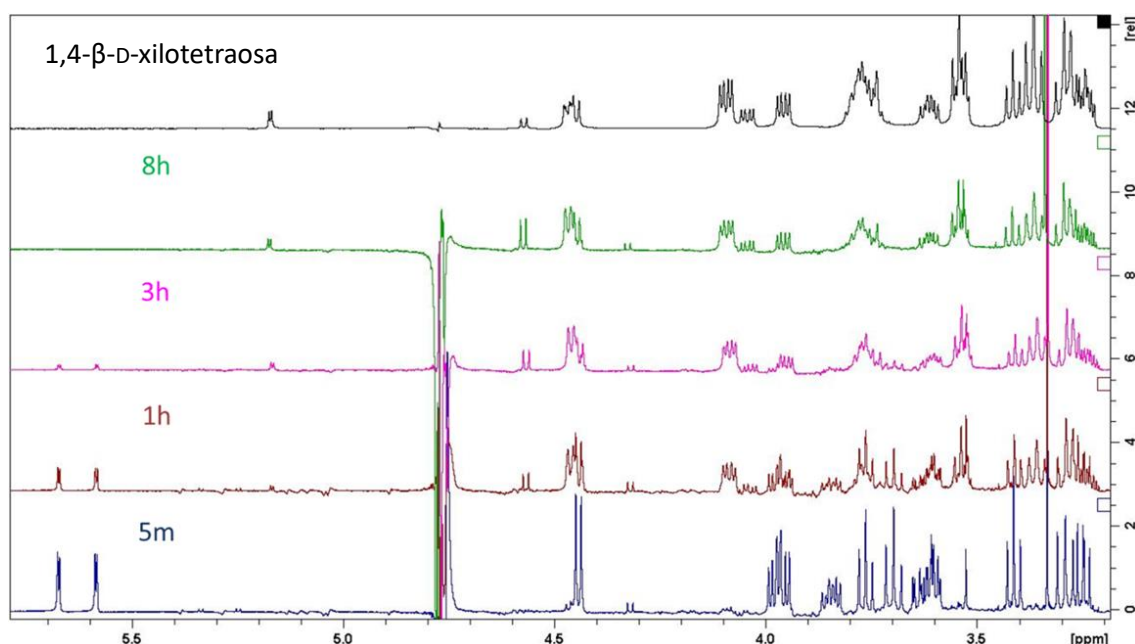


Figura 30. Espectros de RMN de la reacción de síntesis de XOS catalizada por la glicosintasa rXynSOS^{E236G}, utilizando X₂F como única molécula reactiva. Los espectros de 1D-1H se adquirieron a 298 K a distintos tiempos, entre 5 min y 8 h. Como control se utilizó 1,4-β-D-xilotetraosa comercial.

La aplicación de glicosintasas para producir XOS es una alternativa a las reacciones de hidrólisis catalizadas por endoxilasas nativas, entre las que se encuentra rXynSOS. Con las enzimas nativas se suelen alcanzar mejores rendimientos, pero tienden a completar el proceso de hidrólisis del xilano hasta xilotriosa y xilobiosa (Perugino *et al.*, 2004). Esto, en teoría, es una ventaja ya que diversos estudios han indicado que la microbiota intestinal, en particular las especies de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, tiene una mayor preferencia por metabolizar xilobiosa y xilotriosa (Zhao *et al.*, 2024). Sin embargo, si se quisiera aumentar la proporción de XOS de mayor grado de polimerización en la mezcla (como xilotetraosa y xilohexaosa), con el fin de potenciar algún efecto específico o para promover una mayor diversidad bacteriana, la glicosintasa rXynSOS^{E236G} puede ser una opción interesante para lograrlo. Además, a diferencia de los XOS generados a partir de la hidrólisis de xilano, que normalmente presentan ramificaciones, la oligomerización enzimática de X₂F genera XOS de cadena lineal. Este tipo de XOS tienen relevancia biotecnológica ya que no son frecuentes en la naturaleza (Hayes & Pietruszka, 2017). Finalmente, aunque la síntesis de XOS a partir de X₂F ha sido descrita con glicosintasas bacterianas, como las derivadas de las endoxilasas GH10 XylB de *Thermotoga maritima*, XynB de *Clostridium stercorarium*, XynA de *Bacillus halodurans* y Cex de *Cellulomonas fimi* (Kim *et al.*, 2006; Sugimura *et al.*, 2006), rXynSOS^{E236G} es la primera glicosintasa fúngica que presenta esta capacidad.

Para comprobar si la glicosintasa rXynSOS^{E236G} era capaz de sintetizar un abanico más amplio de oligosacáridos y verificar si podía hacerlo con otros donadores, se llevaron a cabo distintas reacciones utilizando XF, G₂F y GF como donadores de xilosa, celobiosa y glucosa, respectivamente. Los resultados de ESI-MS, mostrados en la Tabla 20, confirman la formación de XOS al usar XF como donador, aunque solo de dos, tres y cuatro unidades de xilosa. Con GF no se detectaron oligosacáridos, aunque sí se pudo observar celotetraosa utilizando G₂F (Tabla 20). Estos resultados eran previsibles, teniendo en cuenta las actividades hidrolíticas mostradas en la Tabla 18 para rXynSOS frente a *p*NPX, *p*NPG y *p*NPG₂, en la que se observa que el *p*NPX₂ es, claramente, el sustrato sintético preferido de la enzima.

Tabla 20. Síntesis de oligosacáridos utilizando la glicosintasa rXynSOS^{E236G} y XF, G₂F y GF como donadores de xilosa, celobiosa y glucosa, respectivamente. Los oligosacáridos fueron detectados por ESI-MS como aductos de sodio en el modo positivo.

Molécula reactiva	Oligosacárido	Masa molecular (m/z)	Intensidad (UA)
XF	X ₂	304,2	245307
	X ₃	437,2	345614
	X ₄	569,5	203035
G ₂ F	G ₄	689,2	471410
GF	-	-	-

2.4. Síntesis de glicósidos de compuestos fenólicos bioactivos

Para estudiar si la glicosintasa rXynSOS^{E236G} era más eficaz que la enzima nativa glicosilando compuestos fenólicos, se utilizaron los mismos aceptores que en el apartado 1.6 (alcohol vainillínico, alcohol 2-hidroxibencílico, hidroquinona y ácido gálico) y X₂F como donador. Con todos los aceptores ensayados se produjeron glicósidos, identificados inicialmente por TLC (Figura 31A-D), y se confirmó su masa molecular, en forma de aductos de sodio, por ESI-MS (Tabla 21). En los espectros de todos ellos se observaron picos pequeños que podrían corresponder a xilotetraósidos. Como puede observarse en la Figura 26, todos estos aceptores contienen múltiples grupos hidroxilo susceptibles de participar en las reacciones de glicosilación. Como resultado, podrían generarse glicósidos con moléculas de xilobiosa unidas en diferentes posiciones, que tendrían la misma masa molecular, lo que impediría diferenciarlas con las técnicas empleadas hasta el momento. Lo mismo ocurriría con los glicósidos con cuatro unidades de xilosa, en los que se añade la dificultad adicional de que contengan una cadena de xilotetraosa o dos cadenas de xilobiosa. En cualquier caso, estos resultados confirman que la variante glicosintasa de rXynSOS es mucho más eficiente que la enzima nativa glicosilando los aceptores ensayados.

Teniendo en cuenta estos resultados, se probaron otros posibles aceptores de rXynSOS^{E236G}, como el galato de epigallocatequina (EGCG), ácido rosmarínico, floretina y pterostilbeno (Figura 26), utilizando X₂F como donador. Estos polifenoles, que se extraen de las plantas, tienen interesantes propiedades bioactivas, como actividad antioxidante, antihipertensiva, antitumoral, bactericida, neuroprotectora y/o antiinflamatoria (González-Alfonso *et al.*, 2018). En todos los casos se detectaron posibles glicósidos por TLC (Figura 31E-H), que fueron corroborados por ESI-MS, encontrándose que los mayoritarios tienen una molécula de xilobiosa unida (Tabla 21), aunque también se detectaron otros, minoritarios, con una xilotetraosa.

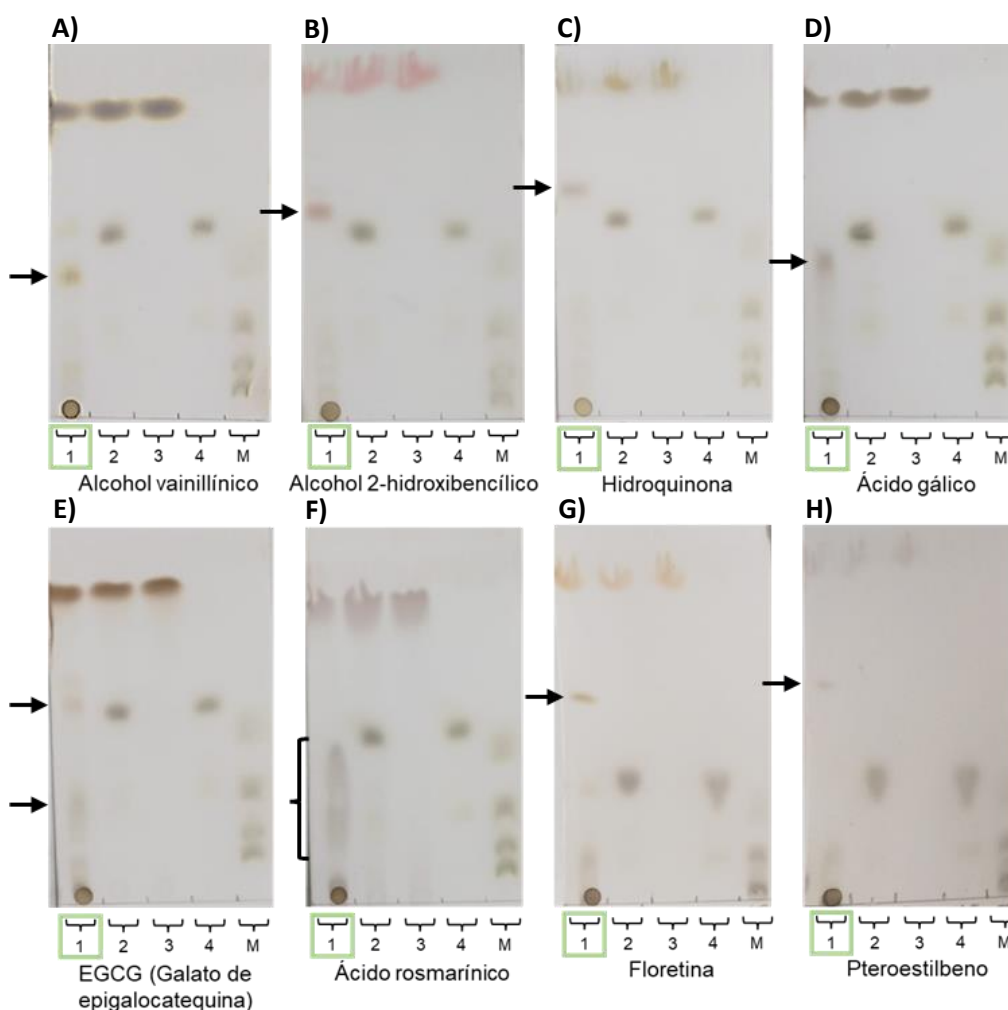


Figura 31. Productos, detectados por cromatografía en capa fina (TLC), de las reacciones de glicosilación catalizadas por la glicosintasa rXynSOS^{E236G}, usando X₂F (donador de xilobiosa) y diferentes moléculas aceptoras, mostradas en el pie de las figuras. Carril 1 (resaltado con un rectángulo verde): mezcla de reacción con los posibles glicósidos indicados con flechas. Carril 2: control negativo con aceptor y X₂F, pero sin catalizador. Carril 3: control negativo con solo la molécula aceptora. Carril 4: control negativo con solo X₂F. Carril M: mezcla de estándares (xilosa, xilobiosa, xilotriosa y xilotetraosa). Las muestras migraron por capilaridad de abajo a arriba.

Para tratar de cuantificar y purificar los glicósidos producidos, los productos de las reacciones se separaron por HPLC, utilizando la columna ZORBAX Eclipse plus C18 (Agilent), de interacción hidrofóbica y fase reversa. Para todos los aceptores se identificó un pico mayoritario, como producto principal de la reacción de glicosilación, excepto en el caso del ácido rosmarínico, en el que se detectaron dos glicósidos mayoritarios. Además, se visualizaron picos minoritarios, que podrían corresponder a glicósidos con la molécula de xilobiosa en una posición diferente a la predominante o que podrían tener una xilotetraosa. En el caso de la floretina, el pterostilbeno y especialmente el ácido rosmarínico, se obtuvieron muchos más picos minoritarios, probablemente debido a que estas moléculas incluyen varios grupos hidroxilo, todos potencialmente glicosilables.

El porcentaje de conversión del glicósido mayoritario de cada reacción, relativo a la concentración inicial del aceptor, se calculó a partir de los cromatogramas. En la Tabla 21 se puede comprobar que los valores más altos se alcanzaron con la hidroquinona (26,0%), ácido gálico (21,7%) y ácido rosmarínico (dos glicósidos mayoritarios de 20,9% y 20,0%, lo que representa una conversión del 40,9% del aceptor).

Tabla 21. Glicósidos mayoritarios obtenidos en las reacciones de glicosilación de distintos aceptores, utilizando la glicosintasa rXynSOS^{E236G} y X₂F como donador de xilobiosa. Se muestra la masa molecular de los glicósidos detectados como aductos de sodio por ESI-MS en el modo positivo, y el porcentaje de conversión de cada uno de ellos calculado por HPLC.

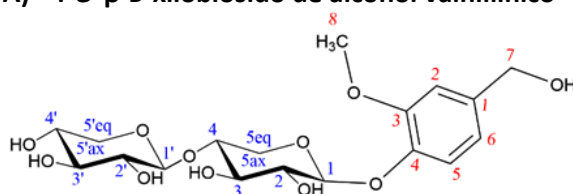
Glicósido	Masa molecular (m/z)	Conversión (%)
Alcohol vainillínico-X ₂	441,1	4,3
Alcohol 2-hidroxibencílico-X ₂	411,0	7,6
Hidroquinona-X ₂	397,0	26,0
Ácido gálico-X ₂	457,1	21,7
Galato de epigallocatequina (EGCG)-X ₂	745,2	1,8
Ácido rosmarínico-X ₂ (dos glicósidos mayoritarios)	647,2	20,9 (1) 20,0 (2)
Floretina-X ₂	561,1	7,8
Pterostilbeno-X ₂	543,3	1,6

Estos resultados confirman que la glicosintasa rXynSOS^{E236G} es una herramienta muy prometedora para la glicosilación de una amplia gama de compuestos fenólicos con propiedades bioactivas, siendo esta la primera vez que se obtienen enzimáticamente estos xilobiósidos utilizando una glicosintasa. Cabe destacar que con algunos de ellos se alcanzan altos niveles de conversión, que se podrían incrementar aún más si se optimizaran las condiciones de reacción, por ejemplo utilizando modelos multiparamétricos capaces de predecir los valores óptimos de concentración de aceptor y donador, dosis de enzima, tiempo, etc. (Méndez-Líter *et al.*, 2019; Nieto-Domínguez *et al.*, 2016, 2019).

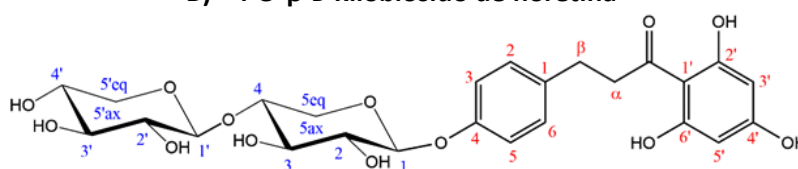
2.5. Identificación de glicósidos

Con el fin de caracterizar la regioselectividad de estas reacciones y la estructura de los glicósidos mayoritarios obtenidos con alcohol vainillínico, floretina y ácido rosmarínico, los productos de reacción se purificaron por HPLC y se analizaron por RMN. Estos glicósidos fueron seleccionados teniendo en cuenta su porcentaje de conversión, facilidad de purificación e interés biotecnológico. Las estructuras deducidas de los glicósidos se muestran en la Figura 32, y los desplazamientos químicos correspondientes en las Anexo 1- Tablas 1,2,3.

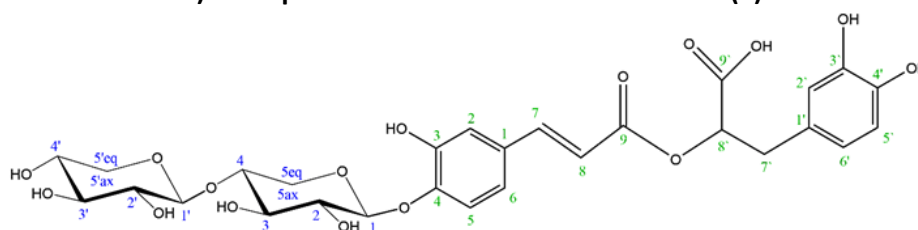
A) 4-O-β-D-xilobiósido de alcohol vainillínico



B) 4-O-β-D-xilobiósido de floretina



C) 4-O-β-D-xilobiósido de ácido rosmarínico (1)



D) 3-O-β-D-xilobiósido de ácido rosmarínico (2)

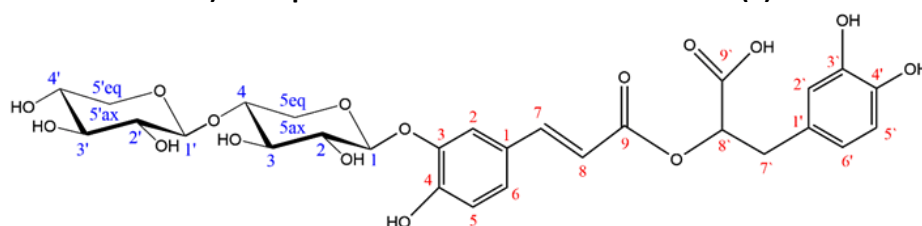


Figura 32. Identificación por RMN de las estructuras moleculares de los glicósidos mayoritarios sintetizados por rXynSOS^{E236G}, utilizando X₂F como donador de xilobiosa, y alcohol vainillínico, floretina y ácido rosmarínico como aceptores. Cada átomo de C y su protón asociado está numerado en las moléculas para facilitar la identificación de las señales en los espectros de RMN (Anexo 1- Figuras 4,5,6,7).

En el caso del xilobiósido de alcohol vainillínico, la glicosintasa unió la xilobiosa al grupo hidroxilo aromático del alcohol vainillínico (Figura 32A), generándose el 4-O-β-D-xilobiósido de alcohol vainillínico. Esto se dedujo observando el desplazamiento a campo bajo del protón

anomérico H1 en configuración β del extremo reductor de la xilobiosa (Anexo 1- Figura 6) y el acoplamiento de largo alcance detectado en el espectro HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) entre este H1 y el carbono aromático C4 del alcohol vainillínico (Anexo 1- Figura 6B). Para el xilobiósido de floretina, el principal producto sintetizado tenía la xilobiosa unida al anillo fenólico (Figura 32B). A partir de las correlaciones dipolares, dependientes de la distancia, observadas en el espectro ROESY (*Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy*), entre el H1 anomérico de la xilobiosa y los protones en las posiciones 3 y 5 de la floretina (Anexo 1- Figura 7), se caracterizó la estructura como el 4-*O*- β -D-xilobiósido de floretina. Finalmente, las dos fracciones mayoritarias aisladas de la reacción con ácido rosmarínico se identificaron como xilobiósidos, presentando la molécula de xilobiosa unida al grupo de ácido cafeico/hidroxicinámico del ácido rosmarínico, en la posición 4 en uno de ellos (1) (Figura 32C) y en la posición 3 en el otro (2) (Figura 32D). En el primero, la observación en el espectro ROESY de un pico de cruce entre el H1 anomérico de la xilobiosa y el protón en el carbono 5 del ácido rosmarínico (Anexo 1- Figura 8) confirma la regioquímica del 4-*O*- β -D-xilobiósido de ácido rosmarínico. En el segundo, la correlación ROE ocurrió entre el H1 anomérico de la xilobiosa y el protón en el carbono 2 del ácido rosmarínico (Anexo 1- Figura 9), lo que respalda la regioquímica del 3-*O*- β -D-xilobiósido de ácido rosmarínico.

Anexo 1

atgactctagtaaagtctattctactagcccttgccggcgccacgttgccaggctcaattgaataccgccgcaaaagcagctggt
tgttgactttggtactgctgttgacaatccagacttgagcgactctcaatatattgccaaccttgagaccgagatttcggtcaa
acaccagcaaatgcaatgaaagttagtgacggaatttaactaccgtatacattaagctaagcgatgacaatttagtggaaccac
ggagccgtcccagggttcctatactttcacgcaaggtgaccaaatcgcgagcctggccaagtcaaataatgactactgagatgtca
caacctggtctggtacaaccaattgccatcgtacagtaagcacgcatacacctcttttgcacctgatccacgttagtagactga
ttccgtgttttttagtcacttcgggttcattggacaaacgctaccctcatcgctgccctgaaggagcatatcaatggggtagttacgcat
tacaaggggcagtggttatgcttgggatgttgtaacgaaggatgtcacgttatttttaggctcccttccaaccttacaagtctgtc
atcttcattctgtatagtcacgtcgagctaagtgagtatatagccttgaacgaagacggcacatatcgtcaaaatgtttctaccaat
acatcggcgaggcatacatcccgattgcgtttgctgccgtgcagcagctgaccctaatgccaagctgtactacaacgattacaaca
tcgaatacgtggggcaaaagcaactggtgctcaggcattgtaaaattgattcaggctgccggcggtcgatcgatggtgtgggtc
ttcagtcctcacttcattgtgggatcaacgcctagtcttgccactcagaaagcaaatatggcttcattcacagctcttggtttaatgttg
ccatcactgagctcgacatccgtatgactctccagaaaccacgctcttgaaactcagcagtcaccgactatcagaccaccacta
ctgcctgcgtccagactaaaggttgtgtcggtatcactctatgggactatacagacaagtactcgtgggttcctggtaccttttctggc
cagggtgatgcctgtccatgggactcaagctacaacaagaagccgcatactatggtattcttgctggcttgcaatctggcactagtt
cttcacctcaacttcagtacctaataaccaccacaacgccactactacctaagtactacgccaacaactaccacaaccacta
cctcaggcacaagtgtgcacactggggacaatgcggaggtatcggtggtctcctacgacttgcgtttcacctacactgtca

Figura 1. Secuencia de nucleótidos de *xynSOS*. Los intrones se indican en gris, el péptido señal está subrayado y los codones de los residuos catalíticos ácido/base (E129) y nucleófilo (E236) están resaltados en verde.

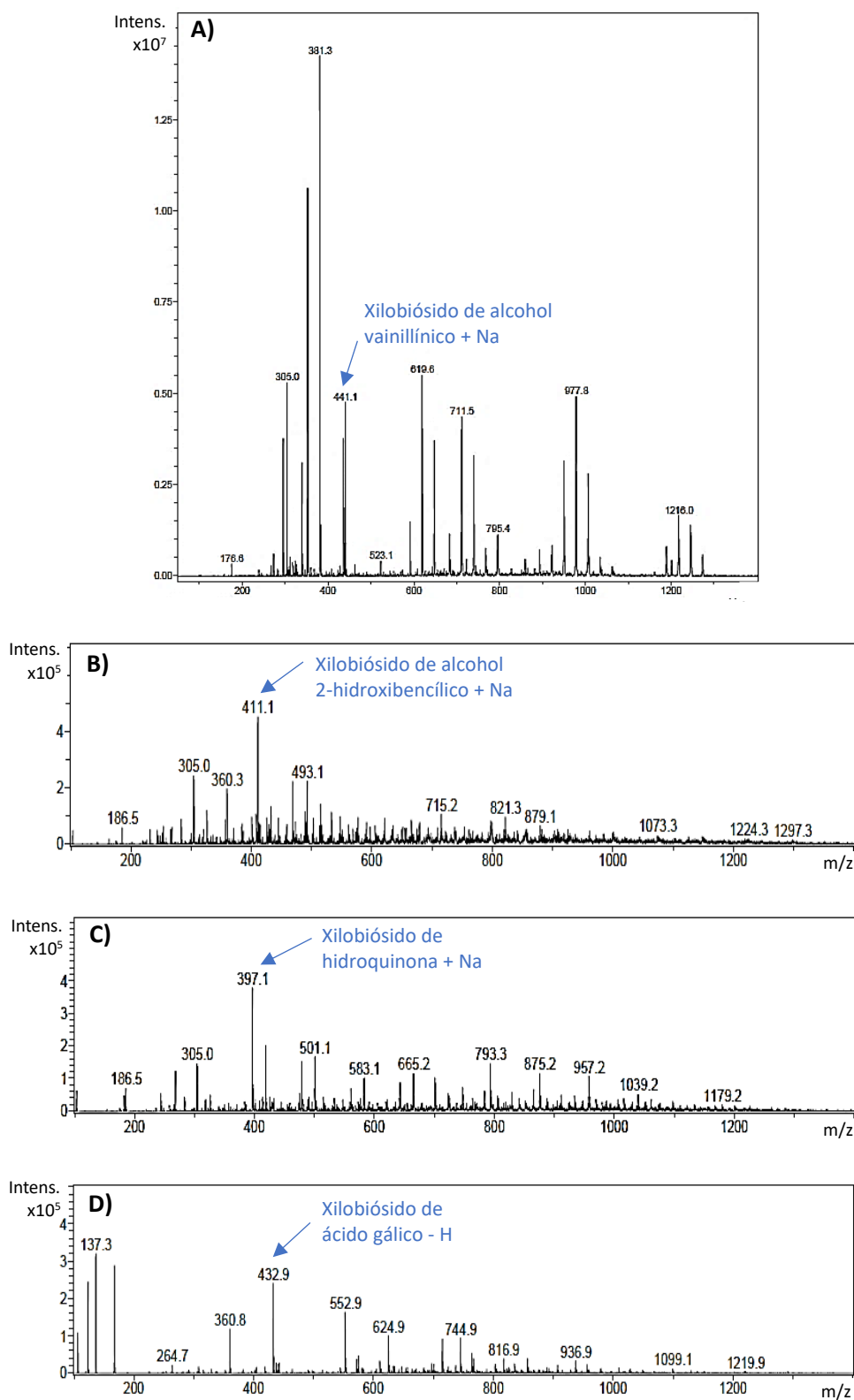


Figura 2. Espectros de ESI-MS de las reacciones de transglucosilación catalizadas por rXynSOS usando *p*NPX₂ como donador de xilobiosa, y diferentes moléculas aceptoras. Las flechas azules indican el m/z de los iones correspondientes a los aductos de los siguientes glicósidos: A) alcohol vainillínico; B) alcohol 2-hidroxibencílico; C) hidroquinona y D) ácido gálico.

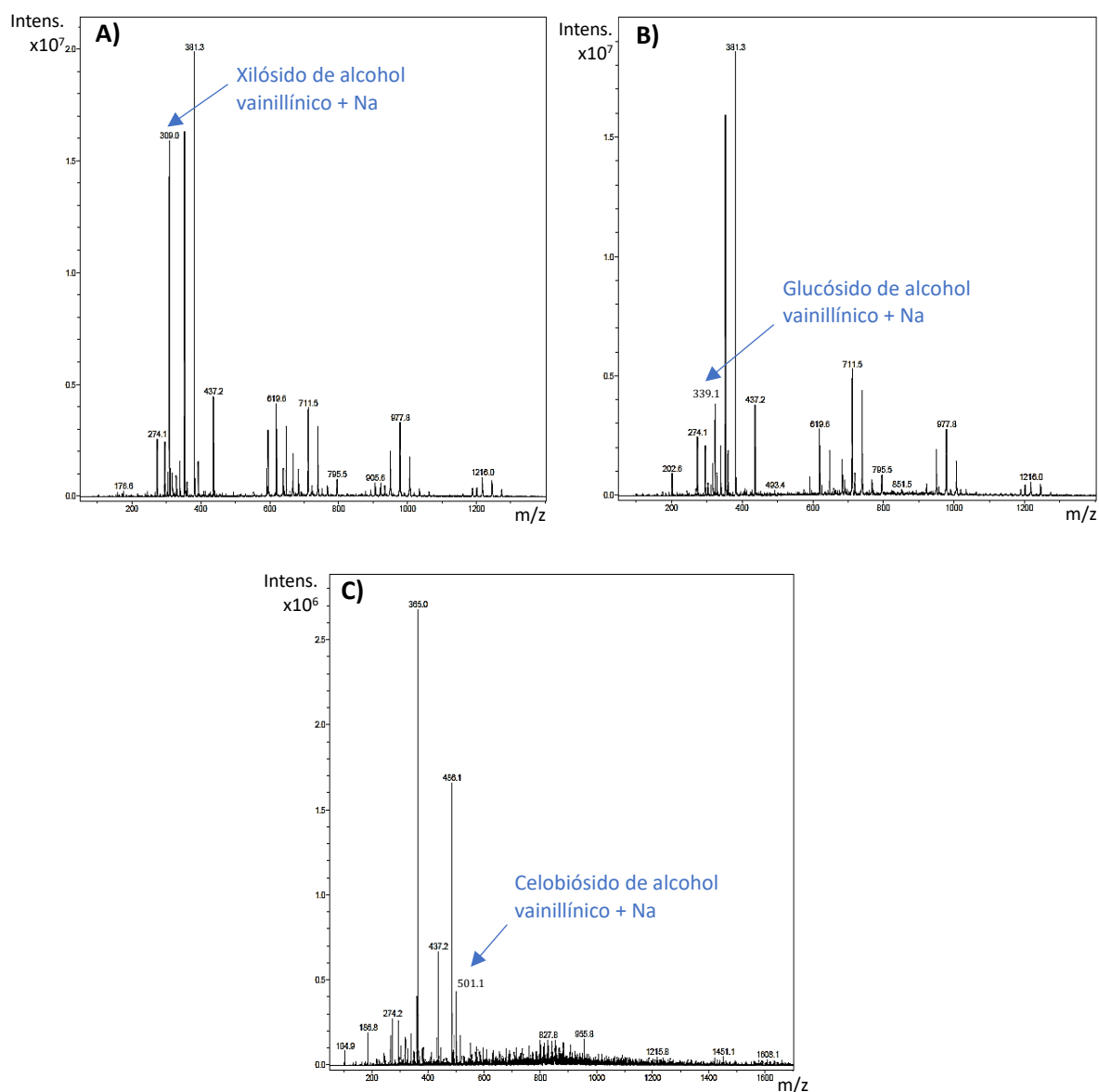


Figura 3. Espectros de ESI-MS de las reacciones de transglucosilación catalizadas por rXynSOS con diferentes donadores de azúcares y alcohol vainillínico como aceptor. Las flechas azules indican el m/z de los iones correspondientes a los aductos de sodio de los glicósidos de alcohol vainillínico obtenidos con: A) *pNPX* como donador de xilosa; B) *pNPG* como donador de glucosa; y C) *pNPG₂* como donador de celobiosa.

Figura 4. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de XynSOS de *T. amestolkiae* (GenBank BHQ10_009513), excluyendo su péptido señal, con las secuencias de endoxilanasas GH10 de los hongos *Aspergillus nidulans* (PDB ID 1TA3), *Penicillium simplicissimum* (PDB ID 1B30) y *Thermoascus aurantiacus* (PDB ID 1K6A). Los números indican la posición de los aminoácidos; los guiones representan huecos en el alineamiento; los asteriscos señalan residuos conservados en las cuatro proteínas, y los puntos muestran cambios conservados en algunas de ellas. Los aminoácidos catalíticos están resaltados en azul (E129, residuo ácido/base) y en verde (E236, residuo nucleófilo), siendo este último el que se sustituyó por glicina y serina. El alineamiento se realizó usando Clustal Omega con los ajustes predeterminados.

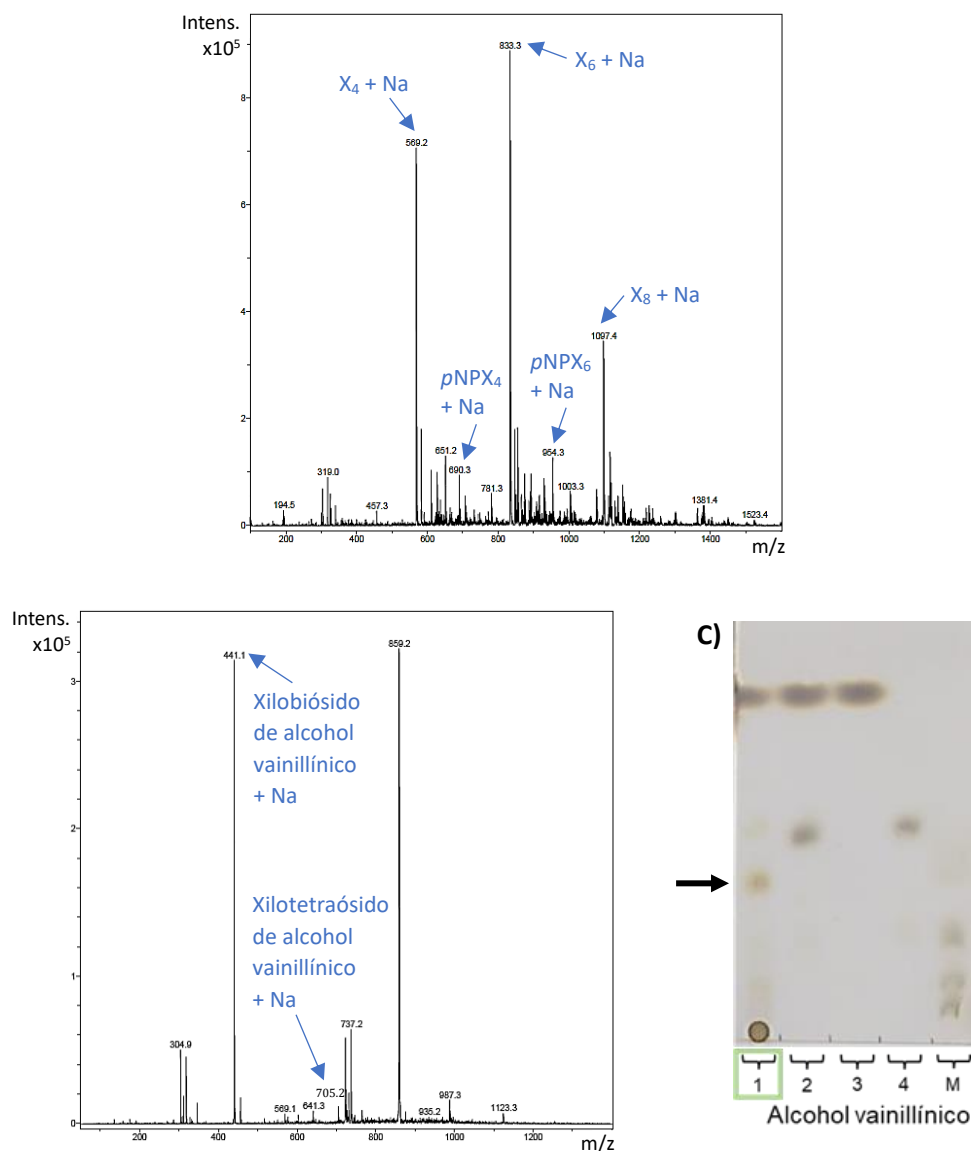


Figura 5. Análisis de los productos obtenidos en las reacciones de glicosilación catalizadas por la glicosintasa rXynSOS^{E236G}, usando X₂F como donador de xilobiosa, y pNPX₂ y alcohol vainillínico como aceptores. A,B) Espectros de ESI-MS en las reacciones con pNPX₂ (A) y alcohol vainillínico (B). Las flechas azules indican los aductos de sodio de los glicósidos. En la reacción con pNPX₂ (A), se detectaron xilooligosacáridos (XOS) de diferentes longitudes (X₄, X₆ y X₈). C) Placa de cromatografía en capa fina (TLC) para detectar glicósidos de alcohol vainillínico (señalados con una flecha).

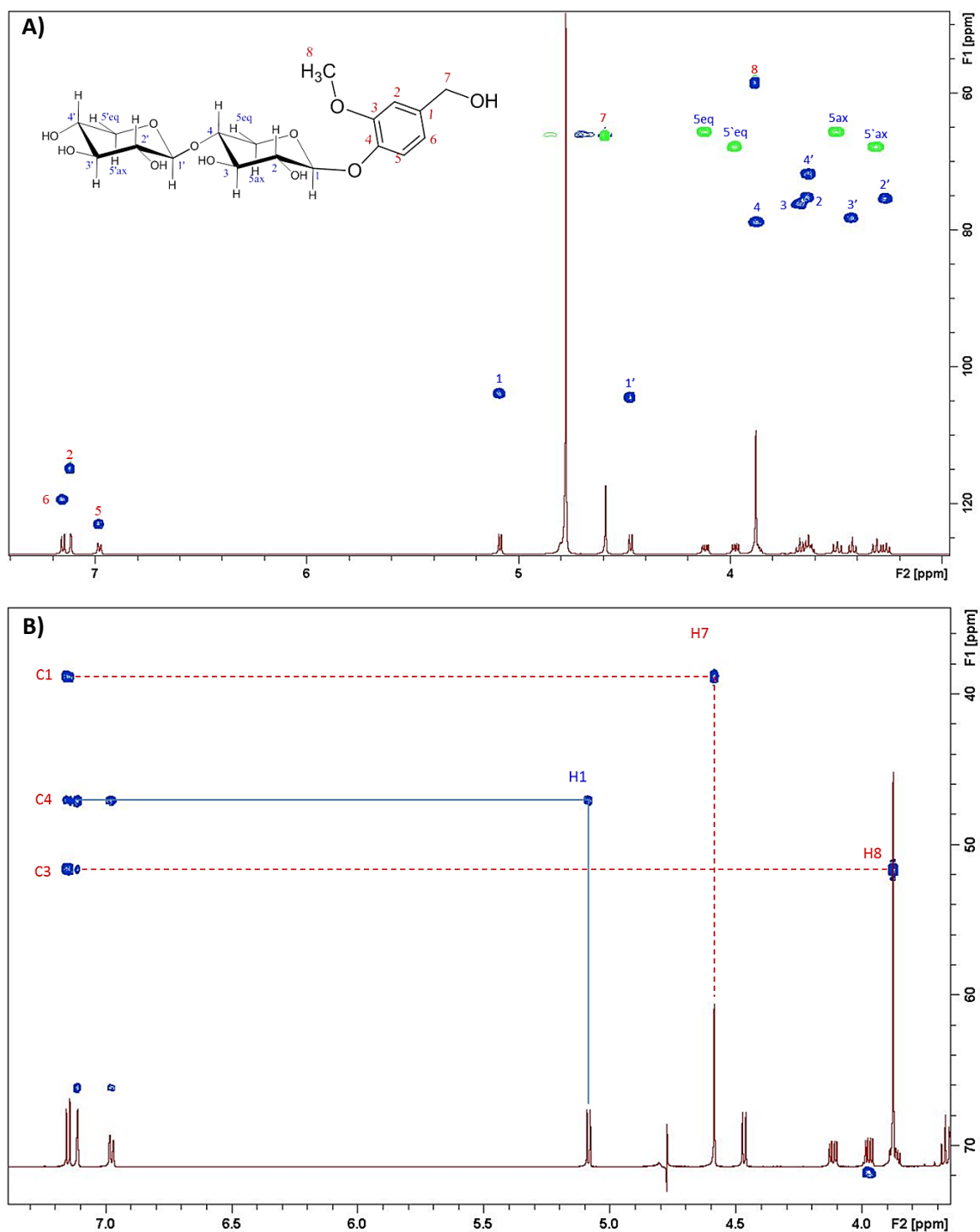


Figura 6. Espectros de RMN del xilobiósido de alcohol vainillínico disuelto en agua deuterada. A) Superposición de los espectros ^1H zg (marrón) y ^1H - ^{13}C HSQC (espectro editado: CH y CH_3 , azul y CH_2 , verde) y asignación: xilobiosa (numeración azul) y alcohol vainillínico (numeración roja). B) Superposición de los espectros HMBC (azul) y ^1H zgpr (marrón). Se destacan las correlaciones de largo alcance ^1H - ^{13}C que muestran la conectividad entre la xilobiosa y el alcohol vainillínico, indicando que esta molécula es 4-O- β -D-xilobiósido de alcohol vainillínico. El espectro HMBC se adquirió con una ventana espectral de 100 ppm centrada en 80 ppm. Los picos de los carbonos aromáticos aparecen en la parte superior del espectro desplazados 100 ppm.

Tabla 1. Desplazamientos químicos observados para el xilobiósido (X₂) de alcohol vainillínico (Vain), disuelto en agua deuterada. Los desplazamientos químicos se calcularon tomando como referencia la señal residual de agua, establecida en 4,77 ppm a 298 K.

	¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)
1 X ₂	5,08	103,5
2 X ₂	3,6	75,2
3 X ₂	3,67	76,0
4 X ₂	3,8	78,7
5 ax X ₂	3,49	65,5
5 eq X ₂	4,1	65,68
1' X ₂	4,46	104,49
2' X ₂	3,26	75,3
3' X ₂	3,4	78,18
4' X ₂	3,6	71,7
5'ax X ₂	3,3	67,67
5'eq X ₂	3,97	67,6

	¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)
1 Vain		138,7*
2 Vain	7,11	114,9
3 Vain		151,6*
4 Vain		147,2*
5 Vain	6,9	123,0
6 Vain	7,15	126,8
7 Vain	4,58	66,14
8 Vain	3,87	58,37

*Asignaciones derivadas del espectro HMBC

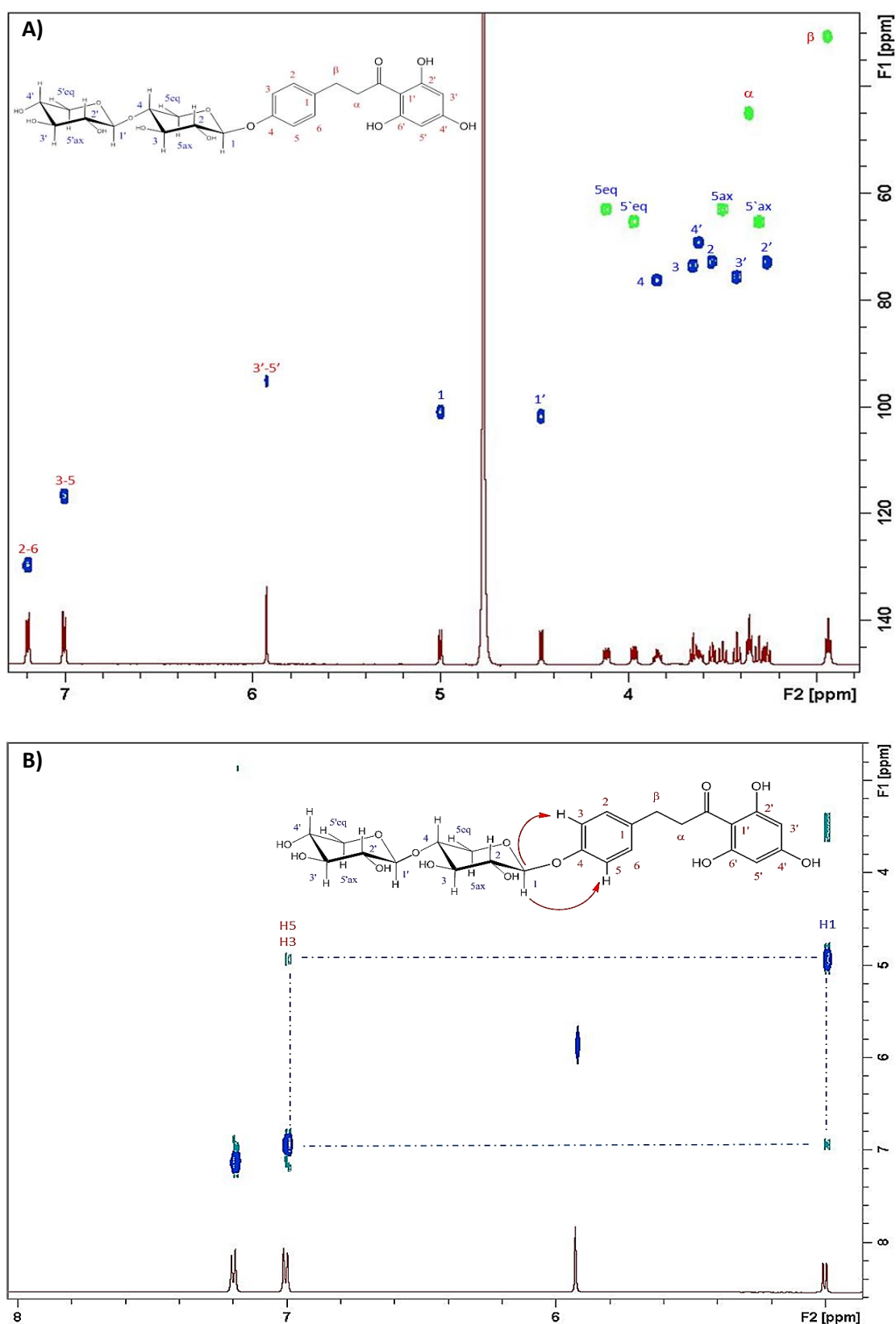


Figura 7. Espectros de RMN del xilobiósido de floretina, disuelto en agua deuterada. A) Superposición de los espectros ^1H zg (marrón) y ^1H - ^{13}C HSQC (espectro editado: CH y CH_3 , azul y CH_2 , verde) y asignaciones: xilobiosa (numeración azul) y floretina (numeración roja). B) Superposición de los espectros ROESY (picos diagonal, azul y picos de cruce ROE, verde) y ^1H zg (marrón) con la correlación ROE destacada entre ^1H 1 y ^1H 3 y 5 de la floretina, indicando que esta molécula es un 4-O- β -D-xilobiósido de floretina.

Tabla 2. Desplazamientos químicos observados para el xilobiósido (X₂) de floretina (Flor), disuelto en agua deuterada. Los desplazamientos químicos se calcularon tomando como referencia la señal residual de agua, establecida en 4,77 ppm a 298 K.

	¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)
1 X ₂	5,0	100,97
2 X ₂	3,55	72,81
3 X ₂	3,65	73,58
4 X ₂	3,84	76,21
5 ax X ₂	3,49	63,11
5 eq X ₂	4,12	62,97
1' X ₂	4,46	101,78
2' X ₂	3,26	72,87
3' X ₂	3,42	75,67
4' X ₂	3,62	69,27
5'ax X ₂	3,3	65,33
5'eq X ₂	3,97	65,32

	¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)
1 Flor		135,4*
2 (6) Flor	7,19	129,66
3 (5) Flor	7,01	116,71
4 Flor		154,6*
α Flor	2,93	30,69
β Flor	3,35	44,9
C=O Flor		206*
1' Flor		104*
2' (6') Flor		163,5*
3' (5') Flor	5,93	95,21
4' Flor		163,5*

*Asignaciones derivadas del espectro HMBC

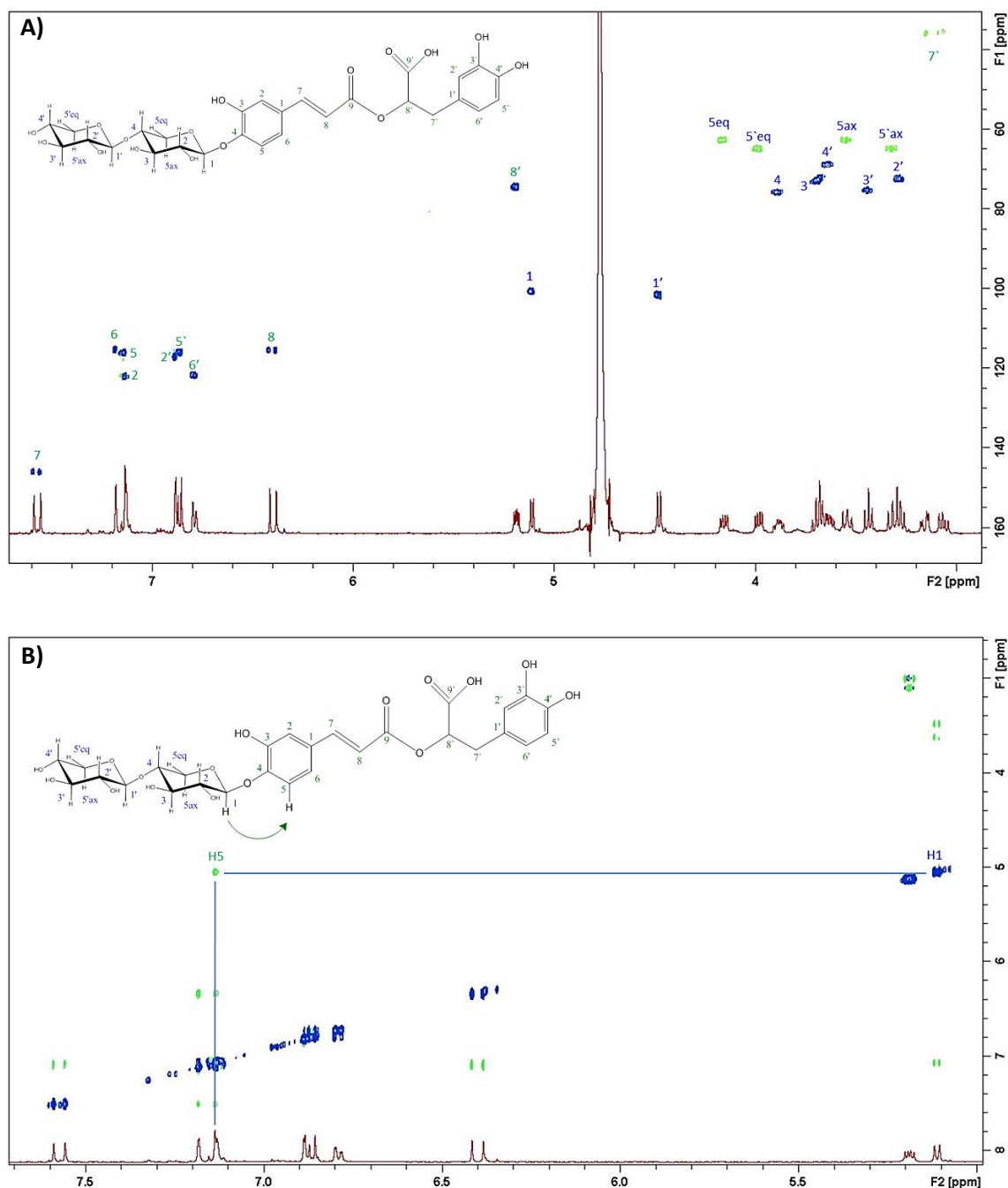


Figura 8. Espectros de RMN del xilobiósido de ácido rosmarínico (1), disuelto en agua deuterada. A) Superposición de los espectros ^1H zg (marrón) y ^1H - ^{13}C HSQC (espectro editado: CH y CH_3 , azul y CH_2 , verde) y asignaciones: xilobiosa (numeración azul) y ácido rosmarínico (numeración verde). B) Superposición de los espectros ROESY (picos diagonal, azul y picos de cruce ROE, verde) y ^1H zg (marrón) con la correlación ROE destacada entre ^1H 1 de la xilobiosa y ^1H 5 del ácido rosmarínico (línea azul), indicando que esta molécula es un 4-O- β -D-xilobiósido de ácido rosmarínico.

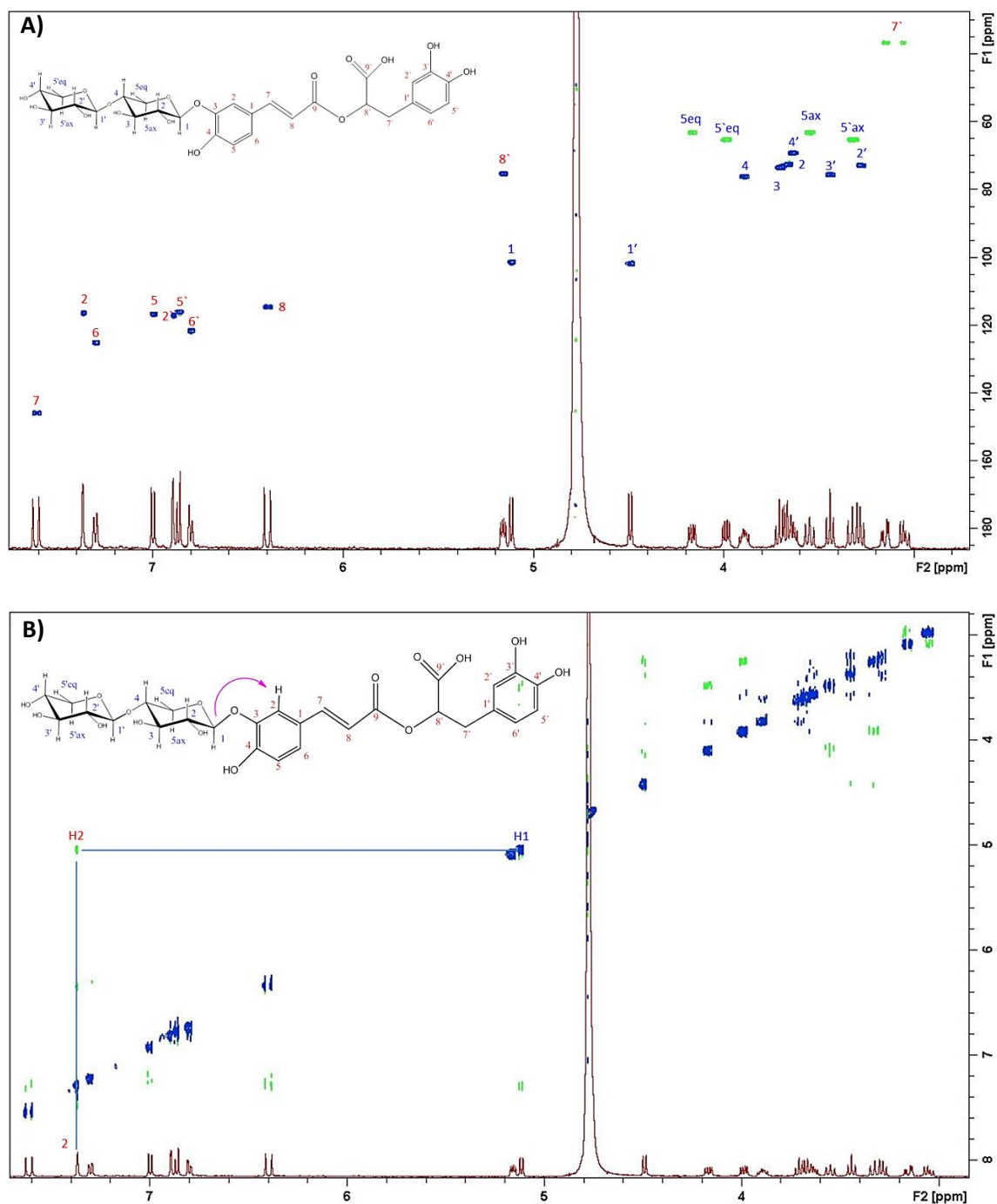


Figura 9. Espectros de RMN del xilobiósido de ácido rosmarínico (2), disuelto en agua deuterada. A) Superposición de los espectros ^1H zg (marrón) y ^1H - ^{13}C HSQC (espectro editado: CH y CH_3 , azul y CH_2 , verde) y asignaciones: xilobiosa (numeración azul) y ácido rosmarínico (numeración roja). B) Superposición de los espectros ROESY (picos diagonal, azul y picos de cruce ROE, verde) y ^1H zg (marrón) con la correlación ROE destacada entre ^1H 1 de la xilobiosa y ^1H 2 del ácido rosmarínico (línea azul), indicando que esta molécula es un 3-O- β -D-xilobiósido de ácido rosmarínico.

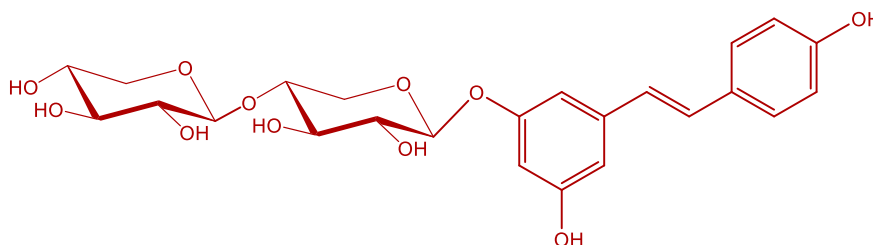
Tabla 3. Desplazamientos químicos observados para los xilobiósidos (X₂) de ácido rosmarínico (Rosm) (1) y (2), disueltos en agua deuterada. Los desplazamientos químicos se calcularon tomando como referencia la señal residual de agua, establecida en 4,77 ppm a 298 K.

Xilobiósido de ácido rosmarínico (1)			Xilobiósido de ácido rosmarínico (2)		
	¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)		¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)
1 X ₂	5,12	100,5	1 X ₂	5,11	101,4
2 X ₂	3,66	72,2	2 X ₂	3,66	62,6
3 X ₂	3,7	73,1	3 X ₂	3,7	73,5
4 X ₂	3,9	75,7	4	3,89	76,0
5 ax X ₂	3,56	64,8	5 ax X ₂	3,5	63,1
5 eq X ₂	4,17	62,6	5 eq X ₂	4,16	63,3
1' X ₂	4,49	101,5	1' X ₂	4,5	101,7
2' X ₂	3,2	72,2	2' X ₂	3,2	72,8
3' X ₂	3,4	75,1	3' X ₂	3,4	75,4
4' X ₂	3,6	68,9	4' X ₂	3,6	69,0
5'ax X ₂	3,33	64,6	5'ax X ₂	3,3	65,1
5'eq X ₂	4,0	64,8	5'eq X ₂	3,99	65,1
1 Rosm		129,5*	1 Rosm		126,81*
2 Rosm	7,13	122,2	2 Rosm	7,36	116,6
3 Rosm		145,5*	3 Rosm		144,13*
4 Rosm		146,4*	4 Rosm		148,2*
5 Rosm	7,13	116,2	5 Rosm	6,99	116,6
6 Rosm	7,18	115,5	6 Rosm	7,3	125,12
7 Rosm	7,57	146	7 Rosm	7,6	145,8
8 Rosm	6,4	115,4	8 Rosm	6,39	114,6
9 Rosm		168,3*	9 Rosm		168,4*
1' Rosm		129,1*	1' Rosm		128,9*
2' Rosm	6,89	117,3	2' Rosm	6,89	117,0
3' Rosm		143*	3' Rosm		143,4*
4' Rosm		143,8*	4' Rosm		142,8
5' Rosm	6,79	121,8	5' Rosm	6,8	116,0
6' Rosm	6,79	121,8	6' Rosm	6,8	121,5
7' Rosm	3,1	35,8	7' Rosm	3,14	36,7
7' Rosm	3,2	35,8	7' Rosm	3,04	36,7
8' Rosm	5,2	74,4	8' Rosm	5,1	75,2
9' Rosm		175,0*	9' Rosm		175,8*

*Asignaciones derivadas del espectro HMBC

CAPÍTULO 2

Síntesis y caracterización de un nuevo xilobiósido de resveratrol obtenido con la glicosintasa rXynSOS^{E236G}



Adaptado de la publicación:

Pozo-Rodríguez A., Méndez-Líter J.A., García-Villalba R., Beltrán D., Calviño E., Santana A.G., de Eugenio L.I., Cañada F.J., Prieto A., Barriuso J., Tomás-Barberán F.A., Martínez M.J. (2022). Synthesis and Characterization of a Novel Resveratrol Xylobioside Obtained Using a Mutagenic Variant of a GH10 Endoxylanase. *Antioxidants*. 12(1), 85. doi: 10.3390/antiox12010085.

Antecedentes

En el Capítulo 1 se desarrolló una glicosintasa a partir de la endoxilanasas GH10 (rXynSOS) de *T. amestolkiae*, sustituyendo su residuo nucleófilo E236 por una glicina (rXynSOS^{E236G}). Esta nueva glicosintasa une, de manera eficiente, una molécula de xilobiosa a una amplia gama de compuestos fenólicos con distintas aplicaciones biotecnológicas. En trabajos previos se ha comprobado que la glicosilación de galato de epigallocatequina (EGCG), floretina, pterostilbeno e hidroxitirosol, mejoraba su solubilidad y propiedades bioactivas (Gonzalez-Alfonso *et al.*, 2021; González-Alfonso *et al.*, 2018; Méndez-Líter *et al.*, 2022; Nieto-Domínguez *et al.*, 2017a). Esta glicosilación puede ser química o enzimática, pero esta última presenta ventajas, ya que es un proceso sostenible, no genera subproductos tóxicos, y no requiere pasos de protección y desprotección de grupos funcionales que eviten la falta de regio- y estereoselectividad (Hayes & Pietruszka, 2017; Wen *et al.*, 2018).

El resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) es un polifenol natural que pertenece al grupo de los estilbenoides y está presente en muchas plantas y frutas, como cacahuètes, moras, arándanos, frambuesas y, especialmente, uvas (Perrone *et al.*, 2017). Numerosos estudios *in vitro* han demostrado que el resveratrol tiene propiedades antioxidantes y diferentes beneficios para la salud, incluyendo actividades antitumorales y antiinflamatorias, protección cardiovascular y neuronal e incluso efectos antienvjecimiento (Baur & Sinclair, 2006). Pese a que el resveratrol es un compuesto muy prometedor para las industrias farmacéutica, nutracéutica y cosmética (Baur & Sinclair, 2006; Robinson *et al.*, 2015), su aplicación *in vivo* sigue siendo un desafío, debido a su baja solubilidad en agua (0,03–0,05 g/L) y su extenso metabolismo. En este sentido, aunque tras una dosis oral la absorción de resveratrol es muy alta (alrededor del 75%), su rápida conversión metabólica, en el intestino delgado y en el hígado, hace que su concentración en sangre sea muy baja y, por tanto, su biodisponibilidad en los tejidos se reduzca a un 1% (Gambini *et al.*, 2015; Walle, 2011). Para abordar estas limitaciones, se planteó, en este capítulo, la glicosilación enzimática del resveratrol utilizando rXynSOS^{E236G}.

1. Glicosilación del resveratrol con la glicosintasa rXynSOS^{E236G}

La capacidad de rXynSOS^{E236G} para producir glicósidos de resveratrol se ensayó utilizando X₂F como donador de xilobiosa. Debido a su extremadamente baja solubilidad en agua, la cantidad de resveratrol que se podía añadir a las reacciones, sin que precipitara, era muy baja. Para aumentar la solubilidad de este compuesto se evaluaron diferentes solventes, considerando al mismo tiempo la posible inhibición enzimática. Inicialmente, se descartó el uso de etanol y metanol, por ser potenciales aceptores de glicosilación de rXynSOS^{E236G}, y se decidió probar acetona, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) y acetonitrilo a concentraciones de

10 a 50% (v/v). El mayor porcentaje de conversión de resveratrol se obtuvo con acetonitrilo al 20% (v/v) (datos no mostrados), por lo que los siguientes experimentos se llevaron a cabo en estas condiciones ya que permitían el uso de concentraciones más altas de resveratrol, sin comprometer la actividad de la glicosintasa rXynSOS^{E236G}.

Basándose en estos primeros experimentos, la reacción de glicosilación estándar se llevó a cabo con 10 mM de resveratrol, 20 mM de X₂F y 4 g/L de rXynSOS^{E236G}, en 20% (v/v) de acetonitrilo. Tras 16 h de incubación, los posibles glicósidos de resveratrol se analizaron por TLC. En el Carril 2 de la Figura 33A se muestra el control negativo con resveratrol (banda superior) y X₂F (banda inferior). En el Carril 1, correspondiente a la mezcla de reacción de glicosilación, la banda del resveratrol sigue presente, la de la X₂F desaparece y se observa una banda intensa junto con otra más tenue y difusa en la parte baja de la placa, lo que podría sugerir la presencia de una mezcla de glicósidos de resveratrol. El análisis por ESI-MS confirmó estos resultados (Figura 33B), ya que la masa molecular del compuesto asociado al pico de intensidad más alto coincidió con la del aducto de sodio del xilobiósido de resveratrol. También se detectaron, como aductos de sodio, compuestos cuyas masas moleculares eran equivalentes a las de glicósidos más largos con cuatro y seis unidades de xilosa unidas al resveratrol. Esto indica que rXynSOS^{E236G} produce varios glicoconjugados de resveratrol, incorporando moléculas de xilobiosa a diferentes grupos -OH del resveratrol o formando cadenas más largas en una sola posición. Además, la identificación de xilotetraosa como uno de los productos de reacción respaldó el potencial de la enzima, previamente documentado en el Capítulo 1, para sintetizar xilooligosacáridos.

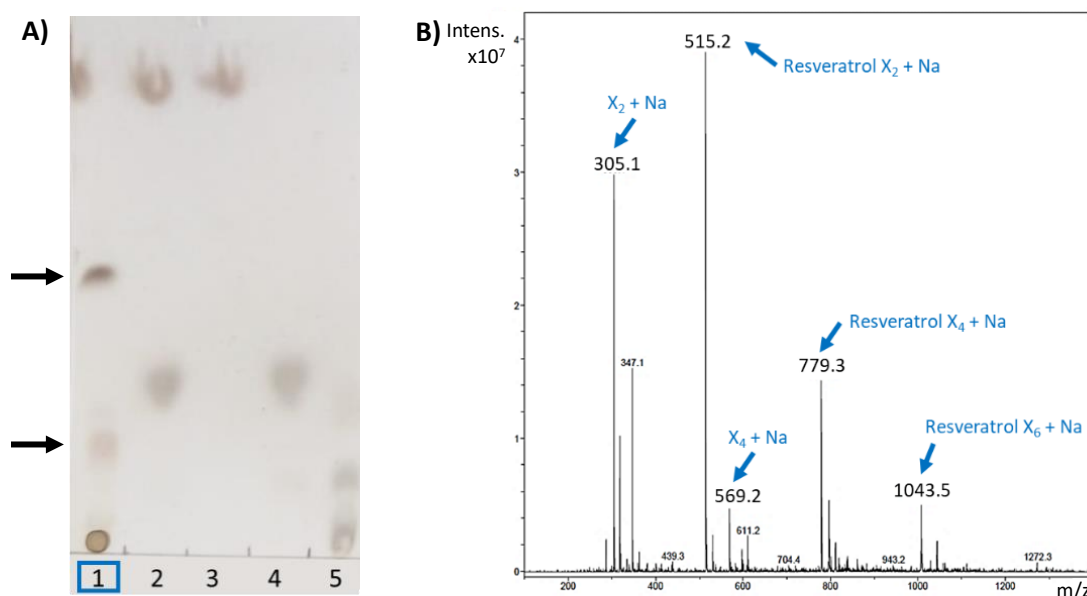


Figura 33. Análisis de la reacción estándar de glicosilación del resveratrol, catalizada por la glicosintasa rXynSOS^{E236G} utilizando X₂F como donador de xilobiosa. A) Cromatografía en capa fina (TLC). Carril 1: mezcla de reacción que contiene resveratrol, X₂F, rXynSOS^{E236G} y los productos generados. Carriles 2-4: controles negativos con resveratrol y X₂F (Carril 2), resveratrol (Carril 3) o X₂F (Carril 4). Carril 5: estándares de xilosa, xilobiosa, xilotriosa y xilotetraosa. B) Espectro de ESI-MS, en el modo positivo, de la mezcla de reacción. El m/z de los iones correspondientes a los aductos de sodio de los glicósidos de resveratrol, xilobiosa y xilotetraosa, se indican con flechas azules. El resveratrol no fue detectado en este espectro, pero fue claramente visible en el espectro en el modo negativo (Anexo 2- Figura 1).

2. Purificación y análisis por RMN de los glicósidos de resveratrol

Los productos de reacción se separaron por HPLC, usando la columna de interacción hidrofóbica y fase reversa ZORBAX Eclipse plus C18 (Agilent), para tratar de purificarlos y caracterizarlos. El cromatograma muestra que rXynSOS^{E236G} genera un perfil de glicosilación con diferentes productos (Figura 34). Dos de ellos están bien separados: el mayoritario (glicósido 1) eluyó a los 2,38 min, y el minoritario (glicósido 2) a los 1,97 min. Además, se observaron varios picos, también minoritarios, a tiempos más cortos que no pudieron ser separados completamente.

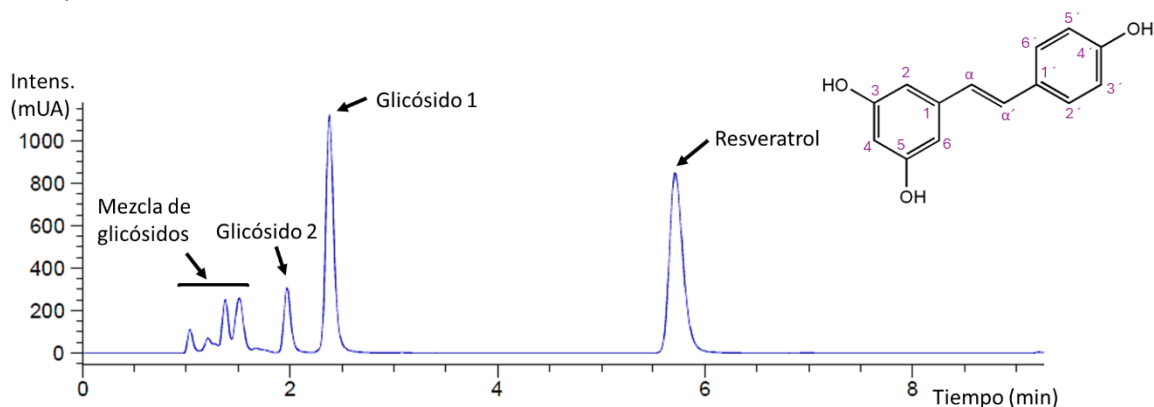
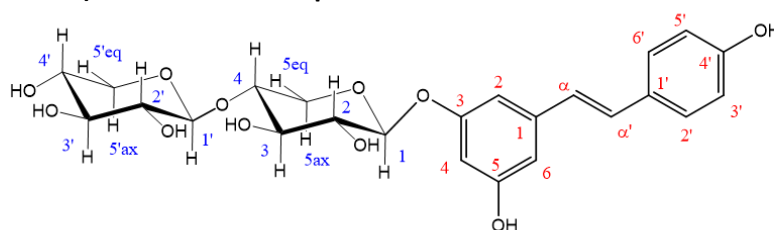


Figura 34. Cromatograma ($\lambda = 270$ nm) que muestra los glicósidos de resveratrol sintetizados por rXynSOS^{E236G} con X₂F. El resveratrol eluyó a 5,71 min, el pico mayoritario (glicósido 1) a 2,38 min, el minoritario (glicósido 2) a 1,97 min y una mezcla de picos minoritarios (posiblemente otros glicósidos) a tiempos más cortos.

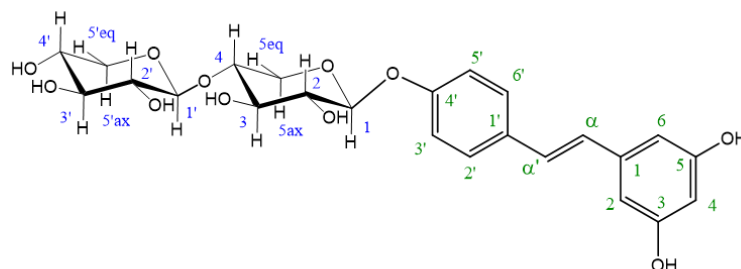
Teniendo en cuenta que el resveratrol tiene tres posibles sitios de glicosilación (3, 5 y 4') (Figura 34), los picos detectados en el cromatograma podrían corresponder a distintos glicósidos. Por ello, las fracciones con los glicósidos 1 y 2 fueron purificadas, y se caracterizaron por RMN. Las estructuras de estos glicósidos se muestran en la Figura 35, y sus espectros de RMN y desplazamientos químicos en las Anexo 2- Figuras 2,3 y Anexo 2- Tablas 1,2, respectivamente.

En el caso del glicósido 1, la glicosintasa unió el residuo de xilobiosa al grupo 3-OH del resveratrol (Figura 35A), como se deduce de las correlaciones en el espectro ROESY entre el H1 anomérico de la xilobiosa y los protones en las posiciones 2 y 4 del resveratrol (Anexo 2- Figura 2), lo que corresponde a la regioquímica del 3-O- β -D-xilobiósido de resveratrol.

A) Glicósido 1: 3-O- β -D-xilobiósido de resveratrol



B) Glicósido 2: 4'-O- β -D-xilobiósido de resveratrol



C) Glicósido 2: 3-O- β -D-xilotetraósido de resveratrol

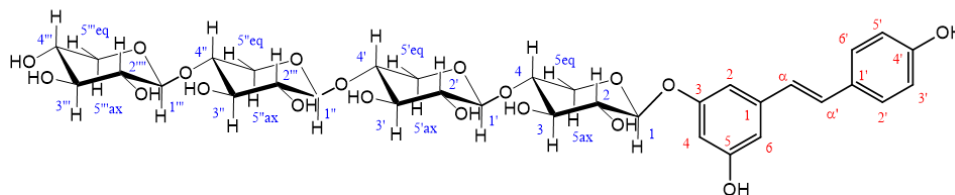


Figura 35. Estructuras moleculares, deducidas por RMN, de los glicósidos de resveratrol sintetizados con rXynSOS^{E236G} y X₂F. A) Glicósido 1: 3-O- β -D-xilobiósido de resveratrol. B, C) Mezcla de productos encontrados en el glicósido 2: 4'-O- β -D-xilobiósido de resveratrol (B) y 3-O- β -D-xilotetraósido de resveratrol (C). Cada átomo de carbono y su protón asociado están numerados en las moléculas para facilitar la identificación de las señales en los espectros (Anexo 2- Figuras 2,3).

Los análisis de RMN también determinaron que el glicósido 2 era una mezcla de dos glicoconjugados diferentes. El predominante se caracterizó como 4'-O- β -D-xilobiósido de resveratrol (Figura 35B), ya que presentaba la molécula de xilobiosa unida al grupo 4'-OH del resveratrol, como se observó en el cruce ROESY entre el H1 anomérico de la xilobiosa y los

protones en los carbonos 3' y 5' del resveratrol (Anexo 2- Figura 3A). El otro glicósido presentaba mayor masa molecular y se identificó, tentativamente, como 3-O-β-D-xilotetraósido de resveratrol (Figura 35C), en base a su espectro DOSY (Anexo 2- Figura 3B). En la mezcla del glicósido 2, el 4'-O-β-D-xilobiósido de resveratrol estaba presente con una abundancia 3 veces mayor que el 3-O-β-D-xilotetraósido de resveratrol (Anexo 2- Figura 3), como se deduce de las integraciones relativas de los picos detectados a 7,58 ppm (protones H2' y H6' del 4'-O-β-D-xilobiósido de resveratrol) y a 7,52 ppm (protones H2' y H6' del 3-O-β-D-xilotetraósido de resveratrol).

De acuerdo con la información disponible hasta la fecha, esta es la primera vez que se sintetizan xilobiósidos de resveratrol u otros derivados pentosilglicosilados. Por el contrario, sí que se ha documentado la producción de α-glucósidos y α-maltósidos con ciclodextrina glucanotransferasas (Marié *et al.*, 2018; Torres *et al.*, 2011) y amilosacarasas (Moon *et al.*, 2021) y de β-diglucósidos y β-triglucósidos con UDP glucosiltransferasas (Lepak *et al.*, 2015; Pandey *et al.*, 2014). También se han sintetizado glicósidos con otras hexosas o desoxihexosas, como galactósidos, ramnósidos y fucósidos (Pandey *et al.*, 2014).

Estos nuevos glicoconjugados podrían ser de gran interés en diferentes sectores industriales, ya que teóricamente serían más solubles que el aglicón, y podrían mejorar su biodisponibilidad e incluso sus propiedades bioactivas, tal y como se ha descrito en trabajos previos con otros glicósidos de resveratrol (Fakhri *et al.*, 2021; Shimoda *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2022). Para tratar de estudiar las propiedades del 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol, glicósido mayoritario conseguido en la síntesis enzimática de este polifenol con rXynSOS^{E236G}, primero ha de ser producido en mayores cantidades, por lo que se optimizó su síntesis.

3. Optimización de la síntesis de 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol

La Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) fue la estrategia seguida para optimizar la producción de 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol. Esta metodología consiste en el uso de un conjunto de técnicas estadísticas para modelar y analizar la respuesta de un proceso en función de múltiples variables cuantificables. Para estimar eficazmente las variables del modelo, es fundamental aplicar un diseño experimental adecuado, siendo el de Box-Behnken uno de los más destacados. Este diseño experimental ajusta superficies de respuesta con, al menos, tres variables, utilizando tres niveles para cada una (-1, 0, +1) (Dean *et al.*, 2017).

En el caso de la síntesis de 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol, las variables que se querían modelar eran las concentraciones de donador y aceptor, la dosis de enzima y el tiempo de reacción. El pH se fijó en 5 y la temperatura en 25 °C. La producción (mM) y la conversión (%) del 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol fueron las respuestas seleccionadas para la optimización. La

matriz de experimentos generada por el software *Design Expert* estaba compuesta por las 29 reacciones que se encuentran en la Tabla 22. Los resultados de producciones y conversiones (%) obtenidos, en cada una de estas reacciones, se utilizaron para generar un modelo polinómico cuadrático, cuyo comportamiento se describe en las ecuaciones mostradas en la Anexo 2- Ecuación 1. El diseño experimental fue validado mediante un análisis de varianza realizado por el *software*.

Tabla 22. Matriz de experimentos generada por el *software* Design Expert, aplicando la Metodología de Superficie de Respuesta y el diseño Box-Behnken, para estudiar la síntesis de 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol con rXynSOS^{E236G} y X₂F.

#	Variables				Respuestas	
	[Resveratrol] (mM)	[X ₂ F] (mM)	[rXynSOS ^{E236G}] (g/L)	Tiempo (h)	[3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol] (mM)	Conversión (%)
1	6	17,5	4	0,5	1,800	30,001
2	2	17,5	4	2,75	0,284	14,202
3	6	5	4	2,75	1,906	31,768
4	6	17,5	0,5	0,5	0,818	13,635
5	2	17,5	0,5	2,75	0,414	20,697
6	6	17,5	2,25	2,75	1,786	29,760
7	2	30	2,25	2,75	0,366	18,291
8	6	30	2,25	0,5	1,859	30,975
9	6	17,5	4	5	1,709	28,486
10	2	17,5	2,25	5	0,293	14,641
11	6	17,5	2,25	2,75	1,620	26,993
12	6	30	4	2,75	1,285	21,419
13	2	5	2,25	2,75	0,572	28,597
14	2	17,5	2,25	0,5	0,478	23,924
15	10	17,5	2,25	5	3,170	31,698
16	6	30	2,25	5	1,328	22,133
17	6	30	0,5	2,75	1,386	23,095
18	6	5	2,25	0,5	1,636	27,261
19	6	17,5	2,25	2,75	1,798	29,974
20	6	17,5	2,25	2,75	1,819	30,318
21	10	17,5	0,5	2,75	1,460	14,604
22	10	17,5	2,25	0,5	2,956	29,556
23	10	5	2,25	2,75	2,081	20,806
24	6	17,5	0,5	5	1,818	30,304
25	10	17,5	4	2,75	3,191	31,906
26	6	5	2,25	5	1,563	26,055
27	10	30	2,25	2,75	2,833	28,329
28	6	5	0,5	2,75	1,468	24,462
29	6	17,5	2,25	2,75	1,774	29,559

A partir de las reacciones diseñadas para elaborar el modelo, se deduce que las mayores producciones se alcanzan con la concentración máxima de resveratrol (10 mM), concentraciones moderadas o elevadas de X_2F (17,5 y 30 mM) y diferentes combinaciones de dosis de enzima y tiempos de reacción (Tabla 22). En cuanto al porcentaje de conversión, los estudios previos, realizados en el grupo de investigación con otros procesos de glicosilación, indicaban que los mejores resultados se obtenían con bajas concentraciones de aceptor y altas concentraciones de donador (Méndez-Líter *et al.*, 2019, 2022). Sin embargo, en el caso del resveratrol, estas condiciones de reacción condujeron a una disminución del porcentaje de conversión del 3-*O*- β -D-xilobiósido de resveratrol, mientras que se detectó una mejora en la síntesis del resto de glicoconjugados eluidos a tiempos más cortos (correspondiente a la mezcla de glicósidos de la Figura 34). La alta versatilidad de la enzima podría explicar estos resultados puesto que, cuando todos los grupos -OH en la posición 3 del resveratrol están glicosilados y todavía queda X_2F , la reacción continuaría y la glicosintasa añadiría una nueva molécula de xilobiosa a un grupo -OH diferente del resveratrol o a la xilobiosa previamente unida, formándose así nuevos glicósidos. Esto indica que para obtener altos porcentajes de conversión del 3-*O*- β -D-xilobiósido de resveratrol, es necesario controlar las condiciones de reacción, sobre todo la ratio resveratrol/ X_2F .

Finalmente, el modelo multiparamétrico se utilizó para predecir la producción y el porcentaje de conversión del 3-*O*- β -D-xilobiósido de resveratrol dentro de los límites seleccionados para las variables. La producción máxima que se puede alcanzar es de 3,48 mM en una reacción de 1,27 h, usando aproximadamente 10 mM de resveratrol, 26,33 mM de X_2F y 3,76 g/L de la glicosintasa (Figura 36A). El porcentaje de conversión máximo de resveratrol a su xilobiósido mayoritario (Figura 36B) se calculó en un 35,28 %, utilizando para ello una reacción de 0,64 h con 9,63 mM de resveratrol, 24,29 mM de X_2F y 3,99 g/L de rXynSOS^{E236G}. Estas reacciones se llevaron a cabo para validar las predicciones, obteniéndose una producción y un porcentaje de conversión similares a los establecidos por el modelo.

La RSM demostró ser eficaz para optimizar esta reacción, alcanzándose aproximadamente un 35% de conversión de resveratrol a 3-*O*- β -D-xilobiósido de resveratrol y una conversión total del polifenol cercana al 70%, si sumamos todos los productos glicosilados. Dado que esta es la primera vez que se sintetiza enzimáticamente un xilobiósido de resveratrol, no existen datos disponibles en la literatura para comparar el porcentaje de conversión obtenido. Sin embargo, sí que podemos analizar estos resultados en función del porcentaje de conversión conseguido para otros glicósidos de resveratrol. Por ejemplo, los porcentajes de conversión para el 4'-*O*- α -D-glucósido de resveratrol y el 3-*O*- α -D-glucósido de resveratrol, en una reacción de 12 h, catalizada por una amilosacarasa, fueron de 38,7% y 6,8%, respectivamente (Moon *et al.*, 2021). La α -

glicosilación del resveratrol, realizada en 2 h por una β -ciclodextrina glucanotransferasa, produjo una mezcla de glucósidos y maltósidos con una conversión total del 35% (Marié *et al.*, 2018). Usando otra ciclodextrina glucanotransferasa en una reacción de 24 h, se alcanzó una conversión total a varios α -glucósidos del 50% (Torres *et al.*, 2011). Finalmente, en una reacción de 12 h con una UDP glucosiltransferasa, se obtuvo un rendimiento mayor, pero se sintetizaron cuatro glucósidos diferentes de resveratrol (Pandey *et al.*, 2014). Con estos datos se puede concluir que la conversión total del resveratrol en este trabajo, utilizando la glicosintasa rXynSOS^{E236G}, se encuentra entre las mejores reportadas hasta la fecha, destacando que en este caso se produce un xilobiósido mayoritario y se utilizan tiempos de reacción mucho más cortos.

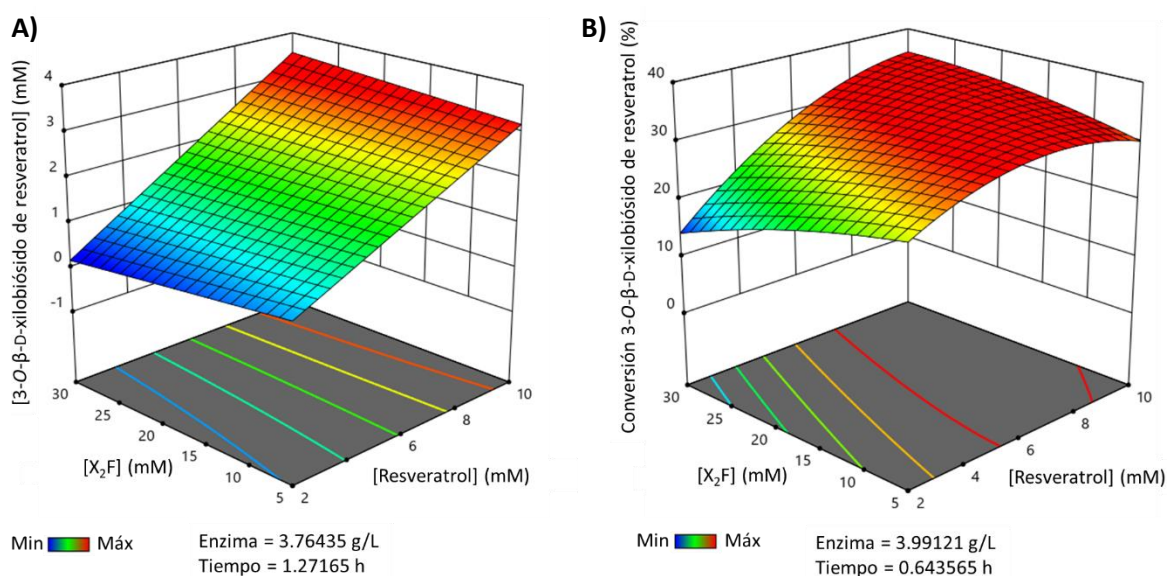


Figura 36: Representación tridimensional, realizada por el *software* Design Expert, de las reacciones optimizadas para la síntesis de 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol. Las condiciones de reacción (concentraciones de rXynSOS^{E236G}, X₂F y resveratrol, y tiempo) fueron predichas mediante un modelo multiparamétrico obtenido siguiendo la Metodología de Superficie de Respuesta (RSM). A) Producción máxima (g/L) y B) conversión máxima (%) del 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol. El código de color representa el rango de producción o conversión (%) desde el mínimo (azul) hasta el máximo (rojo).

4. Análisis de la capacidad antioxidante del 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol

La actividad antioxidante del resveratrol y del xilobiósido mayoritario sintetizado por rXynSOS^{E236G}, se analizó mediante el método de reducción de ABTS^{•+}, utilizando Trolox como compuesto de referencia. Los valores de capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC), para ambos compuestos, se muestran en la Tabla 23. El resveratrol tiene un valor TEAC menor a 1, lo que indica que tiene una mayor actividad antioxidante que el Trolox. Este no es el caso del 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol, el cual experimenta una disminución significativa de su capacidad antioxidante (2,21 veces), en comparación con el aglicón. No obstante, aún podría considerarse un compuesto antioxidante fuerte, comparable al Trolox, ya que presenta un valor TEAC de aproximadamente 1.

La pérdida de actividad antioxidante como consecuencia de la glicosilación de fenoles es un fenómeno previsible, ya que su poder antioxidante está directamente relacionado con la presencia de grupos -OH libres, los cuales pueden donar hidrógenos para neutralizar radicales libres de oxígeno. En los glicoconjugados, algunos de estos grupos -OH se encuentran formando enlaces glicosídicos, reduciéndose así la capacidad antioxidante del compuesto original (Lv *et al.*, 2021; Tsao, 2010). De manera similar, los glicósidos de otros compuestos fenólicos, como el alcohol vainillínico (Veličković *et al.*, 2012), la floretina (Gonzalez-Alfonso *et al.*, 2021) y el EGCG (Gonzalez-Alfonso *et al.*, 2019; Méndez-Líter *et al.*, 2022), también mostraron esta reducción en su capacidad antioxidante, con respecto a sus aglicones. Sin embargo, conviene tener en cuenta que, al menos en los glicoconjugados con glucosa, los niveles iniciales de actividad antioxidante se pueden restaurar, una vez que el glicósido sea hidrolizado *in vivo* y se libere el precursor fenólico original (Braune & Blaut, 2016; Gonzalez-Alfonso *et al.*, 2021; Gowd *et al.*, 2020; Henry-Vitrac *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2020; Tena *et al.*, 2020), lo que podría ocurrir también con los xilobiósidos (su desglicosilación se estudiará en apartados posteriores).

Tabla 23. Actividad antioxidante del 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol y su aglicón. La medida se realizó empleando ABTS^{•+} como sustrato y Trolox como compuesto de referencia.

Compuesto	R ²	TEAC
Trolox	0,993	1
Resveratrol	0,997	0,472 ± 0,039
3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol	0,999	1,042 ± 0,05

Datos expresados como media ± desviación estándar (n=3, **p<0,01 vs. resveratrol)

Por otro lado, varios estudios han analizado la capacidad antioxidante de diversos glicósidos de resveratrol para evaluar la relevancia de sus grupos -OH en sus propiedades bioactivas. Utilizando el método de reducción de ABTS^{•+} se comparó el 3-O-α-D-glucósido de resveratrol y el 4'-O-α-D-glucósido de resveratrol, detectando actividades antioxidantes 2,26 y 1,46 veces menores, respectivamente, en comparación con el compuesto no glicosilado (Torres *et al.*, 2011). Esto podría implicar que el -OH ubicado en la posición 3 del resveratrol es más importante para su actividad antioxidante que el 4'-OH. También se reportaron resultados similares para los mismos glucósidos al medir su actividad antioxidante mediante el método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), observándose una reducción de 2,67 veces para el 3-O-α-D-glucósido de resveratrol y de 1,42 veces para el 4'-O-α-D-glucósido de resveratrol (Marié *et al.*, 2018). Los resultados de estos 3-O-α-D-glucósidos de resveratrol fueron similares a los obtenidos con el 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol en este trabajo. Sin embargo, otros glicoconjugados de resveratrol con el azúcar en las mismas posiciones 3 o 4', como el piceído (3-O-β-D-glucósido de resveratrol, con enlace β en lugar de α), el 3-O-α-D-maltosil de resveratrol y el 4'-O-α-D-maltosil

de resveratrol (una molécula de maltosa en vez de glucosa), redujeron la actividad antioxidante en un grado diferente al de sus correspondientes α -glucósidos (Marié *et al.*, 2018; Torres *et al.*, 2011). Esto sugiere que el tipo de enlace (α o β) y el carbohidrato unido (glucosa o maltosa en este caso) también podrían tener un impacto importante en la capacidad antioxidante de las moléculas, además de la posición de la glicosilación. Por tanto, se necesitaría hacer estudios más detallados para determinar el papel del enlace β y de la molécula de xilobiosa en la reducción de la actividad antioxidante detectada para el 3-O- β -D-xilobiósido de resveratrol. Asimismo, dado el debate entre diferentes autores que sostienen que es la posición 4', y no la 3, la que juega un papel más relevante en la actividad antioxidante del resveratrol (Lepak *et al.*, 2015; Shimoda *et al.*, 2015), sería conveniente realizar una revisión exhaustiva de este tipo de ensayos.

5. Estudio de la solubilidad del 3-O- β -D-xilobiósido de resveratrol

La extremadamente baja solubilidad del resveratrol en agua es uno de los mayores obstáculos para obtener los máximos beneficios de este compuesto bioactivo (Perrone *et al.*, 2017; Salehi *et al.*, 2018). En este experimento se determinó que la solubilidad del resveratrol era de $0,038 \pm 0,003$ g/L, de acuerdo con los resultados reportados por otros autores (Amri *et al.*, 2012; Robinson *et al.*, 2015; Salehi *et al.*, 2018). Por su parte, la solubilidad del 3-O- β -D-xilobiósido de resveratrol fue muy alta, alcanzándose los 184,627 g/L, lo que se traduce en un aumento de 4.866 veces con respecto al aglicón.

Este nuevo xilobiósido es el más soluble entre los glicósidos de resveratrol conocidos hasta la fecha, incluso más que el 3,5-O- β -D-diglucósido de resveratrol, cuya mejora fue de 4,300 veces (Lepak *et al.*, 2015). Los incrementos de solubilidad descritos para otros glicósidos de resveratrol son considerablemente menores. Por ejemplo, las solubilidades del 3-O- α -D-glucósido de resveratrol, 4'-O- α -D-glucósido de resveratrol y 3,4'-O- α -D-diglucósido de resveratrol aumentaron al menos 65 veces en los tres casos y, la del piceido (3-O- β -D-glucosil resveratrol), solo 12,3 veces (Torres *et al.*, 2011). Otros datos también muestran que la configuración anomérica (α o β) del enlace glicosídico influye en la solubilidad de los glicósidos en medios acuosos, mientras que la posición de glicosilación 3 o 4' no parece tener un efecto tan grande. Por ejemplo, algunos autores reportaron solubilidades de 14,3 y 13,1 veces mayores que la del aglicón para el 4'-O- α -D-glucósido de resveratrol y el 3-O- α -D-glucósido de resveratrol, respectivamente, mientras que el piceido volvía a tener un incremento más pequeño de alrededor de 3,8 veces (Moon *et al.*, 2021). En otro estudio, el piceido mostró una mejora en la solubilidad de 31,5 veces y el resveratrolósido (4'-O- β -D-glucósido de resveratrol), un glicósido de origen natural que presenta también enlace β , un incremento similar de 35,5 veces (Lepak *et al.*, 2015). En el caso del 3-O- β -D-xilobiósido de resveratrol sintetizado en esta tesis, los

resultados sugieren que una cadena de carbohidratos más larga, como la xilobiosa, también podría mejorar la solubilidad del resveratrol en medio acuoso.

6. Estudio *in vitro* de la desglicosilación del 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol por la microbiota del colon humano

Para que el 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol pueda ejercer sus propiedades bioactivas, tiene que ser desglicosilado en el tracto intestinal humano. La microbiota del intestino delgado incluye, principalmente, lactobacilos y bifidobacterias, que no pueden hidrolizar glicoconjugados de xilosa y xilobiosa (García-Villalba *et al.*, 2022), por lo que no serían capaces de desglicosilar el 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol. Sin embargo, si el xilobiósido llegase al intestino grueso, sí que podría ser hidrolizado por las bacterias del colon, en particular por las especies de *Bacteroides*, en las que está documentado que degradan fibras de xilosa (García-Villalba *et al.*, 2022; Salyers *et al.*, 1981; Zhang *et al.*, 2014). Si esto ocurriese, el aglicón libre podría ser metabolizado por la microbiota del colon, dando lugar a distintos derivados de resveratrol, como el dihidroresveratrol, el 3,4'-dihidroxi-trans-estilbeno o el 3,4'-dihidroxibibencilo (lunularina). Estos compuestos son metabolitos bioactivos, con posibles beneficios para la salud, que pueden ser absorbidos en el intestino grueso (Andres-Lacueva *et al.*, 2012; Bode *et al.*, 2013; García-Villalba *et al.*, 2022; Iglesias-Aguirre *et al.*, 2022; Serreli & Deiana, 2019; Springer & Moco, 2019).

Con el objetivo de validar esta hipótesis y confirmar que las bacterias del colon humano son capaces de desglicosilar el 3-O-β-D-xilobiósido, se realizó un estudio preliminar *in vitro* utilizando la microbiota presente en muestras fecales de dos voluntarios sanos. Para determinar los cambios en el xilobiósido de resveratrol, se monitorizó su transformación analizando los productos de la fermentación colónica a distintos tiempos. Los controles negativos del experimento (mismas condiciones de fermentación sin la microbiota del colon), indicaron que el 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol es estable durante las primeras 12 h de incubación, aunque se observó una ligera disminución de su concentración después de 24 h (datos no mostrados). La Figura 37 muestra que la microbiota del colon es capaz de hidrolizar todo el 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol presente en las muestras, liberándose resveratrol. Esta hidrólisis finalizó tras 4 h de fermentación con las heces del voluntario 1, y tras 6 h con las del voluntario 2. Transcurrido este tiempo, la concentración de resveratrol liberado disminuyó de forma continua, a la vez que aparecían otros picos en el cromatograma, lo que sugiere que la microbiota del colon lo metabolizó en otros compuestos que no pudieron ser identificados, pero que podrían ser el dihidroresveratrol, el 3,4'-dihidroxi-trans-estilbeno o el 3,4'-dihidroxibibencilo. En las muestras del voluntario 1, tras 12 h de fermentación, todavía se detectaban 10 μM de resveratrol, el cual fue metabolizado por completo a las 24 h. En el caso del voluntario 2, el metabolismo fue más

rápido, ya que tras 12 h de fermentación no quedaban restos de resveratrol. Estas diferencias en el metabolismo de la microbiota del colon entre distintos individuos se han observado también en otros trabajos, tanto con resveratrol como con otros compuestos fenólicos (Iglesias-Aguirre *et al.*, 2022; Morand *et al.*, 2020).

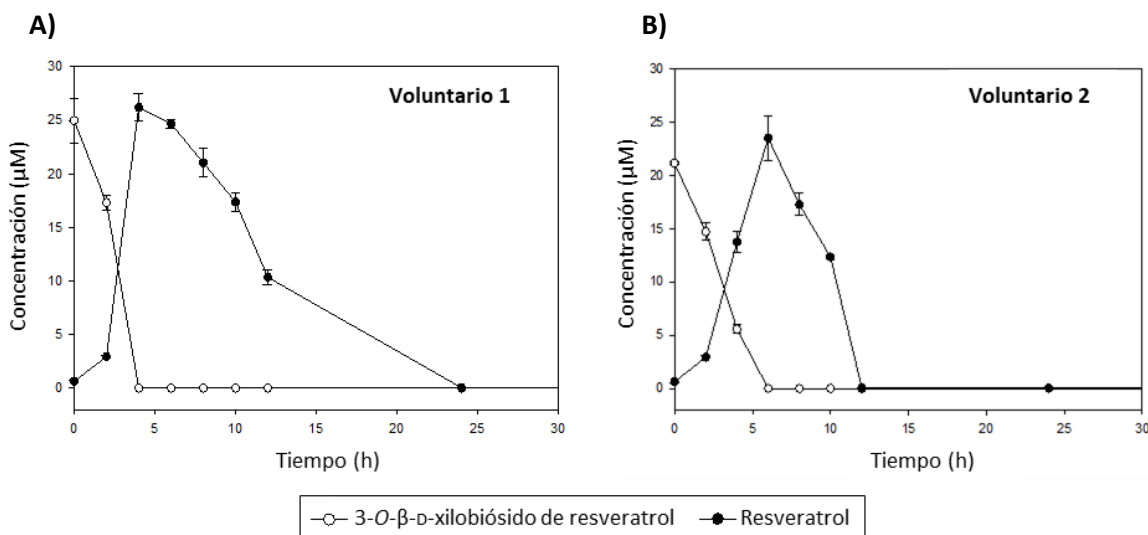


Figura 37. Cinética de la conversión *in vitro*, bajo condiciones anaeróbicas, del 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol (puntos blancos) a resveratrol (puntos negros) por la microbiota del colon humano de dos voluntarios sanos (A, B).

Este estudio demuestra que la microbiota del colon humano es capaz de hidrolizar el xilobiósido y liberar resveratrol. El hecho de que el 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol pueda evitar el extenso metabolismo que sufre el compuesto original en el intestino delgado y en el hígado (Ladurner *et al.*, 2014), facilitaría, junto con su aumento de solubilidad, el uso terapéutico del resveratrol. Al llegar este xilobiósido al colon, sería desglicosilado por la microbiota residente, la cual también podría transformar el resveratrol libre en otros metabolitos potencialmente bioactivos. Los resultados obtenidos, aunque preliminares, sientan las bases para futuros experimentos, en los que se deberían identificar los productos del metabolismo del resveratrol por la microbiota del colon, y evaluar sus propiedades bioactivas.

Anexo 2

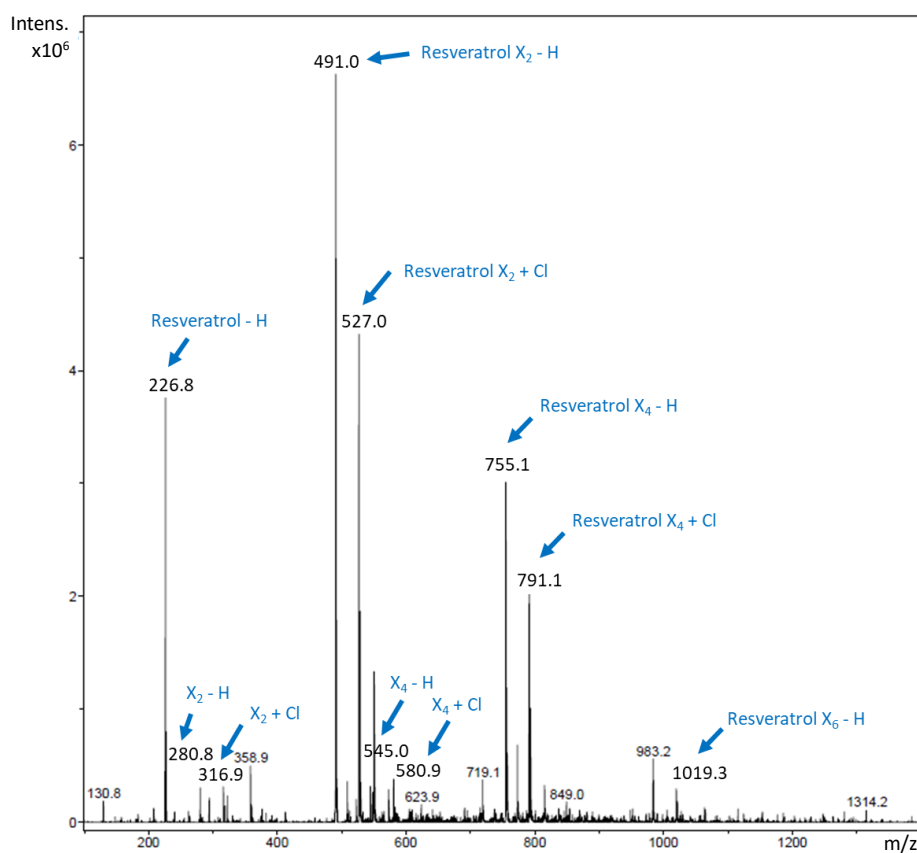


Figura 1. Espectro de ESI-MS, en el modo negativo, de la reacción estándar de glicosilación del resveratrol catalizada por la variante glicosintasa rXynSOS^{E236G} usando X₂F como donador de xilobiosa. Se indica, con flechas azules, el m/z de los iones correspondientes a los aductos de H y Cl de los glicósidos de resveratrol, xilooligosacáridos y el resveratrol no glicosilado.

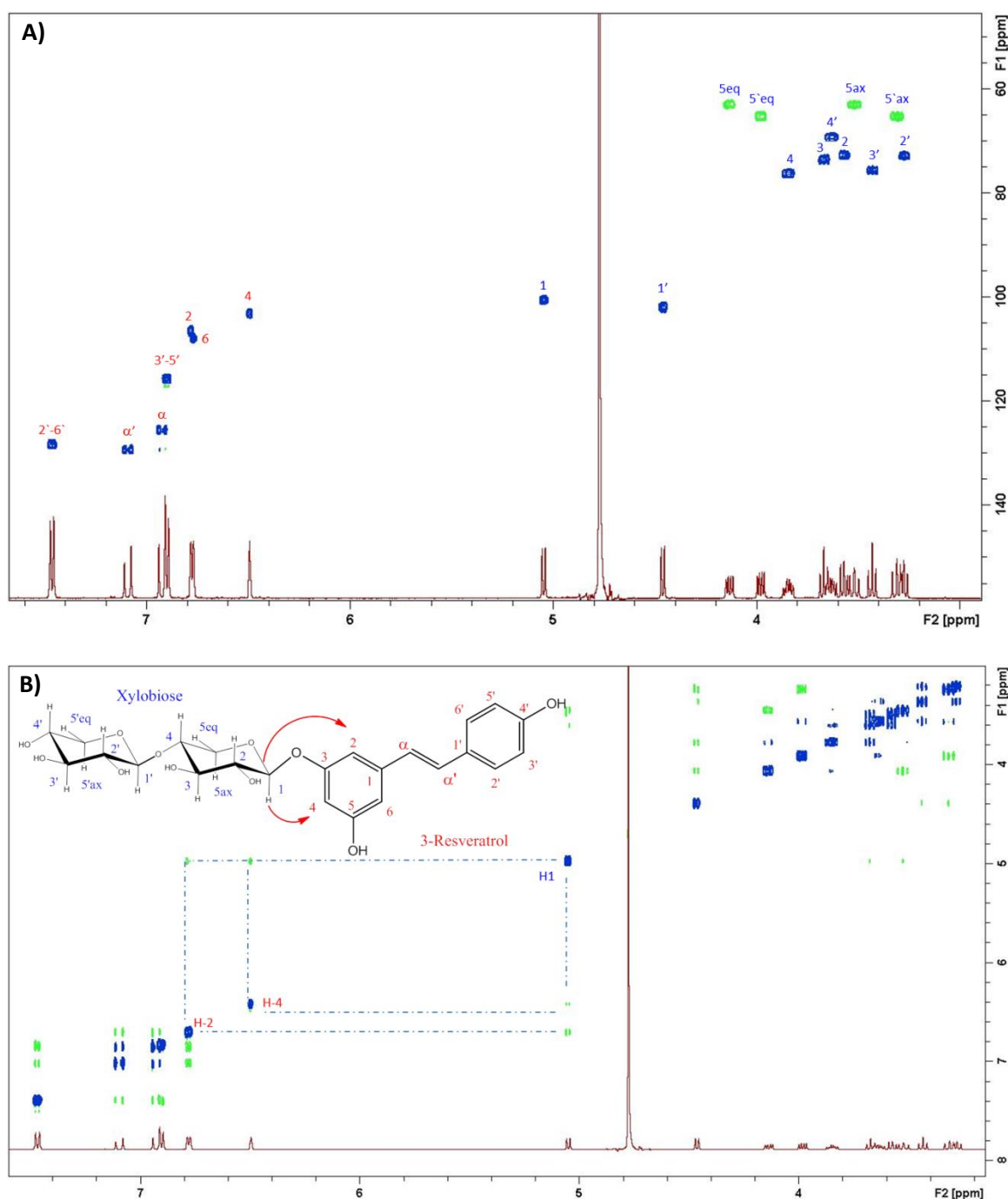


Figura 2. Espectros de RMN del glicósido 1 de resveratrol, disuelto en agua deuterada, que corresponde al 3-*O*- β -D-xilobiosido de resveratrol. A) Superposición de los espectros de ^1H zg (marrón) y ^1H - ^{13}C HSQC (espectro editado: CH y CH_3 , azul y CH_2 , verde) y asignación: xilobiosa (numeración azul) y resveratrol (numeración roja). B) Superposición de los espectros ROESY (pícos diagonal, azul y pícos de cruce ROE, verde) y ^1H zg (marrón) con la correlación ROE resaltada entre el ^1H 1 de la xilobiosa y los ^1H 2 y ^1H 4 del resveratrol (líneas discontinuas azules).

Tabla 1. Desplazamientos químicos observados para el 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol, disuelto en agua deuterada. Los desplazamientos químicos se calcularon tomando como referencia la señal residual de agua, establecida en 4,77 ppm a 298 K.

3-Resveratrol	¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)
1		140*
2	6,78	106,29
3		157,9*
4	6,49	103
5		156,8*
6	6,77	107,87
α	6,92	125,4
α'	7,1	129,3
1'		129,4*
2' (6')	7,46	128,3
3' (5')	6,89	115,0
4'		155,4*

Xilobiosa	¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)
1	5,05	100,5
2	3,57	72,61
3	3,66	73,63
4	3,84	76,06
5 ax	3,52	62,94
5 eq	4,13	62,94
1'	4,46	104,5
2'	3,27	75,3
3'	3,43	78,1
4'	3,63	71,7
5'ax	3,3	67,7
5'eq	3,98	67,6

*Asignaciones derivadas del espectro HMBC

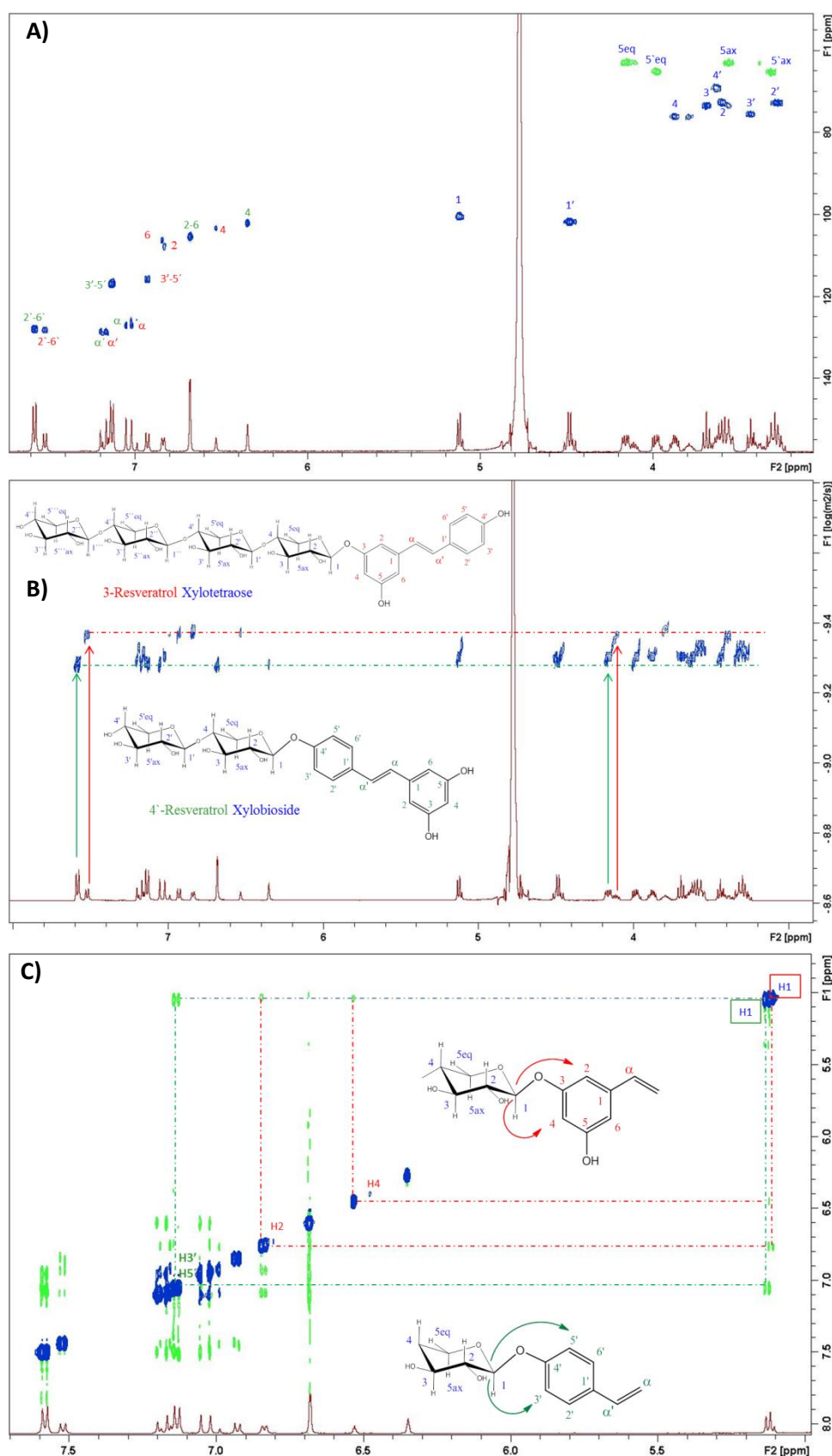


Figura 3. Espectros de RMN del glicósido 2 de resveratrol, disuelto en agua deuterada, que indican una mezcla de 4'-O-β-D-xilobiósido de resveratrol y 3-O-β-D-xilotetraósido de resveratrol en una proporción de 3:1. A) Superposición de los espectros $^1\text{D-}^1\text{H}$ (marrón) y $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ HSQC (espectro editado: CH y CH_3 , azul y CH_2 , verde) y asignación: xilobiosa (numeración azul), 3-resveratrol (numeración roja) y 4'-resveratrol (numeración verde). B) Superposición de los espectros DOSY (azul) y $^1\text{D-}^1\text{H}$ (marrón) con valores de coeficientes de difusión diferentes para el 4'-O-β-D-xilobiósido de resveratrol (línea discontinua verde) y el 3-O-β-D-xilotetraósido de resveratrol (línea discontinua roja). C) Superposición de los espectros ROESY (picos diagonal, azul y picos de cruce ROE, verde) y $^1\text{D-}^1\text{H}$ (marrón) con la correlación ROESY resaltada entre H1 del residuo de xilobiosa y H3' y H5' del residuo de resveratrol en el caso del 4'-O-β-D-xilobiósido de resveratrol (línea discontinua verde) y entre H1 del residuo de xilotetraosa y H2 y H4 del residuo de resveratrol para el 3-O-β-D-xilotetraósido de resveratrol (línea discontinua roja).

Tabla 2. Desplazamientos químicos observados para el A) 4'-O-β-D-xilobiósido de resveratrol y B) el 3-O-β-D-xilotetraósido de resveratrol, disueltos en agua deuterada. Los desplazamientos químicos se calcularon tomando como referencia la señal residual de agua, establecida en 4,77 ppm a 298 K.

(A) 4'-O-β-D-xilobiósido de resveratrol

4'-Resveratrol	¹ H	¹³ C
1		126,7*
2 /6	6,7	105,4
4	6,34	102,6
3(5)		105,2
α	7,03	127,1
α'	7,18	128,9
1'		131,8*
2' (6')	7,58	128,0
3' (5')	7,1	116,9
4'		155,8*

*Asignaciones derivadas del espectro HMBC

Xilobiosa	¹ H	¹³ C
1	5,12	100,5
2	3,60	72,7
3	3,69	73,5
4	3,87	76,1
5 ax	3,56	62,8
5 eq	4,15	62,8
1'	4,48	101,7
2'	3,29	72,7
3'	3,43	75,5
4'	3,63	69,0
5'ax	3,31	65,1
5'eq	3,98	65,1

(B) 3-O-β-D-xilotetraósido de resveratrol

3-Resveratrol	¹ H	¹³ C
1		
2	6,8	107,6
4	6,5	103,2
6	6,8	106,4
α	6,98	125,7
α'	7,18	128,9
1'		131,8*
2' (6')	7,52	128,1
3' (5')	6,9	115,9
4'		

* Asignaciones derivadas del espectro HMBC

Xilotetraosa	¹ H	¹³ C
1	5,11	100,5
2	3,56	73,3
3	3,69	73,5
4 4' 4''	3,87/3,79	76,1
5 5' 5'' ax	3,56/3,38	62,8
5 5' 5'' eq	4,16-4,10	62,9
1' 1'' 1'''	4,5-4,45	101,7
2' 2'' 2'''	3,26-3,29	72,7
3' 3'' 3'''	3,43-3,42	75,5
4'''	3,63	69,0
5'''ax	3,31	65,1
5'''eq	3,96	65,1

Ecuación 1. Ecuaciones generadas por Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) para predecir la producción y el porcentaje de conversión máximos del glicósido de resveratrol mayoritario (3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol), sintetizado por la variante glicosintasa rXynSOS^{E236G} utilizando X₂F como donador de xilobiosa.

La producción máxima del 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol se ajustó con la siguiente ecuación:

$$\text{Producción (g/L)} = 0,308114 + 0,012853 * [\text{Resveratrol}] - 0,004821 * [\text{X}_2\text{F}] + 0,033544 * [\text{rXynSOS}^{\text{E236G}}] + 0,172893 * \text{Time} + 0,004792 * [\text{Resveratrol}] * [\text{X}_2\text{F}] + 0,066433 * [\text{Resveratrol}] * [\text{rXynSOS}^{\text{E236G}}] + 0,011107 * [\text{Resveratrol}] * \text{Time} - 0,006159 * [\text{X}_2\text{F}] * [\text{rXynSOS}^{\text{E236G}}] - 0,004073 * [\text{X}_2\text{F}] * \text{Time} - 0,069273 * [\text{rXynSOS}^{\text{E236G}}] * \text{Time}$$

El porcentaje de conversión máximo de resveratrol a 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol se ajustó con la siguiente ecuación:

$$\text{Conversión (\%)} = 15,92844 - 0,241641 * [\text{Resveratrol}] + 0,056521 * [\text{X}_2\text{F}] + 6,54882 * [\text{rXynSOS}^{\text{E236G}}] + 2,38029 * \text{Time} + 0,089139 * [\text{Resveratrol}] * [\text{X}_2\text{F}] + 0,849929 * [\text{Resveratrol}] * [\text{rXynSOS}^{\text{E236G}}] + 0,317365 * [\text{Resveratrol}] * \text{Time} - 0,102658 * [\text{X}_2\text{F}] * [\text{rXynSOS}^{\text{E236G}}] - 0,067877 * [\text{X}_2\text{F}] * \text{Time} - 1,15454 * [\text{rXynSOS}^{\text{E236G}}] * \text{Time} - 0,278498 * [\text{Resveratrol}]^2 - 0,007765 * [\text{X}_2\text{F}]^2 - 1,15589 * [\text{rXynSOS}^{\text{E236G}}]^2 - 0,104417 * \text{Time}^2$$

CAPÍTULO 3

Transformación de *T. amestolkiae* e implementación de herramientas para su manipulación genética



Adaptado de la publicación:

Pozo-Rodríguez, A., Peñalva, M.Á., Barriuso, J., Espeso, E.A. & Martínez, M.J. (2025), Improvement of β -Xylosidase and Endoxylanase Activities in *Talaromyces amestolkiae* by Genetic Manipulation of the Transcriptional Activator XlnR. *Microbial Biotechnology*, 18(5), e70166. doi: 10.1111/1751-7915.70166

Imagen de Gil Muñoz (2015)

Antecedentes

Talaromyces amestolkiae destaca por su capacidad para producir una gran variedad de glicosil hidrolasas con distintas aplicaciones biotecnológicas. Estas incluyen procesos de sacarificación de residuos lignocelulósicos, síntesis de oligosacáridos y glicosilación de compuestos bioactivos (Prieto *et al.*, 2021). Como se ha demostrado en los capítulos anteriores con la endoxilanasas rXynSOS, este ascomiceto sigue siendo una fuente prometedora de nuevas enzimas con gran interés industrial. Aunque recientemente se ha logrado aumentar la producción de glicosil hidrolasas mediante la optimizando del medio y las condiciones de cultivo (de Eugenio *et al.*, 2024), sería de gran relevancia disponer de herramientas para su manipulación genética, lo que permitiría desarrollar cepas capaces de generar cócteles enzimáticos más eficientes. En este capítulo, se ha logrado, por primera vez, modificar genéticamente *T. amestolkiae* mediante la transformación química de sus protoplastos e implementando la complementación de auxotrofia para pirimidinas como marcador de selección. Además, se ha estudiado la utilidad de plásmidos de replicación autónoma como estrategia para sobreexpresar genes de interés.

1. Desarrollo de cepas auxótrofas *pyr*

Entre los marcadores de selección disponibles para hongos filamentosos, uno de los más utilizados es la complementación de auxotrofia para pirimidinas (Mei *et al.*, 2019). Para poder implementarlo, es necesario desarrollar cepas con mutaciones auxotróficas en la ruta de síntesis *de novo* de pirimidinas. Como se indica en la Introducción (Figura 15), estas cepas se pueden generar por resistencia al ácido 5-fluoroorótico (5-FOA), el cual promueve la adquisición de mutaciones en los genes *pyrF* o *pyrG*, que codifican para las enzimas responsables de los dos pasos finales de la ruta (Díez *et al.*, 1987).

En primer lugar, se determinó que la concentración óptima de 5-FOA para inhibir el crecimiento de *T. amestolkiae* era de 2 g/L en medio MCA. Posteriormente, se incubó el hongo silvestre (Tam_WT) durante un período de 5 a 12 días a 28 °C, en presencia de dicha concentración de 5-FOA, añadiendo también uridina y uracilo, para obtener sectores resistentes. Tras seleccionar 15 sectores con potencial de ser auxotrófos para pirimidinas (*pyr*), se aislaron las cepas correspondientes y se cultivaron en placas de MCA, tanto en presencia como en ausencia de uridina y uracilo, con el objetivo de confirmar su auxotrofia (Figura 38). La mayoría de los mutantes presentaron el fenotipo auxótrofo esperado, requiriendo la suplementación con pirimidinas para su crecimiento. Únicamente el mutante #12 fue capaz de crecer en ausencia de uridina y uracilo, lo que indica que no es auxótrofo para pirimidinas.

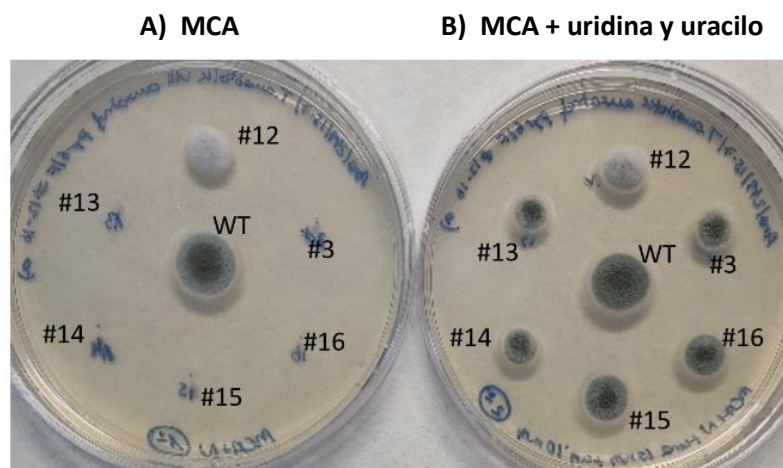


Figura 38. Screening de cepas de *T. amestolkiae* resistentes a 5-FOA (#3, #12-#16). A) Placa de MCA sin suplementación de uridina y uracilo en la que las cepas #3 y #13-16 no pueden crecer, lo que confirma que son auxótrofas para pirimidinas. La cepa silvestre se utilizó como control positivo de crecimiento. B) Placa de MCA en las que se adiciona uridina y uracilo, observándose crecimiento.

Los genotipos de estos mutantes se estudiaron mediante amplificación por PCR y secuenciación de Sanger de las regiones codificantes de *pyrF* (785 pb) y *pyrG* (887 pb). En todos los casos, se detectaron mutaciones causales convincentes en *pyrG* o *pyrF*. Estas mutaciones se detallan en la Tabla 24. Las mutaciones más frecuentes fueron deleciones, mientras que las sustituciones e inserciones estuvieron menos representadas. Excepto en tres cepas, dichas mutaciones dieron lugar a proteínas truncadas por el desplazamiento del marco de lectura, a la generación de codones de terminación prematuros o a la pérdida del codón de iniciación Met. Estos resultados indican que todas las mutaciones conducen a una pérdida total de función, confirmada por la estricta dependencia de suplementación con uridina y uracilo.

Tabla 24. Lista de mutantes *pyr*⁻ de *T. amestolkiae* aislados mediante la adquisición de resistencia al ácido 5-fluoroorótico (5-FOA).

Mutante	Tipo de mutación ⁽¹⁾	Cambio en la secuencia de ADN	Cambio en la secuencia de aminoácidos ⁽²⁾
<i>pyrF1</i>	Sin sentido	c.C606T	Codón de terminación prematuro después de E183
<i>pyrF2</i>	Desplazamiento marco lectura	c.Δ(A421→C458)	Truncamiento después de N122
<i>pyrG3</i>	Desplazamiento marco lectura	c.Δ(G720→A741)	Truncamiento después de D223
<i>pyrF4</i>	Delección de 3 pb	c.Δ(C506→T508)	Delección de V151
<i>pyrG5</i>	Delección de 18 pb	c.Δ(A558→T575)	Delección de T170-D175
<i>pyrF6</i>	Desplazamiento marco lectura	c.ΔA549	Truncamiento después de I164
<i>pyrF7</i>	Cambio de sentido	c.G3A	Met1Ile, pérdida codón iniciación
<i>pyrF8</i>	Cambio de sentido	c.T2C	Met1Thr, pérdida codón iniciación
<i>pyrF10</i>	Desplazamiento marco lectura	c.117insT	Truncamiento después de F40
<i>pyrG11</i>	Delección de 12 pb	c.Δ(G822→G833)	Delección de A258-Q261
<i>pyrF13</i>	Cambio de sentido	c.T2C	Met1Thr, pérdida codón iniciación
<i>pyrG14</i>	Desplazamiento marco lectura	c.Δ(C144→G154)	Truncamiento después de L48
<i>pyrF15</i>	Desplazamiento marco lectura	c.136insT	Truncamiento después de L46
<i>pyrG16</i>	Desplazamiento marco lectura	c.279insA	Truncamiento después de T76

⁽¹⁾ Las mutaciones pueden ser sin sentido (*nonsense*), de desplazamiento del marco de lectura (*frameshift*), de cambio de sentido (*missense*) o delecciones de codones completos que no implican un cambio en el marco de lectura

⁽²⁾ En el gen *pyrF* de *T. amestolkiae*, el siguiente codón de iniciación cambia el marco de lectura

El mutante *pyrG14* de *T. amestolkiae* (Figura 39A), de aquí en adelante Tam_*pyrG14*, fue seleccionado para los siguientes experimentos porque presentaba el desplazamiento del marco de lectura más temprano en *pyrG*, alterando la secuencia de aminoácidos de la orotidina 5-monofosfato descarboxilasa a partir del residuo L48 (la longitud total de esta proteína es de 278 aa). Además, los residuos delecionados forman parte de un hélice α , ubicada aguas arriba de los principales residuos catalíticos de la enzima (Traut & Temple, 2000) (Figura 39B), lo que ayudaría a prevenir la aparición de revertientes espontáneos *pyrG*⁺ durante la selección de transformantes. Estos resultados, en combinación con estudios previos realizados con *Talaromyces marneffe* (Borneman *et al.*, 2001), destacan la utilidad del 5-FOA para la selección de auxótrofos de pirimidinas en especies de *Talaromyces*.

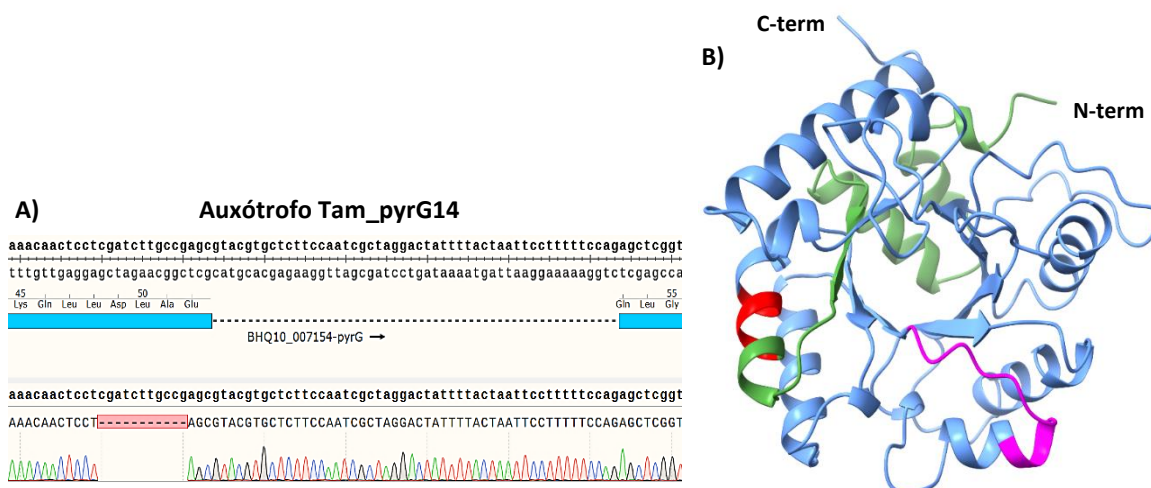


Figura 39. Características del auxótrofo Tam_pyrG14. A) Secuencia del gen *pyrG* con la mutación c.Δ(C144→G154). B) Modelo tridimensional predicho por AlphaFold de la estructura de la orotidina 5-monofosfato descarboxilasa. Esta enzima es dimérica, aunque en esta figura solo se represente uno de los monómeros. El cambio en la secuencia de aminoácidos, resultado de la mutación, se muestra en diferentes colores: en verde, los aminoácidos no alterados del extremo N-terminal; en rojo, los residuos deletados D49-E52; y en azul, el resto de la secuencia truncada. El truncamiento comienza después de L48, el cual se encuentra aguas arriba de los principales residuos catalíticos (DXKXDIXXT), resaltados en morado.

2. Transformación de *T. amestolkiae* con un plásmido integrativo por complementación de auxotrofia para pirimidinas

Tras obtener una cepa auxótrofa de *T. amestolkiae* para pirimidinas, se propuso realizar una transformación de protoplastos, mediada por polietilenglicol (PEG) y calcio. Este método es uno de los más empleados para la transformación de hongos filamentosos y el protocolo que se siguió, con ligeras modificaciones, fue el descrito para *Aspergillus nidulans* (Tilburn *et al.*, 1983). En primer lugar, *T. amestolkiae* se incubó con diferentes concentraciones de Vinoflow (cóctel de Novozyme con glucanasas), con el fin de optimizar el tiempo necesario para degradar la pared celular del hongo. Partiendo de 2 g de micelio y utilizando 600 mg de Vinoflow, se necesitaron 1 hora y 30 minutos para generar protoplastos viables, es decir, capaces de crecer en un medio de regeneración suplementado con 1M de sacarosa como estabilizador osmótico.

Los protoplastos de Tam_pyrG14 se transformaron con el plásmido pFNO3 (p1439 en la colección del grupo Biología Celular de *Aspergillus* del CIB-CSIC), el cual contiene el gen *pyrG* de *Aspergillus fumigatus*, que complementaría la auxotrofia para pirimidinas de esta cepa. p1439 es un plásmido integrativo, sin regiones de alta homología con el genoma de *T. amestolkiae*, lo que permitiría la inserción aleatoria de ADN exógeno en los cromosomas del hongo. Con este protocolo se obtuvieron numerosos transformantes, con fuerte crecimiento en medio de regeneración sin uridina ni uracilo (Figura 40A). De estos, se aislaron nueve (Tam_p1439 #1-9) y su ADN_g fue extraído y analizado por PCR. Los resultados mostraron que todos los

transformantes habían incorporado el ADN exógeno en sus genomas (Figura 40B), confirmando que *T. amestolkiae* puede ser transformado exitosamente utilizando esta metodología.

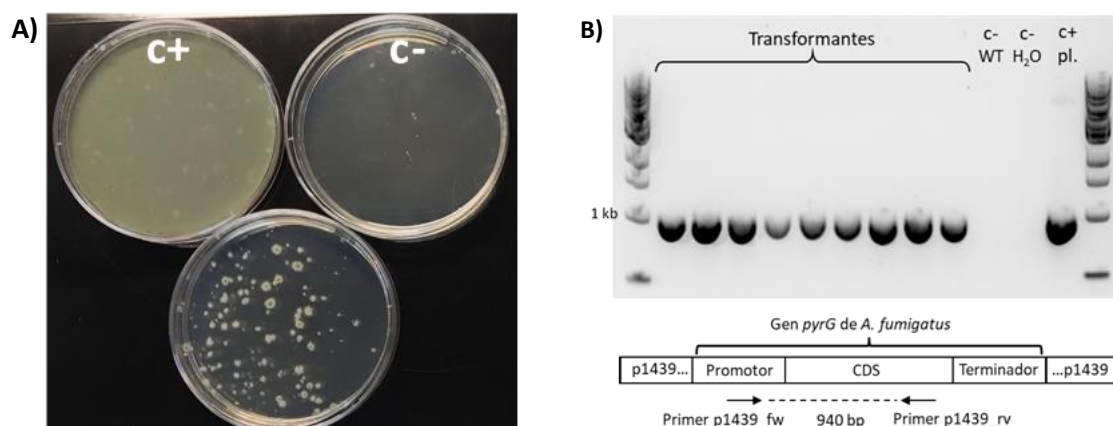


Figura 40. Mutantes de *T. amestolkiae* transformados con el plásmido integrativo p1439 (Tam_p1439), el cual contiene un marcador de selección que complementa la auxotrofia para pirimidinas. A) Placa de transformación junto con un control negativo (C-, sin ADN) y un control positivo para la regeneración de protoplastos (C+, sin selección). B) Resultado de la PCR para verificar la presencia del gen *pyrG* de *A. fumigatus* en los 9 transformantes Tam_p1439. El control positivo es el plásmido p1439 y los controles negativos son Tam_WT y agua. Se empleó el marcador de masa molecular 1 kb DNA Ladder ADN de NEB.

La complementación de auxótrofos para pirimidinas con un gen *pyrG* homólogo ofrece distintas ventajas. Además de evitar el uso de genes de resistencia a antibióticos, cuya liberación al medio ambiente genera preocupación por el riesgo de diseminación de resistencias, este marcador de selección puede reciclarse, mediante contraselección con 5-FOA, lo que permite reutilizar la misma cepa en rondas sucesivas de transformación (d'Enfert, 1996). También posibilita la inserción dirigida de genes en el locus *pyrG* nativo por recombinación homóloga (Gutiérrez *et al.*, 1999). Por último, se ha visto en otros hongos que la eficiencia de transformación es mucho mayor en comparación con los sistemas de selección basados en resistencia a antibióticos, como por ejemplo con la resistencia a higromicina en *Talaromyces cellulolyticus* (Inoue *et al.*, 2013) y la resistencia a fleomicina en *Penicillium nalgiovense* (Fierro *et al.*, 2004).

3. Uso de plásmidos de replicación autónoma en *T. amestolkiae* para la sobreexpresión de genes de interés

Con el fin de evaluar la efectividad de los plásmidos de replicación autónoma, basados en la secuencia AMA1, para sobreexpresar genes de interés en *T. amestolkiae*, se procedió a transformar Tam_pyrG14 con el plásmido p1394 (Villarino *et al.*, 2018). Este plásmido deriva del vector pRG3-AMA1-NotI (p1393 en la colección del grupo Biología Celular de *Aspergillus* del CIB-CSIC) y contiene el gen *pyr4* de *Neurospora crassa* como marcador de selección y un casete de

expresión con el gen que codifica para la proteína roja fluorescente DsRed-Express bajo el control del promotor constitutivo de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*PgpdA*) de *A. nidulans*.

La transformación fue nuevamente exitosa, alcanzándose un número aún mayor de colonias que complementaron la auxotrofía para pirimidinas, en comparación con las obtenidas con el plásmido integrativo. Este fenómeno también se ha observado en *Penicillium rubens* (Villarino *et al.*, 2018) y *P. nalgiovense* (Fierro *et al.*, 2004), lo que respalda la teoría de que se pueden conseguir mejores eficiencias de transformación con plásmidos autorreplicativos (Martín, 2015).

Algunos de los transformantes generados (Tam_DsRed) se aislaron y se analizaron por microscopía de fluorescencia. La Figura 41 confirma la expresión constitutiva de la proteína DsRed-Express, la cual se distribuye homogéneamente a lo largo de las hifas del hongo. La intensa fluorescencia que se detecta al exponer las células solo 5 ms, indica que este plásmido de replicación autónoma facilita una fuerte sobreexpresión del gen de interés. En este sentido, p1394 contiene el replicador AMA1 de *A. nidulans*, el cual permite que el vector se mantenga como un elemento extracromosómico, con un número alto de copias (Aleksenko & Clutterbuck, 1997). Por otro lado, *PgpdA* es uno de los promotores constitutivos más utilizados en ascomicetos y anteriormente ha sido aplicado con éxito para expresar genes que codifican para proteínas fluorescentes, como la DsRed-Express, logrando altas intensidades de fluorescencia (Mei *et al.*, 2019; Mikkelsen *et al.*, 2003).

Este experimento ha demostrado que el gen que codifica para la proteína roja fluorescente DsRed-Express puede expresarse con éxito en *T. amestolkiae*. Dicha proteína podría ser de gran utilidad en futuros estudios, por ejemplo, al fusionarse con proteínas de interés para visualizar su distribución en la célula, o al emplearse como gen reportero para monitorear, de manera sencilla, la actividad de promotores y reguladores génicos (Mei *et al.*, 2019; Mózsik *et al.*, 2021). Además, se ha confirmado que el plásmido de replicación autónoma p1393, basado en la secuencia AMA1, es una herramienta de ingeniería genética muy eficaz para la sobreexpresión de genes de interés en *T. amestolkiae*, lo que permitirá, en el capítulo 4, llevar a cabo las primeras aproximaciones para aumentar la producción de xilanasas.

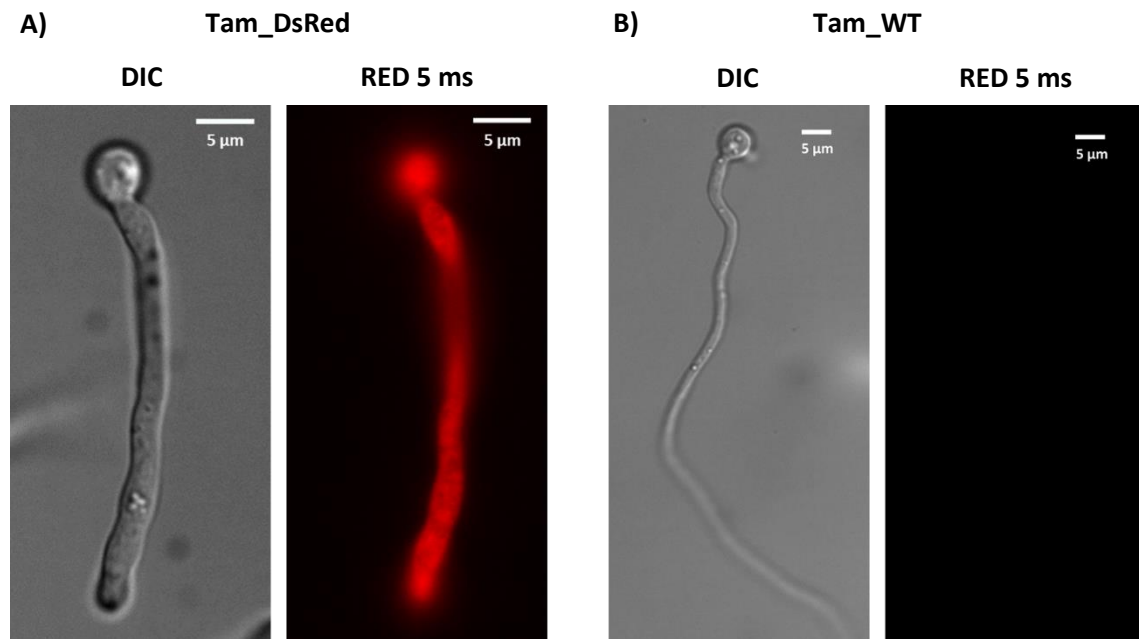
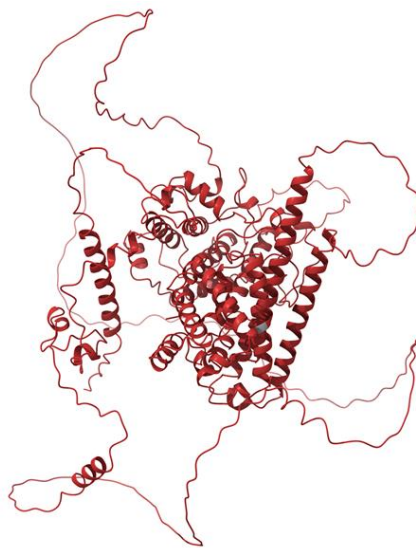


Figura 41. Imágenes de microscopía óptica empleando contraste interferencial (DIC) y fluorescencia roja (RED, 5 ms de exposición). A) Detección de la fluorescencia roja emitida por la proteína DsRed-Express en el mutante Tam_DsRed. B) Control negativo Tam_WT en el que no se detecta fluorescencia.

CAPÍTULO 4

Mejora de la producción de xilanasas en *Talaromyces amestolkiae* mediante ingeniería genética de su activador transcripcional XlnR



Adaptado de la publicación:

Pozo-Rodríguez, A., Peñalva, M.Á., Barriuso, J., Espeso, E.A. & Martínez, M.J. (2025), Improvement of β -Xylosidase and Endoxylanase Activities in *Talaromyces amestolkiae* by Genetic Manipulation of the Transcriptional Activator XlnR. *Microbial Biotechnology*, 18(5), e70166. doi: 10.1111/1751-7915.70166

Antecedentes

Una vez desarrolladas las herramientas para transformar a *Talaromyces amestolkiae*, el objetivo fue mejorar la producción de xilanasas en el hongo mediante su manipulación genética. Para ello se ha de considerar la estricta y compleja regulación que controla la expresión de las glicosil hidrolasas, mediada por factores de transcripción, y que depende de la presencia de sustratos inductores (Benocci *et al.*, 2017). El principal activador transcripcional implicado en la degradación de xilano en hongos filamentosos es XlnR (conocido también como XYR1 o XLR1) (Van Peij *et al.*, 1998). Las primeras aproximaciones para aumentar la actividad xilanolítica a través de este factor de transcripción consistieron en la introducción de copias extra de su gen codificante (Llanos *et al.*, 2019; van Peij *et al.*, 1998) y en su sobreexpresión con promotores constitutivos fuertes, como los de los genes *gpdA* (Li *et al.*, 2015; Tamayo-Ramos & Orejas, 2014), *tef1* (Marui *et al.*, 2002), y *pdcl* (Wang *et al.*, 2013). Por otra parte, también se logró mejorar la producción de xilanasas al introducir sustituciones de un solo residuo en la región C-terminal de XlnR. Concretamente, la sustitución Ala→Val en las posiciones equivalentes descritas en *Penicillium oxalicum* (Ala871Val), *Trichoderma reesei* (Ala824Val) y *Neurospora crassa* (Ala828Val) (Craig *et al.*, 2015; Derntl *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2017), o la sustitución Val→Phe reportada en *Aspergillus niger* (Val756Phe) y *T. reesei* (Val821Phe) (Arai *et al.*, 2022; Ellilä *et al.*, 2017; Hasper *et al.*, 2004; Kun *et al.*, 2020), dieron lugar a un aumento significativo de las actividades β-xilosidasa y endoxilanasas, incluso en condiciones no inductoras. Siguiendo esta línea, en este capítulo se propuso mejorar la producción de xilanasas en *T. amestolkiae* mediante la sobreexpresión y mutación de su activador transcripcional XlnR.

1. Identificación del activador transcripcional XlnR en *T. amestolkiae*

El gen *xlnR* (código de acceso de GenBank BHQ10_006915) fue localizado en el genoma de *T. amestolkiae* realizando un análisis BLAST con las secuencias de los genes homólogos caracterizados en otros ascomicetos. Su longitud es de 2.858 nucleótidos y contiene 2 intrones (Anexo 4- Figura 1). El factor de transcripción XlnR está constituido por 904 aminoácidos y su masa molecular predicha es de 99,511 kDa. La predicción bioinformática realizada con InterproScan muestra un dominio de unión a ADN tipo dedo de zinc Zn₂Cys₆ en el extremo N-terminal y un dominio denominado *middle homology region* en el extremo C-terminal, que tiene funciones reguladoras (Xia *et al.*, 2022). Para ubicar en la proteína de *T. amestolkiae* algunos de los residuos mutados que dieron lugar a cepas con mayor producción de xilanasas en *P. oxalicum*, *T. reesei*, *A. niger* y *N. crassa*, se alinearon sus secuencias de aminoácidos (Anexo 4- Figura 2).

Estos residuos son A788 y V785, y están ubicados en la zona central de una misma hélice α que forma parte del dominio *middle homology region* (Figura 42).

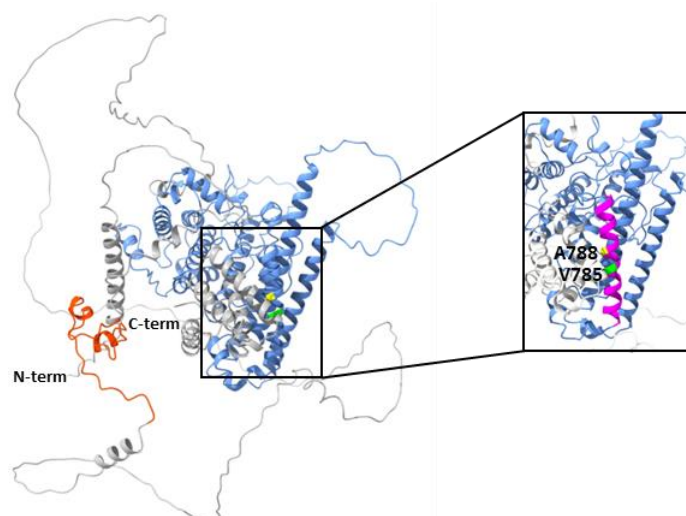


Figura 42. Modelo tridimensional de la estructura del activador transcripcional XlnR de *T. amestolkiae* (1-904 aa) predicho por AlphaFold. El dominio de unión a ADN de tipo dedo de Zn_2Cys_6 (85-128 aa, naranja) y el dominio *middle homology region* (*Fungal_TF_MHR*, 347-807 aa, azul) fueron predichos por InterProScan. Los residuos A788 (amarillo) y V785 (verde) son los que se podrían mutar para conseguir mayor producción de xilanasas.

2. Sobreexpresión de *xlnR* y sus variantes mutantes para aumentar la actividad xilanolítica

Para sobreexpresar el gen del activador transcripcional XlnR, se utilizó el plásmido de replicación autónoma pRG3-AMA1-NotI (p1393 en la colección del grupo Biología Celular de *Aspergillus* del CIB-CSIC), con el que se habían obtenido buenos resultados en el Capítulo 3. En este plásmido se clonó el *xlnR* de *T. amestolkiae*, bajo el control del promotor constitutivo *PgpdA* y el terminador *TtrpC*, ambos de *Aspergillus nidulans*, dando lugar al plásmido p1393-PgpdA-XlnR-TtrpC. De este modo se aumentaría el número de copias del gen y se permitiría su expresión independientemente de la presencia de fuentes de carbono inductoras. Además del gen nativo de XlnR, se sobreexpresaron dos versiones mutadas con las sustituciones Ala788Val o Val785Phe, para lo que se construyeron los plásmidos p1393-PgpdA-XlnR^{A788V}-TtrpC y p1393-PgpdA-XlnR^{V785F}-TtrpC, respectivamente.

La cepa auxótrofa Tam_*pyrG14* fue transformada con estos tres plásmidos y se aislaron, para cada uno de ellos, 6-8 colonias que complementaron la auxotrofia para pirimidinas. Además, Tam_*pyrG14* se transformó con el vector p1393 para estudiar el efecto de este plásmido autorreplicativo en el crecimiento del hongo y descartar que, por sí solo, pudiera afectar a la producción de xilanasas. Posteriormente, para seleccionar los mejores productores de β -xilosidasas y endoxilanasas de cada transformación, se crecieron los transformantes Tam_XlnR, Tam_XlnR^{A788V}, Tam_XlnR^{V785F} y Tam_p1393 en matraces de 250 mL con 50 mL de medio Mandels, suplementado con 1% (p/v) de xilano de haya (Anexo 4- Figuras 3-6). En estos *screenings* se utilizaron como controles Tam_WT, para comparar la producción de xilanasas, y Tam_*pyrG14*, para verificar que la generación de la auxotrofia para pirimidinas no había tenido ningún impacto en estas actividades enzimáticas. Los transformantes que mostraron los valores

de actividad más altos, que fueron Tam_XlnR #7, Tam_XlnR^{A788V} #12, Tam_XlnR^{V785F} #10 y Tam_p1393 #1, se seleccionaron para los siguientes experimentos.

Con el objetivo de evaluar el efecto de la sobreexpresión de *xlnR* y sus variantes mutantes en la producción de xilasas, dichos transformantes, junto con Tam_WT y Tam_p1393, se cultivaron en las mismas condiciones que en el *screening* en medio Mandels suplementado con 1% (p/v) de xilano de haya como sustrato. Se midieron, diariamente, las actividades β -xilosidasa y endoxilanasas, la concentración de proteínas extracelulares y el crecimiento de estas cepas fúngicas. La Figura 43 revela que los mutantes Tam_XlnR, Tam_XlnR^{A788V} y Tam_XlnR^{V785F} incrementaron tanto la actividad β -xilosidasa como la endoxilanasas, en comparación con Tam_WT y Tam_p1393, aunque con diferencias importantes entre ellos.

En el caso de Tam_XlnR, no se observó un aumento muy marcado en las actividades β -xilosidasa y endoxilanasas (1,4 y 2,0 veces, respectivamente, en el cuarto día de cultivo), similar a los resultados encontrados en *T. reesei* (Mach-Aigner *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2013), *P. oxalicum* (Li *et al.*, 2015), *Penicillium canescens* (Serebryanyi *et al.*, 2006) y *Fusarium oxysporum* (Calero-Nieto *et al.*, 2007). Por el contrario, la sobreexpresión de *xlnR* sí que produjo una mejora más destacable en la producción de estas enzimas en *A. nidulans* (Tamayo-Ramos & Orejas, 2014), *A. oryzae* (Noguchi *et al.*, 2009), *A. niger* (Ballmann *et al.*, 2019) y *Myceliophthora thermophila* (Wang *et al.*, 2015). No obstante, cabe destacar que las diferencias entre los sustratos ensayados, condiciones de cultivo, herramientas de ingeniería genética y técnicas de medición empleadas en cada uno de ellos impiden una comparación veraz.

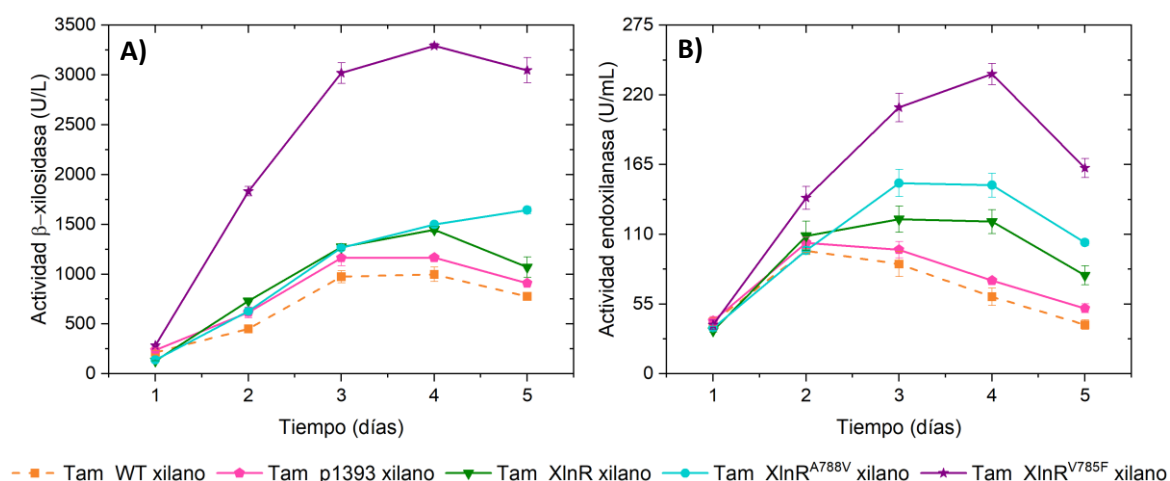


Figura 43. Actividades A) β -xilosidasa y B) endoxilanasas en los sobrenadantes de Tam_XlnR, Tam_XlnR^{A788V}, Tam_XlnR^{V785F}, Tam_p1393 y Tam_WT durante su crecimiento en medio Mandels suplementado con 1% (p/v) de xilano de haya. Las barras de error representan las desviaciones estándar de 3 réplicas.

En el transformante Tam_XlnR^{A788V} se detectó, en el cuarto día de cultivo, un aumento similar al de Tam_XlnR en la actividad β -xilosidasa (1,5 veces), y un poco mayor en la

endoxilanasas (2,4 veces). Sin embargo, este incremento fue mucho más pronunciado en Tam_XlnR^{V785F}, con mejoras de 3,3 y 3,9 veces en las actividades β -xilosidasa y endoxilanasas, respectivamente, en el cuarto día de cultivo. Esto podría deberse a una mayor cantidad de enzimas secretadas, ya que se encontró una concentración mayor de proteínas extracelulares en Tam_XlnR^{A788V} y, especialmente en Tam_XlnR^{V785F}, en comparación con el resto de las cepas (Anexo 4- Figura 7A). Estos resultados indican que, aunque la sobreexpresión de *xlnR* puede aumentar la producción de xilanasas, la mutación de un solo residuo en regiones específicas de XlnR es mucho más efectiva. En el caso de *T. amestolkiae*, la sustitución Val785Phe fue mucho mejor que la Ala788Val.

Aunque hay disponibles diversos estudios sobre el activador transcripcional XlnR en otros hongos, ninguno de ellos compara, en un mismo experimento, la producción de xilanasas entre la cepa silvestre y los transformantes que sobreexpresan *xlnR* o sus variantes mutantes, lo que dificulta el análisis de resultados. En el caso de *P. oxalicum*, la sobreexpresión de *xlnR* condujo a incrementos mínimos en las actividades β -xilosidasa y endoxilanasas, así como en la concentración de proteínas extracelulares, en contraste con la mejora significativa observada con el mutante XlnR^{A871V}. En concordancia con los datos de Tam_XlnR^{V785F}, este aumento fue particularmente elevado en fases más avanzadas del cultivo (4 días en el caso de *T. amestolkiae* y entre 4 y 5 días en el de *P. oxalicum*) (Gao *et al.*, 2017). No obstante, la mutación alternativa XlnR^{V868F} no ha sido estudiada en *P. oxalicum*. En el caso de *T. reesei*, sí que se han generado estas tres cepas (con la sobreexpresión de XYR1 y la introducción de las mutaciones Ala824Val y Val821Phe en dicho activador transcripcional), pero los resultados de estas se han analizado en publicaciones diferentes usando distintas condiciones experimentales, lo que impide que se puedan comparar entre ellas (Derntl *et al.*, 2013; Ellilä *et al.*, 2017; Lv *et al.*, 2023; Zhao *et al.*, 2023).

Con el fin de evaluar el patrón de proteínas secretadas por la cepa nativa de *T. amestolkiae* y sus transformantes, se llevó a cabo un análisis por SDS-PAGE de los crudos enzimáticos de las distintas cepas obtenidos en el cuarto día de cultivo con xilano (Figura 44A). Los resultados revelaron un patrón de proteínas muy similar en todas ellas. Dado que los crudos de este hongo contienen una gran diversidad de glicosil hidrolasas y otras proteínas extracelulares, para identificar las β -xilosidasas y endoxilanasas, se realizaron sus correspondientes zimogramas. El de actividad endoxilanasas se llevó a cabo a partir de un gel SDS-PAGE que contenía xilano de haya (Figura 44B). Tras la renaturalización de las proteínas, se observaron, en todos los casos, cuatro bandas, aunque algunas de ellas mostraban intensidades diferentes. Las dos bandas de mayor tamaño eran mucho más intensas en Tam_XlnR, Tam_XlnR^{A788V} y Tam_XlnR^{V785F}, que en las cepas silvestre y control p1393, lo que indica una mayor producción de las enzimas

correspondientes en estos transformantes. El zimograma de actividad β -xilosidasa se realizó utilizando un gel de isoelectroenfoque en condiciones nativas, ya que la β -xilosidasa BxTW1 de *T. amestolkiae* es una proteína dimérica (Nieto-Domínguez *et al.*, 2015) y sería más complicada de renaturalizar tras SDS-PAGE. En la Figura 44C se observa una única banda en todas las cepas, con mucha más intensidad en Tam_XlnR^{V785F}, lo que evidencia una mayor producción de esta β -xilosidasa en este mutante. Por tanto, ambos zimogramas sugieren que el aumento de las actividades xilanolíticas en Tam_XlnR, Tam_XlnR^{A788V} y Tam_XlnR^{V785F} se debe a la mayor abundancia de β -xilosidasas y endoxilasas secretadas por el hongo, y no a la aparición de nuevas isoenzimas.

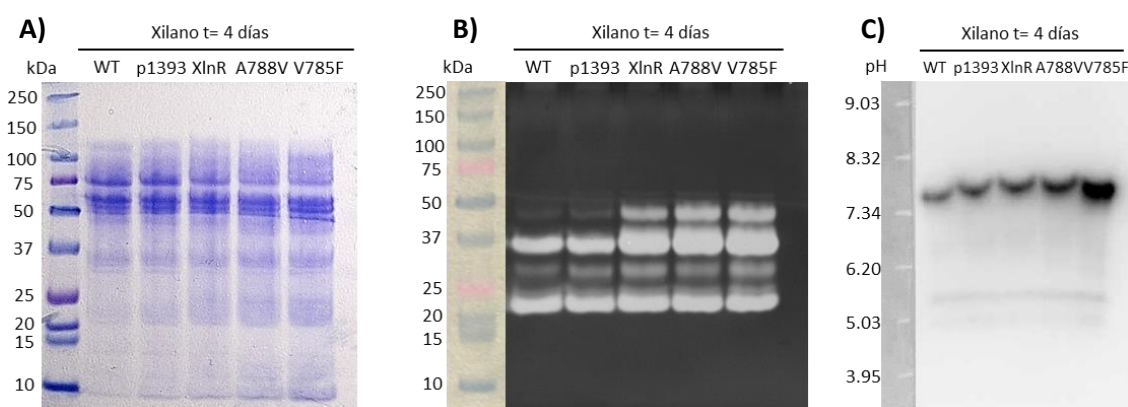


Figura 44. Perfil de proteínas, analizado por SDS-PAGE y zimogramas, de los sobrenadantes de Tam_XlnR, Tam_XlnR^{A788V}, Tam_XlnR^{V785F}, Tam_p1393 y Tam_WT, tras 4 días de cultivo en medio Mandels suplementado con 1% (p/v) de xilano de haya. A) Análisis SDS-PAGE de las proteínas secretadas. B) Zimograma para actividad endoxilanasas tras SDS-PAGE. C) Zimograma para actividad β -xilosidasa tras isoelectroenfoque. Todas las muestras se analizaron partiendo de la misma concentración de proteínas.

Para determinar si las modificaciones genéticas introducidas tenían algún impacto en el crecimiento de las distintas cepas de *T. amestolkiae*, se monitorizó la concentración de ergosterol en los cultivos. El ergosterol es un lípido específico de la membrana celular fúngica que se correlaciona con la concentración de biomasa (Mille-Lindblom *et al.*, 2004). La Figura 45A refleja que Tam_XlnR, Tam_XlnR^{A788V} y Tam_XlnR^{V785F} crecen más despacio que Tam_WT y Tam_p1393, siendo estas diferencias más notorias el primer día de cultivo y atenuándose en tiempos más largos. Este resultado es relevante puesto que, a pesar de esta reducción en la biomasa, las cepas que sobreexpresan *xlnR* y sus variantes mutantes muestran una mayor actividad xilanolítica. El menor crecimiento de estas tres cepas podría deberse a la carga metabólica que supone la mayor síntesis de este activador transcripcional. Además, el aumento en la producción de xilasas observado en Tam_XlnR^{V785F} no parece agravar dicha carga metabólica, dado que su patrón de crecimiento fue similar al de Tam_XlnR.

La sobreexpresión de *xlnR* y sus variantes mutantes también altera la morfología del micelio de *T. amestolkiae*, sobre todo en los primeros días de cultivo (Figura 45B). Mientras que Tam_WT y Tam_p1393 exhiben un crecimiento filamentoso denso, con hifas distribuidas homogéneamente, en Tam_XlnR, Tam_XlnR^{A788V} y Tam_XlnR^{V785F} se forman *pellets* esféricos, resultado de la agrupación de hifas. Estas diferencias morfológicas deberán tenerse en cuenta a la hora de optimizar y escalar la producción de xilanasas, ya que pueden influir significativamente en la eficiencia del proceso (Veiter *et al.*, 2018).

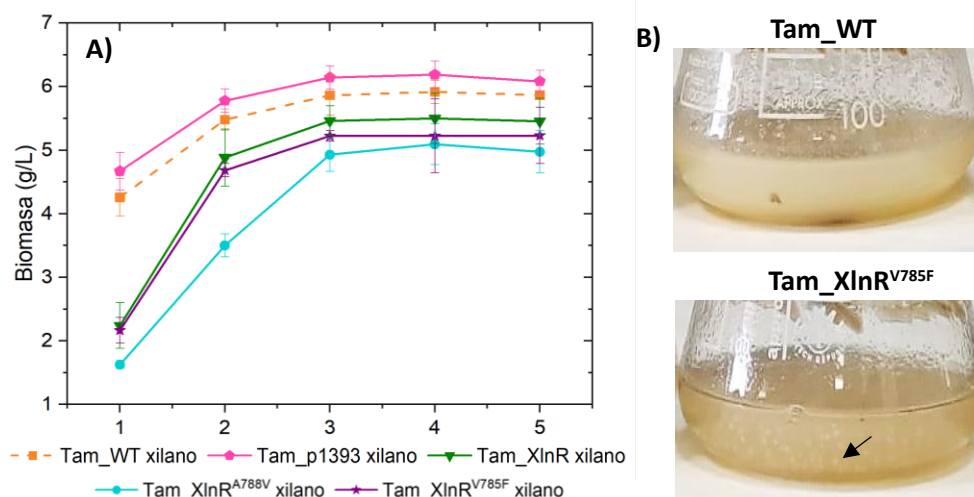


Figura 45: Crecimiento de Tam_XlnR, Tam_XlnR^{A788V}, Tam_XlnR^{V785F}, Tam_p1393 y Tam_WT en medio Mandels suplementado con 1% (p/v) de xilano de haya. A) Evolución de la concentración de biomasa fúngica determinada a partir de su contenido en ergosterol. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas. B) Fenotipo en el primer día de cultivo de Tam_WT (Tam_p1393 muestra un fenotipo similar) y Tam_XlnR^{V785F} (Tam_XlnR y Tam_XlnR^{A788V} exhiben un fenotipo parecido).

Dado que no se detectaron diferencias entre Tam_p1393 y Tam_WT en ninguno de los parámetros estudiados, se puede concluir que este plásmido de replicación autónoma, por sí solo, no afecta al crecimiento del hongo ni a la producción de xilanasas. Estos resultados coinciden con lo observado en la cepa de *Penicillium rubens* transformada con el plásmido p1394 (derivado del vector p1393 y utilizado en el Capítulo 3), puesto que no se encontraron diferencias significativas con respecto a la cepa silvestre en la tasa de crecimiento, morfología de las colonias y otras características fenotípicas (Villarino *et al.*, 2018).

Por último, con el fin de profundizar en su caracterización, se secuenció el genoma completo de la cepa Tam_XlnR^{V785F}, seleccionada para los siguientes experimentos. Este análisis permitió comprobar que el plásmido se encontraba, como era lo esperado, en estado autorreplicativo, ya que no se detectaron eventos de integración en el genoma del hongo. Estos resultados indican que el fenotipo observado en esta cepa debe atribuirse a los genes expresados en el vector, y no a ninguna alteración en el genoma de *T. amestolkiae*.

3. Desregulación parcial de la producción de xilanasas en el mutante Tam_XInR^{V785F} en presencia de glucosa

Para determinar la producción de xilanasas en condiciones no inductoras y de represión por carbono, Tam_XInR, Tam_XInR^{V785F} y Tam_WT, se cultivaron en medio Mandels suplementado con 1% (p/v) de glucosa. La Figura 46 muestra como en Tam_WT apenas se detectó actividad xilanólítica, mientras que Tam_XInR^{V785F} produjo altos niveles de β -xilosidasas y endoxilanasas. Concretamente, en el quinto día de cultivo se observó un incremento de 16,9 veces en la actividad β -xilosidasa, y en el tercer día, un aumento de 31,9 veces en la actividad endoxilanasas. Esto revela una importante desregulación del sistema xilanólico en la cepa recombinante, ya que fue capaz de evadir la fuerte inhibición que la glucosa ejerce en la cepa silvestre, como resultado de la represión catabólica por carbono (Llanos *et al.*, 2019). En cuanto a los niveles de proteína extracelular, estos fueron inicialmente inferiores en Tam_XInR^{V785F} en comparación con Tam_WT, hasta el cuarto día de cultivo, momento en el que el mutante los supera (Anexo 4- Figura 7B). Esta misma tendencia en la concentración de proteínas extracelulares también se observó en Tam_XInR, aunque el incremento registrado en el cuarto día de incubación fue solo ligeramente superior al de Tam_WT. Además, en este último mutante se detectó una leve mejora de 1,8 veces en la actividad β -xilosidasa, en el quinto día de cultivo, y de 1,7 veces en la actividad endoxilanasas, en el tercer día. Este modesto aumento en la producción de xilanasas encontrado en Tam_XInR, comparado con el obtenido en Tam_XInR^{V785F}, indica que la desregulación del sistema xilanólico se debe, principalmente, a la sustitución Val785Phe en XInR y no a la sobreexpresión del propio activador transcripcional.

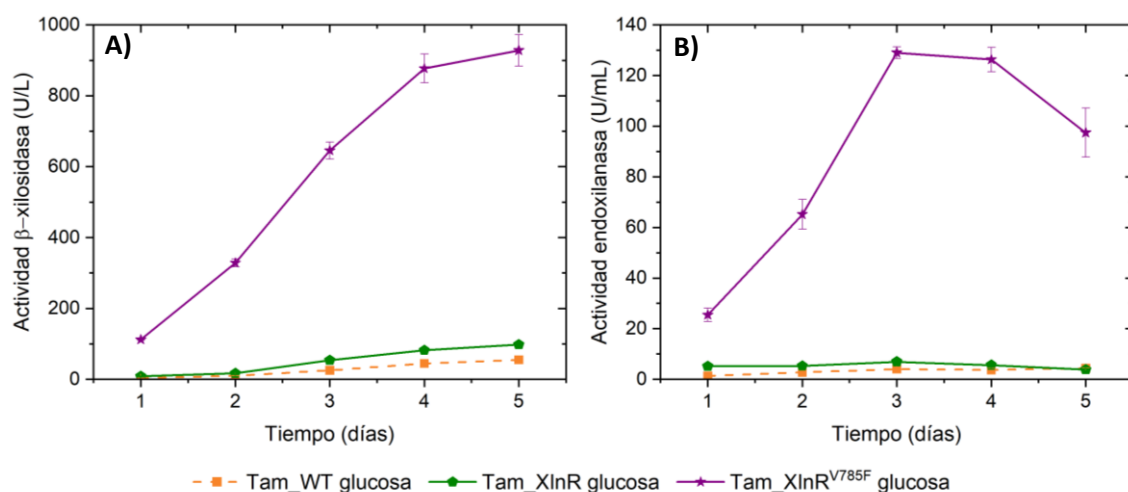


Figura 46. Actividades A) β -xilosidasa y B) endoxilanasas en los sobrenadantes de Tam_XInR, Tam_XInR^{V785F} y Tam_WT durante su crecimiento en medio Mandels suplementado con 1% (p/v) de glucosa. Las barras de error representan las desviaciones estándar de 3 réplicas.

Se han reportado resultados similares en un mutante de *T. reesei* en el que se sobreexpresa *xyr1* en un medio con glucosa (Derntl *et al.*, 2019). De igual manera, las sustituciones Ala824Val y Val821Phe en el XYR1 de *T. reesei* y Val756Phe en el XlnR de *A. niger* también permitieron una alta producción de xilanasas con glucosa o pulpa de remolacha azucarera (Derntl *et al.*, 2013; Kun *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2023).

Por otro lado, el patrón de proteínas secretadas en el cuarto día de cultivo, analizado por SDS-PAGE, mostró un perfil similar en Tam_WT y Tam_XlnR, mientras que en el mutante Tam_XlnRV^{785F} se observaron diferencias más marcadas, especialmente en la intensidad de las bandas de baja masa molecular (Figura 47A). En el caso del zimograma de actividad endoxilanasas, solo se visualizaron bandas en el mutante Tam_XlnRV^{785F}, siendo las dos de mayor masa molecular las que más destacaron (Figura 47B). Por su parte, en el zimograma de actividad β -xilosidasa, se observó una banda cuya intensidad es mucho mayor en Tam_XlnRV^{785F} que en Tam_WT (Figura 47C). Estos resultados corroboran que la sustitución de Val785Phe en XlnR provoca una desregulación en el sistema xilanólítico que favorece una producción más elevada de β -xilosidasas y endoxilanasas en condiciones no inductoras (y represoras), como es en presencia de glucosa. Sin embargo, esta desregulación parece ser parcial ya que en el caso de Tam_XlnRV^{785F}, en los zimogramas de actividad endoxilanasas con xilano (Figura 44B) y con glucosa (Figura 47B), se observaron variaciones en las intensidades de las bandas. Específicamente, las enzimas correspondientes a las dos bandas de menor masa molecular son más débiles en el crudo de glucosa que en el de xilano, siendo esta diferencia más evidente en la banda cercana a 20 kDa. El hecho de que los valores máximos de actividad xilanólítica y el tiempo de cultivo en que se alcanzan sean distintos en función del sustrato, también respaldan esta teoría.

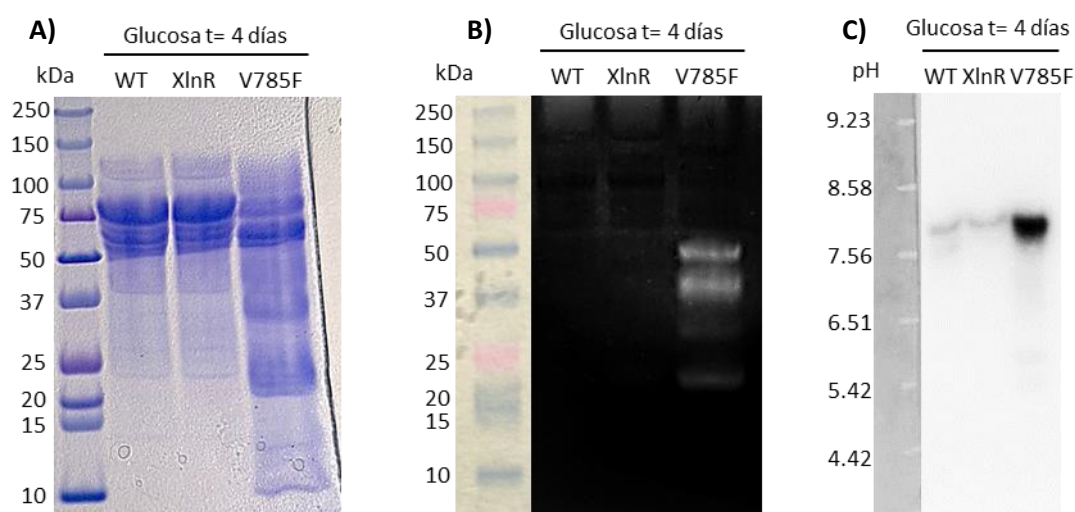


Figura 47. Perfil de proteínas, analizado por SDS-PAGE y zimogramas, de los sobrenadantes de Tam_XlnR, Tam_XlnRV^{785F} y Tam_WT tras 4 días de cultivo en medio Mandels suplementado con 1% (p/v) de glucosa. A) Análisis SDS-PAGE de las proteínas secretadas. B) Zimograma para actividad endoxilanasas tras SDS-PAGE. C) Zimograma para actividad β -xilosidasa tras isoelectroenfoque. Todas las muestras se analizaron partiendo de la misma concentración de proteínas.

4. Producción de xilanasas en el mutante Tam_XInR^{V785F} a partir de residuos agroindustriales

Con el objetivo de contribuir al establecimiento de una economía circular, resulta interesante emplear residuos renovables y de bajo coste para la obtención de cócteles enzimáticos ricos en xilanasas.

El **glicerol** es un subproducto abundante, generado durante la producción de biodiesel (Monteiro *et al.*, 2018). Para evaluar su uso en la producción de xilanasas con *T. amestolkiae*, las cepas Tam_XInR^{V785F} y Tam_WT se cultivaron en medio de Mandels suplementado con 1% (p/v) de glicerol. Los resultados muestran como los niveles de actividad β -xilosidasa y endoxilanasas en Tam_WT fueron muy bajos, mientras que el mutante experimentó incrementos de 13,8 y 22,7 veces, respectivamente, en dichas actividades enzimáticas en el sexto y cuarto día de cultivo (Figura 48). En cuanto a la concentración de proteínas extracelulares, esta también aumentó en Tam_XInR^{V785F} con respecto a Tam_WT durante todo el tiempo de cultivo (Anexo 4- Figura 7C).

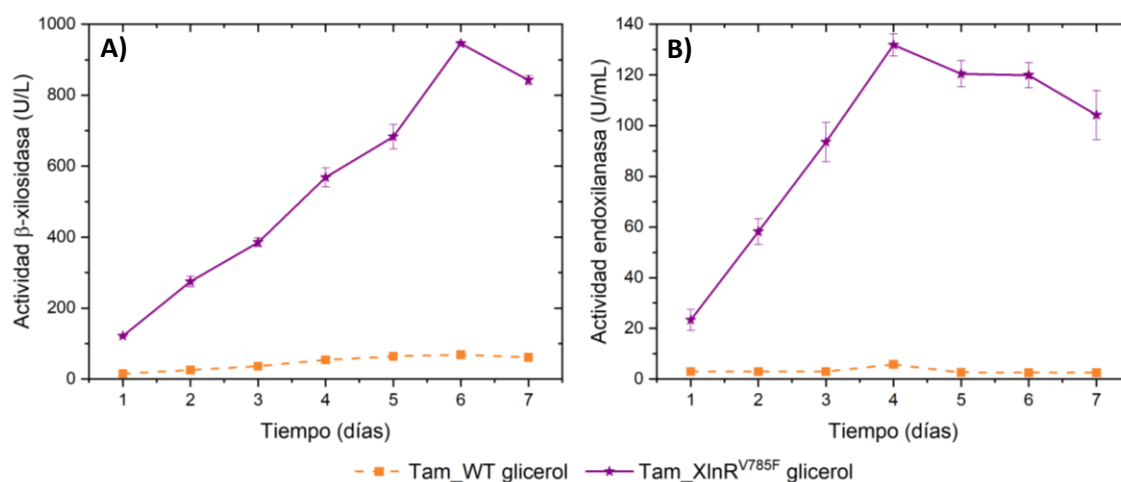


Figura 48. Actividades A) β -xilosidasa y B) endoxilanasas en los sobrenadantes de Tam_XInR^{V785F} y Tam_WT durante su crecimiento en medio Mandels suplementado con 1% (p/v) de glicerol. Las barras de error representan las desviaciones estándar de 3 réplicas.

Para estudiar el efecto del glicerol en el patrón de xilanasas secretadas, se llevaron a cabo análisis SDS-PAGE y zimogramas con los crudos de estas cepas en el sexto día de cultivo. La Figura 49 muestra una situación similar a la observada con los crudos obtenidos con glucosa, aunque en este caso las diferencias en la intensidad de las bandas y, por tanto, en la abundancia de β -xilosidasas y endoxilanasas entre Tam_XInR^{V785F} y Tam_WT no fueron tan marcadas. Como se mencionó anteriormente, en los zimogramas de actividad endoxilanasas (Figura 49B) también se detectaron variaciones en las intensidades de las bandas en Tam_XInR^{V785F} dependiendo del sustrato utilizado, lo que demuestra que aún se mantiene cierto nivel de regulación en la producción de estas xilanasas. En el caso de los crudos obtenidos con glicerol, las bandas más

visibles corresponden a proteínas de aproximadamente 50 kDa y 20 kDa, mientras que la banda de 37 kDa (la más abundante en los crudos de xilano y glucosa) apenas puede ser detectada.

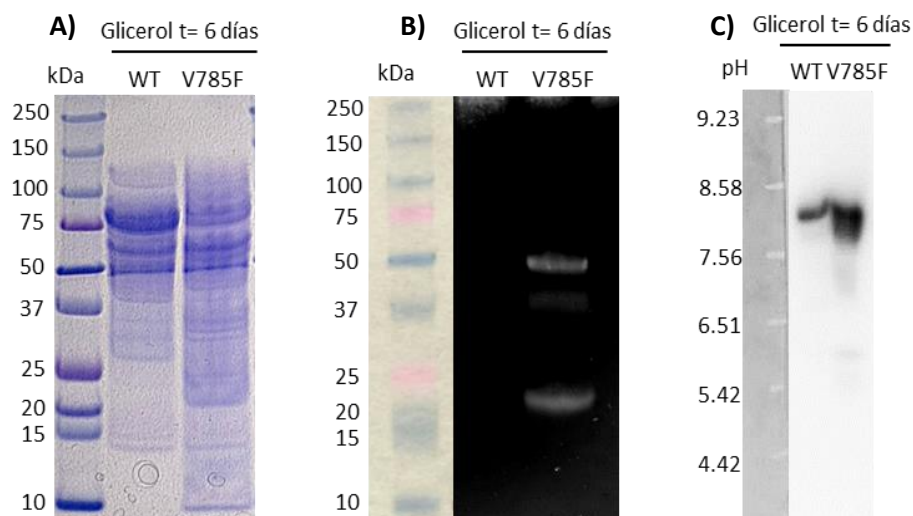


Figura 49. Perfil de proteínas, analizado por SDS-PAGE y zimogramas, de los sobrenadantes de Tam_XlnR^{V785F} y Tam_WT tras 6 días de cultivo en medio Mandels suplementado con 1% (p/v) de glicerol. A) Análisis SDS-PAGE de las proteínas secretadas. B) Zimograma para actividad endoxilanasas tras SDS-PAGE. C) Zimograma para actividad β -xilosidasa tras isoelectroenfoque. Todas las muestras se analizaron partiendo de la misma concentración de proteínas.

Otro residuo que se puede valorizar para la obtención de xilanasas con *T. amestolkiae* es el **bagazo de cerveza**, el cual es el subproducto sólido del grano de la cebada que queda tras la elaboración de esta bebida (Mussatto, 2014). Este residuo lignocelulósico contiene un 17-25% de xilano y su producción mundial supera los 34 millones de toneladas anuales (Ravindran *et al.*, 2018; Schmidt *et al.*, 2023). En este trabajo, el bagazo de cerveza fue suministrado por la cervecería La Cibeles (Madrid) y se pretrató con álcali suave para alterar su estructura y facilitar su posterior aprovechamiento por *T. amestolkiae*. Tam_XlnR^{V785F} y Tam_WT se cultivaron en medio Mandels suplementado con 1% (p/v) de bagazo de cerveza pretratado. Como se puede observar en la Figura 50, Tam_XlnR^{V785F} experimentó un aumento de 7,0 veces y 5,6 veces en las actividades β -xilosidasa y endoxilanasas, respectivamente, en comparación con Tam_WT en el cuarto día de cultivo. La concentración de proteínas extracelulares se comportó de manera similar a lo descrito con glucosa, puesto que Tam_XlnR^{V785F} secretó menos proteínas que Tam_WT durante los primeros días de cultivo, pero a partir del cuarto día presentó una concentración mayor que este (Anexo 4- Figura 7D).

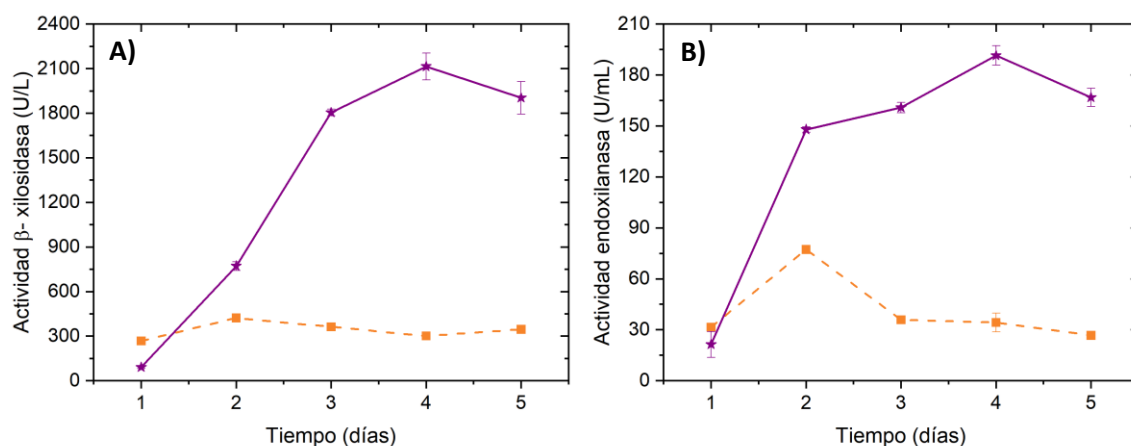


Figura 50. Actividades A) β -xilosidasa y B) endoxilanasas en los sobrenadantes de Tam_XlnR^{V785F} y Tam_WT durante su crecimiento en medio Mandels suplementado con 1% (p/v) de bagazo de cerveza pretratado. Las barras de error representan las desviaciones estándar de 3 réplicas.

5. Sacarificación de xilano utilizando los crudos enzimáticos del mutante Tam_XlnR^{V785F}

Una de las aplicaciones biotecnológicas de los cócteles enzimáticos ricos en xilanasas es la sacarificación del xilano presente en residuos agroindustriales, con el fin de liberar monosacáridos fermentables (en este caso xilosa). Por esta razón, y a modo de prueba de concepto, los cócteles enzimáticos de Tam_XlnR^{V785F} se utilizaron para sacarificar xilano de haya, comparando su rendimiento con los de Tam_WT. Para ello, los crudos de Tam_XlnR^{V785F} y Tam_WT se obtuvieron previamente de cultivos crecidos con los diferentes sustratos en el punto de máxima actividad xilanasas en cada caso: en el cuarto día de crecimiento para los crudos producidos con xilano, glucosa y bagazo de cerveza pretratado, y en el sexto día para los crudos generados con glicerol. Las actividades β -xilosidasa y endoxilanasas, así como las concentraciones de proteína extracelulares de todos estos crudos se muestran en la Tabla 25. Dado que la mejora en las actividades xilanolíticas probablemente se deba a un aumento en la concentración de las enzimas correspondientes, las sacarificaciones se realizaron utilizando el mismo volumen de cada cóctel.

Tabla 25. Actividades β -xilosidasa y endoxilanasas, y concentración de proteínas extracelulares de los crudos de Tam_WT y Tam_XlnR^{V785F} cultivados en medio Mandels suplementado con 1% (p/v) de xilano de haya, 1% (p/v) de glucosa o 1% (p/v) de bagazo durante 4 días, o 1% (p/v) de glicerol durante 6 días. Estos crudos enzimáticos se utilizaron para las sacarificaciones de xilano.

Sustrato	Cepa	Actividad β -xilosidasa (U/L)	Actividad endoxilanasas (U/mL)	Concentración de proteínas extracelulares (mg/L)
Xilano t= 4 días	Tam_WT	998,42 $\pm$ 32,78	60,77 $\pm$ 6,84	198,97 $\pm$ 5,94
	Tam_XlnR ^{V785F}	3292,76 $\pm$ 26,38	236,41 $\pm$ 8,31	258,46 $\pm$ 1,94
Glucosa t= 4 días	Tam_WT	44,67 $\pm$ 2,66	3,69 $\pm$ 0,67	112,46 $\pm$ 4,77
	Tam_XlnR ^{V785F}	876,84 $\pm$ 20,53	126,30 $\pm$ 4,8	156,68 $\pm$ 6,86
Glicerol t= 6 días	Tam_WT	68,70 $\pm$ 3,33	2,47 $\pm$ 0,18	136,74 $\pm$ 1,78
	Tam_XlnR ^{V785F}	945,25 $\pm$ 6,18	119,91 $\pm$ 4,99	158,62 $\pm$ 8,74
Bagazo t= 4 días	Tam_WT	301,49 $\pm$ 3,83	34,26 $\pm$ 5,56	474,84 $\pm$ 13,43
	Tam_XlnR ^{V785F}	2114,28 $\pm$ 30,09	191,44 $\pm$ 5,70	501,49 $\pm$ 8,87

Las sacarificaciones se llevaron a cabo con 50 g/L de xilano de haya, aplicando una agitación alta para garantizar la homogeneidad de las reacciones y se monitorizaron midiendo la liberación de xilosa. Los resultados de la sacarificación de xilano con los diferentes crudos de Tam_XlnR^{V785F} y Tam_WT se muestran en la Figura 51. En todos los casos se alcanzaron concentraciones más altas de xilosa con los crudos de Tam_XlnR^{V785F}, lo que confirma que estos cócteles xilanólitos son más eficaces que los obtenidos con la cepa silvestre y podrían utilizarse en el tratamiento de residuos de biomasa vegetal. Concretamente, los rendimientos de sacarificación del xilano, después de 24 h con los crudos de Tam_XlnR^{V785F} y Tam_WT, fueron 51,7% y 40,4%, para los crudos obtenidos con xilano, 45,3% y 31,6% para los de bagazo de cerveza pretratado, 38,5% y 1,2% para los de glucosa y 36,8% y 1,0% para los de glicerol. Es interesante destacar los resultados de los crudos generados a partir de glicerol y bagazo de cerveza pretratado, ya que son subproductos industriales que permitirían la utilización de materiales renovables y de bajo coste para producir cócteles enzimáticos ricos en xilanasas, contribuyendo a la economía circular. En el caso de los crudos de glicerol, la sacarificación fue posible únicamente con el uso de Tam_XlnR^{V785F}, mientras que con los de bagazo de cerveza pretratado, también podría utilizarse la cepa silvestre, aunque su eficacia es considerablemente menor que la del mutante.

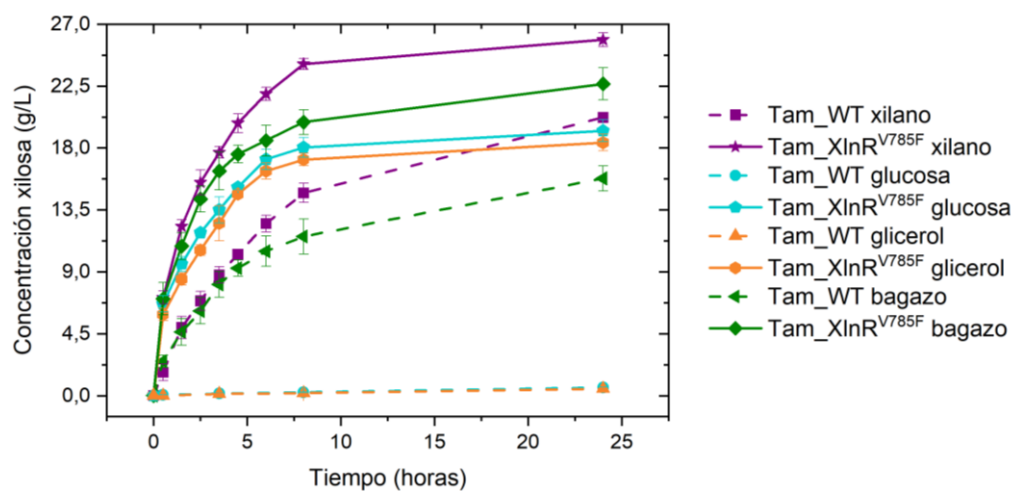


Figura 51. Sacarificación de 50 g/L de xilano de haya con los crudos enzimáticos de Tam_XlnR^{V785F} y Tam_WT obtenidos tras crecer los hongos en medio Mandels suplementado con 1% (p/v) de xilano, glucosa, glicerol y bagazo de cerveza pretratado. Las barras de error representan las desviaciones estándar de 3 réplicas.

Anexo 4

atggcacaaccgtcgagacacccgcttgacactctccgagagctcgattacgctctggagcaaatcgcttgcgcggaagtcgatataacaacagcagtagcagcaacggcaacaatgattctgtaaaaggataataaggcca
 ttgcgattctggctcaagaatcagattatgcgcagctcgtttcagatacagggctggtattcgcaagcattctgctgatacggcgcggtgcgcgcgggattagtcgagcttgcgactgtaatacagctacgaacgaagtgtatgggca
 gactcttctgacattgcacgggtgagatagaatgtcacatacaaaattataaattgctgaggtcaattcaacatcttttgggtcgtagattccggtctgagttgcgaatatgctagagaaagaaaaagcgcgaaagcatcaaaaaag
 atatcgagaagccgctgcgaagctggtggtgctgcgaacctggtactccggctacgagacgggtccagatcagtcattctcaattgtcgcggtcatggcctcagagctgtagtcgcggctgagtcagtcagcgctcgtttcagcgtc
 gcaggtcgagaccaacaacgggtcttctagctgcgcgaactgcgcaacagcagcaacagcagcagccatcacaaacgagatcaagacagttctccatcgaacatgaattcaatgacgatgaatggaggtgcagat
 gtatagtcagcttctcagatgctgactgcgagacttgcagccgaggtcgccatctcgatagttccggttggttaaatgggtttcagatgcgtacatggttatcagcgccgaccaatgaatcaataatccacagctctggaga
 agaaaaacagcaaacacatttactggcctcactcctctgctccagtcgcccggctggttacccttgcctgcacatccggtgggtttccatcgctgaatgtcgaatggtttcactagcacattgaaatcccggtcagagccattgttacctcat
 attgttgcattccgagctgctggcgtgtgatttctgcacctacttggcagcagctgctcctcacatattttccagtcaccgtggtgtaggacacgtattccgaaagaagtcgactcctacatacaaccacgcacatgcagtc
 ccgctttattggcagcatgctctgggtagcagctcagactagcagtcgcccgtttttgacatcacctcctcagcgcgaggaagggtctgtcagaagttaactggagcttacagttgcttcgaccccttaatacatgtctcagcccgagaa
 acgtcgccataattacgctccaatgcggtcatcaacggagttgcgtaggggattcggtgtatctatgtagtcgctggtgcacaaagcagcgctaccggagcagtcgacgacgttgccacatactacacgtggtatcagccagc
 gagtacaaggctgcaagcatccgctggtggctgcagcatggtctctagcagcggaactaaaactcgagcgtggaacttccgcaacgcctcgcagcctcagaatcatgacgagatggcactattgagatagagcccaaccgacgcgagata
 cgagccatgtcaccgaagaacgagaagaacgtagggcaatatggtggcttctctacgtgatgtagcgcatttggcgttatgctaacgcggcgttgacattactggataaagagtgtaggggtgtacagccgatgaacgacgatattt
 ggcaagagggcgagcttgaatgcgggttacgcagcagcaggtccagcttgaatgtacagggcagcagcatgttgggtacttctaccgttgatgactattcttggtaaatcgtcgattgaatcagcggaaccatctcgggttggatttc
 atttgcgaacgagcgcgagtggtggatagtcatactgtggagattactcgacagctcgtctacgaacagagctacgcgaatttgagactcgacatacggcgagtttggcattggaaatgagggcgctgctgctggttgaatgctacagc
 acccaggggattgatcatgtcagtcagcagagatctgcgacacagtggtgtcccgagtcgaatgaatcgttatcgacacaaatggtcgtcgacacggcactacctcatgcagctttacattctgctcggaaggtgggacccg
 atctctttactagcagataacgatctctggtttcatcagaagccttcatcagctatgggcccacgctgaaggccgccaagcagcgtccgatattagaatacagccagattgagtttatgccattcttctcgcatattctctacaagg
 cagtttctgactgcttacggcgataaattacaaggcagcgtgacccatagcgttgcagggcagtcgagacgatatgacggcgcaagagcgtggttgaactgaatacagagatcaggttcgattgtgtccctttagctattctcc
 cccaatttttttttagttatattgctgacgacgttcagcgcaatttccgaaaagtcagctcgcactgcaagtcgcccgcgtgccagacgatttggcgaacagcaacacgacggcgaggttctcgacatttctgctggacg
 gtgacggcagcggttgcctttatga

Figura 1. Secuencia de nucleótidos del gen del activador transcripcional XlnR de *T. amestolkiae* (1-2858 nt). Los intrones se muestran en azul, y las mutaciones silenciosas introducidas para facilitar futuros clonajes, en rojo. Los codones de los residuos A788 y V785 se indican en amarillo y verde, respectivamente, y los nucleótidos sustituidos para dar lugar a las mutaciones A788V y V785F, se resaltan en negrita.

Página | 175

Tamestolkiae	SNGFTSTLKYPVLEPLPHIVSIIPQSLACDLDLYFASTSASHIFPQSPYVVGHVFRKK	383
Poxalicum	-APFTSSLRYPVLQPVLPHIASIIPQSLACDLDVYFTSSSSSHMSPSPYVVGHVFRKQ	454
Aniger	-HPFSSTLRYPVLQPVLPHIASIIPQSLACDLDVYFTSSSSSHLSPYVVGVIYFRKQ	380
Treesei	PIFKQSDLRYPVLEPLPHLGNILPVSLACDLIDLYFSSSSSAQMHPMSPYVLGVFVFRKR	395
Ncrassa	PTYSHAQLRYPVLEPLPHLGNLMPVSLACDLIDLYFASSSSAQMHPMSPYVLGVFVFRKR	401
	: *:****:****: .:.* *****:****:****: : * ****:*.****:	
Tamestolkiae	SILHQTQPRTCSPALLASMLWVAQTSDAPFLTSPPSARGRVCQKLELTVGLLRPLIHG	443
Poxalicum	SFLHPTKPRVCSPELLASMLWVAQTSEAAFLTSPPSARGRVCQKLELTVGLLRPLIHG	514
Aniger	SFLHPTKPRICSPPELLASMLWVAQTSEAAFLTSPPSARGRVCQKLELTIGLLRPLVHG	440
Treesei	SFLHPTNPRRCQPALLASMLWVAQTSEASFLTSLPSARSKVCQKLELTVGLLQPLIHT	455
Ncrassa	SFLHPTKPRQCQPALLASMLWVAQTSDAPFLTSPVPSARGKICQKLELTVSLLKPLIHT	461
	*:** *:** *.*.*****:**** *****.*****:****:****:	
Tamestolkiae	PTPGETSPNYAANAVINGVALGGFGVSM-----DQLGAQS---SATGAVDDVATYIHLA	494
Poxalicum	PATGEASPNYAANMNINGVALGGFGVSM-----DQLGAQS---SATGAVDDVATYVHLA	565
Aniger	PATGEASPNYAANMNINGVALGGFGVSM-----DQLGAQS---SATGAVDDVATYVHLA	491
Treesei	GTN---SPSPKTSPVVGAAALGVLGVAMPGLNMDSLAGETGAFGAIGSLDDVITYVHLA	512
Ncrassa	PSE---EPSPVSSPIVDGVALGGLGVALPGSISMDALTGETGAFGAAGTLDDVVITYIHLA	518
	: .*. .: .:....** *:***: * * .: .* *:*** **:***	
Tamestolkiae	TVVSASEYKAASIRWAAAWSLARELKLGRELPPTSPQP-QNHDRDGTIEIEPK-----	547
Poxalicum	TVVSASEYKAASMRWWTAAWSLARELKLGRELPNANN-RQGDIEGESELDMNGNKRQS	624
Aniger	TVVSASEYKAASMRWWTAAWSLARELKLGRELPNVSHARQDGERDGDG----EADKRHP	547
Treesei	TVVSASEYKGASLRWGAAWSLARELKLGRELPNPPANQEDGEGLSERVEDHDL----	568
Ncrassa	TVVSASEYKGASLRWNAAWSLARELKLGREIPQNSPSMQN-SGSELDGE-----	567
	*****.****:**** *****:****: :	
Tamestolkiae	-----PTRDTSHTVEEREERRRIWWLLYVMDRHLALCYNRPLTLLDKECEGLLQ	597
Poxalicum	NSLLNAMGHGSGSSSINLTEEEREERRRIWWLLYVMDRHLALCYNRPLTLLDKECEGLLQ	684
Aniger	PTLITSLGHGSGSGGINVTEEREERRRLWWLLYATDRHLALCYNRPLTLLDKECGLLQ	607
Treesei	-----NRNTRFVTEEREERRRAWLVYIVDRHLALCYNRPLFLDSECSLDYH	618
Ncrassa	-----MGNIPGMITEEREERRRIWWLVYIVDRHLALCYNRPLFLDIECDGLLQ	617
	:***** *****:**** ***** ***** ** ** .* :	
Tamestolkiae	PMNDDIWHRGELVN-----AGYRRAGPSFECTGHGMFGYFLPLMT	637
Poxalicum	PMNDDLWQAGDFSA-----ASYRRAGPAFECTGHSTFGYFLPLMS	724
Aniger	PMNDDLWQVGDFAA-----AAYRQVGPPVECTGHSMYGYFLPLMT	647
Treesei	PMDDIKWQAGKFRSHDAGNSSINIDSSMTDEFGDSPRAARGAHYECGRSIFGYFLSLMT	678
Ncrassa	PMDDTDYQNGNFYAYTDPNVL-----ASDPNTPAARHRGPSFVCTGHSIFGYFLPLMT	670
	:* :*: : * * *: .:** **:	
Tamestolkiae	ILGEIVDLNHARNHPRFGIHFRTSGEWSHTVEITRQLDVYEQSLREFETRHTASLGIGN	697
Poxalicum	ILGEIVDLQHARNHPRFGLHFRNSGEWESQAIEITRQLDVYAQSLKEFEARYTSSLALGA	784
Aniger	ILGGIVDLHHAENHPRFGLAFRNSPEWERQVLDVTRQLDITYGRSLKEFEARYTSNLTGA	707
Treesei	ILGEIVDVHAKSHPRFGVGFARSARDWEQVAEITRHLDMYEEESLKRFAKHLPLSSKDK	738
Ncrassa	ILGEIVDLHARNHPRFGVGFRRSREWDQTAETIRHLEIYEESIKRFEHRNLSLSAQAAQ	730
	*** ***:**..*****: **. :*: .: .:***: * *.*:.* :	

Tamestolkiae	EGAADA---GFNATAPTGDHVSP---SARSS-STVGSRVNESLMQTKMVVAYGYLMH	749
Poxalicum	D-NDT-----TMEGAHLNHVSP---SGRSNSSTVGSHVNESIVHTRMVVAYGTHIMH	832
Aniger	TDNEP-----VVEGAHLNHTSP---SGRSS-STVGSRVSESIVHTRMVVAYGTHIMH	755
Treesei	EQHEMHDS--GAV-----TDMQSPLSVRTNASSRMTSEIQASIVVAYSTHVMH	785
Ncrassa	AADEKAAEAAGVPTANDVPHDAGTPSVQS-VHSVHTTSSRMTESDIQTRIVMAYGTHVMH	789
	* ...*::.*. :: :*:*.***::**	
Tamestolkiae	VLHILLVGKWDPISSLDDNDLWISSEAFITAMGHVKA ⁷⁴⁸ EAASDILEYDPDLSFMPFFFG	809
Poxalicum	VLHILLAGKWDPINLLDDNDLWISSDSFITAMGHAVSAAEAAADILEYDPDLSFMPFFFG	892
Aniger	VLHILLAGKWDPVNLLDDHDLWISSESFVSAMSHAVGAEEAAEILEYDPDLSFMPFFFG	815
Treesei	VLHILLADKWDPINLLDDDLWISSEGFVTATSHAVSAAEASIQILEFDPGLEFMPFFYG	845
Ncrassa	VLHILLTGKWDPINLLDDNDLWISSQGFITATGHAVSAAEASINILEYDPGLEFMPFFFG	849
	*****..***:.**:*..*****:.*:* .*** ***** :*:***.*.*****:*	
Tamestolkiae	IYLLQGSFLLLLTADKLQGDADPSVVRACETIVRAHEACVVTLNTEYQRNFRKVMRSALA	869
Poxalicum	IYLLQGSFLLLLTADKLQGDASPSVVRACETIVRAHEACVVTLNTEYQRTFRKVMRSALA	952
Aniger	IYLLQGSFLLLLAADKLQGDASPSVVRACETIVRAHEACVVTLNTEYQRTFRKVMRSALA	875
Treesei	VYLLQGSFLLLLIADKLQAEASPSVIKACETIVRAHEACVVTLSTEYQRNFSKVMRSALA	905
Ncrassa	IYLLQGSFLLLLIADKLQVEASPSVVKACETIIRAHEACVVTLNTEYQRNFSRVMSALA	909
	:***** ***** :*.***:*****:*****.*****.* :*****	
Tamestolkiae	QVRGRVPDDFGEQQRRREVLALYRWTGDGSGGLAL	904
Poxalicum	QVRGRVPEDFGEQQRRREVLALYRWSGDGSGGLAL	987
Aniger	QVRGRIPEDFGEQQRRREVLALYRWSGDGSGGLAL	910
Treesei	LIRGRVPEDLAEQQRRRELLALYRWTGNGTGLAL	940
Ncrassa	QVRGRVPEDLGEQHQRRELLALYRWTGDGTGLAL	944
	:***:*:*..**.******:*****:***:*****	

Figura 2. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de XlnR de *T. amestolkiae* (GenBank BHQ10_006915), *P. oxalicum* (Gao *et al.*, 2017), *A. niger* (Hasper *et al.*, 2004), *T. reesei* (Arai *et al.*, 2022) y *N. crassa* (Craig *et al.*, 2015). Los números indican la posición de los aminoácidos; los guiones representan huecos en el alineamiento; los asteriscos señalan residuos conservados en las cinco proteínas, y los puntos muestran cambios conservados en algunas de ellas. Los residuos mutados (sustituciones Ala→Val y Val→Phe) están resaltados en amarillo y verde (A788 y V785, respectivamente, en *T. amestolkiae*). El alineamiento se realizó usando Clustal Omega con los ajustes predeterminados.

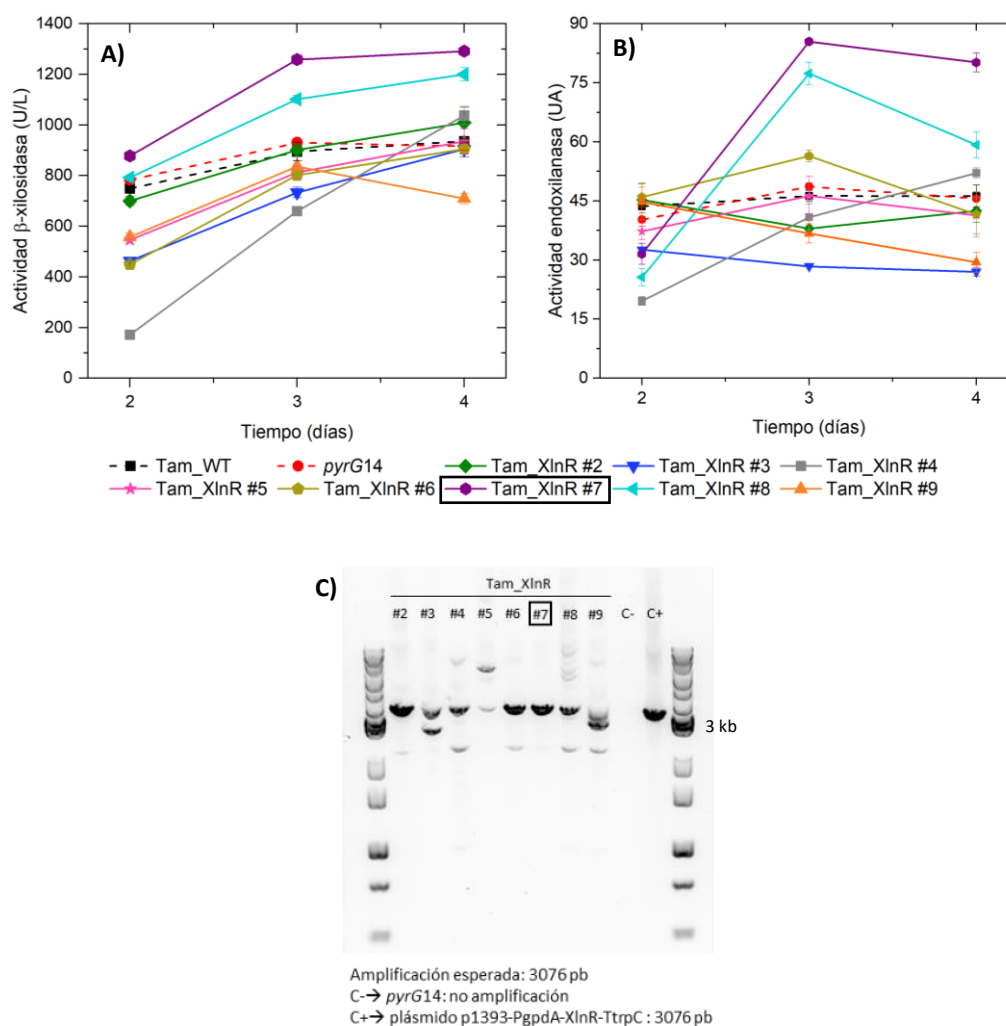


Figura 3. Screening de mutantes obtenidos en la transformación de Tam_pyrG14 con el plásmido p1393-PgpdA-XlnR-TtrpC (Tam_XlnR). El mutante seleccionado está señalado con un recuadro negro. Actividad A) β -xilosidasa y B) endoxilanasas de los sobrenadantes de estos mutantes cultivados en medio Mandels suplementado con 1% (p/v) de xilano de haya. Tam_WT y Tam_pyrG14 fueron incluidos como controles. C) Resultado de la PCR utilizada para analizar los transformantes Tam_XlnR. Se usó Tam_pyrG14 como control negativo y el plásmido como control positivo. El marcador de masa molecular utilizado fue 1 kb DNA Ladder Plus (NIPPON Genetics).

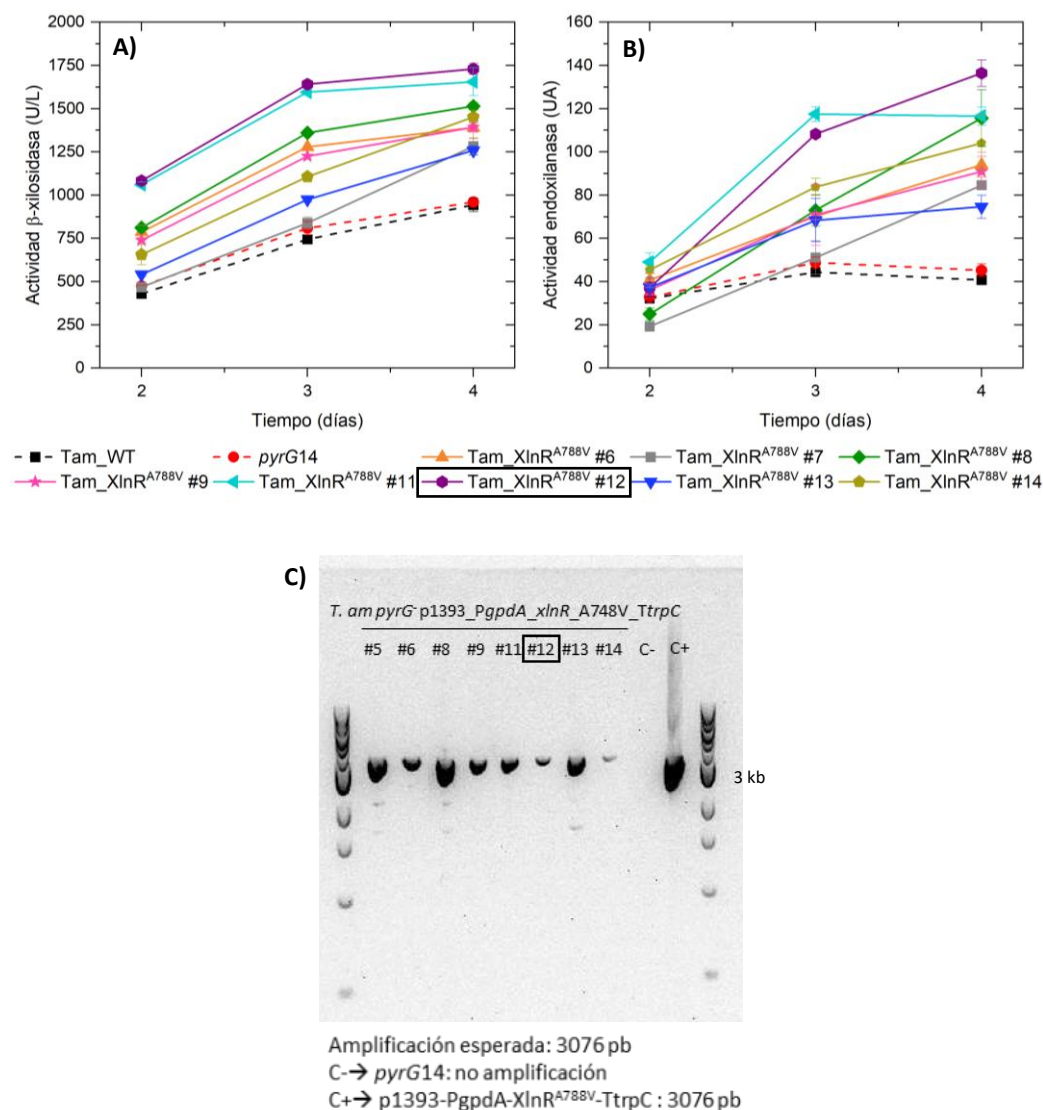


Figura 4. *Screening* de mutantes obtenidos en la transformación de Tam_pyrG14 con el plásmido p1393-PgpdA-XlnR^{A788V}-TtrpC (Tam_XlnR^{A788V}). El mutante seleccionado está señalado con un recuadro negro. Actividad A) β -xilosidasa y B) endoxilanasas de los sobrenadantes de estos mutantes cultivados en medio Mandels suplementado con 1% (p/v) de xilano de haya. Tam_WT y Tam_pyrG14 fueron incluidos como controles. C) Resultado de la PCR utilizada para analizar los transformantes Tam_XlnR^{A788V}. Se usó Tam_pyrG14 como control negativo y el plásmido como control positivo. El marcador de masa molecular utilizado fue 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs).

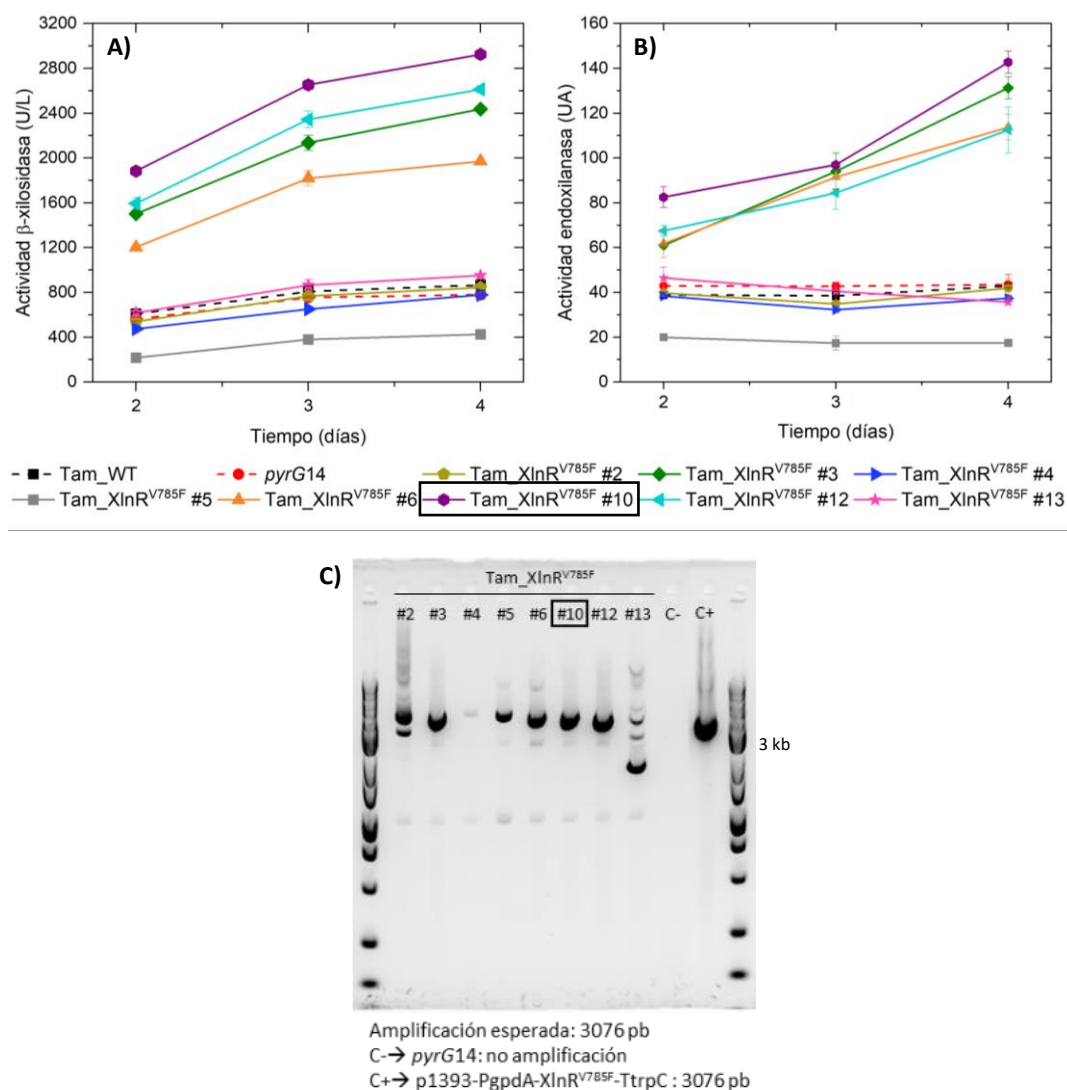


Figura 5. Screening de mutantes obtenidos en la transformación de Tam_pyrG14 con el plásmido p1393-PgpdA-XlnR^{V785F}-TtrpC (Tam_XlnR^{V785F}). El mutante seleccionado está señalado con un recuadro negro. Actividad A) β -xilosa y B) endoxilasa de los sobrenadantes de estos mutantes cultivados en medio Mandels suplementado con 1% (p/v) de xilano de haya. Tam_WT y Tam_pyrG14 fueron incluidos como controles. C) Resultado de la PCR utilizada para analizar los transformantes Tam_XlnR^{V785F}. Se usó Tam_pyrG14 como control negativo y el plásmido como control positivo. El marcador de masa molecular utilizado fue 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs).

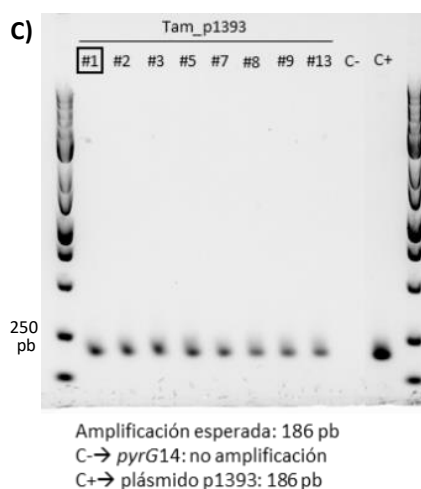
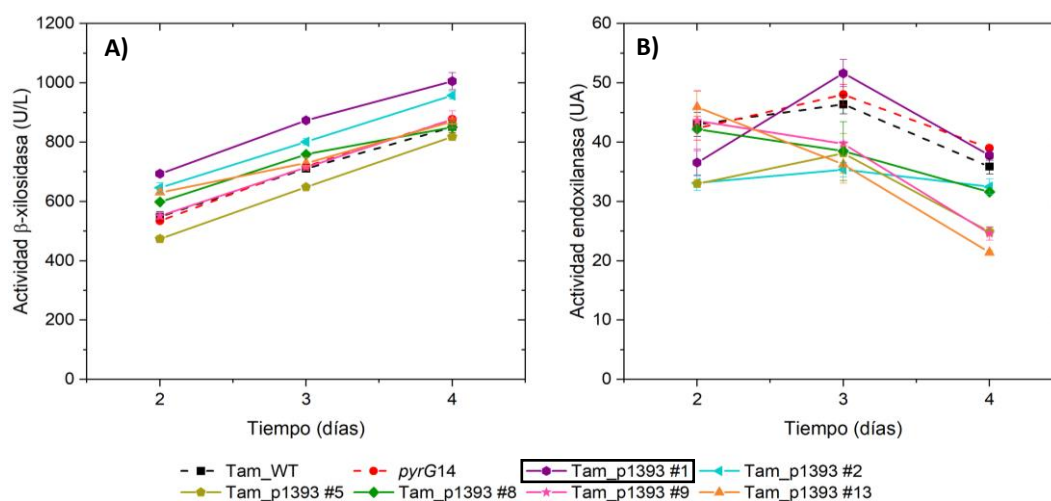


Figura 6. Screening de mutantes obtenidos en la transformación de Tam_pyrG14 con el plásmido p1393 (Tam_p1393). El mutante seleccionado está señalado con un recuadro negro. Actividad A) β -xilosidasa y B) endoxilanasas de los sobrenadantes de estos mutantes cultivados en medio Mandels suplementado con 1% (p/v) de xilano de haya. Tam_WT y Tam_pyrG14 fueron incluidos como controles. C) Resultado de la PCR utilizada para analizar los transformantes Tam_p1393. Se usó Tam_pyrG14 como control negativo y el plásmido como control positivo. El marcador de masa molecular utilizado fue 1 kb DNA Ladder Plus (NIPPON Genetics).

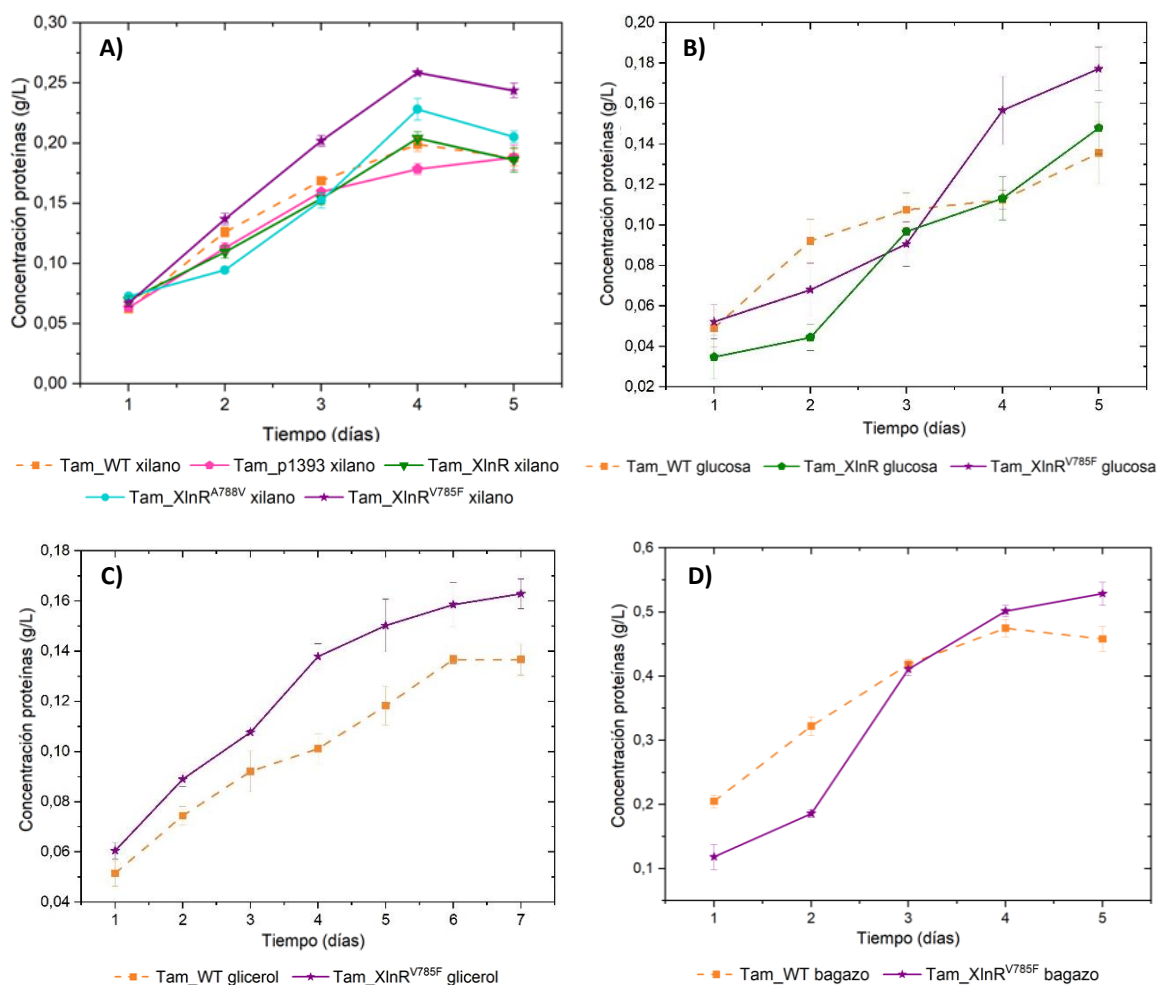
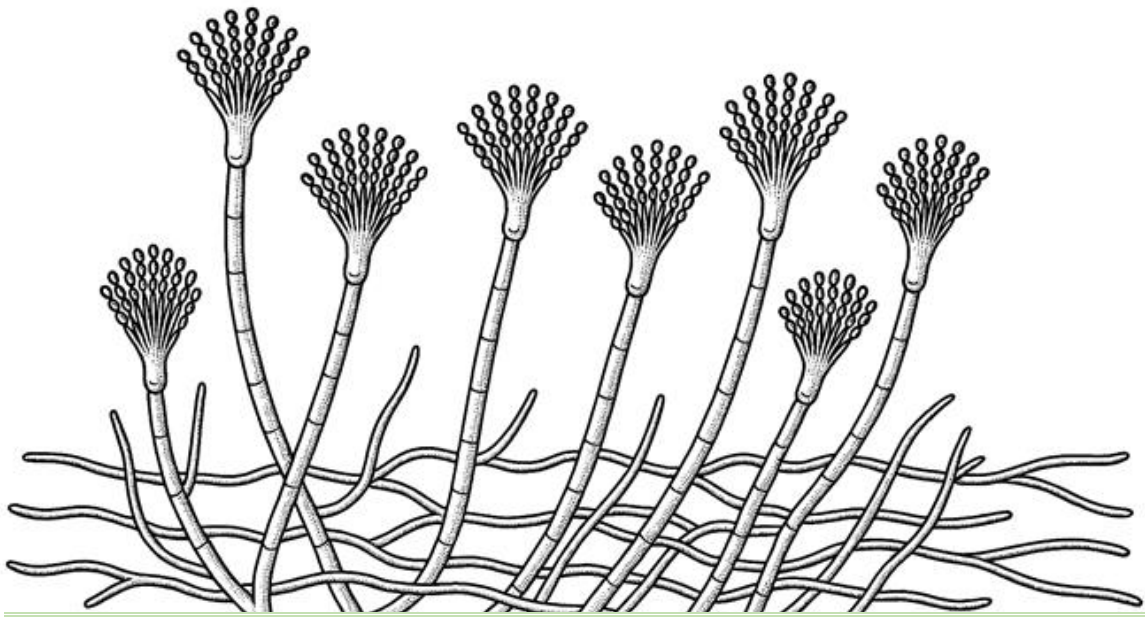


Figura 7. Concentración de proteínas extracelulares de los mutantes y cepa silvestre de *T. amestolkiae* cultivados en medio Mandels con distintos sustratos. A) Tam_XlnR, Tam_XlnR^{A788V}, Tam_XlnR^{V785F}, Tam_p1393 y Tam_WT con 1% (p/v) de xilano de haya. B) Tam_XlnR, Tam_XlnR^{V785F} y Tam_WT con 1% (p/v) de glucosa. C) Tam_XlnR^{V785F} y Tam_WT con 1% (p/v) de glicerol. D) Tam_XlnR^{V785F} y Tam_WT con 1% (p/v) de bagazo de cerveza pretratado. Las barras de error representan las desviaciones estándar de 3 réplicas.

DISCUSIÓN



La degradación del xilano, la hemicelulosa más abundante en la naturaleza, requiere la acción sinérgica y coordinada de diversas xilanasas, entre las que destacan las endoxilanasas y las β -xilosidasas. Estas enzimas son producidas por hongos filamentosos en grandes cantidades (Polizeli *et al.*, 2005), y tienen una gran relevancia biotecnológica, pudiéndose aplicar en diferentes procesos industriales como la sacarificación de xilano, la producción de xilooligosacáridos (XOS), el blanqueo de la pasta de papel, la mejora de la textura y el volumen de productos de panadería, y la elaboración de piensos más digeribles para el ganado (Bhardwaj *et al.*, 2019). Las aplicaciones más extendidas se basan en la hidrólisis del xilano, pero en los últimos años han surgido otros usos biotecnológicos asociados a la capacidad de algunas de estas enzimas para llevar a cabo la síntesis de glicósidos mediante reacciones de transglicosilación. En todos los casos, dado que cada proceso tiene sus particularidades, se necesitan nuevas endoxilanasas y β -xilosidasas que sean robustas y tengan propiedades adecuadas para las distintas aplicaciones. Además, es fundamental poder producir estas enzimas en grandes cantidades para su uso eficiente en contextos industriales. Bajo esta perspectiva, se realizará, a continuación, una discusión integradora de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral.

1. La levadura *Pichia pastoris* como hospedador para la producción heteróloga de XynSOS

Para poder llevar a cabo la caracterización y búsqueda de aplicación biotecnológica de la endoxilanasas XynSOS de *T. amestolkiae*, era indispensable producirla en grandes cantidades y disponer de un método de purificación que permitiera obtener rendimientos razonables. En los secretomas del hongo, estudiados en presencia de distintas fuentes de carbono, esta enzima era minoritaria (de Eugenio *et al.*, 2017). Por esta razón, se planteó su producción heteróloga en la levadura metilotrófica *P. pastoris*, que destaca por ser un sistema de expresión altamente eficiente para la producción de proteínas extracelulares, y en el que se puede utilizar el promotor del gen de la alcohol oxidasa 1 (*aox1*). Este promotor, fuerte e inducible por metanol, permite una producción elevada y controlada de la proteína de interés (Pan *et al.*, 2022). Además, *P. pastoris* es capaz de producir proteínas recombinantes solubles y correctamente plegadas, así como de realizar modificaciones postraduccionales, lo cual es esencial para la secreción y funcionalidad de muchas enzimas fúngicas (Daly & Hearn, 2005). Otras ventajas de usar esta levadura son su capacidad para alcanzar altas densidades en medios de cultivo económicos (Daly & Hearn, 2005), su estabilidad genética (Pan *et al.*, 2022) y su uso ampliamente establecido, tanto en investigación como en la industria, gracias a su disponibilidad comercial (*Pichia Expression Kit*, Invitrogen).

Por otra parte, en trabajos anteriores se observó que *P. pastoris* era un buen sistema de expresión heteróloga para otras glicosil hidrolasas (GHs) de *T. amestolkiae*, incluida la

endoxilanasas rXynM de la familia GH11, ya que se obtuvieron en mayores cantidades en los cultivos de *P. pastoris*, que en los crudos del hongo (Méndez-Líter *et al.*, 2017; Nieto-Domínguez *et al.*, 2015, 2016, 2019). En el caso de la endoxilanasas rXynSOS, objeto de estudio de esta Tesis Doctoral, también fue producida con éxito en *P. pastoris* y, aunque estaba fuertemente glicosilada, mostró una alta afinidad por xilano de haya y arabinoxilano. La purificación de la enzima se logró mediante un solo paso cromatográfico (Figura 22B), lo cual probablemente se deba a que, a diferencia de otros sistemas de expresión, esta levadura secreta pocas proteínas endógenas al medio extracelular, lo que facilita la purificación de las proteínas recombinantes (Cregg *et al.*, 1993). Esto también ocurrió en el caso de la β -xilosidasa rBxTW1, la β -glucosidasa rBGL-2 y la endoxilanasas rXynM de *T. amestolkiae*, en las que se redujeron las etapas del proceso de purificación, pasando de dos o tres pasos cromatográficos con los crudos del hongo a un solo paso utilizando los cultivos de *P. pastoris* (Méndez-Líter *et al.*, 2017; Nieto-Domínguez *et al.*, 2015, 2016, 2019). Además, en estas mismas enzimas se determinó que la hiperglicosilación no modificaba sus propiedades, e incluso en algunos casos las mejoraba (Méndez-Líter *et al.*, 2017; Nieto-Domínguez *et al.*, 2015, 2016, 2019).

Finalmente, la expresión heteróloga de genes de GHs en *P. pastoris* también permite aplicar, de forma rápida y sencilla, estrategias de ingeniería de proteínas para mejorar las propiedades de las enzimas o modificar su actividad (Daly & Hearn, 2005). En el caso de rXynSOS, este sistema se aprovechó para desarrollar la variante glicosintasa rXynSOS^{E236G}.

2. Producción de xilooligosacáridos con la endoxilanasas rXynSOS

Además de estar implicadas en la sacarificación de residuos agroindustriales ricos en xilano, las endoxilanasas tienen otras aplicaciones biotecnológicas, como la producción de XOS. Los XOS presentan características superiores en comparación con otros oligosacáridos prebióticos más establecidos, como los fructooligosacáridos (FOS) y los galactooligosacáridos (GOS). Por ejemplo, son estables en rangos más amplios de pH (2,5-8) y temperatura (hasta 100 °C), lo que les permite resistir la acción de los jugos gástricos y llegar intactos al intestino grueso (Poletto *et al.*, 2020). Además, tienen un sabor más dulce y un valor calórico menor, siendo más atractivos para los consumidores (Corim Marim & Gabardo, 2021). Por último, los XOS son fermentados de manera selectiva por bacterias beneficiosas, mientras que los FOS y los GOS requieren dosis más altas para generar beneficios terapéuticos similares y pueden provocar efectos secundarios, como hinchazón o gases, debido a que también son metabolizados por microorganismos patógenos no deseados (Poletto *et al.*, 2020). Estas ventajas posicionan a los XOS como prebióticos emergentes de gran interés para las industrias alimentaria, farmacéutica

y ganadera, con un valor de mercado estimado en 144,5 millones de dólares para 2033 y una tasa de crecimiento anual compuesta del 7% (Tamayo-Peña *et al.*, 2024).

Los XOS se encuentran de forma natural en cereales, verduras y frutas, aunque en cantidades insuficientes para ejercer una acción prebiótica efectiva. En consecuencia, su producción se realiza a partir de la hidrólisis de materiales lignocelulósicos ricos en xilano mediante procesos químicos, hidrotermales, enzimáticos o combinaciones de ellos. La hidrólisis enzimática con endoxilasas es una opción más sostenible, ya que emplea condiciones de reacción más suaves y no requiere de reactivos que generan problemas medioambientales. Además, no genera subproductos indeseables ni libera grandes cantidades de xilosa, lo que facilita la purificación de los XOS y permite un mayor control sobre su grado de polimerización, obteniéndose mayoritariamente cadenas de 2 a 4 unidades de xilosa (Amorim, Silvério, Prather, *et al.*, 2019; Fuso *et al.*, 2022). Los XOS de bajo grado de polimerización (2-6 unidades) son los más demandados en el mercado, ya que la microbiota intestinal los fermenta con mayor facilidad, generando un efecto prebiótico más rápido (Poletto *et al.*, 2020; Valladares-Diestra *et al.*, 2023).

En el Capítulo 1 se ha demostrado que la endoxilasa rXynSOS de *T. amestolkiae* es capaz de producir XOS, principalmente con un grado de polimerización de 2 a 4 unidades de xilosa, en una reacción de 2 h a partir de xilano de haya. Si la reacción continúa hasta las 5 h, el rendimiento mejora, pero la proporción de xilotetraosa y xilotriosa se reduce en favor de la xilobiosa. La Tabla 26 revela que los rendimientos de producción de XOS de rXynSOS son comparables a los de otras endoxilasas fúngicas. Sin embargo, en el caso de otros biocatalizadores que logran mejores resultados, se necesitan mayores dosis de enzima y tiempos de reacción más largos. Hay que destacar que la comparación de la información publicada sobre diferentes endoxilasas es una tarea difícil, ya que parámetros como la dosis y pureza de la enzima, tiempo de reacción, fuente del xilano y tipo de pretratamiento varían según el estudio (Tabla 26). Además, muchos otros trabajos, no incluidos en la Tabla 26, están realizados con crudos enzimáticos en los que hay otras actividades accesorias, en vez de con endoxilasas purificadas.

Tabla 26. Rendimientos de la producción de XOS con diferentes endoxilanasas fúngicas purificadas o comerciales mediante hidrólisis de xilanos procedentes de distintas biomásas lignocelulósicas.

Hongo fuente de la endoxilanasas	Origen del xilano	[Enzima] (U/g)	Tiempo (h)	Rendimiento XOS (mg/g xylan)	Referencia
<i>T. amestolkiae</i> , rXynSOS	Madera de haya	25	2	303 (2 h, X2-X4) 355 (5 h, ↑X2)*	Este trabajo
<i>T. amestolkiae</i> , XynM	Madera de abedul	50	10	288	(Nieto-Domínguez <i>et al.</i> , 2017b)
<i>Trichoderma viridea</i>	Gramíneas	87	10	110	(Samanta <i>et al.</i> , 2012)
<i>Aspergillus niger</i>	Tallo de tabaco	20,5	24	114	(Akpınar <i>et al.</i> , 2010)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Salvado de trigo	0,18	28	228	(Mathew <i>et al.</i> , 2018)
<i>Paecilomyces themophila</i>	Mazorcas de maíz	210	2,5	286	(Teng <i>et al.</i> , 2010)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Bagazo de caña de azúcar	60	24	371	(Yang <i>et al.</i> , 2015)
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Bagazo de malta	100	12	444	(Amorim, Silvério, & Rodrigues, 2019)
<i>Hypocrea lixii</i>	Bagazo de caña de azúcar	822	48	587	(Zhao <i>et al.</i> , 2021)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Cáscara semillas de cereales	125	5	718	(Palaniappan <i>et al.</i> , 2017)

*Tras 2 h de reacción, rXynSOS produce una mezcla más equilibrada de XOS pero con menor rendimiento, mientras que a las 5 h el rendimiento aumenta a costa de obtenerse una mayor proporción de xilobiosa.

Para aumentar los rendimientos de las reacciones de hidrólisis de xilano con rXynSOS y modular la composición de los XOS que se obtienen en el proceso (por ejemplo, incrementar la proporción de xilotriosa y xilotetraosa evitando concentraciones elevadas de xilobiosa), se podrían optimizar las condiciones de reacción utilizando la metodología de superficie de respuesta. Esta metodología ha sido empleada exitosamente con otras endoxilanasas para la producción de XOS (Samanta *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2021) y también se ha aplicado en el Capítulo 2 para optimizar la síntesis del 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol (Tabla 22 y Figura 36). Otra estrategia alternativa implicaría la inmovilización de rXynSOS, lo que, además de permitir el reciclaje de la enzima, podría mejorar su actividad, termoestabilidad y/o selectividad. En este sentido, la inmovilización de las endoxilanasas PoXyn3 de *P. occitanis* (Driss *et al.*, 2014) y MpXyn10 de *Malbranchea pulchella* (Alnoch *et al.*, 2022), aumentó los rendimientos de XOS en comparación con el uso de las enzimas libres (53% vs 37% y 50% vs 38%, respectivamente). Por último, también se podría mejorar la actividad y/o propiedades de rXynSOS mediante ingeniería de proteínas, bien por evolución dirigida o por diseño racional (Dong *et al.*, 2023), como se ha descrito con la endoxilanasas XynAR de la bacteria *Streptomyces rameus*, en la que se incrementó su tolerancia a pH ácidos, termoestabilidad y actividad específica frente a xilano de haya (esta última 1,9 veces) (Wu *et al.*, 2023).

Finalmente, teniendo en cuenta la mayor versatilidad de las endoxilanasas GH10, rXynSOS también podría utilizarse para producir otros tipos de oligosacáridos, como arabinoxilano-oligosacáridos (AXOS) y xilooligosacáridos con ácido urónico (UXOS) de baja masa molecular (Mathew *et al.*, 2017). Estos compuestos presentan una mayor actividad antioxidante que los XOS, debido a la presencia de ácido ferúlico y ácido glucurónico, respectivamente (Cruz-Guerrero *et al.*, 2022) y podrían ejercer un efecto beneficioso sobre el crecimiento de ciertas especies bacterianas del colon (Nordberg Karlsson *et al.*, 2018).

3. Glicosilación enzimática de compuestos fenólicos bioactivos

Existen en la naturaleza algunos glicósidos de antioxidantes fenólicos con propiedades beneficiosas para la salud, aunque su concentración en los organismos que los producen suele ser baja y muchos de ellos se encuentran en plantas, por lo que su extracción se ve condicionada por factores estacionales y geográficos (Li *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2015). Estos compuestos glicosilados suelen mostrar mejores propiedades que sus aglicones, como una mayor solubilidad, biodisponibilidad e incluso bioactividad (Xu *et al.*, 2016; Cosme *et al.*, 2020). Para lograr disponer de ellos en mayores cantidades pueden ser sintetizados químicamente. Sin embargo, este proceso presenta algunos inconvenientes, entre ellos, la generación de subproductos que podrían originar problemas medioambientales, la dificultad para controlar la regio- y estereoselectividad de las reacciones y la necesidad de numerosos pasos de protección y desprotección de grupos funcionales (Hayes & Pietruszka, 2017; Wen *et al.*, 2018).

En este contexto, la síntesis enzimática de estos glicósidos se considera una estrategia eficaz, selectiva y más sostenible. Entre las enzimas más utilizadas en estos procesos destacan las glicosil transferasas (GTs) y algunas GHs. Las primeras catalizan la transferencia de residuos de azúcares activados a una amplia variedad de aceptores, generando glicósidos con alta especificidad. Estas enzimas son especialmente útiles para sintetizar glicósidos complejos que imitan los obtenidos en sistemas biológicos. Sin embargo, a diferencia de las GHs, pueden ser difíciles de expresar heterológamente, sobre todo si están asociadas a membranas, suelen tener menor estabilidad y los donadores de azúcares que requieren (activados con nucleótido-fosfatos) tienen un alto coste (Danby & Withers, 2016). Por su parte, algunas GHs, bajo determinadas condiciones, pueden glicosilar ciertos compuestos fenólicos, lo que las convierte también en herramientas prometedoras para estos procesos. Este potencial se incrementa considerablemente cuando se emplean variantes glicosintasas o tioglicosilasas de estas enzimas, dado que son capaces de ofrecer mayores rendimientos, lo que amplía sus posibles aplicaciones en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética (Jahn *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2015).

La mayoría de los glicoconjugados sintetizados enzimáticamente hasta la fecha (tanto por GTs como por GHs) han sido glucósidos, con los que se ha logrado mejorar diversas propiedades de los aglicones. Por ejemplo, los glucósidos de galato de epigallocatequina (EGCG) aumentaron la solubilidad, estabilidad y actividades neuroprotectora y anticancerígena del compuesto original (Gonzalez-Alfonso *et al.*, 2019; Méndez-Líter *et al.*, 2022). Asimismo, la glucosilación de floretina y pterostilbeno, también mejoró su solubilidad y, en el caso del glucósido del segundo antioxidante, redujo su toxicidad en varias líneas celulares (Gonzalez-Alfonso *et al.*, 2021; González-Alfonso *et al.*, 2018). Finalmente, varios glucósidos de resveratrol mostraron mayor solubilidad y actividad surfactante (Moon *et al.*, 2021; Torres *et al.*, 2011).

Los glicósidos sintetizados enzimáticamente a partir de azúcares distintos de la glucosa se han estudiado con menor frecuencia. En el caso de los celobiósidos, se ha descrito que este tipo de glicosilación aumenta significativamente la solubilidad y estabilidad de la hidroquinona, galato de metilo, galato de etilo, galato de propilo y epicatequina (De Winter *et al.*, 2015). En cuanto a los xilósidos de antioxidantes fenólicos, destacan el de EGCG que fue sintetizado por la tioglicoligasa rBxTW1^{E495A} de *T. amestolkiae* y que mejoró la solubilidad del compuesto y su actividad antiproliferativa en células de adenocarcinoma de mama (Méndez-Líter *et al.*, 2022). Esta enzima también pudo unir una molécula de xilosa a una gran variedad de aceptores, incluyendo antioxidantes vegetales (entre los que también se encuentran el ácido gálico, la floretina y el pterostilbeno), ácidos grasos cortos, tioles, selenoles, triazoles y compuestos organofosforados, por lo que más que una tioglicoligasa, debería considerarse una multiligasa (Nieto-Domínguez *et al.*, 2020).

En los Capítulos 1 y 2 se comprobó que la glicosintasa rXynSOS^{E236G} es capaz de unir moléculas de xilobiosa y, en algunos casos, de xilotetraosa, a un amplio abanico de antioxidantes fenólicos: alcohol vainillínico, alcohol 2-hidroxibencílico, hidroquinona, ácido gálico, EGCG, ácido rosmarínico, floretina, pterostilbeno y resveratrol. Además de xilobiosa, se observó que puede transferir otros azúcares, como xilosa, celobiosa y glucosa, lo que indica que es una glicosintasa muy versátil tanto en el uso de donadores como en el de aceptores. Esta promiscuidad, que en principio representa una ventaja, debe ser controlada cuando se busca la producción de un glicósido específico. En el caso del resveratrol, se constató que la enzima puede glicosilar varios de sus grupos hidroxilo, por lo que se ve afectado el porcentaje de conversión del 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol.

Hasta el momento solo se ha descrito un xilobiósido derivado del dihidroresveratrol, pero ha sido producido por síntesis química (Oode *et al.*, 2016). Por tanto, en esta Tesis Doctoral se ha demostrado, por primera vez, que es posible sintetizar enzimáticamente xilobiósidos de estos antioxidantes fenólicos utilizando una glicosintasa fúngica. Cabe destacar que, en el caso del

resveratrol, también se comprobó que el 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol experimenta un aumento espectacular en la solubilidad, y que puede ser hidrolizado por la microbiota presente en el colon humano (Figura 37), lo que permitiría que el resveratrol, libre o sus metabolitos potencialmente bioactivos, ejercieran su acción beneficiosa para la salud.

4. Ingeniería genética de *Talaromyces amestolkiae*: mejora de la producción de xilanasas introduciendo la mutación Val785Phe en el activador transcripcional XlnR

Como se ha comentado a lo largo de esta Tesis, *T. amestolkiae* produce altos niveles de actividad xilanasas, especialmente cuando se utiliza el xilano como inductor. Además, el número de genes que codifican para estas enzimas es superior al de otros hongos especializados en la degradación de la biomasa lignocelulósica, como *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* y *Penicillium oxalicum* (de Eugenio *et al.*, 2017). Sin embargo, el número de xilanasas y otras enzimas accesorias no es tan elevado en los secretomas del hongo, analizados cuando se crece en presencia de distintas fuentes de carbono, fenómeno que destaca especialmente en las endoxilanasas de la familia GH11 y las arabinofuranosidasas de la familia GH51 (Tabla 27). Se han observado resultados similares en otros hongos filamentosos productores de xilanasas, como por ejemplo *Penicillium decumbens* (Liu *et al.*, 2013).

Tabla 27. Número de genes que codifican para enzimas degradadoras de xilano en *T. amestolkiae* y las proteínas secretadas con esta actividad que fueron detectadas en estudios proteómicos llevados a cabo en este hongo (de Eugenio *et al.*, 2017). GH: glicosil hidrolasa, CE: carbohidrato esterasa.

Tipo de GH	Familia	Genes	Proteínas secretadas	Enzimas caracterizadas, referencias
β-1,4-endoxilanasas	GH10	1	1	rXynSOS (Este trabajo)
	GH11	8	1	(r)XynM (Nieto-Domínguez <i>et al.</i> , 2019, 2017b)
	GH30	2	1	-
β-xilosidasas	GH3	4	2	(r)BxTW1 (Nieto-Domínguez <i>et al.</i> , 2015, 2016)
	GH43*	2	1	-
α-L-arabinofuranosidasas	GH51	6	1	-
	GH54	6	3	-
	GH62	3	2	rARA-1, rARA-2 (Méndez-Líter <i>et al.</i> , 2023)
	GH43*	2	1	-
α-glucuronidasas	GH67	1	0	-
	GH115	1	0	-
Acetilxilano esterasas	CE1	1	0	-
	CE5	1	0	-
Feruloil esterasas	CE1	1	0	-

*La familia GH43 puede contener β-xilosidasas, arabinofuranosidasas y enzimas con ambas actividades.

Existen varias razones que podrían explicar esta disparidad. En primer lugar, es posible que algunos de estos genes hayan dejado de expresarse a lo largo de la evolución o presenten mutaciones que afecten a la síntesis, plegamiento, procesamiento y/o secreción de las enzimas correspondientes. Además, conviene tener en cuenta la compleja regulación a la que están sujetas las xilanasas (y el resto de GHs), la cual está controlada por múltiples factores de transcripción y depende de la presencia de inductores específicos (Benocci *et al.*, 2017). Esto está relacionado con el hecho de que los niveles de expresión de los genes de estas enzimas pueden variar a lo largo del tiempo de cultivo, un aspecto crucial a considerar al comparar los resultados entre distintos experimentos. Un ejemplo claro es la producción de la β -glucosidasa BGL-3 de *T. amestolkiae*, que solo se detecta en cultivos con glucosa una vez que esta fuente de carbono se ha agotado (Méndez-Líter *et al.*, 2018). En el Capítulo 4 también se muestra como los cultivos con la cepa silvestre, en presencia de xilano (inductor natural de estas enzimas) y bagazo de cerveza pretratado (que contiene xilano) (Figuras 43 y 50), exhibieron altas actividades β -xilosidasa y endoxilanasas. Por el contrario, dichas actividades fueron prácticamente indetectables en los medios con glucosa o glicerol (Figuras 46 y 48). Dado que el uso de distintos inductores podría favorecer la secreción de enzimas diferentes, sería interesante evaluar nuevos residuos lignocelulósicos que contengan otros tipos de xilanos, para determinar si inducen la expresión de las xilanasas no observadas en los secretomas de la Tabla 27.

La red de factores de transcripción que regula la degradación de xilano en hongos filamentosos es extremadamente amplia y compleja, aunque se ha descrito que XlnR es el principal activador transcripcional (Llanos *et al.*, 2019; Tani *et al.*, 2014). En el Capítulo 4 se comprobó que la sobreexpresión de *xlnR* favorece la producción de xilanasas en *T. amestolkiae* y que mutaciones puntuales en este factor de transcripción (Tam_XlnR^{V785F}) dan lugar a una desregulación de su sistema xilanolítico, incrementando aún más sus actividades β -xilosidasa y endoxilanasas, y permitiendo secretar estas enzimas en presencia de fuentes de carbono no inductoras, como glucosa y glicerol (Figuras 46 y 48). Sin embargo, esta desregulación parece ser parcial ya que en este mutante se detectaron variaciones en los valores máximos de actividad enzimática, en el tiempo de cultivo en que estos se alcanzan, y en la intensidad de las bandas en los zimogramas (Figuras 44, 47 y 49), dependiendo del sustrato utilizado. Esto indica que, en *T. amestolkiae*, al igual que en otros ascomicetos, la producción de xilanasas está regulada no solo por XlnR, sino también por otros factores de transcripción. En este sentido, se han descrito diversos activadores transcripcionales de xilanasas, como TctA en *Talaromyces cellulolyticus*, ClbR en *Aspergillus aculeatus* y ACE2 y ACE3 en *T. reesei* (Benocci *et al.*, 2017). Asimismo, se han identificado factores de transcripción con función represora, como CreA (presente en la mayoría de los hongos), ACE1 y XPP1 en *T. reesei*, y HCR-1 en *Neurospora crassa* (Benocci *et al.*, 2017).

También se ha propuesto un nivel adicional de regulación asociado a modificaciones en la estructura de la cromatina y en la accesibilidad de los promotores en respuesta a señales de inducción, como la presencia de determinados sustratos (Alazi & Ram, 2018; Benocci *et al.*, 2017).

El incremento en las actividades endoxilanasas y β -xilosidasas observado en el mutante Tam_XlnR^{V785F} podría atribuirse a la localización del residuo Val785, el cual forma parte de una hélice α ubicada en la región C-terminal del dominio *middle homology region* (Figura 42), cuya función parece estar relacionada con la regulación de la actividad de XlnR (Xia *et al.*, 2022). Pese a la poca información disponible acerca de este dominio y su aminoácido mutado, en *T. reesei* y *A. niger* existen hipótesis que podrían explicar el fenotipo obtenido. En general, estos trabajos defienden que la sustitución equivalente a Val785Phe en estos ascomicetos (Val821Phe en *T. reesei*), y otras mutaciones cercanas en la *middle homology region* (Ala824Val en *T. reesei* y Val756Phe en *A. niger*), provocan que XlnR (denominado también XYR1 o XLR1) se mantenga en un estado de activación irreversible que permite el reclutamiento de la maquinaria de transcripción independientemente de la fuente de carbono utilizada.

En el caso de *A. niger*, cuando la cepa silvestre se encuentra en condiciones represoras, los genes de xilanasas, y otras GHs, son reprimidos por CreA (el represor transcripcional más importante del metabolismo de carbohidratos) y por otro segundo mecanismo regulatorio que mantiene a XlnR en un estado inactivado (Figura 52A). Cuando esta misma cepa silvestre está en condiciones inductoras, XlnR se activa, permitiendo la expresión de los genes bajo su control (Hasper, 2003; Hasper *et al.*, 2004). Sin embargo, al introducirse la sustitución Val756Phe en XlnR, la proteína permanece en un estado de activación constante, quedando anulado el mecanismo de inhibición. Como resultado, los genes de xilanasas y otras GHs en la cepa mutante se expresan tanto en condiciones inductoras como represoras. Para que esto ocurra, se ha postulado que XlnR debe poseer un dominio de inhibición por glucosa (u otras fuentes de carbono), y que la mutación Val756Phe se localiza dentro o cerca de este dominio, modificando la funcionalidad de la proteína (Hasper, 2003; Hasper *et al.*, 2004).

De manera similar, en *T. reesei* se ha propuesto que las mutaciones Ala824Val y Val821Phe podrían estar situadas en un dominio involucrado en el reclutamiento de la maquinaria de transcripción en respuesta a carbohidratos (Figura 52B) (Derntl *et al.*, 2013; Lv *et al.*, 2023; Mello-de-Sousa *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2023). Un estudio *in vitro* reveló que, en presencia de carbohidratos represores, XYR1 sufre un cambio conformacional que oculta dicho dominio, mientras que, en condiciones inductoras, este queda expuesto (Mello-de-Sousa *et al.*, 2022). Por el contrario, la versión mutada de XYR1 no experimenta este cambio conformacional, manteniéndose en un estado de activación constante, lo que permite que la maquinaria

transcripcional se reclute independientemente del tipo de carbohidrato presente en el medio (Mello-de-Sousa *et al.*, 2022).

Para confirmar estas hipótesis en *T. amestolkiae* y profundizar en el limitado conocimiento sobre el mecanismo de acción de XlnR en este hongo, sería necesario llevar a cabo estudios adicionales, como por ejemplo análisis computacionales y experimentales para evaluar posibles cambios conformacionales de este factor de transcripción en presencia de distintas fuentes de carbono, diseño de nuevos mutantes dirigidos a caracterizar sus distintos dominios funcionales, cuantificación de la expresión génica tanto del propio *xlnR* como de los genes que regula, etc. Por otro lado, dado que el mutante Tam_XlnR^{V785F} aún conserva cierto grado de regulación sobre la producción de xilanasas, sería conveniente analizar el papel de otros factores de transcripción implicados en la degradación del xilano.

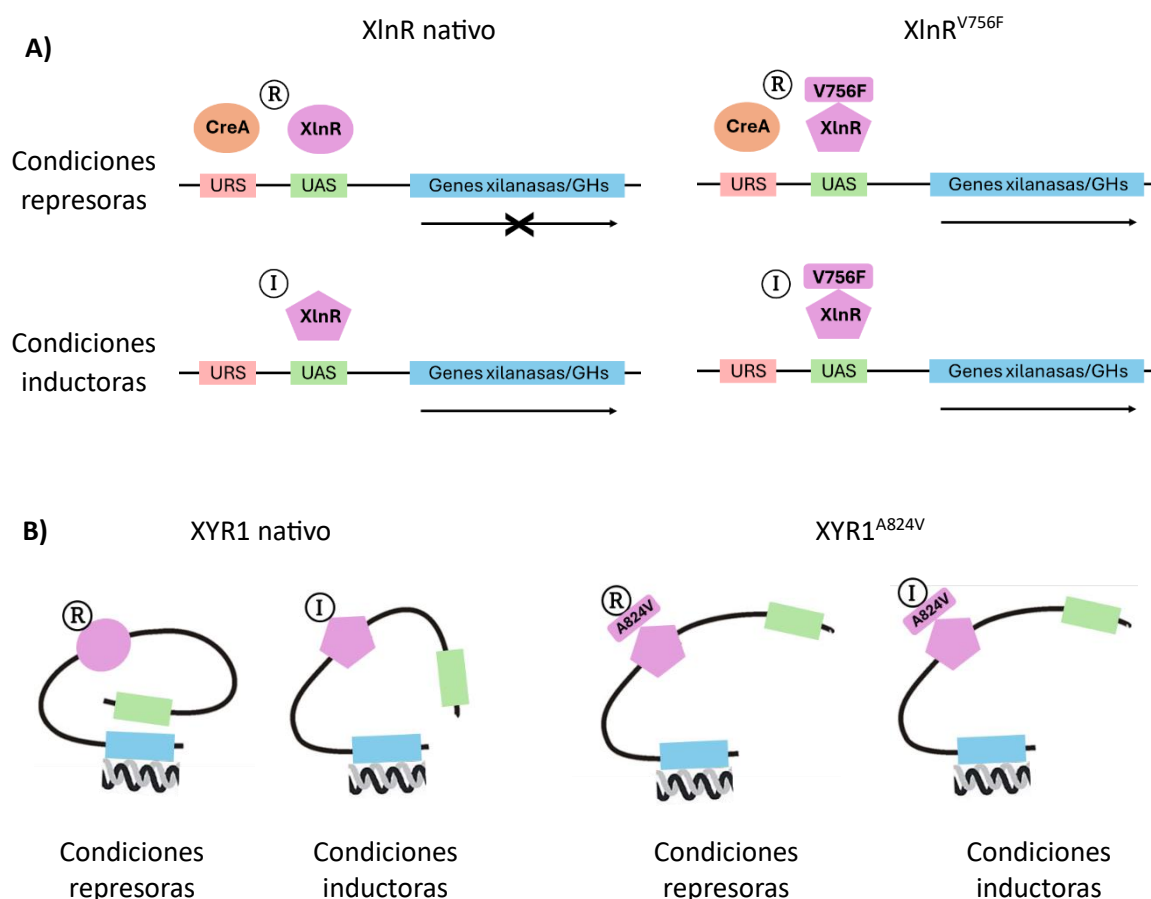
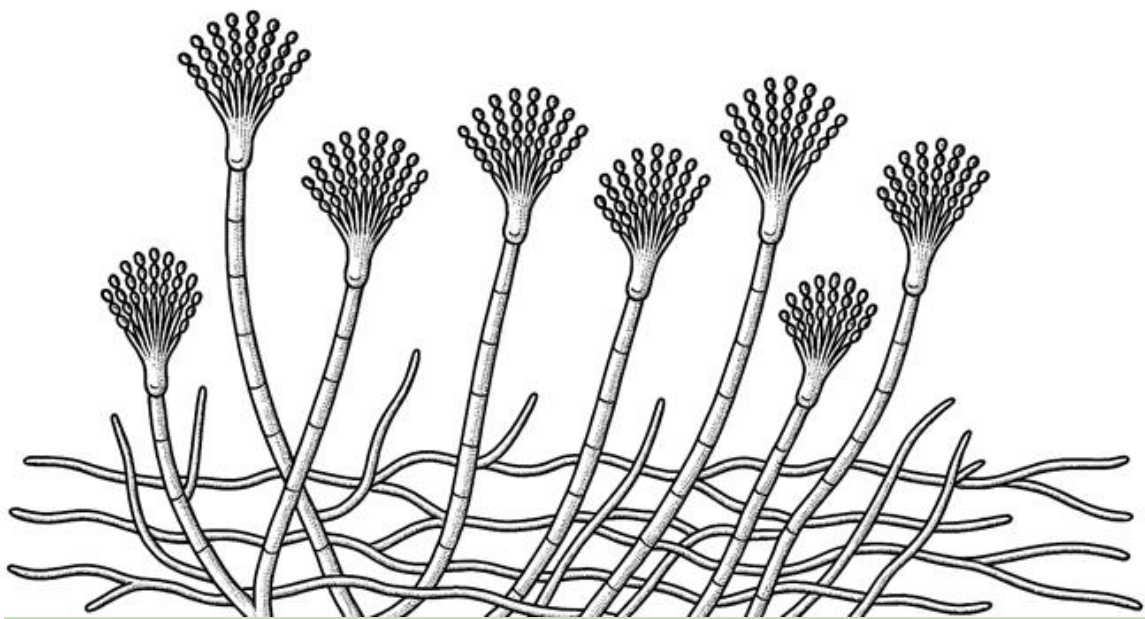


Figura 52. Esquema de la respuesta de XlnR (también denominado XYR1 o XLR1 en otros hongos), nativo y mutado, en presencia de carbohidratos represores e inductores. A) Modelo del mecanismo de regulación de la actividad de XlnR y XlnR^{V756F} en *A. niger* y su efecto en la expresión de los genes de xilanasas (y otras GHs) bajo su control. La forma circular del XlnR representa su estado inactivado y la pentagonal su estado activado. URS: secuencia represora aguas arriba, UAS: secuencia activadora aguas arriba. Figura adaptada de Hasper (2004). B) Estructura del XYR1 y XYR1^{A824V} en *T. reesei* y sus cambios conformacionales. Rosa: dominio de tipo receptor nuclear que recluta la maquinaria de transcripción y donde se localizaría la sustitución A824V. Azul: dominio de unión a ADN, Verde: dominio de transactivación (recluta a la maquinaria de transcripción). Figura adaptada de Mello-de-Sousa *et al.* (2022).

Finalmente, es importante destacar que los avances logrados en esta Tesis Doctoral, en la que se ha transformado por primera vez a *T. amestolkiae*, han establecido las bases para estudiar la regulación de la expresión de los genes de xilanasas y otras GHs en este hongo. Estos resultados abren nuevas vías de investigación para explorar y mejorar el potencial biotecnológico de *T. amestolkiae* en la valorización de la biomasa lignocelulósica y otras aplicaciones industriales.

CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS



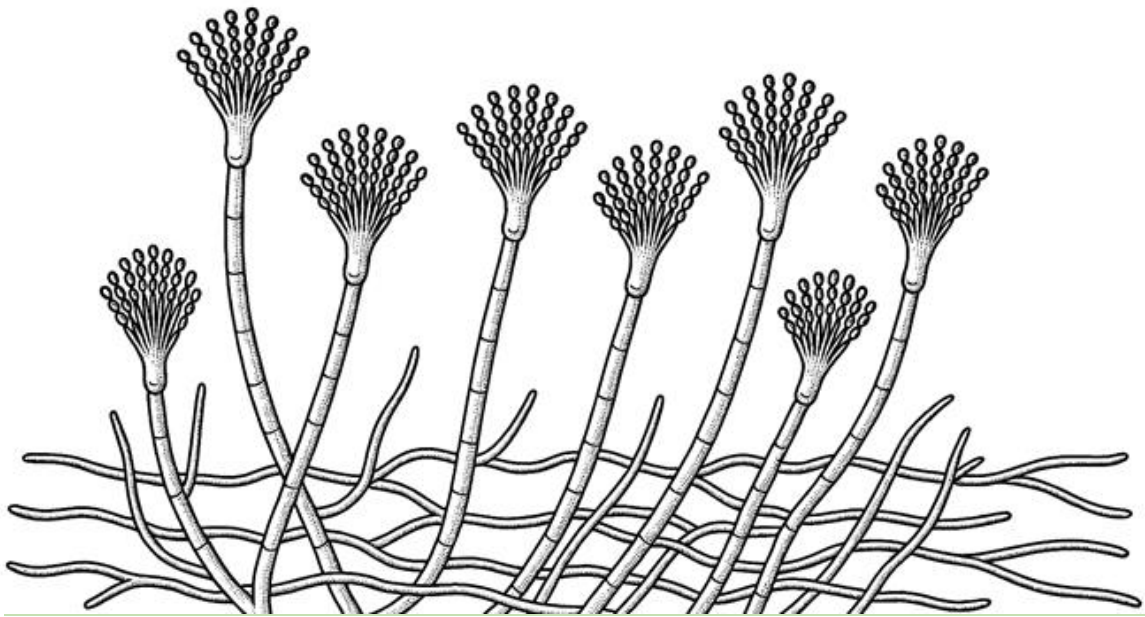
1. Una nueva endoxilanasas de la familia GH10, presente en el hongo *Talaromyces amestolkiae* (XynSOS), fue producida con éxito en la levadura *Pichia pastoris* y purificada. Esta enzima, monomérica y altamente glicosilada, fue estable en un amplio rango de pH y mostró alta especificidad de sustrato por xilano de haya y arabinoxilano de trigo. Esta capacidad hidrolítica se aprovechó para producir, a partir de xilano de haya, xilooligosacáridos (XOS) de bajo grado de polimerización, considerados prebióticos emergentes.
2. rXynSOS catalizó reacciones de transglicosilación uniendo una molécula de xilobiosa a distintos compuestos fenólicos bioactivos, pero su variante glicosintasa, desarrollada sustituyendo el residuo catalítico nucleófilo E236 por una glicina (rXynSOS^{E236G}), fue mucho más eficiente. Esta glicosintasa también pudo sintetizar XOS de cuatro, seis, ocho y diez unidades de xilosa por oligomerización de xilobiosa. Tanto la endoxilanasas nativa como su glicosintasa fueron capaces de utilizar otros donadores de xilosa, celobiosa y glucosa, aunque con menor eficacia.
3. La glicosilación de resveratrol con la glicosintasa rXynSOS^{E236G} dio lugar a un producto mayoritario, el 3-O-β-D-xilobiósido de resveratrol, el cual representa el primer xilobiósido sintetizado enzimáticamente de este antioxidante. Este nuevo glicósido es mucho más soluble que su aglicón (~5.000 veces) y, en experimentos preliminares, se comprobó que puede ser desglicosilado por la microbiota del colon humano.
4. La generación de cepas de *T. amestolkiae* auxótrofas para pirimidinas, mediante la adquisición de resistencia al antimetabolito ácido 5-fluoroorótico (5-FOA), permitió conseguir, por primera vez, la transformación de este hongo. Para ello se utilizó el método de transformación química de protoplastos y el marcador de selección *pyrG*, que complementa la auxotrofia para pirimidinas.
5. La sobreexpresión del gen del activador transcripcional XlnR, con un promotor constitutivo y un plásmido de replicación autónoma, mejoró la producción de β-xilosidasas (1,4 veces) y endoxilanasas (2,0 veces) en esta nueva cepa de *T. amestolkiae*, con respecto a la silvestre, en un medio con xilano de haya como inductor. Este incremento fue mucho mayor cuando se introdujo la sustitución Val785Phe en XlnR, obteniéndose 3,3 y 3,9 veces más actividades β-xilosidasa y endoxilanasas, respectivamente.

6. El mutante de *T. amestolkiae* en el que se sobreexpresó XlnR^{V785F} mostró una desregulación parcial del sistema xilanolítico, puesto que fue capaz de producir altos niveles de β -xilosidasas (16,9 veces más) y endoxilanasas (31,9 veces más) en un medio con glucosa (fuente de carbono no inductora), mientras que en la cepa silvestre apenas se detectó actividad.
7. El mutante Tam_XlnR^{V785F} también aumentó la producción de β -xilosidasas y endoxilanasas en cultivos con residuos agroindustriales, como el glicerol y el bagazo de cerveza, lo que contribuiría al establecimiento de una economía circular. Por esta razón, puede ser mejor opción que la cepa silvestre para producir cócteles enriquecidos en estas enzimas que se puedan utilizar en diferentes aplicaciones biotecnológicas, como se ha comprobado en la sacarificación de xilano de haya.
8. En este trabajo se ha puesto de manifiesto el potencial biotecnológico de nuevas xilanasas de *T. amestolkiae*, tanto en reacciones de hidrólisis como de síntesis. Además, la producción de estas enzimas se ha mejorado notablemente gracias a la manipulación genética del hongo.

1. A novel GH10 family endoxylanase from the fungus *Talaromyces amestolkiae* (XynSOS) was successfully produced in the yeast *Pichia pastoris* and purified. This enzyme, monomeric and highly glycosylated, was stable over a wide pH range and showed high substrate specificity for beechwood xylan and wheat arabinoxylan. This hydrolytic capacity was used to produce low-degree of polymerization xylooligosaccharides (XOS), which are considered emerging prebiotics, from beechwood xylan.
2. rXynSOS catalyzed transglycosylation reactions by transferring a xylobiose molecule to several bioactive phenolic compounds. However, its glycosynthase variant, developed by substituting the nucleophilic catalytic residue E236 with a glycine (rXynSOS^{E236G}), was much more efficient. This glycosynthase was also able to synthesize XOS of four, six, eight, and ten xylose units through xylobiose oligomerization. Both the native endoxylanase and its glycosynthase could utilize other donors of xylose, cellobiose and glucose, although with lower efficiency.
3. Resveratrol glycosylation using the glycosynthase rXynSOS^{E236G} resulted in a major product, identified as 3-O-β-D-xylobiosyl resveratrol, which represents the first xylobioside enzymatically synthesized of this antioxidant. This novel glycoside was found to be much more soluble than its aglycone (~5.000 times) and, in preliminar studies, it was confirmed that it can be deglycosylated by the human colonic microbiota.
4. The generation of pyrimidine auxotrophic strains of *T. amestolkiae*, achieved through the acquisition of resistance to the antimetabolite 5-fluoroorotic acid (5-FOA), enabled the first successful transformation of this fungus. This was accomplished using chemical transformation of protoplasts and the *pyrG* selection marker, which complements pyrimidine auxotrophy.
5. Overexpression of the gene encoding the transcriptional activator XlnR, driven by a constitutive promoter and using an autonomously replicating plasmid, enhanced the production of β-xylosidases (1.4-fold) and endoxylanases (2.0-fold) in this novel *T. amestolkiae* strain, compared to the wild-type one, when cultivated with beechwood xylan as inductor. This improvement was even greater when the Val785Phe substitution was introduced into XlnR, yielding 3.3 and 3.9-fold increases in β-xylosidase and endoxylanase activities, respectively.

6. The *T. amestolkiae* mutant overexpressing XlnR^{V785F} exhibited partial deregulation of the xylanolytic system, as it was able to produce high levels of β -xylosidases (16.9-fold) and endoxylanases (31.9-fold) in a medium with glucose (non-inducing carbon source), while barely any activity was detected in the wild-type strain.
7. The Tam_XlnR^{V785F} mutant also boosted β -xylosidase and endoxylanase production in cultures with agro-industrial residues, such as glycerol and brewer's spent grain, which could contribute to the establishment of a circular economy. For this reason, it may be a better option than the wild-type strain for producing xylanase-enriched cocktails suitable for various biotechnological applications, as demonstrated in the saccharification of beechwood xylan.
8. This study highlights the biotechnological potential of novel xylanases from *T. amestolkiae* in both hydrolytic and synthetic reactions. Additionally, the production of these enzymes has been markedly enhanced through genetic manipulation of the fungus.

BIBLIOGRAFÍA



- Abdul Manas, N. H., Md. Illias, R., & Mahadi, N. M. (2018). Strategy in manipulating transglycosylation activity of glycosyl hydrolase for oligosaccharide production. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(2), 272-293. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1339664>
- Acharya, S., Liyanage, S., Parajuli, P., Rumi, S. S., Shamshina, J. L., & Abidi, N. (2021). Utilization of Cellulose to Its Full Potential: A Review on Cellulose Dissolution, Regeneration, and Applications. *Polymers*, 13(24), 4344. <https://doi.org/10.3390/polym13244344>
- Akel, E., Metz, B., Seiboth, B., & Kubicek, C. P. (2009). Molecular Regulation of Arabinan and L-Arabinose Metabolism in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Eukaryotic Cell*, 8(12), 1837-1844. <https://doi.org/10.1128/ec.00162-09>
- Akpınar, O., Erdogan, K., Bakir, U., & Yilmaz, L. (2010). Comparison of acid and enzymatic hydrolysis of tobacco stalk xylan for preparation of xylooligosaccharides. *LWT - Food Science and Technology*, 43(1), 119-125. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.06.025>
- Alazi, E., & Ram, A. F. J. (2018). Modulating Transcriptional Regulation of Plant Biomass Degrading Enzyme Networks for Rational Design of Industrial Fungal Strains. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6, 133. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00133>
- Albuquerque, B. R., Heleno, S. A., Oliveira, M. B. P. P., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2021). Phenolic compounds: Current industrial applications, limitations and future challenges. *Food & Function*, 12(1), 14-29. <https://doi.org/10.1039/D0FO02324H>
- Aleksenko, A., & Clutterbuck, A. J. (1997). Autonomous Plasmid Replication in *Aspergillus nidulans*: AMA1 and MATE Elements. *Fungal Genetics and Biology*, 21(3), 373-387. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1997.0980>
- Aleksenko, A., Liu, W., Gojkovic, Z., Nielsen, J., & Piskur, J. (1999). Structural and transcriptional analysis of the *pyrABCN*, *pyrD* and *pyrF* genes in *Aspergillus nidulans* and the evolutionary origin of fungal dihydroorotases. *Molecular Microbiology*, 33(3), 599-611. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01507.x>
- Almagro Armenteros, J. J., Tsirigos, K. D., Sønderby, C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature Biotechnology*, 37(4), 420-423. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z>
- Alnoch, R. C., Alves, G. S., Salgado, J. C. S., de Andrades, D., Freitas, E. N. de, Nogueira, K. M. V., Vici, A. C., Oliveira, D. P., Carvalho-Jr, V. P., Silva, R. N., Buckeridge, M. S., Michelin, M., Teixeira, J. A., & Polizeli, M. de L. T. M. (2022). Immobilization and Application of the Recombinant Xylanase GH10 of *Malbranchea pulchella* in the Production of Xylooligosaccharides from Hydrothermal Liquor of the Eucalyptus (*Eucalyptus grandis*) Wood Chips. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 13329. <https://doi.org/10.3390/ijms232113329>
- Amorim, C., Silvério, S. C., Prather, K. L. J., & Rodrigues, L. R. (2019). From lignocellulosic residues to market: Production and commercial potential of xylooligosaccharides. *Biotechnology Advances*, 37(7), 107397. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.05.003>

- Amorim, C., Silvério, S. C., & Rodrigues, L. R. (2019). One-step process for producing prebiotic arabino-xylooligosaccharides from brewer's spent grain employing *Trichoderma* species. *Food Chemistry*, 270, 86-94. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.080>
- Amri, A., Chaumeil, J. C., Sfar, S., & Charrueau, C. (2012). Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? *Journal of Controlled Release*, 158(2), 182-193. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.09.083>
- Andres-Lacueva, C., Macarulla, M. T., Rotches-Ribalta, M., Boto-Ordóñez, M., Urpi-Sarda, M., Rodríguez, V. M., & Portillo, M. P. (2012). Distribution of Resveratrol Metabolites in Liver, Adipose Tissue, and Skeletal Muscle in Rats Fed Different Doses of This Polyphenol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(19), 4833-4840. <https://doi.org/10.1021/jf3001108>
- Arai, T., Ichinose, S., Shibata, N., Kakeshita, H., Kodama, H., Igarashi, K., & Takimura, Y. (2022). Inducer-free cellulase production system based on the constitutive expression of mutated XYR1 and ACE3 in the industrial fungus *Trichoderma reesei*. *Scientific Reports*, 12(1), 19445. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23815-4>
- Aro, N., Saloheimo, A., Ilmén, M., & Penttilä, M. (2001). ACEII, a Novel Transcriptional Activator Involved in Regulation of Cellulase and Xylanase Genes of *Trichoderma reesei*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(26), 24309-24314. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003624200>
- Ayuso-Fernández, I., Molpeceres, G., Camarero, S., Ruiz-Dueñas, F. J., & Martínez, A. T. (2022). Ancestral sequence reconstruction as a tool to study the evolution of wood decaying fungi. *Frontiers in Fungal Biology*, 3, 1003489. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2022.1003489>
- Ballmann, P., Lightfoot, J., Müller, M., Dröge, S., & Prade, R. (2019). Redesigning the *Aspergillus nidulans* xylanase regulatory pathway to enhance cellulase production with xylose as the carbon and inducer source. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 193. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1243-5>
- Basera, P., Chakraborty, S., & Sharma, N. (2024). Lignocellulosic biomass: Insights into enzymatic hydrolysis, influential factors, and economic viability. *Discover Sustainability*, 5(1), 311. <https://doi.org/10.1007/s43621-024-00543-5>
- Battaglia, E., Visser, L., Nijssen, A., van Veluw, G. J., Wösten, H. A. B., & de Vries, R. P. (2011). Analysis of regulation of pentose utilisation in *Aspergillus niger* reveals evolutionary adaptations in Eurotiales. *Studies in Mycology*, 69(1), 31-38. <https://doi.org/10.3114/sim.2011.69.03>
- Baur, J. A., & Sinclair, D. A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: The *in vivo* evidence. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(6), 493-506. <https://doi.org/10.1038/nrd2060>
- Benjamin, C. R. (1955). Ascocarps of *Aspergillus* and *Penicillium*. *Mycologia*, 47(5), 669-687. <https://doi.org/10.1080/00275514.1955.12024485>
- Benocci, T., Aguilar-Pontes, M. V., Zhou, M., Seiboth, B., & de Vries, R. P. (2017). Regulators of plant biomass degradation in ascomycetous fungi. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 152. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0841-x>

- Bhardwaj, N., Kumar, B., & Verma, P. (2019). A detailed overview of xylanases: An emerging biomolecule for current and future prospective. *Bioresources and Bioprocessing*, 6(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s40643-019-0276-2>
- Biely, P., Vršanská, M., Tenkanen, M., & Kluepfel, D. (1997). Endo- β -1,4-xylanase families: Differences in catalytic properties. *Journal of Biotechnology*, 57(1), 151-166. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)00096-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)00096-5)
- Bischof, R. H., Ramoni, J., & Seiboth, B. (2016). Cellulases and beyond: The first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 106. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0507-6>
- Bissaro, B., Monsan, P., Fauré, R., & O'Donohue, M. J. (2015). Glycosynthesis in a waterworld: New insight into the molecular basis of transglycosylation in retaining glycoside hydrolases. *Biochemical Journal*, 467(1), 17-35. <https://doi.org/10.1042/BJ20141412>
- Bode, L. M., Bunzel, D., Huch, M., Cho, G.-S., Ruhland, D., Bunzel, M., Bub, A., Franz, C. M., & Kulling, S. E. (2013). *In vivo* and *in vitro* metabolism of *trans*-resveratrol by human gut microbiota. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 97(2), 295-309. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.049379>
- Borneman, A. R., Hynes, M. J., & Andrianopoulos, A. (2001). STE12 Homolog From the Asexual, Dimorphic Fungus *Penicillium marneffei* Complements the Defect in Sexual Development of an *Aspergillus nidulans* *steA* Mutant. *Genetics*, 157(3), 1003-1014. <https://doi.org/10.1093/genetics/157.3.1003>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Braune, A., & Blaut, M. (2016). Bacterial species involved in the conversion of dietary flavonoids in the human gut. *Gut Microbes*, 7(3), 216-234. <https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1158395>
- Brunner, K., Lichtenauer, A. M., Kratochwill, K., Delic, M., & Mach, R. L. (2007). Xyr1 regulates xylanase but not cellulase formation in the head blight fungus *Fusarium graminearum*. *Current Genetics*, 52(5), 213-220. <https://doi.org/10.1007/s00294-007-0154-x>
- Cai, H., Shi, P., Bai, Y., Huang, H., Yuan, T., Yang, P., Luo, H., Meng, K., & Yao, B. (2011). A novel thermoacidophilic family 10 xylanase from *Penicillium pinophilum* C1. *Process Biochemistry*, 46(12), 2341-2346. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.09.018>
- Cajanko, M. M., Oblak, J., Grilc, M., & Likozar, B. (2021). Enzymatic bioconversion process of lignin: Mechanisms, reactions and kinetics. *Bioresource Technology*, 340, 125655. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125655>
- Calero-Nieto, F., Di Pietro, A., Roncero, M. I. G., & Hera, C. (2007). Role of the Transcriptional Activator XlnR of *Fusarium oxysporum* in Regulation of Xylanase Genes and Virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(8), 977-985. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-8-0977>

- Candioti, L., De Zan, M. M., Cámara, M. S., & Goicoechea, H. C. (2014). Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta*, 124, 123-138. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.034>
- Capetti, C. C. de M., Dabul, A. N. G., Pellegrini, V. de O. A., & Polikarpov, I. (2023). Chapter 13- Mannanases and other mannan-degrading enzymes. En A. Goyal & K. Sharma (Eds.), *Glycoside Hydrolases* (pp. 279-293). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91805-3.00013-7>
- CAZypedia Consortium. (2018). Ten years of CAZypedia: A living encyclopedia of carbohydrate-active enzymes. *Glycobiology*, 28(1), 3-8. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwx089>
- Cepeda-García, C., Domínguez-Santos, R., García-Rico, R. O., García-Estrada, C., Cajiao, A., Fierro, F., & Martín, J. F. (2014). Direct involvement of the CreA transcription factor in penicillin biosynthesis and expression of the *pcbAB* gene in *Penicillium chrysogenum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(16), 7113-7124. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5760-1>
- Cereghino, J. L., & Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1), 45-66. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x>
- Chandel, A. K., Garlapati, V. K., Singh, A. K., Antunes, F. A. F., & da Silva, S. S. (2018). The path forward for lignocellulose biorefineries: Bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization. *Bioresource Technology*, 264, 370-381. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.004>
- Chen, L.-L., Zhang, M., Zhang, D.-H., Chen, X.-L., Sun, C.-Y., Zhou, B.-C., & Zhang, Y.-Z. (2009). Purification and enzymatic characterization of two β -endoxylanases from *Trichoderma* sp. K9301 and their actions in xylooligosaccharide production. *Bioresource Technology*, 100(21), 5230-5236. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.05.038>
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34(17), i884. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>
- Chipeta, Z. A., du Preez, J. C., & Christopher, L. (2008). Effect of cultivation pH and agitation rate on growth and xylanase production by *Aspergillus oryzae* in spent sulphite liquor. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(6), 587-594. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0320-2>
- Christensen, U., Gruben, B. S., Madrid, S., Mulder, H., Nikolaev, I., & de Vries, R. P. (2011). Unique Regulatory Mechanism for D-Galactose Utilization in *Aspergillus nidulans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(19), 7084-7087. <https://doi.org/10.1128/AEM.05290-11>
- Collins, T., Gerday, C., & Feller, G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(1), 3-23. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.06.005>
- Corim Marim, A. V., & Gabardo, S. (2021). Xylooligosaccharides: Prebiotic potential from agro-industrial residue, production strategies and prospects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 37, 102190. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102190>

- Cosme, P., Rodríguez, A. B., Espino, J., & Garrido, M. (2020). Plant Phenolics: Bioavailability as a Key Determinant of Their Potential Health-Promoting Applications. *Antioxidants*, 9(12), 1263. <https://doi.org/10.3390/antiox9121263>
- Craig, J. P., Coradetti, S. T., Starr, T. L., & Glass, N. L. (2015). Direct Target Network of the *Neurospora crassa* Plant Cell Wall Deconstruction Regulators CLR-1, CLR-2, and XLR-1. *mBio*, 6(5), e01452-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01452-15>
- Cregg, J. M., Vedvick, T. S., & Raschke, W. C. (1993). Recent Advances in the Expression of Foreign Genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*, 11(8), 905-910. <https://doi.org/10.1038/nbt0893-905>
- Cruz-Guerrero, A., Gómez-Ruiz, L., & Guzmán-Rodríguez, F. (2022). Xylooligosaccharides (XOS). En S. M. Jafari, A. Rashidinejad, & J. Simal-Gandara (Eds.), *Handbook of Food Bioactive Ingredients: Properties and Applications* (pp. 1-28). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-81404-5_30-1
- Culleton, H., McKie, V., & de Vries, R. P. (2013). Physiological and molecular aspects of degradation of plant polysaccharides by fungi: What have we learned from *Aspergillus*? *Biotechnology Journal*, 8(8), 884-894. <https://doi.org/10.1002/biot.201200382>
- d'Enfert, C. (1996). Selection of multiple disruption events in *Aspergillus fumigatus* using the orotidine-5'-decarboxylase gene, *pyrG*, as a unique transformation marker. *Current Genetics*, 30(1), 76-82. <https://doi.org/10.1007/s002940050103>
- Dahmen, N., Lewandowski, I., Zibek, S., & Weidtmann, A. (2019). Integrated lignocellulosic value chains in a growing bioeconomy: Status quo and perspectives. *GCB Bioenergy*, 11(1), 107-117. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12586>
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- Daly, R., & Hearn, M. T. W. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: A useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition*, 18(2), 119-138. <https://doi.org/10.1002/jmr.687>
- Danby, P. M., & Withers, S. G. (2016). Advances in Enzymatic Glycoside Synthesis. *ACS Chemical Biology*, 11(7), 1784-1794. <https://doi.org/10.1021/acschembio.6b00340>
- Danecek, P., Bonfield, J. K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M. O., Whitwham, A., Keane, T., McCarthy, S. A., Davies, R. M., & Li, H. (2021). Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience*, 10(2), giab008. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008>
- Davies, G., & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3(9), 853-859. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00220-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00220-9)
- Davies, G. J., Wilson, K. S., & Henrissat, B. (1997). Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochemical Journal*, 321(Pt 2), 557-559. <https://doi.org/10.1042/bj3210557>
- de Eugenio, L. I., de la Torre, I., de Salas, F., Vila, F., Alonso, D., Prieto, A., & Martínez, M. J. (2024). Fungal Enzymes for Saccharification of Gamma-Valerolactone-Pretreated White Birch

- Wood: Optimization of the Production of *Talaromyces amestolkiae* Cellulolytic Cocktail. *Engineering in Life Sciences*, 24(9), e202400029. <https://doi.org/10.1002/elsc.202400029>
- de Eugenio, L. I., Méndez-Líter, J. A., de los Ríos, V., Prieto, A., & Martínez, M. J. (2018). β -1,4-endoglucanases from *Talaromyces amestolkiae*: Production of glucooligosaccharides from different β -glucans. *Biocatalysis and Biotransformation*, 36(1), 68-77. <https://doi.org/10.1080/10242422.2017.1306741>
- de Eugenio, L. I., Méndez-Líter, J. A., Nieto-Domínguez, M., Alonso, L., Gil-Muñoz, J., Barriuso, J., Prieto, A., & Martínez, M. J. (2017). Differential β -glucosidase expression as a function of carbon source availability in *Talaromyces amestolkiae*: A genomic and proteomic approach. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 161. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0844-7>
- de Oliveira, F., Rocha, I. L. D., Cláudia Gouveia Alves Pinto, D., Ventura, S. P. M., Gonzaga dos Santos, A., José Crevelin, E., & de Carvalho Santos Ebinuma, V. (2022). Identification of azaphilone derivatives of *Monascus* colorants from *Talaromyces amestolkiae* and their halochromic properties. *Food Chemistry*, 372, 131214. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131214>
- de Vries, R. P., & Visser, J. (2001). *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(4), 497-522. <https://doi.org/10.1128/membr.65.4.497-522.2001>
- De Winter, K., Dewitte, G., Dirks-Hofmeister, M. E., De Laet, S., Pelantová, H., Křen, V., & Desmet, T. (2015). Enzymatic Glycosylation of Phenolic Antioxidants: Phosphorylase-Mediated Synthesis and Characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(46), 10131-10139. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04380>
- Dean, A., Voss, D., & Draguljić, D. (2017). Response Surface Methodology. En A. Dean, D. Voss, & D. Draguljić (Eds.), *Design and Analysis of Experiments* (pp. 565-614). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-52250-0_16
- del Río, J. C., Rencoret, J., Gutiérrez, A., Elder, T., Kim, H., & Ralph, J. (2020). Lignin Monomers from beyond the Canonical Monolignol Biosynthetic Pathway: Another Brick in the Wall. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(13), 4997-5012. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c01109>
- Delmas, S., Llanos, A., Parrou, J.-L., Kokolski, M., Pullan, S. T., Shunburne, L., & Archer, D. B. (2014). Development of an Unmarked Gene Deletion System for the Filamentous Fungi *Aspergillus niger* and *Talaromyces versatilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(11), 3484-3487. <https://doi.org/10.1128/AEM.00625-14>
- Derntl, C., Gudynaite-Savitch, L., Calixte, S., White, T., Mach, R. L., & Mach-Aigner, A. R. (2013). Mutation of the Xylanase regulator 1 causes a glucose blind hydrolase expressing phenotype in industrially used *Trichoderma* strains. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 62. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-62>
- Derntl, C., Mach, R. L., & Mach-Aigner, A. R. (2019). Fusion transcription factors for strong, constitutive expression of cellulases and xylanases in *Trichoderma reesei*. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 231. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1575-8>

- Díez, B., Alvarez, E., Cantoral, J. M., Barredo, J. L., & Martín, J. F. (1987). Selection and characterization of *pyrG* mutants of *Penicillium chrysogenum* lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase and complementation by the *pyr4* gene of *Neurospora crassa*. *Current Genetics*, 12(4), 277-282. <https://doi.org/10.1007/BF00435290>
- Dilokpimol, A., Nakai, H., Gotfredsen, C. H., Appeldoorn, M., Baumann, M. J., Nakai, N., Schols, H. A., Hachem, M. A., & Svensson, B. (2011). Enzymatic synthesis of β -xylosyl-oligosaccharides by transxylosylation using two β -xylosidases of glycoside hydrolase family 3 from *Aspergillus nidulans* FGSC A4. *Carbohydrate Research*, 346(3), 421-429. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.12.010>
- Djafari Petroudy, S. R. (2017). 3—Physical and mechanical properties of natural fibers. En M. Fan & F. Fu (Eds.), *Advanced High Strength Natural Fibre Composites in Construction* (pp. 59-83). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100411-1.00003-0>
- Dong, C.-D., Tsai, M.-L., Nargotra, P., Kour, B., Chen, C.-W., Sun, P.-P., & Sharma, V. (2023). Bioprocess development for the production of xylooligosaccharide prebiotics from agro-industrial lignocellulosic waste. *Heliyon*, 9(7), e18316. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18316>
- Dougherty, M. J., D'haeseleer, P., Hazen, T. C., Simmons, B. A., Adams, P. D., & Hadi, M. Z. (2012). Glycoside Hydrolases from a targeted Compost Metagenome, activity-screening and functional characterization. *BMC Biotechnology*, 12(1), 38. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-12-38>
- Driss, D., Zouari-Ellouzi, S., Chaari, F., Kallel, F., Ghazala, I., Bouaziz, F., ghorbel, R., & Chaabouni, S. E. (2014). Production and *in vitro* evaluation of xylooligosaccharides generated from corncobs using immobilized *Penicillium occitanis* xylanase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 102, 146-153. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.02.004>
- Drouet, P., Zhang, M., & Legoy, M. D. (1994). Enzymatic synthesis of alkyl β -D-xylosides by transxylosylation and reverse hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 43(11), 1075-1080. <https://doi.org/10.1002/bit.260431110>
- Dutta, T., Sengupta, R., Sahoo, R., Sinha Ray, S., Bhattacharjee, A., & Ghosh, S. (2007). A novel cellulase free alkaliphilic xylanase from alkali tolerant *Penicillium citrinum*: Production, purification and characterization. *Letters in Applied Microbiology*, 44(2), 206-211. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02042.x>
- Ebringerová, A., Hromádková, Z., & Heinze, T. (2005). Hemicellulose. En T. Heinze (Ed.), *Polysaccharides I: Structure, Characterization and Use* (pp. 1-67). Springer. <https://doi.org/10.1007/b136816>
- Ellilä, S., Fonseca, L., Uchima, C., Cota, J., Goldman, G. H., Saloheimo, M., Sacon, V., & Siika-aho, M. (2017). Development of a low-cost cellulase production process using *Trichoderma reesei* for Brazilian biorefineries. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0717-0>
- Faijes, M., Saura-Valls, M., Pérez, X., Conti, M., & Planas, A. (2006). Acceptor-dependent regioselectivity of glycosynthase reactions by *Streptomyces* E383A β -glucosidase. *Carbohydrate Research*, 341(12), 2055-2065. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.04.049>

- Fakhri, S., Gravandi, M. M., Abdian, S., Akkol, E. K., Farzaei, M. H., & Sobarzo-Sánchez, E. (2021). The Neuroprotective Role of Polydatin: Neuropharmacological Mechanisms, Molecular Targets, Therapeutic Potentials, and Clinical Perspective. *Molecules*, 26(19), 5985. <https://doi.org/10.3390/molecules26195985>
- Fang, H., & Xia, L. (2013). High activity cellulase production by recombinant *Trichoderma reesei* ZU-02 with the enhanced cellobiohydrolase production. *Bioresource Technology*, 144, 693-697. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.120>
- Fernandez, J., Wright, J. D., Hartline, D., Quispe, C. F., Madayiputhiya, N., & Wilson, R. A. (2012). Principles of Carbon Catabolite Repression in the Rice Blast Fungus: Tps1, Nmr1-3, and a MATE–Family Pump Regulate Glucose Metabolism during Infection. *PLOS Genetics*, 8(5), e1002673. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002673>
- Ferreira, J. A., Mahboubi, A., Lennartsson, P. R., & Taherzadeh, M. J. (2016). Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: Present status and future prospects. *Bioresource Technology*, 215, 334-345. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.018>
- Fierro, F., Laich, F., García-Rico, R. O., & Martín, J. F. (2004). High efficiency transformation of *Penicillium nalgiovense* with integrative and autonomously replicating plasmids. *International Journal of Food Microbiology*, 90(2), 237-248. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00306-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00306-4)
- Fujii, T., Inoue, H., & Ishikawa, K. (2014). Characterization of the xylanase regulator protein gene, *xlnR*, in *Talaromyces cellulolyticus* (formerly known as *Acremonium cellulolyticus*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78(9), 1564-1567. <https://doi.org/10.1080/09168451.2014.923298>
- Fujii, T., Koike, H., Sawayama, S., Yano, S., & Inoue, H. (2015). Draft Genome Sequence of *Talaromyces cellulolyticus* Strain Y-94, a Source of Lignocellulosic Biomass-Degrading Enzymes. *Genome Announcements*, 3(1), e00014. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00014-15>
- Fuso, A., Rosso, F., Rosso, G., Risso, D., Manera, I., & Caligiani, A. (2022). Production of xylo-oligosaccharides (XOS) of tailored degree of polymerization from acetylated xylans through modelling of enzymatic hydrolysis. *Food Research International*, 162, 112019. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112019>
- Gambini, J., Inglés, M., Olaso, G., Lopez-Grueso, R., Bonet-Costa, V., Gimeno-Mallench, L., Mas-Bargues, C., Abdelaziz, K. M., Gomez-Cabrera, M. C., Vina, J., & Borrás, C. (2015). Properties of Resveratrol: *In Vitro* and *In Vivo* Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015(1), 837042. <https://doi.org/10.1155/2015/837042>
- Gao, L., Li, Z., Xia, C., Qu, Y., Liu, M., Yang, P., Yu, L., & Song, X. (2017). Combining manipulation of transcription factors and overexpression of the target genes to enhance lignocellulolytic enzyme production in *Penicillium oxalicum*. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 100. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0783-3>
- García-Villalba, R., González-Sarriás, A., Giménez-Bastida, J. A., Selma, M. V., Espín, J. C., & Tomás-Barberán, F. A. (2022). 3.11—Metabolism of Dietary (Poly)phenols by the Gut Microbiota. En M. Glibetic (Ed.), *Comprehensive Gut Microbiota* (pp. 149-175). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819265-8.00091-7>

- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2003). ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3784-3788. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg563>
- Gil Muñoz, J. (2015). *Estudio de las β -glucosidasas del complejo celulolítico de Talaromyces amestolkiae: Caracterización y aplicaciones biotecnológicas*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Gonzalez-Alfonso, J. L., Peñalver, P., Ballesteros, A. O., Morales, J. C., & Plou, F. J. (2019). Effect of α -Glucosylation on the Stability, Antioxidant Properties, Toxicity, and Neuroprotective Activity of (–)-Epigallocatechin Gallate. *Frontiers in Nutrition*, 6, 30. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00030>
- González-Alfonso, J. L., Rodrigo-Frutos, D., Belmonte-Reche, E., Peñalver, P., Poveda, A., Jiménez-Barbero, J., Ballesteros, A. O., Hirose, Y., Polaina, J., Morales, J. C., Fernández-Lobato, M., & Plou, F. J. (2018). Enzymatic Synthesis of a Novel Pterostilbene α -Glucoside by the Combination of Cyclodextrin Glucanotransferase and Amyloglucosidase. *Molecules*, 23(6), 1271. <https://doi.org/10.3390/molecules23061271>
- Gonzalez-Alfonso, J. L., Ubiparip, Z., Jimenez-Ortega, E., Poveda, A., Alonso, C., Coderch, L., Jimenez-Barbero, J., Sanz-Aparicio, J., Ballesteros, A. O., Desmet, T., & Plou, F. J. (2021). Enzymatic Synthesis of Phloretin α -Glucosides Using a Sucrose Phosphorylase Mutant and its Effect on Solubility, Antioxidant Properties and Skin Absorption. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 363(12), 3079-3089. <https://doi.org/10.1002/adsc.202100201>
- Gorke, J., Sreenc, F., & Kazlauskas, R. (2010). Toward advanced ionic liquids. Polar, enzyme-friendly solvents for biocatalysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 15(1), 40-53. <https://doi.org/10.1007/s12257-009-3079-z>
- Gottlieb, H. E., Kotlyar, V., & Nudelman, A. (1997). NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *The Journal of Organic Chemistry*, 62(21), 7512-7515. <https://doi.org/10.1021/jo971176v>
- Gowd, V., Karim, N., Xie, L., Shishir, M. R. I., Xu, Y., & Chen, W. (2020). In vitro study of bioaccessibility, antioxidant, and α -glucosidase inhibitory effect of pelargonidin-3-O-glucoside after interacting with beta-lactoglobulin and chitosan/pectin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 154, 380-389. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.126>
- Goyari, S., Devi, S. H., Bengyella, L., Khan, M., Sharma, C. K., Kalita, M. C., & Talukdar, N. C. (2015). Unveiling the optimal parameters for cellulolytic characteristics of *Talaromyces verruculosus* SGMNPF3 and its secretory enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, 119(1), 88-98. <https://doi.org/10.1111/jam.12816>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning: A laboratory manual, 4th ed.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Groves, P., Rasmussen, M. O., Molero, M. D., Samain, E., Cañada, F. J., Driguez, H., & Jiménez-Barbero, J. (2004). Diffusion ordered spectroscopy as a complement to size exclusion chromatography in oligosaccharide analysis. *Glycobiology*, 14(5), 451-456. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwh037>

- Gutiérrez, S., Marcos, A. T., Casqueiro, J., Kosalková, K., Fernández, F. J., Velasco, J., & Martín, J. F. (1999). Transcription of the *pcbAB*, *pcbC* and *penDE* genes of *Penicillium chrysogenum* AS-P-78 is repressed by glucose and the repression is not reversed by alkaline pHs. *Microbiology*, 145(2), 317-324. <https://doi.org/10.1099/13500872-145-2-317>
- Häkkinen, M., Valkonen, M. J., Westerholm-Parvinen, A., Aro, N., Arvas, M., Vitikainen, M., Penttilä, M., Saloheimo, M., & Pakula, T. M. (2014). Screening of candidate regulators for cellulase and hemicellulase production in *Trichoderma reesei* and identification of a factor essential for cellulase production. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 14. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-14>
- Hancock, S. M., Vaughan, M. D., & Withers, S. G. (2006). Engineering of glycosidases and glycosyltransferases. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10(5), 509-519. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.07.015>
- Hasper, A. A. (2003). *Function and mode of regulation of the transcriptional activator XlnR from Aspergillus*. Tesis Doctoral. Wageningen University.
- Hasper, A. A., Trindade, L. M., van der Veen, D., van Ooyen, A. J. J., & de Graaff, L. H. (2004). Functional analysis of the transcriptional activator XlnR from *Aspergillus niger*. *Microbiology*, 150(5), 1367-1375. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26557-0>
- Hayes, M. R., & Pietruszka, J. (2017). Synthesis of Glycosides by Glycosynthases. *Molecules*, 22(9), 1434. <https://doi.org/10.3390/molecules22091434>
- Henrissat, B., Callebaut, I., Fabrega, S., Lehn, P., Mornon, J. P., & Davies, G. (1995). Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(15), 7090-7094. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.15.7090>
- Henry-Vitrac, C., Desmoulière, A., Girard, D., Mérellon, J.-M., & Krisa, S. (2006). Transport, deglycosylation, and metabolism of trans-piceid by small intestinal epithelial cells. *European Journal of Nutrition*, 45(7), 376-382. <https://doi.org/10.1007/s00394-006-0609-8>
- Hooykaas, P. J. J., van Heusden, G. P. H., Niu, X., Reza Roushan, M., Soltani, J., Zhang, X., & van der Zaal, B. J. (2018). *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Yeast and Fungi. En S. B. Gelvin (Ed.), *Agrobacterium Biology: From Basic Science to Biotechnology* (pp. 349-374). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/82_2018_90
- Hu, J., & Saddler, J. N. (2018). Why does GH10 xylanase have better performance than GH11 xylanase for the deconstruction of pretreated biomass? *Biomass and Bioenergy*, 110, 13-16. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.01.007>
- Iglesias-Aguirre, C. E., Vallejo, F., Beltrán, D., Aguilar-Aguilar, E., Puigcerver, J., Alajarín, M., Berná, J., Selma, M. V., & Espín, J. C. (2022). Lunularin Producers versus Non-producers: Novel Human Metabotypes Associated with the Metabolism of Resveratrol by the Gut Microbiota. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(34), 10521-10531. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c04518>
- Inoue, H., Fujii, T., Yoshimi, M., Taylor, L. E., II, Decker, S. R., Kishishita, S., Nakabayashi, M., & Ishikawa, K. (2013). Construction of a starch-inducible homologous expression system to produce cellulolytic enzymes from *Acremonium cellulolyticus*. *Journal of Industrial*

- Microbiology and Biotechnology*, 40(8), 823-830. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1286-2>
- Inoue, H., Kishishita, S., Kumagai, A., Kataoka, M., Fujii, T., & Ishikawa, K. (2015). Contribution of a family 1 carbohydrate-binding module in thermostable glycoside hydrolase 10 xylanase from *Talaromyces cellulolyticus* toward synergistic enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 77. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0259-2>
- Ito, T., Yokoyama, E., Sato, H., Ujita, M., Funaguma, T., Furukawa, K., & Hara, A. (2003). Xylosidases associated with the cell surface of *Penicillium herquei* IFO 4674. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(4), 354-359. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)90136-8](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)90136-8)
- Jahn, M., Marles, J., Warren, R. A. J., & Withers, S. G. (2003). Thioglycoligases: Mutant Glycosidases for Thioglycoside Synthesis. *Angewandte Chemie*, 115(3), 366-368. <https://doi.org/10.1002/anie.200390114>
- Jahn, M., & Withers, S. G. (2003). New Approaches to Enzymatic Oligosaccharide Synthesis: Glycosynthases and Thioglycoligases. *Biocatalysis and Biotransformation*, 21(4-5), 159-166. <https://doi.org/10.1080/10242420310001614351>
- Jiang, D., Zhu, W., Wang, Y., Sun, C., Zhang, K.-Q., & Yang, J. (2013). Molecular tools for functional genomics in filamentous fungi: Recent advances and new strategies. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1562-1574. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.005>
- Jin, F. J., Watanabe, T., Juvvadi, P. R., Maruyama, J., Arioka, M., & Kitamoto, K. (2007). Double disruption of the proteinase genes, *tppA* and *pepE*, increases the production level of human lysozyme by *Aspergillus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(5), 1059-1068. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1088-4>
- Jones, P., Binns, D., Chang, H.-Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A., Nuka, G., Pesseat, S., Quinn, A. F., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M., Yong, S.-Y., Lopez, R., & Hunter, S. (2014). InterProScan 5: Genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, 30(9), 1236-1240. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu031>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583-589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kadi, N., & Crouzet, J. (2008). Transglycosylation reaction of endoxylanase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Food Chemistry*, 106(2), 466-474. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.089>
- Kanna, M., Yano, S., Inoue, H., Fujii, T., & Sawayama, S. (2011). Enhancement of β -xylosidase productivity in cellulase producing fungus *Acremonium cellulolyticus*. *AMB Express*, 1(1), 15. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-15>
- Kaplan, J. B. (2010). Biofilm Dispersal. *Journal of Dental Research*, 89(3), 205-218. <https://doi.org/10.1177/0022034509359403>

- Kim, I., Moon, J. K., Hur, S. J., & Lee, J. (2020). Structural changes in mulberry (*Morus Microphylla*. Buckl) and chokeberry (*Aronia melanocarpa*) anthocyanins during simulated *in vitro* human digestion. *Food Chemistry*, 318, 126449. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126449>
- Kim, Y.-W., Fox, D. T., Hekmat, O., Kantner, T., McIntosh, L. P., Warren, R. A. J., & Withers, S. G. (2006). Glycosynthase-based synthesis of xylo-oligosaccharides using an engineered retaining xylanase from *Cellulomonas fimi*. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 4(10), 2025-2032. <https://doi.org/10.1039/B601667G>
- Knob, A., Terrasan, C. R. F., & Carmona, E. C. (2010). β -Xylosidases from filamentous fungi: An overview. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(3), 389-407. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0190-4>
- Koshland Jr., D. E. (1953). Stereochemistry and the Mechanism of Enzymatic Reactions. *Biological Reviews*, 28(4), 416-436. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1953.tb01386.x>
- Kötzler, M. P., Hancock, S. M., & Withers, S. G. (2014). Glycosidases: Functions, Families and Folds. *En eLS*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0020548.pub2>
- Kuhad, R. C., Gupta, R., & Singh, A. (2011). Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Research*, 2011, 280696. <https://doi.org/10.4061/2011/280696>
- Kumar, Y., Khachane, A., Belwal, M., Das, S., Somsundaram, K., & Tatu, U. (2004). ProteoMod: A new tool to quantitate protein post-translational modifications. *Proteomics*, 4(6), 1672-1683. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300778>
- Kun, R. S., Garrigues, S., Peng, M., Keymanesh, K., Lipzen, A., Ng, V., Tejomurthula, S., Grigoriev, I. V., & de Vries, R. P. (2023). The transcriptional activator ClrB is crucial for the degradation of soybean hulls and guar gum in *Aspergillus niger*. *Fungal Genetics and Biology*, 165, 103781. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2023.103781>
- Kun, R. S., Meng, J., Salazar-Cerezo, S., Mäkelä, M. R., de Vries, R. P., & Garrigues, S. (2020). CRISPR/Cas9 facilitates rapid generation of constitutive forms of transcription factors in *Aspergillus niger* through specific on-site genomic mutations resulting in increased saccharification of plant biomass. *Enzyme and Microbial Technology*, 136, 109508. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109508>
- Kurakake, M., Fujii, T., Yata, M., Okazaki, T., & Komaki, T. (2005). Characteristics of transxylosylation by β -xylosidase from *Aspergillus awamori* K4. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1726(3), 272-279. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.08.009>
- Ladurner, A., Schachner, D., Schueller, K., Pignitter, M., Heiss, E. H., Somoza, V., & Dirsch, V. M. (2014). Impact of Trans-Resveratrol-Sulfates and -Glucuronides on Endothelial Nitric Oxide Synthase Activity, Nitric Oxide Release and Intracellular Reactive Oxygen Species. *Molecules*, 19(10), 16724-16736. <https://doi.org/10.3390/molecules191016724>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

- Lafond, M., Tauzin, A., Desseaux, V., Bonnin, E., Ajandouz, E.-H., & Giardina, T. (2011). GH10 xylanase D from *Penicillium funiculosum*: Biochemical studies and xylooligosaccharide production. *Microbial Cell Factories*, 10(1), 20. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-20>
- Lepak, A., Gutmann, A., Kulmer, S. T., & Nidetzky, B. (2015). Creating a Water-Soluble Resveratrol-Based Antioxidant by Site-Selective Enzymatic Glucosylation. *ChemBioChem*, 16(13), 1870-1874. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500284>
- Li, C.-X., Zhao, S., Zhang, T., Xian, L., Liao, L.-S., Liu, J.-L., & Feng, J.-X. (2017). Genome sequencing and analysis of *Talaromyces pinophilus* provide insights into biotechnological applications. *Scientific Reports*, 7(1), 490. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00567-0>
- Li, D., Tang, Y., Lin, J., & Cai, W. (2017). Methods for genetic transformation of filamentous fungi. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 168. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0785-7>
- Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25(14), 1754-1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
- Li, M., Schneider, K., Kristensen, M., Borodina, I., & Nielsen, J. (2016). Engineering yeast for high-level production of stilbenoid antioxidants. *Scientific Reports*, 6(1), 36827. <https://doi.org/10.1038/srep36827>
- Li, Z., Yao, G., Wu, R., Gao, L., Kan, Q., Liu, M., Yang, P., Liu, G., Qin, Y., Song, X., Zhong, Y., Fang, X., & Qu, Y. (2015). Synergistic and Dose-Controlled Regulation of Cellulase Gene Expression in *Penicillium oxalicum*. *PLOS Genetics*, 11(9), e1005509. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005509>
- Liao, H., Zheng, H., Li, S., Wei, Z., Mei, X., Ma, H., Shen, Q., & Xu, Y. (2015). Functional diversity and properties of multiple xylanases from *Penicillium oxalicum* GZ-2. *Scientific Reports*, 5(1), 12631. <https://doi.org/10.1038/srep12631>
- Linares-Pastén, J. A., Aronsson, A., & Karlsson, E. N. (2018). Structural Considerations on the Use of Endo-Xylanases for the Production of prebiotic Xylooligosaccharides from Biomass. *Current Protein & Peptide Science*, 19(1), 48-67. <https://doi.org/10.2174/1389203717666160923155209>
- Liu, G., Zhang, L., Wei, X., Zou, G., Qin, Y., Ma, L., Li, J., Zheng, H., Wang, S., Wang, C., Xun, L., Zhao, G.-P., Zhou, Z., & Qu, Y. (2013). Genomic and Secretomic Analyses Reveal Unique Features of the Lignocellulolytic Enzyme System of *Penicillium decumbens*. *PloS One*, 8(2), e55185. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055185>
- Liu, J., Li, X., Li, M., & Zheng, Y. (2022). Chapter Six - Lignin biorefinery: Lignin source, isolation, characterization, and bioconversion. En Y. Li & Y. Zhou (Eds.), *Advances in Bioenergy* (Vol. 7, pp. 211-270). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.aibe.2022.05.004>
- Liu, X., & Kokare, C. (2017). Chapter 11—Microbial Enzymes of Use in Industry. En G. Brahmachari (Ed.), *Biotechnology of Microbial Enzymes* (pp. 267-298). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00011-X>
- Llanos, A., Déjean, S., Neugnot-Roux, V., François, J. M., & Parrou, J.-L. (2019). Carbon sources and XlnR-dependent transcriptional landscape of CAZymes in the industrial fungus

- Talaromyces versatilis*: When exception seems to be the rule. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1062-8>
- Lo Leggio, L., Kalogiannis, S., Eckert, K., Teixeira, S. C. M., Bhat, M. K., Andrei, C., Pickersgill, R. W., & Larsen, S. (2001). Substrate specificity and subsite mobility in *T. aurantiacus* xylanase 10A. *FEBS Letters*, 509(2), 303-308. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03177-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03177-5)
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D490-D495. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>
- Lv, D., Zhang, W., Meng, X., & Liu, W. (2023). Single Mutation in Transcriptional Activator Xyr1 Enhances Cellulase and Xylanase Production in *Trichoderma reesei* on Glucose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(31), 11993-12003. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c03466>
- Lv, Q., Long, J., Gong, Z., Nong, K., Liang, X., Qin, T., Huang, W., & Yang, L. (2021). Current State of Knowledge on the Antioxidant Effects and Mechanisms of Action of Polyphenolic Compounds. *Natural Product Communications*, 16(7), 1-13. <https://doi.org/10.1177/1934578X211027745>
- Macfarlane, G. t., Steed, H., & Macfarlane, S. (2008). Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 104(2), 305-344. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03520.x>
- Mach-Aigner, A. R., Pucher, M. E., Steiger, M. G., Bauer, G. E., Preis, S. J., & Mach, R. L. (2008). Transcriptional Regulation of *xyr1*, Encoding the Main Regulator of the Xylanolytic and Cellulolytic Enzyme System in *Hypocrea jecorina*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(21), 6554-5652.
- Madeira, F., Park, Y. mi, Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A. R. N., Potter, S. C., Finn, R. D., & Lopez, R. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W636-W641. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz268>
- Maeda, R. N., Barcelos, C. A., Anna, L. M. M. S., & Pereira, N. (2013). Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. *Journal of Biotechnology*, 163(1), 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.10.014>
- Mäkelä, M. R., Mansouri, S., Wiebenga, A., Rytioja, J., de Vries, R. P., & Hildén, K. S. (2016). *Penicillium subrubescens* is a promising alternative for *Aspergillus niger* in enzymatic plant biomass saccharification. *New Biotechnology*, 33(6), 834-841. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.07.014>
- Mandels, M., & Weber, J. (1969). The Production of Cellulases. En *Cellulases and Their Applications* (Vol. 95, pp. 391-414). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/ba-1969-0095.ch023>
- Marié, T., Willig, G., Teixeira, A. R. S., Gazaneo Barboza, E., Kotland, A., Gratia, A., Courrot, E., Hubert, J., Renault, J.-H., & Allais, F. (2018). Enzymatic Synthesis of Resveratrol α -Glycosides from β -Cyclodextrin-Resveratrol Complex in Water. *ACS Sustainable*

- Chemistry & Engineering*, 6(4), 5370-5380.
<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b00176>
- Martín, J. F. (2015). Fungal Transformation: From Protoplasts to Targeted Recombination Systems. En M. A. van den Berg & K. Maruthachalam (Eds.), *Genetic Transformation Systems in Fungi, Volume 1* (pp. 3-18). Springer International Publishing.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-10142-2_1
- Marui, J., Kitamoto, N., Kato, M., Kobayashi, T., & Tsukagoshi, N. (2002). Transcriptional activator, AoXlnR, mediates cellulose-inductive expression of the xylanolytic and cellulolytic genes in *Aspergillus oryzae*. *FEBS Letters*, 528(1-3), 279-282. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03328-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03328-8)
- Massey, H. C., Ranjit, N., Stoltzfus, J. D., & Lok, J. B. (2013). Strongyloides stercoralis daf-2 encodes a divergent ortholog of *Caenorhabditis elegans* DAF-2. *International journal for parasitology*, 43(7), 515-520. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.01.008>
- Mathew, S., Aronsson, A., Karlsson, E. N., & Adlercreutz, P. (2018). Xylo- and arabinoxylooligosaccharides from wheat bran by endoxylanases, utilisation by probiotic bacteria, and structural studies of the enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(7), 3105-3120. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8823-x>
- Mathew, S., Karlsson, E. N., & Adlercreutz, P. (2017). Extraction of soluble arabinoxylan from enzymatically pretreated wheat bran and production of short xylo-oligosaccharides and arabinoxylo-oligosaccharides from arabinoxylan by glycoside hydrolase family 10 and 11 endoxylanases. *Journal of Biotechnology*, 260, 53-61. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.09.006>
- Mattam, A. J., Chaudhari, Y. B., & Velankar, H. R. (2022). Factors regulating cellulolytic gene expression in filamentous fungi: An overview. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01764-x>
- McIntosh, L. P., Hand, G., Johnson, P. E., Joshi, M. D., Körner, M., Plesniak, L. A., Ziser, L., Wakarchuk, W. W., & Withers, S. G. (1996). The pKa of the General Acid/Base Carboxyl Group of a Glycosidase Cycles during Catalysis: A ¹³C-NMR Study of *Bacillus circulans* Xylanase. *Biochemistry*, 35(31), 9958-9966. <https://doi.org/10.1021/bi9613234>
- Mei, Y.-Z., Zhu, Y.-L., Huang, P.-W., Yang, Q., & Dai, C.-C. (2019). Strategies for gene disruption and expression in filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(15), 6041-6059. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09953-2>
- Mello-de-Sousa, T. M., Gorsche, R., Jovanović, B., Mach, R. L., & Mach-Aigner, A. R. (2022). In Vitro Characterization of a Nuclear Receptor-like Domain of the Xylanase Regulator 1 from *Trichoderma reesei*. *Journal of Fungi*, 8(12), 1254. <https://doi.org/10.3390/jof8121254>
- Méndez-Líter, J. A., Ayuso-Fernández, I., Csarman, F., De Eugenio, L. I., Míguez, N., Plou, F. J., Prieto, A., Ludwig, R., & Martínez, M. J. (2021b). Lytic Polysaccharide Monooxygenase from *Talaromyces amestolkiae* with an Enigmatic Linker-like Region: The Role of This Enzyme on Cellulose Saccharification. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13611. <https://doi.org/10.3390/ijms222413611>

- Méndez-Líter, J. A., de Eugenio, L. I., Nieto-Domínguez, M., Prieto, A., & Martínez, M. J. (2021a). Hemicellulases from *Penicillium* and *Talaromyces* for lignocellulosic biomass valorization: A review. *Bioresource Technology*, 324, 124623. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124623>
- Méndez-Líter, J. A., de Eugenio, L. I., Prieto, A., & Martínez, M. J. (2018). The β -glucosidase secreted by *Talaromyces amestolkiae* under carbon starvation: A versatile catalyst for biofuel production from plant and algal biomass. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 123. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1125-9>
- Méndez-Líter, J. A., Eugenio, L. I. de, Nieto-Domínguez, M., Prieto, A., & Martínez, M. J. (2023). Expression and Characterization of Two α -L-Arabinofuranosidases from *Talaromyces amestolkiae*: Role of These Enzymes in Biomass Valorization. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(15), 11997. <https://doi.org/10.3390/ijms241511997>
- Méndez-Líter, J. A., Gil-Muñoz, J., Nieto-Domínguez, M., Barriuso, J., de Eugenio, L. I., & Martínez, M. J. (2017). A novel, highly efficient β -glucosidase with a cellulose-binding domain: Characterization and properties of native and recombinant proteins. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 256. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0946-2>
- Méndez-Líter, J. A., Nieto-Domínguez, M., Fernández de Toro, B., González Santana, A., Prieto, A., Asensio, J. L., Cañada, F. J., de Eugenio, L. I., & Martínez, M. J. (2020). A glucotolerant β -glucosidase from the fungus *Talaromyces amestolkiae* and its conversion into a glycosynthase for glycosylation of phenolic compounds. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 127. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01386-1>
- Méndez-Líter, J. A., Pozo-Rodríguez, A., Madruga, E., Rubert, M., Santana, A. G., de Eugenio, L. I., Sánchez, C., Martínez, A., Prieto, A., & Martínez, M. J. (2022). Glycosylation of Epigallocatechin Gallate by Engineered Glycoside Hydrolases from *Talaromyces amestolkiae*: Potential Antiproliferative and Neuroprotective Effect of These Molecules. *Antioxidants*, 11(7), 1325. <https://doi.org/10.3390/antiox11071325>
- Méndez-Líter, J. A., Tundidor, I., Nieto-Domínguez, M., de Toro, B. F., González Santana, A., de Eugenio, L. I., Prieto, A., Asensio, J. L., Cañada, F. J., Sánchez, C., & Martínez, M. J. (2019). Transglycosylation products generated by *Talaromyces amestolkiae*GH3 β -glucosidases: Effect of hydroxytyrosol, vanillin and its glucosides on breast cancer cells. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 97. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1147-4>
- Mewis, K., Lenfant, N., Lombard, V., & Henrissat, B. (2016). Dividing the Large Glycoside Hydrolase Family 43 into Subfamilies: A Motivation for Detailed Enzyme Characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(6), 1686-1692. <https://doi.org/10.1128/AEM.03453-15>
- Meyer, V. (2008). Genetic engineering of filamentous fungi—Progress, obstacles and future trends. *Biotechnology Advances*, 26(2), 177-185. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.001>
- Miao, Y., Li, P., Li, G., Liu, D., Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P., Shen, Q., & Zhang, R. (2017). Two degradation strategies for overcoming the recalcitrance of natural lignocellulosic xylan by polysaccharides-binding GH10 and GH11 xylanases of filamentous fungi. *Environmental Microbiology*, 19(3), 1054-1064. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13614>

- Mikkelsen, L., Sarrocco, S., Lübeck, M., & Jensen, D. F. (2003). Expression of the red fluorescent protein DsRed-Express in filamentous ascomycete fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 223(1), 135-139. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00355-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00355-0)
- Mille-Lindblom, C., von Wachenfeldt, E., & Tranvik, L. J. (2004). Ergosterol as a measure of living fungal biomass: Persistence in environmental samples after fungal death. *Journal of Microbiological Methods*, 59(2), 253-262. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.07.010>
- Mondal, S., Mondal, K., Halder, S. K., Thakur, N., & Mondal, K. C. (2022). Microbial Amylase: Old but still at the forefront of all major industrial enzymes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 45, 102509. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102509>
- Monteiro, M. R., Kugelmeier, C. L., Pinheiro, R. S., Batalha, M. O., & da Silva César, A. (2018). Glycerol from biodiesel production: Technological paths for sustainability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 88, 109-122. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.02.019>
- Moon, K., Lee, S., Park, H., & Cha, J. (2021). Enzymatic Synthesis of Resveratrol α -Glucoside by Amylosucrase of *Deinococcus geothermalis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(12), 1692-1700. <https://doi.org/10.4014/jmb.2108.08034>
- Morand, C., Roos, B. D., Garcia-Conesa, M. T., Gibney, E. R., Landberg, R., Manach, C., Milenkovic, D., Rodriguez-Mateos, A., Wiele, T. V. de, & Tomas-Barberan, F. (2020). Why interindividual variation in response to consumption of plant food bioactives matters for future personalised nutrition. *Proceedings of the Nutrition Society*, 79(2), 225-235. <https://doi.org/10.1017/S0029665120000014>
- Mózsik, L., Pohl, C., Meyer, V., Bovenberg, R. A. L., Nygård, Y., & Driessen, A. J. M. (2021). Modular Synthetic Biology Toolkit for Filamentous Fungi. *ACS Synthetic Biology*, 10(11), 2850-2861. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00260>
- Mussatto, S. I. (2014). Brewer's spent grain: A valuable feedstock for industrial applications. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(7), 1264-1275. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6486>
- Neelamegham, S., Aoki-Kinoshita, K., Bolton, E., Frank, M., Lisacek, F., Lütteke, T., O'Boyle, N., Packer, N. H., Stanley, P., Toukach, P., Varki, A., Woods, R. J., & The SNFG Discussion Group. (2019). Updates to the Symbol Nomenclature for Glycans guidelines. *Glycobiology*, 29(9), 620-624. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwz045>
- Nielsen, M. L., Isbrandt, T., Rasmussen, K. B., Thrane, U., Hoof, J. B., Larsen, T. O., & Mortensen, U. H. (2017). Genes Linked to Production of Secondary Metabolites in *Talaromyces atrovirens* Revealed Using CRISPR-Cas9. *PLoS One*, 12(1), e0169712. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169712>
- Nieto Domínguez, M. (2017). *Estudio de xilanasas fúngicas para el aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Nieto-Domínguez, M., de Eugenio, L. I., Barriuso, J., Prieto, A., Fernández de Toro, B., Canales-Mayordomo, Á., & Martínez, M. J. (2015). Novel pH-Stable Glycoside Hydrolase Family 3 β -Xylosidase from *Talaromyces amestolkiae*: An Enzyme Displaying Regioselective Transxylosylation. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(18), 6380-6392. <https://doi.org/10.1128/AEM.01744-15>

- Nieto-Domínguez, M., de Eugenio, L. I., Peñalver, P., Belmonte-Reche, E., Morales, J. C., Poveda, A., Jiménez-Barbero, J., Prieto, A., Plou, F. J., & Martínez, M. J. (2017a). Enzymatic Synthesis of a Novel Neuroprotective Hydroxytyrosyl Glycoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(48), 10526-10533. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04176>
- Nieto-Domínguez, M., de Eugenio, L. I., York-Durán, M. J., Rodríguez-Colinas, B., Plou, F. J., Chenoll, E., Pardo, E., Codoñer, F., & Jesús Martínez, M. (2017b). Prebiotic effect of xylooligosaccharides produced from birchwood xylan by a novel fungal GH11 xylanase. *Food Chemistry*, 232, 105-113. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.149>
- Nieto-Domínguez, M., Fernández de Toro, B., de Eugenio, L. I., Santana, A. G., Bejarano-Muñoz, L., Armstrong, Z., Méndez-Líter, J. A., Asensio, J. L., Prieto, A., Withers, S. G., Cañada, F. J., & Martínez, M. J. (2020). Thioglycoligase derived from fungal GH3 β -xylosidase is a multi-glycoligase with broad acceptor tolerance. *Nature Communications*, 11(1), 4864. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18667-3>
- Nieto-Domínguez, M., Martínez-Fernández, J. A., de Toro, B. F., Méndez-Líter, J. A., Cañada, F. J., Prieto, A., de Eugenio, L. I., & Martínez, M. J. (2019). Exploiting xylan as sugar donor for the synthesis of an antiproliferative xyloside using an enzyme cascade. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 174. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1223-9>
- Nieto-Domínguez, M., Prieto, A., Fernández de Toro, B., Cañada, F. J., Barriuso, J., Armstrong, Z., Withers, S. G., de Eugenio, L. I., & Martínez, M. J. (2016). Enzymatic fine-tuning for 2-(6-hydroxynaphthyl) β -D-xylopyranoside synthesis catalyzed by the recombinant β -xylosidase BxTW1 from *Talaromyces amestolkiae*. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 171. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0568-6>
- Noguchi, Y., Sano, M., Kanamaru, K., Ko, T., Takeuchi, M., Kato, M., & Kobayashi, T. (2009). Genes regulated by AoXlnR, the xylanolytic and cellulolytic transcriptional regulator, in *Aspergillus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(1), 141-154. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2236-9>
- Nordberg Karlsson, E., Schmitz, E., Linares-Pastén, J. A., & Adlercreutz, P. (2018). Endo-xylanases as tools for production of substituted xylooligosaccharides with prebiotic properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(21), 9081-9088. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9343-4>
- Oakley, B. R., Rinehart, J. E., Mitchell, B. L., Oakley, C. E., Cannona, C., Gray, G. L., & May, G. S. (1987). Cloning, mapping and molecular analysis of the *pyrG* (orotidine-5'-phosphate decarboxylase) gene of *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 61(3), 385-399. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90201-0](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90201-0)
- Okuda, N., Fujii, T., Inoue, H., Ishikawa, K., & Hoshino, T. (2016). Enhancing cellulase production by overexpression of xylanase regulator protein gene, *xlnR*, in *Talaromyces cellulolyticus* cellulase hyperproducing mutant strain. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(10), 2065-2068. <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1189315>
- Oliveira, D. M., Mota, T. R., Oliva, B., Segato, F., Marchiosi, R., Ferrarese-Filho, O., Faulds, C. B., & dos Santos, W. D. (2019). Feruloyl esterases: Biocatalysts to overcome biomass recalcitrance and for the production of bioactive compounds. *Bioresource Technology*, 278, 408-423. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.064>

- Oode, C., Shimada, W., Yokota, M., Yamada, Y., & Nihei, K. (2016). Dihydroresveratrol cellobioside and xylobioside as effective melanogenesis activators. *Carbohydrate Research*, 436, 45-49. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2016.11.004>
- Osherov, N., Mathew, J., & May, G. S. (2000). Polarity-Defective Mutants of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, 31(3), 181-188. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1236>
- Paës, G., Berrin, J.-G., & Beaugrand, J. (2012). GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. *Biotechnology Advances*, 30(3), 564-592. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.10.003>
- Palaniappan, A., Balasubramaniam, V. G., & Antony, U. (2017). Prebiotic potential of xylooligosaccharides derived from finger millet seed coat. *Food Biotechnology*, 31(4), 264-280. <https://doi.org/10.1080/08905436.2017.1369433>
- Pan, Y., Yang, J., Wu, J., Yang, L., & Fang, H. (2022). Current advances of *Pichia pastoris* as cell factories for production of recombinant proteins. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1059777. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1059777>
- Pandey, Kavita. R., Naik, Suresh. R., & Vakil, Babu. V. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7577-7587. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1921-1>
- Pandey, R. P., Parajuli, P., Shin, J. Y., Lee, J., Lee, S., Hong, Y.-S., Park, Y. I., Kim, J. S., & Sohng, K. (2014). Enzymatic Biosynthesis of Novel Resveratrol Glucoside and Glycoside Derivatives. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(23), 7235-7243. <https://doi.org/10.1128/AEM.02076-14>
- Payan, F., Leone, P., Porciero, S., Furniss, C., Tahir, T., Williamson, G., Durand, A., Manzanares, P., Gilbert, H. J., Juge, N., & Roussel, A. (2004). The dual nature of the wheat xylanase protein inhibitor XIP-I: Structural basis for the inhibition of family 10 and family 11 xylanases. *Journal of Biological Chemistry*, 279(34), 36029-36037. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404225200>
- Payne, C. M., Knott, B. C., Mayes, H. B., Hansson, H., Himmel, M. E., Sandgren, M., Ståhlberg, J., & Beckham, G. T. (2015). Fungal Cellulases. *Chemical Reviews*, 115(3), 1308-1448. <https://doi.org/10.1021/cr500351c>
- Perrone, D., Fuggetta, M. P., Ardito, F., Cottarelli, A., De Filippis, A., Ravagnan, G., De Maria, S., & Lo Muzio, L. (2017). Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) and its properties in oral diseases (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14(1), 3-9. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4472>
- Perugino, G., Trincone, A., Rossi, M., & Moracci, M. (2004). Oligosaccharide synthesis by glycosynthases. *Trends in Biotechnology*, 22(1), 31-37. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2003.10.008>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605-1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>

- Poletto, P., Pereira, G. N., Monteiro, C. R. M., Pereira, M. A. F., Bordignon, S. E., & de Oliveira, D. (2020). Xylooligosaccharides: Transforming the lignocellulosic biomasses into valuable 5-carbon sugar prebiotics. *Process Biochemistry*, 91, 352-363. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.01.005>
- Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., & Amorim, D. S. (2005). Xylanases from fungi: Properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(5), 577-591. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1904-7>
- Poria, V., Saini, J. K., Singh, S., Nain, L., & Kuhad, R. C. (2020). Arabinofuranosidases: Characteristics, microbial production, and potential in waste valorization and industrial applications. *Bioresource Technology*, 304, 123019. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123019>
- Portnoy, T., Margeot, A., Linke, R., Atanasova, L., Fekete, E., Sándor, E., Hartl, L., Karaffa, L., Druzhinina, I. S., Seiboth, B., Le Crom, S., & Kubicek, C. P. (2011). The CRE1 carbon catabolite repressor of the fungus *Trichoderma reesei*: A master regulator of carbon assimilation. *BMC Genomics*, 12(1), 269. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-269>
- Prieto, A., de Eugenio, L., Méndez-Líter, J. A., Nieto-Domínguez, M., Murgiondo, C., Barriuso, J., Bejarano-Muñoz, L., & Martínez, M. J. (2021). Fungal glycosyl hydrolases for sustainable plant biomass valorization: *Talaromyces amestolkiae* as a model fungus. *International Microbiology*, 24(4), 545-558. <https://doi.org/10.1007/s10123-021-00202-z>
- Quiroz-Castañeda, R. E., Folch-Mallol, J. L., Quiroz-Castañeda, R. E., & Folch-Mallol, J. L. (2013). Hydrolysis of Biomass Mediated by Cellulases for the Production of Sugars. En *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/53719>
- Ravindran, R., Jaiswal, S., Abu-Ghannam, N., & Jaiswal, A. K. (2018). A comparative analysis of pretreatment strategies on the properties and hydrolysis of brewers' spent grain. *Bioresource Technology*, 248, 272-279. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.039>
- Ribeiro, L. F., De Lucas, R. C., Vitcosque, G. L., Ribeiro, L. F., Ward, R. J., Rubio, M. V., Damásio, A. R., Squina, F. M., Gregory, R. C., Walton, P. H., Jorge, J. A., Prade, R. A., Buckeridge, M. S., & Polizeli, M. de L. T. (2014). A novel thermostable xylanase GH10 from *Malbranchea pulchella* expressed in *Aspergillus nidulans* with potential applications in biotechnology. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 115. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-115>
- Ries, L. N. A., Beattie, S. R., Espeso, E. A., Cramer, R. A., & Goldman, G. H. (2016). Diverse Regulation of the CreA Carbon Catabolite Repressor in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 203(1), 335-352. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.187872>
- Robinson, K., Mock, C., & Liang, D. (2015). Pre-formulation studies of resveratrol. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 41(9), 1464-1469. <https://doi.org/10.3109/03639045.2014.958753>
- Rohman, A., Dijkstra, B. W., & Puspaningsih, N. N. T. (2019). β -Xylosidases: Structural Diversity, Catalytic Mechanism, and Inhibition by Monosaccharides. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 5524. <https://doi.org/10.3390/ijms20225524>
- Roux, I., Bowles, S., Kalaitzis, J. A., Vuong, D., Lacey, E., Chooi, Y.-H., & Piggott, A. M. (2021). Characterisation and heterologous biosynthesis of burnettiene A, a new polyene-decalin

- polyketide from *Aspergillus burnettii*. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 19(43), 9506-9513. <https://doi.org/10.1039/D1OB01766G>
- Roux, I., & Chooi, Y. H. (2022). Heterologous Expression of Fungal Biosynthetic Pathways in *Aspergillus nidulans* Using Episomal Vectors. En E. Skellam (Ed.), *Engineering natural product biosynthesis: Methods and protocols* (pp. 75-92). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2273-5_5
- Roux, I., Woodcraft, C., Sbaraini, N., Pepper, A., Wong, E., Bracegirdle, J., & Chooi, Y.-H. (2024). Next-generation AMA1-based plasmids for enhanced heterologous expression in filamentous fungi. *Microbial Biotechnology*, 17(9), e70010. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.70010>
- Ruiz-Díez, B. (2002). Strategies for the transformation of filamentous fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 92(2), 189-195. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01516.x>
- Salehi, B., Mishra, A. P., Nigam, M., Sener, B., Kilic, M., Sharifi-Rad, M., Fokou, P. V. T., Martins, N., & Sharifi-Rad, J. (2018). Resveratrol: A Double-Edged Sword in Health Benefits. *Biomedicines*, 6(3), 91. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6030091>
- Salyers, A. A., Gherardini, F., & O'Brien, M. (1981). Utilization of Xylan by Two Species of Human Colonic *Bacteroides*. *Applied and Environmental Microbiology*, 41(4), 1065-1068. <https://doi.org/10.1128/aem.41.4.1065-1068.1981>
- Samanta, A. K., Jayapal, N., Kolte, A. P., Senani, S., Sridhar, M., Suresh, K. P., & Sampath, K. T. (2012). Enzymatic production of xylooligosaccharides from alkali solubilized xylan of natural grass (*Sehima nervosum*). *Bioresource Technology*, 112, 199-205. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.036>
- Samson, R. A., Yilmaz, N., Houbraken, J., Spierenburg, H., Seifert, K. A., Peterson, S. W., Varga, J., & Frisvad, J. C. (2011). Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. *Studies in Mycology*, 70(1), 159-183. <https://doi.org/10.3114/sim.2011.70.04>
- Scheller, H. V., & Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), 263-289. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>
- Schmidt, A., Gübitz, G. M., & Kratky, C. (1999). Xylan Binding Subsite Mapping in the Xylanase from *Penicillium simplicissimum* Using Xylooligosaccharides as Cryo-Protectant,. *Biochemistry*, 38(8), 2403-2412. <https://doi.org/10.1021/bi982108l>
- Schmidt, A. R., Dresch, A. P., Alves Junior, S. L., Bender, J. P., & Treichel, H. (2023). Applications of Brewer's Spent Grain Hemicelluloses in Biorefineries: Extraction and Value-Added Product Obtention. *Catalysts*, 13(4), 755. <https://doi.org/10.3390/catal13040755>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Serebryanyi, V. A., Sinitsyna, O. A., Fedorova, E. A., Okunev, O. N., Bekkarevich, O. A., Sokolova, L. M., Vavilova, E. A., Vitetsky, Yu. P., & Sinitsyn, A. P. (2006). Synthesis of xylanolytic enzymes and other carbohydrases by the fungus *Penicillium canescens*: Transformants with an altered copy number of the gene *xlnR* and an encoding transcriptional activator.

- Applied Biochemistry and Microbiology*, 42(6), 584-591. <https://doi.org/10.1134/S0003683806060081>
- Serreli, G., & Deiana, M. (2019). *In vivo* formed metabolites of polyphenols and their biological efficacy. *Food & Function*, 10(11), 6999-7021. <https://doi.org/10.1039/C9FO01733J>
- Shibata, N., Suetsugu, M., Kakeshita, H., Igarashi, K., Hagihara, H., & Takimura, Y. (2017). A novel GH10 xylanase from *Penicillium* sp. Accelerates saccharification of alkaline-pretreated bagasse by an enzyme from recombinant *Trichoderma reesei* expressing *Aspergillus* β -glucosidase. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 278. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0970-2>
- Shimoda, K., Kubota, N., Uesugi, D., Hamada, H., Tanigawa, M., & Hamada, H. (2015). Synthesis and pharmacological evaluation of glycosides of resveratrol, pterostilbene, and piceatannol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1348(1), 141-149. <https://doi.org/10.1111/nyas.12836>
- Shrestha, S., Kognou, A. L. M., Zhang, J., & Qin, W. (2021). Different Facets of Lignocellulosic Biomass Including Pectin and Its Perspectives. *Waste and Biomass Valorization*, 12(9), 4805-4823. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01305-w>
- Shrivastava, S. (Ed.). (2020). *Industrial Applications of Glycoside Hydrolases*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-4767-6>
- Silva, T. A. L., Varão, L. H. R., & Pasquini, D. (2024). Lignocellulosic Biomass. En *Handbook of Biomass* (pp. 1-39). Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-19-6772-6_5-1
- Somogyi, M. (1945). A new reagent for the determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry*, 160(1), 61-68. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)43097-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)43097-9)
- Springer, M., & Moco, S. (2019). Resveratrol and Its Human Metabolites—Effects on Metabolic Health and Obesity. *Nutrients*, 11(1), 143. <https://doi.org/10.3390/nu11010143>
- Steentoft, C., Vakhrushev, S. Y., Joshi, H. J., Kong, Y., Vester-Christensen, M. B., Schjoldager, K. T. G., Lavrsen, K., Dabelsteen, S., Pedersen, N. B., Marcos-Silva, L., Gupta, R., Paul Bennett, E., Mandel, U., Brunak, S., Wandall, H. H., Levery, S. B., & Clausen, H. (2013). Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *The EMBO Journal*, 32(10), 1478-1488. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.79>
- Sugimura, M., Nishimoto, M., & Kitaoka, M. (2006). Characterization of Glycosynthase Mutants Derived from Glycoside Hydrolase Family 10 Xylanases. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(5), 1210-1217. <https://doi.org/10.1271/bbb.70.1210>
- Sun, B.-D., Chen, A. J., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Wu, W.-P., Wei, H.-L., Zhou, Y.-G., Jiang, X.-Z., & Samson, R. A. (2020). New section and species in *Talaromyces*. *MycKeys*, 68, 75-113. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.68.52092>
- Sun, J., & Glass, N. L. (2011). Identification of the CRE-1 Cellulolytic Regulon in *Neurospora crassa*. *PLoS One*, 6(9), e25654. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025654>

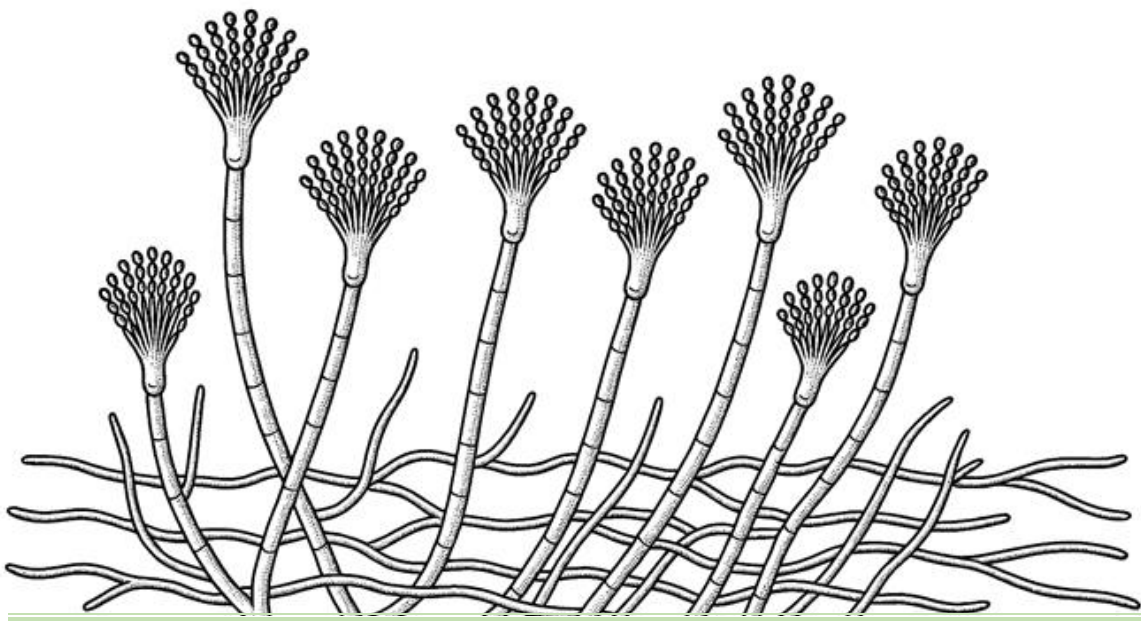
- Sun, J., Tian, C., Diamond, S., & Glass, N. L. (2012). Deciphering Transcriptional Regulatory Mechanisms Associated with Hemicellulose Degradation in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, 11(4), 482-493. <https://doi.org/10.1128/ec.05327>
- Sureshkumar, S., Song, J., Sampath, V., & Kim, I. (2023). Exogenous Enzymes as Zootechnical Additives in Monogastric Animal Feed: A Review. *Agriculture*, 13(12), 2195. <https://doi.org/10.3390/agriculture13122195>
- Szewczyk, E., Nayak, T., Oakley, C. E., Edgerton, H., Xiong, Y., Taheri-Talesh, N., Osmani, S. A., & Oakley, B. R. (2006). Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nature Protocols*, 1(6), 3111-3120. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.405>
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology* (3rd Edition). Sinauer Associates.
- Tamayo-Peña, J. A., Tovar, L. P., Pacheco, L. C. A., Gonçalves, A. R., & Franco, T. T. (2024). *Eucalyptus grandis* Forestry Residue Valorization: Distinct and Integrated Pretreatment Methods for Enhanced Xylooligosaccharide Production. *BioEnergy Research*, 17(3), 1503-1521. <https://doi.org/10.1007/s12155-024-10748-1>
- Tamayo-Ramos, J. A., & Orejas, M. (2014). Enhanced glycosyl hydrolase production in *Aspergillus nidulans* using transcription factor engineering approaches. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 103. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-103>
- Tani, S., Kawaguchi, T., & Kobayashi, T. (2014). Complex regulation of hydrolytic enzyme genes for cellulosic biomass degradation in filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(11), 4829-4837. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5707-6>
- Tena, N., Martín, J., & Asuero, A. G. (2020). State of the Art of Anthocyanins: Antioxidant Activity, Sources, Bioavailability, and Therapeutic Effect in Human Health. *Antioxidants*, 9(5), 451. <https://doi.org/10.3390/antiox9050451>
- Teng, C., Yan, Q., Jiang, Z., Fan, G., & Shi, B. (2010). Production of xylooligosaccharides from the steam explosion liquor of corncobs coupled with enzymatic hydrolysis using a thermostable xylanase. *Bioresource Technology*, 101(19), 7679-7682. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.004>
- Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G. G., Zabicky-Zissman, J. H., Lockington, R. A., & Davies, R. W. (1983). Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 26(2), 205-221. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(83\)90191-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(83)90191-9)
- Torres, P., Poveda, A., Jimenez-Barbero, J., Parra, J. L., Comelles, F., Ballesteros, A. O., & Plou, F. J. (2011). Enzymatic Synthesis of α -Glucosides of Resveratrol with Surfactant Activity. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 353(7), 1077-1086. <https://doi.org/10.1002/adsc.201000968>
- Traut, T. W., & Temple, B. R. S. (2000). The Chemistry of the Reaction Determines the Invariant Amino Acids during the Evolution and Divergence of Orotidine 5'-Monophosphate Decarboxylase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(37), 28675-28681. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003468200>
- Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>

- Valladares-Diestra, K. K., de Souza Vandenberghe, L. P., Vieira, S., Goyzueta-Mamani, L. D., de Mattos, P. B. G., Manzoki, M. C., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2023). The Potential of Xylooligosaccharides as Prebiotics and Their Sustainable Production from Agro-Industrial by-Products. *Foods*, 12(14), 2681. <https://doi.org/10.3390/foods12142681>
- van den Brink, J., & de Vries, R. P. (2011). Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(6), 1477-1492. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3473-2>
- van Peij, N. N., Gielkens, M. M., de Vries, R. P., Visser, J., & de Graaff, L. H. (1998). The transcriptional activator XlnR regulates both xylanolytic and endoglucanase gene expression in *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 3615-3619. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.10.3615-3619.1998>
- Van Peij, N. N. M. E., Visser, J., & De Graaff, L. H. (1998). Isolation and analysis of *xlnR*, encoding a transcriptional activator co-ordinating xylanolytic expression in *Aspergillus niger*. *Molecular Microbiology*, 27(1), 131-142. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00666.x>
- Veiter, L., Rajamanickam, V., & Herwig, C. (2018). The filamentous fungal pellet - Relationship between morphology and productivity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(7), 2997-3006. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8818-7>
- Velasco, J., Oliva, B., Mulinari, E. J., Quintero, L. P., da Silva Lima, A., Gonçalves, A. L., Gonçalves, T. A., Damasio, A., Squina, F. M., Ferreira Milagres, A. M., Abdella, A., Wilkins, M. R., & Segato, F. (2019). Heterologous expression and functional characterization of a GH10 endoxylanase from *Aspergillus fumigatus* var. *Niveus* with potential biotechnological application. *Biotechnology Reports*, 24, e00382. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00382>
- Veličković, D., Dimitrijević, A., Bihelović, F., Bezbradica, D., Knežević-Jugović, Z., & Milosavić, N. (2012). Novel glycoside of vanillyl alcohol, 4-hydroxy-3-methoxybenzyl- α -D-glucopyranoside: Study of enzymatic synthesis, in vitro digestion and antioxidant activity. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35(7), 1107-1115. <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0695-3>
- Vera, C., Illanes, A., & Guerrero, C. (2021). Enzymatic production of prebiotic oligosaccharides. *Current Opinion in Food Science*, 37, 160-170. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.10.013>
- Villarino, M., De Cal, A., Melgarejo, P., Larena, I., & Espeso, E. A. (2016). The development of genetic and molecular markers to register and commercialize *Penicillium rubens* (formerly *Penicillium oxalicum*) strain 212 as a biocontrol agent. *Microbial Biotechnology*, 9(1), 89-99. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12325>
- Villarino, M., Espeso, E. A., Melgarejo, P., & Larena, I. (2018). Transformation of *Penicillium rubens* 212 and Expression of GFP and DsRED Coding Genes for Visualization of Plant-Biocontrol Agent Interaction. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1953. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01653>
- Walle, T. (2011). Bioavailability of resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1215(1), 9-15. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05842.x>

- Wang, J., Wu, Y., Gong, Y., Yu, S., & Liu, G. (2015). Enhancing xylanase production in the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* by homologous overexpression of Mtxyr1. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 42(9), 1233-1241. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1628-3>
- Wang, Q., Zhong, C., & Xiao, H. (2020). Genetic Engineering of Filamentous Fungi for Efficient Protein Expression and Secretion. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00293>
- Wang, S., Chen, H., Tang, X., Zhang, H., Chen, W., & Chen, Y. Q. (2017). Molecular tools for gene manipulation in filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(22), 8063-8075. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8486-z>
- Wang, S., Liu, G., Wang, J., Yu, J., Huang, B., & Xing, M. (2013). Enhancing cellulase production in *Trichoderma reesei* RUT C30 through combined manipulation of activating and repressing genes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40(6), 633-641. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1253-y>
- Weld, R. J., Plummer, K. M., Carpenter, M. A., & Ridgway, H. J. (2006). Approaches to functional genomics in filamentous fungi. *Cell Research*, 16(1), 31-44. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310006>
- Wen, L., Edmunds, G., Gibbons, C., Zhang, J., Gadi, M. R., Zhu, H., Fang, J., Liu, X., Kong, Y., & Wang, P. G. (2018). Toward Automated Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides. *Chemical Reviews*, 118(17), 8151-8187. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00066>
- Win, M., Kamiyama, Y., Matsuo, M., & Yasui, T. (1988). Transxylosylation Products of Xylobiose by β -Xylosidase-1 from *Penicillium wortmanni* IFO 7237. *Agricultural and Biological Chemistry*, 52(5), 1151-1158. <https://doi.org/10.1080/00021369.1988.10868808>
- Wolfenden, R., & Snider, M. J. (2001). The depth of chemical time and the power of enzymes as catalysts. *Accounts of Chemical Research*, 34(12), 938-945. <https://doi.org/10.1021/ar000058i>
- Wu, Q., Zhang, C., Zhu, W., Lu, H., Li, X., Yang, Y., Xu, Y., & Li, W. (2023). Improved thermostability, acid tolerance as well as catalytic efficiency of *Streptomyces ramosus* L2001 GH11 xylanase by N-terminal replacement. *Enzyme and Microbial Technology*, 162, 110143. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2022.110143>
- Xia, C., Gao, L., Li, Z., Liu, G., & Song, X. (2022). Functional analysis of the transcriptional activator XlnR of *Penicillium oxalicum*. *Journal of Applied Microbiology*, 132(2), 1112-1120. <https://doi.org/10.1111/jam.15276>
- Xu, L., Qi, T., Lu, L., & Xiao, M. (2015). Recent progress in the enzymatic glycosylation of phenolic compounds. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 35(1), 1-23. <https://doi.org/10.1080/07328303.2015.1137580>
- Xu, L., Qi, T., Xu, L., Lu, L., & Xiao, M. (2016). Recent progress in the enzymatic glycosylation of phenolic compounds. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 35(1), 1-23. <https://doi.org/10.1080/07328303.2015.1137580>
- Yang, L., Ukil, L., Osmani, A., Nahm, F., Davies, J., De Souza, C. P. C., Dou, X., Perez-Balaguer, A., & Osmani, S. A. (2004). Rapid Production of Gene Replacement Constructs and Generation

- of a Green Fluorescent Protein-Tagged Centromeric Marker in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*, 3(5), 1359-1362. <https://doi.org/10.1128/ec.3.5.1359-1362.2004>
- Yang, Q., Gao, Y., Huang, Y., Xu, Q., Luo, X.-M., Liu, J.-L., & Feng, J.-X. (2015). Identification of three important amino acid residues of xylanase AfxynA from *Aspergillus fumigatus* for enzyme activity and formation of xylobiose as the major product. *Process Biochemistry*, 50(4), 571-581. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.01.021>
- Yilmaz, N., Visagie, C. M., Houburken, J., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2014). Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. *Studies in Mycology*, 78, 175. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.08.001>
- Zhang, H., Yohe, T., Huang, L., Entwistle, S., Wu, P., Yang, Z., Busk, P. K., Xu, Y., & Yin, Y. (2018). dbCAN2: A meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W95-W101. <https://doi.org/10.1093/nar/gky418>
- Zhang, M., Chekan, J. R., Dodd, D., Hong, P.-Y., Radlinski, L., Revindran, V., Nair, S. K., Mackie, R. I., & Cann, I. (2014). Xylan utilization in human gut commensal bacteria is orchestrated by unique modular organization of polysaccharide-degrading enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(35), E3708-E3717. <https://doi.org/10.1073/pnas.1406156111>
- Zhang, P., Woen, S., Wang, T., Liao, B., Zhao, S., Chen, C., Yang, Y., Song, Z., Wormald, M. R., Yu, C., & Rudd, P. M. (2016). Challenges of glycosylation analysis and control: An integrated approach to producing optimal and consistent therapeutic drugs. *Drug Discovery Today*, 21(5), 740-765. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.01.006>
- Zhang, T., Sun, Y., Ma, Z., Zhang, J., Lv, B., & Li, C. (2022). Developing iterative and quantified transgenic manipulations of non-conventional filamentous fungus *Talaromyces pinophilus* Li-93. *Biochemical Engineering Journal*, 179, 108317. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108317>
- Zhao, G., Yang, L., Zhong, W., Hu, Y., Tan, Y., Ren, Z., Ban, Q., Yang, C. S., Wang, Y., & Wang, Z. (2022). Polydatin, A Glycoside of Resveratrol, Is Better Than Resveratrol in Alleviating Non-alcoholic Fatty Liver Disease in Mice Fed a High-Fructose Diet. *Frontiers in Nutrition*, 9, 857879. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.857879>
- Zhao, Q., Yang, Z., Xiao, Z., Zhang, Z., Xing, J., Liang, H., Gao, L., Zhao, J., Qu, Y., & Liu, G. (2023). Structure-guided engineering of transcriptional activator XYR1 for inducer-free production of lignocellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei*. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 8(4), 732-740. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2023.11.005>
- Zhao, S., Zhang, G.-L., Chen, C., Yang, Q., Luo, X.-M., Wang, Z.-B., Wu, A.-M., & Feng, J.-X. (2021). A combination of mild chemical pre-treatment and enzymatic hydrolysis efficiently produces xylooligosaccharides from sugarcane bagasse. *Journal of Cleaner Production*, 291, 125972. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.125972>
- Zhao, X., Wang, Q., Wang, T., Su, Y., Huang, C., Lai, C., & Yong, Q. (2024). Evaluation of prebiotic ability of xylo-oligosaccharide fractions with different polymerization degrees from bamboo shoot shells. *Food and Bioprocess Processing*, 143, 202-211. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2023.11.007>

ACTIVIDADES FORMATIVAS DEL PROGRAMA DE DOCTORADO



La autora de esta Tesis Doctoral ha realizado todas las actividades formativas (obligatorias y opcionales) propuestas por el Programa de Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Tal y como se ha ido recogiendo en los informes anuales, Ana Pozo Rodríguez ha impartido dos seminarios sobre su Tesis Doctoral y ha asistido a seminarios de investigación, así como a cursos de especialización científica o técnica. También ha realizado una estancia de 90 días en un centro de investigación extranjero, ha elaborado cuatro publicaciones científicas y ha presentado sus resultados en distintos congresos. Adicionalmente, ha colaborado en tareas docentes en el marco de su contrato de Formación de Profesorado Universitario (FPU) y ha participado en actividades de divulgación.

Publicaciones

- Pozo-Rodríguez A., Méndez-Líter J.A., de Eugenio L.I., Nieto-Domínguez M., Calviño E., Cañada F.J., Santana A.G., Díez J., Asensio J.L., Barriuso J., Prieto A., Martínez M.J. (2022). A Fungal Versatile GH10 Endoxylanase and Its Glycosynthase Variant: Synthesis of Xylooligosaccharides and Glycosides of Bioactive Phenolic Compounds. *International Journal of Molecular Sciences*. 23(3), 1383. doi: 10.3390/ijms23031383.
- Méndez-Líter, J.A., Pozo-Rodríguez, A., Madruga, E., Rubert, M., Santana, A.G., de Eugenio, L.I., Sánchez, C., Martínez, A., Prieto, A., Martínez, M.J. (2022). Glycosylation of epigallocatechin Gallate by engineered glycoside hydrolases from *Talaromyces amestolkiae*: potential Antiproliferative and neuroprotective effect of these molecules. *Antioxidants*, 11(7), 1325. doi: 10.3390/antiox11071325.
- Pozo-Rodríguez A., Méndez-Líter J.A., García-Villalba R., Beltrán D., Calviño E., Santana A.G., de Eugenio L.I., Cañada F.J., Prieto A., Barriuso J., Tomás-Barberán F.A., Martínez M.J. (2022). Synthesis and Characterization of a Novel Resveratrol Xylobioside Obtained Using a Mutagenic Variant of a GH10 Endoxylanase. *Antioxidants*. 12(1), 85. doi: 10.3390/antiox12010085.
- Pozo-Rodríguez, A., Peñalva, M.Á., Barriuso, J., Espeso, E.A. & Martínez, M.J. (2025). Improvement of β -Xylosidase and Endoxylanase Activities in *Talaromyces amestolkiae* by Genetic Manipulation of the Transcriptional Activator XlnR. *Microbial Biotechnology*, 18(5), e70166. doi: 10.1111/1751-7915.70166

Comunicaciones a Congresos

- Ana Pozo-Rodríguez, Juan A. Méndez-Líter, Laura I. de Eugenio, Alicia Prieto, Jorge Barriuso, María Jesús Martínez. *Obtención de una variante glicosintasa a partir de una*

endoxilanasas fúngicas para la síntesis de glicósidos con interés biotecnológico. (28 de junio - 2 de julio de 2021). Comunicación presentada al XXVIII Congreso Nacional de Microbiología, organizado por la Sociedad Española de Microbiología. España, online.

Premiado.

- Ana Pozo-Rodríguez, Juan A. Méndez-Líter, Laura I. de Eugenio, Alicia Prieto, Jorge Barriuso, Andrés González-Santana, Francisco Javier Cañada, María Jesús Martínez. *Síntesis enzimática de glicósidos de ácido rosmarínico y EGCG utilizando una variante glicosintasa de una endoxilanasas del hongo T. amestolkiae*. (25-28 de agosto de 2021). Comunicación presentada al XXV Congreso Latinoamericano de Microbiología. Paraguay, online.
- Juan A. Méndez-Líter, Ana Pozo-Rodríguez, Enrique Madruga, María Rubert, Laura I. de Eugenio, Ana Martínez, Cristina Sánchez, Alicia Prieto, María Jesús Martínez. *Síntesis enzimática de glicósidos de EGCG para potenciar sus propiedades bioactivas*. (3 de junio de 2022). Comunicación oral presentada al VIII Congreso Nacional de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana, organizado por la Sociedad Española de Microbiología. Valencia, España.
- Pozo-Rodríguez, A., Méndez-Líter, JA., de Eugenio LI., Barriuso, J., Prieto, A., Martínez, MJ. *Synthesis of xylooligosaccharides by a fungal GH10 endoxylanase and its glycosynthase variant*. (4-8 de junio de 2023). Comunicación presentada en el 11th World Congress of Chemical Engineering. Buenos Aires, Argentina.
- Pozo-Rodríguez, A., Barriuso, J., Peñalva, M.A., Espeso, E.A., Martínez, M.J. *Development of a transformation method and genetic engineering tools for the fungus Talaromyces amestolkiae*. (17-20 de julio de 2023). Póster presentado en el XVIII Congreso de la Sociedad Española de Biotecnología. Madrid, España.
- Ana Pozo-Rodríguez, Juan A. Méndez-Líter, David Beltrán, Eva Calviño, Laura I. de Eugenio, Francisco Javier Cañada, Alicia Prieto, Jorge Barriuso, Francisco A. Tomás-Barberán, María Jesús Martínez. *Síntesis y caracterización de un nuevo xilobiósido de resveratrol obtenido mediante una variante mutagénica de una endoxilanasas fúngica*. (28 de junio de 2023). Comunicación oral presentada en el XXIX Congreso de la Sociedad Española de Microbiología. Burgos, España. Premiada.
- Pozo-Rodríguez, Ana, Wick, Lukas Y, Martínez, María Jesús, Barriuso, Jorge. *Interacciones en el consorcio microbiano formado por el hongo Ophiostoma piceae y la bacteria Pseudomonas putida*. (10-12 de junio de 2024). Póster presentado en el IX

Congreso Nacional de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana, organizado por la Sociedad Española de Microbiología. Madrid, España.

Estancias de investigación en centros de investigación extranjeros

- 11 de septiembre - 9 de diciembre de 2023. Helmholtz Center for Environmental Research (UFZ), Leipzig, Alemania.

Supervisor: Dr. Lukas Y. Wick, investigador principal del Grupo Bioavailability, Departamento Environmental Microbiology.

Título del proyecto: Estudio microscópico de la degradación de biomasa vegetal por el ascomiceto *Talaromyces amestolkiae* y el papel de las interacciones hongo-bacteria en el proceso.