

SEM@foro

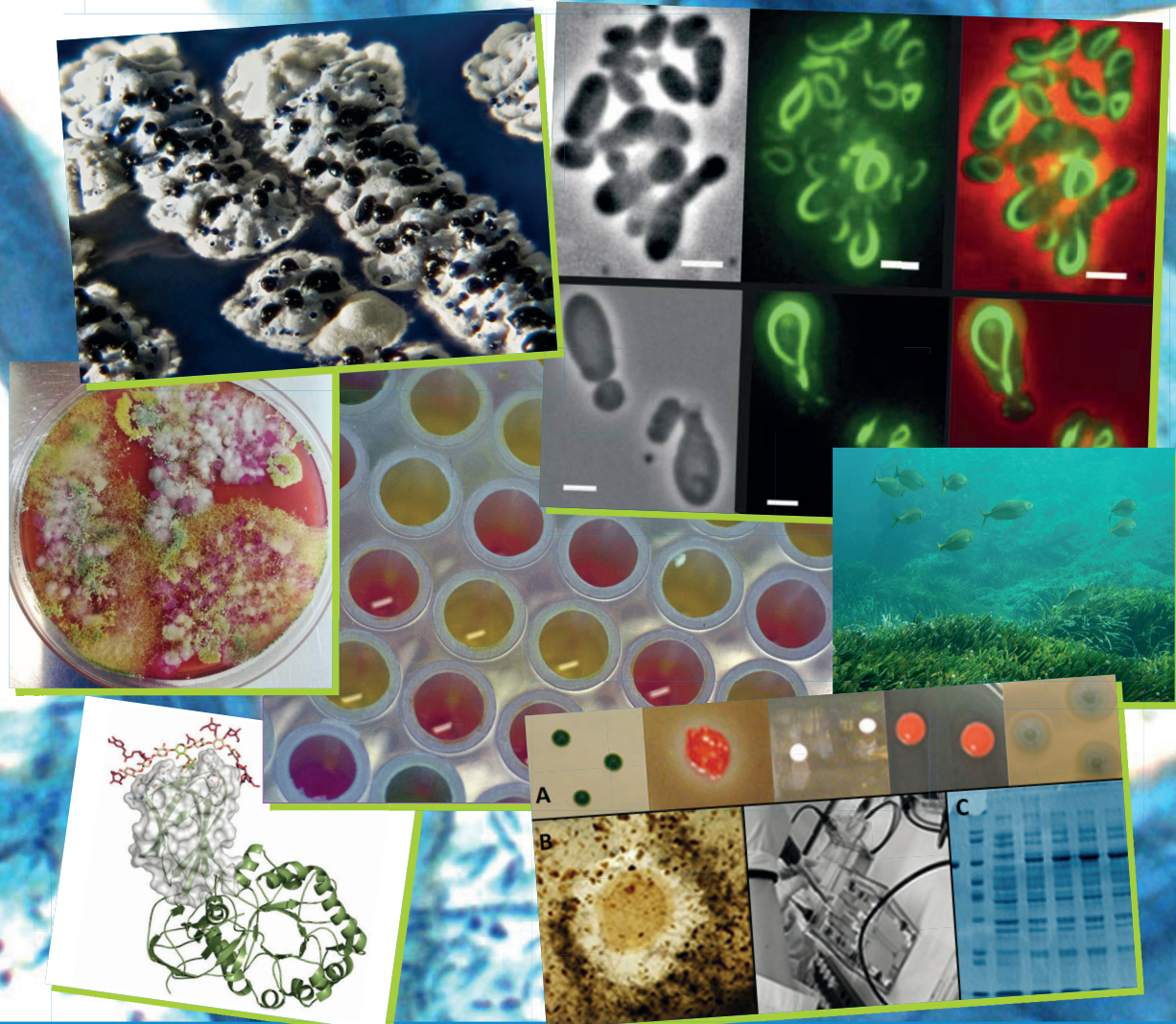
Revista de la Sociedad Española de Microbiología

JUNIO 2017

N.º 63

Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana

www.sem microbiologia.org



FILATELIA Y MICROBIOLOGÍA



El Grupo Especializado de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana

Francisco Javier Pastor

Presidente del Grupo

El Grupo Especializado de Microbiología Industrial se constituyó en el año 1977 y celebró 4 reuniones entre los años 1980 y 1988. Las reuniones se interrumpieron coincidiendo con la creación de la Sociedad Española de Biotecnología, SEBIOT. Sin embargo dada la fundamental contribución de los microorganismos a la biotecnología se hizo patente la necesidad de retomar las reuniones del Grupo de la SEM, para incidir en los aspectos más específicamente microbianos de la biotecnología. En el Congreso Nacional de la SEM celebrado en Cáceres en 2005 se renovó la junta directiva del Grupo, que presidida por Tomás González Villa decidió reanudar las reuniones periódicas del Grupo, así como renombrarlo como Grupo de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana. Aunque puede parecer un título redundante, es una forma de abarcar desde los aspectos con más tradición y solera en microbiología industrial a los más innovadores.

Las reuniones del Grupo se reanudaron con el Congreso celebrado en 2006 en A Coruña y desde entonces se han celebrado periódicamente, siendo la última el Congreso celebrado en León en 2016. En ella se hizo patente la diversidad de temas de investigación tratados por los miembros del Grupo y la transversalidad de los trabajos que realizan.

Una de las palabras de más reciente implantación en el vocabulario científico y socioeconómico y también de gran actualidad es "sostenibilidad". El término "**Desarrollo Sostenible**" se utilizó por primera vez en el *Informe Brundtland* elaborado por una Comisión de la ONU en 1987. Un objetivo fundamental es minimizar el impacto medioambiental de la actividad industrial en particular y de la actividad humana en general. Los que trabajamos en microbiología industrial somos conscientes del importante papel de los microorganismos

y sus productos para aproximarnos a la meta del desarrollo sostenible. Es la sección de la biotecnología que suele denominarse **Biotecnología Blanca**. Una de las herramientas clave son las **Enzimas Microbianas**. La aplicación de las mismas en procesos productivos permite minimizar la generación de productos tóxicos y el ahorro de energía. Las enzimas pueden también jugar un papel clave en la destoxificación de efluentes y contaminantes. Dentro de este contexto, el interés económico por la optimización de recursos incentiva el desarrollo de tecnología para la transformación de la **Biomasa**, especialmente de los restos agrícolas sin valor alimenticio (lignocelulosa), en productos de valor añadido. El papel de los microorganismos en este proceso es clave. Baste como ejemplo la producción de bioetanol como combustible.

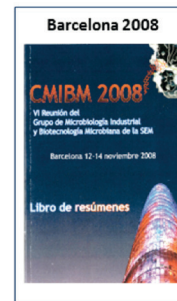
Aunque la aplicación más tradicional de los microorganismos es la producción de alimentos fermentados, la **Biotecnología Alimentaria** es uno de los campos científicos con mayor esfuerzo innovador. Aspectos como la producción de probióticos, **Prebióticos** y alimentos funcionales producen grandes beneficios a las empresas. El creciente interés económico por el vino de elevada calidad ha impulsado el desarrollo de estudios enológicos, que abarcan aspectos tan dispares desde selección de levaduras de vides silvestres a la mejora del aroma del vino por expresión de genes de plantas en levaduras de vinificación, campos que pueden dar un aspecto muy novedoso a las bebidas alcohólicas. No hay que olvidar el desarrollo de nuevos sis-

temas de detección rápida de patógenos en alimentos, donde el desarrollo de nuevos **Kits de Identificación** es un campo crucial.

Pero sin duda, la temática de mayor impacto de la microbiología industrial es la relacionada con la medicina, la producción de fármacos. La necesidad de producirlos a gran escala determinó en el pasado el diseño y desarrollo del biorreactor de cultivo sumergido. Hoy la frecuente aparición e incidencia de microorganismos patógenos multirresistentes hace necesaria la identificación y el desarrollo de **Nuevos Antibióticos**. Entre las diversas estrategias, la **Biosíntesis Combinatoria**, la minería genómica y las técnicas de cribado de alto rendimiento permiten la identificación de nuevos antibacterianos, antitumorales y **Productos Bioactivos**. La emergencia de nuevos patógenos, como el virus Ebola, hacen necesarios estudios moleculares para la identificación de nuevas dianas terapéuticas.

Los equipos de investigación del Grupo de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana trabajamos en aspectos avanzados de todas las temáticas mencionadas. Sin embargo, considero que, aunque de muy buen nivel científico, somos una muestra incompleta de los investigadores españoles en la disciplina. Desde estas páginas animamos a todos los profesores, científicos y profesionales en biotecnología microbiana a incorporarse y participar activamente en el Grupo. Sin duda la contribución de todos repercutirá muy favorablemente en el desarrollo científico y social de nuestro país.

Muchas gracias, recibid un saludo.



Carátulas de la primera página del libro de resúmenes de los Congresos del Grupo desde 2006

Evaluación del potencial biotecnológico y medioambiental de microorganismos ligninolíticos (actinobacterias y hongos) y sus sistemas enzimáticos

Manuel Hernández, Juana Rodríguez, Francisco Guillén, Javier Mérida, Ana Belén García, Alba Blánquez, Sergio Morales y María Enriqueta Arias



Departamento de Biomedicina y Biotecnología. Universidad de Alcalá. 28805 Alcalá de Henares (Madrid).



Grupo MICRODEG de la Universidad de Alcalá. De izquierda a derecha: Sergio Morales, María Enriqueta Arias, Francisco Guillén, Juana Rodríguez, Manuel Hernández y Alba Blánquez

El grupo de investigación del Departamento de Biomedicina y Biotecnología de la Universidad de Alcalá coordinado por la Dra M^a Enriqueta Arias Fernández (Grupo MICRODEG), ha centrado su investigación desde sus inicios hace más de 20 años en la selección de microorganismos lignocelulolíticos y sistemas enzimáticos para aumentar el valor biotecnológico de residuos agroforestales y para implementar métodos biológicos en procesos industriales, con vistas a disminuir su impacto ambiental. A lo largo de estos años se han conseguido establecer los mecanismos básicos implicados en la degradación de lignocelulosa por actinobacterias del género *Streptomyces*, habiéndose aislado y caracterizado los sistemas enzimáticos degradadores de dos de sus polímeros

mayoritarios (lignina y hemicelulosas). Entre estas enzimas se han caracterizado bioquímica y genéticamente xilanasas y lacasas, cuyo potencial biotecnológico y medioambiental se ha puesto de manifiesto en distintas áreas de importancia industrial. Así, se ha demostrado su utilidad en procesos de producción de pastas de celulosa y papel (biopasteo y bioblanqueo) y en los últimos años se está explorando la capacidad de cepas seleccionadas y/o de sus enzimas para resolver problemas de contaminación ambiental derivados de otras industrias (textil y petroquímica), así como de actividades antropogénicas (presencia de contaminantes emergentes en aguas). Recientemente, también estamos evaluando la eficacia en la descontaminación de suelos y aguas de

microorganismos ligninolíticos seleccionados (actinobacterias y hongos) mediante inducción de la producción de radicales hidroxilo, proceso que hemos denominado de Bio-Oxidación Avanzada (PBOA).

ENSAYOS REALIZADOS CON LACASAS BACTERIANAS Y SISTEMAS LACASA-MEDIADOR

Entre las enzimas purificadas y caracterizadas en nuestro grupo, tienen especial relevancia las lacasas producidas por *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 (ScIA) (Arias *et al.*, 2003) y *Streptomyces ipomoeae* CECT 3341 (SiIA) (Molina *et al.*, 2009). Nuestro interés en ellas radica, por un lado, en profundizar

en el conocimiento básico de estas enzimas ya que, al tratarse de enzimas recientemente descubiertas en bacterias, su estructura y función son prácticamente desconocidas, y por otro, en la necesidad creciente de encontrar sistemas enzimáticos oxidativos de alta efectividad y bajo coste, que puedan ser aplicados en la resolución de problemas industriales y medioambientales (Moya *et al.*, 2010; Eugenio *et al.*, 2011; Martín-Sampedro *et al.*, 2015).

Los últimos estudios básicos que hemos llevado a cabo con SiIA han permitido elucidar su función biológica y han demostrado por primera vez la implicación de las lacasas en la degradación de lignina por actinobacterias, merced a la realización de un estudio comparativo entre la cepa salvaje de *S. ipomoeae* productora de SiIA y una cepa mutante no productora SiIA. El estudio se llevó a cabo cultivando ambas cepas sobre paja de trigo en condiciones de fermentación en estado sólido (SSF), poniéndose de manifiesto que la cepa salvaje presenta una capacidad solubilizadora de lignina, estimada como APPL (Acid-Precipitable Polymeric Lignin), 12 veces superior a la cepa mutante. Asimismo, los análisis mediante Pirólisis analítica asociada a Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas (Py-GC/MS) de los APPL correspondientes a ambas cepas, mostraron que la abundancia relativa de compuestos derivados de lignina en el APPL producido por la cepa silvestre fue mucho más elevada que en el producido por la cepa mutante SiIA (Arias *et al.*, 2016).

En nuestro interés por proporcionar valor agregado a las lacasas bacterianas caracterizadas, se evaluó la utilidad de la lacasa SiIA producida por *S. ipomoeae* para degradar contaminantes emergentes, eligiéndose en primer término antibacterianos de tipo fluoroquinolona como modelo representativo de PPCPs (Pharmaceuticals and Personal Care Products) detectados con frecuencia en aguas continentales. Los análisis cromatográficos realizados (UHPLC-DAD) y la evaluación de la toxicidad (sistemas Microtox y Algaltoxkit FTM) de los productos de degradación obtenidos mediante la aplicación del sistema lacasa mediador (LMS) constituido por SiIA y acetosiringona, pusieron de manifiesto la eficacia de esta enzima para ser utilizada como herramienta de descontami-

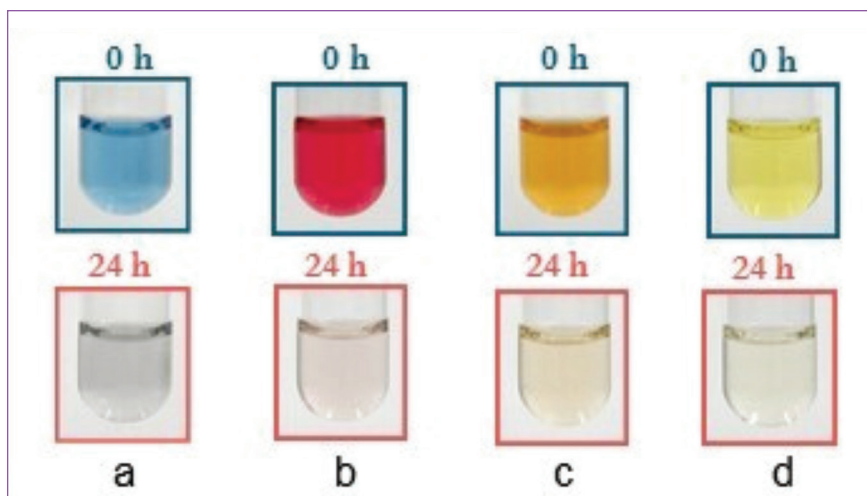


Figura 1.

Fotografías ilustrativas de la decoloración de los tintes Reactive Blue 19 (a), Chromotrope R (b), Methyl Orange (c) y Tartrazine (d) mediante procesos de biooxidación avanzada (PBOA).

nación de este tipo de fármacos (Blánquez *et al.*, 2016).

Recientemente también hemos abordado el estudio de la potencial utilidad de la lacasa SiIA en la mejora del rendimiento de sacarificación de sustratos lignocelulósicos para producir bioetanol, frente a la lacasa fúngica de *Trametes villosa*. Para ello, se ha ensayado la eficacia de ambas lacasas en la deslignificación y sacarificación de paja de trigo pretratada mediante "steam explosion". Los resultados obtenidos mostraron la mayor eficacia de SiIA en la etapa de pre-sacarificación del sustrato, produciendo una mayor liberación de glucosa y xilosa para la etapa de fermentación. Ensayos posteriores de sacarificación y fermentación simultáneas con el sustrato pretratado con ambas lacasas pusieron de manifiesto una mejora en el rendimiento de las dos etapas, siendo importante destacar la ventaja de utilizar la lacasa bacteriana SiIA sobre lacasas fúngicas, ya que su amplio rango de pH de actuación posibilita su aplicación a nivel industrial, facilitando la integración de ambas etapas.

BIO-OXIDACIÓN AVANZADA DE CONTAMINANTES

En estudios anteriores se puso de manifiesto la capacidad de inducir la producción de radicales hidroxilo en hongos ligninolíticos mediante ciclos redox de quinonas

(Gómez-Toribio *et al.*, 2009; Aranda *et al.*, 2011). Más recientemente, hemos comprobado la inducción de este mismo mecanismo en cepas de *Streptomyces*. En nuestro interés por conocer la eficacia degradativa del proceso PBOA, se realizaron ensayos con distintos grupos de contaminantes: compuestos orgánicos persistentes (BTEX, tintes textiles) y contaminantes emergentes (fármacos). Con estos sistemas oxidativos inespecíficos hemos logrado hasta el momento, la degradación de compuestos xenobióticos como benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (BTEX) y un gran número de colorantes textiles de los tipos azo, diazo, triarilmetano, antraquinona, heterociclo, ftalocianina e índigo (figura 1), poniéndose de manifiesto en la mayor parte de los ensayos una completa destoxificación de los mismos. Asimismo, se ha comprobado su eficacia en la degradación y destoxificación de fármacos como fluoroquinolonas y carbamazepina.

FUNCIONALIZACIÓN DE LIGNINA CON FINES BIOTECNOLÓGICOS

En la actualidad nuestro grupo de investigación ha iniciado una nueva línea en la que se pretende dar valor añadido a ligninas de origen agroforestal y/o industrial, mediante funcionalización con lacasas, teniendo en cuenta la consideración actual de este polímero como una materia prima renovable con potencial biotecnológico (aditivos para pien-

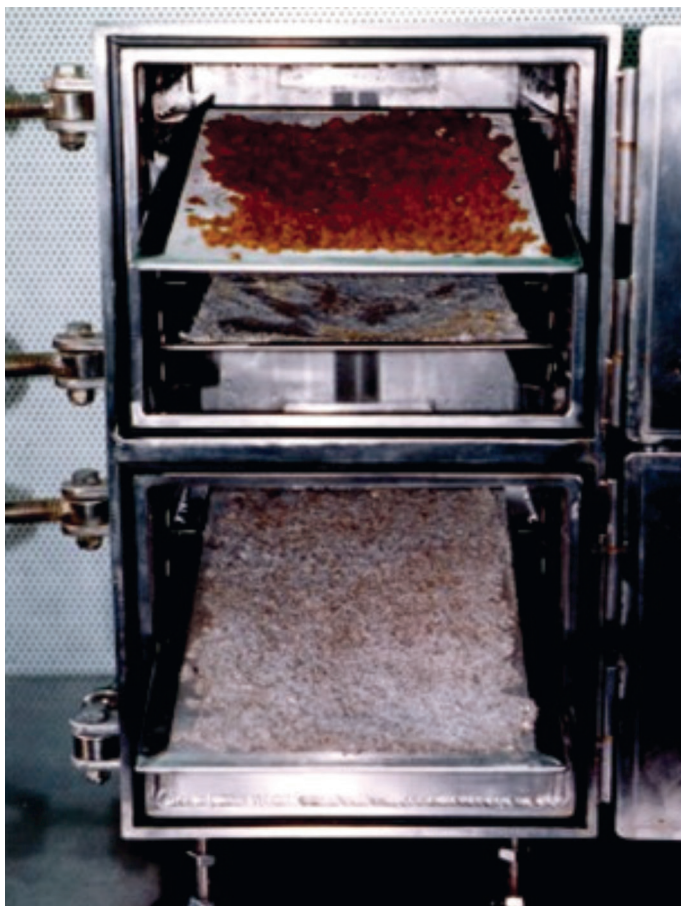


Figura 2.

Fotografía del biorreactor de bandejas utilizado para la fermentación de paja de trigo mediante SSF por *Streptomyces ipomoeae* CECT 3341

osos, plásticos biodegradables, adhesivos, oleogeles, bioespesantes, etc.).

Previamente habíamos analizado la capacidad de SiIA y SiIA-acetosiringona para polimerizar ligninas de origen técnico (kraft y organosolv) y lignanos en condiciones alcalinas (Moya *et al.*, 2011). Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo a pH 7, 8, 9 y 10, y el efecto sobre los distintos sustratos se monitorizó mediante consumo de oxígeno, cromatografía de exclusión molecular (SEC) y MALDI-TOF-MS. Los resultados obtenidos demostraron la capacidad de la lacasa y, en mayor medida, del sistema LMS para incrementar la masa molecular media de las ligni-

nas tratadas y generar polímeros de lignano de hasta 4 unidades.

Con estos antecedentes estamos llevando a cabo un Proyecto MINECO coordinado con el grupo de la Dra. Valencia de la Universidad de Huelva, cuyo objetivo principal es desarrollar nuevos agentes espesantes amigables con el medio ambiente, obtenidos a partir de fracciones lignocelulósicas derivadas de residuos agrícolas fermentados mediante SSF con *Streptomyces* (figura 2) y lignina kraft funcionalizada con SiIA. El objetivo es conseguir formulaciones biodegradables tipo gel en fase orgánica (oleosa) con diversas aplicaciones industriales (lubricantes, adhesivos, recubri-

mientos, films, ...), en concordancia con las nuevas directivas de sostenibilidad ambiental.

BIBLIOGRAFÍA

- Aranda E, Marco-Urrea E, Caminal G, Arias ME, García Romera I y Guillén F** (2010). Advanced oxidation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene isomers (BTEX) by *Trametes versicolor*. *J Hazard Materials* 181: 181-186.
- Arias ME, Arenas M, Rodríguez J, Soliveri J, Ball A y Hernández M** (2003). Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a non-phenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Appl Environ Microbiol* 69 (4): 1953-1958.
- Arias ME, Blánquez A, Hernández M, Rodríguez J, Ball AS, González-Pérez J.A, Jiménez-Morillo NT y González-Vila FJ** (2016). Role of a thermostable laccase produced by *Streptomyces ipomoeae* in the degradation of wheat straw lignin in solid state fermentation. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 122: 202-208.
- Blánquez A, Guillén F, Rodríguez J, Arias ME y Hernández M** (2016). The degradation of two fluoroquinolone based antimicrobials by SiIA, an alkaline laccase from *Streptomyces ipomoeae*. *World J Microbiol Biotechnol* 32: 52-59.
- Eugenio ME, Hernández M, Moya R, Martín-Sampedro R, Villar JC y Arias ME** (2011). Evaluation of a new laccase produced by *Streptomyces ipomoeae* on biobleaching and ageing of kraft pulps. *BioResources* 6(3): 3231-3241.
- Gómez-Toribio V, García-Martín AB, Martínez MJ, Martínez AT y Guillén F** (2009). Induction of extracellular hydroxyl radical production by white-rot fungi through quinone redox cycling. *Appl Environ Microbiol* 75: 3944-3953.
- Martín-Sampedro R, Miranda J, García-Fuentevilla LL, Hernández M, Arias ME, Díaz MJ y Eugenio ME** (2015). Influence of process variables on the properties of laccase biobleached pulps. *Bioprocess Biosyst Eng* 38: 113-123.
- Molina-Guijarro JM, Pérez J, Muñoz-Dorado J, Guillén F, Moya R, Hernández M, y Arias ME** (2009). Molecular and physico-chemical characterization of a novel pH-versatile and haloresistant laccase from *Streptomyces ipomoeae* CECT 3341. A tool for the detoxification of azo dyes. *Int Microbiol* 2:13-21.
- Moya R, Hernández M, García-Martín AB, Ball AS y Arias ME** (2010). Contributions to a better comprehension of redox-mediated decolouration and detoxification of azo dyes by a laccase produced by *Streptomyces cyaneus* CECT. *Bioresour Technol* 101: 2224-2229.
- Moya R, Saastamoinen P, Hernández M, Suurnäki A, Arias ME y Mattinen M-L** (2011). Reactivity of bacterial and fungal laccases on lignin in alkaline conditions. *Bioresour Technol*. 102: 10006-10012.

Enzimas Microbianas de Aplicación Industrial

Francisco Javier Pastor y Pilar Díaz



Departamento de Genética, Microbiología y Estadística. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona. Av. Diagonal 643. 08028 Barcelona. Tel 934034626



De arriba a abajo y de izquierda a derecha: Pau Soteras, Guillem Mas, Rubén Reina, Susana Valenzuela, Gerard Margalef, Alejandro Costa, Maddalen Rodríguez, Mónica Estupiñán, Javier Pastor, Belén Infanzón, Josefina Martínez, Cristina Valls y Pilar Díaz

El grupo de investigación “Enzimas Microbianas de Aplicación Industrial” pertenece a la Sección de Microbiología, Virología y Biotecnología del recién estrenado Departamento de Genética, Microbiología y Estadística de la Universidad de Barcelona, ubicado en la Facultad de Biología de dicha Universidad. Está coordinado por los profesores Francisco Javier Pastor y Pilar Díaz, y forman parte del mismo la profesora titular Josefina Martínez, las profesoras asociadas doctoras Susana Valenzuela y Mónica Estupiñán, así como varios estudiantes de Doctorado, Máster y Grado.

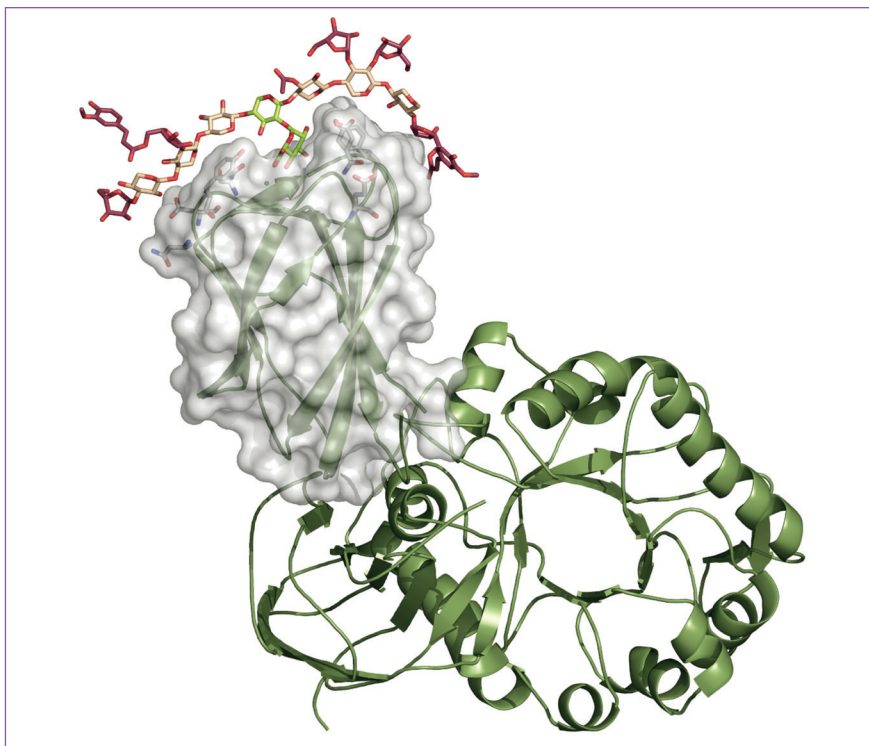
El objetivo y temática principal de investigación es la identificación y estudio de enzimas con actividad despolimerizante o modificadora de la biomasa, tanto de materiales lignocelulósicos como de naturaleza lipídica. Aparte del estudio de la biología molecular de estas enzimas, se evalúa la aplicación

de las mismas en procesos industriales de transformación de la biomasa en productos de consumo. Uno de los principales retos es el desarrollo y diseño de enzimas que minimicen el impacto ambiental de la actividad industrial, cuya introducción en los procesos productivos permita reducir la generación de contaminantes, aumente el rendimiento de las materias primas y/o posibilite la obtención de nuevos productos con propiedades y características novedosas. En definitiva, se persigue la puesta punto de Tecnologías Sostenibles mediante el uso de enzimas.

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE HIDROLASAS

La caracterización bioquímica y genética de nuevas hidrolasas con actividad sobre carbohidratos y lípidos es un aspecto fun-

damental del trabajo investigador. El grupo ha identificado y clonado numerosas carbohidratasas y lipasas a partir de cepas de la colección propia de organismos degradadores de materia orgánica. Entre las enzimas estudiadas con mayor profundidad destacan las xilanasas, de las que se dispone de una gran variedad de tipos de diferentes familias enzimáticas, estructura molecular y actividad. Recientemente se han identificado y caracterizado varias xilanasas de la familia 30 de glicosil hidrolasas (GH30), familia reciente de xilanasas, con muy pocos ejemplos descritos. La característica más notoria de las mismas es su especificidad por el glucuronoxilano, xilano de maderas duras con ramificaciones de ácido glucurónico. Los análisis cristalográficos de las xilanasas GH30 muestran el requerimiento de residuos laterales de ácido glucurónico en el xilano para su unión al centro activo de las enzimas. Los productos de hidrólisis generados por las mismas son



Estructura de la xilanasa Xyn30D de *Paenibacillus barcinonensis*. Constituida por un módulo catalítico de la familia GH30 y un módulo de unión a carbohidratos CBM35. Se muestra la unión de un xilooligosacárido ramificado.

xilooligosacáridos ácidos, de gran potencial biotecnológico como productos bioactivos. Las celulasas son un segundo grupo de carbohidrasas objeto de estudio. Se han clonado y caracterizado varias endoglucanasas y celobiohidrolasas, muchas de las cuales han mostrado un elevado sinergismo en la despolimerización de la celulosa cristalina. También, con el fin de disponer de un mayor rango de posibilidades para la obtención de productos de valor añadido a partir de materiales lignocelulósicos, recientemente se ha abordado el estudio de enzimas con actividad sobre celulosa distinta a la hidrolítica. En este campo se han identificado varias monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMOs), enzimas que rompen los enlaces glucosídicos por oxidación, y varias enzimas no despolimerizadores que modifican la superficie e interacción entre las fibras de celulosa, las denominadas expansinas.

Una clase distinta de enzimas estudiadas por el grupo de la Universidad de Barcelona son las enzimas modificadoras de lípidos, lipasas y esterases. En esta gran clase de enzimas se dispone de un gran número de ejemplos, muchos de ellos provenientes

de microorganismos aislados de hábitats tropicales o volcánicos. Como ejemplo, se han identificado dos lipasas como miembros de nuevas familias no descritas anteriormente. Además, se han realizado estudios de mejora con objeto de utilizarlas tanto en la producción de fármacos a través de la resolución enantiomérica de alcoholes terciarios como en la síntesis enzimática de biodiesel. En este sentido, un aspecto a destacar es la modificación de la especificidad de sustrato de las lipasas mediante mutagénesis por saturación, la obtención de variantes termoresistentes de lipasas por evolución dirigida, o la modificación del bolsillo catalítico (*oxyanion hole*) de dos esterases por mutagénesis dirigida. Asimismo, mediante mutagénesis por diseño racional, se ha estudiado el significado de los residuos implicados en el inusual *oxyanion hole* de tipo Y. Por último, la introducción de estudios *in silico* sobre aspectos estructurales o evolutivos de las lipasas aisladas ha permitido la identificación de dominios estructurales, regiones funcionales y motivos conservados que permiten obtener una visión acerca de los procesos evolutivos de las diferentes enzimas, considerando sus hábitats de aislamiento.

En relación a otro tipo de enzimas que actúan sobre sustratos lipídicos, se ha estudiado en profundidad el sistema diol-sintasa de *P. aeruginosa*, exclusivo de esta especie y nunca antes descrito en bacterias. Se trata de dos enzimas codificadas en un mismo operón que actúan de manera secuencial sobre el ácido oleico, generando hidroperóxido, que a su vez es convertido en el correspondiente diol. Estudios evolutivos realizados *in silico* sugieren que las dos enzimas derivan de un evento de duplicación génica con posterior neofuncionalización de una de las dos enzimas, y permiten su asignación a una nueva subfamilia de di-hemo citocromo c peroxidasas. Ello se ha confirmado mediante mutagénesis dirigida, pudiéndose identificar los residuos implicados en la actividad catalítica.

APLICACIONES EN BIOTECNOLOGÍA DE LA LIGNOCELULOSA

La evaluación del potencial biotecnológico de las enzimas caracterizadas en la modificación de la lignocelulosa permite identificar aquellas con mayor aplicabilidad industrial para la mejora de tecnologías de producción y en la obtención de productos de valor añadido a partir de la biomasa.

En este contexto se han caracterizado varias enzimas con aplicación en tecnología de fabricación de papel. Dos de las xilanasas evaluadas han mostrado elevada eficiencia en el proceso de blanqueo de pasta de papel, tanto de eucalipto como de fibras agrícolas. Es de destacar que, conjuntamente con la disminución en el consumo de blanqueantes químicos contaminantes y el aumento de blancura de las pastas, la aplicación de xilanasas puede disminuir el contenido en ácidos hexenurónicos de las pastas y por tanto contribuir a ralentizar el envejecimiento del papel. Adicionalmente a la disminución en la generación de desechos tóxicos, la aplicación de enzimas puede disminuir el consumo energético del proceso de fabricación. En concreto, se han caracterizado una endoglucanasa y una celobiohidrolasa que modifican superficialmente las fibras papeleras facilitando el refinado mecánico y permitiendo elaborar papeles menos densos pero de mayor resistencia mecánica.

La aplicación de enzimas puede facilitar la funcionalización de las fibras promoviendo

la unión de compuestos de distinto carácter y dando lugar a papeles con propiedades completamente nuevas. La modificación enzimática de las pastas papeleras posibilita la introducción de grupos funcionales para el acoplamiento de sustancias hidrofóbicas o antioxidantes que darían lugar a una nueva generación de productos basados en celulosa. En este campo se ha ensayado con éxito la obtención de papeles antimicrobianos de gran potencial en el embalaje de productos alimenticios.

BIOTRANSFORMACIÓN DE LÍPIDOS

La modificación del *oxyanion hole* de dos esterasas identificadas por el grupo ha permitido su aplicación para la resolución de mezclas racémicas de alcoholes terciarios, elementos clave para la producción de fármacos. En este sentido, se obtuvieron diversas variantes para cada una de las esterasas, que se ensayaron sobre un gran número de alcoholes terciarios. Entre las variantes enzimáticas ensayadas se encontraron dos mutantes con valores de enantioselectividad de $E > 100$, capaces de resolver complejos acetatos de alcoholes terciarios propargílicos con aplicación farmacológica.

Otra aplicación de las lipasas desarrollada recientemente hace referencia a la producción enzimática de biodiesel. Para ello se han ensayado diversas lipasas, tanto solubles como inmovilizadas, sobre sustratos de distinto origen y con calidades y composiciones variables. Se obtuvieron ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) con resultados variables en función de la enzima y las materias primas utilizadas. Cabe destacar también los resultados obtenidos en cuanto a producción de FAMES cuando se ensayaron materias primas alternativas como aceites de res-

tauración o aceites derivados de hongos. En estos casos, aunque con una productividad inferior, se pudo obtener un buen porcentaje de FAMES. Este sistema fue mejorado con la introducción de fosfolipasas, que permiten llevar a cabo el desgomado de las materias primas en la misma reacción de transesterificación, permitiendo así la implementación de un sistema de producción enzimática de biodiesel en un solo paso. Este proceso, más económico y sostenible que los existentes, ha sido adoptado actualmente por dos compañías norteamericanas (Viesel y Blue Sun) para la producción de biodiesel a escala comercial.

PUBLICACIONES SELECCIONADAS DE LOS ÚLTIMOS 5 AÑOS

Cerda-Mejía L, Valenzuela S, Frías C, Díaz P y Pastor FIJ. (2017). A bacterial GH6 cellobiohydrolase with a novel modular structure. *Appl Microbiol Biotechnol* 101: 2943-2952.

Cesarini S, Haller RF, Díaz P, Nielsen PM. (2014). Combining phospholipases and a liquid lipase for one-step biodiesel production using crude oils. *Biotechnol Biofuels* 7.

Cesarini S, Pastor FIJ, Nielsen PM y Díaz P. (2015). Moving towards a Competitive Fully Enzymatic Biodiesel Process. *Sustainability* 7: 7884-7903.

Chiriac AI, Pastor FIJ, Popa VI, Aflori M y Ciolacu D. (2014). Changes of supramolecular cellulose structure and accessibility induced by the processive endoglucanase Cel9B from *Paenibacillus barcinonensis*. *Cellulose* 21: 203-219.

Ciolacu D, Chiriac AI, Pastor FIJ y Kokol V. (2014). The influence of supramolecular structure of cellulose allomorphs on the interactions with cellulose-binding domain, CBD3b from *Paenibacillus barcinonensis*. *Bioresour Technol* 157: 14-21.

Estupiñán M, Alvarez-García D, Barril X, Díaz P y Manresa A. (2015). In Silico/In Vivo Insights into the Functional and Evolutionary Pathway of *Pseudomonas aeruginosa* Oleate-Diol Synthase. Discovery of a New Bacterial Di-Heme Cytochrome C Peroxidase Subfamily. *Plos One* 10.

Estupiñán M, Díaz P y Manresa A. (2014). Unveiling the genes responsible for the unique *Pseudomonas*

aeruginosa oleate-diol synthase activity. *BBA-Mol Cell Biol L* 1841: 1360-1371.

Fillat A, Romea P, Pastor FIJ, Urpi F y Díaz P. (2015). Kinetic resolution of esters from secondary and tertiary benzylic propargylic alcohols by an improved esterase-variant from *Bacillus* sp. BP-7. *Catal Today* 255: 16-20.

Fillat A, Gallardo O, Vidal T, Pastor FIJ, Díaz P y Roncero MB. (2012). Enzymatic grafting of natural phenols to flax fibres: Development of antimicrobial properties. *Carbohydr Polym* 87: 146-152.

García-Ubasart J, Torres AL, Vila C, Pastor FIJ y Vidal T. (2013). Biomodification of cellulose flax fibers by a new cellulase. *Ind Crop Prod* 44: 71-76.

Infanzón B, Valenzuela SV, Fillat A, Pastor FIJ y Díaz P. (2014). Unusual carboxylesterase bearing a GGG(A) X-type oxyanion hole discovered in *Paenibacillus barcinonensis* BP-23. *Biochimie* 104: 108-116.

Martínez E, Estupiñán M, Pastor FIJ, Busquets M, Díaz P y Manresa A. (2013). Functional characterization of ExFadL0, an outer membrane protein required for exporting oxygenated long-chain fatty acids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* 95: 290-298.

Panizza P, Cesarini S, Díaz P y Rodríguez-Giordano S. (2015). Saturation mutagenesis in selected amino acids to shift *Pseudomonas* sp acidic lipase Lip I.3 substrate specificity and activity. *Chem Commun* 51:1330-1333.

Sainz-Polo MA, González B, Menéndez M, Pastor FIJ y Sanz-Aparicio J. (2015). Exploring multimodularity in plant cell deconstruction. Structural analysis of Xyn10C containing the CBM22-1-CBM22-2 tandem. *J Biol Chem* 290: 17116-17130.

Sainz-Polo M A, Valenzuela SV, Pastor FIJ, González B y Sanz-Aparicio J. (2014). Structural analysis of glucuronoxylan-specific Xyn30D and its attached CBM35 domain gives insights into the role of modularity in specificity. *J Biol Chem* 289: 31088-31101.

Valenzuela SV, Ferreres G, Margalef G, y Pastor FIJ. (2017). Fast purification method of functional LPMOs from *Streptomyces ambifaciens* by affinity adsorption. *Carbohydr Res* in press.

Valenzuela SV, López S, Biely P, Sanz-Aparicio J y Pastor FIJ. (2016). The glycoside hydrolase family 8 reducing-end xylose-releasing exo-oligoxylanase Rex8A from *Paenibacillus barcinonensis* BP-23 is active on branched xylooligosaccharides. *Appl Environ Microbiol* 82: 5116-5124.

Valenzuela SV, Valls C, Roncero MB, Vidal T, Díaz P y Pastor FIJ. (2014). Effectiveness of novel xylanases belonging to different GH families on lignin and hexenuronic acids removal from specialty sisal fibres. *J Chem Technol Biot* 89: 401-406.

Microbiología Aplicada y Biotecnología de Hongos

Jesús Manuel Cantoral, Francisco Javier Fernández-Acero, María Carbú, Carlos Garrido, Victoria E. González-Rodríguez, Gustavo A. Cordero y Ana Fernández



Laboratorio de Microbiología. Departamento de Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública. Facultades de Ciencias. Instituto Universitario de Investigaciones Vitivinícolas y Agroalimentarias (IVAGRO). Universidad de Cádiz. Puerto Real (Cádiz)



Foto de grupo. De izquierda a derecha: María Carbú, Ana Fernández-Morales, Victoria E. González-Rodríguez, Jesús M. Cantoral, Gustavo Cordero y Carlos Garrido

El grupo de investigación «**Microbiología Aplicada y Biotecnología de Hongos**» se crea en la Universidad de Cádiz hace más de dos décadas, siendo desde su inicio un equipo multidisciplinar. Desde su origen el grupo ha abarcado diferentes aspectos tanto teóricos como aplicados al sector de la Viticultura y la Agroalimentación. Pertenece al Grupo BIO 219 (Biología y Biotecnología) del Plan Andaluz de Investigación y Desarrollo y se enmarca dentro del **Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (CeIA3 «International Campus of excellence in Agrifood»)**. Una de las líneas de investigación, ha centrado sus estudios en el hongo fitopatógeno de la vid *Botrytis cinerea*. Otra línea de investigación se ha centrado en las levaduras enológicas responsables de la elaboración de vinos sometidos a crianza biológica (finos y manzanillas), vinos blancos de la provincia de Cádiz y vinos de

crianza en barrica de la DO Ribera del Duero. Desde su creación el grupo ha colaborado estrechamente con diferentes Bodegas (Sandeman, Domecq, Barbadillo, Dominio de Pingus, Lustau, etc.) solucionando problemas microbiológicos, caracterizando las levaduras en distintos sistemas enológicos o dirigiendo y controlando la fermentación con levaduras seleccionadas de la propia Bodega.

La primera línea de investigación se lleva a cabo en colaboración con el Dr. Isidro G. Collado de Química Orgánica de la Universidad de Cádiz. Se centra en el estudio de distintos hongos fitopatógenos como *Colletotrichum acutatum*, que afecta a frutos de gran importancia comercial como la fresa y *Botrytis cinerea* responsable de la “podredumbre gris” (Botrytis) que afecta no solo a la cantidad de la uva, sino a la calidad del vino resultante.

Con el desarrollo de varios proyectos hemos realizado grandes avances en la profundización del conocimiento del hongo fitopatógeno *B. cinerea*, desde el estudio de la bioquímica y biología molecular, el metabolismo secundario y el conocimiento de los mecanismos de patogenidad implicados en los procesos infecciosos. La coordinación de ambos grupos ha sido clave para poder abordar estos aspectos multidisciplinarios, además ha sido de gran ayuda la estrecha colaboración con prestigiosos grupos tanto nacionales como internacionales. El grupo ha sido pionero en la aplicación de técnicas proteómicas al estudio de este patógeno. Así, se ha estudiado el complejo conjunto de proteínas expresadas por el hongo, responsables de su fenotipo y de sus características patológicas, desde la publicación del primer mapa proteómico de *B. cinerea*, hasta la caracterización de sus distintos subproteomas (secretoma, mem-

branoma, fosfoproteoma, etc.). Por otro lado, la secuenciación del genoma de *B. cinerea* ha supuesto un importante avance. Se sabe que al menos 43 enzimas específicas son clave en el metabolismo secundario de este hongo y que tienen relación con la patogenicidad. Igualmente, hemos realizado estudios de expresión y caracterización funcional de cada una de estas enzimas. Sin embargo, salvo 4 genes que están bien caracterizados, los demás son desconocidos o se encuentran en estudios muy preliminares. Estudios recientes ponen de manifiesto que *B. cinerea* posee un mecanismo de adaptabilidad al huésped, por el que podrían disponer de diferentes armas químicas dependiendo de la situación y peculiaridades ambientales en el que se encuentre.

El objetivo final de esta línea de investigación es la profundización en el estudio funcional de los genes del metabolismo secundario del hongo *B. cinerea* y en la caracterización de las enzimas o complejos enzimáticos implicados en sus rutas biosintéticas, utilizando distintas técnicas "ómicas" (genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica). Todos estos estudios nos permitirán la determinación de nuevas dianas moleculares que proporcionen un control eficiente del patógeno, el descubrimiento de nuevos factores de virulencia y/o toxinas implicadas en el metabolismo secundario y la profundización en el conocimiento del potencial mecanismo de adaptabilidad al huésped. Todo ello nos permitirá abordar nuevas estrategias de control del patógeno y diseñar fungicidas selec-



Figura 1.

Ordenación de las barricas sobre el albero en una Bodega típica del marco jerezano para la crianza biológica y detalle de las levaduras de «velo de flor» creciendo en la superficie.

tivos y eficientes compatibles con el Medio Ambiente.

La otra línea de investigación se centra en diferentes aspectos de levaduras enológicas. Hemos aislado y caracterizado un elevado número de levaduras de velo de flor (figura 1), utilizando diferentes técnicas microbiológicas y moleculares, (campo pulsante, RFLPs del ADN mitocondrial, etc.). El desarrollo de estas técnicas nos ha permitido caracterizar genéticamente estas levaduras; concluyendo que estos grupos son muy heterogéneos, apareciendo una gran variabilidad genética entre ellas que podrían reflejar la selección artificial debido al sometimiento de estas levaduras a condiciones industriales tan específicas. Hemos sido pioneros en la aplicación de modernas técnicas como la hibridación competitiva mediante el uso de «microarrays». Este estudio compa-

rativo a nivel del genoma explicaría que la gran variabilidad encontrada respondería a un mecanismo de adaptación evolutiva de estas levaduras, que se encuentran sometidas a unas condiciones tan adversas (alto contenido en etanol y acetaldehído). Los estudios llevados a cabo han permitido en algunos casos la correlación entre la composición particular de un determinado grupo de levaduras y el estado de envejecimiento del vino o las peculiaridades organolépticas del vino fino.

Vitis vinifera L. subespecie *sylvestris* Gmelin (Hegi) es la única especie ancestral en Europa. Son parentales dioicos de las variedades de cultivo actuales y en la actualidad figuran como especie amenazada (figura 2). Esta especie constituye hoy en día un importante recurso fitogenético que alberga una importante diversidad genética, con la que



Figura 2.

Vides y uvas silvestres (Garganta del Capitán y Río Majaceite, Parque Natural de los Alcornocales, Cádiz).

hay que contar para futuros programas de mejora de viníferas y portainjertos, así como para la reforestación de ecosistemas naturales. Sin embargo, hasta ahora, no existían estudios que determinasen la ecología de microorganismos asociados a la uva de la vid silvestre, siendo de especial relevancia aquéllos implicados en la fermentación vínica como las levaduras. En este sentido se ha obtenido una importante colección de levaduras aisladas de vides silvestres en Azerbaiyán, Georgia, Rumanía, Italia y España. Este estudio pionero, nos permitirá conocer nuevas especies de levaduras o ya conocidas con propiedades de interés enológico y capaces de hacer frente a ataques de hongos fitopatógenos. A su vez estimula la economía de forma sostenible y nos permitirá proveer a las Bodegas de nuevas cepas de levaduras con la finalidad de crear nuevos estilos de vinos. Participamos en el proyecto europeo YeSViTE 7FP (IRSES) en el que están implicados 9 Universidades de 8 países de 4 continentes, coordinado por la Universidad de Milán. El trabajo desarrollado en esta línea de investigación está cada vez más orientado a generar un conocimiento tecnológico que surja como respuesta a un problema o necesidad tanto a nivel regional, nacional o internacional.

Para su financiación el grupo ha contado ininterrumpidamente durante estos años con varios Proyectos del Ministerio, Proyectos de Infraestructura, FEDER, INNFACTO, Talent Hub, CDTI y OTRI con distintas Bodegas, así como diferentes ayudas de la Junta de Andalucía. Esta financiación ha permitido la creación y desarrollo del grupo, en el que se han formado 14 Doctores de los cuales varios han seguido su carrera en la Universidad y el resto ocupan puestos relevantes en Empresas Biotecnológicas. La actividad científica desarrollada ha quedado plasmada en un alto rendimiento de publicaciones de las que se destacan algunas en la Bibliografía, así como la participación en Congresos de ámbito Internacional y Nacional.

Además de la actividad investigadora el grupo es el responsable de la docencia de varias asignaturas de Microbiología en distintos Grados de CC del Mar, Ambientales, Enología, Ingeniería Química y Biotecnología,

así como en varios Master, como el de Biotecnología que se pondrá en marcha el próximo curso. Por otra parte, dentro de las actividades de difusión de la SEM ha organizado el "X y XVI Curso de Iniciación a la Investigación en Microbiología" (2006 y 2012). Igualmente ha organizado los siguientes Congresos: "SEM: Microbiología Molecular" (2008), "XVth International Botrytis Symposium" (2010), «XI Congreso Nacional de Micología» (2012) y tiene previsto el «VII Congreso Nacional de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana» (previsto para 6-10 de Junio de 2018).

Desde estas líneas, nuestro más sincero agradecimiento a todos los compañeros que con su trabajo han forjado la breve, pero intensa, historia del grupo de **Microbiología Aplicada y Biotecnología de Hongos**.

BIBLIOGRAFÍA

- Cordero-Bueso G, Rodríguez ME, C Garrido, Cantoral JM.** (2017). Rapid and not culture-dependent assay based on multiplex PCR-SSR analysis for monitoring inoculated yeast strains in industrial wine fermentations. *Archives of Microbiology* 199: 135–143. doi: 10.1007/s00203-016-1287-4.
- Cordero-Bueso G, Foschino R, Maghradze D, Mangieri N, Cantoral JM, Vigentini I.** (2017) Wild grape-associated yeasts as a promising strategy of biocontrol against *Vitis vinifera* fungal pathogens. *Frontiers in Microbiology* (under review).
- Fernández-Acero FJ, Jorge I, Calvo E, Vallejo I, Carbú M, Camafeita E, Lopez JA, Cantoral JM, Jorrín J.** (2006). Two-dimensional electrophoresis protein profile of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Proteomics* 6: S88-96. doi: 10.1002/pmic.200500436.
- Fernández-Acero FJ, Colby T, Harzen A, Cantoral JM, Schmidt J.** (2009). Proteomic analysis of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* during cellulose degradation. *Proteomics* 9 (10): 2892-2902. doi: 10.1002/pmic.200800540.
- Fernández-Acero FJ, Colby T, A Harzen, Carbú M, U Wieneke, Cantoral JM, Schmidt J.** (2010). 2-DE proteomic approach to the *Botrytis cinerea* secretome induced with different carbon sources and plant-based elicitors. *Proteomics* 10 (12): 2270-2280. doi: 10.1002/pmic.200900408.
- Garrido C, Carbú M, Fernández-Acero FJ, Boonham N, Colyer A, Cantoral JM, Budge G.** (2009). Development of protocols for detection of *Colletotrichum acutatum* and monitoring of strawberry anthracnose using real-time PCR. *Plant Pathology* 58 (1): 43-51. doi: 10.1111/j.1365-3059.2008.01933.x
- Garrido C, Carbú M, Fernández-Acero FJ, Vallejo I, Cantoral JM.** (2009). Phylogenetic relationships and genome organization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose in strawberry. *European Journal of Plant Pathology*. 125 (3): 397-411. doi: 10.1007/s10658-009-9489-0.
- González-Rodríguez VE, Garrido C, Cantoral JM, Schumacher J.** (2016). The F-actin capping protein is required for hyphal growth and full virulence but is dispensable for septum formation in *Botrytis cinerea*. *Fungal Biology* 120: 1225-1235.
- González-Rodríguez VE, Liñeiro E, Colby T, Harzen A, Garrido C, JM Cantoral, Schmidt J, Fernández-Acero FJ.** (2015) Proteomic profiling of *Botrytis cinerea* conidial germination. *Archives of Microbiology* 197 (2): 117–133.
- Infante JJ, Dombek KM, Rebordinos L, Cantoral JM, Young ET.** (2003). Genome-wide amplifications caused by chromosomal rearrangements play a major role in the adaptive evolution of natural yeast. *Genetics* 165: 1745-1759.
- Liñeiro E, Chiva C, Cantoral JM, Sabidó E, Fernández-Acero FJ** (2016) Modifications of fungal membrane proteins profile under pathogenicity induction: A proteomic analysis of *Botrytis cinerea* membrane. *Proteomics* 16: 2363-2376. doi:10.1002/pmic.201500496.
- Liñeiro E, Chiva E, Cantoral JM, Sabidó E, Fernández-Acero FJ.** (2016) Dataset of the *Botrytis cinerea* phosphoproteome induced by different plant-based elicitors. *Data Brief*. 2016 Jun; 7: 1447–1450. doi: 10.1016/j.dib.2016.04.039.
- Liñeiro E, Chiva E, Cantoral JM, Sabidó E, Fernández-Acero FJ** (2016) Phosphoproteome analysis of *B. cinerea* in response to different plant-based elicitors. *Journal of Proteomics* (SSN: 1874-3919) 139: 84-94 doi:10.1016/j.jprot.2016.03.019.
- Mesa JJ, Infante JJ, Rebordinos L, Sánchez JA, Cantoral JM.** (2000). Influence of the yeast genotypes on enological characteristics of Sherry wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 5: 15-21.
- Muñoz-Bernal E, Deery J, Rodríguez ME, Cantoral JM, Howard J, Feret R, Natera R, Dodero MC, Lilley KS, Fernández-Acero FJ.** (2016). Analysis of temperature-mediated changes in the wine yeast *Saccharomyces bayanus var uvarum*. An oenological study of how the protein content influences wine quality. *Proteomic* 16: 576–592. doi: 10.1002/pmic.201500137.
- Rodríguez ME, Infante JJ, Molina M, Domínguez M, Rebordinos L, Cantoral JM.** (2010). Genomic characterization and selection of wine yeast to conduct industrial fermentations of a white wine produced in a SW Spain winery. *J. Appl. Microbiol.* 108: 1292-1302.
- Rodríguez ME, Infante JJ, Molina M, Rebordinos L, Cantoral JM.** (2011). Using RFLP-mtDNA for the rapid monitoring of the dominant inoculated yeast strain in industrial wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 145: 331-335.
- Rodríguez ME, Infante JJ, Mesa JJ, Rebordinos L, Cantoral JM.** (2013). Enological behaviour of biofilms formed by genetically-characterized strains of sherry *flor* yeast. *The Open Biotechnology Journal* 7: 23-29. doi: 10.2174/1874070701307010023.

MEDINA: Diversidad microbiana y productos naturales

Olga Genilloud



Fundación MEDINA, Avda Conocimiento 34, Parque Tecnológico Ciencias de la Salud, 18016 Granada



Miembros del Grupo de Investigación de Fundación MEDINA

La Fundación MEDINA es un Centro de Investigación sin ánimo de lucro creado a partir de la alianza entre MSD de España, la Universidad de Granada y la Junta de Andalucía, y continuidad de las líneas de investigación en productos naturales del antiguo centro de investigación básica de MSD en España. Los productos naturales han sido y siguen siendo una de las fuentes con mayor diversidad e interés para el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos. La actividad investigadora de MEDINA está principalmente enfocada en la explotación de la diversidad microbiana y la identificación de nuevos metabolitos secundarios para su posible desarrollo como fármacos así como productos de alto valor biotecnológico (Genilloud, 2014). El centro dispone de la mayor colección de microorganismos y librerías de productos naturales dedicadas al descubrimiento de nuevas moléculas, así como una de las plataformas tecnológicas más completas y automatizadas para el cribado de alta capa-

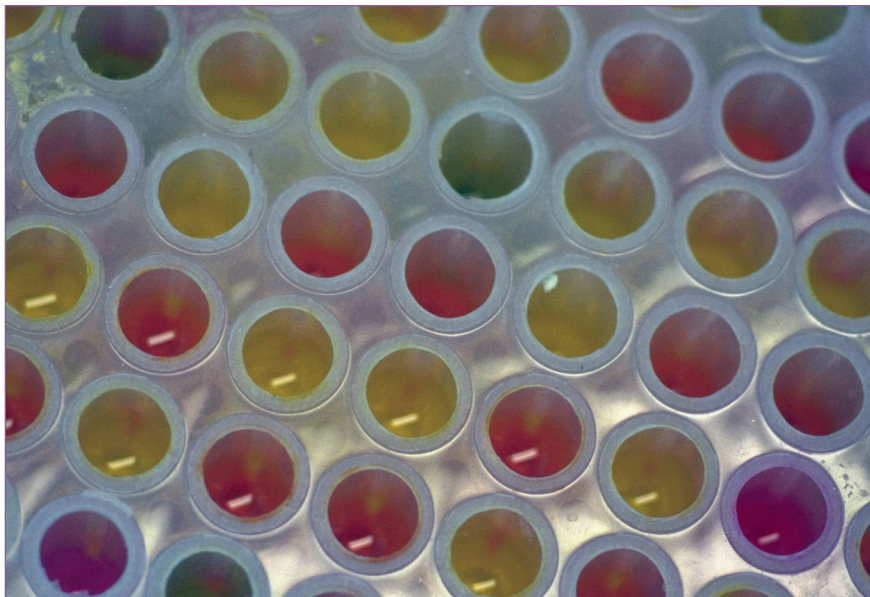
cidad en un abanico de áreas terapéuticas y para el aislamiento y elucidación estructural de las nuevas moléculas.

COLECCIONES MICROBIANAS Y ACCESO A LA DIVERSIDAD MICROBIANA

El estudio de la diversidad microbiana y el análisis de las capacidades biosintéticas de las 190.000 cepas de hongos y bacterias de la colección de cultivos de MEDINA son el objeto de una gran parte de sus actividades. La colección de microorganismos es la piedra angular de MEDINA ya que representa el punto de partida para la producción de nuevas moléculas y la búsqueda de compuestos con actividad biológica en los programas de descubrimiento de nuevos fármacos. La colección de cultivos es el resultado de la fusión de dos colecciones de cepas industriales con diferentes historias y estrategias. La primera está compuesta por las cepas de

la colección del antiguo centro de MSD en Madrid, colección recopilada a lo largo de más de 20 años a partir de la selección de cepas procedentes de la más amplia variedad de geografías, entornos marinos y terrestres, y nichos ecológicos con el fin de garantizar la mayor diversidad de microorganismos y por extensión poder incrementar la diversidad biosintética. A esta colección se ha sumado recientemente la colección de Cubist Pharmaceuticals (Boston) tras su adquisición por Merck and Co., colección que complementa en composición, orígenes y diversidad la ya existente en MEDINA.

La colección de cultivos sigue además expandiéndose como resultado del trabajo realizado sobre nuevas fuentes de aislamiento seleccionadas en entornos singulares en Andalucía. Estos estudios han permitido acceder a comunidades microbianas, especialmente endófitos y microbiomas de rizosferas de plantas endémicas así como aquellas procedentes

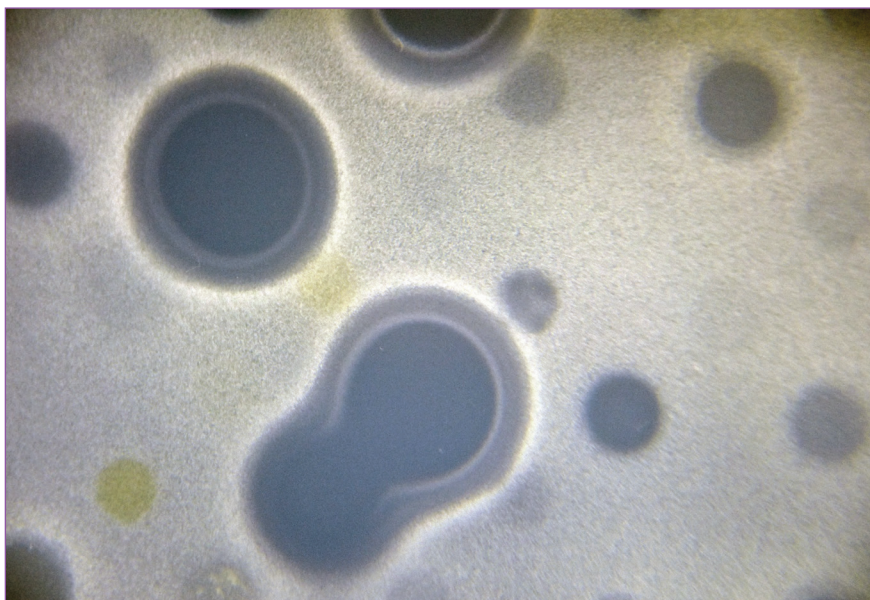


Microplaca de la colección de extractos de productos naturales de origen microbiano.

de entornos expuestos a factores bióticos y abióticos con fuerte presión selectiva, y con el objetivo de complementar la diversidad microbiana de las colecciones existentes.

Otros abordajes desarrollados en el centro plantean el aislamiento de comunidades no cultivadas previamente que siendo metabólicamente activas en su entorno natural suponen una fuente no explorada de nuevos compuestos. La utilización de microcámaras

de difusión ha permitido aislar y domesticar en condiciones de laboratorio una gran variedad de especies bacterianas. Entre estas se incluyen nuevas especies así como nuevos taxones solo descritos en estudios metagenómicos y asociados a taxones no cultivables. Este es el caso del aislamiento de la cepa del nuevo género *Longimicrobium terrae* primer representante aislado en cultivo en su clado perteneciente a los *Gemmatimonadetes* (Pascual et al., 2015; 2016).



Cribado de extractos naturales frente a patógenos Gram negativos: ensayo de inhibición del crecimiento de *E. coli* en agar.

EXPRESIÓN DEL METABOLISMO SECUNDARIO

Está generalmente aceptado que las colecciones de cultivo constituyen un reservorio de diversidad metabólica todavía poco explorada. Una gran mayoría de microorganismos en cultivo solo expresan una pequeña fracción de las rutas biosintéticas identificadas en sus genomas, siendo esta mayoría críptica una excelente oportunidad para la identificación de nuevos productos naturales. Uno de los mayores retos supone implementar métodos de cultivo en condiciones que permitan la expresión de dichos genes crípticos. La diversidad de las nuevas librerías no solo depende de la utilización de múltiples condiciones nutricionales (OSMAC), sino también de la adición de efectores metabólicos y moduladores epigenéticos y en conseguir la producción de nuevos metabolitos a partir de fermentaciones de cepas en co-cultivo favoreciendo la señalización e interacción entre especies y posiblemente la expresión de rutas crípticas (González-Menéndez et al., 2016; Serrano et al., 2017).

Estas aproximaciones empíricas se han complementado con los nuevos programas de minería de rutas biosintéticas y el análisis de los genomas de cepas productoras de nuevos compuestos de interés. Todas estas iniciativas nos están permitiendo identificar las agrupaciones de genes asociadas a la síntesis de nuevos compuestos, así como analizar en profundidad la diversidad metabólica de estos microorganismos y plantear la expresión heteróloga de aquellas rutas que no son funcionales en la cepa salvaje.

APLICACIÓN EN PROGRAMAS DE DESCUBRIMIENTO DE FÁRMACOS

Todos los abordajes anteriores se han aplicado en la generación de nuevos módulos de extractos a partir de fermentaciones de las cepas en una amplia variedad de condiciones. Actualmente MEDINA dispone de una librería de productos naturales con más de 135.000 muestras para su utilización en los programas de descubrimiento de fármacos asociados a las áreas estratégicas desarrolladas en el centro y enfocados en enfermedades infecciosas y tropicales, cáncer y neurodegeneración. Todos estos programas

requieren la participación de un equipo multidisciplinar para asegurar el seguimiento tras la selección de los candidatos más prometedores, de la producción y escalado, el aislamiento químico guiado por bioactividad y la elucidación estructural de las nuevas moléculas.

Como resultado de la búsqueda de nuevos antibióticos en programas de cribado frente a paneles de patógenos de hongos y bacterias Gram negativas y Gram positivas, y especialmente en el marco de los Proyectos FP7 PharmaSea y ERA-net Pathogenomics ANTIFUN, y otros proyectos nacionales, hemos identificado 16 nuevas familias de compuestos entre las que se destacan varios sinérgicos de equinocandinas como la humidimicina, el thiazolipeptido kocurin (MDN-0055), y la nueva clase de antibióticos de amplio espectro frente a Gram negativos (MDN-0057/-0060) seleccionados para desarrollo preclínico en el programa IMI- ND4BB ENABLE (Valiante et al., 2015; Palomo et al., 2013; Genilloud, 2014).

Los programas de búsqueda de nuevos antitumorales han combinado aproximaciones fenotípicas con ensayos enfocados en dianas específicas, utilizando paneles de líneas tumorales de hígado, mama, páncreas, colón y melanoma, y técnicas de High Content Imaging. Dos nuevas familias de compuestos están actualmente en desarrollo preclínico e incluyen una nueva clase de inhibidores de PDK1 para tumores que sobreexpresen PI3K y una nueva familia de compuestos específicos en cáncer de páncreas con eficacia en

modelos animales (de Pedro et al., 2014; 2015).

Finalmente en el campo de la neurodegeneración, y especialmente de la esclerosis lateral amiotrófica y la neuroprotección, hemos identificado a partir de nuestras librerías dos productos naturales con actividad inhibidora de GSK3 β y con efecto neuroprotector en modelo murino de neuronas motoras (de Pedro et al., 2016)

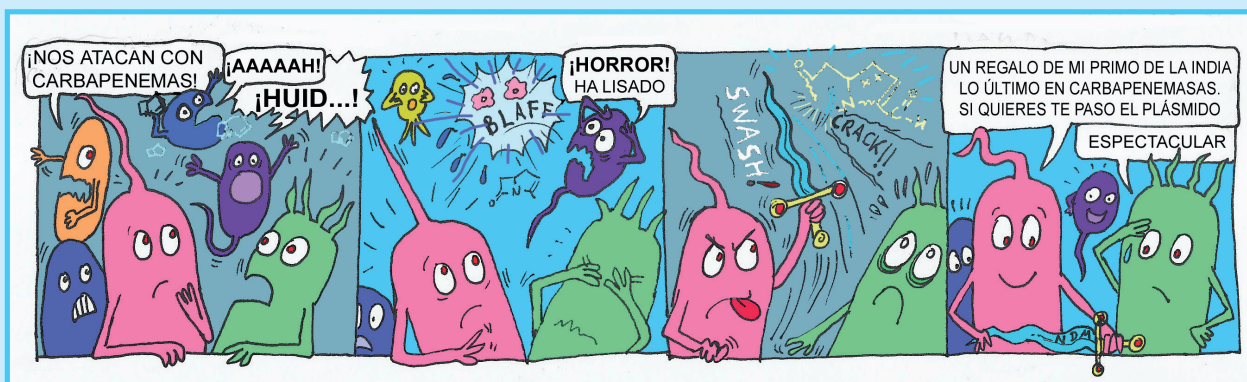
En resumen, el descubrimiento de nuevos candidatos a fármacos en Fundación MEDINA ha requerido la integración de un equipo multidisciplinar de investigadores trabajando sobre la base de la diversidad de las fuentes de productos naturales y la expresión del potencial metabólico de los microorganismos, y apoyados por una plataforma de cribado y de aislamiento de productos naturales igualmente de referencia en el área.

REFERENCIAS

1. Genilloud O (2014) The re-emerging role of microbial natural products in antibiotic discovery. *Antonie Van Leeuwenhoek* 106: 1. 173-88.
2. Pascual J, García-López M, Bills GF, Genilloud O (2015) *Pseudomonas granadensis* sp. nov., a new bacterial species isolated from the Tejada, Almirajara and Alhama Natural Park, Granada, Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* 65: 625-632.
3. Pascual J, García-López M, Bills GF and Genilloud O (2016) *Longimicrobium terrae* gen. nov., sp. nov., a novel oligotrophic bacterium of the underrepresented phylum *Gemmatimonadetes* isolated through a system of miniaturized diffusion chambers. *Int J Syst Evol Microbiol*. 66:1976-85.

4. González-Menéndez V, Pérez-Bonilla M, Pérez-Victoria I, Martín J, Muñoz F, Reyes F, Tormo JR, Genilloud O. (2016) Multicomponent Analysis of the Differential Induction of Secondary Metabolite Profiles in Fungal Endophytes. *Molecules*. 21: doi: 10.3390/molecules21020234.
5. Serrano R, González-Menéndez V, Rodríguez L, Martín J, Tormo JR, Genilloud O. (2017) Co-culturing of fungal strains against *Botrytis cinerea* as a model for the induction of chemical diversity and therapeutic agents. *Front. Microbiol* 19 doi: 10.3389/fmicb.2017.00649.
6. Valiante V., Monteiro MC, Martín J, Altwasser R, El Aouad N., González I, Kniemeyer O., Mellado E, palomo S, de Pedro N, Pérez-Victoria I., Tormo JR, Vicente F., Reyes F., Genilloud O and Brakhage A (2015) Hitting the caspofungin salvage pathway of human-pathogenic fungi with the novel lasso peptide humidimycin (MDN-0010). *Antimicrob. Agents Chemotherapy* 59:5145-53.
7. Palomo S, González I, Martín J, de la Cruz M, Vicente F, Reyes F, Tormo JR, Anderson M, Hill RT, Genilloud O. (2013) Sponge-derived *Kocuria* and *Micrococcus* spp. as new sources of thiazolylpeptide antibiotics. *Marine Drugs* 11:1071-7086.
8. Genilloud O, Tormo JR, Reyes F, El Aouad N, Vicente F, De la Cruz M, Bills G, Gonzalez V., Monteiro MC. 2014. Compounds with antibacterial activity. EP13382258.
9. De Pedro N, Gonzalez V., Crespo G., Cautain B., Acero T, Jimenez V., Molina M, Vicente F, Reyes F, Serrano J, Perez-Victoria I, Genilloud O. 2014. PI3K inhibitor compounds to treat cancer. EP15382048.5.
10. De Pedro N, González V, Crespo G, Pérez-Victoria I, Cautain B, Vicente F, Reyes F, Genilloud O, Griñán C, Marchal JA. 2015. Phenol derivatives to treat cancer EP3088396 A1.
11. de Pedro N, Cantizani J, Ortiz-López FJ, González-Menéndez V, Cautain B, Rodríguez L, Bills GF, Reyes F, Genilloud O, Vicente F. (2016) Protective effects of isolecanoric acid on neurodegenerative in vitro models. *Neuropharmacology* 101:538-48.

Coloquio, by Victor.

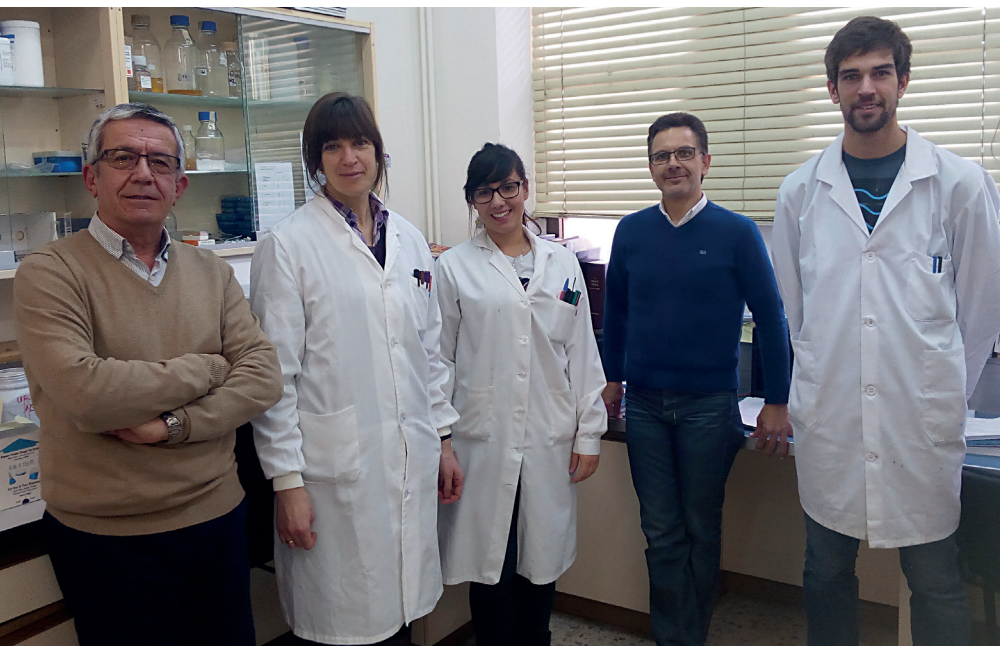


Biología Molecular de Corinebacterias

Luis M. Mateos y José A. Gil

luis.mateos@unileon.es
jagils@unileon.es

Departamento de Biología Molecular (Área de Microbiología). Universidad de León. Campus de Vegazana s/n. 24071. León.



De izquierda a derecha: José A. Gil, Marta F. Caso, Laura M. Pascual, Luis M. Mateos y Álvaro Mourenza.

Las corinebacterias son microorganismos pertenecientes al grupo de las actinobacterias (bacterias Gram positivas con elevado contenido en G+C). Algunos de sus representantes han sido tradicionalmente bien conocidos por su patogenicidad, como es el caso de *Corynebacterium diphtheriae* agente causante de la difteria; actualmente se están describiendo decenas de especies de corinebacterias como agentes causantes de enfermedades emergentes en individuos inmunosuprimidos. Aparte de este interés médico-sanitario por parte de algunos de sus representantes, ciertas especies de corinebacterias han sido tradicionalmente utilizadas en procesos industriales, como es el caso de *Corynebacterium glutamicum* que recibe el epíteto "glutamicum" por producir de forma natural el aminoácido ácido glutámico; otro aspecto muy relevante de *C. glutamicum* radica en su carencia de patogenicidad, siendo reconocido oficialmente como bacteria GRAS ("Genera-

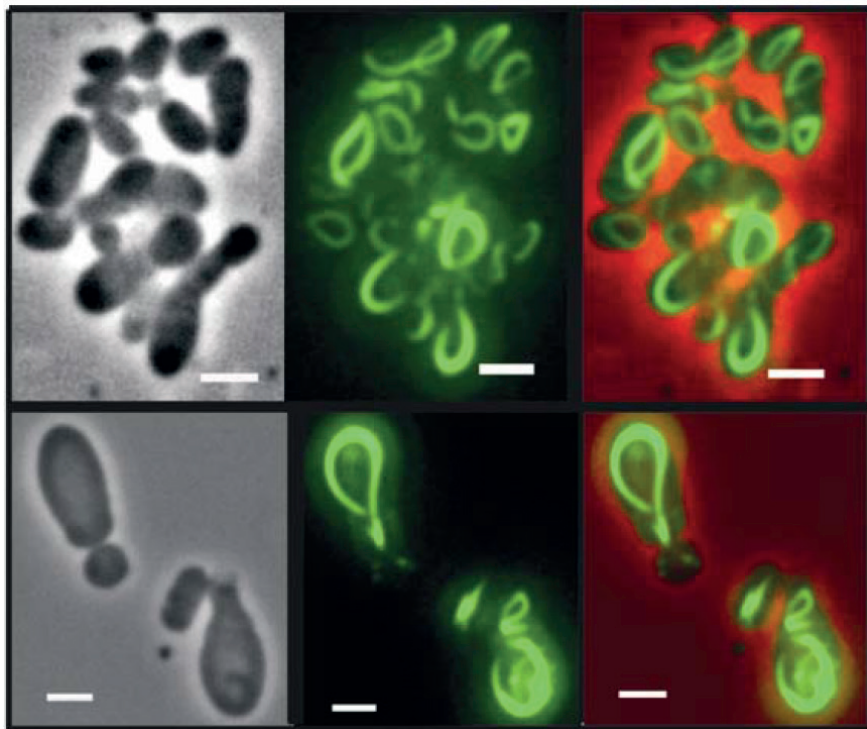
lly Recognized As Safe"). Igualmente, este microorganismo se ha utilizado en procesos de producción de otros metabolitos primarios o en transformaciones metabólicas de interés en el campo de la biología sintética.

Nuestras investigaciones con *Corynebacterium glutamicum* comenzaron en los años 80 en la Universidad de León (Área de Microbiología) dirigido por el Prof. Juan F. Martín. La idea inicial era desarrollar un sistema de manipulación genética en cepas de *C. glutamicum* para incrementar la producción del aminoácido lisina, promovido fundamentalmente por algunas empresas nacionales con interés en producir aminoácidos esenciales para nutrición animal. En esos inicios no había vectores de clonación ni métodos para transformar *Corynebacterium*. No obstante, la experiencia de nuestro laboratorio con otros representantes de actinobacterias (*Streptomyces coelicolor* y

Streptomyces lividans), así como el manejo rutinario de técnicas de biología molecular con la bacteria por excelencia, *Escherichia coli*, nos fueron permitiendo alcanzar los hitos que describimos a continuación; estos hitos van acompañados con referencias de alguna de las publicaciones más representativas de los doctorandos que en su momento las realizaron y que hoy son Profesores en Universidades españolas y extranjeras, investigadores del CSIC, directores de empresas biotecnológicas o Profesores en Institutos de Bachillerato y de Formación Profesional.

1. DESARROLLO DEL SISTEMA DE CLONACIÓN EN *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM*

El conseguir el desarrollo de un sistema de clonación en una especie bacteriana, necesita vectores de clonación específicos para dicha



Imágenes de contraste de fases, fluorescencia y superposición de ambas en una cepa de *Corynebacterium glutamicum* que sobreexpresa la proteína RsmP (filamento intermedio) fusionada a GFP.

especie y un sistema de introducción de ADN. Esto fue conseguido por Ramón Santamaría (Santamaría *et al.*, 1985) partiendo del plásmido críptico endógeno pBL1 (Santamaría *et al.*, 1984). El plásmido pBL1 (el acrónimo indica la cepa *Brevibacterium lactofermentum*, que luego fue reclasificada dentro de *C. glutamicum*) fue la base para desarrollar una gran cantidad de vectores para la manipulación genética de *C. glutamicum* (Cadenas *et al.*, 1991).

2. CLONACIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA BIOSÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS

Dado el interés industrial de *C. glutamicum* como productor de aminoácidos, una de las propuestas fue la clonación de genes de implicados en la biosíntesis de aminoácidos, labor realizada por un elevado número de estudiantes de doctorado; para ello se trabajó en campos diversos que permitieron la caracterización de los genes implicados en la producción de aminoácidos con interés industrial y esenciales para la dieta animal, tales como triptófano (Guerrero *et al.*, 1994; del Real *et al.*, 1985), treonina (Mateos *et al.*, 1987) y

lisina (Fernández-González *et al.*, 1996), entre otros.

3. LAS CORINEBACTERIAS COMO MODELOS PARA PRODUCIR ENZIMAS EXTRACELULARES

Era conocido el hecho de que *C. glutamicum* no producía enzimas extracelulares y por tanto los medios de cultivo para la producción de aminoácidos deberían contener hidrolizadores de proteínas o de azúcares complejos. Los estudios realizados por Sirin Adham mostraron que *C. glutamicum* es capaz de producir de forma heteróloga y secretar al medio de cultivos, grandes cantidades de enzimas xilanasas, amilasas o celulasas de diferentes orígenes (*Streptomyces*, hongos filamentosos), facilitando los procesos de transformación metabólica (Adham *et al.*, 2001).

4. CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE DIVISIÓN/ELONGACIÓN CELULAR EN *C. GLUTAMICUM*

El proceso de crecimiento/elongación y división celular de *C. glutamicum* ha sido

un tema científicamente atractivo ya que las corinebacterias en general presentan un modelo de división llamado crepitante (por “chasquido”); igualmente el patrón de elongación celular, con crecimiento apical independiente de MreB (equivalente de actina en muchos procariontes bacilares) y la existencia de una maquinaria de división “minimalista” cuando se compara con la maquinaria de *E. coli*, nos ha permitido realizar propuestas distintas para patrones de crecimiento/división bacteriana. La proteína que organiza el proceso de división celular es FtsZ (equivalente bacteriano de tubulinas) y el gen *ftsZ* fue clonado por Pilar Honrubia (Honrubia *et al.*, 2001). La clonación, caracterización y regulación del resto de los genes del agrupamiento genético implicado en división y síntesis de pared celular (cluster *dcw*) fueron realizados por Angelina Ramos (Ramos *et al.*, 2003), Noelia Valbuena (Valbuena *et al.*, 2007), Michal Letek (Letek *et al.*, 2008) y María Fiuza (Fiuza *et al.*, 2008), con el hecho relevante de describir la presencia de factores proteicos como DivIVA (implicado en crecimiento apical) y proteínas intermedias como RsmP (Fiuza *et al.*, 2010).

5. RESISTENCIA AL METALOIDE ARSÉNICO Y SU BIOCONTENCIÓN

Una de las líneas de trabajo establecida hace una década en nuestro laboratorio fue el estudio de los sistemas de resistencia a metales pesados en corinebacterias. *C. glutamicum* se ha mostrado tradicionalmente como una bacteria “resistente” a factores ambientales, ocupando en ocasiones nichos donde abundan agentes tóxicos/contaminantes. El agente tóxico más relevante desde hace décadas, cuando se analiza su relación abundancia/peligrosidad es el arsénico (<https://www.atsdr.cdc.gov/spl/>). Dado que este tóxico ha estado presente en la Tierra desde su formación, muchos microorganismos han adquirido resistencia a las dos formas frecuentes de arsénico inorgánico (arseniato y arsenito), aspecto ausente en seres vivos más “evolucionados”. *C. glutamicum* es una de las bacterias más resistentes a las formas inorgánicas de arsénico por presencia de varios operones de resistencia que codifican para un regulador/represor (ArsR), una enzima arseniato reductasa (ArsC o Acr2) y la proteína arse-

nito permeasa (ArsB o Acr3). Dichos operones fueron caracterizados por Efrén Ordóñez (Ordóñez *et al.*, 2005) y Almudena F. Villadangos (Villadangos *et al.*, 2011); igualmente se realizaron sistemas de biocontención de arsénico basados en mutantes de *C. glutamicum* carentes de algunas de las actividades enzimáticas anteriormente reseñadas (Feo *et al.*, 2007).

6. MECANISMOS DE RESISTENCIA A ESTRÉS OXIDATIVO: MICORREDOXINAS

Una de las actividades enzimáticas anteriormente indicadas que estaba implicada en desintoxicar la especie arseniato (As^v) resultó tener un mecanismo de acción Redox diferente a todos los sistemas descritos hasta esos momentos para desintoxicarse de agentes que desencadenen estrés oxidativo; este sistema iba ligado a la molécula micotiol (el equivalente a glutatión en actinobacterias) y a las enzimas micorreductinas, Mrx's (Ordóñez *et al.*, 2009). Fruto de esta descripción, nuestro grupo se propuso la búsqueda de diferentes micorreductinas en *C. glutamicum* y organismos relacionados (*Mycobacterium/Rhodococcus*) con objeto de conocer los procesos metabólicos en los que están implicados estas Mrx's, y principalmente su implicación en recuperar a las células frente a los agentes oxidantes peróxido de hidrógeno e hipocloritos (Pedre *et al.*, 2015; Mateos *et al.*, 2017).


En los últimos años hemos colaborado con grupos de investigación extranjeros, y a modo de ejemplo, con los Drs. Joris Messens (Bélgica), Virginie Molle (Francia) y Barry P. Rosen (USA).

BIBLIOGRAFÍA

- Adham SA, Campelo AB, Ramos A y Gil JA.** (2001). Construction of a xylanase-producing strain of *Brevibacterium lactofermentum* by stable integration of an engineered *xysA* gene from *Streptomyces halstedii* JM8. *Appl Environ Microbiol* 67: 5425-5430.
- Cadenas RF, Martín JF y Gil JA.** (1991). Construction and characterization of promoter-probe vectors for corynebacteria using the kanamycin-resistance reporter gene. *Gene* 98: 117-121.
- Feo JC, Ordóñez E, Letek M, Castro MA, Muñoz MI, Gil JA, Mateos LM y Aller AJ.** (2007). Retention of inorganic arsenic by coryneform mutant strains. *Water Res* 41: 531-542.
- Fernández-González C, Gil JA, Mateos LM, Schwarzer A, Schäfer A, Kalinowski J, Pühler A y Martín JF.** (1996). Construction of L-lysine-overproducing strains of *Brevibacterium lactofermentum* by targeted disruption of the *hom* and *thrB* genes. *Appl Microbiol Biotechnol* 46: 554-558.
- Fiuzza M, Canova MJ, Patin D et al.** (2008). The MurC ligase essential for peptidoglycan biosynthesis is regulated by the serine/threonine protein kinase PknA in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem* 283: 36553-36563.
- Fiuzza M, Letek M, Leiba J, Villadangos AF, Vaquera J, Zanella-Cleón I, Mateos LM, Molle V y Gil JA.** (2010). Phosphorylation of a novel cytoskeletal protein (RsmP) regulates rod-shaped morphology in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem* 285: 29387-29397.
- Guerrero C, Mateos LM, Malumbres M y Martín JF.** (1994). Directed mutagenesis of a regulatory palindromic sequence upstream from the *Brevibacterium lactofermentum* tryptophan operon. *Gene* 138: 35-41.
- Honrubia MP, Ramos A y Gil JA.** (2001). The cell division genes *ftsQ* and *ftsZ*, but not the three downstream open reading frames YFIH, ORF5 and ORF6, are essential for growth and viability in *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869. *Mol Genet Genomics* 265: 1022-1030.
- Letek M, Ordóñez E, Vaquera J, Margolin W, Flårdh K, Mateos LM y Gil JA.** (2008). DivIVA is required for polar growth in the mreB-lacking rod-shaped actinomycete *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* 190: 3283-92.
- Mateos LM, del Real G, Aguilar A y Martín JF.** (1987). Nucleotide sequence of the homoserine dehydrogenase (*thrA*) gene of *Brevibacterium lactofermentum*. *Nucleic Acids Res* 15: 10598.
- Mateos LM, Villadangos AF, de la Rubia AG, Mourrenza A, Pascual L, Letek M, Pedre B, Messens J y Gil JA.** (2017). The arsenic detoxification system in corynebacteria: basis and applications for bioremediation and redox control. *Adv Appl Microbiol* 99: 103-137.
- Ordóñez E, Van Belle K, Roos G, de Galan S, Letek M, Gil JA, Wyns L, Mateos LM y Messens J.** (2009). Arsenate reductase, mycothiol, and mycoredoxin concert thiol/disulfide exchange. *J Biol Chem* 284: 15107-15116.
- Ordóñez E, Letek M, Valbuena N, Gil JA y Mateos LM.** (2005). Analysis of genes involved in arsenic resistance in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Appl Environ Microbiol* 71: 6206-6215.
- Pedre B, Van Molle I, Villadangos AF, Wahni K, Vertommen D, Turell L, Erdogan H, Mateos LM y Messens J.** (2015). The *Corynebacterium glutamicum* mycothiol peroxidase is a reactive oxygen species-scavenging enzyme that shows promiscuity in thiol redox control. *Mol Microbiol* 96: 1176-1191.
- Ramos A, Honrubia MP, Valbuena N, Vaquera J, Mateos LM y Gil JA.** (2003). Involvement of DivIVA in the morphology of the rod-shaped actinomycete *Brevibacterium lactofermentum*. *Microbiology* 149: 3531-3542.
- Real G del, Aguilar A y Martín JF.** (1985). Cloning and expression of tryptophan genes from *Brevibacterium lactofermentum* in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 133: 1013-1019.
- Santamaria R, Gil JA, Mesas JM y Martín JF.** (1984). Characterization of an endogenous plasmid and development of cloning vectors and a transformation system in *Brevibacterium lactofermentum*. *J Gen Microbiol* 130.
- Santamaria RI, Gil JA y Martín JF.** (1985). High-frequency transformation of *Brevibacterium lactofermentum* protoplasts by plasmid DNA. *J Bacteriol* 162: 463-467.
- Valbuena N, Letek M, Ordóñez E, Ayala J, Daniel RA, Gil JA y Mateos LM.** (2007). Characterization of HMW-PBPs from the rod-shaped actinomycete *Corynebacterium glutamicum*: peptidoglycan synthesis in cells lacking actin-like cytoskeletal structures. *Mol Microbiol* 66: 643-657.
- Villadangos AF, Van Belle K, Wahni K et al.** (2011). *Corynebacterium glutamicum* survives arsenic stress with arsenate reductases coupled to two distinct redox mechanisms. *Mol Microbiol* 82: 998-1014.

INBIOTEC. Biotecnología microbiana aplicada a la industria farmacéutica, agroalimentaria y medioambiental

Barreiro C, García-Calvo L, García-Estrada C, Kosalková K, Pérez-Redondo R, Rodríguez-García A, Sánchez-Orejas C, Sola-Landa A.

 carlos.barreiro@inbiotec.com
c.barreiro@unileon.es

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



Integrantes del equipo investigador y técnico del Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC)

El Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC) es un Centro Tecnológico que surgió en León en 1991 para promover las actividades de investigación, control de calidad y desarrollo tecnológico de interés para las entidades vinculadas a la biotecnología con las que colabora. INBIOTEC inició su andadura bajo la dirección del Prof. Juan Francisco Martín, catedrático de Microbiología de la Universidad de León (ULE), quien, tras su jubilación, cedió el testigo en 2011 al Prof. Elías F. Rodríguez Ferri (Catedrático de Sanidad Animal de la ULE) en la dirección gerente y al Prof. Rafael Balaña Fouce (Catedrático de Toxicología de la ULE) en la dirección científica. Posteriormente, en 2016, la dirección del Instituto recayó en el Dr. Carlos Barreiro (Investigador de INBIOTEC).

El Instituto de Toxicología de Castilla y León (INTOXCAL) nació en 1995, estrechamente ligado a la actividad industrial de León y al mundo de la ciencia. En el año 2010, se unió a INBIOTEC para crear juntos un centro de referencia tecnológica en León, donde, actualmente, constituye el área de Analítica de INBIOTEC.

Tradicionalmente, INBIOTEC se ha dedicado al estudio de todos los aspectos relacionados con la obtención de metabolitos microbianos de interés industrial en el área farmacéutica, agroalimentaria o medioambiental. Esto incluye la selección de cepas productoras, la mejora de condiciones de cultivo, el estudio de la regulación metabólica, análisis ómicos, el escalado a nivel semi-industrial y la purificación de los compuestos de interés. Así,

su participación en contratos directos con empresas, los servicios analíticos a terceros y el desarrollo de proyectos competitivos a nivel europeo, nacional y regional utilizando hongos, levaduras y bacterias, principalmente actinobacterias, le han permitido solicitar más de 15 patentes y realizar más de 400 publicaciones científicas en sus 25 años de existencia.

Algunas de las principales líneas de investigación se detallan a continuación:

PRODUCCIÓN DE ESTEROIDES MEDIANTE MICOBACTERIAS

Los compuestos esteroideos de uso clínico presentan 300 formulaciones y generan



Análisis de microorganismos degradadores de madera

unos beneficios anuales superiores a los 6000 millones de dólares. Sin embargo, tras más de 40 años de bioconversiones microbianas siguen existiendo problemas en la producción de esteroides de origen microbiano: i) baja solubilidad de los precursores; ii) inhibición por producto final; iii) producción de esteroides no deseados. INBIOTEC, en colaboración con Gadea Biopharma (AMRI), está abordando varios de estos problemas ayudado por técnicas ómicas, lo que ha facilitado el descubrimiento de dianas génicas que incrementan la producción de los esteroides deseados, la eliminación de productos colaterales y el aumento de la resistencia frente a los productos finales.

CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM: MÁS QUE AMINOÁCIDOS

El estudio de diferentes aspectos de las corinebacterias es una de las líneas más tradicionales y consolidadas del Instituto, además de una de las más internacionales. Así, varios proyectos europeos centrados en la regulación del metabolismo, la obtención de nuevos aminoácidos (valina, aspártico), vitaminas (ácido pantoténico), aminas biogénicas (cadaverina), ácidos dicarboxílicos (málico, succínico), selección de biotipos o la solución de las inhomogeneidades producidas en grandes fermentadores han sido desarrollados por el personal de INBIOTEC.

METABOLITOS SECUNDARIOS DE ORIGEN FÚNGICO

Una de las líneas de investigación que se ha mantenido activa desde los comienzos de INBIOTEC está relacionada con el estudio, en hongos filamentosos (*Penicillium chrysogenum*, *Acremonium chrysogenum*), de los genes que participan en la biosíntesis, regulación y transporte tanto de antibióticos beta-lactámicos (penicilina y cefalosporina), como de sus intermediarios. Recientemente, este grupo se ha centrado en la caracterización mediante técnicas ómicas del incremento de los títulos de penicilina en cepas de alta producción. Los resultados obtenidos por "ingeniería reversa" permiten crear microorganismos a la carta, mediante ingeniería genética, modificados únicamente en aspectos relacionados con la productividad. Asimismo, desde hace unos años, en INBIOTEC se está llevando a cabo la caracterización molecular de la ruta de biosíntesis de diversas micotoxinas, tales como la roquefortina, la meleagrina o la toxina PR.

BIOSÍNTESIS Y REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE STREPTOMYCES

La biosíntesis y regulación de metabolitos secundarios producidos por cepas de *Streptomyces* (cefamicina C; ácido clavulánico; pimaricina; avermectina; tacrolimus) es una de las líneas clásicas del Instituto. Así, gracias

a las técnicas de transcriptómica y proteómica combinadas con ensayos de unión proteína-ADN y análisis bioinformático, se ha completado el modelo de la regulación por fosfato dependiente de PhoP en *S. coelicolor*, el cual se ha ido extendiendo a otras especies de interés industrial. Las últimas investigaciones se centran en la detección de ARN pequeños implicados en la regulación por fosfato y del metabolismo secundario. Por otra parte, la activación de agrupaciones génicas crípticas y el incremento de la producción de metabolitos de interés industrial en *Streptomyces tsukubaensis* es una fuerte apuesta del centro, que comenzó por la secuenciación de su genoma. Actualmente, el objetivo es mejorar la producción del inmunosupresor tacrolimus, mediante la modificación de su ruta de biosíntesis, y conseguir cepas productoras de análogos con distintas actividades farmacológicas.

PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES

INBIOTEC se ha ocupado de mejorar la producción del carotenoide astaxantina con el hongo levaduriforme *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Este es el principal carotenoide usado a nivel mundial en acuicultura, farmacia y nutracéutica. Así, INBIOTEC ha llevado a cabo estudios sobre la biosíntesis de astaxantina con el fin de obtener cepas sobreproductoras de este compuesto, mejorando los medios de cultivo y los parámetros físicos-químicos de la fermentación.

TÉCNICAS ÓMICAS

Para analizar la expresión génica en diferentes rutas biosintéticas de interés industrial, INBIOTEC ha venido desarrollando estudios en genómica, transcriptómica y proteómica, tanto como servicio a terceros como para su propia investigación o en colaboración con otros grupos. Así, mediante el ensamblaje de lecturas de secuenciación, la anotación funcional de genes y la comparación con otros genomas relacionados, se han publicado los genomas de *P. chrysogenum*, *Mycobacterium neoaurum* y *S. tsukubaensis*. Bajo la modalidad RNA-seq se realizan análisis transcriptómicos (organización de transcritos, inicios de transcripción) que han revelado un elevado número de ARN de pequeño tamaño, de entre 50-300 nt, en genomas de actinobacterias.

Alternativamente, los *microarrays* se utilizan para estudios de expresión diferencial en series temporales o de comparación entre condiciones para eucariotas superiores (ratón) y procariotas (*Streptomyces*, *C. glutamicum*).

El análisis proteómico diferencial mediante electroforesis bidimensional (2D-DIGE) acoplado a técnicas de espectrometría de masas ha sido utilizado en INBIOTEC para el estudio de diferentes sub-proteomas en hongos (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Diplodia*), eucariotas superiores (ovejas) y bacterias (*Streptomyces*, *C. glutamicum*), permitiendo en algunos casos hacer ingeniería inversa de cepas de alta producción o mostrar procesamiento post-transcripcionales no detectables mediante otras ómicas.

ANÁLISIS TOXICOLÓGICOS Y SEGURIDAD BIOLÓGICA DE COMPUESTOS

En el área de Analítica se realizan actividades con una doble vertiente: por un lado, soporte en proyectos de investigación propios, y por otro, de servicio a empresas. Dicho soporte incluye el desarrollo y validación de métodos analíticos, ensayos de seguridad, inmunogenicidad y potencia en vacunas, ensayos de estimulación de la inmunidad inespecífica, estudios de residuos de medicamentos en tejidos, estudios de ecotoxicidad, etc. Asimismo, se han desarrollado modelos *in vivo* (modelos animales) e *in vitro* (cultivos celulares) como complemento a la investigación en microbiología y biología molecular, para evaluar la eficacia y seguridad de tratamientos farmacológicos, nuevos alimentos o nuevos compuestos para la protección medioambiental.

NUEVAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

INBIOTEC se ha adaptado a las nuevas tendencias en Biotecnología: biorrefinería, biocontrol, seguridad alimentaria. Dentro del concepto de biorrefinería se trabaja en el descubrimiento y caracterización de enzimas fúngicas con actividad feruloil esterasa o el desarrollo de procesos para el aprovechamiento de la paja de maíz con actinobacterias. En biocontrol, INBIOTEC ha participado en la búsqueda de nuevos recubrimientos

para combatir la corrosión metálica; en la obtención de pesticidas de origen biológico; en la protección de la madera para evitar su degradación, tanto “viva” (biocontrol de enfermedades), como “muerta” (protegiendo la madera presente en estructuras). Finalmente, INBIOTEC, dentro de las nuevas áreas de expansión, también participa activamente en proyectos con empresas relacionados con la caracterización, a nivel de seguridad y eficacia, de ingredientes destinados a formar parte de alimentos, así como con la evaluación de la funcionalidad de bacterias ácido-lácticas en su papel como probióticos.

REFERENCIAS

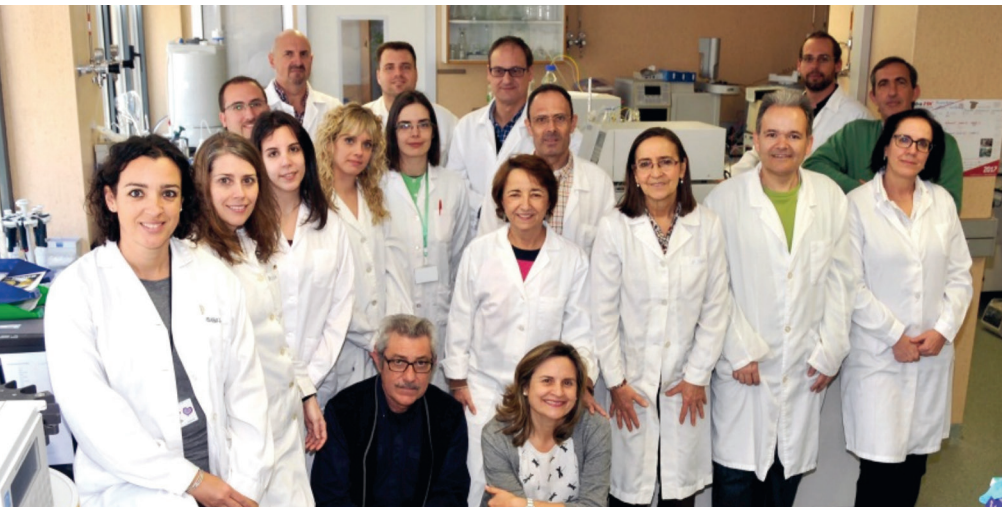
- Álvarez-Álvarez R, Rodríguez-García A, Martínez-Burgo Y, Robles-Reglero V, Santamarta I, Pérez-Redondo R, Martín J F y Liras P. (2014). A 18-Mb-reduced *Streptomyces clavuligerus* genome: relevance for secondary metabolism and differentiation. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 2183-95.
- Barreiro C. (editor) (2015). *New trends in Corynebacterium glutamicum: beyond the amino acids*. Nova Science Publishers, Inc, New York.
- Barreiro C, Martínez-Castro M. (2014). Trends in the biosynthesis and production of the immunosuppressant tacrolimus (FK506). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98(2):497-507.
- Barreiro C, Morales A, Vázquez-Iglesias I, Sola-Landa A. (2017). Intra- and extra-cellular proteome analyses of steroid-producer *Mycobacteria*. En: *Microbial Steroids: Methods and Protocols*. Editores: José Luis Barredo e Ignacio Herráiz. Editorial: Springer Science + Bussines Media (New York).
- Barreiro C, Prieto C, Sola-Landa A, Solera E, Martínez-Castro M, Pérez-Redondo R, García-Estrada C, Aparicio JF, Fernández-Martínez LT, Santos-Aberturas J, Salehi-Najafabadi Z, Rodríguez-García A, Tauch A y Martín JF. (2012). Draft genome of *Streptomyces tsukubaensis* NRRL 18488 the producer of the clinically important immunosuppressant tacrolimus (FK506). *J Bacteriol* 194: 3756-57.
- Dominguez-Santos R, Kosalková K, García-Estrada C, Barreiro C, Ibáñez A, Morales A, Martín JF. (2017). Casein phosphopeptides and CaCl₂ increase penicillin production and cause an increment in microbody/peroxisome proteins in *Penicillium chrysogenum*. *J Proteomics*.156: 52-62.
- García-Estrada C, Barreiro C, Jami MS, Martín-González J, Martín JF. (2013). The inducers 1,3-diaminopropane and spermidine cause the reprogramming of metabolism in *Penicillium chrysogenum*, leading to multiple vesicles and penicillin overproduction. *J Proteomics*. 85:129-59.
- García-Estrada C, Kosalková K, Sánchez-Orejas IC. (2018). Extraction and analysis of carotenes and xanthophylls produced by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. In: *Microbial Carotenoids: Methods and Protocols* (Barreiro C. and Barredo J.L. eds). En prensa.
- García-Estrada C, Martín JF. (2016). Biosynthetic gene clusters for relevant secondary metabolites produced by *Penicillium roqueforti* in blue cheeses. *Appl Microbiol Biotechnol*. 19: 8303-13.
- Jami MS, Barreiro C, García-Estrada C, Martín JF. (2010). Proteome analysis of the penicillin producer *Penicillium chrysogenum*: characterization of protein changes during the industrial strain improvement. *Mol Cell Proteomics*. 2010 9:1182-9.
- Jami MS, García-Estrada C, Barreiro C, Cuadrado AA, Salehi-Najafabadi Z y Martín JF. (2010). The *Penicillium chrysogenum* extracellular proteome. Conversion from a food-rotting strain to a versatile cell factory for white biotechnology. *Mol Cell Proteomics* 9: 2729-44.
- Martínez-Burgo Y, Álvarez-Álvarez R, Rodríguez-García A y Liras P. (2015). The pathway-specific regulator ClaR of *Streptomyces clavuligerus* has a global effect on the expression of genes for secondary metabolism and differentiation. *Appl Environ Microbiol* 81: 6637-48.
- Martín JF, Rodríguez-García A y Liras P. (2017). The master regulator PhoP coordinates phosphate and nitrogen metabolism respiration cell differentiation and antibiotic biosynthesis: comparison in *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces avermitilis*. *J Antibiot*. 70(5): 534-541.
- Pérez-García F, Vasco-Cárdenas MF, Barreiro C. (2016) Biotypes analysis of *Corynebacterium glutamicum* growing in dicarboxylic acids demonstrates the existence of industrially-relevant intra-species variations. *J Proteomics* 146: 172-183.
- Pérez-Redondo R, Rodríguez-García A, Botas A, Santamarta I, Martín JF y Liras P. (2012). ArgR of *Streptomyces coelicolor* is a versatile regulator. *PLoS One* 7: e32697.
- Rodríguez-García A, Fernández-Alegre E, Morales A, Sola-Landa A, Lorraine J, Macdonald S, Dobnyá D, Smith MCM, Donova M y Barreiro C. (2016). Complete genome sequence of '*Mycobacterium neoaurum*' NRRL B-3805 an androstenedione (AD) producer for industrial biotransformation of steroids. *J Biotechnol* 224: 64-5.
- Salehi-Najafabadi Z, Barreiro C, Martínez-Castro M, Solera E, Martín JF. (2011). Characterization of a gamma-Butyrolactone Receptor of *Streptomyces tacrolimus*: Effect on sporulation and tacrolimus biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol*. 92(5): 971-984.
- Sola-Landa A, Rodríguez-García A, Amin R, Wohlleben W y Martín JF. (2013). Competition between the GlnR and PhoP regulators for the *glnA* and *amtB* promoters in *Streptomyces coelicolor*. *Nucleic Acids Res* 41: 1767-82.
- Thomas L, Hodgson DA, Wentzel A, Nieselt K, Ellingsen TE, Moore J, Morrissey ER, Legaie R, STREAM Consortium, Wohlleben W, Rodríguez-García A, Martín JF, Burroughs NJ, Wellington EMH y Smith MCM. (2012). Metabolic switches and adaptations deduced from the proteomes of *Streptomyces coelicolor* wild type and *phoP* mutant grown in batch culture. *Mol Cell Proteomics* 11: M111013797.
- Vasco-Cárdenas MF, Baños S, Ramos, Martín JF, Barreiro C. (2013). Proteome response of *Corynebacterium glutamicum* to high concentration of industrially relevant C4 and C5 dicarboxylic acids. *J Proteomics* 85: 65-88.

Grupo de la unidad de biocarburantes del CIEMAT

Mercedes Ballesteros



Jefe de la Unidad de Biocarburantes. División de Energías Renovables-Departamento de Energía CIEMAT



MIEMBROS DEL GRUPO DE LA UNIDAD DE BIOCARBURANTES DEL CIEMAT

1ª Fila (izqda. a dcha.): José Manuel Illana, Mercedes Ballesteros.

2ª Fila (izqda. a dcha.): Isabel Higuera, Cristina Álvarez, Aranzazu Amoraga, Ana Isabel Susmozas, Aleta Duque, Paloma Manzanares, Felicia Sáez, Alberto González, M^a José Negro.

3ª fila (izqda. a dcha.): David Moreno, José Miguel Oliva, Miguel Moya, Ignacio Ballesteros, José Luis Fernández, Miguel Criado, José María Martínez.

El Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas es un Organismo Público de Investigación adscrito al Ministerio de Economía, Industria y Competitividad a través de la Secretaría de Estado de Investigación, Desarrollo e Investigación, focalizado principalmente en los ámbitos de la energía y el medio ambiente. La Unidad de Biocarburantes, que desarrolla su actividad dentro de la División de Energías Renovables, tiene como objetivo científico la generación de conocimiento, procesos y tecnologías para la conversión de la biomasa lignocelulósica en bioetanol y otros productos de alto valor añadido, de manera eficiente y en condiciones transferibles a la industria.

Desde hace unas décadas la biomasa vegetal ha sido objeto de especial atención como materia prima para la producción de combustibles alternativos para el transporte ante la situación de dependencia casi exclusiva del petróleo en este sector. Los biocombustibles líquidos o biocarburantes se perfilan en el corto-medio plazo como la única alternativa renovable para la sustitu-

ción directa del petróleo como combustible de automoción, pero la falta de cultivos específicos seleccionados para fines energéticos, ha hecho que la industria actual de los biocarburantes se base en la utilización de cultivos tradicionales producidos principalmente para el sector alimentario. Debido a la competencia entre el sector alimentario y el energético para el abastecimiento de las materias primas, cada vez existe un mayor consenso en reconocer que los actuales biocarburantes son una energía de transición que únicamente podrá sustituir una pequeña parte de los derivados del petróleo.

Con el objetivo de aportar soluciones ante esta situación, la Unidad de Biocarburantes desde comienzos de los 90, viene investigando en el desarrollo de nuevos procesos avanzados para la obtención de etanol a partir de materias primas que no estén en competencia directa con los mercados alimentarios. En este contexto, la utilización de biomasa lignocelulósica es la opción más prometedora ya que una gran parte de los materiales con alto contenido en celulosa se generan como

residuos en los procesos productivos de los sectores agrícola, forestal e industrial.

El proceso de obtención de azúcares fermentables a partir de biomasa lignocelulósica es, debido a la estructura de sus polímeros, más difícil que a partir de sacarosa o almidón. Así, aunque el coste de la biomasa lignocelulósica es menor, la dificultad del proceso de extracción de los azúcares y su posterior transformación a etanol, ha hecho que históricamente no haya sido atractivo para la industria. Por ello estamos trabajando en el estudio de las distintas etapas del bioproceso de obtención de etanol de lignocelulosa (pretratamiento, hidrólisis enzimática y fermentación) utilizando catalizadores biológicos.

La fase de pretratamiento tiene como objetivo aumentar la accesibilidad de la celulosa al ataque enzimático, permitiendo obtener altos rendimientos de hidrólisis que son vitales para la competitividad económica del proceso. Los pretratamientos hidrotérmicos son actualmente los métodos más efectivos para mejorar la sacarificación enzimática de la biomasa ligno-

celulósica ya que hidrolizan la mayor parte de la hemicelulosa, incrementan notablemente la hidrólisis de la celulosa. Durante los últimos 15 años hemos trabajado en el desarrollo de procesos hidrotérmicos autocatalizados, específicamente en el pretratamiento denominado explosión por vapor, que combina los efectos sobre el material lignocelulósico de vapor de agua a altas presiones (40 kg/cm² o superiores) y temperaturas (200-220 °C) junto con una brusca descompresión posterior. Durante estos años nos hemos centrado en el estudio de los factores que afectan al proceso, con el objetivo de establecer las condiciones óptimas de operación que conduzcan a altos rendimientos de hidrólisis enzimática, baja degradación de azúcares hemicelulósicos y baja producción de sustancias tóxicas. El proceso de producción de etanol utilizando explosión por vapor desarrollado está patentado.

En los últimos años, estamos desarrollando procesos de pretratamiento avanzados realizados en condiciones más moderadas de temperatura. Nuestro objetivo es separar eficientemente los componentes de la biomasa lignocelulósica, no degradar la fracción de carbohidratos y reducir la generación de inhibidores. En este contexto, en el año 2010 iniciamos una nueva línea de investigación en colaboración, en la que estamos desarrollando un nuevo pretratamiento, denominado bioextrusión (patentado) que reduce la generación de compuestos inhibidores y permite la integración del pretratamiento y la hidrólisis en una única etapa.

La siguiente etapa del proceso de obtención de etanol de lignocelulosa es la hidrólisis de los carbohidratos contenidos en la biomasa pretratada. Es una de las etapas limitantes del proceso, principalmente por causa del precio de las enzimas y lo lentas que transcurren las reacciones. Durante los últimos años hemos estudiado el proceso de hidrólisis enzimática de la lignocelulosa en las condiciones de proceso que requiere la industria. Nuestro grupo fue uno de los primeros que demostró que la presencia de actividades accesorias en los cócteles celulolíticos es esencial para mejorar la eficiencia del proceso.

El estudio de la etapa fermentación a etanol de los azúcares hemicelulósicos y celulósicos obtenidos, es otro de los objetivos científicos de la Unidad de Biocarburante, ya que su mejo-

ra puede reducir significativamente los costes del proceso global. Es necesario aumentar la robustez de los microorganismos fermentativos para que puedan desarrollarse en las difíciles condiciones que suponen los hidrolizados de la biomasa lignocelulósica. Estamos trabajando para aumentar, mediante ingeniería evolutiva, la resistencia a los microorganismos a los inhibidores y al estrés que supone trabajar a altas cargas de sustrato. Una de nuestras actividades futuras se enmarca en el estudio de las variaciones genéticas que confieren resistencia a los microorganismos fermentativos. Esta es una nueva línea de investigación que he iniciado en el año 2011 en el marco de la Unidad Mixta CIEMAT-IMDEA Energía. En este mismo marco estamos investigando la producción de biocombustibles a partir de microorganismos fotosintéticos como las microalgas. La Unidad Mixta se creó con el objetivo de fortalecer la actividad que llevan a cabo las dos instituciones, aprovechando la complementariedad de su personal e instalaciones y creando sinergias que permitan enfrentar los desafíos científicos y tecnológicos en las aplicaciones futuras de la biomasa.

El trabajo desarrollado en estos años ha posicionado a la Unidad de Biocarburantes del CIEMAT como el laboratorio español de referencia en la producción de biocombustibles a partir de la biomasa lignocelulósica y uno de los grupos más reputados en este campo a nivel europeo, como queda acreditado por la larga lista de publicaciones en revistas científicas indexadas en el área de la energía y la biotecnología y la amplia participación en proyectos competitivos nacionales y europeos. Hemos evaluado las etapas del proceso individualmente y determinado para cada una de ellas las condiciones óptimas de operación, pero al mismo tiempo hemos enfocado nuestra investigación hacia la integración de las diferentes etapas del proceso, con el objetivo de evaluar la viabilidad técnico-económica de la tecnología abarcando desde el manejo de la materia prima hasta la obtención del producto final. Este reconocimiento se tradujo en la firma de un convenio con la empresa IMECAL, S.A. para desarrollar conjuntamente un proceso para la obtención de etanol a partir de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos. Fruto de esta colaboración se ha patentado el proceso y construido una planta de demostración de 25 t/día en la que se ha verificado la factibilidad

técnica y económica de la tecnología. Este es un buen ejemplo de la actividad del CIEMAT en la transferencia de tecnología al industrial.

Las tecnologías actuales de utilización de la biomasa para generar biocarburantes irán evolucionando hacia tecnologías más avanzadas que permitan obtener, a partir de la biomasa, una variedad de combustibles, productos químicos y energía estableciéndose el concepto de biorrefinería; es decir, el desarrollo de una química sustitutiva de la química "convencional" aprovechando recursos renovables y procesos poco contaminantes. En los últimos años, la Unidad de Biocarburantes del CIEMAT, se ha posicionado como un referente en el área de las biorrefinerías

Para finalizar quisiera resaltar que la I+D+i son las herramientas básicas y necesarias para lograr una transición desde una sociedad basada en los combustibles fósiles a otra de tipo biológico, en lo que ha venido a denominarse "bioeconomía"; es decir, una economía más innovadora y con bajas emisiones, que concilie las demandas de gestión sostenible de la producción de alimentos y la utilización sostenible de los recursos biológicos renovables para fines industriales, garantizando al mismo tiempo la biodiversidad y la protección del medio ambiente.

BIBLIOGRAFÍA MÁS RECIENTE

- Álvarez C, González A, Negro MJ, Ballesteros I, Oliva JM y Sáez S.** (2017). Optimized use of hemicellulose within a biorefinery for processing high value-added xylooligosaccharides. *Ind Crops Prod* 99: 41-48.
- Duque A, Manzanares P, Ballesteros I y Ballesteros M.** (2016). Steam explosion as lignocellulosic biomass pretreatment. In: *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery*. Ed: Mussato SI Published by Elsevier.
- Moreno AD, Ibarra D, Alvira P, Tomás-Pejó E y Ballesteros M.** (2016). Exploring laccase and mediators behavior during saccharification and fermentation of steam-exploded wheat straw for bioethanol production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 91: 1816-1825.
- Duque A, Manzanares P, Ballesteros I, Negro MJ, Oliva JM, González A y Ballesteros M.** (2014). Sugar production from barley straw biomass pretreated by combined alkali and enzymatic extrusion. *Bioresour Technol* 158: 262-268.
- Romero-García JM, Niño L, Martínez-Patiño C, Álvarez C, Castro E y Negro MJ.** (2014). Biorefinery based on olive biomass. State of the art and future trends. *Bioresour Technol* 159: 421-432.

Biotecnología para la utilización de la biomasa lignocelulósica

Alicia Prieto, Susana Camarero, F. Javier Ruiz-Dueñas, Ángel Martínez y M^a Jesús Martínez

 aliprieto@cib.csic.es
susanacam@cib.csic.es

Grupo de Biotecnología para la Biomasa Lignocelulósica. Centro de Investigaciones Biológicas, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid



Integrantes del Grupo de Biotecnología para la Biomasa Lignocelulósica

Nuestro grupo de investigación, coordinado por los Dres. Ángel T. Martínez y M^a Jesús Martínez, está integrado en el Departamento de Biología Medioambiental y en la Unidad IPSBB (*Integrated Protein Science for Biomedicine and Biotechnology*) del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) de Madrid, uno de los centros pluridisciplinares de mayor tradición en el área de Biología en España. El principal objetivo de nuestro trabajo es aplicar microorganismos, principalmente hongos filamentosos, y sus enzimas extracelulares, en procesos industriales destinados a la obtención de combustibles, materiales y productos químicos a partir de recursos vegetales renovables, tratando de contribuir al desarrollo sostenible de nuestra sociedad.

Estas actividades se concretan en varios proyectos de investigación, estructurados en torno a dos grandes líneas que abordan la bioconversión de distintos componentes de la biomasa vegetal. Los componentes de la pared celular sobre los que trabajamos, por

ser muy abundantes en la naturaleza, son los polisacáridos (celulosa y hemicelulosa) y la lignina. Los primeros son transformados gracias a la acción concertada de varias glicosil hidrolasas (principalmente endoglucanasas, endoxilanasas y β -gluco y xilosidasas, junto con LPMOs –*lytic polysaccharide monoxygenases*-), mientras que la degradación del polímero de lignina se lleva a cabo gracias a la intervención de un complejo sistema enzimático extracelular en el que las oxidoreductasas ligninolíticas (principalmente peroxidasas y lacasas) y otras enzimas auxiliares (GMC oxidasas/deshidrogenasas) juegan un papel fundamental. Los lípidos son otros de los componentes importantes en muchos residuos urbanos e industriales procedentes de biomasa vegetal y también pueden ser modificados y valorizados mediante el empleo de lipasas y esteroles.

Por todo ello, el estudio de nuevas enzimas, su caracterización estructural-funcional, y la mejora de las propiedades de las ya cono-

cidas mediante diseño racional o evolución dirigida, con el fin de obtener compuestos químicos de base y compuestos de valor añadido que contribuyan a la valorización de la lignocelulosa y de otros residuos vegetales, es un tema de plena actualidad. Los Dres. A.T. Martínez y F.J. Ruiz-Dueñas son expertos en el campo de las peroxidasas y GMC oxidasas fúngicas (1, 2), la Dra. S. Camarero en oxidasas multicobre y mediadores redox (3, 4) y las Dras. M.J. Martínez y A. Prieto en glicosil hidrolasas y lipasas (5, 6).

Nuestro trabajo comienza con la búsqueda de enzimas en fuentes naturales o en genomas fúngicos (7-9). Cabe destacar la implicación del grupo en proyectos del *Joint Genome Institute* para la anotación de estas enzimas en genomas fúngicos recientemente secuenciados. La producción de las enzimas de interés se lleva a cabo tanto utilizando el organismo que las produce de forma natural como sistemas de expresión heteróloga, procariontes (*Escherichia coli*) y/o eucariotas


Figura 1.

Estrategias de trabajo realizadas en los laboratorios del grupo de Biotecnología para la Biomasa Lignocelulósica, CIB-CSIC, para el desarrollo de nuevos biocatalizadores de reacciones de interés industrial y medioambiental.

(*Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*). Esta última aproximación facilita la caracterización bioquímica, físico-química y molecular de enzimas existentes o incluso de enzimas ancestrales reconstruidas (10, 11), y permite su mejora por diseño racional y/o evolución dirigida (12-16) (Figura 1). El fin último es entender los mecanismos de la biodegradación de la lignocelulosa para un mejor aprovechamiento de la biomasa vegetal (17-20) y obtener biocatalizadores aplicables en procesos biotecnológicos de interés industrial y medioambiental (21-24). Estas investigaciones se realizan en el ámbito de proyectos nacionales (MINECO), internacionales (H2020 como EnzOx2, www.enzox2.eu) y proyectos con empresas (Retos colaboración, MINECO). Además participamos en diferentes Redes Nacionales, como la Red Lignocel, coordinada por el grupo, cuya temática es la búsqueda y aplicación de soluciones menos contaminantes y más sostenibles para el aprovechamiento de recursos agroforestales como materia prima renovable.

Nuestro equipo colabora con investigadores de diferentes centros, universidades y empresas, tanto nacionales como internacionales y la información detallada de los proyectos en curso puede encontrarse en su página web (<https://www.cib.csic.es/es/departamentos/biologia-medioambiental/biotecnologia-para-la-biomasa-lignocelulosica>).

BIBLIOGRAFÍA

- Ruiz-Dueñas FJ, Morales M, García E, Miki Y, Martínez MJ y Martínez AT (2009). Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases. *J Exp Bot* 60:441-52.
- Carro J, Serrano A, Ferreira P y Martínez AT (2016). Fungal aryl-alcohol oxidase in lignocellulose degradation and bioconversion. In *Microbial enzymes in bioconversions of biomass*. *Biofuel and Biorefinery Technologies* 3: 301-22.
- Cañas AI y Camarero S (2010). Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnology Advances* 28: 694-705.
- Pardo I y Camarero S (2015). Laccase engineering by rational and evolutionary design. *Cell Mol Life Sci* 72:897-910.
- Vaquero ME, Barriuso J, Prieto A y Martínez MJ (2016). Properties, structure, and applications of microbial sterol esterases. *Appl Microbiol Biotechnol* 100: 2047-61.
- Barriuso J, Vaquero ME, Prieto A y Martínez MJ (2016). Structural traits and catalytic versatility of the lipases from the *Candida rugosa*-like family: A review. *Biotechnol Adv* 34: 874-85.
- Barriuso J, Prieto A y Martínez MJ (2013). Fungal genomes mining to discover novel sterol esterases and lipases as catalysts. *BMC Genomics* 14:712-20.
- Ruiz-Dueñas FJ, Lundell T, Floudas D, Nagy LG, Barrasa JM, Hibbett DS y Martínez AT (2013). Lignin-degrading peroxidases in Polyporales: an evolutionary survey based on 10 sequenced genomes. *Mycologia*, 105: 1428-44.
- Ferreira P, Carro J, Serrano A y Martínez AT (2015). A survey of genes encoding H₂O₂-producing GMC oxidoreductases in 10 Polyporales genomes. *Mycologia* 107:1105-19.
- Ayuso-Fernández I, Martínez AT y Ruiz-Dueñas FJ (2017). Experimental recreation of the evolution of lignin-degrading enzymes from the Jurassic to date. *Biotechnol Biofuels* 10: 67.
- Barriuso J y Martínez MJ (2017). Evolutionary history of versatile-lipases from *Agaricales* through reconstruction of ancestral structures. *BMC Genomics* 18:12.
- Acebes S, Fernandez-Fueyo E, Monza E, Lucas F, Almendral D, Ruiz-Dueñas FJ, Lund H, Martínez AT y Guallar V (2016). Rational enzyme engineering through biophysical and biochemical modeling. *ACS-Catalysis* 6: 1624-9.
- Linde D, Cañellas M, Coscolín C, Davó-Siguero I, Romero A, Lucas F, Ruiz-Dueñas FJ, Guallar V y Martínez AT (2016). Asymmetric sulfoxidation by engineering the heme pocket of a dye-decolorizing peroxidase: An experimental and computational study. *Catal Sci Technol* 6: 6277-85.
- Pardo I, Santiago G, Gentili P, Lucas F, Monza E, Medrano FJ, Galli C, Martínez AT, Guallar V y Camarero S (2016). Re-designing the substrate binding pocket of laccase for enhanced oxidation of sinapic acid. *Catal Sci Technol* 6:3900-10.
- Santiago G, de Salas F, Lucas F, Monza E, Acebes S, Martínez AT, Camarero S y Guallar V (2016). Computer-aided laccase engineering: Toward biological oxidation of arylamines. *ACS-Catalysis* 6: 5415-23.
- Saez-Jimenez V, Rencoret J, Rodríguez-Carvajal MA, Gutiérrez A, Ruiz-Dueñas FJ y Martínez AT (2016). Role of surface tryptophan for peroxidase oxidation of nonphenolic lignin. *Biotechnol Biofuels* 9: 198-211.
- Camarero S, Martínez MJ y Martínez AT (2014). Understanding lignin biodegradation for the improved utilization of plant biomass in modern biorefineries. *Biofuels Bioprod. Bioref.* 8:615-25.
- Fernandez-Fueyo E, Ruiz-Dueñas FJ, López-Lucendo MF, Pérez-Boada M, Rencoret J, Gutiérrez A, Pisabarro AG, Ramírez L, Martínez AT (2016). A secretomic view of woody and nonwoody lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnol Biofuels* 9: 49.
- Martínez AT (2016). How to break down crystalline cellulose. *Science* 352: 1050-1.
- Salvachúa D, Katahira R, Cleveland NS, Khanna P, Resch MG, Black BA, Purvine SO, Zink EM, Prieto A, Martínez MJ, Martínez AT, Simmons BA, Gladden JM y Beckham GT (2016). Lignin depolymerization by fungal secretomes and a microbial sink. *Green Chem* 18: 6046-62.
- Carro J, Ferreira P, Rodríguez L, Prieto A, Serrano A, Balcells B, Ardá A, Jiménez-Barbero J, Gutiérrez A, Ullrich R, Hofrichter M y Martínez AT (2015). 5-Hydroxymethylfurfural conversion by fungal aryl-alcohol oxidase and unspecific peroxidase. *FEBS J.* 282: 3218-29.
- de Salas F, Pardo I, Salavagione HJ, Aza P, Amourgi E, Vind J, Martínez AT y Camarero S (2016). Advanced synthesis of conductive polyaniline using laccase as biocatalyst. *PlosOne* 11:e0164958.
- Nieto-Domínguez M, Prieto A, Fernández de Toro B, Cañada FJ, Barriuso J, Armstrong Z, Withers SG, de Eugenio LI y Martínez MJ (2016). Enzymatic fine-tuning for 2-(6-hydroxyphenyl) β-D-xylopyranoside synthesis catalyzed by the recombinant β-xylosidase BxTW1 from *Talaromyces amestolkiae*. *Microb Cell Fact* 15: 171.
- Molina-Gutiérrez M, Hakalin NLS, Rodríguez-Sánchez L, Prieto A y Martínez MJ (2017). Green synthesis of β-sitosterol esters catalyzed by the versatile lipase/sterol esterase from *Ophiostoma piceae*. *Food Chem* 221:1458-65.

La bacteria marina *Marinomonas mediterranea* como modelo de estudio: de la síntesis de melaninas al análisis de un nuevo sistema CRISPR-Cas

Antonio Sánchez-Amat y Patricia Lucas-Elío



Departamento de Genética y Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo. Murcia 30100



Miembros del grupo Biotecnología Microbiana de la UMU: Andrés Andreo Vidal (Estudiante de Máster), Patricia Lucas-Elío (Profesora Titular de Universidad), Antonio Sánchez Amat (IP, Catedrático de Universidad), Alejandra Aroca Crevillén (Estudiante de Grado) e Isabel María García Guillén (Estudiante de Máster).

El grupo de investigación “Biotecnología Microbiana” se creó en la UMU en el año 2004. El objetivo inicial del grupo era profundizar en el estudio de enzimas oxidativas que actúan sobre compuestos fenólicos, aunque, como se comentará más adelante, esta línea inicial se ha ido diversificando y ampliando a lo largo de los años. El grupo ha trabajado con diversos microorganismos modelo, siendo el más relevante de todos ellos *Marinomonas mediterranea*. Esta bacteria marina fue aislada y clasificada por nuestro grupo en un proyecto, en colaboración con el Dr. Francisco Solano del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B de la UMU, orientado al estudio de la melanogénesis en bacterias.

Las melaninas son pigmentos oscuros sintetizados por polimerización de compuestos fenólicos. Dentro de estos pigmentos, las eumelaninas son sintetizadas mediante la actuación de la enzima tirosinasa, que oxida

la tirosina primero al difenol L-dopa y posteriormente a dopaquinona a partir del cual se genera el pigmento melánico. Son pocos los microorganismos estudiados que expresan tirosinasas, siendo *M. mediterranea* uno de ellos. El estudio de la tirosinasa de *M. mediterranea* permitió determinar que el gen que la codifica forma parte de un operón junto con un segundo gen que codifica una proteína implicada en la transferencia de Cu a la tirosinasa (López-Serrano *et al.*, 2007). Esta proteína constituye un mecanismo novedoso de transferencia de Cu y por tanto es de interés en el estudio de los procesos de homeostasis de este metal. El estudio de tirosinasas sintetizadas por *Ralstonia solanacearum* reveló que esta bacteria sintetiza una enzima que, al contrario de la mayoría de las tirosinasas, muestra una mayor actividad sobre la tirosina que sobre el difenol L-dopa (Hernandez-Romero *et al.*, 2006). Este tipo de enzimas pueden tener aplicación en la síntesis de

compuestos difenólicos. De hecho, el mismo L-dopa es utilizado para el tratamiento del Parkinson.

M. mediterranea sintetiza, además de la polifenol oxidasa tirosinasa, una lacasa que es capaz de oxidar un amplio rango de compuestos fenólicos (Solano *et al.*, 2000). Las lacasas son enzimas que han recibido una gran atención por su interés en procesos biotecnológicos. Las lacasas más estudiadas son las de hongos. Sin embargo, las enzimas bacterianas muestran propiedades diferentes en aspectos como tolerancia salina y a pH alcalino, lo que puede hacerlas interesantes en ciertas aplicaciones (Tonin *et al.*, 2016).

La creciente resistencia microbiana a los antibióticos ha renovado el interés por la investigación de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana. Desde los años 70 se conocía que algunas bacterias marinas

se sintetizaban antimicrobianos de alto peso molecular cuya actividad era inhibida por catalasa, pero el mecanismo de actuación era desconocido. El trabajo de nuestro grupo ha contribuido a demostrar que esta actividad antimicrobiana se debe a la síntesis de aminoácido oxidasas que generan, entre otros productos, peróxido de hidrógeno. Un resultado destacado en esta línea de trabajo ha sido la caracterización de LodA, la primera enzima con actividad Lisina ϵ -oxidasa, por lo que recibió un nuevo número EC (EC 1.4.3.20) (Gómez *et al.*, 2006). LodA tiene también el interés de ser la primera aminoácido oxidasa descrita que no posee FAD como cofactor, sino una quinona (CTQ, cisteína triptofilquinona). La síntesis de CTQ tiene lugar mediante un proceso de modificación post-traducciona en el que interviene una segunda enzima (LodB) codificada en el mismo operón que LodA (Gómez *et al.*, 2010, Chacón-Verdú *et al.*, 2015). Esta línea de trabajo encaminada a caracterizar el mecanismo de modificación post-traducciona se mantiene en colaboración con el laboratorio del Dr. Victor Davidson (University of Central Florida, USA).

Estudios recientes de nuestro grupo han revelado que aproximadamente el 1% de los genomas microbianos contienen genes que codifican proteínas similares a LodA que pueden agruparse en varios grupos filogenéticos (Campillo-Brocal *et al.*, 2015). No todas las enzimas de este grupo son lisina oxidasas. De hecho, en la propia *M. mediterranea* un segundo gen de este grupo codifica una glicina oxidasa (Campillo-Brocal *et al.*, 2013). En nuestra opinión, el grupo de proteínas similares a LodA constituye un enorme reservorio de enzimas de potencial interés biotecnológico en las numerosas aplicaciones que tienen las aminoácido oxidasas. Entre estas aplicaciones se incluyen el diseño de biosensores o su uso en biotransformaciones. Desde el punto de vista fisiológico, se ha observado que algunas de estas proteínas juegan un papel importante en el desarrollo de biopelículas microbianas (Mai-Prochnow *et al.*, 2008).

En el desarrollo de las líneas de investigación anteriormente mencionadas, nuestro grupo ha puesto a punto en *M. mediterranea* una gran variedad de técnicas de Biología Molecular que han sido esenciales en el estudio de los sistemas CRISPR-Cas en esta bacteria. Los sistemas CRISPR (Cluste-

red Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)- Cas (CRISPR associated genes) proveen a los procariotas de mecanismos de resistencia adaptativa a la infección por elementos genéticos invasivos. Básicamente, el sistema funciona mediante la adquisición de fragmentos del genoma del elemento invasivo y su integración como "espaciadores" en los *loci* CRISPR. Posteriormente, los espaciadores serán transcritos y procesados en fragmentos de RNA (crRNA) que guiarán a unas nucleasas Cas para la degradación del agente infeccioso original ante una nueva invasión. Los sistemas CRISPR-Cas muestran una enorme diversidad, observándose que algunos de estos sistemas de tipo III-B poseen dominios de retrotranscriptasa asociados a la proteína Cas1 que participa en la adquisición de espaciadores (RT-Cas1). Usando como modelo *M. mediterranea*, el único microorganismo con RT-Cas1 para el que existían técnicas de manipulación genética, la colaboración entre nuestro grupo y el grupo del Dr. Andrew Z. Fire (Stanford University, Premio Nobel de Fisiología o Medicina 2006 por sus estudios de interferencia de RNA) ha puesto de manifiesto por primera vez que la adquisición de espaciadores tiene lugar también a partir de RNA (y no sólo DNA, como se había descrito anteriormente). La proteína RT-Cas1 de *M. mediterranea* lleva a cabo la retrotranscripción de RNA y su integración como nuevo espaciador (Silas *et al.*, 2016). *M. mediterranea* forma parte de la microbiota asociada a la planta marina *Posidonia oceanica*. Mediante el muestreo de estos ambientes en las costas de Cabo de Palos, y otras zonas del mar Mediterráneo, se han aislado nuevas cepas de este microorganismo, así como fagos capaces de infectarlas. Estos datos están permitiendo profundizar en el estudio de los sistemas CRISPR-Cas de *M. mediterranea* ofreciendo resultados muy interesantes en cuanto a su modularidad y a la cooperación entre distintos tipos de sistemas presentes en las cepas aisladas.

REFERENCIAS

- Campillo-Brocal JC, Chacón-Verdú MD, Lucas-Elío P y Sánchez-Amat A** (2015) Distribution in microbial genomes of genes similar to *lodA* and *goxA* which encode a novel family of quinoproteins with amino acid oxidase activity. *BMC Genomics* 16: 231.
- Campillo-Brocal JC, Lucas-Elío P y Sanchez-Amat A** (2013) Identification in *Marinomonas mediterranea*



Fondos marinos del Mediterráneo con *Posidonia oceanica*, hábitat natural de *Marinomonas mediterranea*.

of a novel quinoprotein with glycine oxidase activity. *MicrobiologyOpen* 2: 684-694.

Chacón-Verdú MD, Campillo-Brocal JC, Lucas-Elío P, Davidson VL y Sánchez-Amat A (2015) Characterization of recombinant biosynthetic precursors of the cysteine tryptophylquinone cofactors of l-lysine-epsilon-oxidase and glycine oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *Biochim Biophys Acta* 1854: 1123-1131.

Gómez D, Lucas-Elío P, Sanchez-Amat A y Solano F (2006) A novel type of lysine oxidase: L-lysine-epsilon-oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1764: 1577-1585.

Gómez D, Lucas-Elío P, Solano F y Sanchez-Amat A (2010) Both genes in the *Marinomonas mediterranea* *lodAB* operon are required for the expression of the antimicrobial protein lysine oxidase. *Mol Microbiol* 75: 462-473.

Hernandez-Romero D, Sanchez-Amat A y Solano F (2006) A tyrosinase with an abnormally high tyrosine hydroxylase/dopa oxidase ratio - Role of the seventh histidine and accessibility to the active site. *FEBS Journal* 273: 257-270.

López-Serrano D, Solano F y Sanchez-Amat A (2007) Involvement of a novel copper chaperone in tyrosinase activity and melanin synthesis in *Marinomonas mediterranea*. *Microbiology* 153: 2241-2249.

Mai-Prochnow A, Lucas-Elío P, Egan S, Thomas T, Webb JS Sanchez-Amat A y Kjelleberg S (2008) Hydrogen peroxide linked to lysine oxidase activity facilitates biofilm differentiation and dispersal in several gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 190: 5493-5501.

Silas S, Mohr G, Sidote DJ, Markham LM, Sanchez-Amat A, Bhaya D, Lambowitz AM y Fire AZ (2016) Direct CRISPR spacer acquisition from RNA by a natural reverse transcriptase-Cas1 fusion protein. *Science* 351: aad4234.

Solano F, Lucas-Elío P, Fernández E y Sanchez-Amat A (2000) *Marinomonas mediterranea* MMB-1 transposon mutagenesis: isolation of a multipotent polyphenol oxidase mutant. *J Bacteriol* 182: 3754-3760.

Tonin F, Melis R, Cordes A, Sanchez-Amat A, Pollegioni L, and Rosini E (2016) Comparison of different microbial laccases as tools for industrial uses. *N. Biotechnol* 33: 387-398.

Grupo de biosíntesis de compuestos bioactivos por microorganismos (BIOMIC)

José Antonio Salas Fernández y Carmen Méndez Fernández



Universidad de Oviedo



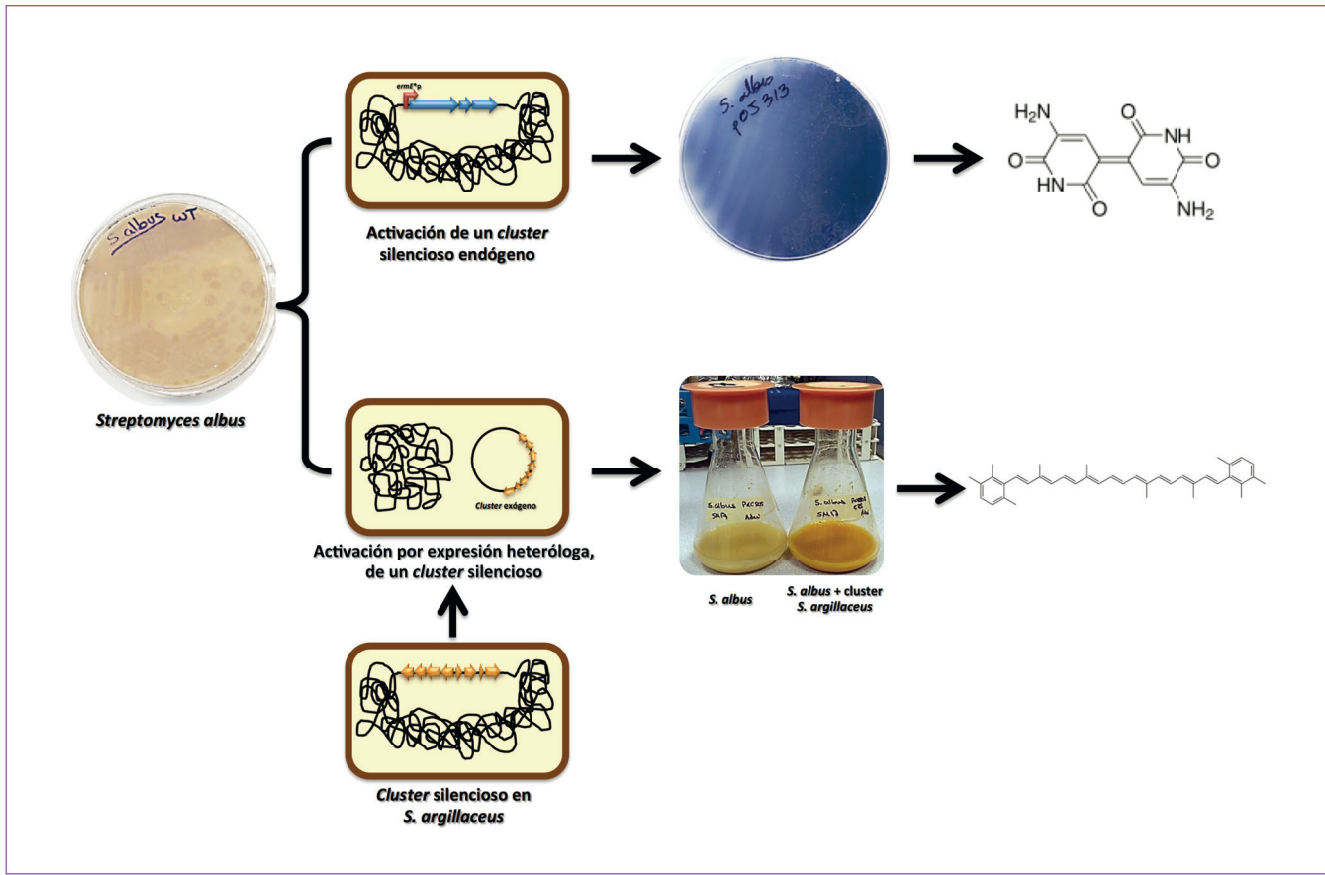
Primera Fila desde la izquierda: Adriana Becerril García, Leire Peña Noval, Suhui Ye Huang, Carmen Méndez Fernández, Mónica Gómez Malmierca, Rubén Álvarez Álvarez, Ana Cenicerros Medrano
Segunda fila desde la izquierda: Ignacio Montero Ordóñez, José Antonio Salas Fernández, Carlos Olano Álvarez, Armando Álvarez Losada, Alma M^a Botas Muñoz, Raúl García Salcedo, Jorge Fernández de la Hoz

El grupo de "Biosíntesis de compuestos bioactivos por microorganismos (BIOMIC)" pertenece al Área de Microbiología del Departamento de Biología Funcional y al Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (I.U.O.P.A.) de la Universidad de Oviedo. Está ubicado en la Facultad de Medicina y está coordinado por los Catedráticos de Universidad José Antonio Salas Fernández y Carmen Méndez Fernández. Además el Dr. Carlos Olano (Investigador del I.U.O.P.A.), miembro del mismo desde su creación oficial, codirige distintos proyectos de investigación. Otros miembros del grupo en la actualidad son seis investigadores postdoctorales (Raúl

García Salcedo, Mónica Gómez Malmierca, Rubén Álvarez Álvarez, Alma M^a Botas Muñoz, Suhui Ye Huang y Ana Cenicerros Medrano), tres doctorandos (Armando Álvarez Losada, Adriana Becerril García y Jorge Fernández de la Hoz) y una técnico de laboratorio (Leire Peña Noval).

Desde su creación, el grupo está interesado en el estudio de distintos aspectos relacionados con la biosíntesis de compuestos bioactivos en los microorganismos productores. Los compuestos bioactivos son productos naturales que juegan un papel importante en clínica debido a sus múltiples actividades

biológicas tales como antitumorales, antibióticas, antiparásitas, antivirales, inmunosupresores, neuroprotectores, etc. En los últimos veinte años, estos productos naturales y sus derivados (o compuestos inspirados en ellos) han representado cerca del 50% de todos los compuestos bioactivos aprobados para su uso (tanto clínico como en agricultura o veterinaria). Considerando su origen, la mitad de los productos naturales bioactivos han sido obtenidos a partir de microorganismos (bacterias y hongos) y en particular de las actinobacterias filamentosas, especialmente del género *Streptomyces*, que producen el 40% de los compuestos bioactivos de origen microbiano.



Las principales líneas de investigación del grupo son:

- **Aislamiento y caracterización de agrupaciones de genes de biosíntesis de compuestos bioactivos (antibióticos y compuestos antitumorales) producidos por Actinomicetos.**

El grupo posee una amplia experiencia en el aislamiento y caracterización de rutas de biosíntesis de antibióticos y compuestos antitumorales producidos por actinomicetos. Se han aislado y caracterizado totalmente diversas rutas de biosíntesis de compuestos bioactivos pertenecientes a distintas familias de compuestos policetónicos ("polyketides"), como el antibiótico macrólido oleandomicina, el macrólido antiangiogénico borrelidina, los macrólidos antitumorales PM100117 y PM100118, la anguciclina antitumoral oviedomicina, las antraciclinas antitumorales eloramina y estefimicina y los antitumorales del grupo del ácido aureólico mitramici-

na y cromomicina A3. Así mismo se han caracterizado las rutas de biosíntesis de los péptidos-policetónicos estreptolidigina (antibiótico) y colismicina A (neuroprotector), la ruta del antitumoral péptido tiocoralina, la del antibiótico carbapenema tienamicina, la ruta de biosíntesis del antibiótico paulomicina, la de los antitumorales rebecamicina y estaurosporina pertenecientes ambos al grupo de los indolocarbazoles y las de los benzoxazoles con actividad antitumoral nataxazol y caboxamicina. Estos estudios implicaron la identificación de los genes de biosíntesis utilizando distintas estrategias; la inactivación y expresión de los genes, experimentos de bioconversión y ensayos de actividad *in vitro* para determinar la función de cada gen; purificación de los compuestos producidos por los diferentes mutantes y su caracterización química utilizando Espectrometría de Masas (MS) y Resonancia Magnética Nuclear (NMR); y ensayos de actividad biológi-

ca (antibiótica, antifúngica, antitumoral, neuroprotectora e inmunosupresora).

- **Utilización de la "Biosíntesis Combinatoria" para generar nuevos compuestos bioactivos.** La "Biosíntesis Combinatoria" es una estrategia que permite generar nuevos compuestos bioactivos mediante la utilización de técnicas de Ingeniería genética. Así, se pueden crear microorganismos recombinantes con combinaciones de genes de rutas de biosíntesis de compuestos bioactivos no existentes en la naturaleza, que potencialmente pueden dar lugar a la producción de nuevos compuestos. La purificación posterior de estos compuestos, su caracterización química y el ensayo de sus actividades biológicas, así como su toxicidad en ratones, permite determinar la potencialidad de los compuestos para ser patentados y desarrollados posteriormente. Utilizando esta estrategia, el grupo ha generado más de 150 nuevos compuestos derivados de compuestos bioactivos (mitramicina,

cromomicina, eloramycin, estefimicina, rebecamicina, estaurosporina, colismicina, oviedomicina, nataxazol, caboximicina, estreptolidigina, borrelidina), algunos de los cuales poseen mayor bioactividad y/o menor toxicidad que los compuestos originales.

- **Mejora de la producción de compuestos bioactivos por Ingeniería metabólica.** Uno de los posibles problemas en el desarrollo de un nuevo compuesto bioactivo, es que éste se produzca en cantidades suficientes para llevar a cabo distintos tipos de ensayos, como ensayos preclínicos. Uno de los potenciales cuellos de botella que pueden existir es la disponibilidad de los precursores metabólicos a partir de los cuales se sintetiza el compuesto. Aplicando estrategias de Ingeniería metabólica (sobreexpresión y/o inactivación de genes del metabolismo primario) se puede favorecer y/o canalizar los precursores metabólicos de compuestos bioactivos hacia las rutas de biosíntesis de interés. Por otro lado, las rutas de biosíntesis de compuestos bioactivos están sometidas a sistemas de regulación que actúan a distintos niveles, cuyo conocimiento y manipulación permite mejorar los niveles de producción codificados por las mismas. Utilizando estas estrategias hemos podido incrementar la producción de mitramicina, estreptolidigina, colismicina, nataxazol y caboximicina.
- **Aplicación del análisis genómico para activar rutas de biosíntesis “silenciosas” e identificar nuevos compuestos bioactivos.** La secuenciación de genomas de actinomicetos ha puesto de manifiesto que estos contienen agrupaciones de genes para la formación de 10-30 compuestos bioactivos que, por razones desconocidas, o no se expresan o se expresan poco en condiciones de cultivo de laboratorio, lo que implica que gran parte del potencial de estos microorganismos como productores de compuestos bioactivos está por descubrir. En nuestro laboratorio, se está analizando el genoma de diferentes actinomicetos con el fin de identificar agrupaciones de genes de biosíntesis de

compuestos bioactivos desconocidas e inducir su activación (utilizando estrategias de Ingeniería genética) para de esta manera descubrir nuevos compuestos. Con esta tecnología se ha podido descubrir que *S. albus* posee la capacidad de sintetizar varios compuestos bioactivos (indigoidina, antimicinas, alteramidas, candicina) y que *S. argillaceus* puede producir una familia de nuevos compuestos a los que se han denominado argimicinas P.

BIBLIOGRAFÍA

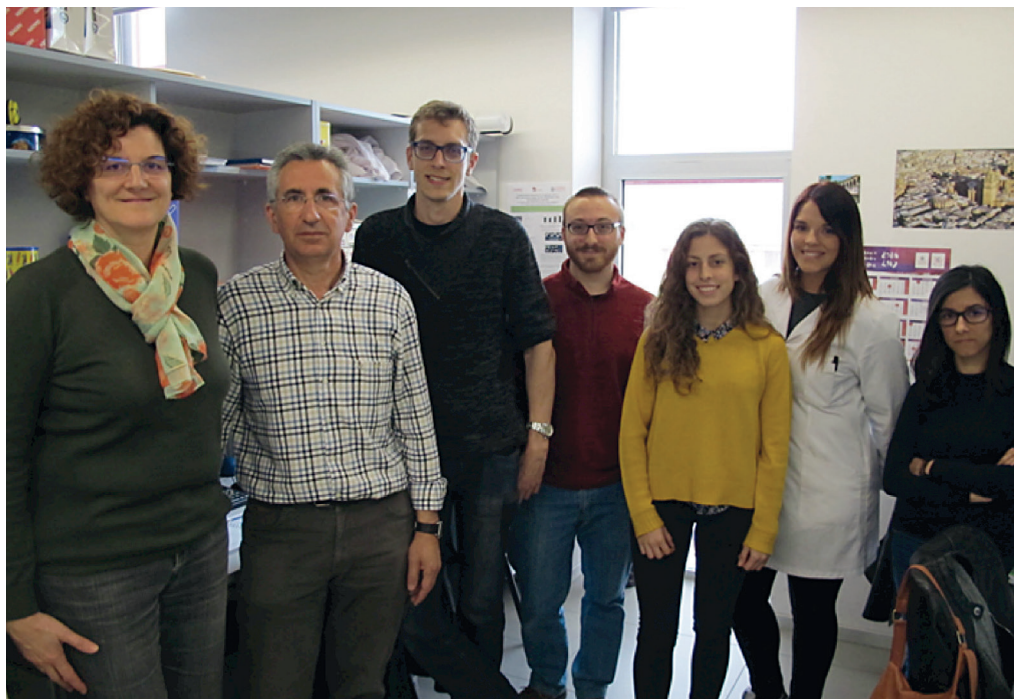
- García I, Vior NM, Braña AF, González-Sabín J, Rohr J, Moris F, Méndez C y Salas JA.** (2012). Elucidating the biosynthetic pathway for the polyketide-nonribosomal peptide collismycin A: mechanism for formation of the 2,2'-bipyridyl ring. *Chem Biol* 19: 399-413.
- Gómez C, Olano C, Palomino-Schätzlein M, Pineda-Lucena A, Carbajo R, Braña AF, Méndez C y Salas JA.** (2012). Novel compounds produced by *Streptomyces lydicus* NRRL 2433 engineered mutants altered in the biosynthesis of streptolydigin. *J Antibiot* 65: 341-348.
- Núñez LE, Nybo SE, Gonzalez-Sabín J, Pérez M, Menéndez N, Braña AF, He M, Moris F, Salas JA, Rohr J y Méndez C.** (2012). A novel mithramycin analogue with high antitumor activity and less toxicity generated by combinatorial biosynthesis. *J Med Chem* 55: 5813-5825.
- Gómez C, Horna DH, Olano C, Méndez C y Salas JA.** (2012). Participation of putative glycoside hydrolases SlgC1 and SlgC2 in the biosynthesis of streptolydigin in *Streptomyces lydicus*. *Microb Biotechnol* 5: 663-667.
- Gómez C, Olano C, Méndez C y Salas JA.** (2012). Three pathway-specific regulators control streptolydigin biosynthesis in *Streptomyces lydicus*. *Microbiology-UK*. 158: 2504-2514.
- García I, Vior NM, González-Sabín J, Braña AF, Rohr J, Moris F, Méndez C y Salas JA.** (2013). Engineering the biosynthesis of the polyketide-nonribosomal peptide collismycin A for generation of analogs with neuroprotective activity. *Chem Biol* 20: 1022-1032.
- Sialer C, García I, González-Sabín J, Braña AF, Méndez C, Moris F y Salas JA.** (2013). Generation by mutasynthesis of potential neuroprotectant derivatives of the bipyridyl collismycin A. *Bioorg Med Chem Lett* 23: 5707-5709.
- Zabala D, Braña AF, Flórez AB, Salas JA y Méndez C.** (2013). Engineering precursor metabolite pools for increasing production of antitumor mithramycins in *Streptomyces argillaceus*. *Metab Eng* 20:187-197.
- Vior NM, Olano C, García I, Méndez C y Salas JA.** (2014). Collismycin A biosynthesis in *Streptomyces* sp. CS40 is regulated by iron levels through two pathway-specific regulators. *Microbiology-UK* 160:467-478.
- Olano C, García I, González A, Rodríguez M, Rozas D, Rubio J, Sánchez-Hidalgo M, Braña AF, Méndez C y Salas JA.** (2014). Activation and identification of five clusters for secondary metabolites in *Streptomyces albus* J1074. *Microb Biotechnol* 7: 242-56.
- Olano C, Cano-Prieto C, Losada AA, Bull AT, Goodfellow M, Fiedler HP, Méndez C y Salas JA.** (2014). Draft genome sequence of marine actinomycete *Streptomyces* sp. strain NTK 937, producer of the benzoxazole antibiotic caboxamycin. *Genome Announc.* 2(4). pii: e00534-14. doi: 10.1128/genomeA.00534-14.
- Flórez AB, Álvarez S, Zabala D, Braña AF, Salas JA y Méndez C.** (2015). Transcriptional regulation of mithramycin biosynthesis in *Streptomyces argillaceus*: dual role as activator and repressor of the PadR-like regulator MtrY. *Microbiology-UK* 161: 271-284.
- Cano-Prieto C, García-Salcedo R, Sánchez-Hidalgo M, Braña AF, Fiedler HP, Méndez C, Salas JA y Olano C.** (2015). Genome mining of *Streptomyces* sp. Tü 6176: characterization of the nataxazole biosynthesis pathway. *Chembiochem* d16: 1461-1473.
- Cano-Prieto C, Losada AA, Braña AF, Méndez C, Salas JA y Olano C.** (2015). Crosstalk of nataxazole pathway with chorismate-derived ionophore biosynthesis pathways in *Streptomyces* sp. Tü 6176. *Chembiochem.* doi: 10.1002/cbic.201500261.
- Méndez C, González-Sabín J, Moris F y Salas JA.** (2015). Expanding the chemical diversity of the antitumor mithramycin by combinatorial biosynthesis and biocatalysis: the quest for mithralogs with improved therapeutic window. *Planta Med* 81(15):1326-38.
- Zabala D, Braña AF, Salas JA y Méndez C.** (2016). Increasing antibiotic production yields by favoring the biosynthesis of precursor metabolites glucose-1-phosphate and/or malonyl-CoA in *Streptomyces* producer strains. *J Antibiot* 69 (3): 179-82. doi:10.1038/ja.2015.104.
- Salcedo RG, Olano C, Gómez C, Fernández R, Braña AF, Méndez C, de la Calle F y Salas JA.** (2016). Characterization and engineering of the biosynthesis gene cluster for antitumor macrolides PM100117 and PM100118 from a marine actinobacteria: generation of a novel improved derivative. *Microb Cell Fact* 15(11): 44. doi: 10.1186/s12934-016-0443-5.
- González A, Rodríguez M, Braña AF, Méndez C, Salas JA y Olano C.** (2016). New insights into paullomycin biosynthesis pathway in *Streptomyces albus* J1074 and generation of novel derivatives by combinatorial biosynthesis. *Microb Cell Fact* 15(11): 56. doi: 10.1186/s12934-016-0452-4.
- Salcedo RG, Olano C, Fernández R, Braña AF, Méndez C, de la Calle F y Salas JA.** (2016). Elucidation of the glycosylation steps during biosynthesis of antitumor macrolides PM100117 and PM100118 and engineering for novel derivatives. *Microb Cell Fact* 15: 187.
- Ye S, Molloy B, Braña AF, Zabala D, Olano C, Cortés J, Moris F, Salas JA y Méndez C.** (2017). Identification by genome mining of a type I polyketide gene cluster from *Streptomyces argillaceus* involved in the biosynthesis of pyridine and piperidine alkaloids argimycins P. *Front Microbiol* 8:194. doi: 10.3389/fmicb.2017.00194.

Regulación génica en *Streptomyces*

Ramón Santamaría, Margarita Díaz, Laura Sevillano, Sergio Antoraz, Ricardo Sánchez de la Nieta, Marta González, Ana M. Martínez



Instituto de Biología Funcional y Genómica. Consejo superior de Investigaciones Científicas/ Universidad de Salamanca. Salamanca



Grupo RS: De izquierda a derecha: Margarita Díaz, Ramón Santamaría, Sergio Antoraz, Ricardo Sánchez de la Nieta, Marta González, Ana M. Martínez y Laura Sevillano.

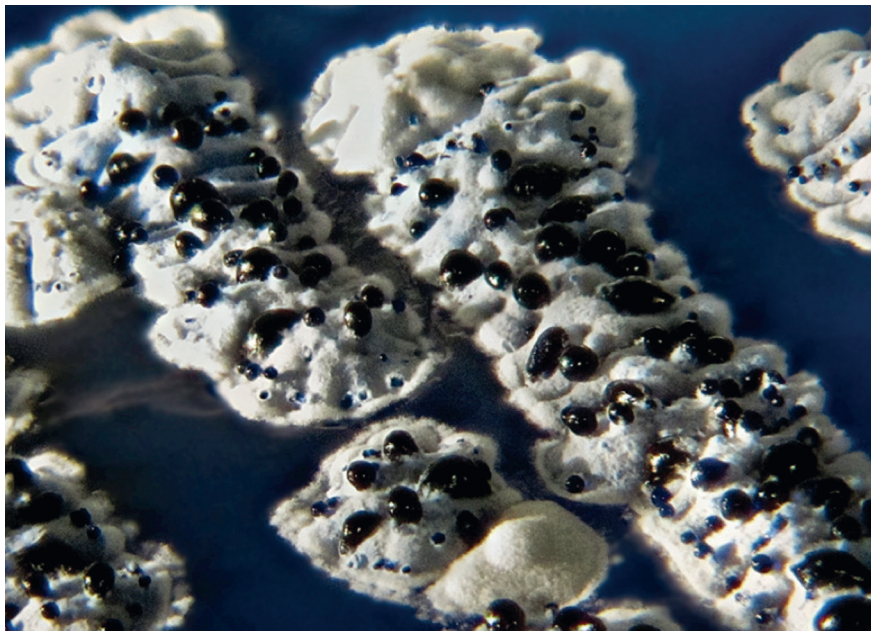
El grupo de investigación dirigido por los doctores Ramón Santamaría y Margarita Díaz profundiza en el estudio de diferentes aspectos de la biología de las bacterias del género *Streptomyces*. Actualmente estamos desarrollando dos proyectos uno centrado en la regulación de la producción de antibióticos mediada por sistemas de dos componentes y el otro en el desarrollo de vectores y cepas para la expresión de proteínas en *Streptomyces*; en particular, para la expresión de enzimas hidrolíticas con potencial industrial.

Streptomyces, con más de 900 especies descritas y cerca de 200 secuenciadas es un género de bacterias que destaca por su capacidad para producir antibióticos y antitumorales (producen más del 50 % de todos los antibióticos naturales disponibles). Ese

potencial se ha visto incrementado con la secuenciación de su DNA al observar que todas las especies secuenciadas poseen múltiples *clusters* biosintéticos que, inactivos en las condiciones de laboratorio, están implicados en la síntesis de metabolitos secundarios desconocidos. El conseguir la producción e identificación de estos metabolitos crípticos y conseguir niveles de producción adecuados, incluso de los metabolitos ya conocidos, es una tarea en la que están implicados multitud de grupos y empresas a nivel mundial utilizando aproximaciones muy variadas (Antoraz *et al.* 2015)

Nosotros, utilizando *S. coelicolor* como modelo, nos hemos enfrentado a este reto centrando nuestra investigación en el estudio de regulación que ejercen diferentes

sistemas de dos componentes sobre la producción de antibióticos con objeto de poder manipular esta regulación y potenciar rutas de producción de antibióticos conocidos y/o activar rutas silenciadas de producción. Hasta la fecha, hemos estudiado el efecto que ejercen seis sistemas de dos componentes sobre la producción de antibióticos mediante la mutación de los genes que los integran (Yepes *et al.* 2011). En la actualidad estamos profundizando en el estudio de los tres que ejercen mayor efecto, y hemos descrito que los sistemas que denominamos AbrA1/A2 y AbrB1/B2 ejercen un efecto negativo sobre la producción de antibióticos (Rico *et al.* 2014a,b) mientras que el sistema AbrC1/C2/C3 (sistema atípico, compuesto por dos quinasas y un regulador) ejerce un efecto positivo sobre la producción de estos meta-



Colonias de *Streptomyces coelicolor* produciendo el antibiótico actinorrodina.

bolitos (Rodríguez *et al.* 2015). El empleo de las cepas delecionadas en los sistemas negativos como cepas hospedadoras para la expresión heteróloga de distintas rutas de antitumorales nos ha permitido demostrar su utilidad al duplicar su producción respecto a la cepa parental (Rico *et al.* 2014a). Además, la sobreexpresión del regulador positivo AbrC3 en otras especies de *Streptomyces* induce la producción de metabolitos endógenos en las mismas y puede ayudarnos a descubrir nuevas moléculas bioactivas de interés para la medicina producidas por diferentes especies (Rico *et al.* 2014b y resultados no publicados).

Nuestra segunda línea de trabajo se apoya en la capacidad de secreción que estos organismos poseen. En particular, producen gran cantidad de enzimas hidrolíticas secretadas que les permiten degradar la materia orgánica de su nicho biológico principal, el suelo, y utilizar los nutrientes generados para su desarrollo. Esta capacidad secretora hace de *Streptomyces* una posible alternativa muy interesante como hospedador para la expresión de proteínas heterólogas con interés industrial.

Nuestro grupo tiene amplia experiencia en el estudio la producción de enzimas hidrolíticas implicadas en la degradación de materiales lignocelulósicos por estas bacterias.

Uno de los frutos de ese trabajo ha sido la identificación de varios promotores fuertes regulados por la fuente de carbono presente en los medios de cultivo que han sido empleados en diferentes vectores para la sobreexpresión de varias proteínas de interés industrial en *Streptomyces* (Díaz *et al.* 2008, 2011; Sevillano *et al.* 2016). Este estudio se ha complementado con el desarrollo de vectores de expresión con selección positiva que no requieren la adición de antibióticos para su mantenimiento durante la etapa de producción en el fermentador. Para este fin hemos utilizado un sistema toxina-antitoxina YoeB/YefM de *S. lividans* que hemos descrito y que ha sido el primer sistema toxina-antitoxina demostrado funcionalmente en *Streptomyces* (Sevillano *et al.* 2012). Durante el desarrollo de este sistema de expresión hemos generado una cepa en la que hemos delecionado todo el sistema YoeB/YefM del genoma y en la que hemos reinsertado el gen de la toxina en el genoma de una cepa que a su vez expresa la antitoxina y el gen que codifica la proteína de interés desde un plásmido. La pérdida de este plásmido provoca la desaparición de la antitoxina y como consecuencia la toxina se activa y la célula muere. El sistema que hemos ensayado con varias proteínas es muy efectivo y prometedor para el escalado a nivel industrial de los productos con el consiguiente ahorro en el proceso y la necesidad de la eliminación


de la contaminación por antibióticos en el producto final (Sevillano *et al.* 2013).

REFERENCIAS

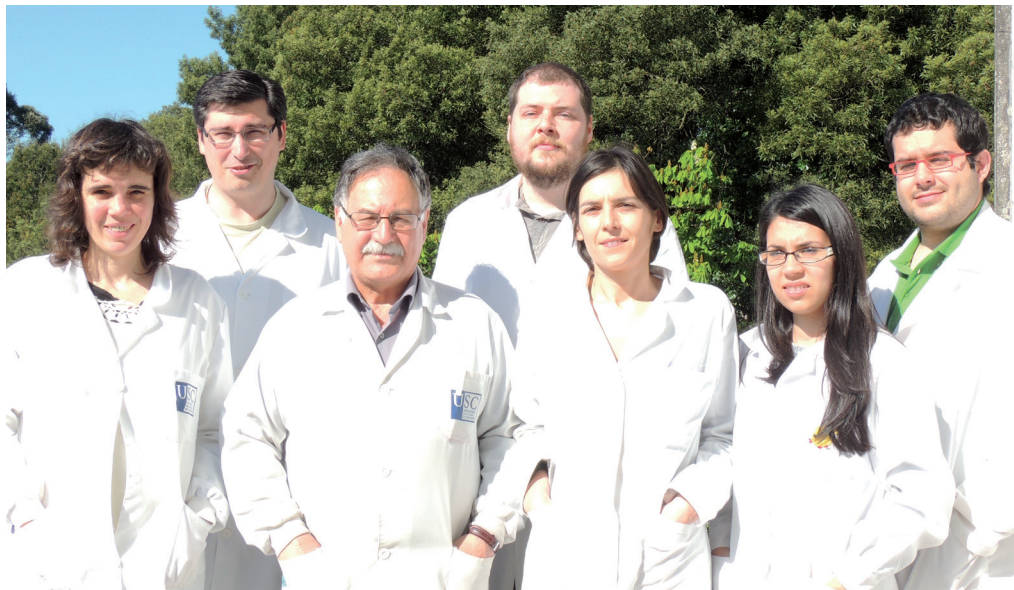
- Sevillano L., Vijgenboom E., van Wezel GP., Díaz, M., and Santamaría, R. I. (2016) New approaches to achieve high level enzyme production in *Streptomyces*. *Microbial Cell Factories* 15:28.
- Rodríguez, H., Rico, S., Yepes, A., Franco-Echevarría, E., Antoraz, S., Santamaría, R. I. and Díaz, M. (2015). The two kinases, AbrC1 and AbrC2, of the atypical two-component system AbrC are needed to regulate antibiotic production and differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Frontiers in Microbiology* 6:450 doi: 10.3389/fmicb.2015.00450.
- Antoraz, S., Santamaría, R.I., Díaz, M., Sanz, D. and Rodríguez, H. (2015) Toward a new focus in antibiotic and drug discovery from the *Streptomyces* Arsenal. *Frontiers in Microbiology* 6:461 doi: 10.3389/fmicb.2015.00461.
- Rico S., Yepes, A., Rodríguez, H., Santamaría, J., Antoraz, S., Krause, E., Díaz, M and Santamaría, R.I. (2014 a). "Regulation of the AbrA1/A2 two-component system in *Streptomyces coelicolor* and the potential of its deletion strain as a heterologous host for antibiotic production." *PLOS One* 9:e109844.
- Rico S, Santamaría RI, Yepes A, Rodríguez H, Laing E, Bucca G, Smith CP, Díaz M. (2014b). "Deciphering the regulon of the *Streptomyces coelicolor* AbrC3, a positive response regulator of antibiotic production. *Appl. Environ. Microbiology* 80(8): 2417-2428.
- Rodríguez, H., Rico, S., Díaz, M. and Santamaría, R.I. (2013). "Two-component systems in *Streptomyces*: key regulators of antibiotic complex pathways". *Microbial Cell Factories* 12:127.
- Sevillano, L., Díaz, M. and Santamaría, R.I. (2013). "Stable expression plasmids for *Streptomyces* based on a toxin-antitoxin system" *Microbial Cell Factories* 12:39.
- Díaz, M., Sevillano, L., Rico, S., Lombo, F., Braña, AF, Salas, JA., Méndez, C. and Santamaría, R.I. (2013). "High level of antibiotic production in a double polyphosphate kinase and phosphate-binding protein mutant of *Streptomyces lividans*". *FEMS letters* 342, 123-129.
- Sevillano L., Díaz, M. and Santamaría, R.I. (2012). Identification of the first functional toxin-antitoxin system in *Streptomyces*. *PLoS One* 7(3): e32977.
- Yepes, A., Rico, S., Rodríguez, A., Santamaría, R.I. and Díaz, M. (2011). "Novel two-components systems involved in antibiotic regulation in *Streptomyces coelicolor*". *PLoS One* 6(5): e19980.
- Pérez, J, Muñoz-Dorado J, Braña AF, Shimkets L J, Sevillano L and Santamaría R.I. (2011). "*Myxococcus xanthus* induces actinorhodin overproduction and aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*". *Microbial Biotechnology* 4:175-183.
- Esteban A, Díaz M, Yepes A and Santamaría R.I. (2008). "Expression of the *pstS* gene of *Streptomyces lividans* is regulated by the carbon source and is partially independent of the PhoP regulator." *BMC Microbiology* 8:201 doi:10.1186/1471-2180-8-201.
- Díaz, M., Ferreras, E., Moreno, R., Yepes, A., Berenguer, J, and Santamaría, R.I., (2008). "High-level overproduction of *Thermus* enzymes in *Streptomyces lividans*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 79, 1001-1008.

Biotecnología Microbiana y Alimentaria

Tomás G. Villa, Pilar Calo Mata y Jorge Barros Velázquez


tomas.gonzalez@usc.es
p.calo.mata@usc.es
jorge.barros@usc.es

Facultad de Farmacia/Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela



Sección de Santiago



Sección de Lugo

Nuestro grupo comenzó su andadura hace más de 30 años. El grupo de investigación posee amplia experiencia en clonación y explotación de genes con potencial indus-

trial en los ámbitos farmacéutico, ingeniería de procesos y tecnología de alimentos. En sus investigaciones destacan los trabajos en genética de levaduras y hongos filamentosos

mediante estrategias alternativas a la ingeniería genética, basándose en conocimientos de genética clásica de microorganismos eucariotas. Por otra parte hemos contribuido el desa-

rollo de técnicas moleculares de detección e identificación directas de microorganismos patógenos en alimentos, especialmente en el ámbito de los métodos miniaturizados y la proteómica. Finalmente, hemos prestado atención a los métodos de lucha contra los microorganismos patógenos de mayor relevancia en el ámbito alimentario, destacando componentes naturales, extractos de algas, bacteriocinas o enzimáticos.

Dentro de este gran ámbito que representa la aplicación de herramientas biotecnológicas a la industria alimentaria, en los últimos cinco años hemos desarrollado específicamente las siguientes grandes líneas:

1. PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE COMPONENTES DE VALOR AÑADIDO PARA LA INDUSTRIA ALIMENTARIA.

En el grupo de investigación se ha trabajado con las poligalacturonasas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* y *Medicago sativa*. Se han caracterizado, clonado y expresado en diferentes organismos tales como *Escherichia coli*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris* y *Arabidopsis thaliana*. Como resultado de esta experiencia se han aislado y conseguido cepas superproductoras de poligalacturonasa, tanto de modo natural como recombinante, susceptibles de aplicación industrial con excelentes resultados. También se ha llevado a cabo la identificación y caracterización de genes de *S. cerevisiae* implicados en la formación de espuma en el vino con la finalidad de clonarlos en levaduras cerveceras, *Saccharomyces carlsbergensis*, para aumentar la cantidad y calidad de la espuma obtenida en la cerveza.

Se ha prestado asimismo especial atención a la selección de genes responsables de la biosíntesis de beta-caroteno, licopeno o xantofilinas y su expresión heteróloga en *P. pastoris*. Componentes todos ellos de gran valor añadido en la biotecnología alimentaria. Asimismo se ha abordado el estudio de quimosinas de grado alimentario y recombinantes para la producción quesera.

En un próximo futuro se pretende generar nuevas cepas productoras de estos compuestos de uso industrial. Actualmente se

está trabajando en la mejora de las cepas recombinantes de la levadura *Pichia pastoris* incrementando la dosis génica para aumentar la producción de astaxantina, licopeno y β -caroteno. De igual manera se está procediendo a terminar el adaptado de cepas de la misma levadura para la producción de una nueva proteasa aspártica de origen vegetal, para la elaboración de quesos tradicionales. Las cepas productoras de espuma y poligalacturonasa de uso alimentario están siendo escaladas para uso industrial.

Bibliografía seleccionada (diez publicaciones de los últimos cinco años)

- Araya-Garay J, Ageitos JM, Vallejo JA, Veiga-Crespo P, Sánchez-Pérez A y Villa TG.** (2012). Construction of a novel *Pichia pastoris* strain for production of xanthophylls. *AMB Express* 2:24.
- Vallejo JA, Ageitos JM, Poza M y Villa TG.** (2012). A comparative analysis of recombinant chymosins. *J Dairy Sci* 95: 609-613.
- Araya-Garay JM, Feijoo-Siota L, Rosa-dos-Santos F, Veiga-Crespo P y Villa TG.** (2012). Construction of new *Pichia pastoris* X-33 strains for production of lycopene and β -carotene. *Appl Microbiol Biotechnol* 93: 2483-2492.
- Blasco L, Veiga-Crespo P, Sánchez-Pérez A y Villa TG.** (2012). Cloning and Characterization of the Beer Foaming Gene CFG1 from *Saccharomyces pastorianus*. *J Agric Food Chem* 60: 10796-10807.
- Ageitos JM, Vallejo JA, Serrat M, Sánchez-Pérez A, Villa TG.** (2013). In Vitro Ca²⁺-Dependent Maturation of Milk-Clotting Recombinant Epr: Minor Extracellular Protease: From *Bacillus licheniformis*. *Mol Biotechnol* 54: 304-311.
- Vallejo JA, Serrat M, Pérez-Portuondo I, Sánchez-Pérez A, Ageitos JM y Villa TG.** (2012). A novel *Kluyveromyces marxianus* strain with an inducible flocculation phenotype. *AMB Express* 1: 38. doi:10.1186/2191-0855-2-38.
- Vallejo JA, Sánchez-Pérez A, Martínez JP y Villa TG.** (2013). Cell aggregations in yeasts and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 2305-2318.
- Vallejo JA, Miranda P, Flores-Félix JD, et al.** (2013). Atypical yeasts identified as *Saccharomyces cerevisiae* by MALDI-TOF MS and gene sequencing are the main responsible of fermentation of chicha, a traditional beverage from Peru. *Syst Appl Microbiol* 36(8): 560-564.
- Sieiro C, Villa TG, da Silva AF, García-Fraga B y Vilanova M.** (2014). Albariño wine aroma enhancement through the use of a recombinant polygalacturonase from *Kluyveromyces marxianus*. *Food Chem* 145: 179-185.
- Feijoo-Siota L, Blasco L, Rodríguez-Rama JL, De Miguel T, Barros-Velázquez J, Sánchez-Pérez A y Villa TG.** (2014). Recent advances in microbial proteases for the dairy industry. *Recent Adv DNA and Gene Seq* 8: 44-45.

2. DESARROLLO DE MICROARRAYS Y BIOMARCADORES DE HUELLA PEPTÍDICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DIRECTA DE MICROORGANISMOS EN ALIMENTOS

En el ámbito de la proteómica, hemos tenido la oportunidad de colaborar desde el principio de nuestra existencia como grupo, con los equipos dirigidos por el Prof. José M. Gallardo en el IIM-CSIC y por el Prof. Benito Cañas en la UCM. En el ámbito de la tecnología de microarrays basados en la detección de la reacción de ligación, venimos colaborando desde hace varios años con el grupo dirigido por la Dra. Bianca Castiglioni en el IBBA-CNR (Milán, Italia) y con el Dr Stefano Morandi del grupo dirigido actualmente por la Dra Milena Brasca en el ISPA-CNR (Milán, Italia). Fruto de esta actividad ha sido la creación de una base de datos de acceso libre, Spectrabank (www.spectrabank.org o www.spectrabank.eu), que permite acceder a los perfiles MALDI-TOF de las principales especies microbianas de interés alimentaria, a sus listas de masas, etc. Dicha base de datos ha sido realizada en colaboración con la USC y el Centro de Supercomputación de Galicia, gracias a sendos proyectos financiados por el MEC y la Xunta de Galicia y representa actualmente la WEB de acceso libre más completa a nivel internacional en el ámbito de la identificación microbiana mediante MALDI-TOF.

Bibliografía seleccionada (diez publicaciones de los últimos cinco años)

- Fernández-No IC, Böhme K, Calo-Mata P, Cañas B, Gallardo JM y Barros-Velázquez J.** (2012). Isolation and characterization of *Streptococcus parauberis* from vacuum-packaged refrigerated seafood products. *Food Microbiol* 30: 91-97.
- Böhme K, Fernández-No IC, Barros-Velázquez J, Gallardo JM, Cañas B y Calo-Mata P.** (2012). SPECTRABANK: an open access tool for microorganism identification by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electrophoresis* 33: 2138-2142.
- Böhme K, Morandi S, Cremonesi P, Fernández-No IC, Barros-Velázquez J y Calo-Mata P.** (2012). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from Italian dairy products by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electrophoresis* 33: 2355-2364.
- Fernández-No I, Böhme K, Díaz-Bao M, Cepeda A, Barros-Velázquez J y Calo-Mata P.** (2013). Characterisation and profiling of *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* strains by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Food Microbiol* 33: 235-242.

- Böhme K, Fernández-No I, Pazos M, Gallardo JM, Barros-Velázquez J, Cañas B y Calo-Mata P.** (2013). Identification and classification of sea-food-borne pathogenic and spoilage bacteria: 16S rRNA sequencing vs MALDI-TOF MS fingerprinting. *Electrophoresis* 334: 877-887.
- Böhme K, Fernández-No I, Pazos M, Gallardo JM, Barros-Velázquez J, Cañas B y Calo-Mata P.** (2013). Characterization of different food-isolated *Enterococcus* strains by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electrophoresis* 34: 2240-2250.
- Böhme K, Cremonesi P, Severgnini M, Villa TG, Fernández-No I, Barros-Velázquez J, Castiglioni B y Calo-Mata P.** (2014). Detection of spoilage and pathogenic bacteria based on ligation detection reaction coupled to flow-through hybridization on membranes. *Biomed Research Int.* 2014 (DOI: 10.1155/2014/156323).
- Fernández-No I, Böhme K, Caamaño-Antelo S, Barros-Velázquez J y Calo-Mata P.** (2015). Identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the 16S rRNA gene of foodborne *Bacillus* spp. *Food Microbiol* 46: 239-245.
- Caamaño-Antelo S, Fernández-No I, Böhme K, Azat-Alnakip M, Quintela-Baluja M, Barros-Velázquez J y Calo-Mata P.** (2015). Genetic discrimination of pathogenic and spoilage *Bacillus* spp based on three housekeeping genes. *Food Microbiol* 46: 288-298.
- Calo-Mata P, Carrera M, Böhme K, Caamaño-Antelo S, Gallardo JM, Barros-Velázquez J y Cañas B.** (2015). Novel Peptide Biomarker Discovery for Detection and Identification of Bacterial Pathogens by LC-ESI-MS/MS. *J Anal Bioanal Technol* 7(1): 296. (doi:10.4172/2155-9872.1000296).

3. DESARROLLO DE MÉTODOS NATURALES DE LUCHA CONTRA MICROORGANISMOS PATÓGENOS DE RELEVANCIA EN EL ÁMBITO ALIMENTARIO.

El uso abusivo de antibióticos convencionales ha provocado la aparición de microorganismos resistentes a un amplio espectro de estos fármacos, por lo que la efectividad de terapias antibacterianas se ha visto mermada.

Por esta razón se hace necesaria la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por microorganismos multirresistentes.

Dentro de estos posibles agentes terapéuticos se encuentran los enzibióticos, enzimas líticas que emplean los virus bacteriófagos en algún momento durante su ciclo lítico. Si el concepto de enzibiótico se extiende a aquellos enzimas capaces de actuar sobre las paredes fúngicas como las actividades glucanásicas y las quitinasas producidas por hongos como *Trichoderma harzianum* o la bacteria *Bacillus circulans*, la batería terapéutica se amplía enormemente. Este grupo de investigación, ha estado trabajando en la aplicación para el tratamiento de enfermedades fúngicas de las enzimas endoglucanasa.

Esta línea de investigación ha incluido asimismo el aislamiento de microbiota ácido láctica productora de compuestos antimicrobianos, fundamentalmente bacteriocinas. Se ha descrito el aislamiento de cepas de enterococos multiproductoras de diversas enterocinas con actividad frente a patógenos humanos y de peces y que actualmente se están evaluando como ingredientes de piensos en la industria acuícola. Asimismo se ha abordado el desarrollo de bacteriocinas híbridas, por colaboración del equipo del Prof. Augusto Bellomio (Conyset, Argentina).

Las perspectivas futuras incluyen no solo la profundización en el estudio de enzibióticos y de nuevas bacterias productoras de bacteriocinas, sino también en otras fuentes de origen natural, como extractos de algas marinas, dotadas de actividad antimicrobiana.

Bibliografía seleccionada (diez publicaciones de los últimos cinco años)

- Fusté E, Galisteo GJ, Jover L, Vinuesa T, Villa TG y Viñas M.** (2012). Comparison of antibiotic susceptibility of old and current *Serratia*. *Future Microbiol* 7(6): 781-786.
- Chahad OB, El Bour M, Calo-Mata P, Boudabous A y Barros-Velázquez J.** (2012). Discovery of novel preservation agents with inhibitory effects on growth of food-borne pathogens and their applications in seafood products. *Res Microbiol* 163: 44-54.
- Chahad Bourouni O, Elbour M, Calo-Mata P, Mraouana R, Abedellatif B y Barros-Velázquez J.** (2012). Phylogenetic analysis of antimicrobial lactic acid bacteria from farmed seabass *Dicentrarchus labrax*. *Can J Microbiol* 58: 463-474.
- Veiga-Crespo P, Sanchez-Perez A y Villa TG.** (2014). Enzybiotics: The Rush Toward Prevention and Control of Multiresistant Bacteria (MRB). In: *Antimicrobial Compounds*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 215-235.
- Villa TG, Veiga-Crespo P, eds.** (2014) *Antimicrobial Compounds*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-40444-3.
- Acuña L, Corbalán N, Fernández-No I, Morero R, Barros-Velázquez J y Bellomio A.** (2015). Inhibitory effect of the hybrid bacteriocin Ent35/MCCV on the growth of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in model and food systems. *Food Bioprocess Technol* 8: 1063-1075.
- El-Jeni R, Elbour M, Calo-Mata P, Böhme K, Fernández-No I, Barros-Velázquez J y Bouhaouala-Zahar B.** (2016). In vitro probiotic profiling of novel *Enterococcus faecium* and *Leuconostoc mesenteroides* lactic acid bacteria strains from Tunisian freshwater fish. *Can J Microbiol* 62: 60-71.
- Villa TG, Feijoo-Siota L, Rama JLR, Sánchez-Pérez A y de Miguel-Bouzas T.** (2016). Enzybiotics In: *Antimicrobial Food Packaging*. Elsevier: 491-502. doi:10.1016/B978-0-12-800723-5.00040-1.
- Ageitos JM, Sánchez-Pérez A, Calo-Mata P y Villa TG.** (2016). Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *Biochem Pharmacol*. doi:10.1016/j.bcp.2016.09.018.
- Miranda JM, Ortiz J, Barros-Velázquez J y Aubourg S.** (2016). Quality enhancement of chilled fish by including alga *Bifurcaria bifurcata* extract in the icing medium. *Food Bioprocess Technol* 9: 387-395.

Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana: Microorganismos y productos microbianos bioactivos

Carmen Sieiro Vázquez



Área de Microbiología. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Universidad de Vigo. Lagoas Marcosende. 36310 Vigo.



Grupo de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana. De izquierda a derecha: Belén García Fraga, Ángeles Pichardo Gallardo, Carmen Sieiro Vázquez, Jacobo López Seijas y Abigail Fernández da Silva.

El equipo de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana está integrado en el grupo de investigación multidisciplinar de Bio-recursos que coordina la Dra. Carmen Sieiro en la Universidad de Vigo. El equipo divide su trabajo en dos grandes bloques. En primer lugar, se dedica al estudio de la biodiversidad microbiana asociada a diferentes ambientes, organismos o procesos fermentativos y, debido a ello, cuenta con colecciones de los microorganismos asociados a estos hábitats, identificados y tipificados a nivel bioquímico y molecular. En segundo lugar, a partir de estas colecciones, lleva a cabo la selección y mejora de microorganismos de interés industrial así como la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos de importancia biotecnológica y la optimización de los procesos de producción.

En concreto, el estudio de la biodiversidad microbiana asociada a las fermentaciones

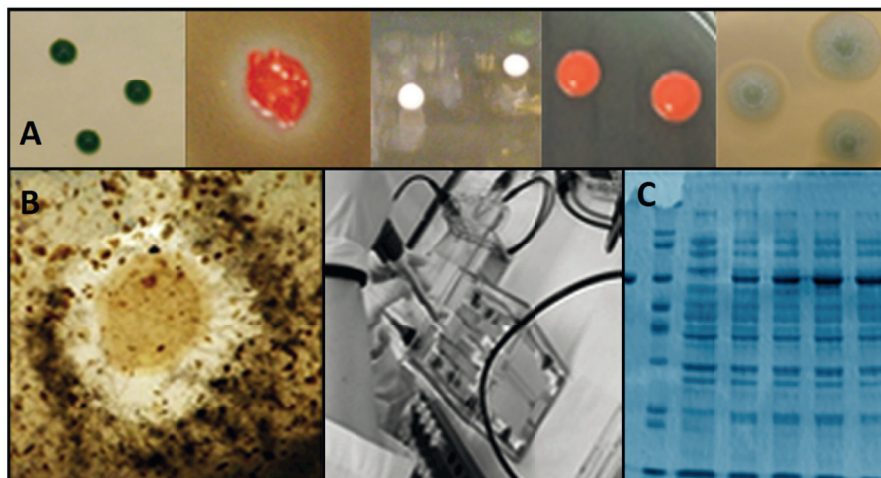
enológicas y su empleo, junto con el de las enzimas pécticas, para la mejora de la calidad de los vinos es una de las líneas de investigación desarrolladas. Estos trabajos se iniciaron con el Dr. Tomás González Villa en la Universidad de Santiago de Compostela de donde procede la investigadora principal del grupo. En colaboración con la Universidad de Santiago y con el CSIC, continuamos en esta línea estudiando el efecto de las levaduras sobre el perfil aromático y el color de los vinos de Galicia. De acuerdo con estos criterios se seleccionaron diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* para llevar a cabo fermentaciones controladas y potenciar la tipicidad regional de los productos. Por otra parte, dados los problemas que puede presentar la consecución de la fermentación maloláctica en los vinos de la variedad Albariño en esta región, se realizaron estudios sobre la diversidad de bacte-

rias ácido lácticas asociadas a los mismos encontrándose una distribución biogeográfica diferenciadora. La caracterización en base a criterios de calidad y seguridad ha permitido la selección de cepas malolácticas que pueden ser utilizadas como cultivos iniciadores adaptados para desarrollarse en las condiciones de los vinos de las zonas estudiadas.

En el marco de un proyecto más reciente, estamos empezando a estudiar la diversidad de levaduras no-*Saccharomyces* asociadas a la vid y su presencia en las primeras fases de fermentación de los vinos. Estos estudios continuarán con la caracterización de estas levaduras para ser empleadas en fermentaciones mixtas controladas, con la finalidad de potenciar y diferenciar el perfil sensorial de los vinos y de conseguir una reducción del grado alcohólico de los mismos.

Otra de las líneas de investigación en las que investiga el grupo es la búsqueda y caracterización, mediante el estudio de sus determinantes moleculares y sus propiedades bioquímicas, de nuevas enzimas de interés biotecnológico. Dentro de esta línea, una parte de nuestros trabajos se centran en las aplicaciones de las poligalacturonasas en la producción y mejora de las características organolépticas de los vinos. Estas enzimas degradan las pectinas de las paredes celulares vegetales y se usan con diferentes funciones en la industria de producción de zumos, fundamentalmente para favorecer su extracción y clarificación. En este ámbito se han clonado y caracterizado nuevos genes que codifican para enzimas pécticas en *Kluyveromyces*. La endopoligalacturonasa codificada por el gen *EPG1-2* de *K. marxianus* se mostró idónea para la clarificación del mosto de uva y los zumos de otras frutas pero, sobre todo, resultó muy eficaz para llevar a cabo la extracción de las moléculas precursoras de los aromas varietales de la uva y potenciar de forma diferenciada el perfil aromático de los vinos. En un segundo estudio se demostró la capacidad de esta enzima para extraer e intensificar el color en vinos elaborados con variedades tintas así como para enriquecerlos significativamente en compuestos beneficiosos para la salud, en concreto en polifenoles. La acción de esta endopoligalacturonasa, como enzima única, podría evitar los efectos secundarios indeseables de los preparados pécticos comerciales constituidos por mezclas de enzimas. La producción de dicha enzima fue optimizada mediante la expresión heteróloga de la misma en *Pichia pastoris*, obteniéndose cepas hiperproductoras que permiten su explotación rentable a escala industrial.

Dentro de la línea de investigación de enzimas de importancia biotecnológica, el grupo investiga también en la identificación y caracterización de microorganismos quitinolíticos procedentes, principalmente, del medio marino y pertenecientes a la microbiota asociada a organismos marinos. Las quitinasas son enzimas que hidrolizan la quitina, el segundo polímero más abundante de la naturaleza. Estas enzimas tienen gran importancia para la degradación y/o reciclado de los residuos de quitina. Además, debido a la presencia de quitina en las paredes celulares de los hongos y en la



A: Microorganismos para *screening* de metabolitos de interés industrial. B: Hidrólisis de quitina por parte de una cepa de *E. coli* que sobreexpresa una quitinasa heteróloga. C: Inducción de la expresión de la quitinasa.

cutícula de los insectos, tanto estas enzimas como sus inhibidores, pueden tener utilidad como agentes de biocontrol. En esta campo, se han identificado y clonado los genes que codifican nuevas enzimas quitinolíticas en *Bacillus halodurans*, *Lactococcus lactis*, *Pseudalteromonas tunicata* y en la arquea *Halobacterium salinarum*. Estos genes fueron analizados desde el punto de vista estructural y demostrada su funcionalidad. El análisis de las propiedades de las enzimas puso de manifiesto que tienen actividad en un diferente y amplio rango de condiciones mostrándose como enzimas robustas con una elevada estabilidad, incluso en condiciones subóptimas. Por sus características se han mostrado como enzimas de utilidad para la transformación de los residuos de quitina y sus derivados en quitooligosacáridos que pueden tener diferentes actividades biológicas. En concreto, estas moléculas con diferentes longitudes, pueden ser empleadas para la síntesis biológica de diferentes nanomateriales que hemos comprobado poseen una potente actividad antimicrobiana frente a distintos microorganismos, incluyendo cepas multirresistentes a antibióticos convencionales. Por otra parte, se estudió también la capacidad de estas enzimas para ser utilizadas como biofungicidas demostrando que, dependiendo de la enzima, tienen la capacidad para inhibir el desarrollo de hongos fitopatógenos y/o de importancia clínica. Estos estudios continúan en la actualidad evaluando su potencial como agentes de control frente a otras plagas. Otro de los

objetivos de nuestro trabajo consistió en la construcción de cepas hiperproductoras de estas enzimas mediante la sobreexpresión de los genes en *E. coli*. Además, se han establecido las condiciones para una expresión máxima mediante la optimización del uso de codones, la estabilización del mRNA, la selección del promotor más adecuado y la optimización del inductor, temperatura y tiempo de inducción.

Esta línea de investigación continúa en la actualidad con diferentes objetivos. Por un lado, teniendo en cuenta el papel que parecen tener los dominios o proteínas de unión a quitina potenciando la actividad de las quitinasas, se están iniciando estudios para aislar, producir y caracterizar estas proteínas en las bacterias quitinolíticas. Por otro, estamos empezando a estudiar también posibles inhibidores de las enzimas quitinolíticas, dada su potencial importancia como agentes para control biológico. Además, las quitinasas han sido relacionadas con ciertas enfermedades infecciosas e inflamatorias y, recientemente, propuestas como dianas terapéuticas. Por tanto, sus inhibidores pueden tener interés también como quimioterapéuticos.

BIBLIOGRAFÍA

da Silva AF, García-Fraga B, López-Seijas J y Sieiro C. (2016). Optimizing the expression of a heterologous chitinase: A study of different promoters. *Bioengineered* 8: 1-5.

- García-Fraga B, da Silva AF, López-Seijas J y Sieiro C.** (2015). Optimized expression conditions for enhancing production of two recombinant chitinolytic enzymes from different prokaryote domains. *Bioprocess Biosyst Eng* 38: 2477-2486.
- García-Fraga B, da Silva AF, López-Seijas J y Sieiro C.** 2015. A novel family 19 chitinase from the marine-derived *Pseudoalteromonas tunicata* CCUG 44952T with antifungal activity. *Biochem Eng J* 93: 84-93.
- Rodríguez-Argüelles MC, González-Ballesteros N, Rodríguez-Domínguez G, Campanini N, Nasi L, Vázquez I y Sieiro C.** (2015). Broad-spectrum antimicrobial activity of silver nanoparticles in different types of chitosan matrices. *Chem J* 1: 165-171.
- da Silva AF, García-Fraga B, López-Seijas J y Sieiro C.** (2014). Characterization and optimization of heterologous expression in *Escherichia coli* of the chitinase encoded by the *chiA* gene of *Bacillus halodurans* C-125. *Process Biochem* 49: 1622-1629.
- Sieiro C, Villa TG, da Silva AF, García-Fraga B y Vilanova M.** (2014). Albariño wine aroma enhancement through the use of a recombinant polygalacturonase from *Kluyveromyces marxianus*. *Food Chem* 145:179-185.
- García-Fraga B, da Silva AF, López-Seijas J y Sieiro C.** (2014). Functional expression and characterization of a chitinase from the marine archaeon *Halobacterium salinarum* CECT 395 in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 2133-2143.
- Ladeira A, Sieiro C y Álvarez M.** (2013). Change in the food ingestion induces rapid shifts in the diversity of microbiota associated with cutaneous mucus of Atlantic salmon *Salmo salar*. *J Fish Biol* 82: 893-906.
- Sieiro C, García-Fraga B, López-Seijas J, da Silva AF y Villa TG.** (2012). Microbial pectic enzymes in the food and wine industry. In: *The Food Industrial Processes-Methods and Equipment*. InTech pp 201-218.
- Rodríguez-Argüelles MC, Sieiro C, Cao R y Nasi L.** (2011). Chitosan and silver nanoparticles as pudding with raisins with antimicrobial activity. *J Colloid Interf Sci* 363: 80-84.
- Sieiro C, Sestelo ABF y Villa TG.** (2009). Cloning, characterization and functional analysis of the *EPG1-2* gene: a new allele coding for an endopolygalacturonase in *Kluyveromyces marxianus*. *J Agr Food Chem* 57: 8921-8926.
- Vilanova M, Zamuz S, Vilarinho F y Sieiro C.** (2007). Effect of terroir on the volatiles of *Vitis vinifera* cv. Albariño. *J Sci Food Agr* 87: 1252-1256.
- Vilanova M y Sieiro C.** (2006). Contribution by *Saccharomyces cerevisiae* yeasts to fermentative flavour compounds in wines from cv. Albariño. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33: 929-933.

NUESTRA CIENCIA

MÁS ALLÁ DE LA CONJUGACIÓN. NUEVOS MECANISMOS DE TRANSFERENCIA HORIZONTAL GÉNICA

Informa: José Berenguer

Los nichos termófilos albergan microorganismos con una plasticidad génica extraordinaria, consecuencia de un intenso flujo horizontal de material genético entre poblaciones. En las bacterias, estos intercambios de información génica pueden ocurrir, además de por los mecanismos clásicos que aparecen en todos los libros de Microbiología (conjugación, transformación y transducción), por estrategias alternativas de más reciente descripción tales como nanotubos, agentes de transferencia génica (GTA) o vesículas de membrana, que protegen DNA durante la transferencia. Recientemente, hemos identificado en *Thermus thermophilus*, una bacteria termófila de origen antiguo empleada como modelo de laboratorio, un nuevo sistema de transferencia al que hemos denominado "Transjugación" por compartir propiedades de la conjugación y la transformación clásicas (Alba Blesa y cols. **PLoS Genet.** 2017 Mar 10;13(3):e1006669. doi: 10.1371/journal.pgen.1006669.). Como en la conjugación, este sistema permite la transferencia de grandes fragmentos de DNA por contacto entre una célula donadora y una célula receptora. Sin embargo, el mecanismo de transferencia presenta grandes diferencias con la conjugación clásica, tales como el no requerir de un sistema de transferencia derivado de los sistemas de secreción tipo 4, el no disponer de un sistema de reconocimiento de un origen de transferencia específico, sino iniciar la transferencia de forma simultánea desde múltiples sitios en el genoma, y el de ser bidireccional, de forma que ambas bacterias en el proceso son a la vez donadoras y receptoras de DNA. Más aún, la transjugación depende de la actividad de la maquinaria de competencia natural de la bacteria que actúa como receptora, de manera que el mecanismo implica una transferencia en dos pasos (*push-pull*) llevados a cabo en ambas direcciones por maquinarias independientes. En el artículo mencionado de Plos Genetics, se identifica además una translocasa de DNA codificada en un nuevo tipo de elemento conjugativo e integrativo (ICEth1), como componente fundamental del mecanismo de donación del DNA. La transferencia de este ICETH1 a otra cepa de *T. thermophilus* originalmente carente de él confiere a la receptora la capacidad para actuar de donador en transjugación.

El análisis de este nuevo proceso de transferencia horizontal, que muestra tasas de eficiencia mayores que las de transformación, sugiere que es la transjugación el motor principal de intercambio génico en las poblaciones de *Thermus*, corroborando el dinamismo en transferencias laterales de DNA en ambientes termófilos.

Blesa A, Baquedano I, Quintáns NG, Mata CP, Castón JR, Berenguer J. **PLoS Genet.** 2017 Mar 10;13(3):e1006669. doi: 10.1371/journal.pgen.1006669. eCollection 2017. The transjugation machinery of *Thermus thermophilus*: Identification of TdtA, an ATPase involved in DNA donation.