



CMIBM 2008

VI Reunión del
Grupo de Microbiología Industrial
y Biotecnología Microbiana de la SEM

Barcelona 12-14 noviembre 2008

Libro de resúmenes



COMITÉ ORGANIZADOR

Presidente:

Francisco I. Javier Pastor (Universitat de Barcelona)

Vicepresidenta:

Pilar Diaz (Universitat de Barcelona)

Vocales:

Julio Abalde (Universidade da Coruña)

M^a Enriqueta Arias (Universidad de Alcalá de Henares)

Jorge Barros (Universidad de Santiago de Compostela)

Óscar Gallardo (Universitat de Barcelona)

Tomás González Villa (Universidad de Santiago de Compostela)

Cristina Madrid (Universitat de Barcelona)

José Sancho (Universitat de Barcelona)

Miguel Viñas (Universitat de Barcelona)

COMITÉ CIENTÍFICO

Ricard Guerrero (Presidente de la SEM)

Pilar Diaz (Universitat de Barcelona)

Antonio Juárez (Universitat de Barcelona)

Paloma Liras (Universidad de León)

María Jesús Martínez (CIB-CSIC)

Francisco I. Javier Pastor (Universitat de Barcelona)

Fernando Peláez (Merck, Sharp & Dohme de España S.A.)

Evaristo Suárez (Universidad de Oviedo)

Antonio Ventosa (Universidad de Sevilla)

PATROCINADORES



Sociedad Española de Microbiología



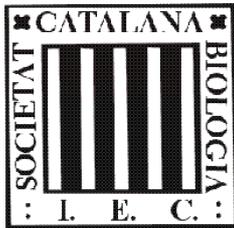
Merck Sharp & Dohme



Institut d'Estudis Catalans



Guserbiot



Societat Catalana de Biologia



Neuron BPh



Universitat de Barcelona

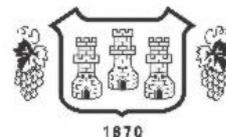


S.G. Servicios Hospitalarios S.L.



Ministerio de Educación y Ciencia

TORRES



Torres

PROGRAMA

Miércoles 12 de Noviembre

15:00-16:00 Entrega de documentación

16:00-16:30 Apertura

16:30-17:20 Conferencia Inaugural

Sustainable enzyme technologies for lignocellulosic biorefineries

Liisa Viikari. Universidad de Helsinki

17:30-19:20 Mesa Redonda 1

Biotecnología de la biomasa

Moderadora: *María Jesús Martínez*. CIB-CSIC, Madrid

- *Retos biotecnológicos en la producción de etanol lignocelulósico*
Pablo Gutiérrez. Abengoa Bioenergía Nuevas Tecnologías
- *Producción de biodiésel a partir de glicerina cruda*
José Luis Adrio. Neuron BPh
- *Producción de biodiésel a partir de biomasa del hongo Mucor circinelloides sin extracción previa de lípidos*
Victoriano Garre, Gemma Vicente. Universidad de Murcia, Universidad Rey Juan Carlos (Madrid)
- *Detoxificación de paja de trigo pretratada mediante steam-explosion para la producción de bioetanol*
Miguel Jurado. CIB-CSIC, Madrid
- *Actividad antimicrobiana en pastas tratadas con sistema lacasa-mediadores naturales*
Amanda Fillat. Universitat Politècnica de Catalunya

19:20-20:00 Visita a paneles

20:00 Cocktail de Bienvenida

Jueves 13 de Noviembre

9:00-10:50 Mesa Redonda 2

Microbiología Industrial de Alimentos

Moderador: Evaristo Suárez. Universidad de Oviedo

- *Producción biotecnológica del compuesto nutracéutico riboflavina*
M^a Angeles Santos. Universidad de Salamanca
- *Potencial probiótico y biotecnológico de bacterias lácticas aisladas de leche materna. Aplicación en la industria alimentaria*
Susana Delgado. Universidad Complutense de Madrid
- *Desarrollo de cultivos lácteos probióticos para su aplicación en sistemas de alimentación acuícola*
Paula Dagá. USC-Avances Bioquímicos Alimentación, S.A. (ABIASA)
- *Búsqueda de genes codificantes de proteasas aspárticas de origen vegetal con actividad coagulante de la leche*
Lucía Feijoo-Siota. Universidad de Santiago de Compostela
- *Phyloproteomics: A new approach to the study of microorganisms of industrial and food importance present in seafood*
Karola Böhme. Universidad de Santiago de Compostela

10:50-11:30 Visita a paneles

11:30-13:20 Mesa Redonda 3

Metabolitos Secundarios en Biotecnología

Moderadora: Paloma Liras. Universidad de León

- *Biosíntesis combinatoria aplicada a la generación de nuevos compuestos antitumorales derivados de la mitramicina*
Carmen Méndez. Universidad de Oviedo
- *Nuevas aproximaciones para el descubrimiento de antibióticos a partir de productos naturales de origen microbiano*
Olga Genilloud. Merck Sharp & Dohme de España

- *Toxinas implicadas en el mecanismo de infección de B. cinerea: Aportación de la genómica al estudio del metabolismo secundario*
Isidro G. Collado. Universidad de Cádiz
- *Control de la biosíntesis de antibióticos en Streptomyces clavuligerus*
Irene Santamarta. INBIOTEC, León
- *Caracterización de la ruta de biosíntesis del inhibidor de la ARN polimerasa estreptolidigina producido por Streptomyces lydicus*
Carlos Olano. Universidad de Oviedo

16:00-17:50 Mesa Redonda 4

Biotecnología Enzimática

Moderadora: Pilar Diaz. Universitat de Barcelona

- *Empleo de lipasas inmovilizadas para la modificación de antioxidantes naturales*
Francisco Plou. Instituto de Catálisis y Petroleoquímica-CSIC, Madrid
- *Decoloración y detoxificación de colorantes textiles de tipo Azo mediante sistemas lacasa-mediador producidos por Streptomyces*
Manuel Hernández. Universidad de Alcalá de Henares
- *Evaluación de celulasas y dominios de unión a celulosa recombinantes en el refinado de pastas TCF de eucalipto*
A. Iulia Chiriac, Edith M. Cadena. Universitat de Barcelona, Universitat Politècnica de Catalunya
- *Producción de la lipasa Lip2 de Candida rugosa en el sistema Pichia pastoris: Caracterización y aplicación en reacciones de síntesis*
Francisco Valero. Universitat Autònoma de Barcelona
- *Degradación enzimática de lípidos de la pared celular vegetal por el sistema lacasa-mediador*
Ana Gutiérrez. IRNAS-CSIC, Sevilla

17:50-18:10 Visita a paneles

18:10-20:00 Mesa Redonda 5

Biotecnología de Microorganismos Extremófilos.

Moderador: Antonio Ventosa. Universidad de Sevilla

- *Enzimas extracelulares producidas por bacterias halófilas*
Cristina Sánchez-Porro. Universidad de Sevilla
- *Sistemas quorum sensing en bacterias halófilas y su uso biotecnológico*
Inmaculada Llamas. Universidad de Granada
- *Ecogenética y aplicaciones de las bacterias magnetotácticas*
Mercedes Berlanga. Universitat de Barcelona
- *Lisina-épsilon-oxidasa, una novedosa proteína antimicrobiana sintetizada por*
Marinomonas mediterranea
Daniel Gómez. Universidad de Murcia
- *La CECT como autoridad internacional de depósito de cepas de*
microorganismos para fines de patente según el tratado de Budapest.
Procedimiento de depósito
José Miguel López-Coronado. Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia

21:30 Cena del Congreso

Viernes 14 de Noviembre

10:00-11:50 Mesa Redonda 6

Microbiología Molecular Industrial

Moderador: Antonio Juárez. Universitat de Barcelona

- *Aspectos actuales de Proteómica de Hongos Filamentosos*
Jesús Manuel Cantoral. Universidad de Cádiz
- *Los sistemas de captación de cationes divalentes y la construcción de*
vacunas contra patógenos bacterianos
Susana Campoy. Universitat Autònoma de Barcelona
- *Secreción al medio de cultivo e inmovilización en la superficie celular de*
antígenos y enzimas mediante fusión traduccional con la proteína de pared celular

Pir4 de *Saccharomyces cerevisiae*

Jesús Zueco. Universitat de València

- *A multi-level approach to the study of heterologous protein production in Pichia pastoris under different oxygen conditions*

Pau Ferrer. Universitat Autònoma de Barcelona

- *Salvando cuellos de botella en la síntesis de pimaricina: sobreexpresión en Streptomyces natalensis del regulador positivo pimM*

Javier Santos-Aberturas. INBIOTEC, León

12:00-12:50 Conferencia de Clausura

La búsqueda de nuevos fármacos a partir de microorganismos: ¿qué hemos aprendido después de 80 años?

Fernando Peláez. Merck Sharp & Dohme de España

12:50-13:30 Clausura

CONFERENCIAS PLENARIAS

- C.I Sustainable enzyme technologies for lignocellulosic biorefineries. L. Viikari.
- C.C La búsqueda de nuevos fármacos a partir de microorganismos: ¿qué hemos aprendido después de 80 años? Fernando Peláez.

MESAS REDONDAS

- M1.1 Retos Biotecnológicos en la Producción de Etanol Lignocelulósico. P. Gutiérrez.
- M1.2 Producción de biodiésel a partir de glicerina cruda. J.L. Adrio.
- M1.3 Producción de biodiésel a partir de biomasa del hongo *Mucor circinelloides* sin extracción previa de lípidos. V. Garre, G. Vicente, R.A. Rodríguez-Frómata, L.F. Bautista, R.M. Ruiz-Vázquez, F.J. Gutiérrez, R. Rodríguez, S-T. Martínez.
- M1.4 Detoxificación de paja de trigo pretatada mediante *steam-explosion* para la producción de bioetanol. M. Jurado, A.T. Martínez, M.J. Martínez.
- M1.5 Actividad antimicrobiana en pastas tratadas con sistemas lacasa-mediadores naturales. A. Fillat, O. Gallardo, T. Vidal, F.I.J. Pastor, P. Díaz, J.F. Colom, M.B. Romero.
- M2.1 Producción biotecnológica del compuesto nutracéutico riboflavina. M.A. Santos, A. Jiménez, J.A. Uña, C. Serrano-Amatriain, C. Vilarriño, P. Lisa-Santamaría, J.L. Revuelta.
- M2.2 Potencial prebiótico y biotecnológico de bacterias lácticas aisladas de leche materna. Aplicación en la industria alimentaria. S. Delgado, R. Martín, F. Lara-Villoslada, L. Fernández, M. Olivares, J.M. Rodríguez.
- M2.3 Desarrollo de cultivos lácteos probióticos para su aplicación en sistemas de alimentación acuícola. P. Dagá, G. Feijoo, M. T. Moreira, A. Guillán, E. Dagá, J. M. Lema.
- M2.4 Búsqueda de genes codificantes de proteasas aspárticas de origen vegetal con actividad coagulante de la leche. L. Feijoo-Siota, L. Blasco, S. Tomé-García, P. Veiga-Crespo, T. de Miguel, T. González Villa.
- M2.5 Phyloproteomics: A new approach to the study of microorganisms of industrial and food importance present in seafood. K. Böhme, J. Barros-Velázquez, J.M. Gallardo, A. Cepeda, P. Calo-Mata, B. Cañas.
- M3.1 Biosíntesis Combinatoria aplicada a la generación de nuevos compuestos antitumorales derivados de la mitramicina. C. Méndez.
- M3.2 Nuevas aproximaciones para el descubrimiento de antibióticos a partir de productos naturales de origen microbiano. O. Genilloud.
- M3.3 Toxinas implicadas en el mecanismo de infección de *B. cinerea*: Aportación de la genómica al estudio del metabolismo secundario. C. Pinedo, J. Ramírez, I.G. Collado, J.M. Cantoral, R. Hernández-Galán.
- M3.4 Control de la biosíntesis de antibióticos en *Streptomyces clavuligerus*. I. Santamarta, M.T. López-García, J.P. Gomez-Escribano, R. Pérez-Redondo, P. Liras.
- M3.5 Caracterización de la ruta de biosíntesis del inhibidor de la ARN polimerasa estreptolidigina producido por *Streptomyces lydicus*. C. Olano, C. Gómez, D.H. Horna, A.F. Braña, C. Mendéz, J.A. Salas.
- M4.1 Empleo de lipasas inmovilizadas para la modificación de antioxidantes naturales. F. Plou, P. Torres, A. Ballesteros.

- M4.2 Decoloración y destoxificación de colorantes textiles de tipo Azo mediante sistemas lacasa-mediador producidos por *Streptomyces*. M. Hernández, R. Moya, A. García, J. Rodríguez, M.I. Pérez, F. Guillén, M.E. Arias.
- M4.3 Evaluación de celulasas y dominios de unión a celulosa recombinantes en el refinado de pastas TCF de eucalipto. A.I. Chiriac, E.M. Cadena, F.I.J. Pastor, T. Vidal, A.L. Torres.
- M4.4 Producción de la lipasa Lip2 de *Candida rugosa* en el sistema *Pichia pastoris*: caracterización y aplicación en reacciones de síntesis. M. Alarcón, M.D. Benaiges, P. Ferrer, F. Valero.
- M4.5 Degradación enzimática de lípidos de la pared celular vegetal por el sistema lacasa-mediador. A. Gutiérrez, S. Molina, J. Rencoret, J.C. del Río, D. Ibarra, A.T. Martínez.
- M5.1 Enzimas extracelulares producidas por bacterias halófilas. C. Sánchez-Porro, E. Mellado, A. Ventosa.
- M5.2 Sistemas *quorum sensing* en bacterias halófilas y su uso biotecnológico. I. Llamas, A. Tahrioui, E. Quesada.
- M5.3 Ecogenética y aplicaciones de las bacterias magnetotácticas. M. Berlanga, R. Guerrero.
- M5.4 Lisina-épsilon-oxidasa, una novedosa proteína antimicrobiana sintetizada por *Marinomonas mediterranea*. D. Gómez, P. Lucas-Elío, F. Solano, A. Sanchez-Amat.
- M5.5 La CECT como autoridad internacional de depósito de cepas de microorganismos para fines de patente según el tratado de Budapest. Procedimiento de depósito. J.M. López-Coronado, L. López-Ocaña, E. Garay.
- M6.1 Aspectos actuales de proteómica de hongos filamentosos. F.J. Fernández-Acero, M. Carbú, C. Garrido, I. Vallejo, J.M. Cantoral.
- M6.2 Los sistemas de captación de cationes divalentes y la construcción de vacunas contra patógenos bacterianos. S. Campoy, M. Llagostera, P. Cortés, J. Aranda, A. Bigas, J. Barbé.
- M6.3 Secreción al medio de cultivo e inmovilización en la superficie celular de antígenos y enzimas mediante fusión traduccional con la proteína de pared celular Pir4 de *Saccharomyces cerevisiae*. J. Zueco, M. Mormeneo, I. Andrés.
- M6.4 A multi-level approach to the study of heterologous protein production in *Pichia pastoris* under different oxygen conditions. K. Baumann, M. Carnicer, I. Töplitz, M. Dragosits, J. Stadlmann, A. Graf, M. Maurer, B. Gasser, F. Altmann, P. Jouhten, H. Maaheimo, F. Sánchez-Ferrando, D. Mattanovich, J. Albiol, P. Ferrer.
- M6.5 Salvando cuellos de botella en la síntesis de pimáricina: sobreexpresión en *Streptomyces natalensis* del regulador positivo *pimM*. J. Santos-Aberturas, S.M. Guerra, C.M. Vicente, T.D. Payero, N. Antón, J.F. Martín, J.F. Aparicio.

PÓSTERS

- P1 ¿Induce el estrés oxidativo la acumulación del carotenoide astaxantina en *Haematococcus pluvialis*?. J. Abalde, C. Rioboo, Ó. González-Barreiro, R. Prado, C. Herrero, Á. Cid.
- P2 Estudio de las condiciones de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* para la producción de poligalacturonasa. J.M. Ageitos, B. Pardo, J.A. Vallejo, M. Poza, T. González Villa.

- P3 Caracterización de los sistemas de captación de zinc y de hierro en *Streptococcus suis*: Potencial antigénico y protector. J. Aranda, M.E. Garrido, P. Cortés, S. Campoy, M. Llagostera, J. Barbé.
- P4 Un método multiplex PCR para la simultánea identificación de especie y tipificación de cepas de *Oenococcus oeni*. M.I. Araque, A. Bordons, C. Reguant.
- P5 Characterization of the probiotic profile of lactic acid bacteria isolated from non-fermented meat and seafood products. S. Arlindo, S.V. Hosseini, I. Fernandez-No, K. Böhme, J. Barros-Velázquez.
- P6 Escalado en la producción de la esterasa de *Ophiostoma piceae* en *Pichia pastoris* y su potencial biotecnológico en la industria papelera. V. Barba, C. Arnau, F. Valero, Á.T. Martínez, M.J. Martínez.
- P7 Efecto de la delección del gen *rpoZ* sobre la biosíntesis de metabolitos secundarios en *Streptomyces coelicolor* A3(2). M. Barriuso-Iglesias, J.F. Martín.
- P8 Heterotalización y haploidización de cepas industriales del género *Saccharomyces*. L. Blasco, S. Tomé-García, L. Feijoo-Siota, P. Veiga-Crespo, T. González Villa.
- P9 Identification and molecular characterization of histamine-producing bacteria in fish by genomic and proteomic analysis. K. Böhme, I. Fernández-No, J.M. Gallardo, J. Barros-Velázquez, B. Cañas, P. Calo-Mata.
- P10 El ácido poli-gamma-glutámico, un compuesto biotecnológico con aplicaciones potenciales en las industrias farmacéuticas, cosméticas y de alimentación. J.J. Bou, L. Hurí, M. Cerdà-Cuéllar.
- P11 Estudio comparativo de la biodegradación de las diferentes formas enantioméricas del ácido γ - y α -poli-gamma-glutámico por *Bacillus licheniformis* NCIMB 11709. J.J. Bou, M.S. Marqués-Calvo, M. Cerdà-Cuéllar.
- P12 Validación de un método rápido de análisis para la cuantificación de parámetros microbiológicos. B. Buján, A. Garrido, G. Marcote, J. Lago, J.M. Vieites, A.G. Cabado.
- P13 Desarrollo de un Método Detección de Residuos de Antibióticos en Productos de la Pesca y Acuicultura. M.J. Chapela, A. Reboreda, J. Lago, J.M. Vieites, A.G. Cabado.
- P14 Efecto de la transformación de “alpeorajo” por *Corioliopsis rigida* en el crecimiento de la rizobacteria fijadora de N_2 *Azospirillum brasiliensis*. R. Díaz, M. Jurado, M.J. Martínez, I. García-Romera, M. Saparrat.
- P15 Características termodinámicas y cinéticas de compuestos naturales y sintéticos utilizados en los sistemas lacasa-mediador. Su aplicación en la transformación de ligninas. M.Á. Falcón, K. González, M.C. Arévalo.
- P16 Screening de bacterias lácticas productoras de β -(1 \rightarrow 3)-glucanos. G. Garai-Ibabe, P. Fernández de Palencia, I. Ibarburu, J. Areizaga, P. Lopez, A. Irastorza, M.T. Dueñas.
- P17 Aislamiento e identificación de microorganismos psicrófilos de muestras de deshielo de la Antártica. S.A. García, A.P. Barba, A. De León.
- P18 Identificación de los microorganismos presentes en el kéfir. C. García-Marzo, J. Ayo, F. Amárita.
- P19 Distribución filogenética y rastreo de lipoxigenasas en microarrays de DNA metagenómico. A. Garreta, M.A. Manresa, S. Pompeia, E. Lemos, M. Busquets.
- P20 Centro para el desarrollo de Bioprocesos. Estudio de las diferentes etapas en el cambio de escala en procesos de fermentación. G. González, A. Casablanco, O. Fernández.

- P21 Inmovilización de una nueva lacasa producida por *Fusarium proliferatum* en oro, carbon vítreo y HOPG. Análisis electroquímico y microscópico. K. González, Y. Gimeno, M.C. Arévalo, M.A. Falcón, A. Hernández.
- P22 Novel antifungal triterpenes from *Colletotrichum acutatum sensu lato*. A. González del Val, J. Collado, G. Harris, S. Galuska, J. Feliz, G. Platas, G. Bills, M.T. Diez, S. Mandala, J. Milligan, P. Liberator, F. Peláez, F. Vicente.
- P23 Detección y cuantificación de bacterias lácticas productoras de β -glucano mediante RTi-PCR. I. Ibarburu, R. Aznar, P. Elizaquível, A. Munduate², Irastorza, M.T. Dueñas.
- P24 *Pichia navarrensis* sp. nov. aislada de raíces de *Allium sativum*. A. Lafraya, L. del Castillo, J. Polaina.
- P25 La CECT, centro de recursos biológicos microbianos al servicio de la Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana. L. López-Ocaña, J.M. López-Coronado, E. Garay.
- P26 Caracterización y análisis funcional de la región que contiene los genes *phoR* y *phoP* en el organismo productor de tacrolimus *Streptomyces sp* ATCC 55098. M. Martínez-Castro, C. Barreiro, J.F. Martín.
- P27 Producción de Ácidos Grasos Trihidroxilados por *Pseudomonas aeruginosa* 42A2. I. Martín, M. Bassas, A. Manresa, J. Llorens.
- P28 Heterologous expression in *Escherichia coli*, optimization of *in vitro* refolding, and enzymatic characterization of an unique lignin peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes cervina*. Y. Miki, M. Morales, F.J. Ruiz-Dueñas, M.J. Martínez, H. Wariishi, A.T. Martínez.
- P29 Regulación de las actividades lacasa, tirosinasa y lisina oxidasa en *Marinomonas mediterranea*. L. Molina-Quintero, I. Córcoles-Sáez, P. Lucas-Elío, A. Sánchez-Amat.
- P30 Caracterización de la actividad lipolítica de la bacteria halófila extrema *Salicola* sp. IC10. M.L. Moreno, M.T. García, A. Ventosa, C. Mateo, J.M. Guisán, E. Mellado.
- P31 Efectos de la expresión en *Saccharomyces cerevisiae* sobre los requerimientos de calcio de la pectato liasa A de *Paenibacillus barcinonensis*. M. Mormeneo, F.I.J. Pastor, J. Zueco.
- P32 Identificación de bacterias lácticas y levaduras de muestras de aceitunas de mesa de Túnez. N.B. Omar, A. Hurtado, N. Rozès, A. Bordons, N. Chammem, M. Hamdi, C. Reguant.
- P33 Identificación, purificación y caracterización de una nueva lipasa de *Pseudomonas* sp. CR-611. P. Panizza, N. Syfantou, P. Diaz.
- P34 Purificación y caracterización bioquímica de la lipasa LipM de *Marinobacter lipolyticus*. D. Pérez, S. Martín, E. Mellado, A. Ventosa, G. Fernández-Lorente, C. Mateo, J.M. Guisán.
- P35 Potencial uso de la microalga marina *Tetraselmis suecica* para la retirada de cadmio. M. Pérez-Rama, E. Torres, C. Suárez, C. Herrero, J. Abalde.
- P36 Producción de un inhibidor de carboxipeptidasa en cultivos de alta densidad celular. J.M. Puertas, G. Caminal, G. González.
- P37 Caracterización genética, selección y control de levaduras vínicas en fermentaciones industriales mediante la aplicación de técnicas moleculares. M.E. Rodríguez, L. Reborditos, M. Molina, J.M. Cantoral.
- P38 Radicales de proteína en la peroxidasa versátil de *Pleurotus eryngii*. F.J. Ruiz-Dueñas, R. Pogni, M. Morales, S. Giansanti, M.J. Mate, A. Romero, M.J. Martínez, R. Basosi, Á.T. Martínez.

- P39 Estrategias alternativas de operación para la producción de enzimas recombinantes en *E.coli*. J. Ruiz, J. Pinsach, G. Álvaro, G. González, C. de Mas, D. Resina, J. López-Santín.
- P40 Descripción de genes implicados en la producción de AHLs en *Halomonas anticariensis* FP35^T, una bacteria halófila de interés industrial. A. Tahrioui, E. Quesada, I. Llamas.
- P41 Clonación de los genes del clúster de lisis del micobacteriófago D29 para su uso como enzibióticos. S. Tomé-García, L. Feijoo-Siota, L. Blasco, P. Veiga-Crespo, T. González Villa.
- P42 Obtención de mutantes negativos para la producción de polihidroxicanoatos. N. Torrego, A. Manresa, P. Diaz.
- P43 Xilanasas XynA de *Paenibacillus barcinonensis*: Clonación, purificación y caracterización. S. Valenzuela, F.I.J. Pastor.
- P44 Estudio y optimización de la producción de quimosina de búfalo en *Pichia pastoris*. J.A. Vallejo, J.M. Ageitos, P. Veiga-Crespo, M. Poza, T.González Villa.
- P45 Utilización de glucanasas como enzibióticos anti-fúngicos. P. Veiga-Crespo, S. Tomé-García, L. Ruíz, M. Viñas, T.González Villa.
- P46 Evolución de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. T. González Villa, P. Veiga-Crespo, L. Ruíz, M. Viñas.

CONFERENCIAS PLENARIAS

Sustainable enzyme technologies for lignocellulosic biorefineries

Liisa Viikari

University of Helsinki

Today, the challenge is to develop new technologies for the increasing demand of products based on renewable lignocellulosic raw materials. An integrated biorefinery is an overall concept where biomass feedstocks are converted into a spectrum of valuable products. The primary objective of an advanced biorefinery is to increase the availability and use of bioenergy and bio-based products by implementing innovative, environmentally sound and cost-effective production technologies for a variety of products. Lignocellulosic raw materials (wood and annual plants) provide an extensive source not only for present fibre products, but also for a large number of intermediates, speciality chemicals and fuels. Biorefineries combine and integrate various technologies, potentially also biotechnological methodologies. Biotechnology offers tools for the improvement of the raw materials, modification of raw material components to more advanced fibre products, composites and polymers, or for the production of biofuels.

Knowledge generated on lignocellulosic enzymes for modification of cellulosic fibres during the last decades is applicable also for these new biorefining areas. The potential enzymes include cellulases, hemicellulases and various oxidative enzymes. These enzymes have already established applications in several industrial sectors; from food to textile and pulp and paper production. Production of fuel ethanol from cellulosic feedstocks is increasingly interesting for environmental, political and economic reasons. In spite of recent developments, the enzymatic conversion technology is still a scientific and technological challenge. In addition to the total hydrolysis of lignocellulosic carbohydrates to sugars for their further conversion to fuels or chemicals, enzymes can be used for upgrading lignocellulosic polymers and components. The target is to develop methods and applications for both large-volume and niche products derived from the main wood polymers, cellulose, hemicelluloses and lignin. These biorefinery approaches would lead to new and advanced processes and technologies for the conversion of forest and agricultural raw materials into high-value added, CO₂-neutral and nature-labelled, biodegradable products.

La búsqueda de nuevos fármacos a partir de microorganismos: ¿qué hemos aprendido después de 80 años?

Fernando Peláez

Centro de Investigación Básica – Merck, Sharp & Dohme de España S.A. Josefa Valcárcel 38, Madrid 28027

El descubrimiento y desarrollo de la penicilina como un fármaco útil en la práctica clínica en las décadas de los años 30 y 40 abrió la puerta a la utilización de microorganismos como fuente de moléculas naturales que en el mejor de los casos podían ser directamente usados como fármacos, o constituir puntos de partida (*leads*) para el desarrollo de derivados sintéticos o semi-sintéticos con potencial para llegar a la clínica. La farmacopea occidental incluye hoy en día un gran número de fármacos con este origen, principalmente en las áreas terapéuticas relativas a enfermedades infecciosas (producidas tanto por bacterias como por hongos), cáncer e inmunosupresión, basados en moléculas descubiertas principalmente en las décadas que van desde 1940 hasta 1980. Algunos de estos fármacos han representado auténticos cambios de paradigma en la práctica clínica y en las expectativas de vida de millones de pacientes, además de constituir oportunidades de mercado de enorme valor para las compañías que los han comercializado (el ejemplo más evidente es el de las estatinas). Sin embargo, y aunque siguen saliendo al mercado ocasionalmente fármacos basados en moléculas naturales de origen microbiano, la mayoría de las grandes compañías farmacéuticas han abandonado sus esfuerzos en la investigación en productos naturales, prefiriendo enfocar sus esfuerzos en el terreno del *lead discovery* en la combinación de *high throughput screening* (HTS) y de mega-librerías de productos de origen sintético. Detrás de la percepción negativa que los productos naturales han adquirido desde la década de los 90 en el seno de la industria existen factores que incluyen desde la percepción de que los extractos complejos habitualmente generados a partir de cultivos microbianos son incompatibles con las modernas técnicas de detección desarrolladas para los sistemas de HTS hasta el concepto de que el tiempo necesario para avanzar desde la detección de un extracto con actividad biológica hasta la identificación del compuesto activo es demasiado largo y los costes demasiado altos para competir con eficacia con el *screening* de grandes colecciones de compuestos sintéticos. A esto se añaden los problemas derivados del re-descubrimiento constante de compuestos conocidos y la falta de sistemas eficientes de des-replicación que permitan evitar invertir esfuerzos en aislar este tipo de compuestos redundantes, así como la creciente falta de interés de la industria en la investigación en nuevos antibióticos, un área tradicionalmente asociada con los productos naturales derivados de microorganismos. Además, la complejidad estructural de muchos de estos metabolitos ha sido percibida como un obstáculo, ya que impone un auténtico desafío para la síntesis química y la derivatización durante los procesos de optimización de *leads*. Aunque algunas de estas críticas están bien fundamentadas, también es cierto que en los últimos años la investigación en productos naturales ha adoptado cambios tecnológicos que permiten encarar los retos que plantea la moderna industria del *drug discovery* con expectativas de éxito. La conferencia describirá algunas de las estrategias que se han utilizado en tiempos recientes y que permiten ser optimista con respecto al futuro de la investigación en productos naturales como fuente de *leads* para el desarrollo de los nuevos fármacos que la sociedad demanda.

MESAS REDONDAS

Retos Biotecnológicos en la Producción de Etanol Lignocelulósico

Pablo Gutiérrez

*Abengoa Bioenergía Nuevas Tecnologías
(pablo.gutierrez@bioenergy.abengoa.com)*

Las tecnologías de producción que desarrolla e implementa Abengoa Bioenergía se agrupan en dos grandes grupos:

- Tecnologías capaces de producir etanol a partir de azúcar y almidón (primera generación).
- Tecnologías capaces de transformar la biomasa lignocelulósica (segunda generación).

Las primeras agrupan a las tecnologías actualmente implementadas a escala industrial y que se caracterizan por ser capaces de transformar materia prima azucarada o amilácea en etanol. El ejemplo más común de tecnología de primera generación es aquella que transforma el almidón de los cereales o el azúcar de la remolacha o de la caña en etanol. Las segundas engloban aquellas tecnologías capaces de transformar la biomasa lignocelulósica en etanol.

De acuerdo a la visión de Abengoa Bioenergía, el único camino para ampliar los objetivos de sustitución de energía primaria en el sector del transporte por energía procedente de biocombustibles, maximizando la producción doméstica de la Unión Europea, es mediante el desarrollo de tecnologías de segunda generación para la producción de bioetanol.

Sin embargo, la utilización de la biomasa lignocelulósica, cuya naturaleza es altamente recalcitrante, hace necesario el desarrollo de procesos capaces de convertirla eficientemente. Abengoa Bioenergía es líder mundial en el desarrollo de tecnología para transformación de biomasa lignocelulósica en etanol tanto mediante procesos termoquímicos como bioquímicos.

La producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica ruta biológica se consigue mediante el fraccionamiento de biomasa en sus componentes principales (celulosa, hemicelulosa y lignina) para la posterior fermentación de los azúcares y valorización del residuo del proceso (lignina).

Actualmente no existe tecnología comercial capaz de transformar eficientemente este tipo de biomasa. Abengoa Bioenergía lidera mundialmente la investigación en este campo habiendo:

- Desarrollado un concepto de proceso,
- Construido una planta piloto capaz de tratar 1 tn/d de biomasa lignocelulósica
- Construido una planta de demostración industrial de 70 tn/d
- Además, estamos diseñando y construyendo una planta industrial con una capacidad de 400 tn/d

Algunas de los retos más importantes, que se tratarán en la presentación, para la optimización de la competitividad, tanto económica como ambiental, de estos procesos son de tipo biológico. Por ejemplo, el desarrollo de mezclas enzimáticas más activas, organismos capaces de degradar la lignina para mejorar la accesibilidad a la biomasa de los enzimas celulósicos, organismos capaces de aprovechar eficientemente los sustratos hemicelulósicos para la síntesis de etanol, desarrollo de microalgas y cianobacterias que capturen el CO₂ producido en la fermentación y/o puedan usarse como materia prima para su transformación en carburantes.

Producción de biodiésel a partir de glicerina cruda

José Luís Adrio

*Unidad Biotecnología Industrial, NEURON BPh. Avda Innovación 1, Edificio BIC 2-211, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, 18100-Armilla, Granada.
jladrio@neuronbp.com*

Diversos subproductos o residuos orgánicos generados a partir de numerosos procesos industriales son susceptibles de ser utilizados como materia prima para la producción de compuestos de mayor valor añadido mediante la utilización de microorganismos y/o enzimas. Dentro de estos subproductos, uno de los más interesantes, es la glicerina cruda procedente de la industria del biodiésel.

La tasa de crecimiento del mercado de biodiésel durante los últimos años se ha realizado a un ritmo por encima del 50% anual, lo que ha generado un incremento similar en la producción de glicerina y la saturación del mercado mundial de este subproducto.

Ante esta situación, el desarrollo de procesos biotecnológicos encaminados a la conversión de la glicerina cruda en productos de alto valor añadido es tanto una “necesidad” como una oportunidad de negocio. Estos procesos podrían incorporarse en plantas de biodiésel ya existentes, o dar lugar a biorefinerías que integren múltiples procesos en un concepto análogo al utilizado para las refinerías las cuáles producen múltiples combustibles y productos a partir del petróleo.

NEURON BPh ha desarrollado un proceso que permite obtener biomasa con un alto contenido en aceites (*single cell oil*) utilizando excedentes de glicerina cruda industrial como única fuente de carbono. Esta biomasa, o los aceites extraídos a partir de la misma, se utilizan como nueva materia prima para la producción de biodiésel mediante un proceso similar al que se realiza a partir de las semillas vegetales.

Producción de biodiésel a partir de biomasa del hongo *Mucor circinelloides* sin extracción previa de lípidos

Victoriano Garre¹, Gemma Vicente², Rosa A. Rodríguez-Frómata¹, Luis Fernando Bautista², Rosa M. Ruiz-Vázquez¹, Francisco Javier Gutiérrez², Rosalía Rodríguez², Santiago-Torres Martínez¹

¹*Departamento de Genética y Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, 30071 Murcia.*

²*Departamento de Tecnología Química y Ambiental, ESCET, Universidad Rey Juan Carlos, 28933 Móstoles, Madrid.*

La disminución de reservas de petróleo y el incremento de su consumo en el futuro hacen necesario el desarrollo de estrategias para la producción de biocombustibles a partir de fuentes renovables. Entre los biocombustibles que se han considerado destacan el bioetanol y el biodiésel. No obstante, el biodiésel ofrece una serie de ventajas frente al bioetanol, siendo las más importantes su mayor estabilidad durante el transporte y almacenamiento, su mayor contenido energético y el hecho de que pueda ser utilizado por los motores actuales. Actualmente, el biodiésel, ésteres metílicos derivados de los ácidos grasos, se obtiene principalmente a partir de aceites vegetales. Aunque ésta representa una fuente adecuada, sobre todo por el reciclaje de aceites usados, no parece la más idónea para la producción de biodiésel a gran escala, por la limitación en la cantidad de aceite disponible para ser convertido en biodiésel. Una fuente alternativa de lípidos susceptibles de ser transformados en biodiésel, y que ha sido muy poco explorada, son los microorganismos. Concretamente, aquéllos que han demostrado una importante capacidad de acumular estos lípidos y, además, pueden manipularse genéticamente para mejorar u optimizar su acumulación. Basándose en esta idea, el Departamento de Energía de los Estados Unidos (DOE) lleva ya algún tiempo financiando distintos programas, entre lo que se encuentra “Genomics to Life”, que se dedica a secuenciar genomas de organismos que pudieran ser importantes en la producción de biocarburantes. Dentro de este programa, el DOE ha seleccionado al hongo *Mucor circinelloides*.

En la comunicación que se presenta hemos desarrollado una estrategia para producir biodiésel de alta calidad en un solo paso, realizando la transformación directa de los lípidos presentes en el micelio de *M. circinelloides* sin previa extracción de los mismos. En la producción se utilizó micelio procedente de cultivos del hongo crecidos en glucosa y con una concentración en lípidos totales del 23%, obteniéndose un rendimiento de biodiésel del 18% con respecto al peso seco del micelio. Este biodiésel tiene una pureza del 99%, siendo la concentración de todos los contaminantes analizados inferior a los máximos establecidos por las normativas europeas y americanas.

La disponibilidad de la secuencia del genoma de *Mucor*, y de herramientas para su manipulación genética, permitirán generar en el futuro estirpes que acumulen mayores cantidades de lípidos y que crezcan sobre residuos agrícolas o industriales.

Detoxificación de paja de trigo pretratada mediante *steam-explosion* para la producción de bioetanol

Miguel Jurado, Ángel T. Martínez y María Jesús Martínez

CIB, CSIC. C/ Ramiro de Maeztu, 9. 28040 Madrid (mjmartinez@cib.csic.es)

La producción de bioetanol a partir de material lignocelulósico implica la hidrólisis enzimática de la celulosa hasta glucosa, y la fermentación de la glucosa hasta etanol por parte de las levaduras. La complejidad estructural del material lignocelulósico, en el que los polímeros de carbohidratos (celulosa y hemicelulosa) se encuentran unidos a la lignina, dificulta la hidrólisis enzimática por inaccesibilidad de las celulasas a la celulosa. El método conocido como *steam-explosion* consiste en la aplicación de presión y altas temperaturas, en presencia de agua o ácido sulfúrico diluido, sobre la biomasa lignocelulósica. La aplicación de este pretratamiento altera la estructura de la lignina principalmente y favorece en gran medida la hidrólisis enzimática de la celulosa. Sin embargo, durante este proceso se ha descrito la generación de inhibidores, entre los que se encuentra el furfural, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos.

Las lacasas son oxidorreductasas, secretadas por una gran cantidad de basidiomicetos, que en presencia de oxígeno catalizan la oxidación de compuestos fenólicos a sus correspondientes radicales con producción de agua.

El objetivo de este trabajo fue examinar los efectos de las lacasas fúngicas de *Coriolopsis rigida* y *Trametes versicolor* en la detoxificación de la paja de trigo pretratada mediante *steam-explosion* (en agua o ácido sulfúrico), analizando su efecto sobre la reducción de fenoles, el crecimiento de la levadura y la producción de bioetanol.

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con lacasas reduce el contenido en compuesto fenólicos de la paja de trigo pretratada mediante *steam-explosion* en un 75 %, debido a la polimerización de los radicales producidos por la enzima. Los experimentos de fermentación mostraron un mayor crecimiento de las levaduras y consumo de glucosa en las muestras detoxificadas, así como un notable incremento en la producción de bioetanol (un 170 % en la paja impregnada en agua y un 100 % en la paja impregnada con ácido sulfúrico, aproximadamente).

Actividad antimicrobiana en pastas tratadas con sistema lacasa-mediadores naturales

**Amanda Fillat¹, Óscar Gallardo², Teresa Vidal¹, Francisco I. J. Pastor²,
Pilar Díaz², Josep F. Colom¹, M. Blanca Roncero¹**

¹*Universitat Politècnica de Catalunya, Departamento de Ingeniería Textil y Papelera, Colom 11, 08222 Terrassa. Spain. tvidal@etp.upc.edu*

²*Universitat de Barcelona, Departamento de Microbiología, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona. Spain.*

En los últimos años, las lacasas han sido ampliamente estudiadas como promotoras de la oxidación de lignina en presencia de mediadores no fenólicos, y el llamado sistema lacasa mediador (LMS) es el sistema enzimático más prometedor en el blanqueo de pastas. Por otra parte, existe una preocupación creciente en la búsqueda de nuevos mediadores como alternativa a los sintéticos, más económicos y fácilmente disponibles para la industria pastera y papelera, como son los fenoles naturales. Además, estudios recientes han sido focalizados hacia una nueva estrategia de uso del LMS para biomodificación de fibras ligninocelulósicas con objetivo de conferirles nuevas propiedades.

El presente estudio se centra en la aplicación del sistema lacasa-mediador a una pasta no maderera: lino (*Linum usitatissimum*), utilizada en la producción de productos con alto valor añadido (papeles especiales). Esta pasta, se trató con lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* (PcL) y tres mediadores naturales (siringaldehído –SA-, acetosiringona –AS- y ácido p-cumárico –PCA-) para modificar las fibras lignocelulósicas (etapa L). Cada uno de ellos se comparó en términos de número kappa (estimación del contenido en lignina) con el mediador sintético 1-hidroxibenzotriazol (HBT), cuyo potencial para blanquear diferentes tipos de pastas ha sido confirmado en numerosos estudios.

Tras la etapa L, los mediadores PCA y SA determinaron un incremento del número kappa. Este incremento se debe probablemente a una condensación parcial de radicales fenoxi en la pasta. Posteriormente, se realizó una extracción con acetona para evaluar la tendencia de estos radicales a condensar en la pasta. Después de este lavado, se observó una disminución del número kappa en todos los tratamientos enzimáticos. Sin embargo, tanto el SA como el PCA todavía mostraron un índice kappa superior al control, indicando que efectivamente tiene lugar una condensación de radicales en las fibras.

Para aprovechar la tendencia de algunos mediadores naturales a acoplarse a las fibras, se llevó a cabo un método estándar para determinar la actividad antimicrobiana en el papel. Se realizó un experimento con pasta tratada solo con lacasa y pastas sometidas al sistema lacasa-mediador natural. El control causó una reducción de las UFC del 40% después de 1 hora de contacto, no obstante las pastas tratadas determinaron una eliminación completa de los organismos viables después del mismo tiempo. Esto sugiere que los mediadores naturales estudiados actúan como agentes antimicrobianos en las pastas.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por dos proyectos del MICINN: ENZPULP (CTQ2005-08925-C02-01/PPQ), y TECHFIBER (CTQ2007-68003-C02-01), y un proyecto europeo integrado en el Sexto Programa Marco: BIORENEW (NMP2-CT-2006-026456) y una beca UPC recerca.

Los autores agradecen a CELESA (Tortosa, España) por suministrar la materia prima y al INRA (Marseille, Francia) por proporcionar la lacasa.

Producción biotecnológica del compuesto nutracéutico riboflavina

M^a Ángeles Santos, Alberto Jiménez, José Antonio Uña, Cristina Serrano-Amatriain, Cristina Vilariño, Patricia Lisa-Santamaría y José Luis Revuelta

*Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca/Instituto de Microbiología Bioquímica, CSIC
Campus Unamuno, 37007 Salamanca
gmail@gugu.usal.es*

El conocimiento sobre la importancia de la nutrición en la salud ha cambiado las tendencias mundiales de la alimentación en las dos últimas décadas, ya que se ha generado un interés acentuado de los consumidores hacia aquellos alimentos nutracéuticos, es decir, alimentos que además de su valor nutritivo aportan beneficios a las funciones fisiológicas del organismo humano. Entre los compuestos nutracéuticos se encuentra la riboflavina o vitamina B₂, esencial para la célula por participar en procesos metabólicos básicos. Adicionalmente, actúa como agente antioxidante previniendo el daño oxidativo de proteínas, rotura de las hebras del DNA, parada de ciclo celular, e inactivación de genes esenciales en la respuesta a estrés celular y apoptosis. Estas propiedades con efectos preventivos en la salud humana han determinado que la demanda mundial de riboflavina se haya disparado en las últimas décadas, pasando de un consumo anual de 2000 toneladas en los años 80 a 4000 toneladas en los últimos años.

Las fuentes naturales de riboflavina son las plantas y los microorganismos, puesto que son los únicos organismos en la naturaleza con la capacidad de realizar su biosíntesis, siendo para el resto de organismos un micronutriente que han ingerir en su dieta. Durante décadas la producción de riboflavina se realizó exclusivamente mediante síntesis química, pero el desarrollo de procesos fermentativos basados en el uso de algunos microorganismos supuso una atractiva alternativa. Aunque estos procesos iniciados a principios de los años 90 sólo generaban el 5% de la producción anual, actualmente los procesos biotecnológicos son responsables de más del 80% de la producción mundial de riboflavina. Este espectacular incremento es consecuencia, principalmente, del conocimiento de las características genéticas y metabólicas de los organismos empleados que han conducido al desarrollo de cepas con mejores capacidades de producción.

Aquí nosotros presentamos las diferentes estrategias empleadas en la identificación de genes que directa o indirectamente están relacionados con la producción de riboflavina en el hemiascomicete *Ashbya gossypii*, uno de los primeros organismos empleado por la industria en la producción de riboflavina y que constituye un buen ejemplo de una historia acertada en la que un proceso de síntesis química bien establecido en una factoría es sustituido por un proceso biotecnológico. En particular presentaremos la identificación de uno de los genes implicado en la regulación de ruta metabólica que suministra el sustrato a partir del cual se inicia la biosíntesis de riboflavina y como a través de la caracterización de ese gen ha sido posible diseñar modificaciones genéticas que han llevado a la obtención de cepas de *A. gossypii* con niveles de producción de riboflavina muy superiores a los de la cepa silvestre.

Potencial probiótico y biotecnológico de bacterias lácticas aisladas de leche materna. Aplicación en la industria alimentaria

Susana Delgado, Rocío Martín, Federico Lara-Villoslada, Leónides Fernández, Mónica Olivares y Juan Miguel Rodríguez

*Dpt. Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos,
Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid. jmrodrig@vet.ucm.es
Puleva Biotech, 18004 Granada*

Recientemente se ha observado que la leche humana es portadora de bacterias que juegan un papel importante en la colonización intestinal del neonato y que podrían ser responsables de algunos de los efectos beneficiosos de la leche materna. En una colaboración entre la UCM y Puleva Biotech se ha realizado un estudio exhaustivo de la microbiota de la leche de mujeres sanas con la finalidad de explorar nuevas fuentes de microorganismos probióticos para la industria alimentaria. Como resultado se ha obtenido una valiosa colección de bacterias lácticas procedentes de la leche humana. A través de un meticuloso proceso de selección se ha evaluado el potencial probiótico de estos aislados siguiendo las recomendaciones de la FAO/WHO. Se han estudiado diversas propiedades probióticas utilizando criterios funcionales y de seguridad, inicialmente mediante ensayos *in vitro* y posteriormente en animales de experimentación, que se están confirmando finalmente mediante ensayos clínicos en humanos. El resultado ha sido la selección de cinco cepas de lactobacilos (*Lactobacillus salivarius* CECT 5713, *Lactobacillus fermentum* CECT 5716, *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711, *Lactobacillus gasseri* CECT 5714 y *L. gasseri* CECT 5715) que se han patentado bajo el nombre de Hereditum® y que comercializa Puleva Biotech. Los últimos estudios realizados en mujeres lactantes con mastitis han mostrado que la administración de estas cepas probióticas por vía oral conduce a la curación o a una mejora notable de la sintomatología y a la reducción de la concentración en leche de los estafilococos causales en mujeres en las que había fracasado la antibioterapia. Los resultados obtenidos aportan nuevas perspectivas al uso de estos probióticos no sólo en nutrición infantil, sino también en mujeres embarazadas o lactantes y como tratamiento alternativo o complementario a la antibioterapia en procesos infecciosos caracterizados por una disbiosis microbiana.

Desarrollo de cultivos lácteos probióticos para su aplicación en sistemas de alimentación acuícola

P. Dagá¹, G. Feijoo¹, M. T. Moreira¹, A. Guillán², E. Dagá² y J. M. Lema¹

¹*Grupo de Ingeniería Ambiental y Bioprocesos. Departamento de Ingeniería Química. ETSE. Universidad de Santiago de Compostela. España. paula.daga@usc.es*

²*Departamento de I+D. Avances Bioquímicos Alimentación, S.A. (ABIASA). Tui (Pontevedra). España.*

La acuicultura es uno de los sectores de producción alimentaria con mayor desarrollo económico, con un crecimiento anual del 10% desde 1984, en comparación con la producción ganadera (3%) y la pesca extractiva (1.6%). Los brotes de enfermedades limitan significativamente la producción acuícola y afectan gravemente al desarrollo del sector. Los probióticos constituyen una excelente alternativa a la vacunación y uso de antibióticos en acuicultura para el control de enfermedades de las especies cultivadas. El término probiótico aplicado a la acuicultura se define como: “microorganismo vivo que tiene un efecto beneficioso sobre el hospedador modificando la comunidad microbiana relacionada con él ó con el ambiente en el que se desarrolla”. El efecto probiótico se puede manifestar con una mejora del valor nutricional del alimento, como respuesta del hospedador a las enfermedades y a través de la calidad del ambiente de crecimiento.

El objetivo de este trabajo es el desarrollo de combinaciones de cultivos probióticos óptimas para su aplicación en sistemas de alimentación acuícola.

Los microorganismos que se emplearon en el estudio son 11 cepas de la colección de ABIASA, preseleccionadas por sus excelentes características tecnológicas. Se realizó una selección de estas cepas en función de su capacidad de producción de bactericinas (efecto antimicrobiano) e inhibición de crecimiento mediante técnicas de difusión agar y cinéticas de crecimiento. Una vez hecha la selección de las cepas que presentan las características más adecuadas, se evaluó la capacidad de desarrollo y adaptación de las cepas a las condiciones de operación correspondientes a los sistemas acuícolas.

Búsqueda de genes codificantes de proteasas aspárticas de origen vegetal con actividad coagulante de la leche

Lucía Feijoo-Siota, Lucía Blasco, Sara Tomé-García, Patricia Veiga-Crespo, Trinidad de Miguel, Tomás G. Villa

Universidad de Santiago de Compostela. Dpto. Microbiología. Fac. Farmacia-Campus Sur s/n, 15782. lucia.feijoo@usc.es

Se definen como coagulantes de la leche (BOE 49/1996) a las preparaciones de proteasas de origen animal, vegetal o microbiano capaces de provocar la desestabilización de la micela de caseína con formación de un gel lácteo en las condiciones habituales de elaboración del queso. La mayoría de los enzimas utilizados en la coagulación de quesos pertenecen concretamente al grupo de las proteasas aspárticas (EC 3.4.23).

Los quesos elaborados con coagulantes de origen vegetal presentan aromas, sabores y texturas novedosas, totalmente diferentes a los elaborados en las mismas condiciones con coagulantes animales o microbianos. Hoy en día pueden encontrarse quesos elaborados con coagulantes vegetales en países Mediterráneos, oeste de África y sur de Europa, siendo especialmente conocidos los quesos elaborados con flores secas de cardos del género *Cynara cardunculus*.

En nuestro laboratorio estamos buscando fuentes alternativas de enzimas coagulantes de leche procedentes de especies vegetales para su aplicación en la industria láctea.

Entre las especies objeto de estudio se encuentra *Galium verum*: planta herbácea perteneciente a la familia de las Rubiáceas. Existen un gran número de referencias sobre el uso de esta especie vegetal en la fabricación de quesos en Galicia en tiempos pasados, aunque en la actualidad se ha perdido esta tradición tecnológica. A pesar de que su nombre científico hace referencia a su capacidad coagulante (en griego gala, galaktos significa leche) y entre los nombres vulgares por los que es conocida figura el de cuajaleches, no existe ningún estudio de las proteasas responsables de esta actividad.

En el presente trabajo se inició el estudio de la actividad coagulante de extractos de *Galium verum* así como de los posibles genes codificantes de proteasas aspárticas. Este último objetivo se consiguió mediante la técnica RT-PCR utilizando oligonucleótidos degenerados diseñados en base a dominios conservados de diferentes proteasas aspárticas de origen vegetal. Esto nos permitió obtener una secuencia parcial de cDNA a partir de la cual se diseñaron oligonucleótidos específicos para realizar una RACE PCR, obteniéndose así la secuencia completa de cDNA que codifica para una proteasa aspártica de *Galium verum*.

Phyloproteomics: A new approach to the study of microorganisms of industrial and food importance present in seafood

Karola Böhme¹, J. Barros-Velázquez¹, J.M. Gallardo², A. Cepeda¹, P. Calo-Mata¹ and B. Cañas³

¹*Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, School of Veterinary Sciences/College of Biotechnology, University of Santiago de Compostela, Rúa Carballo Calero s/n, Campus Universitario Norte, E-27002 Lugo, Spain; and*

²*Department of Food Technology, Institute for Marine Research (IIM-CSIC), Higher Council for Scientific Research, C/ Eduardo Cabello 6, E-36208 Vigo, Spain; and*

³*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University Complutense of Madrid, Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid, Spain;
e-mail jbarros@lugo.usc.es*

Seafood spoilage is an area of global concern and is caused by bacteria, enzymes and chemical action, whereas microorganisms are the major cause of spoilage of most seafood products. Spoilage microorganisms produce off-flavour and discoloration, resulting in high economic losses in the sector of fishing and aquaculture. Also, the presence of pathogenic microorganisms in the above mentioned seafood is of global concern and should be avoided. This work is aimed at the application of proteomic tools for the rapid identification of the main seafood-borne spoilage and pathogenic bacteria as a method to ensure seafood quality and safety. In the study matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) of low molecular weight proteins, extracted from intact bacterial cells by a very fast procedure, was considered to obtain highly specific mass spectral fingerprints. Spectra obtained by MALDI-TOF MS were compared and genus-specific as well as species-specific biomarkers were identified. For phyloproteomic analysis a binary table was constructed that indicates presence or absence of a peak. Based on this table, phyloproteomic relationships among the spectra were inferred using Neighbor-joining methods, including bootstrapping and consensus trees. On the other hand a database with sequences of an approximately 800 bp fragment of the 16S rRNA gene was generated using the universal bacterial primer pair p8FPL/p806R. Phylogenetic classification of the different strains and species based on the proteomic approach was compared with the results obtained with genomic analysis, finding a similar classification using both technologies. This work opens the way to the use of proteomic tools as robust and sensitive molecular methods for the rapid identification of pathogenic and spoilage bacteria potentially present in seafood.

Biosíntesis Combinatoria aplicada a la generación de nuevos compuestos antitumorales derivados de la mitramicina

Carmen Méndez

Departamento de Biología Funcional (Área de Microbiología) e Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (I.U.O.P.A.). Universidad de Oviedo. c/ Julián Clavería. s/n. 33006. Oviedo

Los actinomicetos constituyen el grupo de bacterias más importante como productores de compuestos antitumorales. Aunque en la actualidad existe un gran número de compuestos antitumorales que pueden ser utilizados en tratamientos quimioterápicos sin embargo, sigue existiendo demanda de nuevos compuestos antitumorales que sean más efectivos, activos frente a tipos de cáncer para los que no existe tratamientos efectivos o que posean menos efectos secundarios. La clonación y caracterización de agrupaciones de genes implicadas en la biosíntesis de compuestos antitumorales producidas por microorganismos y el desarrollo de la Ingeniería genética aplicada a estos microorganismos productores, ha abierto la posibilidad de aplicar esta metodología para generar nuevos compuestos antitumorales. Esto es lo que se ha venido en llamar Biosíntesis Combinatoria.

La mitramicina es un antibiótico antitumoral perteneciente al grupo del ácido aureólico, al que también pertenecen otros compuestos como la cromomicina A₃ y la olivomicina. La mitramicina posee aplicación clínica para el tratamiento de procesos de hipercalcemia en pacientes con metástasis en los huesos, en la enfermedad de Paget y en diversos tipos de cáncer incluyendo carcinoma testicular, leucemia mieloide crónica y leucemia mieloide aguda. Su modo de acción implica la interacción, de forma no intercalativa, con regiones ricas en G/C en los surcos menores del ADN, en presencia de Mg²⁺, inhibiendo la replicación y la transcripción celular. Desde el punto de vista estructural, la mitramicina consta de un aglicón tricíclico con una cadena lateral y de dos cadenas sacarídicas, un trisacárido de D-olivosa-D-oliosa-D-micarosa y un disacárido de D-olivosa-D-olivosa, unidos a las posiciones C-2 y C-6 del aglicón respectivamente. En nuestro laboratorio, se ha clonado y caracterizado la agrupación de genes de biosíntesis de mitramicina a partir del microorganismo productor *Streptomyces argillaceus* ATCC 12956, así como la del compuesto relacionado, cromomicina A₃, a partir del productor *S. griseus subsp. griseus*. La caracterización de estas agrupaciones génicas ha permitido el establecimiento de las rutas de biosíntesis de estos compuestos y la generación de nuevos compuestos antitumorales por Biosíntesis Combinatoria. En esta comunicación se presentará la generación de nuevos derivados de estos compuestos antitumorales, con modificaciones que afectan distintas partes de las moléculas, utilizando para ello distintas estrategias de Biosíntesis Combinatoria.

Nuevas aproximaciones para el descubrimiento de antibióticos a partir de productos naturales de origen microbiano

Olga Genilloud

*Centro de Investigación Básica, Merck Sharp and Dohme de España,
Josefa Valcárcel 38, 28027 Madrid, olga_genilloud@merck.com*

La búsqueda de nuevos antibióticos a partir de productos naturales ha sido durante décadas uno de los programas más intensivos en la industria farmacéutica. No obstante recientemente, dada la dificultad para descubrir nuevas entidades químicas con nuevos modos de acción así como el corto periodo de vida de cualquier nuevo compuesto ante la aparición de resistencias, dicha actividad ha ido paulatinamente desapareciendo de los programas de investigación de la mayoría de las grandes compañías.

El screening de productos naturales llevado a cabo en nuestro grupo en los últimos años se ha enfocado en el desarrollo de una serie de aproximaciones alternativas y diferenciadoras para cada una de las etapas clave del proceso que permitieran aumentar las posibilidades de éxito en el descubrimiento de nuevas moléculas. En este sentido destacan la implantación de herramientas moleculares para garantizar la selección de nuevas cepas, condiciones miniaturizadas de fermentación permitiendo el estudio de una amplia variedad de condiciones de cultivo y expresión metabólica, detección temprana de compuestos conocidos por LC/MS y análisis metabolómico de los extractos con actividad antimicrobiana, así como una posterior caracterización del modo de acción mediante utilización de plataformas de ensayo basados en la utilización de cepas sensibilizadas por RNAs antisense frente a dianas específicas. Finalmente se comentará en que medida dichas actividades han impactado positivamente en el descubrimiento de nuevas moléculas con potencial interés para su posterior desarrollo.

Toxinas implicadas en el mecanismo de infección de *B. cinerea*: Aportación de la genómica al estudio del metabolismo secundario

Cristina Pinedo¹, Jacinto Ramírez¹, Isidro G. Collado¹, Jesús Manuel Cantoral² y Rosario Hernández-Galán¹.

¹*Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz, Campus Universitario de Puerto Real, Polígono Río San Pedro s/n, 11510 Puerto Real, Cádiz. isidro.gonzalez@uca.es* ²*Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales. 11510 Puerto Real (Cádiz).*

Como parte de nuestro trabajo en el diseño biosintético de fungicidas contra el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*, hemos abordado el estudio de las toxinas (factores de virulencia), producidas por este hongo e implicados en su mecanismo de infección. *B. cinerea* utiliza en su proceso de infección dos familias de toxinas. Una de estas familias posee esqueleto sesquiterpénico, denominada botridial (1), mientras que la otra presenta un esqueleto policétido, al que inicialmente se le asignó una estructura de nonanolactona, denominándola botcinolida (2), y que posteriormente ha sido revisada al esqueleto de botcinina (3).

El conocimiento reciente del genoma de *B. cinerea*, nos ha brindado la oportunidad de investigar y conocer el “cluster” de genes implicados en la biosíntesis de estos factores de virulencia. En colaboración con el grupo de la Dra. Viaud en el INRA de Versalles (Francia), hemos determinado y caracterizado las dos enzimas responsables de la biosíntesis de las dos toxinas indicadas anteriormente. El estudio ha puesto de manifiesto, por primera vez, un mecanismo de producción de toxinas muy versátil, mostrando ambas un efecto sinérgico mediante un sistema de señalización y regulación desconocido hasta el momento. Así, los mutantes a los que se les había anulado el gen que codificaba para la sesquiterpeno ciclasa, responsable de la biosíntesis de (1), sobre-expresaron los genes implicados en la producción de ácido botcinico y derivados, botcininas (3). De esta forma hemos obtenido cepas superproductoras en esta segunda toxina. Estos resultados nos han permitido profundizar en la caracterización, biosíntesis y síntesis de esta segunda toxina de *B. cinerea*.

Control de la biosíntesis de antibióticos en *Streptomyces clavuligerus*

Irene Santamarta, M. Teresa López-García, J.P. Gomez-Escribano, Rosario Pérez-Redondo y Paloma Liras

*Instituto de Biotecnología de León INBIOTEC. Parque Científico de León.
Avda. Real, 1. 24006. León. España. isanh@unileon.es*

Streptomyces clavuligerus es un actinomiceto productor de una variedad de metabolitos secundarios con diferentes actividades biológicas. Entre ellos se encuentran el ácido clavulánico, con actividad inhibidora de beta-lactamasas, el antibiótico beta-lactámico cefamicina C y varios compuestos de estructura clavama con actividades antifúngicas y antitumorales.

Es de especial interés para la industria farmacéutica el ácido clavulánico, inhibidor enzimático de amplio espectro de beta-lactamasas producidas por bacterias Gram positivas y Gram negativas. De baja actividad bactericida intrínseca, el ácido clavulánico se suministra clínicamente combinado con amoxicilina o ticarcilina en el tratamiento de diversas infecciones bacterianas.

La producción de ácido clavulánico en *S. clavuligerus* está estrechamente relacionada con la biosíntesis de cefamicina C y clavamas, conteniendo todos en su estructura el característico anillo beta-lactámico de cuatro miembros. Las clavamas difieren del ácido clavulánico en su estereoquímica tipo S, ligándose esta característica a su carencia de actividad inhibidora de beta-lactamasas, aparentemente relacionada con la estereoquímica del ácido clavulánico, de tipo R.

S. clavuligerus produce además holomicina, un metabolito secundario de estructura completamente diferente y no relacionada con las anteriores; con un puente disulfuro en su molécula, la holomicina presenta actividades antibiótica, antitumoral y antifúngica. Una compleja red de mecanismos reguladores controla la biosíntesis de esta variedad de compuestos naturales. En ella se incluyen factores de regulación pleiotrópicos y específicos de ruta biosintética que modulan la expresión génica, así como moléculas señal dependientes de la fisiología celular. *S. clavuligerus* posee además un sistema de respuesta a condiciones restrictivas nutricionales relacionado a su vez con la diferenciación morfológica y el inicio del metabolismo secundario.

Fuente A de la, Lorenzana LM, Martín JF, Liras P. 2002. Mutants of *Streptomyces clavuligerus* with disruptions in different genes for clavulanic acid biosynthesis produce large amounts of holomycin: possible cross-regulation of two unrelated secondary metabolic pathways. *J Bacteriol* 184: 6559–6565.

Gomez-Escribano JP, Liras P, Pisabarro A, Martín JF. 2006. An *rplK*^{Δ29-PALG-32} mutation leads to reduced expression of the regulatory genes *ccaR* and *claR* and very low transcription of the *ceaS2* gene for clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Mol Microbiol* 61: 758–770.

Liras P, Gomez-Escribano JP, Santamarta I. 2008. Regulatory mechanisms controlling antibiotic production in *Streptomyces clavuligerus*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35: 667–676.

Santamarta I, López-García MT, Pérez-Redondo R, Koekman B, Martín JF, Liras P. 2007. Connecting primary and secondary metabolism: AreB, an IclR-like protein, binds the ARE*ccaR* sequence of *S. clavuligerus* and modulates leucine biosynthesis and cephamycin C and clavulanic acid production. *Mol Microbiol* 66: 511–524.

Santamarta I, Pérez-Redondo R, Lorenzana LM, Martín JF, Liras P. 2005. Different proteins bind to the butyrolactone receptor protein ARE sequence located upstream of the regulatory *ccaR* gene of *Streptomyces clavuligerus*. *Mol Microbiol* 56: 824–835.

Caracterización de la ruta de biosíntesis del inhibidor de la ARN polimerasa estreptolidigina producido por *Streptomyces lydicus*

Carlos Olano, Cristina Gómez, Dina H. Horna, Alfredo F. Braña, Carmen Mendez y José A. Salas

Departamento de Biología Funcional e Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (I.U.O.P.A), Universidad de Oviedo, 33006 Oviedo

El antibiótico estreptolidigina pertenece al grupo de los ácidos tetrámicos, compuestos que poseen actividad frente a bacterias Gram-positivas ejerciendo su actividad antibiótica por inhibición de la ARN polimerasa bacteriana. Siendo ineficaz frente a la ARN polimerasa eucariota. Estructuralmente son compuestos policetídicos, sintetizados por la acción de policétido sintetasas modulares (PCS), que poseen en su estructura una unidad de ácido tetrámico, originado por la ciclación de un aminoácido introducido por una peptid sintetasa no ribosómica (NRPS). Además algunos compuestos presentan residuos glicosídicos, como es el caso de la estreptolidigina. La ruta biosintética de estreptolidigina ha sido localizada en una región de 80894 pb aislada a partir de una genoteca de ADN cromosómico del microorganismo productor *Streptomyces lydicus* NRRL2433. La secuenciación de esta región ha permitido identificar 39 genes de los cuales a 29 se les pueden adscribir funciones implicadas en la biosíntesis del antibiótico, codificando para enzimas implicados directamente en la biosíntesis del compuesto, en el aporte de precursores para la biosíntesis de estreptolidigina, en procesos de regulación de la ruta y en procesos de transporte de la molécula.

Empleo de lipasas inmovilizadas para la modificación de antioxidantes naturales

Francisco J. Plou, Pamela Torres y Antonio Ballesteros

Departamento de Biocatálisis, Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC, Marie Curie 2, 28049 Madrid (fplou@icp.csic.es)

Además de su importante papel en la conservación de los alimentos, los antioxidantes tienen una función relevante en la protección de nuestro organismo frente al estrés oxidativo, preservando estructuras biológicas sensibles, como DNA o membranas celulares. Así, pueden disminuir la incidencia de determinadas enfermedades degenerativas como el cáncer, enfermedades cardíacas, esclerosis múltiple y otras enfermedades autoinmunes. El principal problema de ciertos antioxidantes naturales radica en su baja estabilidad. Una de las aproximaciones que se ha utilizado para aumentar la estabilidad de un antioxidante es la introducción de una cadena lipofílica, lo que permite modular la biodisponibilidad, reducir la fotodestrucción, disminuir los problemas de irritación y aumentar la vida media.

Para llevar a cabo estas reacciones de acilación una de las alternativas más prometedoras es utilizar enzimas de la familia de las esterasas, fundamentalmente lipasas (EC 3.1.1.3). La producción a gran escala de antioxidantes “semisintéticos” obtenidos por vía enzimática puede verse favorecida si se inmoviliza la enzima en un soporte sólido. Este proceso facilita la separación del biocatalizador del medio con la consiguiente parada de la reacción, su reutilización y, en algunos casos, un aumento de su estabilidad operacional.

En nuestro trabajo hemos investigado la acilación enzimática de dos antioxidantes fenólicos. La vitamina E es un compuesto liposoluble presente de manera natural en una gran cantidad de alimentos; su función biológica es proteger de la oxidación a las grasas insaturadas y fosfolípidos de la membrana. En la actualidad se extrae de las semillas de soja. El resveratrol es una fitoalexina natural biosintetizada en respuesta a ataques de patógenos u otras condiciones de estrés. Se puede encontrar en las uvas y en productos derivados como mosto, vino, etc., aunque en la actualidad se extrae de una planta denominada *Polygonum cuspidatum*. Entre sus numerosas funciones biológicas destacan: cardioprotectora, anticancerígeno, antiinflamatoria, y estrogénica.

En la presentación se mostrarán los resultados más significativos obtenidos en la acilación de ambos antioxidantes con lipasas inmovilizadas de distinta naturaleza.

1. “Acetylation of vitamin E by *Candida antarctica* lipase B immobilized on different carriers”. P. Torres, D. Reyes-Duarte, N. López-Cortés, M. Ferrer, A. Ballesteros and F.J. Plou. *Process Biochemistry* **42**, 145-153 (2008).
2. “Enzymatic modification for ascorbic acid and alpha-tocopherol to enhance their stability in food and nutritional applications”. P. Torres, A. Kunamneni, A. Ballesteros and F.J. Plou. *The Open Food Science Journal*, **2**, 1-9 (2008).
3. “Procedimiento enzimático para la obtención en un solo paso de 3-O-acil-resveratrol y 3,4'-di-O-acil-resveratrol”. P. Torres, F.J. Plou and A. Ballesteros. *Spanish Patent* (2008).

Decoloración y destoxificación de colorantes textiles de tipo Azo mediante sistemas lacasa-mediador producidos por *Streptomyces*

Manuel Hernández, Raquel Moya, Ana García, Juana Rodríguez, M^a Isabel Pérez, Francisco Guillén y M^a Enriqueta Arias

Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad de Alcalá. 28871 Alcalá de Henares. Madrid. Email: manuel.hernandez@uah.es

Como consecuencia del desarrollo de la industria textil, en los últimos años ha crecido la preocupación por el impacto medioambiental que supone el vertido de efluentes derivados de esta industria en los ecosistemas acuáticos. Entre los compuestos utilizados en esta industria, los más perjudiciales por su elevada toxicidad y por el efecto carcinogénico de sus productos de degradación anaerobia, son los colorantes de tipo Azo. Con el fin de prevenir la formación de aminas aromáticas durante la reducción anaerobia de los colorantes de este tipo, existe en la actualidad un gran interés por la puesta a punto de estrategias biológicas capaces de degradar dichos compuestos. Entre estas estrategias cabe mencionar, la utilización de microorganismos y/o de sus enzimas oxidativas. Entre las enzimas susceptibles de ser utilizadas, destacan las lacasas, principalmente por su baja especificidad de sustrato y por la gran versatilidad catalítica que presentan en presencia de compuestos mediadores de oxidación.

En el presente trabajo, se ha comprobado la utilidad de la lacasa producida por *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 en presencia de acetosiringona como mediador, para degradar 8 colorantes textiles de tipo Azo. Asimismo, se ha determinado el grado de destoxificación alcanzado por estos compuestos, tras el tratamiento con el sistema lacasa-mediador.

Los resultados obtenidos muestran que este sistema resulta muy efectivo frente a 5 de los 8 compuestos ensayados, con los cuales se obtienen grados de decoloración de más del 90%. Sin embargo, los estudios de toxicidad llevados a cabo tras el proceso de decoloración mostraron, que la pérdida de color de los compuestos no implica necesariamente la destoxificación de los mismos, ya que en el caso del Methyl Orange y del Orange II el grado de toxicidad aumentó tras el tratamiento enzimático.

Por último, el seguimiento cromatográfico mediante HPLC-PDA del proceso de decoloración puso de manifiesto, que si bien el colorante es completamente degradado, se detectan como consecuencia del tratamiento nuevos compuestos que pudieran ser los responsables del aumento de toxicidad.

Evaluación de celulasas y dominios de unión a celulosa recombinantes en el refinado de pastas TCF de eucalipto

**A. Iulia Chiriac^a, Edith M. Cadena^b, F.I. Javier Pastor^a, Teresa Vidal^b,
Antonio L. Torres^b**

^aDep. Microbiología, Universidad de Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028, Barcelona.

^bDep. Ingeniería Textil y Papelera (ETSEIAT), Universidad Politécnica de Cataluña, Colom 11, 08222, Terrassa. e-mail: iuliachiriac@ub.edu, edith.cadena@etp.upc.edu

Las celulasas son enzimas con gran potencial biotecnológico relacionado con la abundante utilización de materiales celulósicos en los procesos industriales. La celulasa Cel9B de *Paenibacillus barcinonensis* es una enzima modular, con varios dominios organizados en la arquitectura estructural GH9-CBD3c-Fn3-CBD3b (1). Estudios previos indican que Cel9B presenta potencial aplicación en el refinado de las pastas kraft *Eucalyptus* (2). El efecto beneficioso de Cel9B en las propiedades físico-mecánicas del papel permite catalogar a la enzima como coadyuvante del refinado ya que acelera la modificación morfológica de las fibras, incrementa los mecanismos de cohesión fibra-fibra y permite obtener importantes ahorros de energía en el proceso de refinado (3). En el presente trabajo se procedió a la construcción de enzimas derivadas de Cel9B para profundizar en el estudio molecular de la enzima y diseñar celulasas y dominios de unión a celulosa recombinantes con un efecto superior en el biorefinado de las pastas.

Mediante técnicas de ingeniería genética se han construido 9 celulasas recombinantes derivadas de Cel9B, que corresponden a formas truncadas de la enzima conteniendo dominios individuales y distintas combinaciones de los dominios de la enzima. Similarmente a la celulasa salvaje, las formas truncadas que contenían el dominio catalítico mostraron preferencia por la celulosa amorfa. El primer dominio de unión a celulosa, CBD3c, no mostró capacidad de unión a celulosa pero su delección causó un descenso drástico en la actividad enzimática, mostrando por tanto un papel auxiliar para el dominio catalítico (GH9). Por el contrario, el dominio CBD3b fue indispensable para la unión a celulosa cristalina. Las formas desprovistas del mismo perdieron la capacidad de unión a Avicel y presentaron actividad disminuida sobre este sustrato. La aplicación de las enzimas truncadas GH9-CBD3c, Fn3-CBD3b y CBD3b en el refinado de la pasta kraft TCF (*Eucalyptus globulus*) mostró una marcada influencia sobre la morfología de las fibras, originando importantes mejoras en las propiedades físico-mecánicas de la pasta y del papel. Resaltan los resultados obtenidos con el dominio catalítico (GH9-CBD3c), su efecto contrastado con la celulasa completa Cel9B indica una importante influencia en el proceso de refinado, al mejorar de forma similar las propiedades de resistencia a rotura por tracción y estallido que la celulasa completa, pero aumentando la resistencia al desgarrar. Los dominios Fn3-CBD3b y CBD3b muestran menor actividad sobre el refinado, sin embargo se evidencia su efecto en la modificación superficial de las fibras. Las nuevas celulasas construidas modifican la superficie y propiedades de las fibras papeleras de forma diferente al refinado mecánico, y posibilitan la obtención de nuevos materiales celulósicos de aplicación en biotecnología.

1) Pastor, J.I.P., Pujol, X., Blanco, A., Vidal, T., Torres, A.L., Díaz, P. 2001. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55: 61-68.

2) García, O., Torres, A.L., Colom, J.F., Pastor, F.I.J., Díaz, P., Vidal, T. 2002. *Cellulose*. 9: 115-125

3) Cadena, E. M.; Chiriac, I. A.; Vidal, T.; Colom, J. F.; Pastor, F.I.J.; Díaz, P.; Torres, A.L. *IV Congreso Ciadicyt*, 2006, p. 26-33

Producción de la lipasa Lip2 de *Candida rugosa* en el sistema *Pichia pastoris*: caracterización y aplicación en reacciones de síntesis

Manuel Alarcón, M. Dolors Benaiges, Pau Ferrer, Francisco Valero

Departament Enginyeria Química. Escola Tècnica Superior d'Enginyeria. Universitat Autònoma Barcelona, Bellaterra, Barcelona. Francisco.Valero@uab.cat

Las lipasas son enzimas con numerosas aplicaciones en biocatálisis, sin embargo la mayoría de las lipasas comerciales se presentan como una mezcla de isoenzimas. La producción de una isoenzima pura expresada heterológamente, se presenta como una alternativa para su óptima utilización en reacciones estereoselectivas. En el presente trabajo se ha producido Lip2 de *C. rugosa* en *P. pastoris* como microorganismo huésped.

Una vez diseñada y optimizada la secuencia nucleotídica de Lip2 para su óptima expresión en *P. pastoris*, se procedió a la selección de los clones productores de rLip2 activa. La producción de rLip2 se realizó en cultivos de alta densidad celular, en bioreactores operando en discontinuo alimentado. Con esta estrategia operacional se obtuvieron agregados de rLip2 sin actividad lipásica. La recuperación de la actividad enzimática consistió en un proceso de ultra y diafiltración para la disminución de la salinidad del medio.

Una vez determinados el pH y la temperatura óptima de rLip2, mediante el ensayo de actividad, y la especificidad frente a p-nitrofenoles y triglicéridos, se procedió a un estudio de estabilidad frente a pH y temperatura. Si bien la rLip2 es menos estable que la enzima nativa, la inmovilización por adsorción sobre un soporte de polipropileno permitió aumentar su estabilidad y obtener un biocatalizador reutilizable.

La aplicación de rLip2 inmovilizada en reacciones de síntesis enantioméricas queda patente en la resolución de la mezcla racémica del ibuprofeno, un antiinflamatorio no esterooidal, con el que se obtuvieron mejores resultados que los obtenidos con la lipasa nativa, en términos de conversión, exceso y factor enantiomérico.

Degradación enzimática de lípidos de la pared celular vegetal por el sistema lacasa-mediador

**Ana Gutiérrez¹, Setefilla Molina¹, Jorge Rencoret¹, José C. del Río¹,
David Ibarra², Ángel T. Martínez²**

¹IRNAS, CSIC, PO Box 1052, 41080 Sevilla; ²CIB, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid (anagu@irnase.csic.es)

Los extraíbles lipofílicos de la madera y otros materiales lignocelulósicos producen un impacto negativo en la industria de pasta y papel debido a que originan depósitos lipídicos (“pitch”) en la maquinaria y circuitos, así como en el producto final. Las lipasas se han aplicado para el control del “pitch” en la producción de pasta mecánica de coníferas. Sin embargo, estas enzimas que hidrolizan triglicéridos, únicamente son eficaces con determinadas materias primas y procesos en los que estos compuestos son predominantes (Gutiérrez et al. 2001. *Trends Biotechnol.* 19: 340).

Recientemente, hemos demostrado por primera vez la eficacia del sistema lacasa-mediador en la eliminación de los lípidos de las pastas de papel con independencia del tipo de pasta y de la materia prima utilizada (Gutiérrez et al. 2006a,b. *Environ. Sci. Technol.* 40: 3416; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 845) y se ha depositado una patente al respecto (Gutiérrez et al. 2006. PCT/ES06/070091). Estos estudios se basaron en el tratamiento con lacasa (del hongo *Pycnoporus cinnabarinus*) y un mediador redox (1-hidroxibenzotriazol, HBT) de pastas representativas de diferentes procesos de pasteado y diferentes materias primas, incluyendo pasta kraft de eucalipto, pasta termomecánica de *Picea abies* y pasta sosa-antraquinona de lino. El análisis mediante GC-MS de los extractos lipofílicos de las pastas tratadas enzimáticamente reveló que la mayoría de los compuestos lipofílicos presentes en las mismas (incluyendo esteroides libres y conjugados, ácidos grasos y resínicos y triglicéridos) fueron eficazmente eliminados por el sistema lacasa-mediador. Simultáneamente, se observó una mejoría significativa en varias propiedades de las pastas tratadas enzimáticamente, como consecuencia de la eliminación simultánea de lípidos y lignina. Posteriormente a los tratamientos con el mediador sintético HBT, se probaron varios fenoles relacionados con la lignina como mediadores “naturales” de la lacasa para la eliminación de lípidos y lignina de pasta de eucalipto, obteniéndose resultados prometedores con algunos de ellos (Gutiérrez et al. 2007. *Environ. Sci. Technol.* 41: 4124).

Finalmente, con el fin de profundizar en la química de las reacciones del sistema lacasa-mediador con compuestos lipídicos, se estudiaron las reacciones químicas producidas durante el tratamiento con lacasa-HBT de diferentes lípidos modelo representativos de distintas pastas de papel - incluyendo alcanos, alcoholes grasos, ácidos grasos y resínicos, esteroides libres y esterificados y triglicéridos - y los productos se analizaron por GC-MS. Estos estudios mostraron que la lacasa sola (sin mediador) disminuyó la concentración de algunos lípidos insaturados. Sin embargo, la mayor modificación tuvo lugar en las reacciones con el sistema lacasa-mediador. Los lípidos insaturados se oxidaron extensivamente y los principales compuestos identificados fueron epóxidos e hidroxiácidos a partir de los ácidos grasos, y 7-ketoesteroides libres y esterificados además de cetonas esteroidales provenientes de esteroides libres y esterificados. Por el contrario, los lípidos saturados ensayados no se modificaron aunque algunos de ellos sí se oxidaron cuando las reacciones enzimáticas se realizaron en presencia de lípidos insaturados, lo que sugiere la participación de reacciones de peroxidación y explicaría algunos de los resultados obtenidos durante el tratamiento enzimático de las pastas.

Enzimas extracelulares producidas por bacterias halófilas

Cristina Sánchez-Porro, Encarnación Mellado y Antonio Ventosa

Dpto. Microbiología y Parasitología. Universidad de Sevilla, C/ Profesor García González, 2, Sevilla 41012 sanpor@us.es

Los dos grupos principales de microorganismos que se encuentran adaptados a los ambientes hipersalinos son las arqueas halófilas extremas y las bacterias halófilas moderadas. Las bacterias halófilas moderadas se caracterizan porque son capaces de crecer óptimamente en medios que poseen entre un 3 y 15 % de NaCl. En los últimos años estas bacterias han despertado un gran interés desde un punto de vista ecológico y taxonómico pero fundamentalmente por sus aplicaciones y potencialidades biotecnológicas. Entre dichas aplicaciones se encuentran la producción de compuestos de interés industrial como son los polisacáridos o compuestos orgánicos que acumulan en su interior como osmolitos que se denominan solutos compatibles. Estos microorganismos también juegan un papel muy importante en los procesos de biodegradación de residuos. Por último, cabe destacar el interés de los mismos en la producción de enzimas extracelulares que puedan ser utilizados como biocatalizadores en condiciones extremas no solo de salinidad sino de temperatura, pH, etc...

Los primeros estudios sobre la producción de enzimas extracelulares por bacterias halófilas moderadas se realizaron en Japón por Onishi y Kamekura a principios de los años 70. Dichos autores describieron las propiedades de varias enzimas extracelulares, entre ellas una amilasa, una nucleasa y una proteasa, aunque ninguna de ellas fue caracterizada a nivel molecular. Nuestro grupo de investigación realizó la primera caracterización molecular de una alfa-amilasa producida por la bacteria halófila moderada *Halomonas meridiana* (Coronado y col., 2000). Dicha enzima produce maltosa y maltotriosa como principales productos de su acción hidrolítica sobre el almidón y su principal característica diferencial de otras amilasas es su elevada actividad hasta incluso un 30% de salinidad, con un óptimo al 10% de sales. Posteriormente se han descrito otras amilasas producidas por las bacterias *Halothermotrix orenii* y *Halobacillus karajensis*.

Recientemente hemos estudiado una proteasa a la que hemos denominado haloproteasa CP1 producida por la bacteria halófila *Pseudoalteromonas ruthenica* CP76 aislada de una salina de Isla Cristina (Huelva). Dicha enzima ha sido caracterizada tanto bioquímica como molecularmente; se trata de una metaloproteasa que presenta actividad óptima a 55°C, pH 8,5 y muestra una elevada tolerancia a las condiciones salinas, presentando actividad hasta incluso 23% de NaCl y con un óptimo entre 0 y 10% de NaCl (Sánchez-Porro y col., 2003). El gen *cp1* codifica una proteína de 733 aminoácidos que muestra homología con metaloproteasas de la familia M4. Por último hemos realizado estudios de secreción de dicho enzima presentando el sistema de secreción de tipo II.

Coronado, M.J., Vargas, C., Mellado, E., Tegos, G., Drainas, C., Nieto, J.J. y Ventosa, A. 2000. The α -amylase gene *amyH* of the moderate halophile *Halomonas meridiana*: cloning and molecular characterization. *Microbiology* 146: 861-868.

Sánchez-Porro, C., Mellado, E., Bertoldo, C., Antranikian, G. y Ventosa, A. 2003. Screening and characterization of the protease CP1 produced by the moderately halophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain CP76. *Extremophiles* 7: 221-228.

Sistemas *quorum sensing* en bacterias halófilas y su uso biotecnológico

Inmaculada Llamas, Ali Tahrioui y Emilia Quesada

*Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.
Campus Universitario Cartuja s/n, 18071 Granada.
illamas@ugr.es*

La modalidad de comunicación intercelular, en la que la expresión de los genes depende de los valores de densidad celular presentes en el medio, se denomina *quorum sensing*. Este mecanismo está ampliamente distribuido entre las bacterias y controla diversas funciones celulares tales como la expresión de factores de virulencia y exoenzimas, la capacidad de transferencia de DNA, la formación de biofilms y la producción de antibióticos, pigmentos y exopolisacáridos (González y Marketon, 2003; Whitehead y col., 2001).

Nuestro grupo de investigación ha descrito por primera vez la presencia de un sistema de regulación de genes dependiente de la densidad celular en las bacterias halófilas moderadas, concretamente en el género *Halomonas*, un grupo de bacterias ampliamente distribuido en la naturaleza y con un gran potencial industrial (Ventosa y col., 2004).

Halomonas anticariensis FP35^T ha sido seleccionada como modelo para nuestros estudios por crecer en un amplio rango de sales (0,5-30 %, p/v), por sintetizar un exopolisacárido de interés para la industria y por producir una amplia variedad de moléculas autoinductoras del tipo *N*-acilhomoserín lactonas (AHLs): C₄-HL, C₆-HL y C₈-HL, cuya síntesis depende de la densidad celular (Llamas y col., 2005).

Uno de los objetivos perseguidos en nuestro estudio es la construcción de un biosensor halófilo que sea activo y eficaz para detectar la producción de moléculas autoinductoras, propias de los sistemas *quorum sensing*, en bacterias terrestres, marinas y halófilas. Los biosensores actuales presentan algunas limitaciones al respecto, pues no crecen por encima de un 1% p/v de sales y sólo detectan un estrecho rango de AHLs. El biosensor *Halomonas anticariensis* FP35^T será doblemente útil ya que presenta un marcado carácter eurihalino y sintetiza una gran diversidad de las moléculas AHLs, dos características que le convierten en un buen candidato para tal fin.

Mediante experiencias de mutagénesis y análisis de las secuencias interrumpidas en su lectura estamos llevando a cabo la identificación y caracterización de los genes implicados en la síntesis y regulación de las moléculas señal. El siguiente paso será la construcción de una fusión transcripcional del gen sintasa a un gen registrador y la evaluación de su capacidad de activación ante la presencia de diferentes moléculas AHLs exógenas. En un futuro próximo este biosensor halófilo podría ser utilizado para el análisis de las funciones reguladas por sistemas *quorum sensing* en importantes patógenos de peces y moluscos, y en otras cepas marinas y halófilas de interés biotecnológico.

-Llamas y col., 2005. *Extremophiles*. 9: 333-341.

-González y Marketon, 2003. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 574-592.

-Ventosa y col. 2004. *Halophilic Microorganisms*. Spring Verlag. Heidelberg

-Whitehead y col., 2001. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 365-404.

Ecogenética y aplicaciones de las bacterias magnetotáticas

Mercedes Berlanga¹, Ricardo Guerrero²

¹*Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, Barcelona, mberlanga@ub.edu.* ²*Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, Barcelona, rguerrero@ub.edu.*

Las bacterias magnetotáticas (BM) son cosmopolitas, ubicuas en los hábitats acuáticos. Se encuentran en elevada densidad poblacional, justo en la zona de transición óxica-anóxica. Constituyen un grupo heterogéneo de procariotas, con morfologías muy diferentes, pudiendo presentarse como cocos, bacilos, vibrios o espirilos. Además, pueden vivir como células aisladas o bien formar agregados celulares (compuestos por entre 10 y 30 células individuales). A pesar de esta diversidad morfológica, las BM comparten algunas características comunes: (i) son gramnegativas, (ii) presentan movimiento flagelar, (iii) exhiben una respuesta táctica negativa frente a concentraciones atmosféricas de oxígeno, y (iv) poseen magnetosomas, que son partículas intracelulares de magnetita (óxido de hierro, Fe_3O_4) o greigita (sulfuro de hierro, Fe_3S_4) rodeadas por una membrana lipoproteica. Los magnetosomas permiten a las células interactuar con las líneas del campo geomagnético y orientarse en la columna de agua, buscando las condiciones que favorecen su metabolismo. Las bacterias magnetotáticas son microaerófilas o anaerobias. La navegación a lo largo de las líneas del campo magnético facilita la migración hacia una posición favorable de concentración de oxígeno. Hay que destacar que las bacterias magnéticas ni son atraídas ni repelidas por el polo geomagnético, solamente son orientadas. Las células muertas también se sitúan en las líneas de campo magnético como las células vivas, pero no se mueven. El movimiento en una dirección u otra viene determinado por la rotación de los flagelos. Las BM presentan gran interés, desde muchos puntos de vista: ecológico, filogenético-taxonómico, metabólico y aplicado. Su ecofisiología y filogenia las emparenta con las bacterias que pudieron vivir en la Tierra en los ambientes microóxicos del Arqueano antiguo (de -3500 a -2900 millones de años). Diversos autores mantienen que también han existido en Marte, aunque este hecho no podrá ser verificado o falsado hasta dentro de algunos años. Los magnetosomas son una fuente insustituible de partículas magnéticas unidominio. La magnetita bacteriana tiene múltiples aplicaciones biotecnológicas, en campos tan diversos como nuevos materiales para ingeniería o la biomedicina, o base de microchips moleculares, aunque en la actualidad no se ha explotado a escala comercial, principalmente debido a problemas relacionados con el cultivo masivo de las BM. El conocimiento de cómo una bacteria magnetotáctica es capaz de controlar el proceso de biomineralización podría ser empleado en la síntesis de partículas ferromagnéticas “a medida”, con diferentes morfologías cristalinas y propiedades deseadas. La resolución del enigma de las cadenas de “magnetosomas” en el meteorito ALH84001, si se confirma su presencia, supondría una revolución en los conceptos consensuados actualmente sobre el origen de la vida en el sistema solar.

Lisina-épsilon-oxidasa, una novedosa proteína antimicrobiana sintetizada por *Marinomonas mediterranea*

D. Gómez¹, P. Lucas-Elío¹, F. Solano², A. Sanchez-Amat¹

¹*Departamento de Genética y Microbiología y* ²*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B. Universidad de Murcia. Murcia 30100, danigo@um.es.*

Las aminoácido oxidasas son enzimas que oxidan aminoácidos generando el cetoácido correspondiente, amonio y peróxido de hidrógeno. La liberación de peróxido de hidrógeno les confiere propiedades antimicrobianas y se ha visto que en ocasiones juegan un importante papel en el desarrollo de biofilms (Mai-Prochnow *et al.*, 2008). Estas oxidasas, además de su interés como proteínas antimicrobianas, son enzimas de interés biotecnológico en procesos de biotransformaciones y en el desarrollo de biosensores.

Marinomonas mediterranea es una bacteria marina melanogénica aislada y clasificada por nuestro grupo de investigación y que sintetiza una proteína antimicrobiana denominada inicialmente marinocina. La marinocina es un nuevo tipo de lisina oxidasa que cataliza la desaminación oxidativa de la L-lisina generando ácido 2-amino-6-semialdehído adípico, amonio y peróxido de hidrógeno. Esta enzima, a diferencia de las bien conocidas L-lisina- α -oxidadas, actúa sobre el grupo amino en posición épsilon, por lo que la hemos denominado L-lisina- ϵ -oxidasa o L-lisina-6-oxidasa y clasificada por la Comisión de Enzimas con el número E.C. 1.4.3.20 (Gómez *et al.*, 2006).

Nuestro grupo ha conseguido la clonación del operón implicado en la síntesis de la marinocina, al que hemos denominado *lod*, por **lisina oxidasa** (Lucas-Elío *et al.*, 2006). Este operón está constituido por dos genes, *lodA*, que codifica la marinocina y *lodB*, que codifica una hipotética deshidrogenasa de función desconocida. Con el fin de estudiar la funcionalidad de ambos genes, se han construido diversos mutantes de *M. mediterranea* y se ha intentado la expresión recombinante de la actividad en *E. coli*. Estos estudios han puesto de manifiesto que, tanto en *M. mediterranea* como en *E. coli*, se requiere la expresión conjunta de ambos genes (*lodA* y *lodB*) para obtener la actividad lisina oxidasa.

Gómez, D., Lucas-Elío, P., Sánchez-Amat, A., and Solano, F. 2006. *Biochim. Biophys. Acta.* 1764: 1577-1585.

Lucas-Elío, P., Gómez, D., Solano, F., and Sánchez-Amat, A. 2006. *J. Bacteriol.* 188: 2493-2501.

Mai-Prochnow, A., Lucas-Elío, P., Egan, S., Thomas, T., Webb, JS., Sanchez-Amat, A., and Kjelleberg, S. 2008. *J. Bacteriol.*

La CECT como autoridad internacional de depósito de cepas de microorganismos para fines de patente según el tratado de Budapest. Procedimiento de depósito.

José Miguel López-Coronado, Laura López-Ocaña y Esperanza Garay

Colección Española de Cultivos Tipo-CECT, Universidad de Valencia. Campus de Burjassot, 46100, Burjassot, Valencia info@cect.org

La Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) obtuvo en el año 1992 el reconocimiento por parte de la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI) como autoridad internacional de depósito (AID) de cepas de microorganismos según el tratado de Budapest, como consecuencia de la proposición recibida del Ministerio de Industria para que España contase con una autoridad internacional de depósito de cepas microbianas. El tipo de material aceptado para su depósito en el momento de la concesión eran bacterias, hongos filamentosos y levaduras pertenecientes a grupos de riesgo no superiores a dos. En el año 2004 se incluyeron los plásmidos entre los materiales aceptados. Se trata de la única Colección de Cultivos en España con carácter público para el depósito de bacterias, hongos filamentosos y levaduras.

Actualmente la CECT cuenta con 539 cepas depositadas con fines de patente según el tratado de Budapest, de las cuales 400 son bacterias (74%) y 139 corresponden a hongos filamentosos y levaduras (26%)

En esta comunicación pretendemos dar a conocer a la CECT como autoridad internacional de depósito de cepas de microorganismos para fines de patente según el tratado de Budapest. Dadas las dificultades a las que se enfrenta un investigador que se plantea la posibilidad de patentar un procedimiento o un microorganismo, se describirán con detalle los diferentes pasos que hay que seguir para el proceso de depósito, y se aclararán las posibles dudas que puedan surgir a los actuales y potenciales depositantes en relación al mismo.

Aspectos Actuales de Proteómica de Hongos Filamentosos

**Francisco Javier Fernández-Acero, María Carbú, Carlos Garrido,
Inmaculada Vallejo y Jesús Manuel Cantoral**

*Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales.
Universidad de Cádiz, 11510 Puerto Real, Spain*

En los últimos años los hongos filamentosos están siendo intensamente estudiados debido a su importancia médica, industrial y agrícola. En este último campo, los hongos fitopatógenos son responsables de multitud de enfermedades en gran variedad de cultivos en todo el mundo, causando pérdidas económicas muy importantes para los agricultores. De forma general, estos organismos tienen un ciclo biológico complejo, que puede incluir ciclos de reproducción asexual y sexual, lo que implica la formación de estructuras reproductivas diferentes. Además, durante su ciclo de infección producen un amplio abanico de componentes diferentes que son esenciales para completarlo (enzimas, toxinas, etc.), estos factores se conocen como factores de patogenicidad.

Aunque el uso de la electroforesis bidimensional (2-DE) se ha empleado para estudiar el proteoma de un buen número de microorganismos, hay pocos estudios sobre proteómica de hongos filamentosos y menos aún, de fitopatógenos. Los motivos de esta carencia parecen ser, entre otros, la dificultad en obtener extractos proteicos fúngicos o la falta de bases de datos de secuencias de ADN/Proteínas que permitan aumentar el ratio de identificación. Este estudio pretende recoger las distintas estrategias empleadas para resolver estos problemas, así como las distintas aproximaciones realizadas a la descripción del proteoma de estos microorganismos. A pesar de que aún son pocos los trabajos, estos ya han conseguido demostrar la utilidad de la tecnología para identificar factores de patogenicidad potenciales, dianas terapéuticas e investigación básica.

Los sistemas de captación de cationes divalentes y la construcción de vacunas contra patógenos bacterianos

Susana Campoy, Montserrat Llagostera, Pilar Cortés, Jesús Aranda, Anna Bigas y Jordi Barbé

*Grupo de Microbiología Molecular, Departament de Genètica i de Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès 08193. España.
Susana.Campoy@uab.cat*

La detección creciente de cepas patógenas multiresistentes y la rápida aparición y diseminación de resistencias a antimicrobianos está generando, a nivel mundial, un cambio de actitud en el uso y aplicaciones de estos compuestos. En este contexto, la utilización de vacunas se ha consolidado como uno de los sistemas alternativos para el control de infecciones bacterianas, sobretodo en el ámbito veterinario, donde el uso de antibióticos en animales de producción se ha restringido cada vez más.

Las estrategias para la obtención de nuevas vacunas son diversas, como por ejemplo la obtención de bacterinas inactivadas, la utilización de cepas atenuadas o el uso de proteínas cuyas características antigénicas e inmunogénicas generen una respuesta inmune suficiente en el huésped para conferirle protección frente a futuras infecciones. Pese a la especificidad intrínseca del proceso de vacunación, se intenta además que estas nuevas vacunas confieran protección cruzada frente a distintos serotipos o variedades de una misma especie patógena o incluso frente a especies muy similares.

Por su exposición en la superficie celular, su expresión durante el proceso infectivo y su alto grado de conservación entre distintas serovariedades o incluso entre diferentes especies relacionadas, los sistemas de transporte de alta afinidad de cationes divalentes presentan el perfil idóneo como dianas para el desarrollo de nuevas vacunas.

Oligoelementos como el hierro, el zinc o el manganeso son esenciales e imprescindibles para el metabolismo celular. Los organismos superiores poseen mecanismos para reducir en sus tejidos, mucosas y/o fluidos la cantidad de estos elementos. Por ello, las bacterias patógenas se encuentran a lo largo del proceso infectivo en situaciones en las que la concentración libre de cationes como Fe^{2+} , Zn^{2+} o Mn^{2+} es extremadamente baja. Para poder desarrollarse en este entorno, los microorganismos utilizan los sistemas de transporte de alta afinidad de cationes divalentes. Cabe destacar que la expresión de éstos está normalmente asociada a reguladores transcripcionales que controlan que dichos complejos proteicos aparezcan en la superficie celular sólo cuando las concentraciones intracelulares del catión que transportan son bajas, evitando así los efectos deletéreos que tendría una incorporación masiva de estos elementos sobre el metabolismo celular.

Los estudios realizados por nuestro grupo de investigación han permitido determinar no sólo la capacidad antigénica e inmunogénica de estos transportadores sino también su capacidad protectora cuando son usados a modo de vacuna. Además, la caracterización a nivel molecular de los mecanismos de regulación de la expresión de dichos transportadores nos ha permitido la construcción de cepas que presentan una expresión masiva de transportadores de alta afinidad en la pared celular con independencia de la concentración intracelular del catión asociado incrementando así su efecto protector y reduciendo el coste de la producción de estas vacunas ya que pueden generarse usando medios de cultivo convencionales.

Secreción al medio de cultivo e inmovilización en la superficie celular de antígenos y enzimas mediante fusión traduccional con la proteína de pared celular Pir4 de *Saccharomyces cerevisiae*

Jesús Zueco, María Mormeneo e Isabel Andrés

Unidad de Microbiología. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia. Avda. Vicente Andres Estelles s/n. 46100-Burjassot (Valencia). SPAIN. jesus.zueco@uv.es

Saccharomyces cerevisiae es un organismo atractivo como hospedador para la expresión de proteínas recombinantes, incluyendo enzimas de uso industrial y antígenos de microorganismos patógenos para el desarrollo de vacunas. Se trata de un organismo seguro (GRAS), fácil de manipular genéticamente, barato de crecer a escala industrial y que, además, por ser un organismo eucariota, puede llevar a cabo el procesamiento post-traduccional necesario en la expresión de proteínas recombinantes de origen eucariota. Las células de *S.cerevisiae* están rodeadas de una pared celular cuya superficie esta constituida por una capa de proteínas altamente glicosiladas (manoproteínas). Una posibilidad interesante desde el punto de vista biotecnológico consiste en la inmovilización de enzimas o de antígenos recombinantes en la superficie de las células de *S.cerevisiae*, mediante su fusión a una proteína de pared celular, dando lugar de esta manera a catalizadores reusables y fáciles de separar de la mezcla de reacción, en un caso, o a vacunas celulares, en el otro. Nuestro grupo ha caracterizado la proteína de pared celular Pir4 y hemos demostrado que es una proteína de la superficie celular y que puede extraerse de la pared celular mediante agentes reductores. Basándonos en la estructura de Pir4, hemos diseñado estrategias de fusión que, dependiendo de la inserción de la región codificante de la proteína recombinante en distintos sitios de restricción del gen *PIR4*, o de la sustitución del dominio de retención a pared de Pir4 por la proteína recombinante, dan lugar a la inmovilización de la proteína recombinante en la superficie de las células de levadura o a su secreción al medio de cultivo. Hemos conseguido así la inmovilización en la superficie de las células, o la secreción al medio de cultivo, de distintos enzimas de interés biotecnológico de *Bacillus*, incluyendo xilanasas [1], lipasa [2], pectato liasa y celulasa. En todos los casos los enzimas se expresan en forma activa y pueden recuperarse fácilmente del medio de cultivo o extraerse de la pared celular mediante agentes reductores. De la misma manera hemos conseguido la inmovilización en la superficie de las células y la secreción al medio de cultivo del antígeno VP8 de rotavirus y hemos mostrado que es inmunogénico en un modelo murino y que confiere protección contra infección por rotavirus [3]. Finalmente, y en esta misma línea, nos estamos centrando en la expresión de antígenos de Norwalkvirus. En conclusión, creemos haber acumulado suficiente experiencia para sugerir que el sistema que hemos desarrollado pueda ser de aplicación general.

- [1] Andrés I, Gallardo O, Parascandola P, Pastor FIJ, Zueco J. 2005. *Biotech Bioeng.* **89**: 690-697.
- [2] Mormeneo M, Andrés I, Bofill C, Díaz P, Zueco J. 2008. *Appl Microbiol Biotechnol.* **80**:437-445.
- [3] Andrés I, Rodríguez-Díaz J, Buesa J, Zueco J. 2006. *Biotech Bioeng.* **93**: 89-98.

A multi-level approach to the study of heterologous protein production in *Pichia pastoris* under different oxygen conditions

Kristin Baumann,¹ Marc Carnicer,¹ Isabelle Töplitz,¹ Martin Dragosits,² Johannes Stadlmann,³ Alexandra Graf,² Michael Maurer,^{2,4} Brigitte Gasser,² Friedrich Altmann,³ Paula Jouhten,⁵ Hannu Maaheimo,⁵ Francesc Sánchez-Ferrando,^{1B} Diethard Mattanovich^{2,4}, Joan Albiol,¹ and Pau Ferrer¹

¹Departament d'Enginyeria Química & ^{1B}Departament de Química - Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain; pau.ferrer@uab.cat

²Department of Biotechnology and ³Department of Biochemistry - University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Austria

⁴School of Bioengineering, FH Campus Wien - University of Applied Sciences, Vienna, Austria
⁵VTT Biotechnology, Helsinki, Finlandia

In a study for functional, structural and regulatory processes involved in the expression of a complex protein under critical environmental conditions, we applied different oxygenation rates for the constitutive expression of an antibody Fab fragment in *Pichia pastoris* cultivations. The recombinant *Pichia pastoris* strain and its control strain were grown in a chemically defined medium in a glucose-limited chemostat. The oxygen set points were changed from high to low air concentrations, resulting in a stepwise reduction of the oxygen concentration in the inlet air from 20.97% to 10.91% and 8.39% (v^v⁻¹). For cultures that received less than 20.97% oxygen in the gas stream, air was partially replaced with nitrogen. Interestingly, a 2.5 fold increase of the specific productivity q_p was observed when shifting from respirative to hypoxic growth conditions, which were accompanied by sub product formation (mainly ethanol and a C5 sugar alcohol) and a decrease in biomass yield. These observations gave rise to the development of an optimised fed batch process ensuring a permanent low level of fermentative metabolism, which was tested successfully with three different protein producing strains.

In order to reveal the physiology behind this phenomenon, we have investigated the transcriptional response of *Pichia pastoris* at the different levels of oxygen concentrations using *Pichia pastoris* specific whole genome DNA micro arrays.

This transcriptomic approach, which will provide a more detailed overview of transcriptional regulation patterns under the given experimental conditions, was supplemented by proteomics to check the direct involvement of the gene products at the protein level. We have detected a relative increase in the abundance of proteins involved in general fungal stress response and in glycolysis at low oxygen concentrations, while proteins linked to TCA cycle and glycerolipid metabolism show decreased levels. Furthermore, such impact on the central carbon metabolism has been corroborated at the level of metabolic fluxes by means of ¹³C-based metabolic flux analyses. In general, our analyses indicate a strong oxygen-dependent expression pattern rather than a protein-expression related pattern for all the genes studied.

Summarized, the omics approaches should help to understand the cellular mechanism that leads to increased product formation at low oxygen and might reveal hitherto unidentified key factors or major pacemakers of efficient protein production.

Salvando cuellos de botella en la síntesis de pimarcina: sobreexpresión en *Streptomyces natalensis* del regulador positivo *pimM*

Javier Santos-Aberturas¹, Susana M. Guerra¹, Cláudia M. Vicente², Tamara D. Payero¹, Nuria Antón¹, Juan F. Martín^{1,2}, y Jesús F. Aparicio^{1,2}

¹Area de Microbiología, Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad de León, Campus de Vegazana, s/n, 24071 León, España. e-mail: jesus.aparicio@unileon.es

²Instituto de Biotecnología INBIOTEC Avda. Real, nº 1 - Parque Científico de León 24006- León, España.

Streptomyces natalensis es el principal productor de la pimarcina, un macrólido poliénico que se emplea con profusión en la industria alimentaria (aditivo E-235) para evitar la contaminación por mohos en quesos y carnes curadas, gracias a su poderosa actividad antifúngica. La pimarcina encuentra además aplicaciones clínicas en los campos de la oftalmología y la dermatología. El elevado precio en el mercado de este compuesto hace que la optimización de su producción sea un foco de interés biotecnológico.

La identificación de los pasos limitantes en la biosíntesis de un metabolito secundario es uno de los aspectos clave que permiten el desarrollo de cepas superproductoras mediante ingeniería metabólica. En el caso de la pimarcina, dos genes que regulan positivamente su síntesis, *pimR* y *pimM*, han sido identificados hasta la fecha. Mientras la actuación de PimR parece ceñirse al control estricto de la expresión de un único gen, *pimE*, el efecto de PimM se extiende sobre varios genes del *cluster* biosintético de la pimarcina. Este último hecho, unido a que la actuación de la proteína PimM tiene lugar a través de su interacción directa con las secuencias promotoras de los genes que regula, hace probable que la regulación ejercida por *pimM* constituya un cuello de botella en la síntesis de este antifúngico.

Así, el incremento de la dosis génica de *pimM* en *S. natalensis* mediante la introducción de una copia adicional del gen produjo un incremento entre 1,5 y 2,4 veces en la producción de pimarcina. La introducción de múltiples copias del gen a través de un vector replicativo no fue capaz de mejorar la producción más allá de esos niveles. Esto sugiere una saturación de las dianas de PimM, y en consecuencia la práctica supresión del cuello de botella que el número de copias de PimM suponía de manera inicial para la producción de pimarcina en esta bacteria de interés industrial.

PÓSTERS

¿Induce el estrés oxidativo la acumulación del carotenoide astaxantina en *Haematococcus pluvialis*?

Julio Abalde, Carmen Rioboo, Óscar González-Barreiro, Raquel Prado, Concepción Herrero y Ángeles Cid

*Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidade da Coruña,
Rúa Alejandro de la Sota, nº 1, 15008 A Coruña, Spain. E-mail: abaldej@udc.es*

Los carotenoides, y en particular la astaxantina, son muy efectivos como quelantes de radicales oxígeno, lo que los convierte en productos con potencial utilización en la industria alimenticia y farmacéutica. La acumulación de astaxantina en la microalga dulceacuícola *Haematococcus pluvialis* se ha relacionado con la formación de palmelas y aplanosporas dentro de su ciclo de vida, generalmente como respuesta a un estrés ambiental.

Nos hemos planteado como primer objetivo confirmar la potencial acumulación de astaxantina como respuesta a estrés oxidativo en células de *H. pluvialis* mediante el desarrollo de un método citométrico que permita caracterizar las fases celulares de la microalga *H. pluvialis*. Como fuente de estrés oxidativo, se utiliza el herbicida bupiridílico paraquat, inhibidor competitivo del transporte electrónico fotosintético a nivel del PS I actuando como prooxidante celular al generar especies reactivas de oxígeno que causan peroxidación lipídica, dañando las membranas celulares. El segundo objetivo planteado fue el análisis de la generación intracelular de ROS mediante CMF con el fin comprobar *in vivo* el posible papel de los carotenoides, especialmente de la astaxantina, como antioxidantes en situaciones de estrés oxidativo. Para ello, se realizaron cultivos de *H. pluvialis* con diferentes concentraciones de paraquat (0, 50, 300 y 600 nM) durante 96 horas.

El estrés producido por la presencia de paraquat en el medio se analizó mediante el recuento de células, el análisis del contenido celular de clorofila *a* y astaxantina (permitiendo el análisis de las subpoblaciones de células vegetativas y de cistes), además de medidas del nivel intracelular de H₂O₂, utilizando el fluorocromo DHR123 y del nivel intracelular de O₂⁻ con el fluorocromo HE.

La adición de paraquat al medio de cultivo afectó significativamente a todos los parámetros estudiados, en todas las concentraciones ensayadas. Durante las primeras 24 horas de exposición al paraquat, se observó un incremento en la producción de ROS. Sin embargo, a partir de ese momento se registra un descenso significativo de superóxido y de peróxido de hidrógeno en los cultivos tratados con pesticida, con respecto a los niveles intracelulares hallados en las células de los cultivos control, acompañado de un descenso en el porcentaje de células vegetativas y un aumento proporcional de cistes ricos en astaxantina.

Los bajos niveles de producción de ión superóxido y del peróxido de hidrógeno registrados en los hematocistes ponen de manifiesto el papel antioxidante de la astaxantina, presentando niveles inferiores de ROS las células de resistencia que las vegetativas, lo que indica que la acumulación de este carotenoide se produce como mecanismo celular de respuesta ante un estrés más que como una ruta de síntesis del metabolismo celular.

Estudio de las condiciones de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* para la producción de poligalacturonasa

José Manuel Ageitos Martínez, Brenda Pardo Varela, Juan Andrés Vallejo Vidal, Margarita Poza Domínguez, Tomás González Villa

*Universidad de Santiago de Compostela. Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia. Avda. de las Ciencias S/N. Santiago de Compostela. 15782.
josemanuel.ageitos@usc.es*

El trabajo que se ha realizado consiste en el estudio de la capacidad de producción de una poligalacturonasa de *Kluyveromyces marxianus*. Las poligalacturonasas son uno de los enzimas encargadas de la degradación del ácido poligalacturónico, componente que se encuentra, fundamentalmente, en las pectinas de origen vegetal. La estirpe de *K. marxianus* utilizada en los ensayos fue aislada a partir de plantas de procesado de semilla de café de Cuba (Serrat et al., 2002). Durante el procesado del café, uno de los pasos más importantes es la degradación de la capa pectínica que recubre al grano, proceso que se realiza de modo tradicional mediante fermentación del grano mojado. Partiendo de estudios preliminares de selección se seleccionó la cepa con mayor actividad poligalacturónica mediante la observación de halos de lisis en placas de ácido galacturónico.

La cepa que se ha empleando presenta una serie de ventajas biotecnológicas evidentes para su utilización:

- Es capaz de producir el enzima de interés de un modo natural, sin ningún tipo de presión selectiva, lo que permite trabajar con microorganismo no modificados genéticamente.
- La producción del enzima se ve fuertemente inhibida por la presencia de oxígeno, este factor permite regular la expresión, dado que únicamente cambiando las condiciones de crecimiento, tales como agitación o volumen de aireación, se puede temporalizar la producción según se necesite.
- La producción del enzima no se encuentra inhibida por altas concentraciones de glucosa. La capacidad de producir en anaerobiosis permite el uso del efecto Pasteur en el consumo de la glucosa, consiguiéndose como subproducto etanol.

En los procesos industriales uno de los factores críticos para evaluar el rendimiento del proceso es el coste de las materias primas que se utilizan en los medios de fermentación. Esto hace necesario realizar ensayos de diferentes fuentes de nutrientes (carbono, nitrógeno, etc.) para minimizar el gasto invertido en la producción y rentabilizar el beneficio obtenido.

Referencias:

Serrat, M.; Bermúdez, R. and Villa, T.G. (2002) Production, purification and characterization of a poligalacturonase from a new strain of *Kluyveromyces marxianus* isolated from coffee wet-processing wastewater. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. Vol 97.

Caracterización de los sistemas de captación de zinc y de hierro en *Streptococcus suis*: Potencial antigénico y protector

Jesús Aranda, Maria Elena Garrido, Pilar Cortés, Susana Campoy,
Montserrat Llagostera y Jordi Barbé

*Grupo de Microbiología Molecular, Departament de Genètica i de Microbiologia,
Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès 08193. España.
Jordi.barbe@uab.cat*

Streptococcus suis es un importante patógeno que causa grandes pérdidas económicas en la industria porcina a nivel mundial, siendo también un importante agente zoonótico para el que no existen terapias efectivas.

En el presente trabajo se han identificado *in silico* diversos transportadores de *S. suis* implicados en la captación de zinc y hierro y también sus posibles reguladores (AdcR y Fur, respectivamente). Además, se ha purificado la proteína AdcR y mediante ensayos con DNaseI (*footprinting*) y de movilidad electroforética se ha demostrado que dicha proteína reconoce y se une específicamente a la secuencia TTAACNRGTAA. Asimismo, también se ha determinado que se requiere Zn²⁺ o Mn²⁺ para establecer dicha unión *in vitro* y que la proteína AdcR controla la expresión de los genes que codifican las proteínas SsuiDRAFT 0103 y SsuiDRAFT 1237, componentes de transportadores ABC implicados en la captación de zinc y/o manganeso. Por otra parte, se ha sobreexpresado la proteína Fur y mediante ensayos de movilidad electroforética se ha demostrado que esta proteína controla la expresión de los genes *feoAB*, implicados en la captación de hierro.

Asimismo, se han obtenido mutantes carentes de los genes *adcR* y *fur* en una cepa virulenta de *S. suis*, demostrándose que la ausencia de estos genes implica una importante atenuación de su virulencia en el modelo animal de ratón.

Finalmente, se han abordado estudios de inmunogenicidad y protección, purificándose tres proteínas periplásmicas de *S. suis* implicadas en la captación de cationes divalentes (SsuiDRAFT 0103, SsuiDRAFT 0174 y SsuiDRAFT 1237), resultando ser todas ellas inmunogénicas, aunque sólo SsuiDRAFT 0103 confiere una protección significativa contra *S. suis* en el modelo animal de ratón. Asimismo, se han estudiado las propiedades protectoras de las cepas mutantes demostrándose que las proteínas asociadas a la pared celular del doble mutante *adcR fur* inducen una protección significativa ante una infección con una cepa virulenta de *S. suis* en el modelo animal de ratón.

Un método multiplex PCR para la simultánea identificación de especie y tipificación de cepas de *Oenococcus oeni*

M. Isabel Araque, Albert Bordons, Cristina Reguant

Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Campus Sescelades, c/ Marcel·lí Domingo, s/n, Tarragona 43007, Catalunya, España

Oenococcus oeni es la principal especie de bacteria láctica responsable de la fermentación maloláctica (FML) del vino. El principal beneficio de la FML es la desacidificación de L-málico a L-láctico. Además, el metabolismo de estas bacterias en vino da lugar a la aparición de otros compuestos aromáticos que contribuyen al bouquet, y por otro lado ellas contribuyen a la estabilización microbiológica de los vinos.

Para asegurarse un buen desarrollo de la FML, en la mayoría de vinos se inoculan cepas comerciales de *O. oeni*. Sin embargo, las cepas inoculadas no siempre se desarrollan como se espera debido a las duras condiciones del vino (etanol, pH bajo, pocos nutrientes) y a veces otras cepas o especies no deseadas pueden resultar perjudiciales para el vino. Así pues, son imprescindibles métodos fiables para identificar *O. oeni* y tipificar sus cepas. Existen diversos métodos moleculares para ello, pero normalmente se requieren dos análisis para determinar por un lado la especie y por otro lado, la cepa. Esto conlleva un inconveniente de costo y tiempo en el control de los estériles de FML.

Este trabajo presenta un nuevo método multiplex de una sola PCR que se ha optimizado para realizar la simultánea identificación de la especie *O. oeni* y tipificación de sus cepas. La identificación de especie se basa en una PCR específica de especie en base a un fragmento del gen maloláctico. La tipificación de cepas se basa en el uso de un cebador RAPD, Coc, aplicado previamente con éxito en la diferenciación de cepas de *O. oeni* por los mismos autores de este trabajo.

Para ello se han optimizado diversos parámetros de la PCR usando DNA extraído de 10 cepas diferentes de *O. oeni*. La reproductibilidad del método se ha confirmado realizando el análisis en dos termocicladores diferentes, obteniéndose idénticos perfiles de bandas. Este método multiplex PCR para especie y cepa también se ha aplicado con éxito en el análisis de poblaciones de FML en diferentes vinos.

Este método permite la identificación y tipificación simultánea de cepas de *O. oeni* en una sola reacción de PCR generando una mínima complejidad en el perfil de bandas. Esta multiplex PCR puede ser particularmente útil para controlar los cultivos de estériles de *O. oeni*, ya que el perfil conocido de bandas de la cepa inoculada puede ser distinguido fácilmente del de otras cepas presentes en el vino.

Characterization of the probiotic profile of lactic acid bacteria isolated from non-fermented meat and seafood products

S. Arlindo, S.V. Hosseini, I. Fernandez-No, K. Böhme, J. Barros-Velázquez

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, School of Veterinary Sciences/College of Biotechnology, University of Santiago de Compostela, Rúa Carballo Calero s/n, Campus Universitario Norte, E-27002 Lugo, Spain

Four strains, previously isolated from beef stored on vacuum-packaged and advanced vacuum skin packaged system and turbot (*Psetta maxima*) were studied as potential probiotic strains. These bacterial strains were identified as *Enterococcus faecium* by partial 16S rRNA gene sequencing. All of them are bacteriocin enterocin P producers, showing a broad antibacterial spectrum against Gram-positive and Gram-negative bacteria. These bacteria were examined in vitro for potential probiotic properties such as their ability to survive in the gastro-intestinal tract. None of the strains were able to survive an exposure to pH 1 or pH 2 in PBS buffers; on the other hand, after exposure to pH 3 and pH 4, all strains exhibited good survival rate with 1 log cfu⁻¹ reduction in pH 3, and pH 4 from 0, 1 to 0, 5 log cfu⁻¹, the reduction in the population ranging from 0.492 to 6.13%. All strains surviving in oxgall and taurodeoxycholic acid media, and showing therefore a bile salt tolerance. All strains also survived in a solution of pepsin pH 3 0, 5 to 1 log cfu⁻¹. None of the strains shown β -haemolysis in sheep blood agar plates. The strains were sensitive to cloramphenicol, doxycyclin, penicillin, rifampicin, tetracycline, vancomycin, ampicillin, gentamicin and streptomycin. However, the four strains tested were resistant to cefazolin, clindamycin, oxacillin and sulfonamides. Furthermore, their aptitude, not only to withstand, but to proliferate in the presence of bile salts, as well, even at an acidic environment and their ability to adhere to stainless-steel plates, indicate the need for an in vivo study.

Escalado en la producción de la esterasa de *Ophiostoma piceae* en *Pichia pastoris* y su potencial biotecnológico en la industria papelera

Víctor Barba¹, Carolina Arnau², Francisco Valero², Ángel T. Martínez¹ y María Jesús Martínez¹

¹Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid.
mjmartinez@cib.csic.es

²Escola Tècnica Superior d'Enginyeria, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona. Francisco.Valero@uab.es

El empleo de biocatalizadores a nivel industrial requiere producirlos en altos niveles y a bajos costes. Con esta finalidad, las cepas GS115 (Mut⁺) y KM71 (Mut^S) de *Pichia pastoris* se han empleado como factoría para la producción heteróloga de una esterasa que produce el ascomiceto *Ophiostoma piceae*, con gran potencial biotecnológico, que hidroliza triglicéridos y ésteres de colesterol y *p*-nitrofenol.

El escalado en la producción de la enzima recombinante desde matraces Erlenmeyer a biorreactor se ha realizado bajo condiciones óptimas de producción para la obtención de niveles significativos de biocatalizador, empleando tanto bioprocesos en discontinuo como en discontinuo alimentado de alta densidad celular. En ambos casos se utilizó metanol como inductor de la expresión del gen de interés al emplear el promotor AOX1 y sólo con el fenotipo Mut^S se operó con sustratos mixtos (metanol-sorbitol) para mejorar la producción según lo previamente descrito (Ramón *et al.*, 2007).

Con el fenotipo de alta velocidad de asimilación de metanol (Mut⁺), el cultivo de elevada densidad celular produjo niveles de actividad alrededor de 9,5 veces superiores a los obtenidos en discontinuo (1,4 U/ml). Con respecto a la cepa con fenotipo Mut^S, que presenta una capacidad genéticamente limitada para asimilar el metanol, los cultivos en discontinuo alimentado rindieron niveles unas 9 veces superiores a los obtenidos operando en discontinuo (3,4 U/ml). Por último comentar que los niveles de enzima obtenidos en cultivos en semicontinuo con la cepa Mut^S fueron aproximadamente el doble que los alcanzados con la cepa Mut⁺. Actualmente se están caracterizando las enzimas recombinantes para comparar su actividad con la nativa.

Los resultados logrados suponen una clara optimización con respecto a la producción previa en Erlenmeyer permitiendo así disponer de suficiente biocatalizador para ser empleado en la industria papelera contra el *pitch* (depósitos lipídicos) que causa importantes pérdidas económicas en el sector a nivel mundial. El biocatalizador así producido se convierte en una alternativa frente a las lipasas comercializadas en la actualidad que sólo actúan frente al *pitch* originado de coníferas mientras que la enzima de *O. piceae* es efectiva en el tratamiento de depósitos generados a partir de maderas de coníferas y frondosas debido a sus propiedades catalíticas (Calero-Rueda *et al.*, 2004).

Referencias

Calero-Rueda, O., Gutiérrez, A., del Río, J.C., Prieto, A., Plou, F.J., Ballesteros, A., Martínez, A.T., and Martínez, M.J., 2004. Hydrolysis of sterol esters by an esterase from *Ophiostoma piceae*: Application for pitch control in pulping of *Eucalyptus globulus* wood. Intern. J. Biotechnol. 6, 367-375.

Ramón, R., Ferrer, P., and Valero, F., 2007. Sorbitol co-feeding reduces metabolic burden caused by the overexpression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. J. Biotechnol. 130, 39-46.

Efecto de la delección del gen *rpoZ* sobre la biosíntesis de metabolitos secundarios en *Streptomyces coelicolor* A3(2)

Mónica Barriuso-Iglesias¹, Juan Francisco Martín^{1,2}

¹Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC). Parque científico de León, Avda. del Real, nº 1, 24006, León. Correo electrónico: mbari@unileon.es.

²Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales. Departamento de Biología Molecular. Universidad de León. Campus de Vegazana s/n, 24071, León. Correo electrónico: jfmarm@unileon.es.

Muchos microorganismos producen metabolitos secundarios que les confieren una ventaja competitiva en su supervivencia diaria. Las bacterias del género *Streptomyces* producen alrededor del 70% de los antibióticos de uso clínico (1) y otros metabolitos con actividad antitumoral, herbicida o inmunosupresora. *Streptomyces coelicolor* es el organismo modelo de este género para el estudio del metabolismo secundario. Existen diversos niveles de control en la producción de metabolitos secundarios. Hay genes que ejercen un control pleiotrópico sobre uno o más aspectos del metabolismo secundario, y otros que sólo afectan a la ruta biosintética de un determinado antibiótico.

Recientemente se ha visto como el gen *rpoZ*, que codifica la subunidad omega de la ARN polimerasa, está relacionado con la producción de antibióticos y con el proceso de diferenciación morfológica (2, 3). El objetivo del presente trabajo es el estudio del gen *rpoZ* en *S. coelicolor* y su posible implicación en el metabolismo secundario.

Para conocer el posible efecto del gen *rpoZ* sobre el metabolismo secundario en *S. coelicolor* se interrumpió dicho gen mediante el sistema *REDIRECT* (4). Esta metodología se basa en la sustitución del gen de interés por un marcador de selección (resistencia a apramicina), generado mediante PCR con unos oligonucleótidos que cubren 39 pb de las regiones homólogas a ambos lados del gen a deleccionar. De esta manera se obtuvieron 4 posibles dobles recombinantes, que se comprobaron por PCR y por *Southern*, dando el patrón de bandas esperado para una delección del gen *rpoZ*. En estos mutantes se observa un crecimiento lento, presentando unas fases de formación de micelio aéreo y esporulación tardías. Con el fin de estudiar el efecto que la inactivación del gen *rpoZ* tiene en la producción de antibióticos en *S. coelicolor* se realizaron fermentaciones en medio MG. La falta de este gen anula casi prácticamente la producción de undecilprodigiosina, y disminuye la producción de actinorrodina.

Para obtener una visión más global de la relación del gen *rpoZ* con el metabolismo secundario de *S. coelicolor*, actualmente se está realizando la complementación de la delección, la sobreexpresión de dicho gen y por último el estudio de la fuerza de su promotor mediante luminiscencia.

[1] Challis GL, Hopwood DA. (2003). Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proc Natl Acad Sci U S A*.100(Suppl 2):14555–14561.

[2] Kojima I, Kasuga K, Kobayashi M, Fukasawa A, Mizuno S, Arisawa A, Akagawa H. (2002). The *rpoZ* gene, encoding the RNA polymerase omega subunit, is required for antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces kasugaensis*. *J Bacteriol*. Dec;184(23):6417-23.

[3] Mathew R, Mukherjee R, Balachandar R, Chatterji D. (2006). Deletion of the *rpoZ* gene, encoding the omega subunit of RNA polymerase, results in pleiotropic surface-related phenotypes in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology*. Jun;152(Pt 6):1741-50.

[4]Gust B, Kieser T, and Chater KF. (2002). *REDIRECT* technology: PCR-targeting system in *Streptomyces coelicolor*. The John Innes Centre, Norwich.

Heterotalización y haploidización de cepas industriales del género *Saccharomyces*

**Lucía Blasco, Sara Tomé-García, Lucía Feijoo-Siota, Patricia Veiga-Crespo,
Tomás G.Villa**

*Universidad de Santiago de Compostela. Departamento de Microbiología y
Parasitología. Facultad de Farmacia. Campus Sur. lucia.blasco@usc.es*

Tanto la industria cervecera como vinica tratan constantemente de mejorar sus productos. Parte de las características organolépticas tanto del vino como de la cerveza vienen determinados por la cepa de la levadura que se utilice como pie de cuba en su fermentación. Por ello es importante mejorar y estabilizar genéticamente las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pastorianus* empleadas en la fermentación. Las cepas industriales suelen ser homotéticas y diploides o poliploides. La existencia, en estos casos, de varias copias de un mismo gen puede enmascarar las modificaciones genéticas que se realicen en la cepa mediante técnicas de ADN recombinante. Además el homotalismo provoca que al esporular y dividirse por meiosis una de las células hijas cambie de tipo sexual (a , α) y conjugue con la madre, obteniéndose de nuevo un diploide.

En este trabajo se ha interrumpido el gen HO, responsable de homotalismo, que codifica para la endonucleasa HO, en una cepa de *S. cerevisiae* y en una cepa de *S. pastorianus*, con el objeto de obtener cepas heterotéticas haploides estables que mantengan las características de las cepas silvestres.

El gen HO se ha interrumpido con el cassette LoxP-KanMX-LoxP, que proporciona resistencia a la geneticina, y posteriormente este ha sido eliminado por el sistema de la Cre recombinasa, que permite la recuperación del marcador, de manera que este no se encuentre presente en la cepa. Finalmente se ha obtenido una cepa heterotética haploide sin el gen HO, pero con las características de la cepa parental.

Identification and molecular characterization of histamine-producing bacteria in fish by genomic and proteomic analysis

K. Böhme¹, I. Fernández-No¹, J.M. Gallardo², J. Barros-Velázquez¹, B. Cañas³ and P. Calo-Mata¹

¹*Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, School of Veterinary Sciences/College of Biotechnology, University of Santiago de Compostela, Rúa Carballo Calero s/n, Campus Universitario Norte, E-27002 Lugo, Spain; and*

²*Department of Food Technology, Institute for Marine Research (IIM-CSIC), Higher Council for Scientific Research, C/ Eduardo Cabello 6, E-36208 Vigo, Spain; and*

³*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University Complutense of Madrid, Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid, Spain; e-mail: jbarros @lugo.usc.es*

Some of the fish-contaminating bacteria are histamine producers that transform the amino acid histidine in histamine, a biogenic amine that produces the main seafood illnesses caused by food consumption. In this work the histamine-producing bacteria were isolated from fish (turbot and bream) and tested for their histamine production in Niven medium. Molecular identification was performed by polymerase chain reaction (PCR) with the universal bacterial primer pair p8FPL/p806R. rRNA fragments were sequenced and used to construct a genetic database and to establish the phylogenetic relationships among the most relevant strains and species. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) of intact bacterial cells was also used to obtain highly specific mass spectral fingerprints of the main histamine-producing bacteria isolated from seafood products. Phyloproteomic analysis was performed and resulted to be in agreement with phylogenetic analysis. Proteomic analysis revealed as a powerful technique able to differentiate among closely-related species histamine-producing strains in which genomic analysis did not provide concluding results.

El ácido poli-gamma-glutámico, un compuesto biotecnológico con aplicaciones potenciales en las industrias farmacéuticas, cosméticas y de alimentación

Jordi J Bou¹, Lambert Guri¹ y Marta Cerdà-Cuéllar^{2,3}

1 Departament d'Enginyeria Química (UPC). IPCT – CN 150 km 14,5 08220 Terrassa.

jordi.bou@upc.edu

2 Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA), UAB-IRTA, Campus UAB, 08193-Bellaterra, Barcelona. marta.cerda@cresa.uab.cat

3 Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Barcelona

El ácido poli-gamma-glutámico o PGA es un compuesto macromolecular obtenido mediante procesos biotecnológicos, tales como la fermentación. Es un componente de la pared celular de ciertas bacterias, especialmente las del género *Bacillus*. Las sociedades del Extremo Oriente han venido consumiendo este polímero debido a que está presente en un fermento de soja (el Natto en Japón o Cheonggukjang en Corea). Este fermento es comestible y se le han atribuido varias propiedades dietéticas beneficiosas. Hace una década y media se redescubrió el Natto como fuente de PGA y empezó su investigación a nivel mundial, tanto a nivel químico como de producción biotecnológica. El PGA se ha estudiado para ser aplicado en sistemas de liberación controlada de fármacos, terapia génica, componente cosmético de alta hidratación, secuestrante de metales, aditivo dietético, entre muchos otros (1). En la UPC, investigadores adscritos al Dept. de Ingeniería Química han logrado muy buenos resultados tanto a nivel de la bioproducción de PGA como de su estructura (2).

Actualmente se obtiene el PGA por extracción del Natto, aunque se trata de un producto impuro con pocas aplicaciones avanzadas. En nuestro laboratorio se ha desarrollado una planta piloto para la obtención de decenas o centenares de gramos de PGA con biorreactores de 10 a 100 L. Básicamente se trata de equipos por lotes cargados con el medio de cultivo apropiado, inoculado con *Bacillus licheniformis* ATTC 9945A. Esta bacteria permite obtener altos rendimientos de polímero y, según la composición del medio de cultivo, estereoquímicas controlables. La purificación se realiza mediante sistemas dobles de filtración tangencial con membranas hasta obtener disoluciones de PGA altamente puro.

Debido a las posibilidades del PGA, los investigadores de este proyecto han constituido una empresa “spin-off” de la UPC (Proglutamic SL) con el objetivo de ofrecer al mercado este biopolímero en su forma pura, especialmente a la industria farmacéutica y cosmética.

(1) J.M. Buescher and A. Margaritis 2007. Microbial biosynthesis of polyglutamic acid biopolymer and applications in the biopharmaceutical, biomedical and food industries. *Crit Rev Biotech* 27, 1.

(2) G Pérez-Camero, F. Congregado, J.J. Bou, S. Muñoz-Guerra 1998. Biosynthesis and ultrasonic degradation of bacterial poly-gamma-glutamic acid. *Biotech and Bioeng* 63, 110.

Estudio comparativo de la biodegradación de las diferentes formas enantioméricas del ácido γ - y α -poli-gamma-glutámico por *Bacillus licheniformis* NCIMB 11709

Jordi J. Bou¹, M. Soledad Marqués-Calvo², Marta Cerdà-Cuéllar^{3,4}

¹*Departament d'Enginyeria Química (UPC). IPCT – CN150 km 14,5 08233 Terrassa.
jordi.bou@upc.edu*

²*Departament d'Òptica i Optometria, EUOOT, Universitat Politècnica de Catalunya,
08222-Terrassa, Barcelona. marques@oo.upc.edu*

³*Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), UAB-IRTA, Campus UAB, 08193-
Bellaterra, Barcelona. marta.cerda@cresa.uab.cat*

⁴*Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Barcelona*

El ácido poli-gamma-glutámico o γ -PGA es un polímero extracelular producido por diversos miembros del género *Bacillus*. Este polímero está formado por unidades de D- y L- ácido glutámico unidas entre las funciones α -amino y γ -carboxílico. El PGA y sus derivados han suscitado interés en la última década por su potencial aplicabilidad en diferentes ámbitos, como en el campo de la cosmética, la medicina, la industria alimentaria o en el tratamiento de aguas residuales. La mayoría de trabajos donde se estudia la biosíntesis o biodegradación de este polímero microbiano, se centran únicamente en el γ -D-PGA.

En este estudio, producimos γ -L-PGA con un 70% de L- ácido glutámico utilizando la cepa *B. licheniformis* NCIMB11709. Asimismo, estudiamos la biodegradación de las diferentes formas estereoisómeras del PGA, tales como el ácido poli- α -glutámico (D ó L) de origen sintético y el ácido poli- γ -glutámico (D ó L) de origen natural. El microorganismo empleado para la degradación fue la misma cepa bacteriana.

Los resultados muestran que no hubo crecimiento de *B. licheniformis* cuando se utilizaron las formas α - del polímero como fuente de carbono, independientemente del contenido en enantiómeros D- o L-. No obstante, se observó una disminución del peso molecular en el cultivo con α -L-PGA. Por otro lado, esta cepa pudo degradar y utilizar las diferentes formas γ - del polímero (tanto D- como L-). Estos resultados pueden contribuir en la selección de la forma del polímero más adecuada en función de su aplicación biotecnológica.

Validación de un método rápido de análisis para la cuantificación de parámetros microbiológicos

Belén Buján, Alejandro Garrido, Geles Marcote, Jorge Lago, Juan Manuel Vieites y Ana G. Cabado

*ANFACO-CECOPESCA. Carretera del Colegio Universitario 16, 36310 Vigo
agcabado@anfaco.es*

Hoy en día el consumidor requiere alimentos sanos y nutritivos, así como información sobre los riesgos asociados a los alimentos y la posible contaminación de éstos. Por otro lado, la industria alimentaria necesita métodos rápidos de análisis para disminuir el tiempo de incorporación de las materias primas a la producción o para liberar producto final al mercado. El empleo de técnicas analíticas alternativas a los procedimientos clásicos, que combinen la automatización, la robustez y la rapidez en los resultados repercutirá positivamente en la economía de las empresas del sector alimentario, así como en la salud del consumidor.

En este trabajo se ha llevado a cabo una comparación de métodos clásicos de microbiología con técnicas innovadoras y miniaturizadas. El sistema Tempo es un equipo automático basado en la técnica del número más probable (NMP) que utiliza tarjetas con pocillos de distinto volumen en las que se inocula la muestra. La siembra, la lectura y la interpretación de los resultados son automáticas y se llevan a cabo mediante fluorescencia. Se han estudiado cuatro indicadores de calidad: microorganismos aerobios mesófilos, enterobacteriáceas, coliformes totales y *Escherichia coli* mediante este sistema y técnicas de microbiología clásica en paralelo. Se han evaluado un elevado número de matrices que se corresponden con productos de la pesca y de la acuicultura en cualquier formato: frescos, congelados, platos preparados, semiconservas y conservas.

El método se ha validado estudiando parámetros como la veracidad y la precisión, utilizando diversas matrices, material de referencia y mediante la participación en ejercicios intercomparativos. No se han registrado diferencias significativas entre ambos métodos para ninguno de los parámetros evaluados. Se discutirán las ventajas e inconvenientes halladas tras la aplicación de estos procedimientos.

Desarrollo de un Método Detección de Residuos de Antibióticos en Productos de la Pesca y Acuicultura

María José Chapela, Antonio Reboreda, Jorge Lago, Juan Manuel Vieites y Ana G. Cabado

*ANFACO-CECOPECA. Carretera del Colegio Universitario 16, 36310 Vigo
agcabado@anfaco.es*

INTRODUCCIÓN

Recientes crisis alimentarias, como la del *Pangasius*, ponen de manifiesto la importancia del desarrollo de métodos rápidos y fiables que garanticen que los productos que llegan al consumidor cumplen la legislación vigente en lo concerniente a residuos de antibióticos y otras drogas terapéuticas. En este sentido existen métodos cuantitativos de detección de antibióticos basados en el análisis mediante espectrometría de masas. Estos análisis resultan algo caros y laboriosos para analizar en un número de muestras muy elevado, por lo que es de gran interés desarrollar métodos que permitan hacer un screening inicial para determinar la presencia de antibióticos de manera semicuantitativa. En el presente trabajo se llevó a cabo un estudio para optimizar los kits de detección de inhibidores denominados Explorer y Equinox (ZEU Inmunotec, S.L.), para la detección en pescado de determinados antibióticos de uso común en las plantas de acuicultura.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se desarrolló un método de preparación de las muestras adecuado a las matrices que se pretenden analizar, rodaballo y *Pangasius* entre otros, ya que los kits objeto de estudio están diseñados para diferentes productos cárnicos, leche y huevos. Para comprobar el correcto funcionamiento del método se trabajó con muestras dopadas con diferentes cantidades de los antibióticos que son objeto de estudio. En concreto con el Kit Explorer se analizaron diferentes antibióticos pertenecientes a la familia de las sulfonamidas (sulfadiazina), las tetraciclinas (oxitetraciclina), los beta-lactámicos (ampicilina y amoxicilina), el florfenicol y el trimetropim y con el Kit Equinox se analizaron antibióticos del grupo de las quinolonas (flumequina y enrofloxacin).

RESULTADOS

Se ha conseguido detectar los antibióticos anteriormente citados en muestras dopadas de rodaballo, y se ha optimizado el método de modo que el límite de detección para cada uno de ellos sea inferior pero cercano al límite máximo de residuos permitido por la legislación vigente. El método desarrollado para rodaballo se ha aplicado también al *Pangasius* obteniéndose resultados igualmente satisfactorios.

CONCLUSIONES

El método resulta fiable y rápido para la detección de residuos de antibióticos en productos de la acuicultura, permite el análisis de un gran número de muestras además de proporcionar un resultado semicuantitativo. Mediante este método se podría llevar a cabo un cribado previo al análisis mediante espectrometría de masas que sólo se aplicaría en aquellos casos de muestras positivas en las que fuese necesario conocer la cantidad exacta de antibióticos que presentan.

Efecto de la transformación de “alpeorujo” por *Corioloopsis rigida* en el crecimiento de la rizobacteria fijadora de N₂ *Azospirillum brasiliensis*

Rosario Díaz¹, Miguel Jurado², M^aJesús Martínez², Inmaculada García-Romera¹, Mario Saparrat³

¹Dpto de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, EEZ-CSIC, Prof. Albareda 1 18008 Granada (rosario.diaz@eez.csic.es); ²Dpto de Microbiología Molecular, CIB-CSIC; ³INFIVE (CONICET), Instituto Spegazzini, Universidad Nacional de La Plata, Argentina

El alpeorujo es un subproducto de la extracción del aceite de oliva cuyo contenido en macronutrientes y micronutrientes hace posible su uso como enmendante orgánico. Sin embargo, su aplicación directa al suelo produce efectos antimicrobianos y fitotóxicos debido a su alto porcentaje fenólico (Sampedro *et al.*, 2007; de la Rubia *et al.*, 2008). En los últimos años se están estudiando procesos de biorremediación de dicho residuo con hongos saprobios entre los que destaca el basidiomiceto *Corioloopsis rigida* que participa en la polimerización de los fenoles libres del alpeorujo debido a su actividad lacasa (Aranda, 2006). Un aspecto importante a tener en cuenta en los estudios de detoxificación de residuos y su posible uso como enmendante es el efecto que puedan tener éstos sobre la población de microorganismos del suelo. Por ello en este trabajo se utilizó como modelo *Azospirillum brasiliensis*, un microorganismo ampliamente distribuido en el suelo y en la rizosfera de numerosas plantas hortícolas.

El objetivo de este trabajo fue el análisis de la reducción de la toxicidad del extracto acuoso de alpeorujo (ADOR) tras su biorremediación con el hongo *C. rigida*, medido como inhibición del crecimiento de *Azospirillum brasiliensis*, con el fin de establecer las bases para el uso agronómico de este residuo.

Para ello, se creció *C. rigida* durante 15 días en medio de cultivo líquido suplementado con diferentes concentraciones de ADOR en presencia o ausencia de cobre (inductor de la producción de lacasa de *C. rigida*) y dichos cultivos se utilizaron para medir su efecto en el crecimiento de *A. brasiliensis*.

Los resultados mostraron que *C. rigida* a los 15 días de incubación redujo significativamente el contenido fenólico de ADOR en cultivos con porcentaje de residuo del 10 y 20 % y que este efecto era más acusado en los cultivos suplementados con cobre. Es importante destacar un aumento significativo del crecimiento de *A. brasiliensis* en los cultivos con un 10 % de ADOR incubado con *C. rigida* en presencia y ausencia de cobre, y en cultivos con 20 % de ADOR incubado con el hongo en presencia de cobre.

Referencias

- Aranda, E., 2006. Fraccionamiento físico del alpeorujo como base para desarrollar una estrategia biológica con hongos saprobios y arbusculares para la eliminación de su fitotoxicidad. Tesis Doctoral, Granada
- De la Rubia, T., Lucas, M., Martínez, J., 2008. Controversial role of fungal laccases in decreasing the antibacterial effect of olive mill waste-waters. *Bioresource Technology* 99 (5), pp. 1018-1025
- Sampedro, I., Marinari, S., D'Annibale, A., Grego, S., Ocampo, J.A., García-Romera, I., 2007. Organic matter evolution and partial detoxification in two-phase olive mill waste colonized by whit-rot fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation* 60 (2), pp. 116-125

Características termodinámicas y cinéticas de compuestos naturales y sintéticos utilizados en los sistemas lacasa-mediador. Su aplicación en la transformación de ligninas

Miguel Ángel Falcón^a, Katuska González Arzola^a y
María del Carmen Arévalo^b

a. Departamento de Microbiología y Biología Celular. Facultad de Farmacia. Universidad de La Laguna. b. Departamento de Química Física. Facultad de Química. Universidad de La Laguna. Avda. Astrofísico Francisco Sánchez s/n, 38206, La Laguna, Tenerife. katiga@hotmail.com

La selección adecuada de compuestos mediadores de la lacasa juega un papel clave para la aplicación de los sistemas lacasa-mediador en diversos procesos industriales. Entre otros, el potencial de oxidación (E_{pa}), la estabilidad electroquímica de los compuestos así como la afinidad de la lacasa por éstos, son parámetros de interés para seleccionar las parejas lacasa-mediador más adecuadas para su uso en la industria.

En el presente trabajo se han seleccionado una serie de compuestos naturales (acetovanillona, acetosiringona, siringaldehído y catecol) y sintéticos (1-hidroxibenzotrizol, HBT; ABTS; ácido violúrico, N-hidroxiftalimida, HPI y TEMPO) con diferentes E_{pa} y estabilidad electroquímica, ambos parámetros valorados por voltametría cíclica. La lacasa usada en este estudio es una enzima extracelular producida por *Fusarium proliferatum*, con gran estabilidad frente al pH y la temperatura. Las constantes cinéticas (K_m , V_{max} y K_{cat}) de esta enzima por los compuestos seleccionados se valoraron por consumo de oxígeno.

De los compuestos naturales ensayados destacaron por sus altos valores de E_{pa} y estabilidad electroquímica en el sistema utilizado (tampón McIlvaine pH 6) el siringaldehído y la acetosiringona, que a su vez mostraron los valores más bajos de K_m (Tabla 1). La lacasa presentó una afinidad por la acetovanillona mayor que la detectada para los compuestos sintéticos ácido violúrico y TEMPO, siendo los potenciales de oxidación de estos tres compuestos muy similar (Tabla 1). Cabe destacar que los valores de K_m obtenidos para los compuestos sintéticos HBT y ácido violúrico fueron similares a las descritas para otras lacasas de alto potencial redox. Los efectos de los sistemas lacasa-mediador sobre la biotransformación de una lignina natural de pino y de una lignina industrial de Kraft se analizaron mediante HPLC y espectrofotometría UV-Visible, relacionando la eficacia del tratamiento con las características electroquímicas y cinéticas de los mediadores.

Tabla 1. Características cinéticas y termodinámicas de los mediadores

Mediadores	K_m (mM)		E_{pa} (mV) vs. SCE	E^0 (mV) vs. SCE
	Lineweaver-Burk	Eadie-Hofstee		
Acetosiringona	0,36 ± 0,14	0,43 ± 0,12	575 ± 9 (I) 779 ± 39 (II)	534 ± 6 (I) -
Siringaldehído	0,33 ± 0,05	0,37 ± 0,03	589 ± 6 (I) 795 ± 60 (II)	542 ± 7 (I) -
Acetovanillona	2,90 ± 0,47	3,64 ± 0,65	659 ± 23	238 ± 13
Catecol	1,23 ± 0,06	1,99 ± 0,56	347 ± 51	663 ± 3
Ácido violúrico (VLA)	4,07 ± 0,61	4,55 ± 0,94	709 ± 8	-
1-hidroxibenzotrizol (HBT)	18,44 ± 3,05	33,66 ± 9,11	854 ± 25	-
TEMPO	4,07 ± 0,61	4,55 ± 0,94	541 ± 5	492 ± 2
N-hidroxiftalimida (HPI)	18,32 ± 0,92	20,53 ± 0,66	845 ± 8	785 ± 2
ABTS	1,23 ± 0,15	4,85 ± 0,39	497 ± 16 (I) 912 ± 6 (II)	441 ± 15 (I) 840 ± 10 (II)

Screening de bacterias lácticas productoras de β -(1 \rightarrow 3)-glucanos

G. Garai-Ibabe¹, P. Fernández de Palencia³, I. Ibarburu¹, J. Areizaga², P. Lopez³, A. Irastorza¹, M. Teresa Dueñas¹

¹*Facultad de Ciencias Químicas. Dpto. Química Aplicada. Universidad del País Vasco. P. Manuel de Lardizabal 3. 20018. San Sebastián. gaizka_garai@ikasle.ehu.es*

²*Facultad de Ciencias Químicas. Dpto. Ciencia y Tecnología de Polímeros. Universidad del País Vasco.*

³*Centro de Investigaciones Biológicas, C.S.I.C. Departamento de Ciencia de Proteínas. Ramiro de Maeztu 9. 28040 Madrid.*

Los exopolisacáridos (EPS) producidos por las bacterias del ácido láctico (BAL) han sido ampliamente estudiados debido a su capacidad gelificante, emulsificante y como agentes para modificar las características reológicas y textura de diferentes alimentos. Entre los EPSs bacterianos se encuentran los (1 \rightarrow 3)- β -D-glucanos, que se ha comprobado que presentan propiedades medicinales y bioactivas beneficiosas para la salud humana, como: la capacidad inmunomoduladora y de reducir los niveles de colesterol y actividad antitumoral, antimicrobiana y antiviral, entre otras (Zekovic et al. 2005; Laroche y Michaud, 2007). Es por ello que ha atraído el interés de empresas farmacéuticas y alimentarias.

En este trabajo se ha realizado un screening de cepas BAL aisladas de sidra natural, con el objetivo de detectar y caracterizar las cepas productoras de (1 \rightarrow 3) β -D-glucanos. De las 147 cepas estudiadas, 33 resultaron ser EPS⁺. Entre éstas, la detección de productoras de β -glucano se realizó mediante la amplificación por PCR del gen *gtf* con primers específicos para la β -D-glucan-sintasa de *Pediococcus parvulus* 2.6. Las cepas positivas fueron identificadas como *P. parvulus* (32) y *Lactobacillus suebicus* (1) mediante el análisis de secuencia del gen 16S rRNA.

En lo que se refiere a la producción de exopolisacárido (EPS), la mayor parte de las cepas estudiadas produjeron entre 30 y 100 mg/L, aunque 3 cepas de *P. parvulus* produjeron cantidades muy superiores (>220 mg/l). La determinaron estructural y del peso molecular de los EPSs, previa purificación y liofilización, se realizó mediante técnicas de RMN (¹H-RMN y COSY) y cromatografía de exclusión molecular (SEC). Todos los EPSs estudiados presentaron la misma estructura, idéntica al (1 \rightarrow 3)- β -D-glucano producido por *P. parvulus* 2.6, y 2 fracciones de EPS de diferente peso molecular, uno de elevado peso molecular (>10⁶ D) y otro de bajo peso molecular (<10⁶ D). Además, se estudió el patrón de fermentación de azúcares de cada cepa para conocer las posibles materias primas consumibles por estos microorganismos.

Entre las cepas productoras de β -glucano se seleccionaron las de mayor interés para evaluar sus características como agentes probióticos; 2 cepas de *P. parvulus* (cepa 1 y 22) y el *L. suebicus* (cepa 33). Para ello, se cuantificaron diferentes parámetros como la supervivencia frente a condiciones simuladas de estrés gastrointestinal, la capacidad de adhesión a células de epitelio intestinal humano Caco-2 y su actividad inmunomoduladora.

- Zekovic, D.B., Kwiatkowski, S., Vrvic, M.M., Jakovijevic, D. y Moran, C.A. (2005) Critical Reviews in Biotechnology. 25, 205-230.
- Laroche, C. y Michaud, P. (2007). Recent Patents on Biotechnology. 1, 59-73.

Aislamiento e identificación de microorganismos psicrófilos de muestras de deshielo de la Antártica

Sergio A. García Echaury¹, Ana P. Barba de la Rosa¹, Antonio De León Rodríguez^{1*}

*¹División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. Camino a la Presa San José 2055, Col. Lomas 4^a. Secc. San Luis Potosí, CP 78216 México. *aleonr@ipicyt.edu.mx*

Se procesaron diversas muestras del deshielo y lodo del glaciar de Collins (62°10'S, 58°55'O) ubicado en el territorio Antártico para aislar e identificar microorganismos psicrófilos. Las muestras fueron plateadas en cajas de Petri conteniendo medios PDA, LB, PYG o medio mínimo, los cultivos fueron incubados a 4°C hasta por 4 semanas. Los microorganismos fueron identificados mediante el análisis de restricción del gen 16S ribosomal amplificado (ARDRA) y posterior secuenciación de los patrones de bandeos únicos. Hasta el momento se han aislado e identificado 53 cepas de bacterias psicrófilas distintas. El análisis de las secuencias mostró una predominancia del grupo de las betaproteobacterias, seguido de las alfa y gamaproteobacterias. Nueve de las especies encontradas ya habían sido descritas en la literatura en otro tipo de muestras de hielo (1-3) mientras que el resto son potencialmente nuevos géneros y especies que no habían sido reportados previamente. Debido a su naturaleza psicrófila, los microorganismos aislados representan un caso excepcional para estudiar y entender los procesos que les ayudan a sobrevivir en un ambiente con muy bajas temperaturas y alto nivel de exposición de rayos UV, además estos microorganismos tienen un gran potencial biotecnológico a través de sus enzimas que son activas a temperaturas bajas y moderadas.

1 Christner, B.C., E. Mosley-Thompson, L.G. Thompson, and J.N. Reeve. (2003) Bacterial recovery from ancient ice. *Environmental Microbiology* 5:433-436

2 Christner, B.C., E. Mosley-Thompson, L.G. Thompson, and J.N. Reeve. (2005). Recovery and identification of bacteria from polar and non-polar glacial ice. In S. O. Rogers and J. Castello (eds), *Life in Ancient Ice*, pp. 209-227. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.

3 Hodson, A.J., A.M. Anesio, M. Tranter, A.G. Fountain, M. Osborn, J. C. Prisco, J. Laybourn-Parry and B. Sattler. (2008). Glacial Ecosystems. *Ecological Monographs*, 78(1):41-67

Identificación de los microorganismos presentes en el kéfir

Cristina García-Marzo, Josune Ayo y Félix Amárta

AZTI-Tecnia/ Unidad de Investigación Alimentaria. Parque Tecnológico de Vizcaya, Edificio 609 Astondo Bidea, 48160 Derio (Vizcaya); cgarcia@azti.es

La producción microbiológica de ácidos grasos conjugados (AGCs) potencialmente funcionales abarca un novedoso campo de investigación. El kéfir constituye un buen sustrato para el aislamiento de bacterias del ácido láctico y levaduras susceptibles de transformar los ácidos grasos en sus isómeros conjugados. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue aislar e identificar los diferentes microorganismos presentes en kéfir de leche y kéfir de agua. Posteriormente se estudiará la capacidad para producir AGCs de cada uno de los microorganismos.

Los microorganismos presentes en los kéfir de leche y de agua se aislaron mediante el siguiente procedimiento. Se preparó una primera dilución tomando 10 g de gránulos de kéfir y llevándolo hasta 100 g con agua de peptona tamponada (APT). A partir de esta dilución se sembraron diluciones seriadas en diferentes medios de cultivo, con objeto de aislar los distintos microorganismos presentes en cada kéfir: agar MRS para lactobacilos, M17 con lactosa o glucosa para lactococos y Sabouraud con cloranfenicol para el desarrollo de levaduras. Se incubaron las placas a 31 °C en atmósfera de CO₂. Posteriormente las colonias aisladas se caracterizaron morfológicamente y se obtuvieron cultivos puros de aquellas que presentaron morfología diferente. Estos cultivos se conservaron a -80 °C en crioviales con 20 % de glicerol.

La identificación de los microorganismos se llevó a cabo mediante una serie de pruebas bioquímicas: tinción de Gram, reacciones de la catalasa y oxidasa, crecimiento a diferentes temperaturas, en presencia de diferentes concentraciones de NaCl, producción de gas a partir de glucosa y ácido glucónico y cuajado de leche. Estas pruebas se complementaron con la realización de los API correspondientes: 50CHL para lactobacilos, Rapid32 Strep para cocos e ID 32C para levaduras. Con el fin de confirmar la identificación (en algunos casos dudosa) obtenida mediante los API, se extrajo el ADN de cada una de las cepas, se amplificaron secuencias concretas del genoma de cada microorganismo, se aislaron los correspondientes amplicones y se secuenciaron.

Entre los microorganismos presentes en el kéfir de leche se identificaron *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis* ssp *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp *cremoris*, *Leuconostoc* spp, *Candida kefir* y *Candida holmii*. A partir del kéfir de agua se aislaron *Bifidobacterium* spp, *Leuconostoc* spp, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida holmii* y *Candida dattila*. De los bacilos aislados, la especie más común fue la homofermentativa *Lactobacillus helveticus*. Este resultado coincide con el descrito por Simova y col., 2002. La especie cocoide mayoritariamente aislada fue *Leuconostoc* spp. En el caso de las levaduras las cepas más frecuentemente identificadas fueron del género *Candida*. Se han publicado trabajos que citan algunos de estos microorganismos como productores de ácido linoleico conjugado (Sieber y col., 2004).

- Simova, E., Beshkova, D., Angelov, A., Hristozova, T., Frengova, G. and Spasov, Z. (2002). *Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 28(1):1-6.
- Sieber, R., Collomb, M., Aeschlimann, A., Jelen, P. and Eyer, H. (2004). *Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products - A review*. International Dairy Journal 14(1):1-15.

Distribución filogenética y rastreo de lipoxigenasas en microarrays de DNA metagenómico

A. Garreta¹, M.A. Manresa¹, S. Pompeia², E. Lemos², M. Busquets³

¹*Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Catalunya, Espanya. *albertgarreta@ub.edu*

²*Laboratório de Bioquímica de Microorganismos e Plantas. Departamento de Tecnologia – FCAV/UNESP, Jaboticabal – SP – Brasil.*

³*Departament de Bioquímica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Catalunya, Espanya.*

El objetivo de este trabajo, fue analizar una librería metagenómica de suelo de una plantación de eucalipto para detectar nuevas lipoxigenasas mediante la técnica del microarray, y conocer mejor la distribución filogenética de esta familia de enzimas en el mundo procariota mediante la comparación de los resultados del array con el análisis del 16S del DNA metagenómico extraído del suelo.

El proceso de cribaje de una librería metagenómica para la detección de clones que contienen genes específicos, entre una gran cantidad de clones, es uno de los pasos más críticos. Para cribar nuestra librería metagenómica, hemos rastreado, mediante PCR con pares de *primers* específicos y degenerados, toda la librería (10.000 clones) trabajando con el DNA cosmidico de cien clones de manera simultánea. Posteriormente, y a partir de los *pools* de cien clones que daban bandas de amplificación de una longitud adecuada, hemos diseñado un microarray metagenómico con la librería cosmidica de dichos clones en una placa de cristal. La hibridación del microarray la hemos realizado con dos sondas marcadas con fluorescencia a partir de los productos de PCR de un gen diana (Lipoxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2, AF479686) obtenidos con dos pares de *primers* que cubren dos regiones distintas del gen (la longitud de las sondas es de 510 pb y 417 pb, cubriendo el 37% de la secuencia del gen).

Los resultados del tratamiento estadístico de los datos extraídos del revelado de los microarrays, indican la presencia de siete clones que superan las condiciones (filtros) más estrictas para poder clasificar el clon como posible portador de una secuencia de lipoxigenasa.

Agradecimientos:

A la financiación de la “Comissió Interdepartamental de Recerca i Tecnologia CIRIT” proyecto 2005GR00143 y a la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT), proyecto CTQ2007-60749/PPQ y al proyecto HBP2006-0027 del Ministerio de Educación y Ciencia.

Centro para el desarrollo de Bioprocesos. Estudio de las diferentes etapas en el cambio de escala en procesos de fermentación

Glòria González Anadón, Antoni Casablanca Mira, Oscar Fernández Cecilia

*Planta Pilot de Fermentació (PPF), miembro de la Xarxa Innovació Tecnològica (GdC)
Dpt. d'Enginyeria Química, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra*

La Planta Piloto de Fermentación tiene como finalidad principal el desarrollo a escala semi-industrial de productos obtenidos a partir del cultivo de células y microorganismos, ya sean bacterias, hongos o levaduras, modificados o no genéticamente. En los objetivos del Centro se plantea tanto la obtención del producto como el estudio del desarrollo del proceso que permita obtener la información necesaria para su posterior producción a escala industrial.

La Planta Piloto de Fermentación dispone de instalaciones aptas para el desarrollo de procesos con microorganismos en biorreactores, ya sea en procesos en continuo, en discontinuo (batch) o en discontinuo alimentado (fed-batch). Además dispone del equipamiento necesario para el estudio y la realización de las etapas primarias de recuperación del producto.

La actividad del centro está dirigida a aquellas industrias que requieran una instalación apta para desarrollar procesos i/o obtener productos a escala piloto. En este ámbito se sitúan empresas de los sectores farmacéutico y veterinario, química fina y agroalimentario. El Centro se dirige también a instituciones de investigación que requieran obtener moléculas de interés en cantidades superiores a las obtenidas a escala de laboratorio, para la realización de estudios científicos de estructura, función, actividad, rendimientos, etc.

La PPF se plantea como objetivos durante el desarrollo de sus proyectos, la transferencia de experiencia y conocimiento en las áreas de diseño de bioprocesos: Obtención y preservación de cepas, determinación de los requerimientos esenciales para la mejora del medio de cultivo, realización de cinéticas de crecimiento y producción, estrategias de cultivo en bioreactor, cambio de escala, determinación de las etapas de recuperación del producto, así como servicios de formación y consultoría técnica.

Asimismo, todos los proyectos se desarrollan garantizando la confidencialidad de procesos y productos y de acuerdo con las directrices de un sistema de gestión de la calidad basado en la normativa ISO9001.

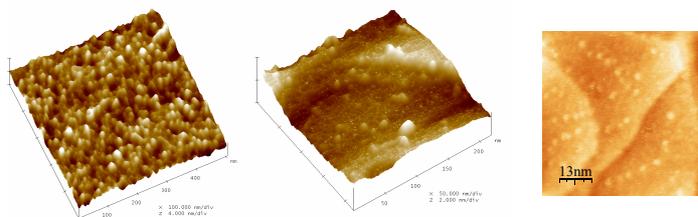
Inmovilización de una nueva lacasa producida por *Fusarium proliferatum* en oro, carbon vítreo y HOPG. Análisis electroquímico y microscópico

**Katiuska González Arzola^a, Yurima Gimeno^b, María del Carmen Arévalo^b,
Miguel Ángel Falcón^a y Alberto Hernández Creus^b**

a. Departamento de Microbiología y Biología Celular. Facultad de Farmacia. Universidad de La Laguna. b. Departamento de Química Física. Facultad de Química. Universidad de La Laguna. Avda. Astrofísico Francisco Sánchez s/n, 38206, La Laguna, Tenerife. katiga@hotmail.com

Las lacasas (*p*-difenol-oxígeno-oxidoreductasas, EC 1.10.3.2) son enzimas producidas principalmente por hongos, que catalizan la oxidación de fenoles y diaminas aromáticas y poseen cobre en su centro activo¹. Su baja especificidad de sustrato le confiere un gran interés para su aplicación biotecnológica en la industria papelera, textil y alimentaria, así como en la fabricación de biosensores². El estudio de las reacciones de transferencia directa de electrones (DET) de lacasas inmovilizadas en diferentes tipos de electrodos ha recibido especial atención en los últimos años debido a su potencial empleo en la construcción de microelectrodos y de células de biocombustible³.

La lacasa producida por el hongo *Fusarium proliferatum* fue purificada hasta homogeneidad electroforética y posteriormente inmovilizada en Au(111) y grafito pirolítico altamente orientado (HOPG) mediante adsorción física. Estos sustratos modificados fueron observados mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) y de efecto túnel (STM). Las imágenes obtenidas por AFM mostraron una gran población de moléculas de lacasa en ambas superficies, siendo mayor en oro, lo que sugiere una fuerte interacción entre los átomos de cobre de la enzima y el oro. Las moléculas de lacasa inmovilizadas en Au(111) presentaron un tamaño medio de 7-8 nm de ancho y 0.5-0.6 nm de altura. La respuesta electroquímica de los electrodos modificados con lacasa (carbón vítreo, HOPG y oro policristalino) fue analizada mediante voltametría cíclica (CV) y de onda cuadrada (SWV) en condiciones anaeróbicas. Mediante SWV se registraron dos respuestas anódicas aproximadamente a 400 y 800 mV vs. SCE, posiblemente atribuidos a los centros de cobre T2 y T1 de la proteína, respectivamente. La eficiencia catalítica de los electrodos modificados fue evaluada mediante CV y espectrofotometría UV-Vis en presencia de dos mediadores de la enzima, ácido violúrico y 2,6 dimetoxifenol.



Imágenes obtenidas por AFM y STM de Au(111) modificado con lacasa

Referencias:

1. Thurston, C. F. *Microbiology* **1994**, *140*, 19.
2. Pita, M.; Shleev, S.; Ruzgas, T.; Fernández, V. M.; Yaropolov, A. I.; Gorton, L. *Electrochem. Commun.* **2006**, *8*, 747.
3. Shleev, S.; Jarosz-Wilkolazka, A.; Khalunina, A.; Morozova, O.; Yaropolov, A.; Ruzgas, T.; Gorton, L. *Bioelectrochemistry* **2005**, *67*, 115.

Novel antifungal triterpenes from *Colletotrichum acutatum sensu lato*

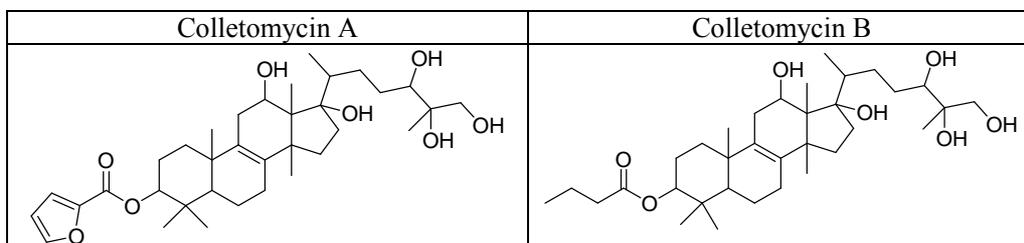
Antonio González del Val¹, Javier Collado¹, Guy Harris², Stefan Galuska², Julia Feliz¹, Gonzalo Platas¹, Gerald Bills¹, M. Teresa Diez¹, Susanne Mandala³, James Milligan³, Paul Liberator³, Fernando Peláez¹ and Francisca Vicente¹

¹Centro de Investigación Básica, Madrid Spain, ²Basic Chemistry and ³Infectious Disease Research, Merck Research Laboratories, Rahway, NJ

Yeast cells are known to respond to cell wall damage (caused by mutation or antifungal agents) by increasing expression of a number of glycosylated proteins, including Cwp 1p. An agar plate format assay using a *Sacharomyces cerevisiae* strain containing a gene fusion of the *Cwp 1p* gene to β -galactosidase as reporter gene was developed to identify cell wall synthesis inhibitors (LacZ gene fusion Assay). Cell wall inhibitors at sublethal doses induce the expression of the gene fusion, resulting in the production of β -galactosidase specific activity. Increased activity is detected using the substrate 4-methylumbelliferyl-galactoside, which becomes fluorescent upon cleavage by β -galactosidase. Using this screen in a semi-automated fashion we tested more than 100,000 natural product extracts derived from fermentations of actinomycetes and fungi from diverse substrates and geographies. Extracts producing inhibition zones surrounded by a fluorescent ring were selected as candidates for isolation chemistry.

This screen was validated by the discovery of a number of known natural cell wall inhibitors, including diverse echinocandins and papulacandins, as well as acidic triterpenes (arundifungin, enfumafungin). Moreover, this assay resulted in the discovery of a family of novel triterpenes^a produced by several isolates identified as *Colletotrichum acutatum sensu lato*. Details on the discovery and biological activity of these novel compounds will be presented.

(a).- novel triterpenes structures



Detección y cuantificación de bacterias lácticas productoras de β -glucano mediante RTi-PCR

I. Ibarburu¹, R. Aznar^{3,4}, Elizaquível, P³, A. Munduate², A. Irastorza¹, M. Teresa Dueñas¹

^{1*} *Facultad de Ciencias Químicas. Dpto. Química Aplicada. Universidad del País Vasco. P. Manuel de Lardizabal 3. 20018. San Sebastián. idoia.ibarburu@ehu.es*

² *Facultad de Ciencias Químicas. Dpto. Física de Materiales. Universidad del País Vasco. P. Manuel de Lardizabal 3. 20018. San Sebastián.*

³ *Departamento de Microbiología, Universitat de València, Burjassot, Valencia;*

⁴ *Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Burjassot, Valencia*

Ciertas bacterias ácido lácticas sintetizan exopolisacáridos (EPS) y estas bacterias o sus EPSs pueden ser usadas en la industria alimentaria para mejorar la textura y estabilidad, así como las propiedades organolépticas de ciertos productos como quesos o yogures. Sin embargo, estos EPS pueden tener efectos deletéreos en la textura de bebidas alcohólicas como sidras, vinos y cervezas. En concreto, en la elaboración de sidra natural se producen ocasionalmente sidras “ahiladas”, muy viscosas y de aspecto aceitoso, debido a la producción de EPS por parte de las BAL, tras la fermentación maloláctica. La mayor parte de las bacterias lácticas aisladas de estas sidras, e implicadas en esta alteración, son productoras de β -(1 \rightarrow 3)-glucanos. En este trabajo, hemos puesto a punto un método de PCR a tiempo real para la detección y cuantificación de bacterias lácticas productoras de estos polisacáridos, que podría ser utilizado para el seguimiento de estas cepas, en caso de utilizarse como coadyuvantes de fermentación, así como para la prevención del ahilado en bebidas mediante la detección temprana de estas cepas.

Previamente se aisló de una sidra ahilada la cepa *Pediococcus parvulus* 2.6, productora de un exopolisacárido (1), cuya caracterización estructural reveló que sintetiza un (1 \rightarrow 3)- β -D-glucano. El gen *gtf* de *P. parvulus* 2.6, codificante para la glicosiltransferasa responsable de la síntesis del glucano, fue clonado y secuenciado. El producto del gen *gtf* es homólogo a los miembros de la familia de las glicosiltransferasas tipo 2 y su dominio catalítico está flanqueado por regiones transmembranales. Este gen ha sido detectado en otras cepas de BAL EPS⁺, que producen el mismo EPS que *P. parvulus* 2.6. Para la puesta a punto del método de PCR a tiempo real basado en el gen *gtf*, se han diseñado cebadores específicos y se han optimizado las condiciones de amplificación. Todas las cepas productoras de (1 \rightarrow 3)- β -D-glucano mostraron amplificación con los cebadores específicos. La cuantificación fue lineal en un rango de 5 unidades logarítmicas, tanto con las diluciones decimales seriadas del ADN purificado como con las suspensiones celulares de *P. parvulus* 2.6. Además, se estudió la evolución a lo largo del tiempo de las poblaciones alterantes en la sidra.

- (1) Werning, M.L., Ibarburu, I., Dueñas, M.T., Irastorza, A., Navas, J., López, P. The *Pediococcus parvulus gtf* gene encoding the GTF glycosyltransferase and its application for specific PCR detection of β -D-glucan producing bacteria in foods. *J. Food Prot.* 69 (1), 161-169. 2006

Pichia navarrensis* sp. nov. aislada de raíces de *Allium sativum**Alvaro Lafraya¹, Lucas del Castillo², Julio Polaina¹**

1. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Apartado de Correos 73, E-46100 Burjassot, Valencia, Spain. 2. Sección Departamental de Microbiología, Facultat de Farmacia, Universidad de Valencia, Spain.

Las invertasas e inulinasas son enzimas estructural y filogenéticamente relacionadas que hidrolizan sacarosa e inulina, respectivamente. Estas enzimas pueden ser utilizadas para la biosíntesis de fructooligosacáridos (FOS), compuestos de importancia industrial por sus propiedades probióticas. Algunas hortalizas como la cebolla (*Allium cepa*) y el ajo (*Allium sativum*) contienen cantidades apreciables de sacarosa e inulina y son por tanto fuentes potenciales de microorganismos productores de invertasa e inulinasa. Con el fin de caracterizar levaduras productoras de las enzimas de interés se tomaron muestras de tierra asociada a raíces de plantas de cebolla y ajo procedentes de un huerto situado en el término municipal de Ribaforada (Navarra) y se inocularon en medio de cultivo líquido con distintas fuentes de carbono (inulina, sacarosa, glucosa y fructosa). Alícuotas de estos cultivos se sembraron en cajas de Petri, a partir de las cuales se seleccionaron seis tipos de colonias de levadura morfológicamente distinguibles. Para su clasificación taxonómica, se aisló DNA de estos clones y se amplificaron mediante PCR la región que comprende el rDNA 5,8S y zonas flanqueantes ITS1 y ITS2, y la región variable D1/D2 del rDNA 28S. Las secuencias de cinco de las seis levaduras estudiadas mostraron identidad prácticamente completa con secuencias pertenecientes a *Trichosporon mucoides* y *Candida tropicalis*. La secuencia restante mostró elevado parecido, pero no concordancia total, con la región D1/D2 de una especie de levadura poco caracterizada: *Pichia onychis*. Para estudiar la relación existente entre las dos levaduras se ha llevado a cabo un estudio comparativo de ambas, que incluye además de la secuencia de DNA ribosómico (en la que se ha encontrado aproximadamente 4% de divergencia), otros criterios como el metabolismo de azúcares, aspecto colonial, capacidad de miceliación y cariotipo por electroforesis en campo pulsado (dotación cromosómica). Las diferencias observadas son suficientemente significativas para proponer que la levadura aislada en este estudio representa una nueva especie que ha sido denominada *Pichia navarrensis*.

La CECT, centro de recursos biológicos microbianos al servicio de la Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana

Laura López-Ocaña, José Miguel López-Coronado y Esperanza Garay

Colección Española de Cultivos Tipo-CECT, Universidad de Valencia. Campus de Burjassot, 46100, Burjassot, Valencia info@cect.org

Introducción

Con casi 50 años de historia desde su fundación en 1960, la Colección Española de Cultivos Tipo (www.cect.org) mantiene más de 7000 cepas de bacterias, hongos filamentosos y levaduras, entre las que se encuentran numerosas especies de importancia en alimentos. Entre estas se encuentran tanto las que participan en procesos biotecnológicos para la obtención de diversos productos, constituyen cepas de referencia para estudios taxonómicos, controles en ensayos de calidad o desarrollo de nuevos métodos de detección de microorganismos, como las que presentan efectos probióticos.

Funciones y Servicios

Los dos servicios más conocidos de la CECT son el actuar como centro receptor de microorganismos bajo diferentes modalidades (público, restringido y para fines de patentes) y como centro público y oficial de suministro de cepas microbianas para los más diversos usos. Conviene destacar que desde 1992, la CECT es autoridad internacional de depósito de patente según el tratado de Budapest. Además, la CECT ofrece otros servicios como la identificación de cepas microbianas, cursos especializados, asesoramiento en taxonomía y nomenclatura, etc. La información sobre todos ellos queda recogida en la página web.

La CECT ha desarrollado recientemente dos nuevas presentaciones (ACTICULT 3R y CECT 6R), que facilitan y simplifican el trabajo con los microorganismos, al no tener que manipular y reconstituir los cultivos liofilizados. Asimismo, la CECT ha puesto a disposición de sus usuarios una serie de cepas de referencia certificadas para determinadas características fenotípicas útiles para los más diversos usos en investigación, ensayos de comparación interlaboratorios, acreditaciones en distintas técnicas de detección de microorganismos, controles de calidad en hospitales y laboratorios de salud pública, etc.

Política de calidad y reglamento de uso

Desde 2004 la CECT está certificada según la norma ISO 9001:2000 con el alcance: "Preparación, venta y distribución de cultivos microbianos (bacterias, hongos filamentosos y levaduras)" y cuenta desde entonces con un Acuerdo sobre Transferencia de Materiales (MTA) para asegurar la trazabilidad y calidad de sus cepas.

La CECT como CRBM (Centro de Recursos Biológicos Microbianos)

Al igual que ha sucedido en los países europeos más avanzados, España debe contar con un centro de estas características para atender las demandas de la OCDE relativas a la conservación de los recursos biológicos. En el caso particular de los microorganismos, este centro es la CECT, que está desempeñando en la actualidad las funciones que definen a un BRC según la OCDE en el sentido de proporcionar servicios esenciales a la comunidad científica y a las empresas y otros organismos relacionados con la salud pública para la investigación básica o aplicada.

Caracterización y análisis funcional de la región que contiene los genes *phoR* y *phoP* en el organismo productor de tacrolimus *Streptomyces sp* ATCC 55098

Miriam Martínez-Castro^{2*}, Carlos Barreiro¹ y Juan Francisco Martín^{1,2}

¹INBIOTEC, Parque Científico de León. Avda. Real, 1. 24006, León, España.

²Área de Microbiología, Facultad CC Biológicas y Ambientales, Universidad de León, Campus de Vegazana, s/n. 24071, León, España.

La importancia de la cepa *Streptomyces sp.* ATCC 55098 radica en la producción del compuesto con propiedades inmunosupresoras denominado tacrolimus, el cual es ampliamente usado en clínica para evitar el rechazo en los trasplantes de órganos. Hasta la fecha, se han realizado numerosos estudios clínicos de este compuesto, así como la optimización de la producción a gran escala. Sin embargo, es muy escaso el conocimiento que se posee sobre la biosíntesis y los mecanismos de regulación de la misma.

Una alta concentración de fosfato en el medio influye negativamente en la producción de metabolitos secundarios en varias especies del género *Streptomyces*. Esta respuesta está mediada por el sistema de dos componentes PhoR-PhoP, donde PhoR es la proteína sensora y PhoP el activador transcripcional. La delección de estos genes en *Streptomyces lividans* y *Streptomyces natalensis* (Sola-Landa *et al* 2003; Mendes *et al*, 2007), favorece la superproducción de metabolitos secundarios. Un mecanismo similar podría participar en la regulación de la biosíntesis de tacrolimus en *Streptomyces sp.* ATCC 55098.

El estudio de los genes *phoR* y *phoP* en la cepa productora de tacrolimus requiere en primer lugar la secuenciación de los mismos. Una región de 11,5 kb ha sido secuenciada. Las proteínas codificadas por estos genes guardan una alta similitud con sus ortólogas en otras especies del mismo género (80-97%). Los genes *phoR-phoP* se localizan en la misma orientación en el genoma de *Streptomyces sp.* ATCC 55098 separados por 5 nucleótidos. Corriente arriba del gen *phoR* y en sentido contrario se localiza el gen *phoU* (modulador del control por fosfato). Si bien la región localizada corriente abajo de *phoP* mantiene una organización similar a la encontrada en otras especies de *Streptomyces*, no ocurre lo mismo en la región adyacente a *phoU*.

La deficiencia de fosfato en el medio provoca la activación de los genes del regulón PHO mediante la unión de PhoP a las denominadas cajas PHO, las cuales se localizan en la región promotora de dichos genes. Estas cajas se componen de unidades de repetición directa de 11 nucleótidos dispuestas en tandem (Sola-Landa *et al*, 2007). Un análisis informático ha permitido localizar dos posibles zonas con cajas PHO en la región secuenciada de *Streptomyces sp.* ATCC 55098 (*phoR-U*, *carD*). Mediante ensayos de movilidad electroforética se ha confirmado la presencia de dos cajas PHO en la región intergénica *phoR-phoU*. Por el contrario, no se ha observado retraso al utilizar la región promotora del hipotético regulador transcripcional *carD*, situado corriente abajo del gen *phoP*.

Estudios de protección con DNasaI revelan la secuencia de las cajas PHO, las cuales contienen unidades de repetición directa de 11 nucleótidos que coinciden con la secuencia consenso descrita en el género *Streptomyces* (Sola-Landa *et al.*, 2008).

Sola-Landa A, Rodríguez-García A, Apel AK, Martín JF. (2008) *Nucleic Acids Res.* 36(4):1358-68.

Sola-Landa A, Moura RS, Martín JF. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(10):6133-8

Mendes MV, Tunca S, Antón N, Recio E, *et al* (2007) *Metab Eng.* 9(2):217-27.

Producción de Ácidos Grasos Trihidroxilados por *Pseudomonas aeruginosa* 42A2

I. Martín¹, M. Bassas, A. Manresa² y J. Llorens³

¹*Departament de Microbiologia y Parasitologia Clíniques, Facultat de Farmàcia.
Universitat de Barcelona. Avda. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Espanya.
imartin@ub.edu*

²*Departament de Microbiologia y Parasitologia Clíniques, Facultat de Farmàcia.
Universitat de Barcelona. Espanya.*

³*Departament d'Ingenieria Química, Facultat de Química. Universitat de Barcelona.
Espanya.*

El objetivo de este trabajo fue la producción y caracterización de ácido grasos trihidroxilados debido al creciente interés que han suscitado este tipo de compuestos debido a sus características antifúngicas [1, 2]. Dichos compuestos derivan de una fuente oleosa rica en ácidos grasos, que presenta una composición semejante a la de los residuos grasos industriales.

La producción de dichos compuestos se produjo en un biorreactor. Durante la producción de estos compuestos se observa la formación de una gran cantidad de espuma debido a compuestos intermedios de reacción que presentan propiedades tensioactivas [3]. Este hecho limita el proceso de escalado, así como la modelización del proceso. Para paliar esta formación se ha utilizado membranas cerámicas [4] para mejorar la solubilidad del oxígeno en el medio cultivo y diversas estrategias de alimentación de la fuente de carbono.

Tras los diversos regímenes de alimentación se obtuvieron resultados dispares, así como, la producción de dos isómeros estructurales [1].

[1]Kim, H., Gadner, H.W. and Hou, C.T. (2000) Production of isomeric 9,10,13, (9,12,13)-trihydroxy-11E(10E)-octadecenoic acid from linoleic acid by *Pseudomonas aeruginosa* PR3. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnonology* **25**: 109-115.

[2]Kuroda, H., Kobayashi, N., Kaneda, H., Watari, J., Takashio, M. (2002) Characterization of Factors That Transform Linoleic Acid into Di- and Trihydroxyoctadecenoic Acids in Mash. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **93** (1): 73-77.

[3]Culleré, J., Durany, O., Busquets, M., Manresa, A. (2001) Biotransformation of oleic acid into (E)-10-hydroxy-8-octadecenoic acid and (E)-7,10-dihydroxy-8-octadecenoic acid by *Pseudomonas* sp. 42A2 in an immobilized system. *Biotechnology Letters* **23**: 215-219.

[4]Dhariwal, A. (2007) The significance of Submerged Ceramic Membrane systems for production oriented Bioprocesses. Tesis Doctoral. Univerität des Saarlandes.

Heterologous expression in *Escherichia coli*, optimization of *in vitro* refolding, and enzymatic characterization of an unique lignin peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes cervina*

Yuta Miki^{a*}, María Morales^a, Francisco J. Ruiz-Dueñas^a, María J. Martínez^a, Hiroyuki Wariishi^b, Angel T. Martínez^a

^a Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, E-28040 Madrid, Spain; ^b Department of Forest & Forest Products Science, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 8128581, Japan (yutam@cib.csic.es)

Lignin degradation by fungal peroxidases, including lignin peroxidase (LiP) and versatile peroxidase (VP), initiates by one-electron long-range transfer to heme, involving an exposed tryptophanyl radical¹. *Trametes cervina* lignin peroxidase (TcLiP) shares catalytic mechanisms with the above peroxidases². However, the catalytic tryptophan residue conserved in all LiPs and VPs, is absent in TcLiP. Furthermore, TcLiP is the only ligninolytic peroxidase that has a tyrosine residue in its sequence (Tyr181), being located also on the protein surface. By using protein chemical modification, Tyr181 was suggested to be the substrate oxidation site of TcLiP³. Detailed catalytic mechanism of TcLiP, including Tyr181 role, is very interesting, but it has not investigated so far because of very low yield of wild enzyme.

To obtain enough amount of protein for detailed characterization of catalytic mechanism, heterologous expression system of TcLiP in *Escherichia coli* was constructed. cDNA encoding putative mature TcLiP, which was predicted by using multiple alignment analysis with LiP and VP genes, was cloned and inserted into the pET expression vector. Recombinant TcLiP (TcLiP*) protein was produced in *E. coli* BL21(DE3)pLysS. TcLiP* protein was mainly located in insoluble inclusion bodies as an inactive form. To obtain activated TcLiP*, reported refolding conditions of other fungal peroxidases were tested, and the influence of varying several parameters was investigated to optimize the TcLiP* refolding condition. The optimum condition was the following; refolding was carried out for 72 h at 4°C in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 9.5, containing 0.4 M urea, 0.6 mM GSSG, 5 mM CaCl₂ and 5 µM hemin. Refolding yield against total protein in refolding mixture was up to 3.5%, which was equal level to those of other class II and class III peroxidases.

The electron absorption spectrum of activated TcLiP* closely resembled that of wild TcLiP, suggesting that TcLiP* was refolded correctly. TcLiP* exhibited oxidation activity against 1,4-dimethoxy benzene, and ferrocyclochrome *c*, proving that activated TcLiP* possessed similar catalytic features, high redox potential and widely substrate specificity, as wild TcLiP. Though the steady-state kinetics constants of veratryl alcohol (LiP's physiological substrate) oxidation were different from those of wild enzyme, it could be because of the absence of glycosylation in TcLiP* that caused low stability at acidic pH (< pH 3.5). Detailed transient-state kinetic study using stopped-flow spectrophotometry is now in progress.

¹ Pérez-Boada, M., Ruiz-Dueñas, F.J., Pogni, R., Basosi, R., Choinowski, T., Martínez, M.J., Piontek, K., and Martínez, A.T. (2005) *J. Mol. Biol.* 354: 385-402.

² Miki, Y., Tanaka, H., Nakamura, M., and Wariishi, H. (2006) *J. Fac. Arg., Kyushu Univ.* 51, 99-104.

³ Miki, Y., and Wariishi, H. (2006) *Proc. Intern. Symp. Mushroom Sci., Akita, Japan, 20-22 September*, pp 183-184.

Regulación de las actividades lacasa, tirosinasa y lisina oxidasa en *Marinomonas mediterranea*

L. Molina-Quintero, I. Córcoles-Sáez, P. Lucas-Elío y A. Sánchez-Amat

Departamento de Genética y Microbiología. Universidad de Murcia. Murcia 30100, luisaraquel.molina@alu.um.es.

Marinomonas mediterranea es una bacteria marina melanogénica que expresa diferentes actividades oxidasa. Posee todas las actividades polifenol oxidasa conocidas debido a la expresión de dos cuproproteínas diferentes. PpoB1 es una tirosinasa implicada en la síntesis de melaninas (Lopez-Serrano *et al.*, 2004). La segunda polifenol oxidasa, PpoA, es una lacasa de membrana cuya función fisiológica es desconocida (Solano *et al.*, 2000). Además, *M. mediterranea* sintetiza una proteína con actividad L-lisina- ϵ -oxidasa, inicialmente denominada marinocina por nuestro grupo. Esta proteína posee actividad antimicrobiana debido a la generación de peróxido de hidrógeno como uno de los productos de reacción (Gómez *et al.*, 2006). Así, la gran variedad de actividades oxidasa expresadas por *M. mediterranea* la convierten en un buen modelo de estudio de regulación de dichas actividades. El conocimiento de los factores que regulan las actividades oxidasa en este organismo sería de utilidad en biotecnología con el fin de obtener niveles de expresión máxima que faciliten la caracterización de las enzimas y sus aplicaciones biotecnológicas. Al mismo tiempo, aportaría datos sobre la función fisiológica de estas enzimas en bacterias.

Este estudio se ha abordado con dos aproximaciones diferentes. Por una parte, se han medido las actividades enzimáticas en diferentes condiciones de cultivo, y por otra, se han creado fusiones transcripcionales de las regiones promotoras de los tres genes mencionados anteriormente con el gen *lacZ* para estudiar la regulación transcripcional de su expresión. Las fusiones con *lacZ* se han introducido tanto en el fondo genético silvestre (cepa MMB-1R) como en el fondo genético de la cepa T103, un mutante afectado en la proteína PpoS, una histidín quinasa de membrana que forma parte de un sistema regulador de dos componentes que capta señales ambientales y transmite esos cambios al interior celular mediante una cascada de transferencia de grupos fosfato (Lucas-Elío *et al.*, 2002).

Los resultados obtenidos indican que todas las actividades oxidasa objeto de estudio están reguladas por PpoS por lo que pueden formar parte de una respuesta coordinada frente a determinadas condiciones ambientales. Esta regulación ocurre a nivel transcripcional en el caso de la actividad lisina oxidasa. Además, todas las actividades están reguladas por fase de crecimiento a nivel transcripcional, alcanzándose niveles máximos en fase estacionaria.

Gómez, D., P. Lucas-Elío, A. Sanchez-Amat, and F. Solano. 2006. *Biochim Biophys Acta* **1764**:1577-1585.

López-Serrano, D., F. Solano, and A. Sanchez-Amat. 2004. *Gene* **342**:179-187.

Lucas-Elío, P., F. Solano, and A. Sanchez-Amat. 2002. *Microbiology* **148**:2457-2466.

Solano, F., P. Lucas-Elío, E. Fernández, and A. Sanchez-Amat. 2000. *J. Bacteriol.* **182**:3754-3760.

Caracterización de la actividad lipolítica de la bacteria halófila extrema *Salicola* sp. IC10

M.L. Moreno*¹, M.T. García¹, A. Ventosa¹, César Mateo²,
Jose M. Guisán² y E. Mellado¹

¹Dpto. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. C/ Profesor García González, 2, 41012 Sevilla (lmoreno@us.es)

²Dpto. de Biocatálisis, Instituto de Catálisis, CSIC, Campus Universidad Autónoma, Cantoblanco, 28049 Madrid

La mayoría de los trabajos de biodiversidad realizados en los ambientes hipersalinos hasta la fecha, se han centrado en el estudio de bacterias halófilas moderadas y de haloarchaeas, que comprenden el principal componente microbiano en este tipo de ambientes. Sin embargo, son escasos los estudios ecológicos dirigidos al aislamiento y detección de halófilos extremos capaces de producir enzimas hidrolíticas. Por ello, se realizó un screening en salinas del sur de España encaminado a determinar la biodiversidad de microorganismos halófilos extremos productores de hidrolasas, lo cuál constituye un tema de investigación interesante, no solo desde el punto de vista ecológico de los aislamientos sino por el gran potencial biotecnológico de las enzimas producidas por los mismos.

La cepa IC10 fue aislada de una salina de Huelva y se clasificó taxonómicamente como *Salicola* sp. IC10. Esta cepa ha sido seleccionada para estudios posteriores por su actividad hidrolítica doble (lipasa y proteasa). Con objeto de cuantificar la actividad lipolítica en las diferentes fracciones celulares, se utilizaron como sustratos ésteres de *p*-nitrofenol en un ensayo colorimétrico, obteniéndose actividad únicamente en la fracción intracelular. El análisis zimográfico del extracto celular reveló la presencia de al menos dos enzimas lipolíticas de distinto tamaño. Por el contrario, los ensayos de hidrólisis de la caseína permitieron determinar la localización de la enzima proteolítica en la fracción extracelular.

Entre las hidrolasas, las lipasas constituyen un grupo de enzimas de enorme interés dado que muestran una gran regio, quimio y estereoselectividad, no requiriendo cofactores y permaneciendo activas en disolventes orgánicos (Jaeger y Eggert, 2002). Estas propiedades las hacen excelentes para su uso en biotransformaciones en el ámbito de la alimentación, biosíntesis, bioremediación y en la industria de detergentes.

Actualmente se está procediendo a la purificación de las enzimas responsables de la actividad lipolítica en la fracción intracelular de la cepa IC10. Para ello se ha diseñado una estrategia de purificación haciendo uso de diferentes soportes: hidrofóbicos (octil-agarosa), iónicos (DEAE-agarosa), así como quelatos metálicos (IDA-Ni). Una vez purificadas las enzimas lipolíticas, se procederá a la digestión enzimática de las mismas y posterior microsecuenciación del extremo amino terminal mediante MALDI-TOF. Paralelamente se han iniciado estudios para abordar la clonación del gen responsable de esta actividad lipolítica, mediante alineamiento de secuencias depositadas en las bases de datos y posterior diseño de cebadores a partir de dominios conservados.

Jaeger, K.E. y Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 13: 390-397.

Efectos de la expresión en *Saccharomyces cerevisiae* sobre los requerimientos de calcio de la pectato liasa A de *Paenibacillus barcinonensis*

Mormeneo, M., Pastor, F.I.J. y Zueco, J.

*Dpto. de Microbiología. Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia.
Avda. Vte. Andrés Estellés s/n. 46100 Burjassot. Valencia. jesus.zueco@uv.es*

**Dpto. de Microbiología. Facultad de Biología, Universidad de Barcelona.
Avda. Diagonal, 645. 08028 Barcelona.*

Los enzimas pectinolíticos, incluyendo las pectato liasas, son enzimas producidos por plantas y microorganismos que de forma natural participan en la maduración de frutas y en el desarrollo del polen. Tradicionalmente, estos enzimas se han empleado en la elaboración de zumos y vinos, si bien su gran versatilidad les ha permitido desempeñar un papel esencial no sólo en la industria alimentaria sino también en las industrias papelera y textil.

Estudios previos habían permitido caracterizar la pectato liasa A de *Paenibacillus* sp. BP-23, cuyo rasgo más distintivo frente a otras pectato liasas es su elevada actividad enzimática sobre pectinas altamente metiladas. Aunque había sido posible su clonación y expresión en *Escherichia coli*, hasta el momento no se había tratado de expresar este enzima en *S. cerevisiae*. Por lo que se decidió emplear la proteína Pir4 de la pared celular de *S. cerevisiae* como compañera de fusión para determinar la secreción al medio de cultivo, o la localización en la pared celular, de proteínas recombinantes que incluyeran la región codificante de dicho enzima.

En este trabajo no sólo se describe por primera vez la expresión, secreción e inmovilización de la pectato liasa de *Paenibacillus* sp. en *S. cerevisiae*, sino que además ha sido posible caracterizar el enzima en este nuevo hospedador.

Identificación de bacterias lácticas y levaduras de muestras de aceitunas de mesa de Túnez

**Nada Ben Omar¹, Albert Hurtado*², Nicolas Rozès², Albert Bordons²,
Nadia Chammem¹, Moktar Hamdi¹, Cristina Reguant²**

*Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie INSAT, Université 7
Novembre a Carthage, 1 Boulevard de la Terre, 1080 Tunis, Túnez*
*Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i
Virgili, Campus Sescelades, c/ Marcel·lí Domingo, s/n, Tarragona 43007, Catalunya,
Espanya*

Se recolectaron muestras de salmueras de aceitunas de mesa de diversas variedades y elaboradas por diversos métodos en diferentes lugares de Túnez. Las muestras se sembraron en diferentes medios para aislar bacterias lácticas (MRS) y levaduras (YPD). Puesto que el principal microorganismo propuesto como responsable de la fermentación de las aceitunas es *Lactobacillus pentosus*, los aislados se analizaron mediante una PCR multiplex capaz de diferenciar entre las especies *L. pentosus*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus paraplantarum*. Aquellas muestras que no respondieron a la técnica se analizaron mediante la técnica 16S-ARDRA y sus perfiles de restricción se confrontaron con cepas tipo. El 45% de las muestras fueron cepas de *L. pentosus*, un 38% de las muestras fue *L. plantarum*, un 13% de las muestras fueron *Lactobacillus rhamnosus* y el 4% restante fueron cepas de *Leuconostoc* ssp.

Para identificar las levaduras se utilizó el análisis RFLP del gen 5.8S rRNA y los dos ITS ribosomales. Se observó que la variedad de especies era muy escasa, probablemente debido a que las muestras se tomaron en estadios avanzados de la fermentación, momento en que la diversidad de levaduras es mucho menor que en estadios iniciales. Las únicas tres especies identificadas fueron *Pichia membranaefaciens* (19%), *Candida boidinii* (54%) y *Pichia anomala* (27%).

Conocer las diferentes especies de levaduras y de bacterias lácticas presentes en las diferentes variedades de aceitunas es un primer paso de cara a seleccionar inóculos adecuados para cada variedad de aceituna según el proceso de elaboración a que se someta.

Identificación, purificación y caracterización de una nueva lipasa de *Pseudomonas* sp. CR-611

Paola Panizza, Nikolia Syfantou, Pilar Diaz

*Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona
Av. Diagonal 645, 08028-Barcelona. E-mail: pdiaz@ub.edu*

Las lipasas son biocatalizadores de amplia aplicación en biotecnología, capaces de catalizar reacciones de hidrólisis o de síntesis, actuando en condiciones suaves y con alta regio- y/o estereoselectividad¹⁻³. Las lipasas han sido clasificadas en base a sus secuencias y a sus propiedades biológicas⁴. Las lipasas verdaderas provenientes de bacterias Gram negativas se encuentran en las subfamilias I.1, I.2 y I.3. Aunque las lipasas de las subfamilias I.1 y I.2 son claramente homólogas, las enzimas de la subfamilia I.3 difieren notablemente de ellas y poseen propiedades físicas y biológicas distintas. Las lipasas de la subfamilia I.3 se encuentran únicamente en los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Serratia*, mientras que las lipasas de las subfamilias I.1 y I.2 se encuentran ampliamente distribuidas.

La cepa *Pseudomonas* sp. CR-611 presenta alta actividad lipolítica frente a tributirina y aceite de oliva^{5,6}. En este trabajo se identificó y se clonó una lipasa extracelular de la subfamilia I.3 producida por esta cepa. La lipasa clonada fue expresada en *E. coli* y purificada a partir de cuerpos de inclusión para su posterior caracterización. La enzima purificada presenta mayor afinidad por sustratos de cadena media, con preferencia por pNP-decanoato y MUF-heptanoato. Muestra la máxima actividad a 30°C y pH 5.5, lo que la convierte en la primera lipasa acidófila descrita perteneciente a la subfamilia I.3. Se estudió también la influencia de distintos compuestos en su actividad. La presencia de calcio es necesaria para su actividad, como es común en las lipasas de esta familia. Su actividad aumenta por la presencia de concentraciones bajas de Tritón X-100 y no es disminuida por el inhibidor de serin-hidrolasas PMSF. La lipasa I.3 de *Pseudomonas* sp. CR-611 presenta alta actividad específica, y propiedades catalíticas de interés para su futura aplicación en biocatálisis.

- (1) Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*; Springer-Verlag: Berlin, **2004**.
- (2) Gotor-Fernandez, V.; Brieva, R.; Gotor, V. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2006**, *40*, 111 - 120.
- (3) Jaeger, K.-E.; Eggert, T. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 390-397.
- (4) Arpigny, J. L.; Jaeger, K.-E. *Biochemistry Journal* **1999**, *343*, 177-183.
- (5) Ruiz, C.; Pastor, F. I. J.; Diaz, P. *Lett. Appl. Microbiol.* **2005**, *40*, 218-227.
- (6) Prim, N.; Bofill, C.; Pastor, F. I. J.; Diaz, P.; *Biochimie* **2006**, *88*, 859-867.

Agradecimientos:

Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID)
Universidad de Barcelona
Proyecto CTQ2007-60749/PPQ - Ministerio de Educación y Ciencia de España

Purificación y caracterización bioquímica de la lipasa LipM de *Marinobacter lipolyticus*

D. Pérez¹, S. Martín¹, E. Mellado¹, A. Ventosa¹, G. Fernández-Lorente², Cesar Mateo² y José M. Guisán²

¹Dpto. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, C/ Profesor García González, 2, 41012, Sevilla (lpg@us.es)

²Departamento de Biocatálisis, Instituto de Catálisis, CSIC, Campus Universidad Autónoma, Cantoblanco, 28049 Madrid

Los ambientes hipersalinos constituyen uno de los ejemplos más característicos de habitats extremos, caracterizándose por presentar además de una elevada concentración de sales, grandes oscilaciones de temperaturas, baja concentración de oxígeno y en algunas ocasiones elevados valores de pH y baja disponibilidad de nutrientes que los convierten en lugares inhóspitos para muchos microorganismos. Se distinguen varias categorías de microorganismos en función de su crecimiento óptimo a distintas concentraciones de cloruro sódico (Kushner y Kamekura, 1988): no halófilos (0,2 M NaCl), halófilos débiles (0,2 a 0,5 M NaCl), halófilos moderados (0,5-2,5 M NaCl) y halófilos extremos (2,5-5,2 M NaCl).

Marinobacter lipolyticus es una bacteria halófila moderada aislada de dichos ambientes y productora de enzimas lipolíticas (Martín et al., 2003). Las condiciones óptimas de crecimiento coinciden con las de máxima producción enzimática, siendo éstas 1 M de NaCl, pH 7,5, una temperatura de 37°C y una aireación de tres a cinco veces mayor al volumen del cultivo.

Tras el estudio de la actividad lipolítica producida por esta bacteria hemos detectado en el extracto celular la presencia de al menos dos lipasas de distinto tamaño y especificidad de sustrato. La construcción de una genoteca en *Escherichia coli* nos ha permitido aislar el gen *lipM* que codifica una de estas lipasas. Este gen codifica la proteína LipM, compuesta por 271 aminoácidos.

Debido al interés de estas enzimas en procesos tales como la biorremediación, síntesis de biocombustibles, etc., se procedió a su purificación partiendo del extracto crudo del clon de *E. coli* que contiene dicha lipasa. Para ello se utilizó una combinación de soportes hidrofóbicos como fenil agarosa, desorbiendo de éste con un gradiente de glicerol, soportes de intercambio iónico como el sulfopropil Toyopearl o el dextrano sulfato, desorbiendo luego con un gradiente de cloruro sódico.

Posteriormente, hemos realizado estudios encaminados a la caracterización bioquímica de la lipasa purificada.

Kushner, D.J. y Kamekura, M. (1988). Physiology of halophilic eubacteria. *En*: F. Rodríguez-Valera (ed.). Halophilic Bacteria. CRC Press: Boca Raton. vol. I, pp. 109-140.

Martín, S., Márquez, M. C., Sánchez-Porro, C., Mellado, E., Arahal, D. R. y Ventosa, A. (2003). *Marinobacter lipolyticus* sp. nov., a novel moderate halophile with lipolytic activity. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 1383-1387.

Potencial uso de la microalga marina *Tetraselmis suecica* para la retirada de cadmio

Mónica Pérez-Rama, Enrique Torres, Cristina Suárez, Concepción Herrero y Julio Abalde

Departamento de Biología Celular y Molecular, Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidade da Coruña, Campus da Zapateira s/n. 15071. A Coruña.

En este trabajo se ensayó la capacidad de la microalga marina *Tetraselmis suecica* para retirar cadmio del medio. La retirada de este metal se analizó en cultivos expuestos a diferentes concentraciones de Cd (0.6, 3, 6, 15, 30 y 45 mg L⁻¹). Esta microalga mostró excelentes propiedades como bioacumuladora para la retirada de este metal. La retirada de Cd dependió tanto de la concentración de metal en el medio como de la duración de la exposición de las células al metal. La cantidad total de cadmio retirado fue notablemente alto, siendo retirado el 98.1% del cadmio en los cultivos expuestos a una concentración inicial de 0.6 mg Cd L⁻¹. La unión del cadmio a la superficie celular de *T. suecica* fue evidente tras la adición del metal al medio de cultivo. Este cadmio bioadsorbido aumentó al incrementar la cantidad de cadmio en el medio, de manera inversa a lo que pasó con los niveles intracelulares del metal. Así, en los cultivos que contenían la concentración inicial de cadmio más baja se observó que el 79.6% del total de cadmio retirado estaba bioacumulado, mientras que en los cultivos con una concentración inicial de 45 mg L⁻¹, la cantidad de cadmio acumulado intracelularmente disminuyó considerablemente alcanzando un valor de 38.1% del total de cadmio retirado. Sin embargo, en la mayoría de cultivos expuestos a las diferentes concentraciones del metal la mayor proporción del total de cadmio retirado se encontró acumulado intracelularmente, con excepción del cultivo expuesto a 45 mg Cd L⁻¹ que fue el único en que este valor bajó del 50%.

Producción de un inhibidor de carboxipeptidasa en cultivos de alta densidad celular

Juan Miguel Puertas^a, Glòria Caminal^b y Glòria González^a

^a*Dpto. de Ingeniería Química, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, España*

^b*Unidad de Biocatálisis Aplicada asociada al IIQAB, CSIC-UAB, España*

En esta comunicación se recogen los resultados principales de los experimentos realizados con la finalidad de poner a punto una metodología reproducible y bien caracterizada para producir un inhibidor de la carboxipeptidasa aislado de la patata (*Solanum tuberosum*), conocido como PCI. El PCI es una proteína pequeña (38 residuos, 4.3 kDa), rica en cisteínas (3 puentes disulfuro), con numerosas aplicaciones biomédicas.

Se parte del trabajo de investigadores del Instituto de Biotecnología y Biomedicina de la Universitat Autònoma de Barcelona, quienes diseñaron el gen que codifica para el PCI, utilizando el plásmido pIN-III-ompA para expresar esta proteína en el periplasma de *E.coli*, observando que la proteína madura no permanecía en este compartimento celular, sino que se acumulaba en el medio de cultivo. Asimismo, se puso a punto un sistema de fermentación en medio complejo, que permitía obtener entre 20-30 g de biomasa y 100-150 mg de PCI por litro de cultivo.

Utilizando la misma cepa recombinante, en esta investigación se ha desarrollado un método de cultivo en discontinuo, para conseguir altas concentraciones de biomasa y proteína, con repetitibilidad. Las etapas del estudio fueron las siguientes:

- Formulación de un medio de cultivo definido
- Diseño de un técnica de cultivo en bioreactor de 2L, en modo discontinuo alimentado; empleando un perfil preprogramado de alimentación para mantener una velocidad de crecimiento específica constante, limitando por fuente de carbono.
- Estudio de la concentración de inductor (IPTG) más adecuada para maximizar el rendimiento PCI/biomasa y estrategia de adición.
- Estudio de los perfiles de concentración de PCI en el citoplasma, periplasma y medio de cultivo.

La realización de esta metodología ha permitido poner a punto una estrategia de fermentación en bioreactor de 2L, mediante el cual se pueden conseguir 60 g DCW/L, y sobre 800 mg/L de proteína. Sin embargo, se han detectado tres cuellos de botella importantes en la producción en fermentador de este inhibidor: en primer lugar, la inestabilidad del plásmido pIN-III-ompA; luego, el efecto marcadamente tóxico que la acumulación de PCI en el citoplasma tiene para el crecimiento del huésped bacteriano; y en tercer lugar, la presencia de formas degradadas de la proteína que hacen que no todo el producto final sea biológicamente activo.

Caracterización genética, selección y control de levaduras vínicas en fermentaciones industriales mediante la aplicación de técnicas moleculares

M.E. Rodríguez¹, L. Reborditos¹, M. Molina², J.M. Cantoral¹

¹*Laboratorio de Microbiología y Genética, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Universidad de Cádiz, Pol. Río San Pedro s/n, Puerto Real, 11510, Cádiz.*
²*Bodegas Barbadillo S.A. Sanlúcar de Barrameda (Cádiz)*

La obtención del cariotipo electroforético mediante la técnica de *Electroforesis en Campo Pulsante* (PFGE) ha sido una herramienta muy útil para caracterizar la amplia diversidad genética de levaduras que participaron en las fermentaciones espontáneas de un vino blanco de la Tierra de Cádiz durante dos años consecutivos. Esta técnica permite diferenciar entre cepas pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae* por el número, tamaño e intensidad de las bandas que forman el cariotipo. A partir de estos análisis se determinó la presencia de cuatro cepas en altas proporciones, aquellas con cariotipo P1, P2, P3 y P5, que se eligieron para estudiar distintas características microbiológicas de interés industrial. Tras un proceso de selección se eligieron las levaduras autóctonas de patrones P2, P3 y P5 como cultivos iniciadores de las fermentaciones durante cinco vendimias consecutivas (desde 2001 hasta 2005). Dada la complejidad del proceso, debido a que los volúmenes a fermentar fueron de 400.000 litros, fue necesario establecer diversos esquemas de inoculación para poder utilizar las cepas seleccionadas en condiciones industriales.

El seguimiento de las levaduras inoculadas se realizó una vez finalizadas las vendimias, utilizando la técnica de PFGE, comprobándose que la cepa con patrón P5 fue la que predominó en tres de las cinco vendimias estudiadas, obteniéndose en ellas un producto final con características organolépticas mejoradas con respecto al obtenido en las fermentaciones espontáneas.

La necesidad de monitorizar las cepas inoculadas durante las fermentaciones en tiempos relativamente cortos tiene cada vez más importancia en las Bodegas, ya que en caso de tener sospecha de que no esté presente la cepa inoculada, se pueda actuar sobre las fermentaciones adicionando más inóculo, lo cual supone una ventaja para el bodeguero. La aplicación de la técnica de *Polimorfismo para la Longitud de los Fragmentos de Restricción* del ADN mitocondrial (RFLP-ADNmt) con la enzima *Hinf I*, a muestras tomadas directamente del mosto fermentando sin necesidad de realizar aislamientos ha supuesto un método de control microbiológico de las fermentaciones industriales. Esta técnica pone de manifiesto de forma rápida y fiable, en el caso de inocular una sola cepa, si ésta es la que lleva a cabo la fermentación desde el inicio del proceso hasta su finalización, bien cuando se trata de levaduras autóctonas o comerciales para la elaboración de distintos tipos de vinos.

Radicales de proteína en la peroxidasa versátil de *Pleurotus eryngii*

Francisco J. Ruiz-Dueñas,¹ Rebecca Pogni,² María Morales,¹ Stefania Giansanti,² María J. Mate,¹ Antonio Romero,¹ María Jesús Martínez,¹ Riccardo Basosi² and Ángel T. Martínez¹

¹Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Ramiro de Maeztu 9, E-28040 Madrid, Spain; ²Department of Chemistry, University of Siena. Aldo Moro, I-53100 Siena, Italy (atmartinez@cib.csic.es)

La peroxidasa versátil (VP) del hongo ligninolítico *Pleurotus eryngii* se caracteriza por su capacidad para oxidar compuestos aromáticos de elevado potencial redox, Mn^{2+} , fenoles sustituidos y colorantes industriales. Recientemente se ha demostrado que la oxidación de compuestos aromáticos de elevado potencial redox se produce en contacto directo con un radical de proteína centrado en el Trp164 expuesto al solvente. Mediante mutagénesis dirigida se ha sustituido este triptófano catalítico por residuos de tirosina e histidina susceptibles de formar radicales estables en otras enzimas. Experimentos de resonancia paramagnética electrónica (EPR) a baja temperatura revelaron por primera vez en una peroxidasa fúngica la presencia de radicales de triptófano y tirosina en las dos formas activas intermediarias del ciclo catalítico (compuesto-I y compuesto-II, con una deficiencia de dos electrones y un electrón, respectivamente). Sin embargo, no se detectaron radicales de proteína en la variante W164H, en la que el espectro del compuesto-I correspondió a un radical de porfirina idéntico al de la variante W164S que es incapaz de oxidar compuestos aromáticos de elevado potencial redox. Mediante espectrofotometría de flujo detenido se pudo comprobar que las mutaciones W164Y y W164H reducen 10 veces la constante de velocidad aparente de segundo orden (k_{2app}) para la reducción del compuesto-I por alcohol 3,4-dimetoxibencílico (veratrílico), comparado con una reducción de 50 veces en la variante W164S. La mutación W164Y afectó a la constante de velocidad de primer orden (k_2) más que a la constante de disociación (K_{D2}), sugiriendo que la mutación afecta a la velocidad de oxidación y no a la capacidad de unión del sustrato. La reducción del compuesto-II por alcohol veratrílico se vio fuertemente afectada por todas las mutaciones en el Trp164. Los valores de la constante de velocidad de primer orden (k_3) fueron similares para las variantes W164Y, W164H y W164S, revelando que la sustitución del triptófano catalítico siempre resulta en la pérdida de la capacidad del compuesto-II para oxidar alcohol veratrílico, y en consecuencia en la incapacidad para cerrar el ciclo catalítico en presencia de este sustrato. La autoreducción del compuesto-II también fue suprimida, tal y como quedó demostrado por EPR y espectrofotometría de flujo detenido. Las estructuras cristalográficas no mostraron diferencias estructurales significativas en la variante W164Y indicando que el comportamiento cinético alterado observado fue solamente debido a la sustitución del Trp164.

Estrategias alternativas de operación para la producción de enzimas recombinantes en *E.coli*

Jordi Ruiz*, Jaume Pinsach, Gregorio Álvaro, Glòria González, Carles de Mas, David Resina, Josep López-Santín

*Departament d'Enginyeria Química. Escola Tècnica Superior d'Enginyeria (ETSE)
Universitat Autònoma de Barcelona.*

La estrategia operacional empleada en la producción de ramnulosa 1-fosfato aldolasa (RhuA) en *E.coli* tiene un importante impacto sobre el proceso de purificación cuando se prepara esta enzima para su uso como biocatalizador.

En primer lugar se llevó a cabo una estrategia basada en la adición continua de IPTG como inductor en sistemas operando a concentraciones limitantes de fuente de carbono para la sobreexpresión de RhuA fusionada a una cola de 6 histidinas (6xHis-tag) en posición N terminal.

En este caso, el nivel de RhuA producido fue de 180 mg RhuA·g⁻¹DCW, con una actividad específica (1.7 UA·mg⁻¹RhuA) considerablemente menor de la esperada. Únicamente el 55% del enzima presente en el lisado celular se recuperó mediante purificación e inmovilización simultánea en resinas de cromatografía de afinidad a metales (IMAC). Análisis de Western blot demostraron una disminución notable de la proporción de RhuA recombinante fusionada a la cola de 6xHis-tag durante la fase de inducción, llegando a ser del 20 % del nivel inicial al final del cultivo como consecuencia de fenómenos proteolíticos.

Dos estrategias alternativas de cultivo se implementaron con el objetivo de minimizar las respuestas de estrés debidas a la limitación de fuente de carbono y a la propia inducción:

- Reducción de la temperatura (28°C) del cultivo en sistemas operando bajo limitación de fuente de carbono, permitiendo la obtención de mayores niveles de RhuA (210 mg RhuA·g⁻¹DCW), con actividad específica de 4 UA·mg⁻¹RhuA y rendimientos de inmovilización del 93%.
- Operación en condiciones de elevada concentración de glucosa en el medio de cultivo, alcanzando niveles de RhuA de 233 mg RhuA·g⁻¹DCW, con actividad específica 4.8 UA·mg⁻¹RhuA y rendimientos de inmovilización del 95%.

En ambos casos, análisis de Western blot demostraron la presencia de un 100 – 80 % del nivel inicial de RhuA fusionada a cola de 6xHis-tag, confirmando así un aumento en la calidad de la proteína recombinante producida.

Descripción de genes implicados en la producción de AHLs en *Halomonas anticariensis* FP35^T, una bacteria halófila de interés industrial

Ali Tahrioui, Emilia Quesada e Inmaculada Llamas

*Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.
Campus Universitario Cartuja s/n, 18071 Granada.
illamas@ugr.es*

En los últimos años ha crecido el interés en el estudio de la comunicación intercelular bacteriana y se han identificado mecanismos reguladores de la expresión de ciertos genes en respuesta a altas densidades celulares [1]. Además, la caracterización de estos sistemas, acoplado a una serie de aplicaciones, ofrece oportunidades para avanzar en la biotecnología, medicina, ecología y agricultura [2].

La mayoría de los sistemas *Quorum Sensing* (QS) se componen de dos genes, el gen sintasa (*luxI*) o gen encargado de la síntesis de moléculas señal y el gen regulador de la transcripción (*luxR*), que posee un dominio de unión a dichas moléculas. En bacterias Gram negativas, los autoinductores más conocidos son del tipo *N*-acil homoserin lactonas (AHLs) mientras que en bacterias Gram positivas son péptidos. Cuando se alcanzan niveles umbrales de autoinductores, en presencia de alta densidad celular, se forma el complejo LuxR-autoinductor que se une a secuencias consenso en el DNA conocidas como “lux box” e inducen tanto la síntesis de nuevas moléculas autoinductoras como la activación/represión de otros genes en la célula.

Nuestro grupo de investigación ha hallado un sistema de comunicación intercelular tipo *Quorum Sensing* mediado por moléculas señales del tipo AHLs en la bacteria *Halomonas anticariensis* FP35^T. El análisis de estas moléculas mediante técnicas de cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) ha puesto de manifiesto que este microorganismo produce al menos tres tipos de autoinductores (C₄-HL, C₆-HL, C₈-HL, C₁₂-HL) [3]. Nuestro objetivo más inmediato es la identificación y caracterización de los genes implicados en la síntesis y regulación de las moléculas señal AHLs en dicha bacteria. Para ello, hemos seleccionado cuatro mutantes, deficientes o que producen en menor cantidad las moléculas señal, mediante experiencias de mutagénesis insercional y dirigida. El análisis secuencial de los genes afectados en su lectura ha puesto de manifiesto la existencia del sistema canónico LuxI/LuxR semejante al de otras bacterias Gram negativas y de sistema global de regulación tipo GacA/GacS.

Bibliografía

- [1] Paul Williams, 2007. *Microbioloy*. 153:3923-3938.
- [2] March J. C. and Bentley W. E, 2004. *Current Opinion in Biotechnology*. 15:495-502.
- [3] Llamas y col., 2005. *Extremophiles*. 9: 333-341.

Clonación de los genes del clúster de lisis del micobacteriófago D29 para su uso como enzibióticos

Sara Tomé-García^{*}, Lucía Feijoo-Siota, Lucía Blasco, Patricia Veiga-Crespo, Tomás G. Villa

*Universidad de Santiago de Compostela. Departamento de Microbiología y Parasitología, facultad de Farmacia. Santiago de Compostela.
sara.tome@usc.es*

El rebrote de la tuberculosis y la elevada tasa de resistencia a antibióticos de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, representa un importante problema de salud pública. Por esta razón en los últimos años se ha reactivado la investigación sobre micobacteriófagos destinados al desarrollo de nuevas aplicaciones para la terapia y el diagnóstico de esta enfermedad.

La aplicación de bacteriófagos en el tratamiento de enfermedades infecciosas surgió en los años 20 del siglo pasado antes de la llamada Era de los Antibióticos, lo que provocó el abandono de la investigación con fagos. Las investigaciones continuaron en países del Este de Europa y de la antigua Unión Soviética para el tratamiento de infecciones causadas por *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Klebsiella* y *Salmonella*.

Con la aparición de las resistencias microbianas a los antibióticos, cobran interés como posibles agentes terapéuticos los enzibióticos. El término “enzibiótico” engloba, entre otros, a los enzimas líticos que emplean los virus bacteriófagos al final de su ciclo lítico. Estos enzimas lisan las bacterias que infectan para permitir la liberación de los nuevos fagos recién sintetizados. Hay dos tipos: lisinas y holinas. Dentro de las lisinas, las lisozimas son β -1,4-acetilmuramidasa que actúan rompiendo enlaces entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina del peptidoglucano de la pared bacteriana. Las holinas forman poros en la membrana plasmática para que las lisozimas puedan acceder a la pared bacteriana.

Para este trabajo se ha seleccionado el micobacteriófago D29 que presenta un amplio rango de hospedadores. La secuenciación del genoma del fago D29, muestra una elevada similitud con el micobacteriófago L5.

El objetivo de este trabajo ha sido la clonación de los genes de las posibles lisinas y la holina del micobacteriófago D29 para su posterior expresión y caracterización enzimática.

Mediante técnicas de PCR y basándonos en las secuencias de los posibles genes, se realizó la amplificación de los mismos y su secuenciación.

Una vez obtenidos los amplificadores, se clonaron en el vector de clonación pET 30-a(+) (Novagen). A partir de pCR[®]-Blunt II-TOPO[®] (Invitrogen), se obtuvieron los insertos de cada gen mediante digestión enzimática y se ligaron en el vector de expresión pET 30-a(+) para *Escherichia coli*, con el fin de producirlos y purificarlos para la realización de ensayos de actividad.

Ha sido posible la clonación de los genes del clúster de lisis del micobacteriófago D29 y su posterior ligación en el vector de expresión pET 30-a(+), lo que nos permitirá realizar ensayos de expresión de las lisinas y la holina para la determinación de su actividad enzimática.

Obtención de mutantes negativos para la producción de polihidroxicanoatos

Torrego, N.^{1,2}, Manresa, A.¹, Diaz, P.²

¹*Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias, Facultat de Farmacia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII, s/n 08028 Barcelona.*

²*Departamento de Microbiología, Facultat de Biología, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal, 645, 08028 Barcelona. noeliatorrego@ub.edu*

La cepa de *Pseudomonas* 47T2 tiene la capacidad de producir diversos productos lipídicos, entre ellos los polihidroxicanoatos (PHAs), productos de elevado interés biotecnológico por sus propiedades como plásticos biodegradables [1].

Se pretende obtener mutantes para la producción de PHAs para el estudio de su ruta metabólica de biosíntesis. Este objetivo se ha abordado desde un punto de vista genético, a través de una estrategia de mutagénesis dirigida en la cual se fuerza la recombinación, y la mutación por tanto de los genes que codifican para la enzima PHA sintasa [2], mediante el uso del plásmido suicida pEX100Tlink [3].

Se obtuvieron mutantes negativos para la producción de PHAs que fueron analizados, por microscopía electrónica de transmisión. La producción de PHAs se analizó por resonancia magnética nuclear. Ambos procesos permitieron determinar que los potenciales mutantes no producían PHAs. Para confirmarlo se procedió a la cuantificación de los PHAs producidos por las cepas mutantes seleccionadas observando que la producción de PHAs desaparece.

[1] **Luzier, W.D.** (1992) Materials derived from biomass/biodegradable materials. *Proceedings of National Academic Sciences*. **89**: 839-842.

[2] **Madison, L.L. y Huisman, G.W.** (1999) Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol. Molec.* **63**: 21-53.

[3] **Quénée, L.; Lamotte, D.; Polack, B.** (2005) Combined *acB*-based negative selection and *cre-lox* antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in *Pseudomonas aeruginosa*. *BioTechniques* **38**: 63-67.

Xilanasa XynA de *Paenibacillus barcinonensis*: Clonación, purificación y caracterización

Susana Valenzuela y F. I. Javier Pastor

Departamento de Microbiología, Universidad de Barcelona. Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, España. fpastor@ub.edu

En la industria papelera, el proceso de blanqueo de la pasta de papel con cloro o dióxido de cloro genera una gran cantidad de residuos organoclorados de elevada toxicidad, que hacen de la fabricación del papel un proceso de elevado impacto ambiental. La adición de enzimas, como es el caso de xilanasas, en la etapa de blanqueo de la pasta de papel, potencia el efecto de los blanqueantes químicos, con lo que se reduce la utilización de sustancias contaminantes.

Paenibacillus barcinonensis, cepa aislada de arrozales del delta del Ebro (Sánchez et al, 2005), posee un sistema de múltiples xilanasas entre las cuales destaca XynA por presentar una mayor actividad en zimogramas. Los ensayos realizados sobre pasta de papel han demostrado que la enzima efectivamente facilita el blanqueo de la pasta de *Eucalyptus*, produciendo un descenso importante del índice kappa y un aumento notable en la blancura del papel (Blanco et al. 1995).

El potencial que presenta XynA como enzima de aplicación industrial ha evidenciado la necesidad de continuar los estudios, efectuando la clonación de la enzima en vectores de expresión para posibilitar su producción a escala de ensayos papeleros, así como su purificación para llevar a cabo su caracterización bioquímica exhaustiva.

La secuencia del gen codificante de la xilanasa XynA ha sido determinada mediante la técnica de gene walking con cebadores degenerados diseñados a partir de la secuencia aminoterminal de la proteína. El gen *xynA* codifica una endo-1,4-beta-xilanasa de 320 residuos de aminoácidos, con peso molecular deducido de 32 kDa y un péptido señal de 32 aminoácidos. La secuencia aminoacídica de XynA presenta una alta similitud con las xilanasas de la familia 10 de glicosil hidrolasas descritas en otros microorganismos. La enzima presenta la homología más elevada (73% de identidad a nivel aminoacídico) con la xilanasa B de *Paenibacillus* sp. KCTC8848P, no obstante esta proteína homóloga no ha sido clonada ni caracterizada hasta la fecha.

El gen *xynA* de *Paenibacillus barcinonensis* ha sido clonado y expresado en *Escherichia coli* utilizando el vector de expresión pET-3a. XynA ha sido purificada a partir de extractos de los clones recombinantes de *Escherichia coli* mediante cromatografía de intercambio iónico utilizando columnas MonoS. La proteína recombinante presenta alta actividad sobre xilanos de maderas duras y de gramíneas, y actividad menor sobre pNPX, oNPX, y pNPap. La enzima purificada presenta máxima actividad sobre xilano de madera de abedul (42,6 U/mg proteína) y actividad óptima a pH 6,5 y 60 °C. Se evaluaron las constantes cinéticas K_M y V_{max} sobre xilano de abedul, obteniendo valores de 2,93 mg/ml y 50,67 U/mg de proteína, respectivamente.

Blanco A., Vidal T., Colom J.F. and Pastor F.I.J. (1995) Purification and properties of xylanase A from alkali-tolerant *Bacillus* sp. strain BP-23. *Appl Environ Microbiol.* 61:4468-4470.

Sánchez M.M., Fritze D., Blanco A., Spröer C., Tindall B.J., Schumann P., Kroppenstedt R.M., Diaz P. and Pastor F.I. (2005) *Paenibacillus barcinonensis* sp. nov., a xylanase-producing bacterium isolated from a rice field in the Ebro River delta. *Int J Syst Evol Microbiol.* 55:935-939.

Estudio y optimización de la producción de quimosina de búfalo en *Pichia pastoris*

J.A. Vallejo, J.M. Ageitos, P. Veiga-Crespo, M. Poza y T.G. Villa

Departamento de Microbiología, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela

Los cuajos empleados en la industria quesera están compuestos básicamente por proteasas aspárticas (1). Las proteasas aspárticas poseen dos residuos de ácido aspártico esenciales para su funcionamiento; Asp32 y Asp215. Esta característica, junto con su conformación tridimensional bilobulada, donde el centro activo, rico en ácido aspártico, se sitúa entre ambos lóbulos, les confiere la capacidad de actuar sobre el enlace peptídico Phe105- Met106 existente en la *k*-caseína de la leche, originando para-*k*-caseína insoluble que precipita (2). Esto conduce a la coagulación de la leche, lo que explica que estas proteasas se hayan estado empleando para la elaboración tradicional de masas queseras como paso previo a la fabricación de distintos tipos de quesos.

La quimosina es la proteasa aspártica más valorada en la industria quesera como fuente de cuajo por su eficacia a la hora de elaborar masas queseras (3). Otras proteasas aspárticas empleadas en la industria quesera originan digestiones inespecíficas sobre las caseínas de la leche y pueden dar lugar a productos que dan sabor amargo a las masas queseras y a pérdidas del contenido proteico durante el desuerado, lo cual provoca una disminución importante del rendimiento en el proceso de elaboración de queso (4).

Nuestro equipo ha conseguido desarrollar una levadura que secreta quimosina de búfalo al sobrenadante en su forma ya activa. El enzima recombinante obtenido se ofrece como una alternativa a la única quimosina recombinante que existe actualmente en el mercado ya que la quimosina de búfalo muestra características fisicoquímicas más estables que la de *B. taurus* (5).

Tras caracterizar la producción de la quimosina recombinante estamos optimizando esta producción. Esta optimización se centra en dos niveles de actuación. El primero consiste en modificar en la secuencia nucleotídica los codones más deficitarios para *P. pastoris* empleando técnicas de mutagénesis dirigida ya que tenemos cuatro codones críticos para la producción de esta proteína por parte de *P. pastoris*. El segundo nivel se trata de tratar de incrementar el número de cassettes de expresión para la quimosina de búfalo integrados en su genoma. Para ello empleamos dos vectores de expresión, el pGAPZalpha y el pIB2. El vector pGAPZ alpha se integra en la zona del promotor GAP utilizando como marcador diferencial la zeocina y el pIB2 se integra en la zona del gen HIS4 empleando como marcador de selección la auxotrofia para la histidina.

1. Ustunol, Z. and C. L. Hicks. 1990. Effect of milk-clotting enzymes on cheese yield. *J. Dairy Sci.* 73:8-16.
2. McMahon, D. J., R. J. Brown, and C. A. Ernstrom. 1984. Enzymic coagulation of milk casein micelles. *J. Dairy Sci.* 67:745-748.
3. Rao, M. B., A. M. Tanksale, M. S. Ghatge, and V. V. Deshpande. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62:597-635.
4. Beppu, T. 1983. The cloning and expression of chymosin (rennin) genes in microorganisms. *Trends Biotechnol.* 1:85-89.
5. Mohanty, A. K., U. K. Mukhopadhyay, J. K. Kaushik, S. Grover, and V. K. Batish. 2003. Isolation, purification and characterization of chymosin from riverine buffalo (*Bubalus bubalis*). *J. Dairy Res.* 70:37-43.

Utilización de glucanasas como enzibióticos anti-fúngicos

Patricia Veiga-Crespo¹, Sara Tomé-García¹, Lidia Ruíz², Miquel Viñas² y Tomás G. Villa¹

*1*Universidad de Santiago de Compostela. Dpto. Microbiología. Fac. Farmacia. Santiago de Compostela. *2*Universidad de Barcelona Dpto. De Patología y Terapéutica experimental. Facultad de Medicina. Patricia.veiga@usc.es

La resistencia microbiana a fármacos es cada vez un fenómeno más frecuente y preocupante. En el caso de las infecciones fúngicas, las resistencias a fármacos, sobre todo en ambientes hospitalarios y en pacientes inmunocomprometidos son cada vez más acuciantes haciendo necesaria la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento de las infecciones. En el caso de las patologías por hongos uno de los mayores problemas es la búsqueda de alternativas farmacéuticas específicas para el agente causal ya que la mayoría de las dianas están presentes también en el enfermo. La pared fúngica está formada principalmente por β -glucanos y quitina. La pared fúngica es, además, un elemento esencial para la supervivencia de los hongos ya que además de dar forma al organismo, interviene en procesos de regulación osmótica e intercambio intra-extracelular. Estos componentes son exclusivos de las paredes de los hongos y no aparecen en los humanos. Curiosamente, es la línea menos estudiada a la hora del diseño racional de fármacos específicos contra los patógenos fúngicos.

Candida albicans es uno de los mayores patógenos humanos que aparece como patógeno oportunista en pacientes inmunodeprimidos y en ambientes hospitalarios. Las β -1,3-glucanasas son enzimas que hidrolizan el enlace β -1,3 en las cadenas de β -glucanos de la pared fúngica. Estos enzimas son producidos naturalmente por los hongos durante su proceso de desarrollo morfológico y también por determinadas especies como mecanismo de defensa frente a hongos patógenos.

Bacillus circulans produce de manera natural estos enzimas lo que le permite utilizar el β -glucano de las paredes fúngicas como fuente de carbono.

La producción de glucanasas en *B. circulans* puede inducirse por la presencia de paredes de levaduras en el medio de crecimiento. En nuestro laboratorio, se ha inducido la producción de β -1,3-glucanasa en distintas cepas de *B. circulans* WL. Los resultados obtenidos permitieron comprobar que la cepa *B. circulans* WL-13 era la que producía una mayor cantidad de enzima y que además ésta presentaba una mayor actividad lítica contra paredes de levadura.

B. circulans WL-13, así como el resto de las cepas analizadas, secretan la β -1,3-glucanasa al exterior celular. Se obtuvo la relación de producción de enzima con respecto al momento del ciclo celular en el que se encontraban las células. Así se pudieron obtener extractos enzimáticos concentrados de β -1,3-glucanasa. Cultivos de *C. albicans* fueron puestos en contacto con los extractos enzimáticos obtenidos a partir de los sobrenadantes de *B. circulans* WL13. Se pudo comprobar así la actividad lítica de estos enzimas sobre las paredes de *C. albicans* mediante la aparición de halos de lisis en los cultivos así tratados.

En base a los resultados obtenidos se puede concluir que el enzima β -1,3-glucanasa producido por *B. circulans* es una buena alternativa para el desarrollo de enzibióticos anti-fúngicos.

Evolución de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Tomás G. Villa¹, Patricia Veiga-Crespo¹, Lidia Ruiz² y Miquel Viñas²

1Universidad de Santiago de Compostela. Dpto. Microbiología. Fac. Farmacia. Santiago de Compostela. 2Universidad de Barcelona Dpto. De Patología y Terapéutica experimental. Facultad de Medicina. tomas.gonzalez@usc.es

Saccharomyces cerevisiae es una de las levaduras de mayor interés industrial. Esta levadura ha sido utilizada durante siglos por el hombre, aún desde antes que se conociese la existencia de las levaduras, en la elaboración de procesos de fermentación en la elaboración del vino, cerveza o pan. Estos procesos, con el desarrollo de las sociedades, han sufrido un fuerte proceso de industrialización pasando de una elaboración artesanal a pequeña escala y consumo doméstico a una producción profesionalizada en la que cada vez es necesario un mejor conocimiento de los microorganismos implicados en los procesos de fermentación. Son cada vez más frecuentes los estudios de la levadura, su función concreta en la fermentación así como trabajos de modificación genética dirigidos a conseguir producciones cada vez más eficientes desde dos premisas básicas: un mayor rendimiento de las reacciones y la adquisición de características órgano-lépticas características y concretas del producto final obtenido mediante modificación de la levadura.

Una manera de conseguir una mayor eficacia y racionalidad en el estudio y modificación genética de *S. cerevisiae* destinadas a la industria es comprender como esta levadura ha ido evolucionando del tiempo, qué características ha adquirido durante este proceso y comprender cómo esto puede ayudar en los procesos de evolución dirigida para obtener cepas de mayor interés industrial.

Se ha comprobado que el ámbar es una fuente de DNA ancestral que permite aislar secuencias de DNA fósil de distintos tipos de organismos. En nuestro laboratorio ha sido posible aislar y amplificar DNA ancestral de distintos periodos geológicos (Mioceno, Oligoceno y Cretácico) a partir de piedras de ámbar de *S. cerevisiae*. Su estudio y análisis, principalmente de las secuencias de los genes rDNA18s, ATP9 y PGU1 de *S. cerevisiae* ha permitido establecer las tasas de mutación naturales de los mismos a lo largo de tan amplio periodo de tiempo así como el estudio de la evolución natural de *S. cerevisiae*.

El análisis de estos genes, las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión así como la búsqueda de nuevos genes de interés industrial permitirán un diseño más racional de nuevas cepas de interés industrial.

LISTA DE PARTICIPANTES

Abalde, Julio (abaldej@udc.es)
Adrio, José Luis (iladrio@neuronbp.com)
Ageitos, José Manuel (josemanuel.ageitos@usc.es)
Amarita, Felix (ngutierrez@azti.es)
Aranda, Jesús (jesus.arandar@campus.uab.cat)
Balsalobre, Carlos (cbalsalobre@ub.edu)
Barba, Victor (vbarba@cib.csic.es)
Barbero, Francisca (mentxu@guserbiot.com)
Barriuso, Monica (inbiotec@inbiotec.com)
Barros, Jorge (jorge.barros@usc.es)
Bellver, Dan (danbellver@hotmail.com)
Berlanga, Mercedes (mberlanga@ub.edu)
Blasco, Lucía (lblasco@usc.es)
Bofill, Cristina (crisbofill@ub.edu)
Bohme, Karola (karolaboehme@gmx.de)
Bordons, Albert (albert.bordons@urv.cat)
Bou, Jordi (jordi.bou@upc.edu)
Buján, Belén (agcabado@anfaco.es)
Cabrer, Joan David (jdcabrer@gmail.com)
Cadena, Edith M. (edith.cadena@etp.upc.edu)
Calo, M^a Pilar (p.calo.mata@usc.es)
Caminal, Gloria (gloria.caminal@uab.cat)
Campoy, Susana (Susana.Campoy@uab.cat)
Cantoral, Jesús Manuel (jesusmanuel.cantoral@uca.es)
Cerdá, Marta (marta.cerda@cresa.uab.es)
Chapela, María José (mjchapela@anfaco.es)
Chiriac, A Iulia (iuliachiriac@ub.edu)
Contelles, María Dolores (mcontelles@calantia.com)
Cordero, Ricardo (ingrid.busquets@urv.cat)
Daga, Paula (paula.daga@usc.es)
De Leon, Antonio (aleonr@ipicyt.edu.mx)
Delgado, Susana (sdelgado@vet.ucm.es)
Diaz, Pilar (pdiaz@ub.edu)
Díaz, Rosario (rosario.diaz@eez.csic.es)
Falcón, Miguel Ángel (mafalcon@ull.es)
Feijoo Lucía (luciafs@usc.es)
Fernandez, Alfred (alfred.fernandez@uab.cat)
Fernandez, Inmaculada (ifernandezno@yahoo.es)
Ferrer, Pau (miriam.lazaro@uab.cat)
Fillat, Amanda (amanda.fillat@etp.upc.edu)
Fusté, Ester (esterfuste@gmail.com)
Gallardo, Oscar (ogallardo@ub.edu)
Garai, Gaizka (gaizkagarai@yahoo.es)
García, Cristina (cgarcia@azti.es)
Garre, Victoriano (vgarre@um.es)
Garreta, Albert (albertgarreta@ub.edu)
Genilloud, Olga (olga_genilloud@wanadoo.es)
Gómez, Daniel (danigo@um.es)

Lista de participantes

Gonzalez, Gloria (gloria.gonzalez@uab.cat)
González, Katuska (katiga@hotmail.com)
Gonzalez, Isidro (isidro.gonzalez@uca.es)
González Villa, Tomás (tomas.gonzalez@usc.es)
Guerrero, Ricard (rguerrero@iec.cat)
Guillen, Francisco (francisco.guilles@uah.es)
Guilleuma, Victor (victor_gr@msn.com)
Gutierrez, Ana (anagu@irnase.csic.es)
Gutierrez, Pablo (pablo.gutierrez@bioenergy.abengoa.com)
Hernández, Manuel (manuel.hernandez@uah.es)
Hurtado, Albert (alberthurtado@ozu.es)
Ibarburu, Idota (idoia.ibarburu@ehu.es)
Juárez, Antonio (ajuarez@ub.edu)
Jurado, Miguel Ángel (mjurado@cib.csic.es)
Lafraya, Alvaro (alafraya@iata.csic.es)
Liras, Paloma (paloma.liras@unileon.es)
Llamas, Inmaculada (illamas@ugr.es)
López, José Miguel (jmlopez@cect.org)
Lopez, Lidia (lidialopezj@ub.edu)
López, Laura (hongos@cect.org)
Lopez, Joseph (josep.lopez@uab.cat)
Madrid, Cristina (cmadrid@ub.edu)
Manresa, Angeles (amanresa@ub.edu)
Márquez, M^a del Carmen (cmarquez@us.es)
Martinez, Angel T. (atmartinez@cib.csic.es)
Martinez, Miriam (inbiotec@inbiotec.com)
Martínez, Eriel (eriel_martinez@yahoo.com)
Martinez, Maria Jesús (mjmartinez@cib.csic.es)
Mellado, Encarnación (emallado@us.es)
Méndez, Carmen (cmendezf@uniovi.es)
Miki, Yuta (yutam@cib.csic.es)
Molina, Luisa Raquel (luisaraquel.molina@alu.um.es)
Moreno, María de Lourdes (lmoreno@us.es)
Mormeneo, María (mmoir1980@hotmail.com)
Moya, Raquel (raquel.moya@uah.es)
Olano, Carlos (olanocarlos@uniovi.es)
Oyanguren, Iñigo (ioyanguren@guserbiot.com)
Pardo, Isabel (isabel.pardo@uv.es)
Pastor, Francisco I. Javier (fpastor@ub.edu)
Peláez, Fernando (fernando_pelaez@merck.com)
Pérez, Dolores (lpg@us.es)
Picart, Pere (ppicart@ub.edu)
Platas, Gonzalo (gplatas@telefonica.net)
Plou, Francisco José (fplou@icp.csic.es)
Prieto, Alicia (aliprieto@cib.csic.es)
Puertas, Joan Miquel (juanmiquel.puertas@uab.cat)
Rius, Nuria (nrius@ub.edu)
Rodríguez, M.E. (jesusmanuel.cantoral@uca.es)
Rojas, Antonia María (arojas@calantia.com)
Ruiz, Jordi (jordi.ruiz@uab.cat)

Lista de participantes

Salas, Jose Antonio (jasalas@uniovi.es)
Sánchez-Porro, Cristina (sanpor@us.es)
Sancho, José (josancho@ub.edu)
Sans, Cristina (cristina.sans@uab.es)
Santamaría, Irene (isanh@unileon.es)
Santos, M^a Angeles (gmail@usal.es)
Santos, Javier (jsana@unileon.es)
Solera, Elena (esols@unileon.es)
Suárez, Juan Evaristo (evaristo@uniovi.es)
Tahrioui, Ali (tahrioui@hotmail.com)
Tomé, Sara (sara.tome@usc.es)
Torrego, Noelia (noeliatorrego@gmail.com)
Torres, José Enrique (torres@udc.es)
Urmeneta, Jordi (jurmeneta@ub.edu)
Valdivieso, Malena (mvaldivieso@neuronbp.com)
Valenzuela, Susana (susanaValenzuela@ub.edu)
Valero, Francisco (francisco.valero@uab.cat)
Vallejo, Juan Andres (juan.vallejo@usc.es)
Valls, Cristina (cristina.valls@upc.edu)
Veiga, Patricia (patricia.veiga@usc.es)
Ventosa, Antonio (ventosa@us.es)
Vicente, Gemma (gemma.vicente@urjc.es)
Vicente, María Francisca (fvperez@telefonica.net)
Vidal, Teresa (tvidal@etp.upc.edu)
Viikari, Liisa (liisa@helsinki.fi)
Viñas, Miguel (mvinyas@ub.edu)
Vives, Joseph (jvives@ub.edu)
Zueco, Jesús (jesus.zueco@uv.es)

ÍNDICE DE AUTORES

Abalde, J.	P1, P35
Adrio, J.L.	M1.2
Ageitos, J.M.	P2, P44
Alarcón, M.	M4.4
Albiol, J.	M6.4
Altmann, F.	M6.4
Álvaro, G.	P39
Amárita, F.	P18
Andrés, I.	M6.3
Antón, N.	M6.5
Aparicio, J.F.	M6.5
Aranda, J.	M6.2, P3
Araque, M.A.	P4
Areizaga, J.	P16
Arévalo, M.C.	P15, P21
Arias, M.E.	M4.2
Arlindo, S.	P5
Arnau, C.	P6
Ayo, J.	P18
Aznar, R.	P23
Ballesteros, A.	M4.1
Barba de la Rosa, A.P.	P17
Barba, V.	P6
Barbé, J.	M6.2, P3
Barreiro, C.	P26
Barriuso-Iglesias, M.	P7
Barros-Velázquez, J.	M2.5, P5, P9
Basosi, R.	P38
Bassas, M.	P27
Baumann, K.	M6.4
Bautista, L.F.	M1.3
Benaiges, M.D.	M4.4
Berlanga, M.	M5.3
Bigas, A.	M6.2
Bills, G.	P22
Blasco, L.	M2.4, P8, P41
Böhme, K.	M2.5, P5, P9
Bordons, A.	P4, P32
Bou, J.J.	P10, P11
Braña, A.F.	M3.5
Buján, B.	P12
Busquets, M.	P19
Cabado, A.G.	P12, P13
Cadena, E.M.	M4.3
Calo-Mata, P.	M2.5, P9

Índice de autores

Caminal, G.....	P36
Campoy, S.	M6.2, P3
Cantoral, J.M.	M3.3, M6.1, P37
Cañas, B.....	M2.5, P9
Carbú, M.....	M6.1
Carnicer, M.....	M6.4
Casablanco, A.....	P20
Cepeda, A.	M2.5
Cerdà-Cuéllar, M.....	P10, P11
Chammem, N.....	P32
Chapela, M.J.....	P13
Chiriaco, A.I.	M4.3
Cid, A.	P1
Collado, I.G.	M3.3
Collado, J.....	P22
Colom, J.F.	M1.5
Córcoles-Sáez, I.....	P29
Cortés, P.	M6.2, P3
Dagá, E.	M2.3
Dagá, P.	M2.3
De León Rodríguez, A.....	P17
de Mas, C.....	P39
de Miguel, T.	M2.4
del Castillo, L.	P24
del Río, J.C.	M4.5
Delgado, S.	M2.2
Díaz, P.	M1,5, P33, P42
Díaz, R.	P14
Diez, M.T.....	P22
Dragosits, M.	M6.4
Dueñas, M.T.	P16, P23
Elizaquível, P.....	P23
Falcón, M.A.....	P15, P21
Feijoo, G.	M2.3
Feijoo-Siota, L.....	M2.4, P8, P41
Feliz, J.....	P22
Fernández Cecilia, O.	P20
Fernández de Palencia, P.....	P16
Fernández, L.	M2.2
Fernández-Acero, F.J.....	M6.1
Fernández-Lorente, G.....	P34
Fernandez-No, I.	P5, P9
Ferrer, P.	M4.4, M6.4
Fillat, A.....	M1.5
Gallardo, J.M.....	M2.5, P9
Gallardo, O.	M1.5
Galuska, S.....	P22
Garai-Ibabe, G.	P16

Garay, E.....	M5.5, P25
García Echaui, S.A.....	P17
García, A.....	M4.2
García, M.T.....	P30
García-Marzo, C.....	P18
García-Romera, I.....	P14
Garre, V.....	M1.3
Garreta, A.....	P19
Garrido, A.....	P12
Garrido, C.....	M6.1
Garrido, M.E.....	P3
Gasser, B.....	M6.4
Genilloud, O.....	M3.2
Giansanti, S.....	P38
Gimeno, Y.....	P21
Gómez, C.....	M3.5
Gómez, D.....	M5.4
Gomez-Escribano, J.P.....	M3.4
González Anadón, G.....	P20
González Arzola, K.....	P15, P21
González del Val, A.....	P22
González Villa, T.....	M2.4, P2, P8, P41, P44, P45, P46
González, G.....	P36, P39
González-Barreiro, O.....	P1
Graf, A.....	M6.4
Guerra, S.M.....	M6.5
Guerrero, R.....	M5.3
Guillán, A.....	M2.3
Guillén, F.....	M4.2
Guisán, J.M.....	P30, P34
Guri, L.....	P10
Gutiérrez, A.....	M4.5
Gutiérrez, F.J.....	M1.3
Gútierrez, P.....	M1.1
Hamdi, M.....	P32
Harris, G.....	P22
Hernández Creus, A.....	P21
Hernández, M.....	M4.2
Hernández-Galán, R.....	M3.3
Herrero, C.....	P1, P35
Horna, D.H.....	M3.5
Hosseini, S.V.....	P5
Hurtado, A.....	P32
Ibarburu, I.....	P16, P23
Ibarra, D.....	M4.5
Irastorza, A.....	P16, P23
Jiménez, A.....	M2.1
Jouhten, P.....	M6.4
Jurado, M.....	M1.4, P14

Índice de autores

Lafraya, A.	P24
Lago, J.	P12, P13
Lara-Villoslada, F.	M2.2
Lema, J.M.	M2.3
Lemos, E.	P19
Liberator, P.	P22
Liras, P.	M3.4
Llagostera, M.	M6.2, P3
Llamas, I.	M5.2, P40
Llorens, J.	P27
Lopez, P.	P16
López-Coronado, J.M.	M5.5, P25
López-García, M.T.	M3.4
López-Ocaña, L.	M5.5, P25
López-Santín, J.	P39
Lucas-Elío, P.	M5.4, P29
Maaheimo, H.	M6.4
Mandala, S.	P22
Manresa, A.	P19, P27, P42
Marcote, G.	P12
Marqués-Calvo, M.S.	P11
Martín, I.	P27
Martín, J.F.	M6.5, P7, P26
Martín, R.	M2.2
Martín, S.	P34
Martínez, A.T.	M1.4, M4.5, P6, P28, P38
Martínez, M.J.	M1.4, P6, P14, P28, P38
Martínez-Castro, M.	P26
Mate, M.J.	P38
Mateo, C.	P30, P34
Mattanovich, D.	M6.4
Maurer, M.	M6.4
Mellado, E.	M5.1, P30, P34
Méndez, C.	M3.1, M3.5
Miki, Y.	P28
Milligan, J.	P22
Molina, M.	P37
Molina, S.	M4.5
Molina-Quintero, L.	P29
Morales, M.	P28, P38
Moreira, M.T.	M2.3
Moreno, M.L.	P30
Mormeneo, M.	M6.3, P31
Moya, R.	M4.2
Munduate, A.	P23
Olano, C.	M3.5
Olivares, M.	M2.2
Omar, N.B.	P32

Panizza, P.	P33
Pardo Varela, B.	P2
Pastor, F.I.J.	M1.5, M4.3, P31, P43
Payero, T.D.	M6.5
Peláez, F.	C.C, P22
Pérez, D.	P34
Pérez, M.I.	M4.2
Pérez-Rama, M.	P35
Pérez-Redondo, R.	M3.4
Pinedo, C.	M3.3
Pinsach, J.	P39
Platas, G.	P22
Plou, F.J.	M4.1
Pogni, R.	P38
Polaina, J.	P24
Pompeia, S.	P19
Poza, M.	P2, P45
Prado, P.	P1
Puertas, J.M.	P36
Quesada, E.	M5.2, P40
Ramírez, J.	M3.3
Reborditos, L.	P37
Reboreda, A.	P13
Reguant, C.	P4, P32
Rencoret, J.	M4.5
Resina, D.	P39
Revuelta, J.L.	M2.1
Rioboo, C.	P1
Rodríguez, J.	M4.2
Rodríguez, J.M.	M2.2
Rodríguez, M.E.	P37
Rodríguez, R.	M1.3
Rodríguez-Frómata, R.A.	M1.3
Romero, A.	P38
Roncero, M.B.	M1.5
Rozès, N.	P32
Ruiz, J.	P39
Ruiz, L.	P45, P46
Ruiz-Dueñas, F.J.	P28, P38
Ruiz-Vázquez, R.M.	M1.3
Salas, J.A.	M3.5
Sanchez-Amat, A.	M5.4, P29
Sánchez-Ferrando, F.	M6.4
Sánchez-Porro, C.	M5.1
Santamaría, P.L.	M2.1
Santamarta, I.	M3.4
Santos, M.A.	M2.1
Santos-Aberturas, J.	M6.5
Saparrat, M.	P14

Índice de autores

Serrano-Amatriain, C.	M2.1
Solano, F.	M5.4
Stadlmann, J.	M6.4
Suárez, C.	P35
Syfantou, N.	P33
Tahrioui, A.	M5.2, P40
Tomé-García, S.	M2.4, P8, P41, P45
Töplitz, I.	M6.4
Torrego, N.	P42
Torres Martínez, S.	M1.3
Torres, A.L.	M4.3
Torres, E.	P35
Torres, P.	M4.1
Uña, J.A.	M2.1
Valenzuela, S.	P43
Valero, F.	M4.4, P6
Vallejo, J.A.	P2, P44
Vallejo, I.	M6.1
Veiga-Crespo, P.	M2.4, P8, P41, P44, P45, P46
Ventosa, A.	M5.1, P30, P34
Vicente, C.M.	M6.5
Vicente, F.	P22
Vicente, G.	M1.3
Vidal, T.	M1.5, M4.3
Vieites, J.M.	P12, P13
Viikari, L.	C.I
Vilariño, C.	M2.1
Viñas, M.	P45, P46
Wariishi, H.	P28
Zueco, J.	M6.3, P31