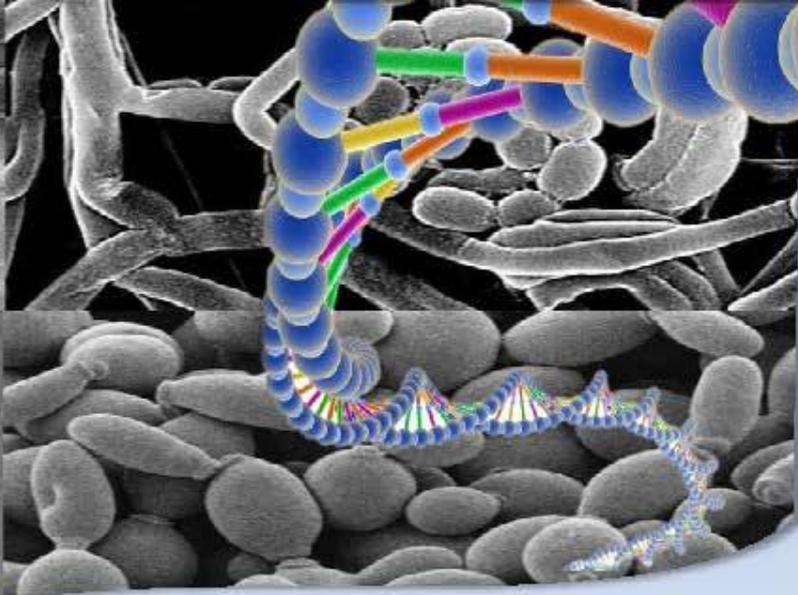


CMIBM 16 - LEÓN



SEM BIOTEC
CETOIB



Libro de resúmenes VI congreso de microbiología industrial y biotecnología microbiana

12, 13 Y 14 DE SEPTIEMBRE
LEÓN 2016



universidad
de león

CMIBM'2016



RESÚMENES DEL CONGRESO DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL Y BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA

León, 12, 13 y 14 de septiembre de 2016

*Organizado por el Grupo Especializado de
Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana
de la Sociedad Española de Microbiología (SEM) y
la Universidad de León*



COMITÉ ORGANIZADOR

Jesús Aparicio

Francisco J. Casqueiro

José M. Castro

José A. Gil

Santiago Gutiérrez

Luís M. Mateos

Juan J. Rubio Coque

COMITÉ CIENTÍFICO

Francisco Javier Pastor. *Presidente del Grupo de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana. Universidad de Barcelona.*

Tomás G. Villa. *Ex-Presidente del Grupo de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana. Universidad de Santiago de Compostela.*

María Enriqueta Arias. *Vice-Presidenta del Grupo de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana. Universidad de Alcalá de Henares.*

Jose Luis Barredo. *Vocal del Grupo de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana. Grupo Gadea-Biopharma. León.*

Jesús Manuel Cantoral. *Vocal del Grupo de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana. Universidad de Cádiz.*

Margarita Orejas. *Vocal del Grupo de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana. IATA. Valencia.*

Antonio Sánchez Amat. *Vocal del Grupo de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana. Universidad de Murcia.*

Carmen Méndez. *Secretaria/Tesorera del Grupo de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana. Universidad de Oviedo.*

ENTIDADES COLABORADORAS

Universidad de León

Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales

Sociedad Española de Microbiología

Fundación Carolina Rodríguez

Ayuntamiento de León

Diputación de León

Nuevo Recreo Industrial

mAbxience

Fisher Scientific

Asensio Biotécnica

Biomar

Gadea

León Research

Prosisa

Pearson

PRESENTACIÓN.....	5
PROGRAMA.....	6
Lunes 12 de septiembre	6
Martes 13 de septiembre de 2016.....	7
Miércoles 14 de septiembre de 2016.....	9
CONFERENCIA INAUGURAL.....	10
CONFERENCIA DE CLAUSURA.....	12
SESIÓN I.....	14
SESIÓN II.....	19
SESIÓN III.....	23
SESIÓN IV	29
SESIÓN V	35
SESIÓN VI	41
SESIÓN VII	46
COMUNICACIONES POSTER	51
ÍNDICE DE AUTORES	98
ENTIDADES COLABORADORAS.....	100

PRESENTACIÓN

Queridos amigos, como presidente del comité organizador, os doy la más calurosa bienvenida al VI Congreso de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana.

En la última reunión del Congreso (CMIBM'14) celebrado en la Universidad de Oviedo, se nos encargó la organización del CMIBM'16 en la Universidad de León y aceptamos encantados e ilusionados. Hemos de decir que no ha sido una tarea fácil debido principalmente a la grave situación económica del país y del elevado número de congresos de temáticas afines. A pesar de todo, estamos aquí con un programa repleto de buenos trabajos, excelentes investigadores nacionales y extranjeros, y prometedores investigadores del futuro.

Curiosamente, este Congreso tiene lugar 30 años después de la Primera Reunión Nacional de Biotecnología, que fue el germen de la Sociedad Española de Biotecnología, y quizás del esplendor de la Biotecnología Española. En aquellos momentos se preconizaba: “queremos que esta Reunión sea la primera piedra sobre la que se construya el desarrollo de la Biotecnología en España”. En aquellos años, tan lejanos para muchos, algunos de nuestros conferenciantes invitados presentaron comunicaciones sobre “obtención de maxicélulas en *Escherichia coli*” (Olga Genilloud), “autolisinas de *Streptococcus pneumoniae*” (José Luís García), “genética molecular de *Penicillium chrysogenum*” (Daniel Ramón), “transformación de *Streptomyces clavuligerus*” (Jesús Cortés), “clonación de genes implicados en la producción de penicilina” (Bruno Diez o José Manuel Cantoral) o “clonación de genes de biosíntesis de aminoácidos” (Luís M. Mateos o Ramón I. Santamaría).

Queremos expresar nuestro agradecimiento a todos los conferenciantes invitados, nacionales y extranjeros, que conociendo las dificultades económicas que supone la realización de estos Congresos han asumido sus gastos de asistencia al Congreso. Muchas gracias por venir a León. Igualmente, nuestro agradecimiento a todos los asistentes por su esfuerzo económico y por la presentación de sus excelentes trabajos de investigación.

Gracias también a cuantas instituciones y entidades nacionales y locales han colaborado en el desarrollo de este Congreso, y en particular a la Universidad de León que desde el primer momento nos brindó su apoyo y su colaboración. De forma especial, nuestro agradecimiento a todos los miembros del Área de Microbiología de la Universidad de León que durante los últimos meses no han reparado en esfuerzos y generosidad para la organización del Congreso. Los que tienen experiencia en este tipo de actividades saben cuanta dedicación conlleva la puesta en marcha de un Congreso, por ello les pedimos que sepan disculpar las posibles deficiencias.

Nuestra aspiración ha sido que todos os sintáis a gusto entre nosotros y que disfrutéis en León de todo lo que de valor científico, cultural y social aquí se encierra.

Prof. José A. Gil
Presidente del Comité Organizador

PROGRAMA

Lunes 12 de septiembre

15:00 h. **Entrega de documentación** (Sala de Juntas, Facultad de Biología).

16:00 h. **Acto de Apertura** (Aula Magna, Facultad de Biología).

16:30 h. **Conferencia inaugural:** Prof. Masayuki Inui. Production of biofuels and green chemicals from non-food biomass by a growth-arrested bioprocess”

17:30 h. **Sesión Científica I. Biotecnología Ambiental.** Coordinadores: Luís M. Mateos y Antonio Sánchez Amat. *Sesión patrocinada por [Pearson](#).*

- Antonio Sánchez Amat. Proteínas antimicrobianas con actividad aminoácido oxidasa en bacterias marinas
- Silvia Marqués Martín. Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en condiciones de limitación de oxígeno
- Luís M. Mateos. Biorremediación de metales: el sistema arsénico-*Corynebacterium*
- Presentación oral de póster
 - Rubén Moreno. Integración de la digestión anaerobia y procesos bioelectroquímicos: Impacto sobre las condiciones de operación.

19:30 h. **Sesión de Posters I** (Poster 01 a 19) (Sala de exposiciones de la Facultad)

20:30 h. **Cocktail de bienvenida** (*Palacio de Torreblanca, Plaza de San Marcelo, 18. León*).

Martes 13 de septiembre de 2016

09:00 h. **Sesión Científica II. Bioenergía y Combustibles.** Coordinadores: Juan José Rubio Coque y Bruno Díez García.

- Bruno Díez García. Cócteles celulolíticos de alto rendimiento para la producción de biocombustibles
- Francisco Javier Ruíz Dueñas. Peroxidasas fúngicas de alto potencial redox: herramientas claves para las nuevas biorrefinerías de la lignocelulosa
- Mercedes Ballesteros Perdices. Bioenergía a partir de microalgas

11:00 h. Café y Sesiones de Posters (Poster 01 a 19) (Sala de exposiciones de la Facultad).

11:30 h. **Sesión Científica III. Biotecnología Farmacéutica.** Coordinadores: Jesús Aparicio y Jesús Cortés. *Sesión patrocinada por [mAbxience](#).*

- Jesús Cortés. Desarrollo de fármacos obtenidos por biosíntesis combinatoria
- Olga Genilloud. Diversidad química y productos naturales: continúa la búsqueda de nuevos fármacos
- Ramón Santamaría. Nuevos reguladores de la producción de antibióticos en *Streptomyces*
- Presentaciones orales de pósteres:
 - Igor Martínez. A collection of KstDs for à la carte $\Delta 1$ -dehydrogenation of steroids in *Mycobacterium smegmatis* mc² 155.
 - Suhui Ye. Identificación mediante minería genómica y caracterización de la agrupación de genes de biosíntesis de una nueva familia de compuestos alcaloides en *Streptomyces argillaceus*

14:00 h. Comida (Cafetería Central)

16:00 h. **Sesión Científica IV. Biotecnología Agrícola.** Coordinadores: Santiago Gutiérrez y Enrique Monte. *Sesión patrocinada por [Biomar](#).*

- Jesús Manuel Cantoral Fernández. Aportaciones biotecnológicas de la Microbiología para una Enología moderna
- Jesús Mercado Blanco. Tres en uno: endofitismo, control biológico y promoción del crecimiento vegetal por *Pseudomonas fluorescens*
- Antonio Molina Fernández. Plant Innate Immunity and resistance to pathogens: from the bench to the field

- Presentaciones orales de pósteres:
 - Carlos Nicolás. Producción de giberelinas por el hongo beneficioso *Trichoderma harzianum*. Posibles efectos fisiológicos en plantas
 - José Manuel Álvarez. Empleo de actinomicetos como agentes de biocontrol en enfermedades de madera de vid

18:00 h. Café y Sesiones de Posters (Posters 20-46) (Sala de exposiciones de la Facultad).

18:30 h. **Sesión Científica V. Biotecnología de Alimentos**. Coordinadores: José M. Castro y Margarita Orejas. *Sesión patrocinada por [LeonResearch](#)*.

- Margarita Orejas. Regulación de la utilización de biomasa vegetal en *Aspergillus nidulans*
- Baltasar Mayo. Cultivos lácteos funcionales: origen y aplicaciones
- Ana Cristina Freitas. Functional foods incorporating marine-derived ingredients
- Presentaciones orales de jóvenes investigadores:
 - María Santos. Production of α -linolenic acid in a genetically engineered versión of *Synechococcus elongatus* PCC 7942
 - M^a Ángeles Morcillo. Producción melatonina por levaduras *Saccharomyces* y no *Saccharomyces*

21:30 h. **Cena del Congreso** (Hospedería San Isidoro).

Miércoles 14 de septiembre de 2016

09:00 h. **Sesión Científica VI. Biotecnología Enzimática.** Coordinadores: José A. Gil y Enriqueta Arias

- Javier Pastor. Diversidad de Xilanasas. Aplicaciones para la Valorización de la Biomasa
- José Manuel Ageitos. Chemo-enzymatic synthesis of functional cationic peptides: Evaluation as gene delivery carriers
- Presentaciones orales de jóvenes investigadores:
 - Iván Ayuso. Peroxidasas del Jurásico como nuevos biocatalizadores
 - Susana V. Valenzuela. Búsqueda de nuevas monooxigenasas líticas de polisacáridos. Evaluación en la degradación de material lignocelulósico

10:30 h. Café y Sesiones de Posters (Posters 20-46) (Sala de exposiciones de la Facultad).

11:30 h. **Sesión Científica VII. Biotecnología Molecular.** Coordinadores: Javier Casqueiro y Daniel Ramón. *Sesión patrocinada por Gadea.*

- Daniel Ramón. El futuro de la biotecnología molecular microbiana: Pasteur tenía razón
- José Luís García. Un nuevo chasis para la producción de esteroides
- Presentaciones orales de pósteres:
 - Rubén Álvarez. "Genome mining" de actinomicetos: activación de agrupaciones crípticas en *Streptomyces* para la producción de nuevos compuestos bioactivos
 - Antonio de Pedro. Control de la expresión de múltiples agrupaciones génicas por un único regulador transcripcional PAS-LuxR

13:00 h. **Conferencia de clausura:** Prof. Gilles van Wezel. *Streptomyces*: the beauty of the beast

13:50 h. Acto de clausura.

14:00 h. Comida.

TARDE

Visitas a empresas biotecnológicas (Gadea, mAbxience)

Excursión a la Cueva de Valporquero



CONFERENCIA INAUGURAL

Production of biofuels and green chemicals from non-food biomass by a growth-arrested bioprocess

Masayuki Inui^{1, 2, 3)}

1) Group Leader, Chief Researcher, Research Institute of Innovative Technology for the Earth.

2) Director, General Manager, Green Phenol Development Co.,Ltd

3) Visiting Professor, Nara Institute of Science and Technology

9-2, Kizugawadai, Kizugawa, Kyoto 619-0292 Japan. inui@rite.or.jp

“Biorefining” is defined as the sustainable processing of biomass into a spectrum of bio-based products and bioenergy. Over the past several years, the biorefinery concept attracts rising attention as a key strategy to transform a petroleum-based society to one based on sustainable resources. Cellulosic non-food biomass, which is the most abundant renewable biomass on earth, is one of the most promising alternatives for petroleum. With the current technologies, however, saccharification of cellulosic biomass generates complex mixtures of C6 & C5 sugars, which are not amenable to conventional bioprocesses. Fermentation inhibitors present in cellulosic hydrolysates create another hurdle for utilization of this resource. RITE has developed an efficient biomass utilization technology based on an inherent feature of the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*, namely, it retains major metabolic pathways active while its growth is arrested under anaerobic conditions. "RITE Bioprocess", the growth-arrested bioprocess we developed proceeds without microbial cell growth, achieving higher efficiency and productivity compared to conventional fermentative processes, in which formation of products and biomass inevitably occurs in parallel. Metabolic engineering enabled our microbial catalyst to utilize C6 & C5 sugars simultaneously, and, moreover, we found that *C. glutamicum* is highly tolerant to fermentation inhibitors included in cellulosic hydrolysates such as furans, demonstrating that RITE Bioprocess is compatible with cellulosic non-food biomass. Using the technology, we have succeeded in producing ethanol, lactic acids, and various amino acids with remarkably high yields, and gained global recognition for our achievement. We are currently applying the technology to microbial production of biofuels and aromatic green chemicals like phenol.



CONFERENCIA DE CLAUSURA

Streptomyces: the Beauty of the Beast

Gilles P. van Wezel

Microbial Biotechnology, Leiden University, Sylviusweg 72, 2333BE Leiden, Netherlands; Microbial Ecology, Netherlands Institute of Ecology (NIOO-KNAW), Droevendaalsesteeg 10, Wageningen, Netherlands. Email: g.wezel@biology.leidenuniv.nl

Central in this talk is *Streptomyces*, a filamentous soil bacterium with a complex life cycle that reproduced via sporulation. Streptomycetes and other members of the actinomycetes produce some two thirds of all known antibiotics and a range of other natural products and enzymes. The beauty lies in the organism itself, with its wonderful development, and in the often-colourful natural products it produces. The treasures that lie hidden in the actinomycete genomes may well be our final resource in the fight against the rapidly emerging multi-drug resistant pathogens.

In this talk, I will first focus on some novel insights we have obtained in the amazing biology of the multicellular Streptomycetes. We applied advanced imaging techniques such as cryo-electron tomography and correlative microscopy to elucidate a novel mode of cell division in the long multinucleoid vegetative hyphae ¹. This mode of cell division is based on the formation of intricate membrane assemblies instead of the typical peptidoglycan-based septa. These structures, which serve to compartmentalize the hyphae and also to protect the nucleoids from damage during division, were dubbed cross-membranes.

Next, I will highlight some of the work we have done to identify novel antibiotics. Sequencing of actinomycete genomes revealed that their producing capacity has been grossly underestimated ². Many of the biosynthetic gene clusters are poorly expressed under routine laboratory conditions ³. We have set up a novel drug-discovery pipeline, whereby we harness the microbial biodiversity in combination with approaches to activate sleeping antibiotics and advanced metabolomics to identify novel antimicrobials. Where BigPharma has routinely screened bacteria in isolation, in nature bacteria live in complex communities with other microbes, protozoa and plants, and these often-competitive interactions may well elicit specific responses involving the production of natural products. Application of chemical ecology approaches identified several new antibiotics, including a class of compounds with new chemical scaffold. The challenges and solutions to find new antimicrobial drugs will be discussed.

References

- 1 Celler, K., Koning, R. I., Willemse, J., Koster, A. J. & van Wezel, G. P. Cross-membranes orchestrate compartmentalization and morphogenesis in *Streptomyces*. *Nat Comm*, in press (2016).
- 2 Nett, M., Ikeda, H. & Moore, B. S. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Nat Prod Rep* **26**, 1362-1384, doi:10.1039/b817069j (2009).
- 3 Zhu, H., Sandiford, S. K. & van Wezel, G. P. Triggers and cues that activate antibiotic production by actinomycetes. *J Ind Microbiol Biotechnol* **41**, 371-386, doi:10.1007/s10295-013-1309-z (2014).



SESIÓN I

BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

SESIÓN PATROCINADA POR:



Propiedades antimicrobianas de aminoácido oxidasas con cofactor quinónico sintetizadas por bacterias marinas.

Jonatan C. Campillo-Brocal, Aída Carrasco, Patricia Lucas-Elio, Antonio Sánchez-Amat*

Departamento de Genética y Microbiología, Facultad de Biología, Campus de Espinardo, Murcia 30100.
antonio@um.es

Las aminoácido oxidasas (AOs) pueden ser definidas de forma genérica como enzimas que oxidan aminoácidos generando la cetona o aldehído correspondiente y liberando amonio y peróxido de hidrógeno, lo que les confiere actividad antimicrobiana. Además de su relevancia fisiológica, estas enzimas pueden ser de interés en procesos biotecnológicos diversos, como puede ser su uso como biosensores. Existen diferentes tipos de AOs. Según el isómero que oxidan se pueden distinguir las L-aminoácido oxidasas (LAOS, EC 1.4.3.2) o D-aminoácido oxidasas (DAOS, EC1.4.3.3). Otro grupo está constituido por las glicinas oxidasas (GOX, EC 1.4.3.19), con un sustrato aquiral. Todas las enzimas anteriores se caracterizan por poseer FAD como cofactor. Recientemente se ha descrito una nueva familia de aminoácido oxidasas que no son flavoproteínas ya que poseen un cofactor quinónico que se genera mediante modificación post-traducciona de residuos de la propia proteína. Los dos primeros ejemplos descritos de estas enzimas son sintetizados por la bacteria marina *Marinomonas mediterranea*. LodA (EC 1.4.3.20) es una lisina oxidasa que oxida L-lisina en posición épsilon, a diferencia de las LAOs que oxidan este aminoácido en posición alfa (Gomez et al., 2006). GoxA es similar en secuencia a LodA, pero oxida glicina (Campillo-Brocal et al., 2013). El análisis de genomas microbianos ha permitido la detección de genes que codifican proteínas similares a LodA en aproximadamente el 1% de los genomas secuenciados, donde aparecen anotados como codificantes de proteínas hipotéticas. Son particularmente abundantes en microorganismos que interactúan con plantas (Campillo-Brocal et al., 2015). El análisis filogenético de estas proteínas indica la presencia de diversos grupos. LodA y GoxA están en diferentes grupos, mientras que hay otros grupos en los que no hay ninguna proteína cuya actividad haya sido caracterizada. Estas observaciones sugieren que estas proteínas pueden constituir un reservorio de novedosas actividades de potencial interés biotecnológico. Por otra parte, estas enzimas pueden participar en la interacción de los microorganismos productores con su medio ambiente. En el caso de LodA se ha demostrado que puede participar en el desarrollo de biopelículas. La muerte celular provocada por el peróxido de hidrógeno liberado causa la liberación de células supervivientes y la colonización de nuevos ambientes (Mai-Prochnow et al., 2008). El estudio comparativo de LodA y GoxA ha revelado que, pese a que ambas enzimas liberan cantidades equimoleculares de peróxido de hidrógeno respecto al sustrato oxidado, LodA tiene una mayor capacidad antimicrobiana que GoxA. Los resultados obtenidos sugieren que la actividad antimicrobiana de LodA puede ser debida a los intermediarios liberados durante la oxidación de la lisina.

Referencias

- Campillo-Brocal, J. C., M. D. Chacon-Verdu, P. Lucas-Elio, and A. Sanchez-Amat, 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, v. 16, p. 231. DOI: 10.1186/s12864-015-1455-y.
- Campillo-Brocal, J. C., P. Lucas-Elio, and A. Sanchez-Amat, 2013, Identification in *Marinomonas mediterranea* of a novel quinoprotein with glycine oxidase activity: MicrobiologyOpen, v. 2, p. 684-694.
- Gomez, D., P. Lucas-Elio, A. Sanchez-Amat, and F. Solano, 2006, A novel type of lysine oxidase: L-lysine-epsilon-oxidase: Biochim.Biophys.Acta, v. 1764, p. 1577-1585.
- Mai-Prochnow, A., P. Lucas-Elio, S. Egan, T. Thomas, J. S. Webb, A. Sanchez-Amat, and S. Kjelleberg, 2008, Hydrogen peroxide linked to lysine oxidase activity facilitates biofilm differentiation and dispersal in several gram-negative bacteria: J Bacteriol, v. 190, p. 5493-501.



Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en condiciones de limitación de oxígeno

Silvia Marqués*, Sophie Marie Martirani von Abercron, Patricia Marín, Marta Solsona y Mayra Castañeda

Grupo de Microbiología Ambiental y Biodegradación. Estación Experimental del Zaidín, CSIC. C/. Profesor Albareda nº1, 18008-Granada. silvia@eez.csic.es

Muchos compuestos aromáticos tóxicos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) se liberan al medio ambiente ya sea de forma natural o como consecuencia de vertidos accidentales. Las bacterias han desarrollado una extraordinaria capacidad adaptativa para degradar compuestos de esta naturaleza, convirtiéndolos en CO₂ y agua, por lo que la biorremediación mediada por bacterias se considera una técnica destacable de recuperación de sitios contaminados, por su bajo coste y bajo impacto ambiental. Actualmente esta tecnología se basa en la actividad de biodegradación de aromáticos de bacterias aerobias, muy bien caracterizada. Sin embargo, el oxígeno no siempre está presente en las zonas contaminadas, ya sea por la naturaleza de estos sitios o porque se consume rápidamente por la actividad inicial de las bacterias aerobias, creando situaciones de anoxia o microaerobiosis¹. En esas condiciones, es necesario considerar aproximaciones basadas en la actividad de bacterias especializadas activas a bajas concentraciones de oxígeno o en ausencia de él.

Con la idea de identificar bacterias capaces de llevar a cabo la degradación de PAHs en condiciones de baja tensión de oxígeno o de anoxia, iniciamos cultivos de enriquecimiento a partir de muestras de suelo y sedimento donde se había detectado una presencia importante de comunidades nitratorreductoras degradadoras de PAHs. El análisis molecular de los cultivos de enriquecimiento reveló que en muchos casos, la presencia de PAHs enriquecía los cultivos en grupos de bacterias no cultivadas o poco caracterizadas, y no fue posible obtener aislados puros capaces de degradar estos compuestos en condiciones nitratorreductoras. Cabe destacar que hasta la fecha sólo en un caso se ha obtenido un cultivo puro anaerobio capaz de degradar naftaleno, que utiliza sulfato como aceptor último de electrones². Nuestros resultados sugieren que la degradación de PAHs en condiciones de nitratorreducción es un proceso complejo que probablemente requiera la contribución de varios grupos bacterianos y unas condiciones de crecimiento aún no establecidas.

En condiciones de microaerobiosis, en enriquecimientos a partir de muestras de acuífero contaminado con petróleo, se observó un crecimiento neto en forma de una biopelícula estructurada alrededor de cristales de naftaleno. La caracterización molecular de la biopelícula a lo largo del enriquecimiento mostró que partiendo de una comunidad inicial dominada por *Betaproteobacterias* (79% *Rhodofera*, 6% *Azovibrio*) se seleccionaron dos grupos co-dominantes que llegaron a constituir el 97% de la comunidad tras múltiples pases de enriquecimiento: una *Betaproteobacteria* (*Variovorax*, 54%) y una *Alfaproteobacteria* (*Xanthobacteraceae*, 43%). A partir de los enriquecimientos pudimos aislar las dos cepas mayoritarias, ambas capaces de crecer con naftaleno como fuente de carbono, y filogenéticamente relacionadas con *Variovorax ginsengisoli* y *Starkeya novella*. El análisis posterior nos permitió demostrar que *S. novella* era la cepa responsable de la formación de la biopelícula y la principal implicada en la degradación de naftaleno a través de una naftaleno dioxigenasa homóloga a enzimas activas a muy bajas tensiones de oxígeno³. Esta cepa y la formación de la biopelícula se han caracterizado en detalle.

¹ Rivett MO, Buss SR, Morgan P, Smith JW, Bemment CD. 2008. *Water Res* **42**:4215-32

² DiDonato RJ, Jr., Young ND, Butler JE, Chin KJ, Hixson KK, Mouser P, Lipton MS, DeBoy R, Methe BA. 2010. *PLoS ONE* **5**:e14072.

³ Hirano S, Haruki M, Takano K, Imanaka T, Morikawa M, Kanaya S. 2006. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69**:672-681

Biorremediación de metales pesados: el sistema As-*Corynebacterium*

Luis M. Mateos*, Almudena F. Villadangos, Alfonso Gonzalo, Laura Marcos, Álvaro Mourenza y José A. Gil.

Area Microbiología, Dpt. Biología Molecular. Fac. de Biología-Ambientales. Campus de Vegazana s/n. Universidad de León. 24071-LEON. * luis.mateos@unileon.es

Los microorganismos ocupan nichos ecológicos bien establecidos de acuerdo a sus características fisiológicas y metabólicas. En estos ambientes coexisten nutrientes esenciales y otros compuestos tóxicos no nutrientes; entre estos últimos se encuentran la mayoría de los metales pesados. Algunos de estos metales son usados por los sistemas vivos en cantidades mínimas (cobre, níquel, cinc), pero otros resultan muy tóxicos para las células incluso en cantidades ínfimas (cadmio, mercurio, arsénico, etc.). El arsénico (As) es considerado el elemento más tóxico según el listado de sustancias peligrosas de la ATSDR⁽¹⁾. Este puesto lo ocupa desde hace décadas y se calcula en relación con la peligrosidad y su presencia en el ambiente; el arsénico esta presente en minerales/rocas y principalmente en arsenopiritas asociadas a granito. La movilización de estas rocas por extracciones de minería y la aplicación del arsénico en determinados procesos como aleaciones, antifúngicos, pinturas, etc., hace que el As esté presente como contaminante en numerosos ambientes. Las células que ocupan esos ambientes suelen tener sistemas moleculares para desintoxicarse de As debido a que en su forma oxidada se encuentra como arseniato (As^V ; AsO_4^{3-}), mientras que en ambientes reductores, el As se encuentra como arsenito (As^{III} ; AsO_2^-).

Los sistemas de desintoxicación celular se basan normalmente en la presencia de operones *ars* que suelen codificar para: una proteína reguladora (ArsR), una permeasa de arsenito (ArsB/Acr3) y una enzima arseniato reductasa (ArsC/Acr2). En ausencia del inductor (normalmente arsenito) el operón *ars* no se expresa, pero en su presencia el arsenito interacciona con cisteínas (grupos tiol, -SH) de ArsR y desreprimen el sistema, permitiendo la expresión de los genes del operón⁽²⁾. La enzima ArsC provoca una reducción de arseniato a arsenito, siendo luego el arsenito liberado fuera de las células por la permeasa ArsB/Acr3. Las corinebacterias al ser microorganismos ubicuos suelen estar en ambientes contaminados por sustancias químicas (entre otras) y han desarrollado sistemas eficientes de resistentes a arsénico por incremento del número de operones *ars*.

Por técnicas de biología molecular se han conseguido diseñar cepas de *Corynebacterium glutamicum* que carecen de diferentes sistemas moleculares de desintoxicación, convirtiéndolas en “contenedores” de diferentes especies de arsénico (bien arsenito o arseniato), en función de los mutantes generados; de esta forma se pudo alcanzar una acumulación de As 50-100 veces superior a la obtenida para la cepa silvestre⁽³⁾. Fruto de los análisis realizados se ha identificado una nueva actividad enzimática ligada a las arseniato reductasas de *C. glutamicum* (y de otras actinobacterias), las cuales utilizan un mecanismo de acción para el proceso de reducción de As^V a As^{III} basado en el sistema antioxidante micotiol(MSH)/micorreductinas(Mrx)⁽⁴⁾. Este sistema sustituye al sistema glutatión/glutarreductinas de bacterias Gram-negativas y de la mayoría de los organismos eucariotas, jugando un papel muy relevante en la defensa de estos organismos frente a situaciones de estrés oxidativo como el causado por un gran número de metales pesados.

(1) <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/>; (2) Ordóñez et al. 2008. J Biol Chem. 283:25706-14; (3) Villadangos et al. 2014. Appl Microbiol Biotechnol. 98:10143-52; (4) Ordóñez et al. 2009. J Biol Chem. 284:15107-16.

El trabajo ha sido financiado por la Junta de Castilla y León con ref. LE326U14 y Fondo Social Europeo y sistema nacional garantía juvenil de Junta de Castilla y León (L Marcos; ULE16) y del MINECO (A, Mourenza, PEJ-2014-P-00528).

Integración de digestión anaerobia y procesos bioelectroquímicos: impacto sobre las condiciones de operación

R. Moreno*, A. Escapa, E. J. Martínez, X. Gómez

Grupo de Ingeniería Química, Ambiental y Bioprocesos. Instituto de Recursos Naturales (IRENA), Universidad de León. Avda. De Portugal 41, León 24009, España. rmorg@unileon.es

La digestión anaerobia (DA) es la opción preferida para el tratamiento de lodos en las estaciones de tratamiento de aguas residuales (EDAR). Sin embargo, este proceso es propenso a sufrir inhibición como resultado de una acidificación excesiva en los casos en que materiales fácilmente degradables se usan como cosustratos. Las diferentes tasas de degradación de los cosustratos pueden provocar la acumulación de ácidos grasos volátiles (AGV), con la consiguiente inhibición del sistema de digestión anaerobia. Los sistemas bioelectroquímicos (por ejemplo las celdas de electrólisis biocatalítica, MECs) son una tecnología con un gran potencial para la recuperación de la energía contenida en los sustratos ricos en carbohidratos. En este estudio se llevó a cabo la evaluación del comportamiento de un reactor de DA en el que se habían integrado electrodos tipo MEC. El reactor funcionó en modo batch y con una alta concentración de glucosa como sustrato, con el objetivo de caracterizar la capacidad del reactor DA-MEC para disminuir la acumulación de AGV. Los resultados revelaron una mayor producción de CH₄ en las primeras etapas del experimento en el reactor DA-MEC en comparación con el control (reactor de DA convencional). Además, las concentraciones de AGV se redujeron significativamente gracias a la presencia de los electrodos MEC. Estos resultados subrayan los beneficios potenciales de la integración de ambas tecnologías como medio para mejorar el proceso de tratamiento y la obtención de energía a partir de residuos.

Esta investigación ha sido financiada por la Junta de Castilla y León (Proyecto LE182U14). R. Moreno recibió una beca del Gobierno de Castilla y León (Orden EDU/828/2014), cofinanciada por el Fondo Social Europeo.



SESIÓN II

BIOENERGÍA Y COMBUSTIBLES

Cócteles celulolíticos de alto rendimiento para la producción de biocombustibles

Bruno Díez García

Abengoa Research. Calle Energía Solar 1. Campus Palmas Altas. 41014 Sevilla. bruno.diez@abengoa.com

Dentro de su estrategia de producción de biocarburantes sostenibles, Abengoa ha venido impulsando durante más de 10 años el desarrollo de la llamada segunda generación de etanol (2G), que utiliza como materia prima residuos lignocelulósicos de origen agrícola, forestal o incluso residuos sólidos urbanos. Una de las principales barreras para la comercialización de los carburantes 2G es el coste de las enzimas para la degradación del material lignocelulósico y liberar los azúcares fermentables, pudiendo llegar el coste de este cóctel celulolítico a representar un 30% del coste de producción del etanol 2G. Debido al impacto del coste de la enzima en la producción, la compañía se planteó desarrollar un cóctel enzimático propio para integrarlo en el proceso productivo.

En el año 2009 se adquirió la cepa industrial C1 de *Myceliophthora thermophila*, que se había desarrollado para la obtención de celulasas de uso textil, y se comenzó un programa de mejora enfocado a la aplicación lignocelulósica. Los parámetros para la mejora de la rentabilidad se centraron en la actividad enzimática global de cóctel, que condicionaba su dosificación, así como la productividad del organismo y el coste del proceso productivo. Se desarrollaron actividades paralelas desde la biología molecular del microorganismo productor hasta el diseño y mejora del proceso productivo que han culminado con el escalado industrial y transferencia tecnológica a distintas plantas de producción, validando los resultados.

Mediante la investigación bioquímica del proceso de hidrólisis y la elaboración de cócteles sintéticos con enzimas purificadas se avanzó en la definición de las enzimas clave para el proceso, emprendiendo programas de mejora genética de las más importantes. Los factores que mayor mejora han supuesto son la sobreexpresión de enzimas clave como beta-glucosidasa o beta-xilosidasa, eliminación de enzimas o proteínas innecesarias, consiguiendo una óptima formulación del cóctel, así como la estabilización frente a la proteólisis. La combinación de las mejoras del cóctel junto con la adaptación de las condiciones del proceso de hidrólisis han permitido reducir la dosis a menos de una décima parte de los consumos iniciales.

Por otra parte los trabajos sobre el proceso productivo han permitido reducciones importantes del coste en materias primas, incrementos de productividad de en torno a 4 veces y mejoras importantes de la calidad y estabilidad del cóctel, contribuyendo no sólo al ahorro de coste sino a reducciones adicionales de la dosis. El proceso productivo se ha validado a escala industrial en cuatro instalaciones diferentes, utilizando fermentadores de hasta 400 m³, alcanzando las productividades y calidad similares a las establecidas a escala de 30 litros.

Las áreas de mejora futura se centran en el desarrollo de aplicaciones para otros materiales 2G como madera y residuos sólidos urbanos, así como incremento de los rendimientos en 1G mediante el aprovechamiento de la fibra del grano de cereal.

Peroxidasas fúngicas de alto potencial redox Herramientas claves para las nuevas biorrefinerías de la lignocelulosa

Francisco Javier Ruiz-Dueñas^{a*}, Verónica Sáez-Jiménez^a, Elena Fernández-Fueyo^b, Iván Ayuso-Fernández^a y Ángel T. Martínez^a

^aCentro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, E28040 Madrid, España; ^bUniversity of Technology, Julianalaan 136, 2628 BL Delf, Netherlands. fjruiz@cib.csic.es

El inevitable agotamiento de las reservas petrolíferas en un futuro más o menos próximo, junto con el calentamiento global por el efecto invernadero, han llevado a las principales economías mundiales a considerar la biomasa vegetal como una fuente de materias primas renovables para la obtención de combustibles, productos químicos y materiales. Esta necesidad ha dado lugar al concepto de Biorrefinería, que hace referencia al aprovechamiento integral de los diferentes constituyentes de cultivos (y residuos) agrícolas y forestales, para sustituir a los recursos fósiles no renovables. La cantidad de biomasa lignocelulósica utilizada actualmente por la industria representa un pequeño porcentaje que se podría incrementar mediante procesos biotecnológicos basados en el empleo de microorganismos y sus enzimas. En la Naturaleza existe una gran variedad de microorganismos productores de hidrolasas y oxidorreductasas capaces de actuar sobre los diferentes polímeros vegetales. El interés por estos organismos y sus enzimas ha ejercido un fuerte impacto en los proyectos de secuenciación de genomas y, en particular, en los financiados por el Joint Genome Institute (JGI) del Departamento de Energía (DOE) de Estados Unidos (<http://www.jgi.doe.gov>). Como resultado de estos proyectos actualmente disponemos de más de 500 genomas fúngicos secuenciados cuyo análisis nos está permitiendo identificar nuevas enzimas que se podrán emplear como biocatalizadores en las futuras Biorrefinerías de la lignocelulosa.

Un aprovechamiento eficiente de todos los componentes de la biomasa vegetal pasa por el empleo de enzimas de tipo oxidorreductasa capaces de actuar sobre el polímero de lignina, entre cuyas funciones se encuentra la de proteger a los polisacáridos de la pared celular de las plantas de la degradación microbiana. El polímero de lignina es muy recalcitrante a la degradación biológica y química debido a su compleja arquitectura molecular y naturaleza aromática. Muy pocos organismos son capaces de degradarlo, siendo los basidiomicetos de podredumbre blanca los principales responsables de su mineralización en la Naturaleza. Estos organismos han desarrollado una estrategia propia, basada en la oxidación inespecífica del anillo bencénico de las diferentes subestructuras que constituyen la lignina mediante la acción de peroxidasas extracelulares. Estas peroxidasas presentan dos características únicas: i) muestran un inusualmente elevado potencial redox que les permite oxidar los anillos aromáticos no fenólicos de la lignina (y también las unidades fenólicas minoritarias); y ii) son capaces de generar un radical libre en un residuo de triptófano, relativamente estable y altamente reactivo, en la superficie de la proteína donde un compuesto tan voluminoso como la lignina puede interaccionar y ser finalmente oxidado.

Aunque siendo evidente su potencial biotecnológico, las peroxidasas ligninolíticas no están disponibles comercialmente debido a que no son aplicables tal y como se producen en la Naturaleza (proteínas salvajes) al requerir a menudo los procesos industriales enzimas que funcionen bajo condiciones extremas. Durante los últimos años hemos generado variantes mejoradas de estas enzimas mediante diferentes estrategias. Éstas han incluido desde el diseño racional (p.ej. mutagénesis dirigida) basado en el conocimiento de la estructura (p.ej. mediante análisis comparativo estructural) y el empleo de herramientas *in silico* (p.ej. análisis computacionales, incluyendo técnicas de simulación de migración de sustratos y de mecánica cuántica y mecánica molecular), hasta un diseño no racional mediante evolución molecular dirigida basado en la introducción de mutaciones al azar y selección bajo las condiciones en las que queremos que trabaje la enzima. Finalmente también hemos recurrido a la reconstrucción de secuencias de oxidorreductasas ancestrales mediante análisis filogenéticos por métodos de máxima verosimilitud, y a la posterior resucitación de las mismas con la idea de encontrar enzimas con mejores propiedades catalíticas y más estables que las actuales.

Bioenergía a partir de microalgas

Mercedes Ballesteros Perdices

*Unidad Mixta CIEMAT-IMDEA Energía de Procesos Biotecnológicos para la Producción de Energía.
CIEMAT-Avda. Complutense, 40 28040 Madrid.*

*IMDEA Energía- Avda. Ramón de la Sagra, 3-Parque Tecnológico de Móstoles 28935 Móstoles, Madrid
Correo electrónico: m.ballesteros@ciemat.es*

El uso de microalgas para la producción de biocombustibles, como alternativa a los vegetales superiores, ha surgido en los últimos años como una opción prometedora, debido a que presentan mayor eficiencia fotosintética, son más eficaces en la asimilación de CO₂ y otros nutrientes y no requieren tierras cultivables. Aunque la investigación en el cultivo de microalgas para producir biocombustibles es muy incipiente, la información disponible deja entrever que este proceso presenta una serie de exigencias y requerimientos que podrían limitar su implementación a escala industrial. La necesidad de considerables cantidades de agua y fósforo, unido al alto coste de producción, son los principales obstáculos que hay que enfrentar para su desarrollo comercial.

Una alternativa que permitiría reducir estos costes es el cultivo de microalgas en aguas residuales, ricas en nutrientes. Desde el punto de la depuración, la biomasa algal sería un subproducto del proceso de tratamiento de aguas residuales. La idea que subyace es acometer el tratamiento de aguas residuales, lo cual se debe realizar de todos modos y tiene un coste económico, mediante cultivos de microalgas que permitan aprovechar energéticamente la biomasa producida. Tanto el conocimiento como la infraestructura existente para el tratamiento de aguas residuales se identifican como dos elementos clave para eludir las barreras asociadas a los costes y la escalabilidad de los sistemas de producción de biocombustibles a partir de microalgas.

El tratamiento convencional de aguas residuales consta de una serie de fases que incluyen un tratamiento secundario aerobio asistido con aireación mecánica. En esta fase los organismos aeróbicos dependen del oxígeno para mantener los procesos metabólicos que producen la energía necesaria para su crecimiento y reproducción. La solubilidad del oxígeno en el agua es muy baja y esta es la principal limitante para la autodepuración de las aguas residuales y la razón por la que hay que inyectar aire a los reactores abiertos y provocar turbulencia para, de esta manera, compensar por el oxígeno consumido en los procesos de digestión aeróbica. Esta agitación o turbulencia consume una gran cantidad de energía y constituye el principal coste de operación de los sistemas de depuración. Las microalgas se presentan como una alternativa ventajosa a estos procesos convencionales de purificación de aguas residuales puesto que permiten la oxigenación fotosintética del agua residual, lo que reduce el coste de la aireación mecánica, la asimilación de dióxido de carbono, la recuperación de nutrientes (como el fosfato y el amonio), y la valorización de la biomasa producida mediante su uso como biofertilizante o para la producción de biogás.

En esta ponencia se presentará el proyecto MICROALBAC que está siendo desarrollado por la empresa FACSA, el Instituto IMDEA Energía y el CEBAS-CSIC; con el objetivo de integrar el cultivo de microalgas en las plantas convencionales de tratamiento de aguas residuales para, de este modo, tener un sistema de depuración híbrido que busca la maximización de las sinergias entre ambas especies permitiendo obtener una maximización en la descontaminación de las aguas y obtención de energía en forma de biogás al llevar a cabo una digestión anaerobia de los lodos resultantes del proceso de depuración. El proyecto también pretende valorizar los residuos generados en las depuradoras, al poder utilizar los lodos residuales compuestos por biomasa algal como fertilizantes-bioenmiendas en agricultura, o en recuperación de suelos degradados.



SESIÓN III

BIOTECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

SESIÓN PATROCINADA POR:



Desarrollo de fármacos obtenidos por biosíntesis combinatoria

Jesús Cortés*, Luz Elena Núñez, Nuria Menéndez, Paula Costales, Jhudit Pérez-Escuredo, Francisco Morís.

Entrechem SL. Edificio Severo Ochoa. Campus El Cristo. Julián Clavería s/n. 33006 Oviedo
jesus.cortes@entrechem.com

La biosíntesis combinatoria permite la producción racional de compuestos estructuralmente análogos de productos naturales. La combinación de genes biosintéticos de distintas rutas metabólicas de compuestos producidos por microorganismos puede dar lugar a la producción de nuevas moléculas con mejores propiedades. La mitramicina A es un producto natural con actividad antitumoral utilizado en clínica durante los años setenta en el tratamiento de cancer testicular, leucemia, enfermedad de Paget e hipercalcemia pero debido a su alta toxicidad, la mitramicina A dejó de emplearse. La determinación de la secuencia y la caracterización de los genes que codifican para la biosíntesis de este compuesto han permitido su manipulación con el fin de crear moléculas análogas mediante biosíntesis combinatoria. Modificaciones en la estructura del núcleo central de la molécula y de los azúcares sustituyentes han dado lugar a la producción de una colección de análogos que han sido evaluados por su capacidad antitumoral y por su toxicidad. Estos estudios han permitido identificar a un posible candidato para desarrollo preclínico. Este candidato EC-8042, ha sido evaluado frente a una colección más amplia de líneas tumorales y se ha sometido a un mayor número de pruebas de toxicidad. Se han hecho estudios sobre el mecanismo de acción de este compuesto, comparado con la mitramicina A y se ha evaluado la actividad antitumoral *in vivo* frente a compuestos utilizados actualmente en la práctica clínica.

La producción de EC-8042 se ha incrementado mediante la expresión heteróloga de la vía biosintética en una cepa de *Streptomyces* construida específicamente para su expresión. Esto se ha llevado a cabo mediante el uso de métodos de recombinación *in vivo* en *Streptomyces* y *Saccharomyces cerevisiae* y para la generación de mutantes se han utilizado técnicas de edición génica adaptadas para *Streptomyces*.

Otro candidato preclínico obtenido por biosíntesis combinatoria es EC-70124. Este compuesto se produce mediante la combinación de tres vías biosintéticas; dos que codifican para los indolocarbazoles rebecamicina y estaurosporina y la vía de biosíntesis del azúcar L-olivosa. EC-70124 también se ha seleccionado dentro de una colección de análogos de indolocarbazoles por su eficacia y toxicidad frente diversas líneas celulares comparándolos con las moléculas iniciales. Al igual que la estaurosporina, EC-70124 es un inhibidor de quinasas de proteínas pero presenta menor toxicidad, probablemente debido a una mayor selectividad sobre los posibles sustratos. Este candidato preclínico también ha sido evaluado frente a una colección más amplia de líneas tumorales y se ha sometido a un mayor número de pruebas de toxicidad. Se han hecho estudios sobre el mecanismo de acción de este compuesto y se ha evaluado la actividad antitumoral *in vivo* frente a compuestos utilizados actualmente en la práctica clínica.

La producción de EC-70124 se ha incrementado mediante estrategias paralelas que incluyen la expresión heteróloga de las vías biosintéticas, incremento del número de copias de las vías, cambio de promotores y mejora de los genes reguladores, su sobreexpresión e incremento de su número de copias.

Los resultados obtenidos a la fecha sobre la eficacia, toxicidad y producción de estos compuestos sugieren que estos candidatos preclínicos tienen el potencial para su evaluación clínica en un futuro próximo.

Diversidad química y productos naturales: continúa la búsqueda de nuevos fármacos.

Olga Genilloud

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

E.mail: olga.genilloud@medinaandalucia.es

Los productos naturales han sido durante décadas una de las más importantes fuentes para el descubrimiento de nuevos fármacos, y de especial relevancia en el caso de los antibióticos, antifúngicos y antiparasitarios, con un gran número de moléculas y derivados actualmente en uso en la clínica. Los productos naturales representan un espacio químico único dada su complejidad estructural y la potencia y selectividad que presentan a nivel de su actividad biológica, resultado de una larga selección evolutiva. Estas moléculas poseen las propiedades idóneas para interactuar y ser inhibidores potenciales de una amplia diversidad de dianas celulares.

MEDINA es un centro de investigación enfocado en el descubrimiento de productos naturales de origen microbiano y con una de las mayores colecciones de cultivo para uso industrial. Uno de los objetivos del centro es continuar enriqueciendo las librerías de productos naturales a partir de nuevas cepas aisladas de entornos y nichos ecológicos poco o no explorados, así como el continuar explorando la diversidad de la colección de cultivos a través de nuevas aproximaciones que permitan maximizar la diversidad química producida por estos microorganismos. Actualmente la colección posee más de 130.000 extractos y fracciones derivados de solo parte de la colección microbiana que ya alcanza las 190.000 cepas. Esta colección de extractos es el punto de partida para la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas y su potencial desarrollo como nuevos fármacos en cuatro áreas terapéuticas principales que incluyen las enfermedades infecciosas y parasitarias, el cáncer y la neurodegeneración. Como resultado de nuestros programas de cribado, hemos identificado nuevas moléculas con interesantes propiedades químicas y actividades biológicas. Una selección de estos casos nos servirán de marco para presentar y discutir las diferentes aproximaciones y estrategias empleadas en el centro para el descubrimiento de nuevos productos naturales con aplicación biotecnológica.

Nuevos reguladores de la producción de antibióticos en *Streptomyces*

Ramón. I. Santamaría, Sergio Antoraz, Laura Sevillano, Margarita Díaz.

Instituto de Biología Funcional y Genómica. CSIC/Universidad de Salamanca. C/Zacarías González nº 2. 37007 Salamanca. santa@usal.es

Las bacterias del género *Streptomyces* poseen un elevado potencial industrial debido a su capacidad para producir moléculas con interés en clínica, en veterinaria, o con interés fitosanitario. La secuenciación del genoma de un amplio número de especies de este género ha permitido corroborar que este potencial es aún mas amplio que el observado en el laboratorio ya que todas ellas tienen capacidad para producir más de 20 compuestos de los que únicamente una pequeña parte es producida en las condiciones de cultivo empleadas. El activar estas rutas silenciadas ha atraído a gran número de investigadores y son variadas las estrategias abordadas para intentar su activación sin que hasta la fecha se haya encontrado una estrategia general para activarlas.

Nuestro grupo está estudiando la regulación que ejercen varios sistemas de dos componentes (SDC) sobre la producción de antibióticos empleando como organismo modelo *Streptomyces coelicolor*.

A lo largo de este estudio hemos identificado dos SDCs que regulan negativamente la producción de antibióticos y la diferenciación y un sistema que actúa como un regulador positivo en ambos procesos. Este último sistema es un SDC especial al contener dos histidina kinasas (HK) y un único regulador de respuesta (RR) al que, las dos HKs del sistema, parecen controlar de modo diferente (1, 2). La generación de cepas delecionadas en los SDC negativos y su empleo como cepas hospedadoras de rutas heterólogas ha permitido comprobar que esta es una buena estrategia para incrementar la producción heteróloga de compuestos ya conocidos. Por otro lado, hemos demostrado el gran potencial que supone la sobreexpresión del RR del SDC positivo en otros organismos para estimular la producción de sus metabolitos secundarios endógenos (3).

Actualmente hemos extendido este estudio a otras proteínas con capacidad de unión a DNA observando que la producción de antibióticos puede verse modificada drásticamente por la sobreexpresión de alguna de estas proteínas.

Referencias:

1. Yepes *et al.* 2011. PLOS ONE, 6 (5):e19980.
2. Rodríguez *et al.* 2015 Front Microbiol. 6: 450
3. Rico *et al.* 2014. Appl. Environ. Microbiol., 80 (8): 2417-2428.

A collection of KstDs for à la carte Δ 1-dehydrogenation of steroids in *Mycobacterium smegmatis* mc² 155

Igor Martínez^{1*}, Lorena Fernández¹, Dina Kacar¹, Beatriz Galán¹, José Luis Barredo² and José Luis García¹

¹ Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC). Departament of Environmental Biology. Ramiro de Maeztu 9. 28040 Madrid (Spain)

² Gadea Biopharma. Departament of Biotechnology. Parque Tecnológico de León. Nicostrato Vela s/n. 24009 León (Spain)

* email to: imartinez@cib.csic.es

The biotransformation of natural sterols into pharmaceutical synthons is a promising alternative to multi-step chemical synthesis. From all the transformations involved in the sterols metabolism, the introduction of a double bound in the C1-C2 position of ring A has a high importance at industrial level because it increases the biological activity and, therefore, the value of the original substrate. This transformation is catalyzed by 3-ketosteroid- Δ 1-dehydrogenases (KstDs).

In this work, we have studied the Δ 1-dehydrogenation of several steroidal substrates using a genetically modified strain of *Mycobacterium smegmatis* mc² 155 previously developed which is unable to transform the original substrates and has been presented as a suitable chassis for sterol transformations. For this purpose, several KstDs, which have been described and characterized from different microorganisms, have been used for the Δ 1-dehydrogenation of several substrates. Genes encoding these KstDs have been expressed in *M. smegmatis* in a plasmid under the control of a constitutive promoter and all the transformations have been carried out in resting cells conditions. Androst-4-ene-3,17-dione (AD), cortisone, hydrocortisone and testosterone have been selected as substrates because of the high interest of their Δ 1-dehydro-derivatives in the pharmaceutical industry, which are androsta-1,4-diene-3,17-dione (ADD), prednisone, prednisolone and boldenone, respectively.

Results show a complete conversion of each substrate in their Δ 1-dehydro-derivatives and, moreover, it was found that different KstDs have different substrate specificity. Therefore, it has been possible to construct a collection of KstDs for à la carte production of these high-added value products that would be of great interest in pharmaceutical industry. These results also consolidate the use of *Mycobacterium smegmatis* mc² 155 as a powerful chassis for the production of steroidal synthons.

This work has been supported by projects RTC-2014-2249 and BIO2012-36995-C02-01.

Identificación mediante minería genómica y caracterización de la agrupación de genes de biosíntesis de una nueva familia de compuestos alcaloides en *Streptomyces argillaceus*

Suhui Ye*, Brian Molloy, Alfredo F. Braña, Carlos Olano, José A. Salas, Carmen Méndez

Departamento de Biología Funcional e Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA), Universidad de Oviedo. Julián Clavería s/n. 33006. Oviedo. yesuhui@uniovi.es

El término “minería genómica” hace referencia al análisis de la secuencia genómica de un microorganismo para el descubrimiento de nuevos procesos metabólicos, dianas de actuación y productos metabólicos. La secuenciación de genomas de actinomicetos, los mayores productores de compuestos bioactivos, reveló que cada especie contiene de 30-40 agrupaciones de genes para la biosíntesis de metabolitos secundarios potencialmente bioactivos, de los cuales sólo unos pocos se están expresando en condiciones habituales de cultivo en el laboratorio. Estos genomas constituyen un nuevo e importante nicho para el descubrimiento de nuevos compuestos potencialmente interesantes desde el punto de vista aplicado.

El genoma de *Streptomyces argillaceus* ATCC 12956, microorganismo productor del antitumoral mitramicina, ha sido secuenciado por nuestro grupo de investigación. Mediante el análisis bioinformático de dicha secuencia se han identificado 32 posibles agrupamientos génicos (*clusters*) de biosíntesis de metabolitos secundarios, de los cuales 19 codificarían compuestos en un principio desconocidos. Se seleccionó el *cluster* 18, que contiene genes que codificarían una policétido sintasa (PKS) tipo I, para su estudio y caracterización. Se han identificado 7 productos del *cluster* 18 mediante la obtención de una cepa mutante en uno de los genes que codificarían una de las subunidades de la PKS y la comparación de los perfiles metabólicos de dicha cepa y la silvestre en diferentes medios de producción. Estos compuestos han sido purificados y caracterizados por espectrometría de masas (MS) y resonancia magnética nuclear (RMN). Todos ellos, a excepción de la nigrifactina, resultaron ser compuestos nuevos, constituyendo una nueva familia de compuestos de tipo alcaloide.

Por otra parte, se ha conseguido delimitar experimentalmente el *cluster* de biosíntesis mediante la obtención de mutantes en genes localizados en los extremos del agrupamiento. El *cluster* de biosíntesis presenta un tamaño total de 45,28 kb y se encuentra formado por 14 genes, dos de ellos con función reguladora.

Una vez delimitado el *cluster* de biosíntesis, se ha procedido al estudio y caracterización de la ruta de biosíntesis de estos compuestos mediante la obtención de mutantes en cada uno de los genes estructurales que conforman el agrupamiento. Algunas de estas cepas mutantes acumularon compuestos diferentes, los cuales fueron purificados y caracterizados mediante MS y RMN, revelando ser compuestos nuevos. La estructura de estos compuestos así como el patrón de producción presentado por cada cepa mutante permitieron proponer una ruta de biosíntesis.

Por último, se ha estudiado la actividad antibiótica y antitumoral de todos los compuestos identificados y caracterizados, revelando 2 de ellos actividad antibiótica frente a *Micrococcus luteus*. También se ha observado que la ausencia de estos compuestos afecta a la morfología y al proceso de esporulación de *S. argillaceus*.



SESIÓN IV

BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

SESIÓN PATROCINADA POR:

biomar
MICROBIAL TECHNOLOGIES

Aportaciones biotecnológicas de la Microbiología para una Enología moderna

Jesús M. Cantoral*, Gustavo Cordero-Bueso, Carlos Garrido, María Carbú, Victoria E. González-Rodríguez, Ana Fernández-Morales, Marina Ruiz, M. Esther Rodríguez

Universidad de Cádiz. Dpto. de Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública, Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Instituto Universitario de Investigación Vitivinícola y Agroalimentaria (IVAGRO), 11510, Puerto Real, Cádiz. jesusmanuel.cantoral@uca.es

La Microbiología Industrial y la Biotecnología Microbiana se ha hecho presente y desarrollado especialmente en los últimos años en el campo de la Enología. La incorporación de personal altamente cualificado, los esfuerzos de muchas Bodegas y las inversiones en general, y particularmente en España, han hecho que el sector enológico tenga una importante pujanza en nuestro país. Dando como resultado la modernización y creación de nuevas Bodegas y los magníficos vinos que se elaboran en la actualidad, tanto por su variedad como por su elevada cualificación. La profundización en los aspectos microbiológicos y biotecnológicos de los microorganismos que intervienen en la elaboración del vino suponen sin duda una importante aportación para una Enología moderna y productiva. En los últimos años, debido a la competencia internacional en el mercado del vino, se hace necesario un proceso de mejora continua en las instalaciones vitivinícolas. Estas mejoras van desde la introducción de nuevas variedades de uvas blancas y tintas, hasta la mejora del proceso fermentativo. Sin embargo, para que los vinos adquieran especificidad y distinción, es fundamental disponer de un amplio conocimiento microbiológico de los procesos de fermentación, ya que la diversidad de levaduras implicadas en dicho proceso son las que proporcionan gran parte de la tipicidad y complejidad a los vinos.

El desarrollo de modernas técnicas de biología molecular (cariotipo o campo pulsante, RFLPs del ADN mitocondrial, PCR, microsatélites múltiple, etc.) ha permitido identificar y caracterizar cepas de levaduras en muchas regiones productoras de vino, mostrando, i) que existe una amplia variabilidad genética dentro de una misma especie, y ii) la ecología y la dinámica de poblaciones en las fermentaciones espontáneas. El conocimiento de las distintas cepas de levaduras que participan durante el proceso de fermentación es muy importante para establecer las más representativas, estudiar propiedades de interés enológico y poder seleccionarlas para su utilización en bodega como cultivos iniciadores (Levaduras Autóctonas Seleccionadas). Nuestro grupo ha centrado sus estudios en levaduras enológicas que participan en distintos procesos de elaboración de vinos (blancos y jóvenes), tanto jóvenes como sometidos a crianza biológica (finos y manzanillas), colaborando con diversas Bodegas, tanto del Marco vitivinícola de Jerez, como con el marco de la D. O. Ribera del Duero, Ribera del Guadiana, etc. Mediante la utilización de distintas técnicas moleculares hemos llevado a cabo la caracterización y selección de un amplio número de levaduras, lo que nos ha permitido describir un original modelo de adaptación al ambiente de las levaduras de “velo de flor”, así como la selección de las levaduras enológicas más adecuada, permitiendo mejorar, tanto la eficiencia del proceso de fermentación, como la calidad de los vinos obtenidos.

Teniendo presente que, *Vitis vinifera* L. ssp. *Sylvestris* (Gmelin) Hegi es la única especie de vid ancestral en Europa, que es reconocida como la generación de los padres dioicos de cultivares de hoy en día y que no se han realizado estudios sobre las poblaciones microbianas presente en sus frutos, hemos iniciado un original estudio de recolección de vayas para obtener información de las comunidades de levaduras en varias zonas del Mediterráneo y los países del Cáucaso. Este estudio pone de relieve, no solo el potencial de la diversidad biológica de las levaduras encontradas, sino su potencial biotecnológico, que ofrece nuevas oportunidades en manos del enólogo experto, abriendo nuevas posibilidades, hasta ahora desconocidas.

Bibliografía.

Genetics 165 (4): 1745-1759. 2003. International Journal of Food Microbiology. 145: 331-335. 2011 doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.035. Archives of Microbiology. 195: 297-302. 2013. doi: 10.1007/s00203-013-0872-z .Proteomics 16: 576–592. 2016. doi: 10.1002/pmic.201500137.



Tres en uno: endofitismo, control biológico y promoción del crecimiento vegetal por *Pseudomonas fluorescens* PICF7

Jesús Mercado Blanco

Instituto Agricultura Sostenible (IAS), Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Campus 'Alameda del Obispo', Avda. Menéndez Pidal s/n, 14004 Córdoba. Email: jesus.mercado@ias.csic.es

Pseudomonas fluorescens PICF7 coloniza de forma natural las raíces de olivo (*Olea europaea* L.) [1]. Es, además, un agente de control biológico (ACB) efectivo frente a la Verticilosis del olivo (VO) [2], enfermedad de gran relevancia para el cultivo de esta leñosa, causada por el hongo fitopatógeno del suelo *Verticillium dahliae* Kleb., y de muy difícil control [3]. La cepa PICF7 es capaz de colonizar el interior de las raíces de diferentes cultivares de olivo, estableciéndose en los tejidos de este órgano como endófito beneficioso, un modo de vida que ha sido verificado en diferentes condiciones experimentales [4, 5]. Se ha demostrado que en el proceso de entrada los pelos radicales juegan un importante papel [5]. Para un control eficaz de la VO (condiciones de inoculación artificial del patógeno y utilizando plantas de vivero) se requiere una buena colonización tanto de la superficie como del interior de raíces intactas por parte del ACB antes de que se produzca la infección por *V. dahliae*. Los mecanismos que explican el biocontrol de la VO por PICF7 son poco conocidos. La disponibilidad del genoma completo [1] será de gran ayuda para la identificación de genes implicados en dicha actividad, así como de aquellos relacionados con su modo de vida endófito y con su capacidad para promover el crecimiento vegetal, fenómeno recientemente verificado [6]. El análisis de mutantes ya ha permitido excluir fenotipos bacterianos tales como la producción del sideróforo pioverdina o la motilidad de tipo 'swimming' en la supresión de la VO o en la capacidad de colonización endófito [2]. Por otra parte, la colonización de las raíces de olivo por PICF7 induce en el huésped importantes cambios a nivel transcriptómico, muchos de ellos relacionados con respuestas a diferentes tipos de estreses a/bióticos. Algunas de estas respuestas tienen lugar tanto a nivel local (raíces) como sistémico (tallos) [7, 8], y la manera en que aquéllas son moduladas a lo largo del tiempo puede explicar la capacidad de biocontrol de PICF7 así como la 'identificación' de esta bacteria por parte del huésped como un invasor no deletéreo 'autorizado' a establecerse de forma prolongada en el interior de la raíz. PICF7 muestra otras características que la cualifican como un agente microbiano beneficioso muy versátil. Por ejemplo, la presencia de PICF7 en raíces de olivo no impide que se desarrollen tumores en la parte aérea como consecuencia de la infección por *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv), otro patógeno de relevancia para el olivar. Sin embargo, cuando el ACB y Psv se inoculan de forma conjunta en tallos, PICF7 es capaz de alterar la apariencia macroscópica y la anatomía de los tumores así como la localización del patógeno en el interior del tejido hiperplásico, lo cual puede tener importantes consecuencias epidemiológicas [9]. Por otra parte, la cepa PICF7 es capaz de colonizar raíces de especies botánicas filogenéticamente distantes de su huésped natural. Se ha podido confirmar así la capacidad de colonizar y persistir en raíces de trigo (*Triticum aestivum* L.) y cebada (*Hordeum vulgare* L.), incluso como endófito. Es de destacar que PICF7 promueve el crecimiento y la producción en cebada pero no en trigo, a pesar de colonizar de forma similar ambas especies. Por último, la presencia de PICF7 provoca cambios específicos en los proteomas de las raíces de estos cereales. En resumen, *P. fluorescens* PICF7 es un endófito de raíces que confiere diversos beneficios a las plantas que es capaz de colonizar.

[1] Martínez-García et al. (2015) Standards in Genomic Science 10:10.

[2] Maldonado-González et al. (2015) Environmental Microbiology, 17: 3139–3153.

[3] López-Escudero FJ y Mercado-Blanco J (2011) Plant Soil 344:1-50.

[4] Prieto P et al. (2009) Microbial Biotechnology 2: 499-511.

[5] Prieto P et al. (2011) Microbial Ecology 62: 435-445.

[6] Mercado-Blanco et al. (2016) FEMS Microbiology Ecology 92(8): fiw092

[7] Schilirò E et al. (2012) PLoS ONE 7: e48646.

[8] Gómez-Lama Cabanás et al. (2014) Frontiers in Microbiology 5: 427.

[9] Maldonado-González et al. (2013) Microbial Biotechnology 6: 275–287.

Trabajos subvencionados por los proyectos P07-CVI02624 y P12-AGR667 (Junta de Andalucía) y AGL2012-33264 (MICINN/MINECO), cofinanciados con fondos FEDER de la UE.



Plant Innate Immunity and Crop Disease Resistance: from the Bench to the Field

Antonio Molina*, Lucía Jordá, Miguel Angel Torres, Soledad Sacristan, Eva Miedes, Hugo Mérida, Sara Sopeña, Laura Bacete, Antonio Muñoz, Sanjay Swami

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP, UPM-INIA), Campus de Excelencia Internacional (CEI) de Montegancedo, Universidad Politécnica Madrid, 28223-Pozuelo de Alarcón (Madrid), SPAIN. Departamento de Biotecnología-Biología Vegetal, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica Madrid, 28040-Madrid, SPAIN.

Plant innate immunity system is a complex network of constitutive and inducible defensive barriers. Plant cell wall is one of the barriers that pathogens, such as necrotrophic and vascular fungi, may overcome to successfully colonize plant tissues. The composition and ultrastructure of plant cell wall are largely unknown despite its relevance in the regulation of developmental-associated processes, the control of the resistance to biotic and abiotic stresses, and the recent emerging interest of the cell wall as a renewable source for biofuel production. The traditional view of the cell wall as a passive barrier has evolved to a new concept that considers it as a dynamic structure and a source of signaling molecules that regulates plant innate immunity responses. Cell wall-derived molecules released after pathogen infection or wounding, that are so-called DAMPs (damaged-associated molecular patterns), can activate the plant immune system upon recognition by specific plants protein receptors, such as Receptor Protein Kinases. The plant immune system is also triggered by pathogen-associated molecular patterns (MAMPs) or pathogen effectors (Avr proteins), which are recognized by plant pathogen recognition receptors (PRR). These PRRs activate Protein Kinase cascades, which regulate downstream immune responses and disease resistance. The understanding of the dynamics and evolution of plant defensive responses is of fundamental importance as they impact agricultural yield, which is essential to sustain our society. We will present the recent progresses of our group in translational biology and in the characterization of the function of plant cell wall in innate immune responses. The translational biology strategy has resulted in the development of agro-biological products, which are currently commercialized for agricultural production and crop protection.

Producción de giberelinas por el hongo beneficioso *Trichoderma harzianum*. Posibles efectos fisiológicos en plantas

Isabel Vicente, Ana Alonso-Ramírez, Raquel Martín-Arevalillo, Rosa Hermosa, Enrique Monte, Carlos Nicolás*

Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Departamentos de Microbiología y Genética y Fisiología Vegetal, Universidad de Salamanca. Campus de Villamayor, C/ Río Duero, 12; 37185 Salamanca, España. cnicolas@usal.es

Los hongos del género *Trichoderma* destacan no solo por su capacidad para ejercer biocontrol sobre numerosos patógenos que habitualmente afectan a las plantas de cultivo, sino también por promover el crecimiento y desarrollo de las mismas. Además, algunos estudios han demostrado que *Trichoderma* spp. tiene la facultad de estimular la germinación de las semillas de diversas especies vegetales, lo cual se ha atribuido a la síntesis por parte del hongo de moléculas que imitan los efectos de las giberelinas.

El objetivo de este trabajo es comprobar si este hongo beneficioso es capaz de producir giberelinas, hecho no descrito en la literatura científica. Para ello, se diseñó un experimento en el que se evaluaron los efectos de un extracto fúngico de *T. harzianum* sobre la emergencia radicular y el desarrollo de la parte aérea de semillas de *Arabidopsis thaliana* pertenecientes al ecotipo silvestre Col-0 y el mutante biosintético de giberelinas *ga1-1*, que se compararon con las mismas observaciones realizadas en medios de cultivo suplementados con ácido abscísico y ácido giberélico. Se observó que el sobrenadante del hongo era capaz de revertir parcialmente los efectos del ácido abscísico y de restaurar el fenotipo silvestre en los mutantes *ga1-1*, induciendo su germinación y desarrollo, que se vieron acelerados en el ecotipo silvestre.

A la vista de estos resultados, y para confirmar la presencia o no de giberelinas en este extracto fúngico, se analizó la presencia de esta hormona en el sobrenadante del hongo y se encontraron tanto formas activas como precursoras de éstas, lo que confirma la hipótesis de que *T. harzianum* cepa T34 sintetiza y libera a la rizosfera giberelinas activas, que la planta es capaz de utilizar en su metabolismo.

Finalmente, se llevó a cabo una búsqueda bioinformática en *T. harzianum* de genes candidatos que pudieran estar implicados en la ruta de biosíntesis de las giberelinas, utilizando las secuencias de aminoácidos y nucleotídicas de las enzimas de esta ruta del hongo *Gibberella fujikuroi*, descritas en la literatura. Se encontraron secuencias de *T. harzianum* que guardan una alta similitud con las de *G. fujikuroi*, así como otras con similitudes más bajas, y aunque no se puede asegurar con firmeza que estas secuencias codifiquen las enzimas de biosíntesis de giberelinas en *T. harzianum*, se cree que hay indicios suficientes para pensar que el hongo posee estos genes.

Empleo de actinomicetos como agentes de biocontrol en enfermedades de madera en vid

Jose Manuel Álvarez-Pérez*¹, Sandra González-García¹, Rebeca Cobos², Ana Ibáñez¹, Miguel Angel Olego², Enrique Garzón-Jimeno^{1,2}, Carlos Barreiro³, Juan José Rubio Coque^{1,2}

¹ Instituto de Investigación de la Viña y el Vino. Universidad de León. Avda. Portugal, 41. 24071 León. España.

² RGA Bio-Investigación S.L. Avda. Portugal, 41. IRENA, Lab. 29. 24009 León. España.

³ INBIOTEC-(Instituto de Biotecnología de León). Parque Científico de León. Avda. Real, 1. 24006 León. Spain. e-mail: jmalvp@unileon.es

Uno de los mayores problemas del sector vitivinícola en todo el mundo es el decaimiento de la planta de vid con las correspondientes pérdidas económicas derivadas. Esta patología está asociada principalmente a la infección de hongos, bien a través de heridas de poda, o a través del sistema radicular. Destacan las patologías conocidas como “pie negro” y “enfermedad de Petri”. Dichas enfermedades son atribuidas a diferentes especies del género *Ilyonectria* en el primer caso y a *Phaeoacremonium aleophilum* y el género *Phaeomoniella* en el segundo, sin descartar algunos patógenos de la familia *Botryosphaeriaceae*. El resultado de dichos procesos infecciosos desencadena una notable pérdida de vigor, pudiendo derivar en la muerte prematura de la planta.

El principal **objetivo** de este estudio es el empleo de actinobacterias (rizosféricas y endofíticas) naturalmente asociados al sistema radicular de las plantas, para ser empleados como agentes de biocontrol (BCAs) con capacidad de reducir e incluso erradicar las afecciones causadas por hongos en las plantas de vid.

Una colección de actinobacterias fueron aisladas de la rizosfera, así como del interior del aparato radicular (aislados endofíticos) de plantas jóvenes de *Vitis vinífera*. Tras ser identificadas mediante métodos moleculares se comprobó su pertenencia mayoritaria al género *Streptomyces*.

Su capacidad como agentes de biocontrol se determinó mediante bioensayos *in vitro* frente a los principales hongos fitopatógenos anteriormente mencionados.

Aquellas actinobacterias que mostraron una mayor capacidad antifúngica se seleccionaron para realizar estudios de campo en un vivero experimental de plantas de vid. Las actinobacterias se aplicaron mediante inmersión del aparato radicular de plantas en una suspensión bacteriana, procediéndose posteriormente a su normal procesado industrial. Se realizó un seguimiento de la tasa de supervivencia, altura total de las vides, longitud de los internudos, así como la tasa de hongos patógenos presentes en la zona de inserción de la raíz.

Mediante este estudio se ha podido **concluir** que varias actinobacterias eran capaces de reducir, mediante aplicación al sistema radicular de plantas jóvenes de vid, la tasa de infección de varios hongos patógenos causantes del decaimiento o muerte prematura de la vid. Por tanto, su empleo como BCAs podría ser una buena alternativa para evitar el empleo de productos fitosanitarios de origen químico en el control de infecciones por patógenos para el establecimiento de nuevos viñedos.



SESIÓN V

BIOTECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

SESIÓN PATROCINADA POR:



Regulación de la utilización de biomasa vegetal en *Aspergillus nidulans*

Margarita Orejas

Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IATA-CSIC). Agustín Escardino 7, 46980 Paterna, Valencia. morejas@iata.csic.es

La pared celular de las plantas -compuesta de polisacáridos, lignina y proteínas- no solo desempeña importantes papeles estructurales y fisiológicos sino que proporciona un mecanismo de defensa frente a patógenos y es reservorio de nutrientes para muchos microorganismos, los cuales a su vez dedican una gran cantidad de recursos para degradarla eficientemente. Los polisacáridos (celulosa, hemicelulosa y pectina) son la principal fuente de carbono para muchos hongos filamentosos, y estos han desarrollado mecanismos para identificarlos y diferenciarlos. Además, al no poder ser asimilados directamente, necesitan ser degradados en el medio extracelular por medio de complejos enzimáticos cuya composición se ajusta a la naturaleza de los polisacáridos disponibles. De forma que la degradación de celulosa, hemicelulosa y pectina y la subsiguiente liberación de sus componentes (celodextrinas, D-glucosa, D-xilosa, L-ramnosa, ácido D-galacturónico, etc.), que además de como fuentes de carbono funcionan también como moléculas señalizadoras, es un proceso clave y altamente regulado (fundamentalmente a nivel transcripcional) cuando los hongos filamentosos crecen en esos sustratos o infectan plantas. Así, los genes codificantes de transportadores de azúcares (mono y oligosacáridos), de rutas catabólicas y de las enzimas que los liberan (celulasas, xilanasas, beta-xilosidasas, ramnosidasas, pectinasas, etc), se activan en presencia de los biopolímeros o de moléculas derivadas de los mismos, y se reprimen en las condiciones en las que sus productos no son necesarios, como es la presencia de determinadas fuentes de carbono de más fácil utilización como la glucosa, proceso denominado 'represión por catabolito de carbono' (CCR). En *Aspergillus nidulans* se ha establecido que en esos circuitos de regulación intervienen factores transcripcionales de amplio dominio como CreA, que media la CCR, y PacC, que controla la expresión génica en función del pH ambiental, y reguladores de la familia Zn₂Cys₆ (ClrB, XlnR, RhaR y PecR) que específicamente controlan la degradación de celulosa, hemicelulosa y pectina.

Como eficientes degradadores de biomasa vegetal, los hongos filamentosos son la principal fuente de enzimas que catalizan la degradación, biosíntesis y/o modificación de glicoconjugados, oligosacáridos y polisacáridos con diversas aplicaciones en la industria agroalimentaria (reducción del amargor de cítricos, liberación de compuestos aromáticos y bioactivos, etc.), farmacéutica, química, papelera, de biocombustibles... Así, para optimizar su producción, las técnicas moleculares ofrecen vías alternativas a los métodos clásicos de mutagénesis al azar, cribado y selección. Consecuentemente, la caracterización y manipulación de los componentes de los circuitos de regulación implicados en la utilización de biomasa vegetal va a permitir el diseño racional de nuevas cepas productoras útiles a nivel industrial para distintas aplicaciones biotecnológicas.

Agradecimientos: Estudios financiados por proyectos de la DGICYT incluido el actual AGL2015-66131-C2-2R (MINECO/FEDER)

Cultivos lácteos funcionales: origen y aplicaciones

Baltasar Mayo*

Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), Paseo Río Linares s/n, 33300-Villaviciosa, Asturias; baltasar.mayo@ipla.csic.es

Introducción general

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) son los componentes más habituales de los cultivos iniciadores utilizados en la fermentación de la leche. Las más típicas se agrupan en los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. Junto a las BAL ocasionalmente se agrupan también a especies de géneros como *Propionibacterium* y *Bifidobacterium* por encontrarse en los mismos hábitats o por utilizarse con los mismos propósitos.

Microbiología de quesos tradicionales y selección de fermentos

Las bacterias de estos tipos aparecen asociadas a la leche, la carne y materiales vegetales y son responsables de su fermentación. De forma ancestral, las fermentaciones se llevaban a cabo por microorganismos adventicios presentes en la materia prima o procedentes del entorno de elaboración. Por motivos de higiene y para homogenizar las características sensoriales, la contaminación accidental se ha ido sustituyendo por la utilización de cultivos iniciadores o fermentos. Estos se definen como “una o más cepas de una o más especies microbianas que se inoculan en una materia prima para iniciar su fermentación”. Los fermentos promueven la acidificación de forma eficiente y participan en los cambios que tienen lugar durante la maduración modificando la textura, el aroma y el sabor. Dadas sus funciones, resulta esencial la identificación de las cepas más apropiadas para reproducir las fermentaciones tradicionales o para emprender otras nuevas. De manera aplicada, el término fermento engloba a todos los microorganismos que se añaden los alimentos con una intención tecnológica.

En la línea de fermentos, nuestro grupo ha trabajado en la caracterización y tipificación microbiana de diversos quesos tradicionales de Asturias. Tras la tipificación microbiológica del queso de Peñamellera, propusimos una mezcla de cepas bien caracterizadas de *Lactococcus lactis* como fermento específico. De forma más reciente, hemos abordado una nueva caracterización del Cabrales. Como resultado del trabajo, propusimos también una mezcla de cepas de *L. lactis* como fermento específico y seleccionamos dos cepas de *Penicillium roqueforti* con buenas aptitudes tecnológicas. La mezcla acidificadora se licenció a la empresa Biogés Starters SA, que la produce a petición del Consejo Regulador del queso de Cabrales. En los últimos tiempos hemos estudiado el queso Casín, uno de los quesos tradicionales españoles con mayor originalidad. En este queso, *Lactococcus garvieae* parece ser la especie responsable de la acidificación, aunque se ve reemplazado durante la maduración por *L. lactis*.

Microbiología intestinal humana y selección de probióticos

BAL y bifidobacterias forman parte también de la microbiota del tracto gastrointestinal de los animales y del hombre, donde parecen contribuir a mantener el equilibrio microbiano necesario en el estado de salud: antagonizan a los patógenos, mejoran la digestibilidad de compuestos de la dieta y actúan como coadyuvantes inmunológicos. Por estos motivos, varias cepas se utilizan como probióticos (“microorganismos vivos que ingeridos en cantidades adecuadas mejoran la salud del consumidor”). Aunque no hay un criterio único, existe un consenso sobre las características deseables que deben poseer los microorganismos probióticos, así como otras de las que deben carecer. Las cepas probióticas han de responder también a las necesidades de los procesos industriales. La identificación y selección de probióticos es un proceso largo y complejo en el que hay que ir descartando las cepas que no cumplan los criterios de probiosis, seguridad y tecnológicos establecidos a priori.

En la línea de probióticos, hemos trabajado sobre la microbiota de heces y mucosa intestinal y más recientemente hemos concluido la caracterización microbiana del estómago. Entre otros logros destacamos la identificación de un numeroso grupo de bifidobacterias y lactobacilos con buenas propiedades probióticas. Entre ellas mencionamos una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* resistente a eritromicina a causa de una mutación puntual en el gen que codifica el ARNr 23S y que, dadas sus posibles aplicaciones, se protegió bajo patente de invención.

Functional foods incorporating marine-derived ingredients

Ana C. Freitas^{1,2*}, Dina Rodrigues², Armando C. Duarte², Ana M.P. Gomes³

¹ ISEIT/Viseu, Instituto Piaget, Estrada do Alto do Gaio, Galifonge, 3515-776 Lordosa, Viseu, Portugal

² CESAM - Centre for Environmental and Marine Studies & Department of Chemistry, University of Aveiro, Campus Universitário de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal

³ Universidade Católica Portuguesa, CBQF – Centro de Biotecnologia e Química Fina – Laboratório Associado, Escola Superior de Biotecnologia, Rua Arquitecto Lobão Vital, Apartado 2511, 4202-401 Porto, Portugal

ana.freitas@viseu.ipiaget.pt; acfreitas@ua.pt

The increasing ageing of populations, the decrease in quality of life due to stress, the high incidence of the so-called modern diseases (cardiovascular disease, obesity, cancer, diabetes, and allergies) represent driving forces in the quest for different foods and diets to promote healthy active ageing, improve well-being and to counteract the incidence of many diseases. The research and development of functional foods, which are foods with functional ingredients that may impact on specific functions or systems in the human body, providing health benefits beyond nutritional value has been the target of many studies over the last years. This growth is fuelled by technological innovations, development of new products, and the increasing number of health-conscious consumers interested in products that improve life quality.

The marine environment represents a tremendous source of many new healthy functional food ingredients and biologically active compounds constituting a research area with much to explore for food purposes. For example, edible seaweeds are a very interesting natural source of compounds with biological activity that could be used as functional ingredients. Seaweeds are well-known for their low calorie content, and for their richness in polysaccharides, minerals, vitamins, proteins, particularly the high contents found in red algae, steroids, lipids with long-chain polyunsaturated fatty acids, particularly those of red and brown algae and dietary fibres. Many current foods widely consumed all over the world are a potential vector for incorporating new functional ingredients from seaweeds, which will enhance their value at both nutritional and economic levels (Freitas et al., 2015; Cofrades et al., 2011; Sim et al., 2011). Novel functional foods that combine existing nutritional richness with important health promoting features are thus in order, especially if they are organoleptically appealing (Madureira et al., 2015).

A summary on the potential use of marine organisms as sources of food ingredients towards applications in new functional foods will be presented and discussed. In addition, the development of a new functional food based on a dairy spreadable cream with incorporated seaweed extracts from *Osmundea pinnatifida* and the assessment of their biological and technological potential will be presented.

Cofrades S, López-López I, Ruiz-Capillas C, Triki M, Jiménez-Colmenero F. (2011). Quality characteristics of low-salt restructured poultry with microbial transglutaminase and seaweed. *Meat Science*, 87, 373-380.

Freitas AC, Rodrigues D, Carvalho AC, Panteleitchouk T, Pereira L, Gomes AM, Duarte AC. 2015. Chapter 42 - Marine functional foods. *In Springer Handbook of Marine Biotechnology. Trends and Industrial Applications*, Kim Se-Kwon (Ed). *Springer*, ISBN 978-3-642-53970-1; 1560 p (pp. 969-994). Doi:10.1007/978-3-642-53971-8_42

Madureira, A.R., Soares, J.C., Pintado, M.E., Gomes, A.M.P., Freitas, A.C. & Malcata, F.X. (2015). Effect of the incorporation of salted additives on probiotic whey cheeses. *Food Bioscience*, 10, 8-17.

Sim SY, Aziah AAN & Cheng LH (2011). Characteristics of wheat dough and Chinese steamed bread added with sodium alginates or konjac glucomannan. *Food Hydrocolloids*, 25, 951-957.

Production of α -linolenic acid in a genetically engineered version of *Synechococcus elongatus* PCC 7942

María Santos-Merino* and Fernando de la Cruz

Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria IBBTEC, CSIC–Universidad de Cantabria-SODERCAN, Santander, Spain. santosmc@unican.es

α -linolenic acid (ALA, 18:3n-3) is a polyunsaturated fatty acid (PUFA) abundant in some vegetable oils. ALA is an essential precursor of long chain ω -3 PUFAs, docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA), and it is considered an adequate dietary source to provide and maintain the required levels of these fatty acids [1]. Cyanobacteria are prokaryotes able to produce valuable metabolites using energy from sunlight. In this work, we genetically engineered the model cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (Se7942) to produce ALA. We introduced the Δ 12 and Δ 15 fatty acid desaturase genes from *Synechococcus* sp. PCC 7002 (S7002) [2], because Se7942 lacks these genes. Although S7002 does produce ALA, its main disadvantage is its requirement of Vitamin B12 for growth, which is inadequate for large-scale industrial bioprocessing. We cloned both desaturases under the control of *PnrsB* and *Ptrc* promoters. The recombinant strains produced 1.1 % and 7.5 % ALA, respectively, against 0 % of Se7942 wild type. Moreover, we deleted or overexpressed several other genes involved in fatty acid biosynthesis in Se7942 in order to optimize the synthesis of unsaturated fatty acid. Deletion of *fabH* and simultaneous overexpression of *fabF* and, to a lesser extent, *fabB* genes increased the amount of C18 intermediaries, useful to produce ALA. These results lay the foundations for increasing fatty acid content in cyanobacteria. Besides, they shed light in our understanding of fatty acid metabolism. Ultimately, these findings will allow the production of nutritional supplements and medical products with higher content of essential ω -3 PUFAs.

1. Simopoulos AP: Human requirement for N-3 polyunsaturated fatty acids. *Poult Sci* 2000, 79:961-970.
2. Sakamoto T, Shen G, Higashi S, Murata N, Bryant DA: Alteration of low-temperature susceptibility of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 by genetic manipulation of membrane lipid unsaturation. *Arch Microbiol* 1998, 169:20-28.

Producción de melatonina por levaduras *Saccharomyces* y no *Saccharomyces*

M^a Ángeles Morcillo*, Beatriz González, M^a Jesús Torija, Gemma Beltrán, Albert Mas

Universidad Rovira i Virgili. Facultad de Enología. Dept. de Bioquímica y Biotecnología. Biotecnología enológica. C/Marcel·lí Domingo nº1 43007 Tarragona, España
maangeles.morcillo@urv.cat

Algunos metabolitos derivados de aminoácidos aromáticos son conocidos por su implicación en la regulación del crecimiento y el control del *quorum sensing* en levaduras, así como en la respuesta adaptativa a cambios ambientales. Una de esas respuestas es la secreción de compuestos bioactivos como la melatonina. Este compuesto es una neurohormona producida en la glándula pineal en humanos, implicada en la regulación del ritmo circadiano, funciones reproductivas y actividad antioxidante (1,2). La melatonina es una molécula ubicua, podemos encontrarla en animales, plantas, bacterias y levaduras.

La melatonina ha sido descrita en vinos, por lo que la fermentación alcohólica junto con la acción de la levadura es crucial para su formación. Así mismo, en el estudio llevado a cabo por Rodríguez-Naranjo et al. (3) se demuestra que la fase de crecimiento, la concentración de azúcares reducidos y la composición del medio influyen en la producción de este compuesto. Siendo en éste último, la presencia de triptófano un elemento esencial dado que es el principal precursor.

El propósito de este estudio fue determinar la capacidad de varias levaduras para sintetizar melatonina durante el crecimiento y la fermentación alcohólica. Se utilizó para ello una selección que incluía 4 cepas de levaduras comerciales pertenecientes al género *Saccharomyces*, recomendadas para diferentes procesos fermentativos y nutricionales (Enoferm QA23, Instaferm RED, Levucell SC20 y Diamond) y 4 cepas de levadura no-*Saccharomyces* (*Torulasporea delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Starmerella bacillaris*, *Hanseniaspora uvarum*) para cuantificar la producción de melatonina intracelular y extracelular en mosto sintético. Las levaduras fueron sometidas a un precultivo durante 4 días, alternando un medio rico al principio y un medio pobre en nitrógeno en los últimos días. Posteriormente, fueron inoculadas en un mosto sintético modificado para tener una concentración de nitrógeno final de 100 mg/L así como 5 veces la concentración normal de los aminoácidos aromáticos

La producción de melatonina presenta un patrón similar entre las diferentes especies donde la síntesis aumenta al inicio de la fermentación, en las primeras horas de contacto con el mosto, siendo mayor en las cepas no-*Saccharomyces*, más concretamente en *S. bacillaris*. En cuanto a la exportación al medio extracelular, la melatonina presenta un patrón, de nuevo, similar entre las diferentes especies, apareciendo, en este caso, dos picos de concentración máxima a las 24 y 48 horas, siendo las levaduras *Saccharomyces* mayores productoras que las levaduras no-*Saccharomyces*. A partir de estos datos se podría postular que la melatonina tenga un papel como molécula señal.

Bibliografía

- (1) López A, García JA, Escames G, Venegas C, Ortiz F, López LC, Acuña-Castroviejo D (2009). Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. *J Pineal Res* 46, 188–198.
- (2) Serrano E, Venegas C, Escames G, Sánchez-Muñoz C, Zabala, M, Puertas, A, De Haro T, Gutiérrez A, Castillo M, Acuna-Castroviejo, D (2010). Antioxidant defence and inflammatory response in professional road cyclists during a 4-day competition. *J Sports Sci* 28, 1047–1056.
- (3) Rodríguez-Naranjo MI, Torija MJ, Mas A, Cantos-Villar E, García-Parrilla MC (2012). Production of melatonin by *Saccharomyces* strains under growth and fermentation conditions. *J Pineal Res* 53, 219–224.





SESIÓN VI

BIOTECNOLOGÍA ENZIMÁTICA

Diversidad de Xilanasas. Aplicaciones para la Valorización de la Biomasa

Francisco I. Javier Pastor*, Susana V. Valenzuela, Josefina Martínez, Pilar Díaz

Departamento de Genética, Microbiología y Estadística. Universidad de Barcelona. Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona. e-mail: fpastor@ub.edu

La degradación del xilano es una etapa crítica en el reciclado del carbono en la naturaleza, ya que constituye el segundo polisacárido más abundante de la tierra, tras la celulosa. Su despolimerización catalítica es objeto de gran esfuerzo investigador para la bioconversión de la biomasa vegetal en productos de alto valor añadido y como fuente de energía renovable. El xilano está formado por una cadena central de monómeros de xilosa unidos por enlaces $\beta(1,4)$, que dependiendo de la planta de origen, puede estar ramificada por diferentes residuos, siendo los más frecuentes el ácido metilglucurónico y la arabinosa, que presentan una abundancia relativa muy diferente en xilanos de distintos orígenes. Las xilanasas, enzimas que hidrolizan los enlaces internos del esqueleto de $\beta(1,4)$ xilosas, desempeñan un papel fundamental en la biodegradación del xilano. La mayoría de las xilanasas caracterizadas hasta el momento pertenecen a las familias 10 o 11 de las glicosil hidrolasas (GH10, GH11) y no muestran diferencias importantes en la especificidad de sustrato. Recientemente, se han caracterizado varias nuevas xilanasas que se han incluido en las familias 30, 5 y 8 de las glicosil hidrolasas. Entre ellas, las xilanasas bacterianas GH30 muestran actividad exclusiva sobre glucuronoxilano, mientras que el único ejemplo descrito de xilanasas GH5 tiene actividad exclusivamente sobre xilano ramificado por arabinosa. Dada la abundancia del xilano en la biomasa, las xilanasas tienen numerosas aplicaciones biotecnológicas. El blanqueo de la pasta de papel es una de las aplicaciones industriales más importantes de estas enzimas, ya que contribuyen a disminuir la dosis de blanqueantes químicos y consecuentemente minimizan la generación de residuos tóxicos (organoclorados adsorbibles, AOX). Varios trabajos publicados han evaluado la efectividad de xilanasas de las familias GH10 y GH11 en el bioblanqueo, indicando que las xilanasas de la familia GH11 podrían ser más eficientes, aunque existen muchos otros factores tales como el origen de las enzimas y de la pasta de papel, y el proceso de pasteado, que contribuyen al efecto potenciador de blanqueo de una xilanasas. Adicionalmente, las xilanasas facilitan la eliminación de ácidos hexenurónicos (HexAs), que aceleran la indeseada reversión de blancura (envejecimiento del papel). El tratamiento con xilanasas también puede aplicarse para la valorización de pastas de papel, tales como las pastas kraft, a pastas para disolver, como punto de partida para la obtención de celulosas químicas. La contribución de las xilanasas a la deconstrucción de la pared celular vegetal está también siendo evaluada actualmente, para facilitar el acceso de enzimas activas sobre la lignocelulosa a los polímeros de la biomasa, para la producción de bioetanol y productos de biorefinería y nanomateriales.

Las xilanasas bacterianas de la familia GH30 requieren de ramificaciones de ácido metil glucurónico para su actividad sobre el xilano, y liberan oligosacáridos ramificados en el penúltimo residuo de xilosa como únicos productos de hidrólisis. La estructura cristalina de estas enzimas ha sido resuelta, mostrando un típico barril $(\alpha/\beta)_8$ unido a una estructura diferencial "β-side domain" exclusiva de estas enzimas¹. Estas xilanasas han sido evaluadas en el blanqueo de pastas de papel de eucalipto y sisal, mostrando su efectividad como adyuvantes de blanqueo². Su característico modo de acción sobre el xilano, hidrolizando enlaces únicamente en proximidad a las ramificaciones, puede tener potencial para la hidrólisis específica del glucuronoxilano, o para la obtención de xilooligosacáridos ramificados como nuevos prebióticos. Las propiedades de las xilanasas GH30 muestran la importante función de estas enzimas en la degradación del xilano y hacen evidente su potencial biotecnológico para la bioconversión de la biomasa vegetal. La complejidad química y heterogeneidad del xilano pone de manifiesto la multiplicidad de xilanasas producidas por los microorganismos.

1) Sainz Polo et al. 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

2) Valenzuela et al. 2014. Effectiveness of novel xylanases belonging to different GH families on lignin and hexenuronic acids removal from specialty sisal fibres. J. Chem. Technol. Biotechnol. 89: 401

Chemo-Enzymatic Synthesis of Functional Cationic Peptides: Evaluation as Gene Delivery Carriers

José Manuel Ageitos Martínez

Department of Microbiology and Parasitology, Biotechnology Unit, Faculty of Pharmacy, University of Santiago de Compostela 15706, Spain. josemanuel.ageitos@usc.es

The study of artificial vectors for gene delivery is emerging in the biotechnology field. These compounds have generated interest by their safety as compared with natural vectors such as modified virus. Most of non-viral gene vectors are based on cationic sequences that form electrostatic complexes with the negatively charged DNA. Examples of artificial vectors are the cationic peptides (CPs) composed by L-lysine (Lys) and L-arginine (Arg). Thereby, CPs can form complexes with DNA via ionic interactions and induce its internalization by cells. Cationic peptides are generally difficult to produce by recombinant expression due to they are toxic for bacteria [1]. Even though it is possible by chemical synthesis, it requires the use of polluting agents and several steps of deprotection, resulting in a high cost technology [2]. Moreover, the kinetically controlled synthesis of peptides is a green technology that allows production of good yield under mild conditions [3]. With the aim to simplify the production of CPs for gene delivery, the present work developed a chemo-enzymatic reaction mediated by proteinase K which enabled the synthesis of linear and branched CPs.

In order to observe the applicability of synthesized CPs, it was tested their ability to form ionic complex and gene transfection with 2 types of plasmid DNA (pDNA) encoding the reporter genes for luciferase and green fluorescent protein. Toxicity and transfection efficiency of CPs were evaluated with human embryonic kidney 293 cells.

As a result, it has been synthesized linear and branched CPs in one-pot reaction without using organic solvents or deprotection steps. Synthesized peptides exhibit transfection efficiencies comparable to previously reported monodisperse CPs [4]. The results show that chemo-enzymatic synthesis opens the door for efficient production of CPs for their use as gene delivery carriers by a fraction of the cost of traditional organic synthesis of peptides.

- [1] L. Metlitskaia, J.E. Cabralda, D. Suleman, C. Kerry, J. Brinkman, D. Bartfeld, et al., Recombinant antimicrobial peptides efficiently produced using novel cloning and purification processes., *Biotechnol. Appl. Biochem.* 39 (2004) 339–45. doi:10.1042/BA20030100.
- [2] K. Viswanathan, M.H. Schofield, I. Teraoka, R.A. Gross, Surprising metal binding properties of phytochelatin-like peptides prepared by protease-catalysis, *Green Chem.* 14 (2012) 1020–29. doi:10.1039/c2gc16063c.
- [3] J.M. Ageitos, P.J. Baker, M. Sugahara, K. Numata, Proteinase K-Catalyzed Synthesis of Linear and Star Oligo(l-phenylalanine) Conjugates., *Biomacromolecules.* 14 (2013) 3635–42. doi:10.1021/bm4009974.
- [4] J.M. Ageitos, J. Chuah, K. Numata, Chemo-Enzymatic Synthesis of Linear and Branched Cationic Peptides: Evaluation as Gene Carriers, *Macromol. Biosci.* 15 (2015) 990–1003. doi:10.1002/mabi.201400487.

Peroxidasas del Jurásico como nuevos biocatalizadores

Iván Ayuso-Fernández*, Francisco Javier Ruiz-Dueñas, Ángel T. Martínez

Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. C/ Ramiro de Maeztu, 9, 28040, Madrid, España.
ivan.ayuso@cib.csic.es

La gran diversidad de organismos que existe hoy día se debe en gran parte a la evolución de las proteínas. Como consecuencia de esto, el estudio de los cambios que han dado lugar a las proteínas actuales es clave en los análisis de evolución molecular. Para ello, la reconstrucción de estados ancestrales nos puede dar pistas de las funciones que tenían las proteínas en el pasado pero con la resurrección de dichas proteínas en el laboratorio se va un paso más allá al poderse analizar en las propiedades de las mismas. Este abordaje es especialmente interesante cuando las proteínas que se pretenden estudiar son enzimas de interés biotecnológico, ya que proporciona información básica acerca de las relaciones estructura-función y puede conducir al descubrimiento de propiedades perdidas a lo largo de la evolución y que son de interés para su aplicación en procesos industriales concretos.

El procesamiento de la lignina es uno de los principales problemas a los que se enfrenta la biotecnología blanca dirigida a establecer una bioeconomía sostenible basada en el aprovechamiento integral de la biomasa vegetal. La solución a este problema la encontramos en los basidiomicetos de podredumbre blanca. Estos organismos son los principales responsables de la degradación de este polímero aromático en un proceso en el que participan enzimas pertenecientes a tres familias de peroxidasas ligninolíticas: i) Lignina peroxidasa (LiP), que oxida compuestos aromáticos de alto potencial redox, incluyendo monómeros y dímeros modelo de lignina no fenólica; ii) Manganese peroxidasa (MnP), que oxida el Mn^{2+} a Mn^{3+} , cuyos quelatos actúan como oxidantes difusibles capaces de oxidar las unidades fenólicas de la lignina, minoritarias en su composición (algunas MnPs también oxidan compuestos de bajo potencial redox directamente, como por ejemplo fenoles derivados de la despolimerización de la lignina); y iii) Peroxidasa versátil (VP), que combina las actividades de LiP y MnP. También producen peroxidasas genéricas (GP), que sólo oxidan sustratos de bajo potencial redox. Estos cuatro tipos de peroxidasas han sido ampliamente estudiados y difieren en los sitios catalíticos que poseen.

La evolución de los organismos capaces de degradar la lignina y de sus enzimas ha sido investigada en los últimos años. El inicio de la degradación por parte de los hongos fue datada en el Carbonífero tardío y, tras el análisis de 10 genomas secuenciados del orden Polyporales, se ha propuesto una hipotética evolución de los sitios catalíticos de estas peroxidasas desde la aparición del primer hongo de podredumbre blanca. En el presente trabajo reconstruimos la historia evolutiva que lleva a la altamente especializada LiP (isoenzima H8) de *Phanerochaete chrysosporium*. Para ello, resucitamos las peroxidasas ancestrales más relevantes de dicha línea evolutiva que abarca desde el ancestro común de los Polyporales (cerca del Jurásico, hace 150 millones de años) hasta la enzima actual. La caracterización de estos ancestros nos permitirá analizar los cambios funcionales que estas enzimas han sufrido a lo largo de la evolución de los Polyporales, donde se incluyen la mayoría de hongos de la podredumbre blanca.

Además, la reconstrucción de estas enzimas ancestrales proporciona nuevas herramientas para la biotecnología. Las enzimas resucitadas tienen gran potencial biotecnológico ya que poseen propiedades que no se encuentran en sus descendientes (como una mayor estabilidad u otro tipo de actividades) que pueden ser interesantes a nivel industrial. Es más, dado su potencial evolutivo estas enzimas ancestrales podrán ser evolucionadas *in vitro* en el laboratorio para conseguir las propiedades que se deseen. Por ello, en este trabajo se presentan y discuten las peroxidasas resucitadas que muestran las propiedades más interesantes desde el punto de vista biotecnológico.

Búsqueda de nuevas Monooxigenasas Líticas de Polisacáridos. Evaluación en la degradación de material lignocelulósico

Susana V. Valenzuela*, Liliana Cerda, Guillem Ferreres, F. I. Javier Pastor

Departamento de Genética, Microbiología y Estadística, Universidad de Barcelona. Av. Diagonal 643, Barcelona 08028. E-mail: susanavalenzuela@ub.edu

Históricamente, la despolimerización enzimática del material lignocelulósico se ha considerado como un proceso deconstructivo, que es llevado a cabo por una combinación de diferentes enzimas hidrolíticas. Estas enzimas presentan diversas actividades y son capaces de actuar de manera sinérgica, con el fin de realizar la degradación de manera eficiente.

Sin embargo, recientemente se ha descrito un nuevo tipo de enzimas, denominadas “Monooxigenasas Líticas de Polisacáridos” o LPMOs por sus siglas en inglés (Lytic polysaccharide monooxygenases), las cuales rompen el paradigma que establece que la degradación de los enlaces glicosídicos es llevada a cabo únicamente mediante hidrólisis.

Las LPMOs son metaloenzimas dependientes de cobre, que rompen el enlace glicosídico por oxidación, en sustratos como la celulosa o la quitina (2). La catálisis requiere la unión de una molécula de oxígeno activo al átomo de cobre de la enzima, para realizar la despolimerización oxidativa del sustrato. Dependiendo del tipo de LPMO, los productos liberados son oligosacáridos que pueden estar oxidados tanto en su extremo reductor (C1) y/o en su extremo no reductor (C4) (3).

Actualmente, las LPMOs se han posicionado como un grupo enzimático significativo en la deconstrucción de macromoléculas recalcitrantes, incluyendo componentes de la pared celular vegetal, y otros polímeros de difícil degradación como la quitina. Recientemente, los ejemplos descritos con esta actividad enzimática han sido reclasificados dentro de las familias de proteínas con actividad accesoria AA9, AA10 y AA11 en la base de datos de proteínas activas sobre carbohidratos CAZy (1)

En el presente estudio, hemos realizado el análisis y comparación de la secuencia aminoacídica de los LPMOs ya caracterizados de familia AA10 (que corresponden en su mayoría a enzimas bacterianas) de acuerdo a su actividad. Con esta información hemos buscado nuevos posibles LPMOs en las bases de datos, con el fin de encontrar nuevas enzimas con actividad sobre materiales lignocelulósicos.

De los candidatos escogidos se clonaron 8 marcos abiertos de lectura, provenientes de diferentes especies bacterianas, con actividades probables sobre celulosa y sobre quitina. Adicionalmente, se clonó el gen que codifica para la AA10 más caracterizada hasta la fecha, la CBP21 de *Serratia marcescens*, con el fin de obtener un control positivo para la evaluación de las pruebas a realizar.

Se analizó la secuencia de todas las posibles LPMOs clonadas, para poder predecir el tipo de oligosacáridos que liberarían, de acuerdo a la similitud obtenida con las enzimas ya descritas.

Finalmente se realizaron ensayos enzimáticos y los productos obtenidos fueron sujetos a análisis por MALDI-TOF, con el fin de corroborar las predicciones de actividades realizadas.

[1] Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., Henrissat, B.(2014) *Nucleic Acids Res.* **42**, D490–5.

[2] Book, A. J., Yennamalli, R. M., Takasuka, T. E., Currie, C. R., Phillips, G. N., Fox, B. G.(2014) *Biotechnol. Biofuels* **7**, 109.

[3] Frommhagen, M., Sforza, S., Westphal, A. H., Visser, J., Hinz, S. W. A., Koetsier, M. J., van Berkel, W. J. H., Gruppen, H., Kabel, M. A.(2015) *Biotechnol. Biofuels* **8**, 101.



SESIÓN VII

BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

SESIÓN PATROCINADA POR:



El futuro de la biotecnología microbiana: Pasteur tenía razón

Daniel Ramón

Biopolis SL. Parque Científico-Universidad de Valencia. 46980 Paterna (Valencia). Email: daniel.ramon@biopolis.es

Los últimos diez años han dado lugar a avances muy importantes en las disciplinas científicas que componen la biotecnología. Lo más importante es que comenzamos a ver sus primeras aplicaciones industriales, como siempre, primero en el mundo farmacéutico y, posteriormente y de forma más tímida, en la agroalimentación. Hace diez años nadie hablaba de genómica, pero ahora ya hay empresas cotizando en bolsa que se dedican a estos menesteres. Mientras tanto, ¿qué ha sucedido en nuestro país? En los años de bonanza pocos empresarios hicieron una apuesta firme y decidida por la I+D. No valía la pena, era más fácil invertir en otros menesteres que generaban retornos más inmediatos. A buen seguro que ahora, tras estos últimos años de crisis, muchos se lamentan de ello. Pero también es cierto que otros si lo hicieron y ahora empiezan a recoger los frutos. Hay un perfil muy coincidente en todas estas empresas. Casi todas aprovecharon de forma inteligente convocatorias públicas de financiación a la I+D, como CENIT, que les ponían en sintonía con los excelentes grupos públicos de I+D de nuestras universidades y organismos públicos de investigación (fundamentalmente CSIC e INIA), y también con las PYMES biotecnológicas nacidas a la sombra de estos centros.

Como fruto de ello ya hay varios productos en el mercado que han usado las herramientas biotecnológicas para generar alimentos innovadores cuya venta se expande más allá de nuestras fronteras. Estos éxitos demuestran lo que en muchos países de nuestro entorno inmediato (Holanda, Suiza o países nórdicos, curiosamente los países con mayor cantidad de patentes agroalimentarias transferidas y en uso por millón de habitantes) es evidente: hay que crear espacios comunes donde se produzca esta convivencia entre las personas que generan buena ciencia (la mal llamada ciencia básica) y las que buscan sus aplicaciones desde el mundo industrial (la mal llamada ciencia aplicada).

Pero, ¿qué marcará el futuro? Sin duda las nuevas tecnologías de la genómica que nos van a permitir en muy pocos meses secuenciar un genoma humano por 100 dólares y en sólo unos minutos. También los próximos años nos depararán el desarrollo de tecnologías bioinformáticas que nos permitirán desentrañar en segundos el aluvión de datos que la genómica va a deparar. Conoceremos lo más íntimo desde el punto de vista molecular de nosotros, nuestro genoma letra a letra, como conoceremos lo más íntimo de los genomas de todo aquello que utilizamos como materia prima o como fermento en el mundo agroalimentario. Estos avances nos permitirán diseñar nuevos alimentos y nuevas dietas ajustadas a nuestra realidad genómica. Esta conjunción de la biotecnología, la informática y la ingeniería metabólica es la biología de sistemas. Hace dos Nestlé creó el Nestlé Institute of Health Sciences sólo para aplicar esta disciplina naciente en el mundo de la alimentación. Así funcionan los líderes.

Un nuevo chasis para la producción de esteroides

José Luis García*, Carmen Felpeto-Santero, Julia García-Fernández, Beatriz Galán

Laboratorio de Biotecnología Medioambiental. Departamento de Biología Medioambiental. Centro de Investigaciones Biológicas CSIC. C/ Ramiro de Maeztu 9. 28040 Madrid. jlgarcia@cib.csic.es

La biotransformación de esteroides con fines industriales constituye uno de los campos que mejor ejemplifican las ventajas de la integración de la química con la biotecnología para conseguir procesos más económicos y medioambientalmente más sostenibles. Actualmente muchos de los esteroides comerciales se sintetizan a partir de sintonas esteroidicas que se producen por una fermentación bacteriana de materias primas de bajo coste como son los fitoesteroles. En otros casos algunas de las reacciones de “decoración” de los esteroides que han de rendir productos modificados con residuos que poseen una determinada quiralidad se realizan utilizando hongos o bacterias como biocatalizadores. Hoy en día la mayoría de estas reacciones se llevan a cabo utilizando organismos aislados directamente de la naturaleza o ligeramente modificados por técnicas de mutagénesis convencional para optimizar su rendimiento. Estos organismos tienen el inconveniente de que en muchos casos poseen una batería amplia de actividades enzimáticas más allá de las deseadas lo que provoca que los esteroides se pueden modificar más de lo deseado causando pérdidas de rendimiento notables y sobre todo pérdidas económicas y de tiempo en los procesos de purificación de los productos al tener que separarlos de muchos contaminantes. Por este motivo resultaría interesante conseguir un chasis bacteriano “limpio” que pudiese servir para albergar distintas capacidades enzimáticas modificadoras de esteroides de tal manera que se pudieran diseñar biocatalizadores a la carta para cada biotransformación partiendo de un chasis vacío.

Dado que la mayor parte de las biotransformaciones de esteroides se realizan actualmente con actinobacterias de los géneros *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter* y *Gordonia*, entre otras, parece lógico pensar que un buen chasis para la biotransformación de esteroides podría surgir de entre las bacterias con características similares a estas. Una de estas bacterias es *Corynebacterium glutamicum*, muy bien conocida, considerada GRAS y cultivada en los mayores biorreactores desarrollados hasta la fecha a nivel industrial para la producción de aminoácidos. En esta ponencia se describen varios trabajos realizados para demostrar que *C. glutamicum* es un chasis robusto y limpio para la biotransformación de esteroides utilizándolo como biocatalizador para la expresión de enzimas recombinantes heterólogas procedentes tanto de bacterias como de hongos. Se presentan los casos de la producción de progesterona a partir de pregnenolona utilizando enzimas bacterianas y la producción de distintos derivados hidroxilados como por ejemplo corticosterona a partir de desoxicorticosterona utilizando citocromos fúngicos (1).

1. Felpeto-Santero C., Galán B., García J.L. (2016) PRODUCCIÓN DE ESTEROIDES 11 α HIDROXILADOS MEDIANTE BIOTRANSFORMACIÓN CON BACTERIAS RECOMBINANTES. Patente Española P201630701.

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos BFU2006-15214-C03-01, BFU2009-11545-C03-03 y BIO2012-39695-C02-01 del MINECO.

“Genome mining” de actinomicetos: activación de agrupaciones crípticas en *Streptomyces* para la producción de nuevos compuestos bioactivos.

R. Álvarez-Álvarez*, MG. Malmierca, C. Méndez, C. Olano y JA. Salas

Dpto. Biología Funcional (Área de Microbiología). I.U.O.P.A.C. Universidad de Oviedo. Oviedo. España.
alvarezaruben@uniovi.es

Las especies del género *Streptomyces* han sido descritas como productoras naturales de una amplia diversidad de compuestos con aplicación industrial, como antibióticos, antifúngicos, antitumorales, inmunomoduladores, herbicidas, etc. Desde la primera mitad del siglo XX, el cultivo en el laboratorio y fermentadores industriales de cada una de las especies del género producía uno o varios metabolitos secundarios. Los programas de “screening” para el aislamiento y caracterización de nuevos actinomicetos en diversos hábitats permitían ampliar el número de fármacos conocidos con interés industrial. Sin embargo, a partir de la década de los años setenta, el ritmo de descubrimiento de nuevos compuesto bioactivos fue ralentizándose.

La secuenciación del genoma de *Streptomyces coelicolor* en 2002¹ y sucesivamente distintas especies del género, ha puesto de manifiesto el potencial productor de estas especies, conteniendo en su genoma un número de agrupaciones biosintéticas de metabolitos secundarios muy superior al número de metabolitos que se producen en condiciones experimentales, o al menos, que son producidos a concentraciones suficientes para ser detectados. Estas agrupaciones silenciosas o crípticas pueden ser activadas para la obtención de nuevos fármacos mediante diferentes estrategias, microbiológicas, bioquímicas o de ingeniería genética.

En nuestro laboratorio disponemos de la colección “CS”, compuesta por un total de 96 especies del género *Streptomyces* asociadas a hormigas pertenecientes a la Tribu *Attini* del género *Acromyrmex octospinosus*. Tres de estas especies, *Streptomyces* CS57, CS149 y CS159 han sido secuenciadas por nuestro grupo. La secuencia completa de sus genomas, analizadas mediante el programa bioinformático *antiSMASH* (*antibiotics & secondary metabolite analysis shell*)², ha identificado la presencia de un total de 39, 29 y 28 posibles agrupaciones biosintéticas, respectivamente. Algunas de estas agrupaciones no presentan ortología con otras descritas en los genomas secuenciados de otros microorganismos, pudiendo estar implicadas en la biosíntesis de nuevos compuestos bioactivos.

Mediante la utilización de técnicas moleculares han sido clonados promotores constitutivos para control de operones de genes estructurales clave (*pks*, *nmps*, etc.) o se han sobreexpresado activadores específicos de ruta procedentes de estas agrupaciones. La fermentación en diferentes medios de cultivo de algunas de las cepas obtenidas ha mostrado la producción de nuevos compuestos no descritos en procariotas en comparación con la cepa parental.

¹ Bentley *et al.* (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3. *Nature*. 9:417(6885):141-7.

² Medema *et al.* (2011). antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res.* doi: 10.1093/nar/gkr466

Control de la expresión de múltiples agrupaciones génicas por un único regulador transcripcional PAS-LuxR

Cláudia M. Vicente, Antonio de Pedro*, Eva G. Barreales, Tamara D. Payero, Jesús F. Aparicio.

Universidad de León. Área de Microbiología, Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales, Campus de Vegazana s/n - 24071 León, España.

Los reguladores de tipo PAS-LuxR son proteínas altamente conservadas que están implicadas en el control de la producción de diferentes compuestos con actividad antifúngica mediante la unión a operadores situados en promotores de genes biosintéticos de polienos. Estos reguladores, que aparecen codificados en todas las agrupaciones génicas implicadas en la biosíntesis de policétidos de tipo polieno, han sido tradicionalmente considerados reguladores específicos de ruta.

PteF es el activador transcripcional PAS-LuxR de la biosíntesis de filipina en *Streptomyces avermitilis*. Mientras las cepas mutantes delecionadas en PteF manifiestan una pérdida severa de la producción de filipina, la duplicación del gen *pteF* dispara la producción del antifúngico. La acción directa de PteF sobre promotores de determinados genes implicados en la producción de filipina ha sido descrita con anterioridad.

Puesto que estos reguladores están funcionalmente conservados, era concebible que compartieran los mismos operadores. Por ello, hemos utilizado el operador canónico de PimM, arquetipo de esta clase de reguladores, para buscar posibles dianas de la proteína ortóloga PteF en el genoma de *S. avermitilis*. Como resultado, encontramos múltiples sitios de unión a ADN reconocidos por PimM (y por tanto por PteF) en el genoma. Se seleccionaron varios de estos operadores y su unión a PimM fue demostrada mediante ensayos de retraso en gel. El análisis comparativo del transcriptoma de las cepas parental y mutante mediante microarrays sugirió que PteF controla la biosíntesis de varios *clusters* biosintéticos de metabolitos secundarios. Como prueba de concepto, se ha demostrado el control directo de PteF sobre la producción del inhibidor de la ATP-sintasa oligomicina.

Nuestros resultados indican que, contrariamente a la opinión establecida, los reguladores PAS-LuxR controlan directamente muchos procesos diferentes no previstos anteriormente, tales como el procesamiento de la información genética, la replicación y reparación del ADN, el metabolismo energético, de los carbohidratos, de los lípidos, la diferenciación morfológica, la regulación transcripcional, y la biosíntesis de metabolitos secundarios, entre otros, mostrándose así, como moduladores de amplio espectro en las redes de regulación, lo que abre nuevas posibilidades para la mejora y activación de la producción de metabolitos en *Streptomyces*.



COMUNICACIONES POSTER

Okara based medium for the production of bacterial cellulose

Julia Fernandez*, Pilar Díaz, Francisco Javier Pastor, Josefina Martínez

Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística. Universitat de Barcelona. Avda. Diagonal 643, 08028 Barcelona.

Okara is the residue left from ground soy beans after extraction of the water extractable fraction, used to produce soy milk or tofu. Large quantities of curd of okara are produced worldwide, and this value is increasing as the soy-based products have been introduced into our culture. Okara is sometimes used as animal feed but most is dumped as waste. Okara is rich in organic water-insoluble ingredients (polysaccharides, protein, lipids) making it a potentially suitable substrate for microbial growth. Several studies have shown that bacterial growth on okara allows the production of bioactive substances (1,2,3).

Bacterial cellulose (BC) can be produced by some microorganisms. Although the molecular structure is identical to that of plant cellulose, BC displays exceptional physicochemical properties, such as an ultrafine reticulated structure, high crystallinity, high tensile strength, high hydrophilicity, and biocompatibility. These unique properties enable many successful applications and made of BC a multifunctional nano-biomaterial. An issue that restrains commercial production and extended application of BC is the high cost of the culture media used for bacterial growth and CB production.

In this work we examined the suitability of the okara as a substrate for the production of CB by *Komagateibacter xylinus*, a well-studied bacterial cellulose producer. After incubation of the bacteria on liquid culture in static conditions, a cellulosic film is obtained on the air-liquid interface. The okara was subjected to both, acid-based and enzymatic-based pretreatments as a means for hydrolyzing its polysaccharides in order to increase the amount of usable sugars by the bacteria. We compared the BC yield production obtained on okara-based media with that obtained on the standard high glucose medium (HS). Our results showed that okara allows growth of cellulose producing bacteria as well as the synthesis of cellulose. The BC yield production obtained is equivalent in both, okara and standard media. Pretreatment of okara is not necessary for the production of cellulose, but increased the yield of cellulose production. CB pellicles obtained with acid treated okara were clean and transparent. However, pellicles from no treated okara and from enzymatic treated okara had incorporated between the layers of cellulose small particles, probably from the material in resuspension of the culture medium. Our results indicated that the residue okara is a suitable substrate for BC production. Acid-hydrolyzed okara-based medium allows the production of clean CB membranes.

The replacement of glucose-based medium with okara for BC production not only could reduce production cost but also can properly use the excess of a waste from soy food industry.

- 1- Mizumoto S, Hirai M, Shoda M (2006) Production of lipopeptide antibiotic iturin A using soybean curd residue cultivated with *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation. Appl. Microbiol. Biot. 72:869-875
- 2- Shu-bin L, Zhou R, Xia L, Chu-yi, Ai-lin Y (2011) Solid state fermentation with okara for production of cellobiase-rich cellulases preparation by a selected *Bacillus subtilis* Pa5
- 3- Kumar K, Devi RA, Nair A, Balakrishnan, K (2013) Stimulatory effect of acid Hydrolysed okara fortified with L-asparagine on fungal L-asparaginase production by *Aspergillus terreus* MTCC1782

Using *Novosphingobium tardaugens* ARI-1 to describe the estradiol degradation pathway in bacteria

Juan Ibero*, David Sanz, Beatriz Galán, Eduardo Díaz and José Luis García

Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid. jicaballero@cib.csic.es

Among natural steroids present in nature acting as endocrine disruptors 17 β -estradiol (E2) is the most potent. Bacterial biodegradation has been proposed as a solution to remove some of those pollutants from the environment. *Novosphingobium tardaugens* NBRC 16725 (described as strain ARI-1), a Gram-negative aerobic bacterium, was isolated from activated sludge in a wastewater treatment plant in Japan. Fujii *et al.* [1] has described its ability to use 17 β -estradiol (E2) as sole carbon and energy source. However, the metabolic degradation pathway of this compound is largely unknown. A comparative *in silico* analysis based on the ARI-1 genome (access number PRJDB314) has allowed us to identify the genes putatively involved in the degradation pathway of E2. These genes are located in a gene cluster approximately 26 kb in size and are divided into at least three operons. The identified genes present a high similarity with those involved in the degradation of testosterone by *Comamonas testosteroni* and in the degradation of cholesterol and cholic acid in actinobacteria. Based on these similarities we were capable of assigning a function to most of them as well as to propose a pathway for E2 mineralization. A transcriptomic study was carried out to experimentally confirm the involvement of the selected genes in E2 degradation. The differential expression of those genes was studied comparing a control situation where the bacteria grew on pyruvate with other using E2 as sole carbon source. In addition, the ARI-1 strain was grown in the presence of different steroids as sole carbon source in order to assess its metabolic potential as a tool for the biodegradation of other endocrine disruptors. We are developing genetic tools for the accurate characterization of all gene functions as well as to identify the regulatory systems of E2 degradation pathway.

This work was funded by the Ramón Areces Foundation.

[1] Fujii, K., Kikuchi, S., Satomi, M., Ushio-Sata, N. & Morita, N. (2002). Degradation of 17 β -estradiol by a gram-negative bacterium isolated from activated sludge in a sewage treatment plant in Tokyo, Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2057–2060

[ELIMINADO]

Actividades enzimáticas de *Terribacillus* sp. AE2B 122 con aplicaciones medioambientales

Leyre Sánchez Barrionuevo^{a,b}, Almudena Escobar-Niño^{a,b}, David Cánovas^a, Encarnación Mellado^{*b}

^aDepartamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Sevilla, España

^bDepartamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, España. E-mail: emellado@us.es

La búsqueda de nuevas fuentes de energías alternativas, sostenibles y renovables se ha convertido en un área de investigación de gran importancia en los últimos años, debido, entre otras razones, a la previsión de que el petróleo se agote en las próximas décadas. En este sentido, el Biodiésel es una alternativa prometedora al gasóleo, debido a una serie de ventajas respecto al Diésel derivado del petróleo y a que puede ser utilizado en cualquier motor Diésel, sin necesidad de ningún tipo de modificación y con un rendimiento energético similar.

Una de las líneas de investigación más importantes consiste en el uso de lipasas para la producción de Biodiésel, permitiendo que la “biotecnología enzimática blanca” se introduzca en el sector industrial energético.

Las lipasas son uno de los grupos de enzimas industrialmente más utilizados. Su interés en la industria energética se centra en su utilización como catalizadores en la producción de Biodiésel, debido a la capacidad de estas enzimas para realizar reacciones de esterificación, interesterificación y transesterificación de aceites en medios no acuosos

Este trabajo se centra en el estudio de las actividades enzimáticas de la bacteria *Terribacillus* sp. AE2B122 la cual se ha aislado de una almazara de Écija (Sevilla) empleando una metodología de screening diseñada para la identificación de bacterias lipolíticas. Utilizando la maquinaria enzimática de esta cepa se ha desarrollado un proceso biocatalítico útil desde el punto de vista económico usando directamente el sobrenadante de *Terribacillus* sp. AE2B122, para producir Biofuel, en el cual se evita la separación del glicerol del producto final y la necesidad de la purificación de la enzima utilizada en la reacción, abaratando y simplificando el proceso de producción.

A partir de la secuenciación completa del genoma y su posterior análisis informático se identificaron 8 lipasas/esterasas que han sido caracterizadas para la identificación de las proteínas responsables de la actividad transesterificadora de esta cepa.

Lacasas: enzimas clave para la mejora de la viabilidad celular y la productividad en los procesos de producción de etanol lignocelulósico a altas cargas de sustrato

Moreno AD^{1,*}, Alvira P², Tomás-Pejó E³, Ibarra D⁴, Ballesteros M¹

¹CIEMAT, Departamento de Energía, Unidad de Biocombustibles, Madrid, España. ²LISBP, Université de Toulouse, CNRS, INRA, INSA, Toulouse, Francia. ³IMDEA Energía, Unidad de Procesos Biotecnológicos, Móstoles, España. ⁴INIA-CIFOR, Departamento de Productos Forestales, Laboratorio de Celulosa y Papel, Madrid, España.

En la conversión de los materiales lignocelulósicos a etanol por métodos biotecnológicos se requieren altas cargas de sustrato para alcanzar concentraciones de producto superiores a 40 g/L, y garantizar de ese modo la rentabilidad del proceso. Sin embargo, las severas condiciones (altas temperaturas, altas presiones, etc.) a las que se somete la biomasa para incrementar su accesibilidad a las enzimas hidrolíticas, promueven la formación de productos de degradación que limitan la fermentabilidad de los materiales pretratados. En el presente trabajo se ha estudiado el uso de una lacasa de origen fúngico (*Pycnoporus cinnabarinus*) y otra de origen bacteriano (Metzyme) con el fin de reducir el poder inhibitorio de la paja de trigo pretratada por explosión de vapor y así poder trabajar a mayores concentraciones de sustrato. Los efectos del tratamiento con lacasas se evaluaron en procesos de sacarificación y fermentación simultánea (SFS) con el material pretratado completo (MPC) o el residuo sólido insoluble (RSI, obtenido por filtración y lavado del MPC), y las levaduras *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 o *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red, respectivamente. Independientemente de la enzima o el material utilizado, el tratamiento con lacasa fue capaz de disminuir de forma selectiva aquellos inhibidores procedentes de la solubilización parcial de la lignina (derivados fenólicos). Al utilizar el MPC a una concentración del 9% (p/p), el tratamiento con la lacasa de *P. cinnabarinus* produjo una mayor reducción del contenido de fenoles totales en comparación al tratamiento con la lacasa de Metzyme (80% vs. 20%). A pesar de estas diferencias, ambos tratamientos atenuaron la pérdida de células viables de *K. marxianus* CECT 10875 durante los procesos de SFS, disminuyendo la fase de adaptación de esta levadura e incrementando los valores de productividad volumétrica de etanol. Sin embargo, tras incrementar la concentración de MPC al 11% (p/p), sólo la lacasa de *P. cinnabarinus* permitió la producción de etanol (16,7 g/L) durante el proceso de SFS (concentraciones superiores de MPC fueron completamente inhibitorias incluso tras el tratamiento con lacasa). Con el objetivo de alcanzar mayores concentraciones de sustrato, el residuo sólido insoluble y la levadura industrial *S. cerevisiae* Ethanol Red, se utilizaron en lugar del MPC y *K. marxianus* CECT 10875, respectivamente. Al trabajar al 25% (p/p) de RSI, el tratamiento con la lacasa de *P. cinnabarinus* disminuyó en un 65% los fenoles totales, permitiendo reducir la etapa de adaptación celular y alcanzándose una concentración final de etanol de 56 g/L en 48 h de SFS. Este estudio demuestra la capacidad de las lacasas para mejorar la viabilidad celular durante los procesos de fermentación de los materiales lignocelulósicos. De este modo se permite trabajar a mayores concentraciones de sustrato con mejores valores de productividades volumétricas y rendimientos de etanol, mejorando la viabilidad económica del proceso.

Agradecimientos: Este estudio ha sido parcialmente financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad a través de los proyectos ENE2014-315 54912-R y CTQ2013-47158-R y el subprograma Juan de la Cierva (ADM: FJCI-2014-22385), así como por el Séptimo Programa Marco de la Unión Europea (FP7/2007-2013) a través de las Acciones Marie Curie (ETP: Ref. nº REA-291803).

Efecto del estrés mecánico sobre *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae* en procesos de producción de bioetanol

José María Salor^{1*}, Mercedes Ballesteros^{1,2}, Elia Tomás-Pejó¹

¹IMDEA Energía. Unidad de Procesos Biotecnológicos. Av. Ramón de la Sagra 3, 28935 Móstoles, Madrid.
jose.salor@imdea.org

²CIEMAT. Unidad de Biocarburantes. Av. Complutense 40, 28040, Madrid

La sustitución de combustibles fósiles por combustibles renovables, como el bioetanol, es decisiva para conseguir la disminución de las emisiones de CO₂ y reducir la dependencia del petróleo. Es por ello que en las últimas décadas se han realizado avances significativos en la investigación de los procesos de producción de bioetanol lignocelulósico como sustitutivo de la gasolina. Este proceso de producción de bioetanol consta principalmente de las siguientes etapas: pretratamiento, hidrólisis y fermentación. Para que la producción de etanol de lignocelulosa sea económicamente competitiva, es necesario realizar todo el proceso a altas cargas de sustrato ya que a mayor concentración de azúcares en el medio de fermentación, mayores serán las concentraciones de etanol potencialmente alcanzables y, por tanto, menores los costes de la destilación. No obstante, el incremento de la carga de sustrato lleva asociada una mayor complejidad del medio debido al aumento en la concentración de fibras insolubles e inhibidores generados en el pretratamiento. El alto contenido en fibras insolubles puede provocar estrés mecánico en las levaduras, afectándose su capacidad fermentativa y la tolerancia a los inhibidores.

Con el objetivo de estudiar como afecta el estrés mecánico a las levaduras productoras de etanol, se realizaron fermentaciones en medio sintético (20 g/L glucosa) en presencia de fibras de roble (10% p/p y 20% p/p). Las cepas utilizadas fueron *Saccharomyces cerevisiae* F12 y *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. Esta última es una levadura termotolerante capaz de crecer y producir etanol a temperaturas superiores de 40 °C. Es por ello muy interesante en procesos de sacarificación y fermentación simultánea ya que permite realizar todo el proceso a temperaturas más cercanas al óptimo de las enzimas hidrolíticas (≈ 50°C).

En ausencia de fibras ambas cepas alcanzaron rendimientos de etanol de 0.41 g/g. *K. marxianus* CECT 10875 alcanzó las concentraciones máximas de etanol a las 24 h mientras que *S. cerevisiae* las alcanzó a las 48 h. No obstante, en presencia de 10% (p/p) de fibras los rendimientos de etanol disminuyeron un 27% y un 15% con *K. marxianus* y *S. cerevisiae*, respectivamente. Además, cabe destacar que *K. marxianus* no fue capaz de producir etanol al 20% (p/p) de fibras mientras que en el caso de *S. cerevisiae* no se vieron diferencias significativas con los resultados obtenidos con 10% (p/p) de fibras. Estos resultados indicaron claramente el efecto negativo que ejercen las fibras sobre la producción de etanol. Además, la cepa termotolerante fue más susceptible al estrés mecánico causados por las mismas. Esta mayor susceptibilidad podría estar relacionada con diferencias en la composición de la pared celular. El análisis de los carbohidratos de la pared celular también mostró diferencias entre ambas cepas ya que la concentración de carbohidratos de pared fue mayor en *K. marxianus* que en *S. cerevisiae*.

Para estudiar de forma más detallada las diferencias de expresión génica en células sometidas a diferentes niveles de estrés mecánico, las células de *S. cerevisiae* se recuperaron tras el proceso de fermentación en ausencia o con 10% (p/p) y 20% (p/p) de fibras para el análisis de expresión génica global mediante chips de ADN (GeneChip® Yeast Genome 2.0 Array).

Empleo de la minería genómica para la identificación de nuevos compuestos péptido-policetónicos híbridos producidos por *Streptomyces argillaceus*

Adriana Becerril*, Suhui Ye, Brian Molloy, Alfredo F. Braña, José A. Salas, Carmen Méndez

Departamento de Biología Funcional (Área de Microbiología) e Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA). Universidad de Oviedo. Julián Clavería s/n 33006 Oviedo. becerriladriana@uniovi.es

El desarrollo de las nuevas tecnologías en secuenciación masiva ha abierto un gran campo en la búsqueda de nuevos compuestos con actividad biológica (metabolitos secundarios). La secuenciación de los genomas completos de los principales productores de estos compuestos, el género bacteriano *Streptomyces*, ha puesto de manifiesto que estos contienen la maquinaria biosintética para producir muchos más compuestos de los que se detectan en las condiciones estándar del laboratorio.

En nuestro grupo se ha obtenido la secuencia completa del genoma de *Streptomyces argillaceus*, el principal productor del antitumoral mitramicina. El análisis bioinformático de la misma, mediante la herramienta *AntiSmash*, permitió identificar un total de 31 agrupaciones de genes de biosíntesis (*clusters*), entre los que cabe destacar 4 para la síntesis de policétidos (PK), 3 para péptidos no ribosomales (NRP), 2 híbridos NRP-PK, 4 terpenos y 3 lantipeptidos. Por otro lado, el análisis del genoma entorno a genes para activadores tipo SARP (*Streptomyces* Antibiotic Regulatory Protein), permitió localizar un *cluster* adicional.

Entre los 32 *clusters* identificados, se seleccionó el *cluster* 11 para su caracterización. Dicho *cluster* codifica para un compuesto NRP-PK híbrido y muestra una elevada similitud con un *cluster* de *S. canus* no identificado previamente y, en menor grado, con otros *clusters* de biosíntesis de antibióticos y antitumorales. La activación del *cluster* 11 se llevó a cabo combinando dos estrategias: (i) sobreexpresión de un gen regulador positivo (*ORF27*) del *cluster* y (ii) cultivo de la cepa resultante (*S. argillaceus* pEM4T-Reg831) en 30 medios de cultivo distintos. La comparación mediante UPLC de los perfiles metabólicos de esta cepa con los de un mutante en la *ORF37* (*S. argillaceus* NRPS-PKS Δ), que codifica una Péptido Sintetasa No Ribosomal-Policétido Sintasa (NRPS-PKS) híbrida, permitió identificar una serie de compuestos que estaban ausentes en la cepa mutante y que por tanto estarían codificados por este *cluster*. El análisis de sus espectros de absorción y masas permitió deducir que se trataba de una familia de compuestos relacionados entre sí que no se encuentran en el Diccionario de Productos Naturales, por lo que se trataría de compuestos PK-NRP híbridos nuevos. Los límites del *cluster* 11 se han establecido por comparación con el *cluster* identificado en *S. canus*, en combinación con la generación de mutantes en regiones limítrofes del mismo. Por otro lado, se han generado mutantes por reemplazamiento génico en genes de biosíntesis, lo que ha permitido identificar y caracterizar químicamente (por NMR y MS) posibles intermediarios biosintéticos de la ruta de estos compuestos NRP-PK híbridos.

Expresión heteróloga del agrupamiento génico de biosíntesis del inmunosupresor brasilicardina en especies no patógenas

Alma M^a Botas*; Alfredo F. Braña; Anina Bajac; Harald Gross; José A. Salas; Carmen Méndez

Departamento de Biología Funcional (Área de Microbiología) e Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA). Universidad de Oviedo. C/ Julián Clavería. 33006. Oviedo. termal69@gmail.com

El rechazo a los trasplantes ha ocasionado multitud de problemas en la medicina durante los últimos 60 años. Este puede reducirse eligiendo cuidadosamente el donante y mediante el uso de inmunosupresores. Entre estos últimos, los más utilizados han sido la ciclosporina y el tacrolimus, pero presentan efectos secundarios y muestran interacciones con otros medicamentos.

La Brasilicardina A (bca) es un metabolito secundario que posee actividad inmunosupresora y citotóxica y es producida por la bacteria *Nocardia terpenica*, patógena para humanos. Tiene estructura terpenoide con L-ramnosa, N-acetil-glucosamina (NAG) y un anillo hidroxibenzoico. La potencialidad de este producto natural es enorme, dado que presentan además menos efectos secundarios que el tacrolimus y la ciclosporina. Su producción presenta varios problemas: la cepa productora es un organismo perteneciente al nivel de bioseguridad 2, y el nivel de producción es bastante bajo. Por tanto, la producción de bca mediante fermentación clásica sería un proceso muy costoso y complicado. La posibilidad de generar la molécula completa por síntesis química tampoco sería una opción razonable, debido a la complejidad de la estructura. Es por ello que se aborda la expresión del agrupamiento de genes de biosíntesis (cluster) de bca en huéspedes no patógenos.

El análisis bioinformático del cluster de bca permitió determinar que contenía todos los genes necesarios para la biosíntesis de bca, a excepción de los genes de biosíntesis de los azúcares y de una glicosiltransferasa para la NAG. Dicho cluster se clonó en un fósido integrativo en *Streptomyces* y resistente a kanamicina (bcaAB01), para ser expresado en distintas cepas de *Streptomyces*. Como huéspedes se seleccionaron 45 cepas de *Streptomyces*, 7 pertenecientes a colecciones públicas, 2 cepas de *S. argillaceus* disponibles en el laboratorio que incrementarían la disponibilidad de precursores de bca, y 36 cepas de una colección disponible en el laboratorio (colección CS). Se consiguió introducir el cluster en 36 de las 45 cepas, en las que se detectó la producción de aglicón en 10 de las mismas. Dado que el cluster no contenía los genes de biosíntesis de ramnosa, se coexpresó bcaAB01 junto con un plásmido que dirige la biosíntesis de este azúcar (pRHAMo). Como resultado, en 4 de las cepas ensayadas se pudo detectar la producción de brasilicardina C (aglicón + ramnosa).

El cultivo de estas cepas en 15 medios de cultivo distintos permitió identificar 2 medios en los que la producción de brasilicardina C era superior, y detectar la producción de otros intermediarios biosintéticos de brasilicardina C en cantidades muy pequeñas, así como brasilicardina A.

Identificación de la 11 β -hidroxilasa de *Cochliobolus lunatus* y su aplicación biotecnológica para la para la producción de corticoides de uso farmacológico

Beatriz Galán^{1*}, Carmen Felpeto-Santero¹, Carlos del Cerro¹ y José L. García¹

¹Dpto. Biología Medioambiental, CIB- CSIC, Madrid, España, bgalan@cib.csic.es

Los esteroides representan uno de los grandes sectores en la industria farmacéutica con una producción anual de más de 1000000 toneladas. Los procesos de biotransformación de estos compuestos han sido de gran interés para la industria desde que en 1952 se descubriese un hongo perteneciente al género *Rhizopus* capaz de 11 α -hidroxilar la progesterona, proceso que redujo el coste de producción 200 veces. Desde entonces, los hongos han sido las biofactorías empleadas en la producción industrial de corticoesteroides. Sin embargo, uno de los principales inconvenientes de estas biotransformaciones es que generalmente los hongos realizan varias modificaciones simultáneas en el compuesto esteroideo, dando lugar al compuesto de interés y otros subproductos haciendo descender los rendimientos. Para aumentar los rendimientos en las biotransformaciones se han realizado estrategias clásicas de mutación al azar gracias a las cuales se ha conseguido mejorar las cepas utilizadas aunque la aparición de intermediarios continua siendo un problema. Debido a la dificultad de conseguir compuestos 11-hidroxilados sin subproductos, nuestro principal interés radica en una vez identificada, producir de forma heteróloga la enzima con dicha actividad en hospedadores que no realicen modificaciones adicionales sobre los compuestos esteroideos. El hongo *Cochliobolus lunatus* es capaz de 11 β -hidroxilar diferentes esteroides, reacción muy importante en la producción de hidrocortisona. Sin embargo hasta la fecha no se ha identificado el gen que codifica el enzima responsable de esta actividad. En el presente trabajo se han identificado mediante análisis bioinformáticos varios candidatos que podrían codificar el citocromo P450 (CYP) con actividad 11 β -hidroxilasa de *C. lunatus*, así como varios candidatos que podrían codificar la citocromo reductasa (CPR) que aportaría el poder reductor necesario para dicha actividad. Mediante estudios de expresión génica se confirmó que el CYP103168 se inducía en presencia de deoxicorticosterona, progesterona y androstenediona y las CPR64795 y CPR59830 se expresaban de forma constitutiva. Para comprobar la posible actividad 11 β -hidroxilasa del candidato seleccionado se construyeron dos operones: el operón FAN, que contenía el CYP103168 y la CPR64795 y el operón FIN, con el CYP103168 y la CPR59830. Estos dos operones se clonaron en un vector replicativo para expresarse en la bacteria de uso industrial *Corynebacterium glutamicum* cuyo genoma está secuenciado y se conoce que no posee metabolismo endógeno para degradar/modificar esteroides. Se realizaron ensayos de biotransformación utilizando diferentes sustratos y se confirmó que el operón FAN tenía actividad 11 β -hidroxilasa sobre todos ellos. En este trabajo se ha conseguido, por un lado, la identificación de la actividad 11 β -hidroxilasa del hongo *C. lunatus*, y además la constatación de *C. glutamicum* como un excelente chasis para abordar la producción de corticoides de interés farmacológico.

Caracterización y manipulación del *cluster* génico de biosíntesis de los macrólidos antitumorales PM100117 y PM100118: obtención de derivados mejorados

Raúl García Salcedo^{a*}, Carlos Olano^a, Cristina Gómez^a, Rogelio Fernández^b, Alfredo F. Braña^a, Carmen Méndez^a, Fernando de la Calle^b, José A. Salas^a

^aDepartamento de Biología Funcional e Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (I.U.O.P.A), Universidad de Oviedo, 33006, Oviedo (Asturias) raul.garcia.salcedo@gmx.com

^bÁrea de Drug Discovery, PharmaMar S.A. Avda. de los Reyes 1, 28770, Colmenar Viejo (Madrid)

PM100117 y PM100118 son policetidos glicosilados con una elevada actividad antitumoral producidos por la actinobacteria *Streptomyces caniferus* GUA-06-05-006A, la cual fue aislada como microorganismo endosimbionte de un invertebrado marino. La estructura química de estos compuestos consiste en una lactona macrocíclica, a la que se une una cadena compuesta de tres deoxiazúcares (L-axenose, L-2-deoxifucosa y L-rhodinosa) y un cromóforo tipo naftoquinona [1] cuya estructura y biosíntesis está relacionada con la de menaquinona. La secuenciación del cromosoma de *S. caniferus* GUA-06-05-006A ha permitido la identificación del *cluster* génico para la biosíntesis de PM100117 y PM100118, el cual ha sido caracterizado mediante análisis bioinformático y la generación de varias cepas mutantes. El producto génico deducido de cuatro genes del *cluster* posee una elevada identidad con enzimas implicadas en la biosíntesis de menaquinona a partir de fualosina [2]. La mutación por delección de uno de estos genes conllevó una disminución en los niveles de producción de PM100117 y PM100118, así como la acumulación de varios análogos estructurales carentes de naftoquinona. Dichos compuestos derivados mostraron una disminución considerable de su actividad citotóxica con respecto a los compuestos parentales PM100117 y PM100118. Asimismo, los experimentos de mutación han demostrado que otros cinco genes del *cluster* están también implicados en la biosíntesis del componente naftoquinona. Por otro lado, la delección de un gen putativo citocromo P450 permitió la obtención de dos compuestos derivados, carentes de un grupo ceto en el aglicón, con una mayor actividad citotóxica *in vitro* frente a distintas líneas tumorales que la de los correspondientes productos naturales. Aunque previamente ya se habían descrito varios compuestos bioactivos estructuralmente relacionados con PM100117 y PM100118 [3, 4], este es hasta la fecha el primer análisis relativo a las bases genéticas de su biosíntesis. Los resultados de este análisis son una excelente contribución para la futura obtención de nuevos derivados de estos compuestos mediante ingeniería genética y biosíntesis combinatoria. Además, este trabajo ha arrojado interesantes observaciones sobre la relación entre la estructura y la actividad de PM100117 y PM100118, las cuales podrían ser también extrapoladas a otros compuestos estructuralmente relacionados.

Referencias:

1. Pérez M. *et al.*, *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2016;69:388-94.
2. Dairi T., *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2009;62:347-52.
3. Helaly S.E. *et al.*, *J. Nat. Prod.* 2012;75:1018-24.
4. Takahashi I., Nishiie Y., Uosaki Y., Ochiai K., Patent JPH09100290; 1997.

Efecto de la regulación por γ -butirolactonas en la producción de filipina por *Streptomyces filipinensis*

Eva G. Barreales*, Antonio de Pedro, Tamara D. Payero, Cláudia M. Vicente, Jesús F. Aparicio

Área de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad de León, 24071 León (España). e-mail: egarcb@unileon.es

La filipina es un antifúngico macrólido poliénico no glicosilado producida industrialmente por *Streptomyces filipinensis*. Debido a su gran afinidad por el colesterol, es comúnmente utilizada para la detección y cuantificación del mismo en membranas celulares y para el diagnóstico de la enfermedad de Niemman-Pick de tipo C.

Uno de los elementos clave en la regulación del metabolismo secundario en *Streptomyces* lo constituyen unas pequeñas moléculas de estructura γ -butirolactona (GBLs) que actúan como *hormonas* bacterianas, interviniendo en la regulación de la producción de antibióticos y en algunos casos también en la diferenciación morfológica. Estas moléculas actúan uniéndose a proteínas receptoras específicas (GBRs) modificando su conformación, y forzando su separación de operadores en el ADN, normalmente activando de esta forma la expresión génica.

En este trabajo, se rastreó una librería genómica de *S. filipinensis* DSM 40112 con una sonda diseñada a partir de un motivo HTH de unión al ADN conservado en distintos receptores de butirolactonas. Como resultado, se identificó un posible gen codificante de un GBR (*sfbR*). Aproximadamente 4 kb corriente abajo de *sfbR* se encontraron un posible gen para la biosíntesis de GBLs (*sfbA*) y, adyacente, un gen codificante de un pseudo-GBR (*sfbR2*). El estudio de la función de *sfbR* y *sfbA* en la biosíntesis de filipina se llevó a cabo mediante experimentos de delección y complementación génica.

El gen *sfbR* codifica una posible proteína receptora de GBLs que presenta alta identidad con otros receptores como AvaR de *S. avermitilis*. La delección de este gen disminuyó significativamente la producción de filipina, mientras que la complementación la restauró a niveles de la cepa parental. Esto sugiere que SfbR actúa como un regulador positivo de la expresión de los genes biosintéticos de la filipina. En consonancia con estos resultados, la delección de *sfbA*, similar a genes codificantes para enzimas biosintéticas de butirolactonas como BarX o AfsA, también resultó en un descenso significativo en la producción de filipina. La comparación del crecimiento y esporulación en distintos medios sólidos entre la cepa silvestre y la mutante carente de *sfbR* mostró que la delección del gen también produce una alteración de la diferenciación morfológica.

Nuestros resultados indican que la proteína SfbR regula tanto la esporulación como la producción de filipina en *S. filipinensis*, y que esta regulación depende de su interacción con la butirolactona sintetizada por SfbA.

Búsqueda de nuevos compuestos glicosilados producidos por actinobacterias aisladas de hormigas cortadoras de hojas.

Mónica G. Malmierca*, Lorena González, Alfredo Braña, Carmen Méndez, Carlos Olano y José A. Salas.

Departamento de Biología Funcional, Área de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo, C/ Julián Clavería s/n, 33006. E-mail: mgomh@unileon.es

La búsqueda de nuevos fármacos activos frente a patógenos resistentes o de antitumorales más efectivos y con menos efectos secundarios es uno de los principales retos a los que se enfrenta la biomedicina actual.¹ Sin embargo, el ritmo de descubrimiento de nuevos compuestos naturales con interés en farmacología ha disminuido drásticamente en las últimas décadas debido al re-aislamiento de los mismos metabolitos una y otra vez. Para abordar este problema se han planteado nuevas estrategias, incluyendo la manipulación genética o química para la activación y/o mejora de la producción y la búsqueda de cepas productoras en ambientes poco explorados hasta el momento, como bacterias que viven en simbiosis con insectos.^{2,3}

Muchos de los compuestos bioactivos sintetizados por bacterias del género *Streptomyces* están glicosilados. Los azúcares que forman parte de estos metabolitos son mayoritariamente desoxiazúcares, concretamente los 6-desoxiazúcares aparecen muy a menudo formando parte de compuestos con actividad antibiótica o antitumoral (mitramicina, avermectina, doxorubicina, etc.).⁴ Se ha demostrado que estos azúcares juegan un papel muy importante en la actividad biológica del compuesto ya que en muchos casos ayudan al reconocimiento de su diana celular.⁵ Todo esto ha motivado una intensa investigación alrededor de este tipo de compuestos, centrada en 3 aspectos principales: obtención de nuevos metabolitos glicosilados, estudio de sus rutas de biosíntesis y generación de nuevos derivados.

Nuestro grupo dispone de una colección de 79 cepas de Actinomycetos aislados de la cutícula de hormigas cortadoras de hojas recogidas en Perú. Se hizo un análisis inicial para detectar la presencia de genes implicados en glicosilación en estas cepas, empleando oligonucleótidos degenerados que amplificaban regiones conservadas de genes implicados en la síntesis de desoxiazúcares (glucosa sintasa, 4,6-dehidratasa y 2,3-dehidratasa). De las 64 cepas positivas, se seleccionaron 35 para continuar con su estudio debido a su capacidad para ser manipuladas genéticamente. La estrategia para detectar compuestos glicosilados se basó en la generación de mutantes en los que se interrumpieron los genes anteriormente mencionados, su posterior crecimiento en diferentes medios de cultivo y la comparación de sus perfiles de producción de metabolitos mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (UPLC).

Se obtuvieron mutantes en 17 de las cepas que, tras el análisis de sus cromatogramas y estudios de desreplicación de los metabolitos producidos, se clasificaron en 3 grupos: (I) mutantes en los que desapareció la producción de compuestos ya conocidos: cromomicina, lobofoquinas, cervimicinas, benzantrinas y vicenistatina; (II) mutantes en los que desapareció la producción de compuestos *a priori* no descritos y (III) mutantes en los que no se observaron diferencias con respecto a la cepa silvestre (lo que indicaría la presencia de agrupamientos génicos de biosíntesis crípticos o silenciosos con potencial interés).

Para identificar los genes de biosíntesis implicados en la producción de estos compuestos, se han secuenciado los genomas de 9 de las cepas incluidas en los grupos II y III. Así, entre otros, se ha identificado en la cepa CS149 el agrupamiento génico implicado en la biosíntesis de la incednina B, policétido cíclico con 2 azúcares no descrito hasta el momento y que presenta una buena actividad citotóxica frente a varias líneas celulares tumorales.

El trabajo realizado demuestra la eficacia de la estrategia seguida a la hora de identificar compuestos glicosilados y pone de manifiesto el gran potencial de las bacterias en simbiosis con insectos como productoras de este tipo de metabolitos.

1. C. Olano, C. Méndez, J.A. Salas, *Microbial Biotechnology*, 2011, **4**, 144-164.
2. M. Poulsen, D.C. Oh, J. Clardy, C.R. Currie, *PloS One*, 2011, **6**, e16763.
3. J.S. Zarins-Tutt, T.T. Barberi, H. Gao, A. Mearns-Spragg, L. Zhang, D.J. Newman, R.J. Goss, *Natural Products Reports*, 2016, **33**(1):54-72.
4. J.A. Salas, C. Méndez, *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2005, **9**, 77-85.
5. A.C. Weymouth-Wilson, *Natural Product Reports*, 1997, **14**, 99-110.



Bioreactor Optimization Production of the Family of Fungal Antibiotics MDN-0057 & MDN-58

V. Gonzalez-Menendez*, L. Lorenzo, J. Martin, N. el Aouad, J.R. Tormo, F. Reyes and O. Genilloud

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

The novel family of broad spectrum Gram negative antibiotics MDN-0057 and MDN-0058 was previously reported as isolated from the liquid cultures of a grass endophytic fungus. In this study we describe the optimization of the antibiotics production and scale-up fermentation in 7L bioreactors as part of the development studies performed to ensure the large scale production of these novel compounds.

The Biolog FF MicroPlate system was applied for evaluating the use of 95 carbon and nitrogen sources in fermentation media by the producing fungal strain. The substrate utilization patterns guided the selection of nutritional components for media optimization of MDN-57 production. Scaled-up fermentations were performed in 7L Applikon BioBundle bioreactors combining both 6 bladed Rushton impellers (100 mm) and marine 3 bladed impellers (60 mm, vortex). Cultivations were carried out for 10 days at 22 °C, air flow rate was adjusted to 2L/min, with an agitation speed of 500 r.p.m and a pH initially adjusted to 5.5.

In fungal pre-optimization studies, fungal culture growth was monitored by absorbance in each well of the FF MicroPlate and D-cellobiose resulted to be the best substrate for our strain. The optimized medium YEC containing D-cellobiose as principal carbon source ensured the best yield for antibiotic production in the 7-liter bioreactor, with a 2-fold yield in comparison with YES medium (sucrose as carbon source).

The FF MicroPlate was shown to be a useful tool for the prior selection of the best nutritional conditions for large scale fungal fermentations in large scale. A strong correlation was found between substrate utilization, growth, and MDN-57 production.

References

Patent WO 2015/000825A1 Compounds with antibacterial activity

Novel *Streptomyces* spp. Φ BT1 site-specific integrating vectors

Nathaly González-Quiñonez*, María Teresa López-García, Paula Yagüe, Beatriz Rioseras, Annalisa Pisciotta, Rosa Alduina, Ángel Manteca

Área de Microbiología, Departamento de Biología Funcional e IUOPA, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo, 33006 Oviedo, Spain. natygg@gmail.com

Genetic tools to study *Streptomyces* have been extensively optimized during the last decades (Kieser *et al.* 2000). ϕ C31 vectors were the first and the most used integrative plasmids designed to work in *Streptomyces* (Bierman *et al.* 1992). The most important limitation of these plasmids is that they integrate in different positions of *Streptomyces* genome, generating diverse mutations (Combes *et al.* 2002). When ϕ C31 plasmids are used to introduce genes in *Streptomyces*, the phenotypes detected can be consequence of plasmid integration, instead of the gene introduced. The less common Φ BT1-derived vectors integrate at the unique *attB* site localized into the *SCO4848* gene (*S. coelicolor* genome) or their orthologues in other streptomycetes. Integration generates an alternative version of *SCO4848*, which was described like functional and likely to generate a neutral phenotype (Gregory *et al.* 2003). This work demonstrates that disruption of *SCO4848* generates an unknown delay in spore germination. *SCO4848* is co-transcribed with *SCO4849*, and the phenotype is caused by the mutation in *SCO4849*. The spore germination delay is complemented by *SCO4849*. Plasmids pNG1-4 were created modifying the Φ BT1 integrative vector pMS82, introducing a copy of *SCO4849* under the control of the *SCO4848* promoter region. Plasmids pNG2 and pNG4 included also a *PerME** to facilitate gene overexpression; pNG3 and pNG4 included a copy of the *bla* ampicillin resistance gene to facilitate selection in *E. coli*. These four plasmids are the only integrative vectors designed to produce a neutral phenotype when they are integrated into the *Streptomyces* genome.

References:

1. Bierman, M., Logan R., O'Brien K., Seno E.T., Rao R.N., y B. E. Schoner. 1992. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene*, 116:43–49.
2. Combes, P., Till R., Bee S., y M.C. Smith. 2002. The *Streptomyces* genome contains multiple pseudo-attB sites for the ϕ C31-encoded site-specific recombination system. *J. Bacteriol.*, 184:5746–5752.
3. Gregory, M.A., Till, R., y M.C. Smith 2003. Integration site for *Streptomyces* phage ϕ iBT1 and development of site-specific integrating vectors. *J. Bacteriol.*, 185(17):5320-5323.
4. Kieser, T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F. y D.A. Hopwood. 2000. Practical *Streptomyces* genetics. The John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom.

SCO4117: factor sigma extracitoplasmático implicado en la regulación de la producción de antibióticos y el desarrollo morfológico en *Streptomyces coelicolor*.

M^a Teresa López-García*, Paula Yagüe, Beatriz Rioseras, Nathaly González-Quiñónez, Ángel Manteca.

Área de Microbiología, Departamento de Biología Funcional e IUOPA, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo. Julián Clavería s/n 33006.

e-mail: maitelopez@uniovi.es

El genoma de *S. coelicolor*, al igual que gran parte de Actinomycetos, contiene un alto número de factores sigma, subunidades de la ARN polimerasa encargadas del reconocimiento específico de los promotores. Entre los factores sigma, el grupo ECF (extracytoplasmic function) es el más amplio y el que presenta una mayor diversidad de estructuras y mecanismos de regulación. Su activación se produce bajo determinados cambios ambientales, y da lugar a la transcripción de una serie de genes diana que permiten a la célula adaptarse a la nueva situación.

SCO4117 pertenece a la familia ECF52, recientemente descrita y que únicamente se encuentra en Actinobacterias. Es una proteína transmembrana compleja que presenta un dominio ECF en el extremo amino junto a un dominio ZAS típico de factores anti-sigma, y un dominio de unión a carbohidratos en el extremo carboxilo.

Para analizar la función de SCO4117 se han realizado varios mutantes. El primero de ellos (SCO4117::Tn5062) se ha obtenido mediante la inserción del transposón Tn5062, lo que da lugar a la delección de la mayor parte del gen, incluidas las regiones transmembrana. Este mutante, que conserva el extremo amino con el dominio ECF, presenta una elevada producción de antibióticos y un adelanto del desarrollo y la esporulación. Sin embargo, la delección completa del gen (Δ SCO4117) apenas afecta a la producción de antibióticos y sorprendentemente retrasa la diferenciación morfológica. Mediante RT-PCR a tiempo real se ha determinado que la expresión de SCO4117 en la cepa parental se induce en el micelio productor (MII), mientras que en el mutante SCO4117::Tn5062 la mayor expresión tiene lugar a tiempos tempranos en un micelio todavía no diferenciado (MI).

Estos resultados sugieren que SCO4117 codifica un factor sigma ECF que se autorregula positivamente en tiempos tempranos y que induce la diferenciación morfológica y la producción de antibióticos cuando no está unido a la membrana.

Cloning of 11- α -hydroxylase from *Aspergillus nidulans*

Lidia Ortega de los Ríos*, José María Luengo Rodríguez, José Manuel Fernández Cañón

Dpto. Biología Molecular. Instituto de Biología Molecular, Genómica y Proteómica. Universidad de León. Campus Vegazana, s/n. 24071. León. lortd@unileon.es / jmferc@unileon.es

Steroids are a group of natural compounds derived from the cyclopentano-perhydro-phenantrene nucleus that have a distinguished commercial value in the pharmaceutical industry due to their physiological effects. They are employed as anti-inflammatories, contraceptives, anabolic steroids, in hormone therapies or as immunosuppressives. Furthermore, they are also essential to face autoimmune diseases or some types of cancer.

Nowadays, microbial transformation of steroid precursors is winning relevance opposite to the chemical synthesis, since it allows decreasing time, expenses and environmental pollution. Pharmaceutical industry tends to use cholesterol and phytosterols as precursors because of their low cost. *Aspergillus nidulans*, whose biochemistry and genetics are well known, has been chosen for its capacity of 11- α -hydroxylation over some steroids which provides them anti-inflammatory properties. We have cloned the gene encoding this enzyme with the aim to introduce it in other microorganisms, such as *Mycobacterium smegmatis*, used in the industry to split the C17-side-chain of phytosterols, and, thus, creating a recombinant microorganism able to generate useful steroid compounds from cheap precursors in just one-step-fermentation.

The cloning of the enzyme 11- α -hydroxylase present in *A. nidulans* has been accomplished following the method of Suppression Subtractive Hybridization (SSH) described by Diatchenko et al. in 1996 (1). This technique is based on the hybridization of complementary cDNAs (induced and non-induced cDNAs). In this way, we remove the sequences that are presents both in induced and non-induced populations of cDNAs and only preserve the ones that appear as a consequence of the presence the inductor (androstenedione, AD), since they will not be hybridized. Selection of +cDNAs not hybridized is possible thanks to the join of specific adaptors which allow an exponential amplification in a PCR process.

The screening of the candidate genes was made by RT-PCR using cDNAs coming from non-induced and induced mycelium (with progesterone, AD or testosterone) while definitive testing was possible thanks to the generation of a knock-out strain where we interrupted the candidate gene with the *pyrG* gene of *A. fumigatus* according to a procedure of fusion PCR described by Szewczyk et al. in 2006 (2).

References:

1. Diatchenko, L., Lau, Y. F., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B. and Lukyanov, S. (1996). Suppression Subtractive Hybridization: A Method for Generating Differentially Regulated or Tissue-Specific cDNA Probes and Libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (12): 6025-30.
2. Szewczyk, E., Nayak, T., Oakley, C. E., Edgerton, H., Xiong, Y., Taheri-Talesh, N., Osmani, S. A., Oakley, B. R. and Oakley, B. (2006). Fusion PCR and Gene Targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nature Protocols* 1 (6): 3111-20. doi:10.1038/nprot.2006.405.

Estudio de los microorganismos implicados en el metabolismo del gluten presentes en la leche materna y su aplicación como probióticos en el tratamiento de la enfermedad celiaca

Jenifer Pérez-Andrés*¹, Alexandra R. Herrán¹, Sergio Gutiérrez², Alba M. García-Lino¹, Esther Nistal¹, Alberto Caminero¹, Miguel Ángel Ferrero², Leandro B. Rodríguez-Aparicio², Cristina Iglesias-Blázquez³, José María G. Ruiz de Morales⁴, Javier Casqueiro¹

¹Área de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad de León (Campus de Vegazana s/n 24071 León). ²Área de Bioquímica, Facultad de Veterinaria, Universidad de León (Campus de Vegazana s/n 24071 León). ³Servicio de Pediatría, Hospital de León (Altos de Nava s/n 24071 León), ⁴Servicio de Inmunología, Hospital de León (Altos de Nava s/n 24071 León). Email: jperea@unileon.es

La enfermedad celiaca (EC) es una enteropatía inflamatoria crónica del intestino delgado que aparece en individuos genéticamente susceptibles y es causada por una respuesta inmune inapropiada a las proteínas del gluten presentes en el trigo, así como a proteínas similares presentes en la cebada y el centeno. La EC afecta aproximadamente al 1% de la población mundial, y actualmente el único tratamiento es una dieta libre de gluten de por vida.

La leche materna es un fluido biológico complejo que se encuentra perfectamente adaptado para satisfacer nutricional e inmunológicamente las necesidades de los recién nacidos. Lejos de ser un fluido estéril, constituye una fuente continua de bacterias al aparato digestivo del niño, convirtiéndose, por tanto, en un factor crucial en la iniciación y desarrollo de la microbiota intestinal de los neonatos. Varios estudios han apuntado, a lo largo de los años, a un efecto protector de la lactancia contra el desarrollo de la EC, pero no ha habido una conclusión clara, ya que un estudio reciente muestra que no hay ninguna asociación entre la lactancia y la protección frente a la EC.

El objetivo de este trabajo es aislar e identificar los microorganismos involucrados en el metabolismo del gluten presentes en la leche materna, y por tanto, que son transferidos al bebé desde sus primeros días de vida. Varios estudios muestran que muchos de los microorganismos presentes en la leche materna son clasificados por la EFSA (European Food Safety Authority) como QPS (Qualified Presumption of Safety), es decir, que han sido aprobados para ser introducidos en la cadena alimentaria. Por lo tanto, otro objetivo del estudio es la caracterización de los microorganismos aislados para evaluar su potencial probiótico para el tratamiento de la EC.

A partir de 29 muestras de leche donadas por 17 voluntarias sanas en distintos momentos de la lactancia (0, 4 y 8 meses) se aislaron e identificaron un total de 177 cepas, pertenecientes a 38 especies de 20 géneros diferentes, siendo los géneros predominantes *Streptococcus* y *Staphylococcus*. Las muestras de leche se cultivaron en MCG-3 y se seleccionaron los microorganismos que: (I) degradaban el gluten macroscópicamente (II) no crecían cuando se les retiraba el gluten del medio (medio de cultivo MSG-3) y/o (III) crecían en un medio de cultivo que solo contenía gluten como fuente de nitrógeno (medio de cultivo MCG-1). De los 177 microorganismos aislados, se seleccionaron los clasificados como QPS y/o los que eran capaces de digerir el péptido tóxico del gluten 33-mer, y se sometieron a ensayos de bioseguridad (medida de actividades mucinásica, hialuronidásica, gelatinásica, elastásica y hemolítica). Posteriormente, se evaluó la resistencia al tránsito gastrointestinal y la resistencia a antibióticos de las cepas que superaron los ensayos de bioseguridad. También se evaluó la capacidad de las cepas aisladas para formar biofilms, así como su capacidad de adhesión a las células intestinales Caco-2, y su capacidad antiinflamatoria *in vitro* en la línea de cultivo celular HT-29. Finalmente, con las cepas que presentaban características deseables para microorganismos probióticos se estudió la capacidad para digerir otros péptidos tóxicos del gluten como el 19-mer o el 13-mer, así como para digerir gliadina (parte proteica del gluten) o gluten en diferentes medios de cultivo.

Tras analizar todos los resultados obtenidos, se concluyó que en la leche materna hay microorganismos involucrados en el metabolismo del gluten, de los cuales, se seleccionaron por su alto potencial como probióticos para el tratamiento de la EC tres cepas pertenecientes a las especies *Lactobacillus rhamnosus*, *Enterococcus faecalis* y *Rothia mucilaginosa*.



SCO4439, a D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase involved in *Streptomyces coelicolor* spore wall maturation, resistance, and germination

Beatriz Rioseiras *, Paula Yagüe, María Teresa López-García , Nathaly González-Quiñónez, Elisa Binda , Flavia Marinelli, Ángel Manteca.

Universidad de Oviedo. Facultad de Medicina. C/ Julián Clavería s/n. 33006 Oviedo (Asturias)
brioseiras@gmail.com

This work contributes to the understanding of cell wall modifications during sporulation and germination in *Streptomyces* by assessing the biological function and biochemical properties of SCO4439, a D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase (DD-CPase) constitutively expressed during development. SCO4439 harbors a DD-CPase domain and a putative transcriptional regulator domain, separated by a putative transmembrane region.

The recombinant protein shows that DD-CPase activity is inhibited by penicillin G. The spores of the SCO4439::Tn5062 mutant are affected in their resistance to heat and acid and showed a dramatic increase in swelling during germination. The mycelium of the SCO4439::Tn5062 mutant is more sensitive to glycopeptide antibiotics (vancomycin and teicoplanin). The DD-CPase domain and the hydrophobic transmembrane region are highly conserved in *Streptomyces*, and both are essential for complementing the wild type phenotypes in the mutant.

A model for the biological mechanism behind the observed phenotypes is proposed, in which SCO4439 DD-CPase releases D-Ala from peptidoglycan (PG) precursors, thereby reducing the substrate pool for PG crosslinking (transpeptidation). PG crosslinking regulates spore physical resistance and germination, and modulates mycelium resistance to glycopeptides. This study is the first demonstration of the role of a DD-CPase in the maturation of the spore cell wall.

Un nuevo tipo de división celular en las hifas jóvenes de *Streptomyces* (Micelio I) basado en “Z-ladders” y tabiques de membrana

Paula Yagüe*, Joost Willemse, Roman I. Koning, Beatriz Rioseas, María Teresa López-García, Nathaly Gonzalez-Quiñonez, Carmen Lopez-Iglesias, Pavel V. Shliha, Adelina Rogowska-Wrzesinska, Abraham J. Koster, Ole N Jensen Gilles P. van Wezel & Ángel Manteca.

Universidad de Oviedo. Julián Clavería sn 33006. yaguepaula@uniovi.es

Las bacterias del género *Streptomyces* son un modelo de multicelularidad bacteriana. Su morfología micelilar implica la formación de hifas largas multinucleadas durante el crecimiento vegetativo (micelio sustrato), con algunos tabiques que separan grandes compartimentos multinucleados. Posteriormente hay una fase de micelio aéreo (comienza a crecer por encima del suelo) que finalmente se diferencia en cadenas de esporas uninucleadas. Hasta el momento, todos los septos conocidos en *Streptomyces*, y bacterias en general, están compuestos de una capa gruesa de peptidoglicano y membrana celular.

En este trabajo se muestra la existencia de un nuevo tipo de división celular durante las fases tempranas de desarrollo (Micelio I). Dicha división celular se basa en la formación de barreras de permeabilidad consistentes en membranas sin peptidoglicano detectable. La formación de estas membranas se correlaciona con la formación de anillos de la proteína de división celular FtsZ (“Z-rings”). Las barreras de permeabilidad y los anillos de FtsZ, tienen una separación media de 1 μm , formando “ladders”.

Este trabajo describe la existencia de un proceso de división celular sin precedentes en bacterias. La alta frecuencia de compartimentación observada en las hifas tempranas de *Streptomyces*, cambia el viejo dogma de que las hifas vegetativas de *Streptomyces* son multinucleadas con tabiques esporádicos.

Desarrollo de un biofertilizante a base de cianobacterias para aumentar la competitividad agrícola y seguridad alimentaria de la guajira colombiana

Ruth Elena Hernández Benítez*, Daldo Ricardo Araujo Vidal

Centro Agroempresarial y Acuícola, Servicio Nacional de Aprendizaje "SENA", Km 1 vía a Barrancas, Fonseca, La Guajira. Colombia. Daraujov@misena.edu.co

Los cereales son de los cultivos más importantes en el mundo para alimentación humana, animal y como materia prima en numerosas industrias. El arroz es el segundo cultivo de ciclo corto de mayor importancia económica y social en Colombia, con 460.000 ha sembradas en el año 2015 y una producción cercana a los 2.900.000 ton, valores que en su conjunto representan el 4% del PIB agropecuario y alrededor del 5% del empleo del sector agrícola nacional. El Tratado de Libre Comercio con los Estados Unidos, plantea nuevos retos para la producción de arroz y maíz en el país. Hernández en el 2015 resaltó la importancia de disminuir los costos e incrementar la producción si se quiere competir con el mercado estadounidense. Adicionalmente, el cultivo intensivo de arroz ha conducido a un deterioro constante de las propiedades físicas y químicas del suelo en las zonas cultivadas, lo que ha incrementado el uso de fertilizantes nitrogenados, lo que generó problemas ambientales como la eutrofización de aguas, la producción de gases de invernadero como N_2O , NO y NH_3 como lo menciona Adesemoye et al., 2009 y problemas en salud humana que van desde enfermedades respiratorias hasta la generación de enfermedades cancerígenas. Las cianobacterias son organismos fijadores de Nitrógeno capaces de generar su propio fotosintato que incrementan la fertilidad del suelo, el cual las hace especialmente atractiva para ser usadas como biofertilizante. Esta investigación planteó desarrollar biofertilizantes a partir de cianobacterias con el fin de mejorar la competitividad agrícola y contribuir el manejo sostenible del suelo y la seguridad alimentaria de la Guajira Colombiana. Las cianobacterias se obtuvieron del muestreo en los campos arroceros de los municipios de Fonseca, Distracción y Dibulla del Departamento de la Guajira, Colombia. Las especies encontradas se cultivaron en medio BG-11 donde se identificaron *Gloeocapsa sp*, *Oscillatoria sp* y *Anabaena sp*. Para determinar la actividad promotora de crecimiento de las cianobacterias en las plantas de frijol, maíz y arroz se realizaron diferentes parcelas experimentales, las cuales se inocularon con las especies de cianobacterias identificadas y fueron comparados con un control. La aplicación de cianobacterias en cultivos agrícolas de interés comercial ha permitido aumentar los rendimientos y productividad de los cultivos, reduciendo la aplicación de fertilizantes de síntesis química, las cianobacterias aportan de 10 a 50 Kg Nitrógeno /ha/año a las plantas estudiadas.

Adesemoye AO, Torbert HA, Kloepper JW (2009) Plant growthpromoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microb Ecol*. doi:10.1007/s00248-009- 9531-y
Hernandez. (2015). Manejo y conservación de suelos para la producción de arroz en Colombia. Fedearroz - Fondo Nacional del Arroz. Primera Edición. 78pp.

Evaluación de la capacidad de biocontrol de *Trichoderma* frente a *Phaeoacremonium aleophilum* procedentes de plantas de vid.

*Guzmán Carro-Huerga,¹ Sara Mayo,¹ José Antonio Rubio²; Enrique Barajas², Álvaro Rodríguez-González¹; Oscar González-López¹; Paulo Henrique Da Silva¹; Santiago Gutiérrez³; Pedro Antonio Casquero.¹

1. Grupo de Investigación de Ingeniería y Agricultura Sostenible. Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad, Universidad de León Av. Portugal 41, 24071 León, España. smayp@unileon.es; pacasl@unileon.es.

2. Unidad de Cultivos Leñosos y Horticolas. ITACYL. Junta de Castilla y León. Ctra. Burgos km 119. Finca Zamadueñas. 47071. Valladolid.

3. Grupo de Investigación de Ingeniería y Agricultura Sostenible. Universidad de León, Campus de Ponferrada, Av. Astorga s/n, 24401 Ponferrada, España.

E-mail: gcarh@unileon.es; pacasl@unileon.es

La vid (*Vitis vinifera* L.), principal cultivo leñoso de Castilla y León y de gran relevancia en España (posee la mayor superficie de este cultivo del mundo) se enfrenta al grave problema de las enfermedades de madera de vid. Yesca, eutipiosis, BDA, enfermedad de Petri etc., son enfermedades que carecen de una solución eficaz. En concreto la enfermedad de la yesca es la más importante con más de un 2,5% de la superficie afectada en Castilla y León siendo *Phaeoacremonium aleophilum* uno de los primeros hongos colonizadores y más virulentos.(Pierron et al., 2015)

Conforme a las normativas europeas de política medioambiental un mayor número de productos fitosanitarios se están retirando del mercado. Esto conlleva a una indefensión de los agricultores frente a plagas y enfermedades en el campo.

Todo ello incita a la búsqueda de nuevas soluciones pero sostenibles, ecológicas y respetuosas con el medio ambiente; por lo que la solución que cumple todos estos requisitos son los agentes de control biológico.

Trichoderma (Teleomorfo: *Hypocrea*) es un género de hongos edáficos. Es un invasor oportunista secundario, de rápido crecimiento, que produce gran cantidad de esporas, de enzimas capaces de degradar la pared celular y de sustancias antibióticas. Sus principales métodos de control de patógenos son el micoparasitismo, la síntesis de antibióticos y la competencia directa.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de biocontrol en condiciones in vitro de *Trichoderma* frente a *P. aleophilum*, empleando para ello un aislamiento de éste y treinta y uno de *Trichoderma* (T63 a T93), obtenidos a partir de muestras de madera de vid (principalmente de ritidoma pero también médula de pulgares, brazos y tronco) así como de suelo de viñedo de la provincia de León y de Zamora. La principal premisa de aislamiento de los *Trichoderma* es la búsqueda de viñedos viejos con el fin de encontrar cepas donde hayan coevolucionado con los fitopatógenos. Se realizó un ensayo dual de ambos microorganismos. Se enfrentaron un disco de 5 mm de micelio del patógeno frente a otro de los *Trichoderma* separados 4,5 cm y se incubaron a 28 °C para ser evaluados a los 5 y a los 10 días.

Se observó que todos los aislamientos de *Trichoderma* fueron capaces de controlar in vitro a *P. aleophilum*. Tras la evaluación a los 5 días todos los *Trichoderma* son capaces de detener el crecimiento del hongo fitopatógeno. Cabe destacar que tras la evaluación a los 10 días la mayoría de los hongos de biocontrol son capaces de colonizar el hongo patógeno llegándolo a cubrir por completo ya sea mediante micelio o esporas.(Kotze et al., 2011)

REFERENCIAS:

- Kotze, C., Van Niekerk, J., Mostert, L., Halleen, F., Fourie, P., 2011. Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection. *Phytopathol. Mediterr.* 50, 247–263.
- Pierron, R., Gorfer, M., Berger, H., Jacques, A., Sessitsch, A., Strauss, J., Compant, S., 2015. Deciphering the Niches of Colonisation of *Vitis vinifera* L. by the Esca-Associated Fungus *Phaeoacremonium aleophilum* using a *gfp* Marked Strain and Cutting Systems. *PLoS One* 10, 1–22.



Caracterización de proteínas NEP de *Diplodia seriata* y su implicación en patogénesis

Rebeca Cobos*^{1,2}, Penélope García-Angulo¹, Sandra González-García¹, Jose Manuel Álvarez-Pérez¹, Ana Ibáñez¹, Enrique Garzón-Jimeno^{1,2} Juan José Rubio Coque^{1,2}

¹ Instituto de Investigación de la Viña y el Vino. Universidad de León. Avda. Portugal, 41. 24071 León. España.

² RGA Bio-Investigación S.L. Avda. Portugal, 41. IRENA, Lab. 29. 24009 León. España.

E-mail: rebeca.cobos@unileon.es

Bajo el nombre de enfermedades de madera de vid se engloban un conjunto de enfermedades causadas por unas cincuenta especies de hongos fitopatógenos. *Diplodia seriata* es uno de los principales hongos asociados a las enfermedades de madera de vid en planta adulta, provocando importantes pérdidas económicas al sector vitivinícola. El hongo penetra en la madera a través de las heridas de poda colapsando los vasos del xilema y provocando la muerte prematura de la planta.

A pesar de que se desconoce el mecanismo molecular que desencadena la necrosis de los tejidos de la planta, se ha observado que el hongo secreta unas proteínas capaces de inducir la necrosis. Estas proteínas denominadas NEP (Necrosis and Ethylene-Inducing Proteins) han sido ampliamente estudiadas en otros géneros como *Phytophthora*, *Verticillium* o *Botrytis* entre otros patógenos de plantas. Las proteínas NEP activan los mecanismos de defensa de la planta y provocan necrosis en las hojas.

En el presente estudio se caracterizaron dos NEPs presentes en el secretoma del hongo *Diplodia seriata* denominadas DserNEP1 y DserNEP2. Ambas presentaban los motivos estructurales característicos de las proteínas NEP y mostraron una alta similitud de secuencia. Ambas proteínas fueron sobreexpresadas y purificadas para la realización de los ensayos en planta. Se realizaron ensayos en cultivos celulares, en plantas multiplicadas *in vitro*, y en hojas de plantas enraizadas y mantenidas en invernadero. Los estudios con cultivos celulares de *Vitis vinifera* L. demostraron su capacidad para reducir la viabilidad celular. En ensayos realizados en hojas de vid la actividad citolítica de DserNEP1 fue mayor que la de DserNEP2 incluso a menores concentraciones de proteína.

Estos resultados constituyen el primer estudio de proteínas NEP en un hongo asociado a las enfermedades de madera de la vid así como en un miembro de la familia Botryosphaeriaceae. Los resultados sugieren que las proteínas NEP podrían estar involucradas en el desarrollo de los síntomas foliares característicos de las enfermedades de la madera de la vid.

Desarrollo de marcadores de tipo SCAR para la detección de actinobacterias en plantas de vid.

Sandra González-García*¹, Jose Manuel Álvarez-Pérez¹, Rebeca Cobos², Ana Ibáñez¹, Enrique Garzón-Jimeno^{1,2} Juan José Rubio Coque^{1,2}

¹ Instituto de Investigación de la Viña y el Vino. Universidad de León. Avda. Portugal, 41. 24071 León. España.

² RGA Bio-Investigación S.L. Avda. Portugal, 41. IRENA, Lab. 29. 24009 León. España.

E-mail: sgong@unileon.es

El decaimiento de la vid es uno de los mayores problemas en el sector vitivinícola a nivel mundial. Se asocia principalmente a patologías causadas por hongos que infectan la planta a través de la raíz. A pesar de que el sistema radicular es una potencial vía de entrada de patógenos, actualmente no existe ningún tratamiento de prevención o control de la infección causada por hongos fitopatógenos. En nuestro grupo de investigación venimos desarrollando tecnologías para el control de hongos patógenos de vid mediante la aplicación de actinobacterias como agentes de biocontrol (BCAs) con resultados satisfactorios y esperanzadores.

Por este motivo se ha desarrollado un protocolo rápido para detectar la implantación de las actinobacterias en el sistema radicular de las plantas mediante el desarrollo de marcadores moleculares de tipo SCAR (Región Amplificada Caracterizada por Secuencia) específicos de cada cepa de interés.

Estos marcadores permiten detectar de manera rápida y sencilla aquellas cepas para las que se hayan diseñado oligonucleótidos específicos mediante una reacción de PCR convencional. Para desarrollar un marcador SCAR se parte de un marcador RAPD (ADN Polimórfico Amplificado al Azar), que consiste en amplificar ADN a partir de un único oligonucleótido degenerado, obteniendo un patrón de bandeo característico de cada especie. Este patrón permite detectar polimorfismos en las secuencias amplificadas, de manera que aquellas bandas únicas obtenidas son clonadas y secuenciadas para, en nuestro caso, buscar regiones intergénicas no conservadas evolutivamente. Dentro de estas regiones no conservadas se diseñan parejas de oligonucleótidos SCAR (20-25 pb) que se emplean para identificar mediante PCR convencional la cepa de interés, dentro de un conjunto de especies relacionadas, por la presencia de un única banda de tamaño conocido.

Esta metodología ha mostrado gran fiabilidad para la detección de una actinobacteria en particular dentro de una población compleja de microorganismos, siendo por tanto adecuada para determinar la implantación en plantas tratadas con actinobacterias seleccionadas como potenciales BCAs.

Aislamiento y caracterización de bacterias oxidadoras de azufre (SOB)

Ana Ibáñez*¹, Sandra González-García¹, Rebeca Cobos², Jose Manuel Álvarez-Pérez¹, Carlos Barreiro³, Enrique Garzón-Jimeno^{1,2} Juan José Rubio Coque^{1,2}

¹ Instituto de Investigación de la Viña y el Vino. Universidad de León. Avda. Portugal, 41. 24071 León. España.

² RGA Bio-Investigación S.L. Avda. Portugal, 41. IRENA, Lab. 29. 24009 León. España

³ INBIOTEC (Instituto de Biotecnología de León). Av. Real, 1. 24006 León. España

Email: aibas@unileon.es

El fosfato es el segundo elemento más importante en la nutrición de las plantas. Juega un importante papel en procesos metabólicos como la fotosíntesis, la respiración o la biosíntesis de macromoléculas (como los ácidos nucleicos). También tiene gran importancia durante fases tempranas del desarrollo vegetal, durante el desarrollo de raíces y en la resistencia a enfermedades. Sin embargo, a pesar de que es un elemento abundante en los suelos, constituye un factor limitante en el desarrollo de las plantas, debido a que frecuentemente se encuentra formando complejos minerales insolubles que no son asimilable para la planta. Las grandes desventajas que presentan el uso y producción de fertilizantes químicos han puesto a los microorganismos en el punto de mira de numerosas investigaciones acerca de este tema. Así, surge un grupo de bacterias denominadas Bacterias Solubilizadoras de Fosfato (PSB, por sus siglas en inglés), dentro del cual encontramos las Bacterias Oxidadoras del Azufre (SOB). Estas bacterias son capaces de producir ácido sulfúrico a partir de la oxidación del azufre y compuestos reducidos del azufre, generando un ambiente suficientemente ácido para la solubilización del fosfato presente en la roca fosfórica.

Durante el proyecto se aislaron bacterias oxidadoras de azufre a partir de muestras procedentes de una planta de tratamiento de aguas residuales (León) y procedentes de agua de escorrentía de las minas de Riotinto (Huelva) utilizando 4 medios diferentes: 9K-Fe y 9K-Na₂S₂O₃ (Bhatti & Yawar, 2010), *Acidithiobacillus thiooxidans medium* (ATT) y *Leptospirillum medium* (LM). Se identificaron las especies bacterianas aisladas mediante secuenciación de su RNA 16S ribosomal. Finalmente se analizó su capacidad de solubilización de fosfato mediante un ensayo realizado en embudos Büchner durante 30 días. Esto permitió simular condiciones similares a las de una hipotética escombrera de producción de fosfato a partir de roca fosfórica.

Así se aislaron cinco cepas oxidadoras del azufre diferentes y se analizó su capacidad solubilizadora. Se comprobó que existe una correlación lineal entre la disminución del pH del medio -debida a la producción bacteriana de ácido sulfúrico- y la concentración de fosfato soluble producida entre pH 3 y 6. Es probable que las bacterias traten de disminuir el pH hasta alcanzar un valor cercano a 3, ya que éste es su valor óptimo, por lo que una vez alcanzado, lo mantienen estable durante el proceso de solubilización.

Bhatti T.M. & Yawar W. (2010) Bacterial solubilization of phosphorus from phosphate rock containing sulfur-mud. *Hydrometallurgy*, **103**, 54–59.

Los trichotecenos y aspinolidas producidos por *Trichoderma arundinaceum* regulan la expresión de genes de *Botrytis cinerea* implicados en virulencia y crecimiento

Malmierca, M.G.¹, Izquierdo-Bueno, I.², McCormick, S.P.³, Cardoza, R.E.¹, Alexander, N.J.³, Barua, J.², Lindo, L.^{1*}, Casquero, P.A.⁴, Collado, I.G.², Monte, E.⁵, Gutiérrez, S.¹

¹Area de Microbiología, Escuela Universitaria de Ingeniería Agrícola. Universidad de León, Ponferrada.

²Departamento de Química Orgánica, Universidad de Cádiz, Puerto Real.

³Mycotoxin Prevention and Applied Microbiology Research Unit, USDA/ARS, National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, IL, EEUU.

⁴Grupo de Investigación de Ingeniería y Agricultura Sostenible, Instituto de Recursos Naturales, Universidad de León, 24071.

⁵Centro de Investigación Agrícola (CIALE), Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca, Salamanca.

*lliny@unileon.es

Trichoderma arundinaceum (= Ta37) y *Botrytis cinerea* B05.10 (= B05.10) producen los sesquiterpenos Harzianum A (= HA) y botridial (= BOT), respectivamente. La disrupción del gen *tri5*, que codifica la trichodieno sintasa, resulta en el bloqueo de la producción de HA en el mutante Ta Δ Tri5, lo que se traduce en una reducción del potencial de biocontrol de esta cepa frente a B05.10. Por otra parte, Ta Δ Tri5 produce elevados niveles de las aspinolidas B y C ^{1,2}. En el presente trabajo hemos analizado el efecto del HA y las aspinolidas (Asp) B y C en la regulación de la expresión de genes de *B. cinerea* implicados en: 1) la síntesis de BOT, 2) en virulencia y 3) en la producción de ergosterol, así como en los niveles de producción de BOT y escualeno-ergosterol.

Se ha podido observar que el HA aumenta la expresión de los genes de virulencia en B05.10 y de los genes de síntesis de BOT cuando *B. cinerea* crecía solo. Sin embargo, estudios de enfrentamiento entre B05.10 y Ta37 muestran una disminución en el nivel de inducción de la expresión de los genes de síntesis de BOT, sumado a una disminución en la producción de este sesquiterpeno. Por otra parte, el enfrentamiento con Ta Δ Tri5 resultó en un fuerte aumento en la expresión relativa de los genes de síntesis de BOT, de *BcatrB* (gen codificante para un transportador ABC, involucrado en la sensibilidad del hongo al phytoalexin resveratrol), *BMP1* (gen codificante para *Botrytis* MAP kinasa, necesario para la penetración del hongo en las células de las plantas), *Bcpg1* (codificante para una endopoligalacturonasa, que confiere al hongo patógeno una ventaja competitiva) y de los genes implicados en la síntesis de ergosterol. La adición exógena de HA a la confrontación B05.10-Ta Δ Tri5 disminuyó el nivel relativo de expresión de los genes de síntesis de BOT. Esto sugiere que la confrontación por sí misma, o las aspinolidas producidas por Ta Δ Tri5 están aumentando la expresión de los genes de virulencia, lo que podría ser explicado por dos teorías: (i) la expresión de los genes de síntesis de BOT es activada por metabolitos producidos por la cepa Ta Δ Tri5, que no son producidos o lo son en menos nivel por la cepa Ta37; (ii) la activación de los genes de biosíntesis de BOT es producida por la acción hidrolítica de enzimas involucradas en el proceso de micoparasitismo que son activadas durante el proceso de confrontación.

Este trabajo describe la existencia de una nueva regulación genética cruzada entre *B. cinerea* y *T. arundinaceum*, en la que los metabolitos producidos por ambos hongos juegan un papel esencial, y contribuye a comprender como una cepa de biocontrol como es *T. arundinaceum* y su presa interaccionan entre sí y con su entorno.

1. Malmierca, M. G. *et al.* Relevance of trichothecenes in fungal physiology: disruption of *tri5* in *Trichoderma arundinaceum*. *Fungal Genet. Biol. FG B* **53**, 22–33 (2013).
2. Malmierca, M. G. *et al.* Novel aspinolide production by *Trichoderma arundinaceum* with a potential role in *Botrytis cinerea* antagonistic activity and plant defence priming. *Environ. Microbiol.* **17**, 1103–1118 (2015).



Selección *in vitro* de sustratos para el desarrollo óptimo de *Trichoderma* empleando la técnica de qPCR

Sara Mayo^{*1}; Álvaro Rodríguez-González¹; Óscar González-López¹; Alicia Lorenzana¹; Guzmán Carro¹; M^a Piedad Campelo¹; Santiago Gutiérrez²; Pedro A. Casquero¹

1. Grupo de Investigación de Ingeniería y Agricultura Sostenible. Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad, Universidad de León Av. Portugal 41, 24071 León, España. smayp@unileon.es; pacasl@unileon.es

2. Área de Microbiología, Escuela Superior y Técnica de Ingeniería Agraria, Universidad de León, Campus de Ponferrada, Av. Astorga s/n, 24401 Ponferrada, España.

Los sustratos en los que se desarrolla la planta así como los microorganismos de la rizosfera deben poseer unas características fisicoquímicas que permitan un crecimiento óptimo. La mayoría de los sustratos usados son una combinación de materiales orgánicos (turba, corteza, paja,...) e inorgánicos (vermiculita, perlita, arcilla,...). Con la adición de componentes orgánicos a sustratos inorgánicos se puede mejorar propiedades tales como la capacidad de retención de agua, la porosidad, la capacidad de intercambio catiónico, así como el favorecer el desarrollo de microorganismos tanto beneficiosos como perjudiciales para la planta.

Uno de los microorganismos beneficiosos para la planta sería *Trichoderma* ya que se caracteriza por estar presente en la rizosfera de las plantas. Éste es oportunista, simbiote no virulento con la planta y parásito y antagonista de muchos hongos fitopatógenos, con lo que proteger a la planta de distintas enfermedades. Así una buena elección del sustrato provocaría un mejor desarrollo de este agente de biocontrol.

El objetivo de este trabajo es comprobar el desarrollo de *Trichoderma* en las distintas combinaciones de sustrato estudiadas. Para ello se emplea el aislado *Trichoderma harzianum*, T019, seleccionado de la zona de producción Indicación Geográfica Protegida "Alubia la Bañeza-León" sin manipulación genética y crecido en medio patata-dextrosa-agar para preparar una concentración de 2×10^7 esporas/ml.

Se emplean: vermiculita exfoliada (V), turba (T), bentonita (B) y harina de maíz ecológica (H) autoclavados a 121 °C durante 60 minutos 2 días consecutivos, obteniéndose vermiculita (100V:0H:0B), turba (100T:0H:0B), vermiculita-harina (100V:2H:0B), turba-harina (100T:2H:0B), vermiculita-bentonita (100V:0H:5B), turba-bentonita (100T:0H:5B), vermiculita-bentonita-harina (100V:2H:5B), turba-bentonita-harina (100T:2H:5B).

Se colocan 12 g de sustrato inoculado con 4.45 ml de solución de esporas en placas Petri. Se realizan 5 repeticiones de cada uno. Se mantiene el cultivo durante 45 días a 24 °C en condiciones de oscuridad. Se hace dos extracciones de DNA por cada placa con FavorPrep Soil DNA Isolation Kit (Favorgen Biotech Corporation). Se realiza qPCR de cada extracción usando Step One Plus™ (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se emplea el gen α -actina como referencia para el análisis.

Se realiza un análisis de varianza (ANOVA) y test de Fisher (LSD) con el programa SAS (SAS Institute Inc., 2004, Cary, NC, USA).

Se comprueba que tras los 45 días hay más cantidad de *T. harzianum* en las combinaciones con turba. Sin embargo en las que está presente la vermiculita su desarrollo es escaso incluso con harina y/o bentonita. Se observa que hay mayores concentraciones de *Trichoderma* cuando está presente sólo la harina de maíz o bien con bentonita sin que haya diferencias significativas entre ellas.

Se concluye el mejor sustrato para el desarrollo de *Trichoderma* sería aquel en el que se incluyera una fuente de carbohidratos, como en este caso sería harina de maíz. También se le podría añadir bentonita, para aportarle una estructura al sustrato más apta para el desarrollo de este agente de biocontrol.

Citrus industry and sugar residues as component for growth media for microbial biofertilizers

Rebeca Mulas*, Ana Teresa Serra, Raquel Pastor-Bueis, Catarina Duarte, Fernando González-Andrés, Xiomar Arleth Gómez.

Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad. Universidad de León. Avenida de Portugal, Nº 41, 24009 León. rmulq@unileon.es

Citrus production and sugar industry are two of the most important agricultural activities in the Mediterranean area. The residues generated in those activities are citrus peel and molasses. In this study, both of them had been evaluated as a carbohydrate source to prepare culture medium for microorganism. Nowadays, it is very important the biofertilizers products and it would be possible to take advantage of these industry subproducts as a carbohydrate source.

In orange peel case, it is very important to eliminate the limonene that gives citrus fruit their aroma, but limonene also have bactericide properties. To remove limonene from citrus waste we used conventional techniques hydrodistillation, microwave assisted extraction with solvent addition, microwave assisted extraction without solvent addition and supercritical fluid extraction (SFE) procedure. The next step was to control with analysis by Thin Layer Chromatography (TLC) if there were remaining limonene in citrus waste after the application of the different techniques. The residues obtained in the different limonene extraction techniques were crushed and homogenized.

The composition of the growth media for the bacteria was the recommended for each species except for the carbon source that was molasses or the citrus peel after the limonene extraction. The Plant Growth Promoting Rhizobacteria tested were: *Bacillus aryabhattai*, *Pseudomonas thivervalensis* and *Rhizobium leguminosarum*. The bacterial growth was analyzed by serial dilution plated onto Petri dishes with the appropriated growth media.

Efecto de *Trichoderma* en la captación eficiente de nitrógeno de plantas de tomate

Manuel Sánchez-Cao, María Belén Rubio, Carlos Nicolás, Enrique Monte* y Rosa Hermosa

Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Departamentos de Microbiología y Genética y Fisiología Vegetal, Universidad de Salamanca. Campus de Villamayor, C/ Río Duero, 12; 37185 Salamanca, España. cnicolas@usal.es

En los últimos 50 años, el uso de fertilizantes nitrogenados ha contribuido de forma importante a los incrementos conseguidos en la producción de alimentos, muy necesarios ante el crecimiento de la población mundial durante el último siglo. Sin embargo, las actuales directrices en Europa son producir mejor, es decir, a menor coste y contaminando menos. *Trichoderma* es un género de hongos ascomicetos cuyas especies ocupan los más variados nichos ecológicos, debido a su capacidad para metabolizar un gran número de sustratos. Algunas especies de este género (*T. harzianum*, *T. virens*, *T. atroviride* o *T. asperellum*) son utilizadas como agentes de control biológico en agricultura porque son capaces de antagonizar a hongos y oomicetos fitopatógenos, e incluso nematodos, a través de diferentes mecanismos de acción (micoparasitismo, antibiosis y/o competición). Cepas seleccionadas de *Trichoderma* spp. también se han relacionado con efectos positivos en las plantas [1], su buena capacidad para colonizar la rizosfera les permite promover el crecimiento o inducir defensas frente a estreses bióticos o abióticos. Con objeto de estudiar si *Trichoderma* modifica la respuesta de plantas de tomate a fertilizantes nitrogenados, se realizaron ensayos de invernadero con tomate de la variedad "Marmande" bajo 8 tratamientos diferentes. Las condiciones consideradas fueron: semillas tratadas con agua (control) o pildoradas con *T. harzianum* T34; aplicación o no de urea como fertilizante nitrogenado; uso de tres dosis diferentes de urea [dosis recomendada (DR), 1/2 de DR o 1/3 de DR]; y sus combinaciones. Al final del ensayo, se midieron en plantas de seis semanas: tamaño de parte aérea, diámetro de tallo, clorofila, pesos fresco y seco, y contenido en nitrógeno (N) y carbono de las plantas. Estos datos sirvieron para calcular el uso eficiente de N (NUE), la captación eficiente de N (UPE) y la recuperación aparente de N (RAN). Los resultados mostraron que la urea promueve el crecimiento de las plantas a las tres dosis ensayadas y que la cepa T34 incrementa su contenido en N, principalmente cuando se aplica conjuntamente con urea a 1/2 de DR. Los mayores valores de UPE y RAN se obtuvieron para los tratamientos donde se combinó *Trichoderma* con las dos dosis reducidas de urea. La disminución y el aumento de la expresión de los genes *nsHb1* y *nia*, que codifican hemoglobina 1 no simbiótica y nitrato reductasa, respectivamente, causados por la cepa T34 o por la aplicación combinada de T34 y dosis de urea inferiores a su DR, estarían de acuerdo con el aumento de óxido nítrico y el desarrollo de pelos radicales, y también con los valores de UPE y RAN calculados.

[1] Hermosa R, Viterbo A, Chet I y Monte E. (2012) Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* 158: 17-25.

*Financiado por los proyectos MINECO AGL2015-70671C2-1-R y Junta de Castilla y León SA-009U16.

Efecto de la adición de cultivos iniciadores nativos sobre el perfil de ácidos grasos y el contenido en ácido linoleico conjugado en el queso tipo Zamorano

Domingo Fernández^{1*}, Rosane Elvira Ferrazza², M^a Eugenia Tornadijo¹, José María Fresno¹.

¹Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de León. 24071 León, España. *E-mail: dfergr@unileon.es

²Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS (Brasil)

El consumo de derivados lácteos es una fuente importante de grasa en la dieta humana. No obstante, la presencia de grasa de origen animal en los alimentos está asociada al desarrollo enfermedades cardiovasculares lo que conlleva a una disminución en el consumo de los mismos. Este efecto negativo se relaciona con el alto contenido de ácidos grasos saturados. Sin embargo, dentro de la grasa láctea también se incluyen compuestos que pueden jugar un papel positivo en la salud como el butirato, esfingolípidos, ácido linolénico y el ácido linoleico conjugado. Estudios biomédicos con modelos animales han demostrado una serie de efectos beneficiosos del CLA para la salud, como anticancerígeno, antioxidante, mejora de la respuesta inmune, etc.

El queso representa una de las principales fuentes de CLA para el consumo humano, variando su concentración en función de su contenido inicial en la leche, de las condiciones de procesado o del tipo de cultivo iniciador. En este sentido, el empleo de cultivos autóctonos preparados a partir de cepas de bacterias lácticas aisladas de quesos artesanales y seleccionados en base a sus características tecnológicas y a sus propiedades funcionales constituye una interesante oportunidad para elaborar quesos tradicionales con leche pasteurizada que conserven sus propiedades sensoriales y características peculiares y con un perfil lipídico más saludable.

El objetivo de este estudio fue analizar el efecto del tipo de cultivo iniciador y tiempo de maduración sobre el perfil de ácidos grasos con especial atención al contenido en ácido linoleico conjugado (CLA) en el queso de oveja de pasta prensada no cocida (tipo Zamorano) elaborado a partir de leche pasteurizada.

En el presente estudio se elaboraron 4 lotes de queso "tipo Zamorano": uno de ellos empleando un cultivo comercial mesófilo y los otros tres fueron elaborados con cultivos autóctonos a base de diferentes cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris*, *Lactobacillus plantarum* y *Enterococcus raffinosus*. Posteriormente, se analizó el perfil de los metil ésteres de los ácidos grasos (FAMES) separados mediante cromatografía de gases a los 60 y 100 días de maduración, respectivamente.

Los ácidos grasos predominantes fueron el ácido palmítico (C16:0) y el ácido oleico (C18:1), los cuales representaron en torno al 20% y 30%, respectivamente. El ácido mirístico (C14:0) y el ácido esteárico (C18:0) presentaron proporciones intermedias con valores que oscilaron entre el 10 y el 13%, respectivamente. El nivel de ácidos grasos de cadena corta, en general, fue bajo no superando en ninguno de los lotes el 10% del total, si bien hay que destacar que este tipo de ácidos grasos juegan un papel muy importante en el aroma del queso.

El porcentaje de ácidos grasos saturados totales representó en torno a 2/3 partes del total de ácidos grasos analizados, el 1/3 restante estuvo integrado por ácidos grasos insaturados. Dentro de estos últimos, los ácidos grasos monoinsaturados representaron casi el 85%, estando el 15% restante integrado por los poliinsaturados. Estos valores fueron muy similares a los descritos por otros autores [1] para quesos elaborados a partir de leche de oveja.

Finalmente, cabe destacar las mayores proporciones de los isómeros de ácido linoleico conjugado (9c11t y 10t12c) en los quesos elaborados con el cultivo iniciador que contenía *Lb. plantarum*. Este hecho aumentaría el valor añadido del producto final por las propiedades beneficiosas para la salud humana de estos compuestos.

[1] Fernández-García E, Carbonell M, Calzada J, Núñez M. 2006. Seasonal variation of the free fatty acids contents of Spanish ovine milk cheeses protected by a designation of origin: a comparative study. *Int Dairy J* 16:252–261.

Determinación de la huella peptídica “fingerprint” de dos nuevas especies contaminantes de leche condensada por métodos de MALDI-TOF MS.

Ana González Abril^{1*}, José Luis Rodríguez Rama¹, Lucía Feijoo Siota¹, Fernando María Punin y Nistan¹, Pilar Calo Mata², Tomás González Villa¹.

¹Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Campus Sur 15782. Universidad de Santiago de Compostela. España. E-mail: tom.villa@gmail.com

²Departamento de Química analítica, Nutrición y Bromatología, Area de Tecnología de los alimentos, Facultad de Veterinaria, Campus Lugo, 27002. Universidad de Santiago de Compostela. España. E-mail: p.calo.mata@gmail.com

La seguridad alimentaria es una de las prioridades públicas más importantes a niveles internacionales y dentro del sector. La búsqueda de métodos cada vez más rápidos y fiables para la determinación de contaminaciones alimentarias se encuentra a la orden del día, la espectrometría de masas se ha revelado como un método que genera resultados rápidos disminuyendo el tiempo de preparado de las muestras y a un bajo coste.

En este trabajo se han aislado dos especies diferentes contaminantes de un sobre de leche condensada. Los estudios genéticos y pruebas bioquímicas realizadas revelaron que posiblemente se trate de dos nuevas especies del género *Bacillus* estrechamente emparentadas con *B. licheniformis* y *B. safensis*.

La creación de la base de datos “Spectrabank” basada en MALDI-TOF MS “fingerprint”, en la que colabora la Universidad de Santiago de Compostela, permite así la determinación rápida de especies microbianas mediante la comparación de su espectro con los recogidos en la base de datos. De este modo cada perfil de una cepa de la base de datos presenta unos picos característicos y representativos de la especie y género a la que pertenecen [1,2].

Ambas especies fueron analizadas por espectrometría de masas MALDI-TOF a partir de una extracción sencilla de las proteínas de membrana y el patrón se ha comparado con los perfiles de bacterias contaminantes de alimentos recogidas en la base de datos “Spectrabank”, de este modo se ha podido determinar el “fingerprint” para estas dos posibles nuevas especies.

[1] Bohme K, Fernández-No IC, Barros-Velázquez J, Gallardo JM, Cañas B, Calo-Mata P. *Rapid species identification of seafood spoilage and pathogenic Gram-positive bacteria by MALDI-TOF mass fingerprinting*. Electrophoresis, 2011. 32(21): p. 2951-65.

[2] Böhme K, Fernández-No IC, Gallardo JM, Cañas B, Calo-Mata P. (2011). *Safety assessment of fresh and processed seafood products by MALDI-TOF mass fingerprinting*. Food and Bioprocess Technology, 4(6), 907-918.

Este trabajo fue financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad español Proyecto AGL 2.013-48.244-R. y por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (2007-2013).

Utilidad de los antioxidantes no tóxicos en la regulación de la proliferación bacteriana

Sergio Gutiérrez^{1*}, Jenifer Pérez-Andrés³, Alfredo Morán¹, Honorina Martínez-Blanco^{1,2}, Miguel A. Ferrero^{1,2}, Javier Casqueiro³, y Leandro B. Rodríguez-Aparicio^{1,2}

¹Área de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología Molecular, Universidad de León.

²Instituto de Biología Molecular, Genómica y Proteómica (INBIOMIC), Universidad de León. ³Área de Microbiología, Departamento de Biología Molecular, Universidad de León. Campus de Vegazana s/n, León, España, 24071. sgutg@unileon.es

La investigación pretende esclarecer el efecto que los metabolitos, generalmente reconocidos como seguros (GRAS), de plantas tienen sobre la proliferación bacteriana. Para ello, hemos seleccionado dos grupos de microorganismos: unos patógenos o contaminantes y otros potencialmente probióticos y, en ellos, hemos valorado tanto su efecto antibacteriano como frente a la formación de biofilms. De los metabolitos GRAS seleccionados, hemos observado que el timol, el carvacrol y el eugenol, son los que han mostrado la acción antimicrobiana más fuerte; tanto frente a bacterias patógenas como probióticas. En todas ellas, la concentración subinhibitoria (SIC) ha sido $\leq 50 \mu\text{g ml}^{-1}$. Por su parte, la genisteína, la hidroquinona, el ácido *p*-hidroxibenzoico y el resveratrol han mostrado efectos antimicrobianos, pero a una mayor concentración (SIC entre 50 y $1.000 \mu\text{g ml}^{-1}$). La catequina, el ácido gálico, el ácido protocatéutico y el cranberry han revelado ser las moléculas más compatibles biológicamente (SIC $\geq 1.000 \mu\text{g ml}^{-1}$). Con respecto al efecto sobre la formación de biofilms, los resultados han mostrado que, el timol, el carvacrol y el eugenol poseen una actividad anti-biofilm contra *L. innocua*, *E. coli* K92 y *B. cereus*, al tiempo que mejoran específicamente la agregación de los microorganismos probióticos. La genisteína, ácido protocatéutico, cranberry, ácido *p*-hidroxibenzoico y resveratrol mostraron actividad anti-biofilm contra *S. aureus*, pero no contra *S. epidermidis* en el que, sorprendentemente, estos metabolitos estimularon la formación de biopelículas entre el 35% y 1.200%. La catequina, la genisteína y el cranberry se ha observado que no inhiben la agregación de *L. innocua*, *E. coli* K92 y *B. cereus*, pero estimulan la formación de biofilm en microorganismos probióticos. En cuanto al ácido gálico, el ácido protocatéutico, la hidroquinona, el *p*-hidroxibenzoico y el resveratrol el efecto sobre la agregación celular no ha mostrado diferencias entre *L. innocua*, *E. coli* K92 y *B. cereus*, y los microorganismos probióticos testados. Sobre *S. aureus* y *S. epidermidis*, decidieron llevarse a cabo combinaciones binarias de cranberry y resveratrol con genisteína, protocatéutico o ácido *p*-hidroxibenzoico observándose en todos los casos un aumento sobre la formación de biofilm de *S. epidermidis* y manteniendo o incluso aumentando la actividad anti-biofilm sobre *S. aureus*. Los resultados obtenidos revelan que los metabolitos vegetales GRAS, que tradicionalmente han sido utilizados como constituyentes en la dieta, gracias a sus efectos sobre la salud, pueden ser también muy útiles en la regulación de la proliferación bacteriana. La combinación apropiada de los mismos puede facilitar la proliferación de microorganismos probióticos y dificultar la de los patógenos y ayudar, en último término, a mantener el equilibrio de la microbiota intestinal y epitelial.

Esta investigación ha sido financiada por la Dirección General de Investigación (SAF2015-64306-R) y por la Junta de Castilla y León (LE283U14).

Caracterización enzimática de levaduras aisladas a partir de uvas sobremaduradas en planta

J.J. Mateo*, I. Palomares, S. Maicas.

Departamento de Microbiología y Ecología, Universitat de València. Dr. Moliner 50, 46100-Burjassot, Valencia. e-mail: Jose.J.Mateo@uv.es

El mosto se encuentra estéril dentro de la uva sana, por lo que en una fermentación espontánea las levaduras encontradas al inicio provienen de la superficie del grano de la uva, transportadas por el viento e insectos, y de la superficie de las instalaciones de la bodega. La superficie de la uva posee una compleja ecología microbiana, conformando un hábitat natural inestable. La proporción de levaduras encontradas varía en función de la etapa de maduración y de la disponibilidad de nutrientes. En uvas sobremaduradas existe una mayor disponibilidad de nutrientes porque la cutícula de la uva se debilita y libera compuestos orgánicos volátiles, incluso en uvas que visualmente parecen intactas; a ello hay que unir las bayas que muestran daño sobre la superficie, provocado por la intervención de insectos y algunos pájaros. La mayor disponibilidad de nutrientes explica la alta población y diversidad de levaduras encontradas. El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar las levaduras que colonizan la superficie de la uva en condiciones especiales de sobremaduración, así como realizar la caracterización de las mismas, tanto a nivel fisiológico como enzimático. La identificación de los diferentes aislados se realizó mediante el empleo del sistema miniaturizado de identificación API® C-AUX y el análisis de restricción de la región ribosomal que incluye el gen 5'8S rRNA y las regiones intergénicas (ITS1, ITS2). La caracterización enzimática de las levaduras obtenidas se realizó mediante el empleo del sistema miniaturizado API® ZYM y mediante ensayos en placas con sustratos diferenciales para detectar, a nivel cualitativo, las actividades pectinasa, proteasa, lipasa, esterasa, xilanasas y β -glucosidasa. La identificación mediante PCR/RFLP proporcionó diferentes perfiles moleculares, la mayoría de los cuales pertenecían al género *Candida*. En cuanto a la caracterización enzimática, la mayoría de los aislados presentan una clara actividad β -glucosidasa, mientras que las actividades pectinasa y xilanasas se detectan solamente en unas pocas levaduras y con una actividad relativa reducida.

Este trabajo ha sido financiado mediante las ayudas INV-AE-336499 de la Universitat de València y AICO/2016/079 de la Generalitat Valenciana, Conselleria d'Educació, Investigació, Cultura i Esports.

Utilización de una acetilesterasa (AE-6L) de *Bacillus* sp. HR21-6 para la síntesis de compuestos de interés en la industria alimentaria

Leyre Sánchez Barrionuevo^{a,b}, Alejandro González-Benjumea^c, María Guzmán^c, David Cánovas^b, Almudena Escobar-Niño^{a,b}, María Teresa García^{a*}, José G. Fernández-Bolaños^c, Inés Maya^c, Óscar López^c, Encarnación Mellado^a

^aDepartamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, España.

^bDepartamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Sevilla, España

^cDepartamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, España.

E-mail: leyresan@gmail.com

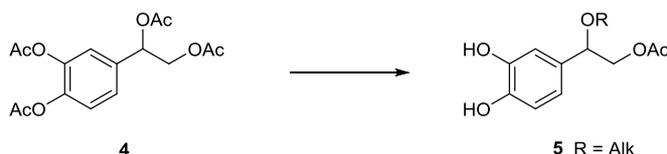
La protección y desprotección quimio-, regio- y estereoselectiva constituye una de las estrategias más utilizadas en síntesis orgánica, especialmente valiosa en la síntesis de moléculas complejas y polifuncionales, entre las que se encuentran los polifenoles. Normalmente estas reacciones sintéticas involucran complejas y largas reacciones de protección/desprotección. En este contexto, la biocatálisis puede ofrecer una alternativa a estos procedimientos convencionales para la síntesis de estas complejas moléculas.

En este trabajo describimos una bacteria lipolítica, *Bacillus* sp. HR21-6, aislada a partir de residuos de industrias alimenticias y su uso para la síntesis de un nuevo grupo de compuestos polifenólicos.

El sobrenadante de esta bacteria posee unas características y regioselectividades únicas durante reacciones de acilación y desacilación de polifenoles, las cuales son diferentes a las exhibidas por las lipasas comerciales más utilizadas.

Con el objetivo de identificar la enzima responsable, se procedió a analizar el secretoma de la bacteria mediante técnicas proteómicas, Así, se identificó una acetilesterasa, que denominamos AE-6L. Esta proteína se clasificó en la familia CE-12, superfamilia de las hidrolasas de tipo SGNH y presenta un peso molecular de 25 KDa. El gen que codifica esta enzima se expresó en *E. coli* BL21 (DE3) 4S2 etiquetado con una cola de histidinas (6xhis) para su fácil purificación y utilizando un sistema de expresión del tipo Cascade o T7 inducido con salicilato. La enzima purificada se ha usado para la síntesis quimioselectiva y regioselectiva de compuestos parcialmente acetilados como los polifenoles **5**, derivados del 3,4-Dihidroxi Fenil Glicol (3,4-DHFG), un polifenol natural presente en la aceituna. Estos compuestos resultantes son más lipófilos que la molécula natural y retienen las propiedades antioxidantes.

Por lo tanto, el procedimiento quimioenzimático propuesto en este trabajo genera una colección de moléculas con diferentes propiedades físico-químicas y bioactividades para ser utilizadas como nutracéuticos.



Producción de galactooligosacáridos empleando células permeabilizadas de *Kluyveromyces lactis*. Efecto del atrapamiento en alginato

Marta Docavo^{a,b}, Bárbara Rodríguez-Colinas^a, Antonio O. Ballesteros^a, María Fernández-Lobato^b y Francisco J. Plou^{a,*}

^a Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC, 28049 Madrid, fplou@icp.csic.es

^b Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, UAM-CSIC, 28049 Madrid

Los galactooligosacáridos (GOS) son carbohidratos no digeribles con reconocida capacidad prebiótica, cuya síntesis a partir de lactosa puede ser catalizada por β -galactosidasas de distintas procedencias [1]. La β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* es una de las más utilizadas en la industria láctea para la obtención de productos bajos en lactosa; su estructura tridimensional ha sido recientemente resuelta [2]. Se trata de una enzima intracelular y con una estabilidad moderada. Por ello, la utilización de células enteras de *K. lactis* (Fig. 1) para la producción de GOS es una alternativa interesante, ya que la envuelta celular puede proteger a la enzima frente a las condiciones adversas y las fuerzas de cizalla del reactor [3].

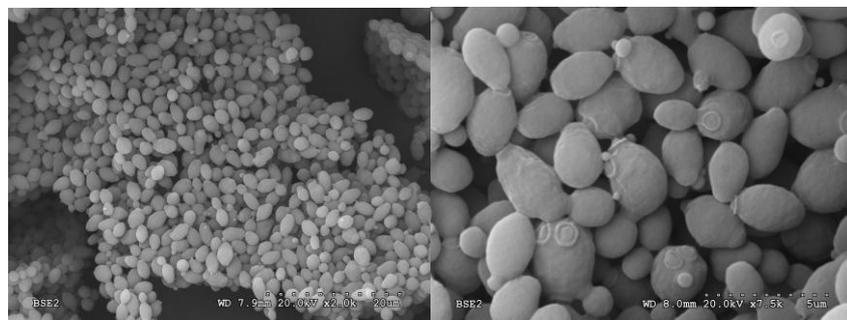


Fig. 1. Células de *K. lactis* permeabilizadas observadas al microscopio electrónico de barrido (2000x y 7500x)

El trabajo se ha centrado en el empleo de distintas cepas de *K. lactis* para la preparación de GOS a partir de lactosa. Para aumentar la actividad enzimática se han estudiado diversos tratamientos: liofilización, permeabilización con disolventes orgánicos, así como la combinación de ambos. La actividad de las distintas preparaciones se analizó con un sustrato sintético (*o*-nitrofenil-galactósido) y con lactosa.

Una vez elegida la mejor cepa y el tratamiento, se estudió la producción de GOS con las células obtenidas. Las mezclas de reacción se analizaron mediante cromatografía de intercambio aniónico con detector amperométrico de pulsos (HPAEC-PAD). También se llevó a cabo la inmovilización de las células por atrapamiento en geles de alginato cálcico, con el fin de poder diseñar reactores continuos en lecho fijo para la producción de GOS.

[1] “ β -Galactosidasas for lactose removal and galactooligosaccharide synthesis”. F.J. Plou, J. Polaina, J. Sanz-Aparicio, M. Fernández-Lobato. In: “*Microbial Enzyme Technology & Food Applications*” (C. Molina and R. Ray, eds.). CRC Press, en prensa (2016).

[2] “Structural basis of specificity in tetrameric *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase”. A. Pereira-Rodríguez, R. Fernández-Leiro, M.I. González-Siso, M.E. Cerdán, M. Becerra, J. Sanz-Aparicio. *Journal of Structural Biology* 177, 392–401 (2012).

[3] “Production of galacto-oligosaccharides by the β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: comparative analysis of permeabilized cells versus soluble enzyme”. B. Rodríguez-Colinas, M. de Abreu, L. Fernández-Arrojo, R. de Beer, A. Poveda, J. Jiménez-Barbero, D. Haltrich, A. Ballesteros, M. Fernández-Lobato and F.J. Plou. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 10477-10484 (2011)

La exclusiva actividad oleato-diol sintasa de *Pseudomonas aeruginosa*

Mónica Estupiñán^{1,2}, M Ángeles Manresa², Pilar Díaz¹

¹Departamento de Genética, Microbiología y Estadística, Facultad de Biología; ² Departamento de Biología, Sanidad y Medio Ambiente, Sección de Microbiología, Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación. Universidad de Barcelona. E-mail: pdiaz@ub.edu

Pseudomonas aeruginosa realiza la bioconversión de ácido oleico en una clase de ácidos grasos hidroxilados conocidos como oxilipinas. Las aplicaciones biotecnológicas de las oxilipinas han sido ampliamente estudiadas, constituyendo agentes emulsionantes importantes en las industrias alimentaria y cosmética, en calidad de sustancias antibacterianas o antifúngicas, o como compuestos intermediarios para la industria química fina, con un papel importante en el sector farmacéutico [1–4]. Dicha bioconversión procede a través de la dioxigenación de ácido oleico para liberar hidroperóxido de 10-H (P) OME ((10S)-hidroxi- (8E) ácido -octadecenoico), seguida de la conversión del hidroperóxido intermediario en 7,10-DiHOME ((7S, 10S) -dihidroxi- (8E) ácido -octadecenoico), que se acumula en el sobrenadante del cultivo gracias al transportador específico ExFadI [5]. Por otra parte, el hidroperóxido de 10-H (P) OME se convierte espontáneamente en la forma monohidroxilada de ácido oleico (10S) hidroxi-ácido (8E) -octadecenoico (10-HOME), que también se acumula en el sobrenadante [5,6].

Mediante escrutinio del mutantes del genoma de *P. aeruginosa*, se identificaron los genes responsables de las dos actividades enzimáticas: una dioxigenasa codificada por el gen *PA2077* cataliza la primera etapa de la reacción, mientras que la diol-sintasa codificada por *PA2078* convierte el hidroperóxido en 7,10-DiHOME [7]. Ambos genes constituyen un operón bicistrónico, pero conservan sus actividades individuales cuando se clonan por separado en *E. coli* [6], indicando que la formación de heterocomplejos no es imprescindible. Estudios *in silico* mostraron que ambos genes derivan de un evento de duplicación génica con posterior neofuncionalización de uno de ellos. Dadas las características de ambas proteínas, la ausencia de genes ortólogos en otras especies, y su reducida semejanza a otras peroxidases descritas permiten clasificar a ambas enzimas como los primeros miembros caracterizados de una nueva subfamilia de di-hemo citocromo c peroxidases, sin precedentes hasta el momento [7].

Referencias:

1. Martín-Arjol et al., (2010). *Chem Phys Lipids* 163: 341–346
2. Hou CT (2009). *N Biotechnol* 26: 2–10
3. Bajpai VK et al., (2009). *N Biotechnol* 26: 122–130
4. Martínez et al., (2010). *J Biol Chem* 285: 9339–9345
5. Martínez et al., (2013). *Biochimie* 95: 290–298
6. Estupiñán et al., (2014). *Biochim Biophys Acta Mol Cel Biol Lipids* 1841: 1360–1371
7. Estupiñán et al., (2015). *PLoS One* 10: e0131462

Agradecimientos: MINECO CTQ2010-21183-C02-02 / CTQ2014-59632-R y Red Temática AC2015-00008-00-00; 2009-2013 SGR 534 00327/2014 y Red I + D + I de Referencia en Biotecnología de la Generalitat de Catalunya

Efecto de la rifampicina sobre los sistemas simbióticos de *Blattella germanica* en la F1 y F2

Rebeca Domínguez-Santos^{1*}, Pablo Llop¹, Tania Rosas-Pérez¹, Carlos García-Ferris^{1,2} y Amparo Latorre^{1,3,4}

¹Instituto Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva, Universitat de València, Paterna (València). rebeca.dominquez@uv.es;

²Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de València;

³Área de Genómica y Salud, FISABIO – Salud Pública, Valencia;

⁴Departament de Genètica, Universitat de València. Amparo.Latorre@uv.es.

Las cucarachas son paradigmáticas, ya que se trata, posiblemente, del único caso descrito de un insecto que mantiene dos sistemas de simbioses. Nuestro modelo de estudio, *Blattella germanica*, alberga un endosimbionte obligado, *Blattabacterium*, localizado en el cuerpo graso, el cual juega un importante papel en el metabolismo de nitrógeno, y una compleja microbiota intestinal aún no bien caracterizada, cuya composición depende de factores como la dieta y el estadio de desarrollo, y cuyo papel en la normal fisiología del hospedador es desconocido.

Para estudiar la adquisición y colonización de la microbiota intestinal, y el efecto sobre el endosimbionte obligado, hemos desarrollado un estudio experimental para analizar estos factores sobre una población control y otra tratada con el antibiótico rifampicina durante una generación. Además, una vez obtenida la segunda generación de estas cucarachas, estas se dividen en tres subpoblaciones alimentadas con dieta control (dieta de perro), dieta control suplementada con rifampicina o suplementada con heces de la población control.

Tras la secuenciación de amplicones del gen 16S rRNA hemos identificado cambios drásticos en la composición de la microbiota y una disminución en la diversidad causada por el tratamiento con el antibiótico. Es interesante reseñar que la recolonización de la microbiota normal se logró tanto al suprimir el tratamiento con rifampicina como con la suplementación de la dieta control con heces.

A pesar de los cambios observados en la composición bacteriana, el género *Desulfovibrio* es el único que no se ve afectado por el tratamiento con el antibiótico, sugiriendo un papel importante en la microbiota intestinal.

Por otro lado, hemos observado una clara disminución de la población de *Blattabacterium* entre la primera y segunda generación, la cual no se recupera tras la supresión del tratamiento con el antibiótico, ni al suplementar la dieta con heces de la población control, lo que podría indicar que el antibiótico afecta negativamente a la transmisión vertical del endosimbionte obligado.

Producción de testosterona en *Mycobacterium smegmatis*

Lorena Fernández-Cabezón*, Beatriz Galán & José Luis García

Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC). Departamento de Biología Medioambiental, Grupo de Biotecnología Medioambiental. C/ Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid (España)

e-mail: l.fernandez@cib.csic.es

La testosterona (TS) es una hormona sexual esteroidea del grupo de los andrógenos. Promueve efectos fisiológicos androgénicos y anabolizantes y es sintetizada por la mayoría de los vertebrados. Aunque su uso médico principal ha estado ligado a terapias de reemplazo hormonal en hombres con hipogonadismo, también puede ser administrada en otro tipo de trastornos y terapias médicas. Actualmente, la TS se sintetiza químicamente a partir de androst-4-en-3,17-diona (AD) a nivel industrial. En mamíferos, la síntesis de TS desde AD se lleva a cabo por las enzimas 17-cetoesteroide reductasas microsomales (17 β -HSD, EC 1.1.1.64), que catalizan la reducción/oxidación dependiente de NAD(P)H de la posición C-17 del esteroide. La mayoría de estas proteínas pertenecen a la familia SDR (*Short-chain dehydrogenase:reductase superfamily*) y son reversibles. Por otro lado, también se ha descrito la reducción enzimática de AD en TS en diferentes bacterias, levaduras, hongos filamentosos y plantas. De hecho se conocen mutantes convencionales de *Mycobacterium* que son capaces de producir TS desde esteroides naturales de bajo coste. Sin embargo, las técnicas de ingeniería metabólica no han sido aún explotadas para la construcción racional de cepas bacterianas recombinantes que produzcan TS y aún no ha sido posible implementar un proceso biotecnológico que pueda competir con la síntesis química industrial de TS.

En este trabajo se han desarrollado bacterias recombinantes que sobreexpresan genes *17 β -HSD*, con el objetivo de biotransformar eficientemente esteroides naturales (fitoesteroides o colesterol) y/o AD en TS. Para ello, se ha seleccionado la actinobacteria *Mycobacterium smegmatis* mc² 155 como modelo de trabajo. Esta micobacteria de suelo no patógena presenta un crecimiento rápido, es capaz de transportar eficazmente compuestos esteroideos, ha sido utilizada como modelo para el estudio de las rutas de degradación del colesterol y no produce naturalmente TS. En esta bacteria hemos clonado genes codificantes de 17 β -HSDs de origen microbiano (bacterias y hongos). Los genes se han sobreexpresado tanto en la cepa silvestre de *M. smegmatis* mc² 155 como en una cepa mutante *M. smegmatis* MS6039-5941 productora de AD. La producción de testosterona fue estudiada en estas cepas recombinantes tanto en condiciones de *resting cell* como en crecimiento usando como sustratos AD y esteroides, respectivamente. En ambos casos, se observó la producción de TS con altos rendimientos de biotransformación. Este trabajo constituye una prueba de concepto que pone de manifiesto que la actinobacteria *M. smegmatis* mc² 155 puede ser utilizada como chasis biotecnológico para la producción de TS y otros esteroides con buenos rendimientos mediante el uso de tecnologías recombinantes.

Activación de rutas de biosíntesis silenciosas en *Streptomyces albus* J1074 para producción de nuevos compuestos bioactivos

Jorge Fernández De la Hoz*, Alfredo A. Braña, Carmen Méndez, José A. Salas, Carlos Olano.

Departamento de Biología Funcional de la Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo (Área de Microbiología). C/ Julian Clavería s/n 33006-Oviedo, España. jorgefhoz@gmail.com

Los productos naturales (PNs) juegan un papel importante en Biotecnología debido a sus diversas actividades biológicas y a su aplicación en clínica, veterinaria y agricultura. En los últimos años, el conocimiento de las bases genéticas y bioquímicas de rutas de biosíntesis de PNs microbianos ha aumentado enormemente como consecuencia del desarrollo de la ingeniería genética aplicada a microorganismos.

Es conocida la capacidad de muchas bacterias de generar productos bioactivos. De entre todas ellas, los actinomicetos representan el grupo de bacterias del que más se conoce su capacidad de producir dichos productos bioactivos (antitumorales, antibacterianos, antifúngicos, antivirales,...). La secuenciación masiva de genomas bacterianos ha puesto de manifiesto que algunos grupos presentan un potencial oculto para la producción de nuevas moléculas bioactivas previamente desconocidas y determinadas por agrupaciones génicas silenciosas. En concreto, los actinomicetos, y en particular el género *Streptomyces*, entran dentro de esta categoría de potenciales productores de nuevas moléculas bioactivas.¹

Streptomyces albus J1074 presenta en su genoma al menos 27 agrupamientos génicos para la biosíntesis de metabolitos secundarios potencialmente bioactivos. De estos agrupamientos se han identificado por el momento los metabolitos determinados por 5 de ellos que corresponden a un pigmento (indigoidina), dos familias de compuestos antifúngicos (candidinas y antimicinas), una familia de compuestos con actividad antibiótica (paulomicinas) y un compuesto citotóxico (6-*epi*-alteramida A).^{2,3} Los productos determinados por los 22 agrupamientos génicos restantes son por el momento desconocidos.

Como ocurre en todos los estreptomicetos en estudio, la mayoría de los agrupamientos génicos presentes en *S. albus* J1074 permanecen silenciosos en las condiciones habituales de crecimiento en el laboratorio o bien se expresan pobremente. Para determinar los productos cuya biosíntesis es determinada por estos agrupamientos génicos silenciosos se requiere la manipulación genética del microorganismo para activar específicamente la expresión de genes biosintéticos, bien de forma directa o bien a través de la sobreexpresión de activadores de la transcripción específicos de cada ruta.

Para este trabajo se estudió el genoma de *S. albus* J1074 para la identificación de agrupaciones génicas y se seleccionaron 4 de esos agrupamientos para realizar el análisis de la producción de metabolitos secundarios, uno de ellos conteniendo genes que codifican un sistema PKS-NRPS (*polyketide synthase-non-ribosomal peptide synthetase*) y tres conteniendo genes que codifican NRPSs, por su potencial biosintético de acuerdo a las predicciones bioinformáticas obtenidas con programas informáticos como Antismash y PRISM. A continuación se llevó a cabo la manipulación genética, para la activación y expresión de las rutas de biosíntesis, mediante la introducción de un promotor constitutivo para controlar la expresión de genes estructurales esenciales y la sobreexpresión de reguladores positivos de la ruta. Estas aproximaciones han conducido a la producción de nuevos compuestos. Una vez obtenidos dichos compuestos se procederá a la determinación de posible actividad citotóxica y/o antibacteriana de los nuevos compuestos.

1. Gomez-Escribano JP, Alt S, Bibb MJ. Next generation sequencing of *Actinobacteria* for the discovery of novel natural products. *Mar Drugs*, 2016, 14(4), 78.
2. Olano C, García I, González A, Rodríguez M, Rozas D, Rubio J, Sánchez-Hidalgo M, Braña AF, Méndez C, Salas JA. Activation and identification of five clusters for secondary metabolites in *Streptomyces albus* J1074. *Microb. Biotechnol.*, 2014, 7(3):242-256.
3. González A, Rodríguez M, Braña AF, Méndez C, Salas JA, Olano C. New insights into paulomycin biosynthesis pathway in *Streptomyces albus* J1074 and generation of novel derivatives by combinatorial biosynthesis. *Microb. Cell Fact.*, 2016, 15(1):56.

Estudio de expresión de los genes que codifican para NRPS en el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* mediante la utilización del modificador epigenético 1,3-diaminopropano

Ana Fernández-Morales*, Victoria E. González-Rodríguez, María Carbú, Alejandro Bódalo, Gustavo Cordero-Bueso, Carlos Garrido, Jesús M. Cantoral

Universidad de Cádiz. Dpto. de Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública, Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Instituto Universitario de Investigación Vitivinícola y Agroalimentaria (IVAGRO), 11510, Puerto Real, Cádiz. ana.fernandezmorales@alum.uca.es ; jesusmanuel.cantoral@uca.es

El hierro es un ión esencial para el metabolismo de todos los organismos, por ser cofactor de multitud de enzimas y necesario en la síntesis de biomoléculas. Aun así un exceso del mismo podría provocar daños celulares debido a la formación de radicales libres. A pesar de ser un metal abundante en el medio ambiente, no se encuentra siempre disponible debido a sus posibles estados de oxidación.

Todos los organismos han desarrollado diferentes estrategias para captar el hierro del entorno y almacenarlo de manera que no le resulte tóxico (Haas, 2012). En el caso de los hongos filamentosos, producen unas moléculas de bajo peso molecular, capaces de quelatar con una muy alta afinidad los iones de hierro del entorno, los Péptidos No Ribosomales (NRPs) cuya síntesis es llevada a cabo por unos complejos multiproteicos denominados Péptidos Sintasa No Ribosomales (NRSP) (Bushley *et al.*, 2008). Además de la implicación de estos sideróforos en el metabolismo del hierro, también existen estudios que demuestran su participación en otros procesos metabólicos, estando íntimamente relacionados con la patogenicidad y procesos de infección de determinados hongos, tanto en humanos como en plantas (Rieber *et al.*, 2005; Oide *et al.*, 2006).

Botrytis cinerea es un hongo fitopatógeno que afecta a una amplia variedad de cultivos (frutales, plantas ornamentales, hortalizas, etc.), haciéndolo responsable de cuantiosas pérdidas económicas. *B. cinerea*, presenta en su genoma un total de 9 genes que codifican para la síntesis de NRPSs (Amselem *et al.*, 2011). Estos genes, han sido descritos como codificantes de enzimas claves en el metabolismo secundario de este hongo, pero su papel concreto aún está por dilucidar, pudiendo tener algún tipo de implicación en los mecanismos de infección de la planta.

Muchos de los genes del metabolismo secundario no son expresados de forma rutinaria en el laboratorio, denominándose genes crípticos o silenciados, y para su estudio hay que buscar estrategias experimentales que puedan llegar a disparar su expresión. El objetivo del presente trabajo es llevar a cabo un estudio de expresión mediante Real-Time PCR en condiciones de fermentación del hongo, suplementado con un modificador epigenético como es el 1,3-diaminopropano. La utilización de este compuesto como modificador de la expresión de genes y síntesis de proteínas en el metabolismo secundario, ya ha sido previamente estudiado en otros hongos, como por ejemplo *Penicillium chrysogenum* (García-Estrada *et al.*, 2013), pero no se ha estudiado hasta la fecha, la implicación en el metabolismo secundario de *Botrytis cinerea*.

Este trabajo ha sido financiado con ayudas del Ministerio de Economía y Competitividad (Fondos FEDER, Fondos Europeos de Desarrollo Regional), mediante los proyectos MINECO: AGL2012-39798-C02 y AGL2015-65684-C2-2-R; así como el Proyecto UCA-18DGUEII02.

Biosíntesis combinatoria aplicada a la generación de compuestos híbridos derivados de una familia de alcaloides identificados en *Streptomyces argillaceus*

Suhui Ye, Giovanni Ballin, Brian Molloy, Alfredo F. Braña, José A. Salas, Carmen Méndez*

Departamento de Biología Funcional e Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA), Universidad de Oviedo. Julián Clavería s/n. 33006. Oviedo. cmendezf@uniovi.es

La biosíntesis combinatoria consiste en reprogramar las rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios en un organismo, normalmente combinando genes de biosíntesis de diferentes rutas, para obtener nuevos compuestos. Estos compuestos pueden presentar propiedades nuevas o mejoradas respecto a las del compuesto nativo, pudiendo resultar en compuestos más interesantes desde el punto de vista aplicado.

Una de las estrategias más utilizadas en biosíntesis combinatoria consiste en la expresión de genes procedentes de otro agrupamiento génico o *cluster* de biosíntesis, que codifiquen enzimas que, por presentar cierta flexibilidad de sustrato, sean capaces de modificar el compuesto o compuestos de interés.

En el presente trabajo se describe la obtención de nuevos derivados de una familia de nuevos compuestos de tipo alcaloide recientemente identificados en *Streptomyces argillaceus* por minería genómica. Estos nuevos derivados se han obtenido expresando genes pertenecientes a dos *clusters* diferentes, uno de ellos presente en el propio *S. argillaceus* y otro procedente de *S. coelicolor*. De este modo, en base al origen de los genes expresados, los nuevos derivados obtenidos podrían clasificarse en híbridos intraespecíficos e interespecíficos.

El análisis bioinformático de la secuencia genómica de *S. argillaceus* ha permitido la identificación de 32 potenciales agrupamientos de genes de biosíntesis de metabolitos secundarios, entre los que se encuentran el *cluster* de biosíntesis de los nuevos alcaloides (*cluster* 18) y otro *cluster* críptico que contiene genes responsables de la biosíntesis de la unidad estructural ácido 3-amino-4-hidroxibenzóico (3,4-AHBA) (*cluster* 32). Esta molécula está descrita como precursora de la biosíntesis de compuestos con diferentes actividades biológicas como la asukamicina, la grixazona o la bagremicina. Con el fin de identificar los productos del *cluster* 32, se llevó a cabo la expresión de los dos genes responsables de la biosíntesis de 3,4-AHBA, *orf30* y *orf31*, junto con un posible activador de la molécula, *orf29*, bajo el control del promotor del gen de resistencia a eritromicina mejorado (*ermE***p*) en la cepa silvestre de *S. argillaceus*. Como consecuencia se pudieron identificar 4 picos diferenciales con respecto a la cepa silvestre, de los cuales sólo uno pudo ser purificado y caracterizado estructuralmente. Este compuesto resultó ser un híbrido entre un compuesto alcaloide codificado por el *cluster* 18 y una molécula de 3,4-AHBA.

Por otra parte, algunos de los genes que conforman el *cluster* de biosíntesis de los nuevos alcaloides presentan similitud con genes del *cluster* de biosíntesis del compuesto coelomicina P1 de *S. coelicolor*. Las rutas de biosíntesis propuestas para ambos compuestos comparten también similitudes en las etapas tempranas de la biosíntesis, presentando intermediarios muy parecidos estructuralmente, aunque difieren en etapas tardías. Una de las diferencias principales residiría en la formación de dos grupos epóxido en la cadena lateral de los intermediarios biosintéticos de coelomicina P1, reacciones que no parecen tener lugar durante la biosíntesis de los compuestos alcaloides en *S. argillaceus*. Por ello, se llevó a cabo la expresión en *S. argillaceus* de los genes de *S. coelicolor* que codificarían las enzimas propuestas como implicadas en la formación de dichos grupos epóxido: *cpkH*, *ScF* y *cpkD*. Además, se incluyó una construcción adicional en la que se expresaba *cpkD* junto con *cpkE*, ya que las funciones deducidas indicaban una posible cooperación entre las enzimas codificadas por ambos. Los cultivos de las cepas recombinantes produjeron compuestos diferenciales que se purificaron y caracterizaron estructuralmente, resultando ser nuevos derivados de los compuestos alcaloides.



Optimization of docosahexaenoic acid production by heterologous expression in *Escherichia coli* of *pfa* gene cluster from *Moritella marina*

Laura Giner*, Irene González, Beatriz Lázaro, Fernando de la Cruz and Gabriel Moncalián

*Departamento de Biología Molecular (Universidad de Cantabria) and Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC), Universidad de Cantabria (UC-CSIC). C/ Albert Einstein, 22, 39011 Santander, (Spain). *ginerl@unican.es*

Long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) have a major importance in human health, since its consumption has been linked to many benefits. They are found in membrane phospholipids, being especially abundant in neuron and retina membranes and having a major importance in fetal development and Alzheimer's disease. Furthermore, their anti-inflammatory properties seem to be beneficial in the reduction of chronic inflammation in many diseases. Since LC-PUFAs are essential, meaning they cannot be synthesized from MUFAs and only small amounts are synthesized from α -linolenic acid in the body, health agencies recommend a daily intake of 300-500 mg LC-PUFAs. The main source of LC-PUFAs is fish and fish oil. However, this LC-PUFA source presents many disadvantages such as over-exploitation of fisheries, high costs and difficulties in LC-PUFA purification, low stability, and undesirable odors, flavors and tastes. These concerns have promoted the development of alternative sources of LC-PUFA production.

In this work, we have developed an *Escherichia coli* strain which carries a multi-enzymatic protein complex named polyunsaturated fatty acid synthase (Pfa) from the deep-sea bacteria *Moritella marina*. This multidomain complex catalyzes the anaerobic biosynthetic pathway to produce Docosahexaenoic Acid (DHA) through a mechanism similar to Polyketide Synthases (PKS) and *de novo* fatty acid synthase (FAS). The Pfa complex is encoded by a cluster containing five genes, which was cloned in an expression vector named pDHA4 by Orikasa et al (1). This construction produced a 3% DHA accumulation when expressed in *E. coli* strain DH5 α at 15°C for 96 hours. Continuing with this construction, we tested the expression of pDHA4 in other *E. coli* strains such as BL21, C41, MG1655 or BW27783 to improve DHA and biomass production. In fact, *E. coli* BW27783 reached 7.5% DHA in only 72 hours.

Nevertheless, this improvement in DHA production needs to be further increased before the scale-up process to industrial production. In order to minimize production costs, higher cultivation temperatures need to be used. However, Pfa system heterologously expressed in *E. coli* does not produce DHA at temperatures higher than 20°C. We have analysed *pfaA*, *pfaC* and *pfaD* expression at different temperatures and we have found that, although some differences in expression could be found, the reduction in DHA concentration at 20°C cannot be explained by these differences.

In addition, a diacylglycerol acyl transferase from *Thermomonospora curvata* (tDGAT) (2) was co-expressed with the *pfa* cluster in order to accumulate DHA in triacylglycerols (TAGs) and avoid an increase of membrane fluidity at high temperatures. Results showed accumulation of TAGs at 15°C and 25°C, but no DHA was detected at 25°C. Moreover, fatty acid analysis of the TAG fraction did not show DHA at any of the temperatures tested. Further studies are needed to determine the DGAT ability to incorporate DHA into TAG.

1. Orikasa Y. Tanaka M. Sugihara S. Hori R. Nishida T. Ueno A. Morita N. Yano Y. Yamamoto K and Shibahara A (2009). "*pfaB* products determine the molecular species produced in bacterial polyunsaturated fatty acid biosynthesis". FEMS Microbiology Letters. 295(2): 170-176.
2. Moncalián G, De La Cruz F, Villa JA; Lázaro B, Cabezas MA (2014). "Heat-stable triacylglycerol synthases and use thereof". International patent application No. WO2014/049180.



Estudio de interacción física del heterodímero que conforma la “F-actin capping protein” en el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* mediante la utilización de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Victoria E. González-Rodríguez^a, Julia Schumacher^b, Carlos Garrido^a, Maria Carbú, María José González-Rodríguez, Gustavo Cordero-Bueso^a, Ana Fernández-Morales^a y Jesús M. Cantoral^a

^a Universidad de Cádiz. Departamento de Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública, Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Instituto Universitario de Investigación Vitivinícola y Agroalimentaria (IVAGRO), Universidad de Cádiz, 11510 Puerto Real (Cádiz)

^b Institut für Biologie und Biotechnologie der Pflanzen, Westfälische Wilhelms-Universität, Schlossplatz 8, 48143 Münster, Germany

jesusmanuel.cantoral@uca.es

El hongo filamentos *Botrytis cinerea* es conocido mundialmente por la severidad de sus infecciones en cultivos y por las cuantiosas pérdidas económicas que genera a los agricultores, especialmente en invernaderos, plantas ornamentales y zonas con altas temperaturas y elevados índices de humedad. Además de esto, *B. cinerea* es un microorganismo modelo para el estudio del metabolismo secundario, incluyendo la caracterización y profundización de los mecanismos de infección que los hongos fitopatógenos desarrollan para conseguir colonizar las plantas. Este es un hongo que presenta una gran variedad de mecanismos de penetración y desarrollo de la enfermedad, incluyendo i) mecanismos enzimáticos, con la excreción de enzimas que degradan la pared vegetal, ii) químicos, con la biosíntesis de toxinas que matan a las células vegetales, así como iii) físicos, con penetración de las hifas hacia el interior de las células.

Para el crecimiento polarizado de las hifas, el desarrollo morfológico del micelio, y la capacidad de penetración física del hongo, juega un papel esencial la robustez y el dinamismo del citoesqueleto celular. Este citoesqueleto incluye microtúbulos, complejos multiproteicos y los filamentos de actina. En concreto relacionados con los filamentos de actina, existe un heterodímero que se denomina *F-actin capping protein*, cuya función es la de estabilizar los filamentos de actina para prevenir de malformaciones y pérdidas de monómeros y por tanto consistencia de los mismos. En el caso de *Botrytis cinerea*, encontramos dos genes que codifican para dos subunidades (subunidad alfa y beta), cuya masa aproximada es de 30 kDa.

En el presente trabajo, realizamos un estudio de interacción física de las dos subunidades que conforman el heterodímero en *Botrytis cinerea*, utilizando la maquinaria metabólica de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Hemos puesto de manifiesto la interacción positiva y funcional existente entre las dos subunidades para las que codifican los dos genes anotados en el genoma del *Botrytis cinerea* como *F-actin capping protein*, cuyo estudio no había sido caracterizado con anterioridad.

Este trabajo ha sido financiado con ayudas del Ministerio de Economía y Competitividad (Fondos FEDER, Fondos Europeos de Desarrollo Regional), mediante los proyectos MINECO: AGL2012-39798-C02 y AGL2015-65684-C2-2-R; así como el Proyecto UCA18DGUEII02.

Estudio de la importancia de los sistemas Micotiol/Micorreductina frente a agentes oxidantes en *Rhodococcus equi*

Álvaro Mourenza*, Laura Marcos, Alfonso Gonzalo, José A. Gil y Luis M. Mateos

Área de Microbiología, Dpt. de Biología Molecular. Fac. de Biología-Ambientales. Campus de Vegazana s/n. Universidad de León. 24071-LEON *amouf@unileon.es

Rhodococcus equi es una bacteria Gram-positiva del grupo de las Actinobacterias y presente en suelos; su importancia radica en ser causante de enfermedades en potros y, ocasionalmente, en pacientes inmunosuprimidos como ocurre en algunos enfermos de SIDA. En *R. equi* se conocen una serie de factores de virulencia, siendo estos en su mayoría codificados en plásmidos pVAPA/B de 80-90 Kpb. Sin embargo, hay pocos factores de virulencia codificados en su cromosoma. Durante el proceso de infección, *R. equi* se comporta como parásito intracelular (interior de macrófagos), estando expuesto a diferentes agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Sin embargo no se han descrito genes implicados en el control Redox presentes en el plásmido de virulencia, mientras que en el cromosoma hay genes para tiorredoxinas y micorreductinas. Por ello, en este trabajo se pretende poner en valor el papel que los sistemas Redox tienen durante el proceso infectivo.

En otras Actinobacterias, como *Corynebacterium glutamicum* o *Mycobacterium tuberculosis* se han descrito dos sistemas de oxidación-reducción. El primero, que está presente en la mayoría de los organismos vivos, es el sistema compuesto por el par Tiorredoxina (Trx)/Tiorredoxina reductasa (TrxR); el otro sistema descrito recientemente en *C. glutamicum* y *Mycobacterium* está conformado por el par Micotiol (MSH)/ Micorreductina (Mrx) y podría jugar un papel relevante en la desintoxicación celular frente a agentes oxidantes. Los análisis bioinformáticos realizados con *R. equi* indican la presencia de dos genes con alto porcentaje de homología con estas micorreductinas que también han sido denominadas Mrx 1 y Mrx 3.

En *C. glutamicum* las micorreductinas han resultado ser esenciales para contrarrestar el efecto de agentes tóxicos oxidantes como el H₂O₂ o el metaloide arsénico. Por otro lado, se ha demostrado que la cepa *R. equi* 103S es relativamente resistente a las especies de arsénico arseniato (>50 mM) y arsenito (>1 mM). Esta resistencia intrínseca al metaloide se debería principalmente a la presencia en su genoma del operón de resistencia *ars* que contiene los genes para la proteína transmembrana arsenito permeasa (ReArsB) y para la enzima arseniato reductasa (ReArsC). En *C. glutamicum*, el metaloide en forma de arseniato (As_v) puede ser reducida a arsenito (As_{iii}) y así desintoxicarse mediante la enzima arseniato reductasa que recibe los electrones del complejo MSH/Mrx1. Para evaluar si el sistema de resistencia a arsénico en *R. equi* presenta un mecanismo de acción equivalente al descrito para *C. glutamicum* se pretende evaluar si el operón *ars* de *R. equi* presenta los genes funcionales implicados en la resistencia a arsénico. Para ello se han optimizado en *R. equi* ciertas herramientas que nos facilitan los procesos genético-moleculares. A partir de plásmidos recombinantes preparados en *E. coli*, y que actúan como suicidas en *R. equi*, se han interrumpido los genes para la arseniato reductasa y la arsenito permeasa. Los plásmidos usados derivan de pOJ260 (con marcador de resistencia a apramicina) y contienen un fragmento interno del gen de interés. Los derivados recombinantes de pOJ260 fueron usados para electroporar *R. equi*, aislándose clones mutantes con alteración en cada uno de los genes descritos del operón *ars*. Las resistencias a arsénico en los mutantes fueron analizadas obteniendo incrementos importantes en sensibilidad al metaloide.

Igualmente se están evaluando los sistemas más eficientes de incorporación de material genético por parte de las cepas de *R. equi*. En la mayoría de los trabajos se usan sistemas de electroporación, aunque en nuestras manos las eficiencias obtenidas no son elevadas; dado que *R. equi* presenta el plásmido conjugativo pVAP con su correspondiente replicón, la clonación del replicón en el plásmido movilizable pOJ260, haría de éste un plásmido bifuncional *E. coli*-*R. equi* que permita transferir marcadores a *R. equi* con alta eficiencia.

(i) Ordóñez E. et al. 2009. J Biol Chem. 284:15107-16; (ii) Letek M. et al. 2010 PLoS Genet. 6(9):e1001145
El trabajo ha sido financiado por la Junta de Castilla y León con ref. LE326U14 y Fondo Social Europeo y sistema nacional garantía juvenil de Junta de Castilla y León (L Marcos; ULE16) y del MINECO (A, Mourenza, PEJ-2014-P-00528).



Análisis funcional del transportador GlpF de *Blattabacterium* para evaluar su papel en la complementación metabólica entre *Blattella germanica* y su endosimbionte

Maria Muñoz-Benavent^{1*}, Cecilia Picazo^{2,5}, Rebeca Domínguez-Santos¹, Juli Peretó^{1,2}, Amparo Latorre^{1,3,4}, Emilia Matallana^{2,5} y Carlos García-Ferris^{1,2}

¹Instituto Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva, Universitat de València, Paterna (València); ²Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de València; ³Área de Genómica y Salud, FISABIO – Salud Pública, Valencia; ⁴Departament de Genètica, Universitat de València; ⁵Departamento de Biotecnología, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, IATA-CSIC, Paterna, Spain.
*mamuozbe@alumni.uv.es

La simbiosis es una interacción biológica esencial en el proceso evolutivo. Se produce tanto en procariotas como eucariotas y es especialmente importante en los insectos: se calcula que hasta un 20% de especies establecen relaciones endosimbióticas con diferentes bacterias. Este es el caso de la cucaracha alemana (*Blattella germanica*) y su endosimbionte *Blattabacterium cuenoti*, que se localiza en el interior de células especializadas del cuerpo graso, y que establece una complementación metabólica con el insecto hospedador, suministrándole aminoácidos esenciales además de participar en el reciclado del ácido úrico, compuesto en el que *B. germanica* almacena el excedente de nitrógeno de la dieta. La reconstrucción metabólica a partir del genoma completo y la modelización del metabolismo de *Blattabacterium* nos ha permitido concluir que la bacteria debe incorporar glicerol como fuente de carbono, además de urea, producto derivado del ácido úrico en el huésped, que la bacteria degrada a amoníaco y que se incorpora a la biosíntesis de aminoácidos en forma de glutamina. En este trabajo se pretende comprobar si la acuagliceroporina (GlpF) del endosimbionte es la responsable del transporte de urea y glicerol, sustancias esenciales para la complementación metabólica. Para ello hemos expresado GlpF en cepas de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes en el transporte de urea (*dur3*) y de glicerol (*gps1*) con el objeto de realizar ensayos de complementación funcional, en el caso del transporte de urea, y de choque osmótico, en el del transporte del glicerol. Así mismo, hemos etiquetado GlpF con la proteína verde fluorescente (GFP) para comprobar mediante microscopía de fluorescencia su localización subcelular. La caracterización funcional de GlpF ayudará a entender mejor la simbiosis metabólica establecida entre *B. germanica* y *Blattabacterium*.

Draft whole genome sequence of *Streptomyces caniferus* CA-271066: A producer of new and known natural products

Daniel Oves-Costales,* Marina Sánchez-Hidalgo, Rodney Lacret and Olga Genilloud

Fundación MEDINA, Granada, Spain. daniel.oves@medinaandalucia.es

Introduction. Microbial natural products continue to play an invaluable role in the discovery and development of the chemotherapeutic arsenal.¹ In the last years much attention has been given to marine microorganisms, which have proven to be a rich source of new natural products with therapeutic potential.²

During our ongoing research with marine microorganisms we identified strain CA-271066 as a producer of new 36-membered macrolides with antifungal properties.

Results. *Streptomyces caniferus* CA-271066, isolated from an Ascidia in Sao Tome and Principe, was shown to produce new 36-membered macrolides with some unusual structural features. In order to gain more insight into the biosynthesis of these new antifungal compounds we isolated CA-271066 genomic DNA and subjected it to Illumina HiSeq 2500 next generation sequencing. A total of 272 contigs with a N50 of 90.308 Kb were obtained, with an estimated genome size of 8.7 Mb.

The draft genome was analyzed with the Antibiotics and Secondary Metabolite Analysis Shell (antiSMASH) algorithm,³ which predicted 36 putative secondary metabolite gene clusters, including NRPS, PKS-I, PKS-II, siderophores, terpenes, bacteriocins, thiopeptides and a lasso peptide. Careful *in silico* examination of the biosynthetic gene clusters allowed us to identify the cluster directing the biosynthesis of the 36-membered macrolides and propose a biosynthetic pathway.

On the other hand, *in silico* analysis of the identified lasso peptide gene cluster strongly suggest that it directs the biosynthesis of RES-701-3, a selective endothelin type B receptor antagonist,⁴ whose biosynthetic gene cluster, as far as we know, has not been previously described.

Finally, we were able to identify an intriguing gene cluster directing the biosynthesis of up to 5 different thiopeptides, encoded by 5 different pre-propeptide ORFs clustered together. Currently we are working on the cloning and heterologous expression of this gene cluster employing a TAR-based strategy.⁵

References.

1. Newman, D, J, Cragg, G, M, (2012). *J. Nat. Prod.* 75 (3):311-335
2. Gerwick, W, H, Moore, B, S, (2012). *Chem. Biol.* 19 (1):85-98
3. Weber, T, Blin, K, Duddela, S, Krug, D, Kim, H, U, Brucoleri, R, Lee, S, Y, Fischbach, M, A, Müller, R, Wohlleben, W, Breitling, R, Takano, E, Medema, M, H, (2015). *Nucl. Acids Res.* 43 (W1):W237-W243
4. Ogawa, T, Ochiai, K, Tanaka, T, Tsukuda, E, Chiba, S, Yano, K, Yamasaki, M, Yoshida, M, Matsuda, Y, (1995). 48 (11):1213-1220
5. Yamanaka, K, Reynolds, K, A, Kersten, R, D, Ryan, K, S, Gonzalez, D, J, Nizet, V, Dorrestein, P, C, Moore, B, S, (2014). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 111 (5):1957-1962

Identification of the kocurin biosynthetic pathway from the draft whole genome sequence of the producer *Kocuria palustris* CA-276345

Marina Sánchez-Hidalgo*, Soledad Villanueva, Daniel Oves-Costales, Ignacio González, Olga Genilloud

Fundación MEDINA. Avenida del Conocimiento, 34. Parque Tecnológico de la Salud, 18016 Granada.
marina.sanchez@medinaandalucia.es

Introduction. Kocurin (MDN-0055) is a potent anti-MRSA thiopeptide (MIC < 0.25 µg/mL) produced by several sponge-associated actinomycetes of the genera *Kocuria* and *Micrococcus*, and structurally related to antibiotic GE37468A (1,2). This study has been focused on the identification of the kocurin biosynthetic pathway and other potential cryptic biosynthetic gene clusters in the draft genome of the producer strain *Kocuria palustris* CA-276345.

Results. The kocurin structural gene was located in contig 56 of *K.palustris* CA-276345 draft genome sequence using the amino acid sequence of kocurin. It was shown that a 39-amino acid leader peptide and a 2-residue tail are excised from the mature peptide. Other characteristic genes for thiopeptide biosynthesis were identified in a 20 Kb region of this contig, such as an YcaO-like cyclodehydratase, two lantibiotic-type dehydratases and a McbC-like oxidoreductase. To verify that this predicted biosynthetic gene cluster is responsible for kocurin biosynthesis, we are currently cloning and heterologously expressing the 20 Kb region using a transformation-associated recombination (TAR) strategy (3).

In addition, we will discuss the 7 additional putative secondary metabolite clusters, including terpenes, siderophores, linaridin and a bacteriocin that were predicted in the *K. palustris* CA-276345 genome using antiSMASH (4), as well as the additional 47 putative gene clusters predicted by the analysis with Clusterfinder algorithm. These predictions suggest the genomic potential of an actinomycete genus previously underexploited as producer of diverse natural products.

References.

1. Martín J, da S. Sousa T, Crespo G, Palomo S, González I, Tormo JR, de la Cruz M, Anderson M, Hill RT, Vicente V, Genilloud O, Reyes F. (2013). *Mar. Drugs*. 11:387-398.
2. Palomo S, González I, de la Cruz M, Martín J, Tormo JR, Anderson M, Hill RT, Vicente F, Reyes F, Genilloud O. (2013). *Mar. Drugs*. 11:1071-1086.
3. Yamanaka K, Reynolds KA, Kerstena RD, Ryana,KS, Gonzalez DJ, Nizete V, Dorresteina,PC, Moore BS. (2014) *PNAS* 111:1957–1962.
4. Weber T, Blin K, Duddela S, Krug D, Kim HU, Bruccoleri R, Lee SY, Fischbach MA, Müller R, Wohlleben W, Breitling R, Takano E, Medema, MH. (2015) *Nucleic Acids Res.* 43:W237-W243.

ÍNDICE DE AUTORES

A. Braña, Alfredo	Costales, Paula	G. Ruiz de Morales, José María
Ageitos Martínez, José Manuel	D. Payero, Tamara	Galán, Beatriz
Alduina, Rosa	Da Silva, Paulo Henrique	García Salcedo, Raúl
Alexander, N.J.	de la Calle, Fernando	García, José Luis
Alonso-Ramírez, Ana	de la Cruz, Fernando	García, María Teresa
Álvarez-Álvarez, Rubén	de Pedro, Antonio	García-Angulo, Penélope
Álvarez-Pérez, Jose Manuel	del Cerro, Carlos	García-Estrada, Carlos
Alvira, P	Díaz, Eduardo	García-Fernández, Julia
Antoraz, Sergio	Díaz, Margarita	García-Ferris, Carlos
Araujo Vidal, Daldo Ricardo	Díaz, Pilar	García-Lino, Alba M.
Arleth Gómez, Xiomar	Díez García, Bruno	Garrido, Carlos
Ayuso-Fernández, Iván	Docavo, Marta	Garzón-Jimeno, Enrique
Bacete, Laura	Domínguez-Asenjo, Bárbara	Genilloud, Olga
Bajac, Anina	Domínguez-Santos, Rebeca	Gil, José A.
Balaña-Fouce, Rafael	Duarte, Armando C.	Giner, Laura
Ballesteros, Mercedes	Duarte, Catarina	Gómez, Cristina
Barajas, Enrique	el Aouad, N.	Gómez, X.
Barredo, José Luis	Escapa, A.	González Abril, Ana
Barreiro, Carlos	Escobar-Niño, Almudena	González Villa, Tomás
Barua, J.	Estupiñán, Mónica	González, Beatriz
Becerril, Adriana	F. Aparicio, Jesús	González, Ignacio
Beltrán, Gemma	F. Braña, Alfredo	González, Irene
Binda, Elisa	F. Villadangos, Almudena	González, Lorena
Bódalo, Alejandro	Feijoo Siota, Lucía	González-Andrés, Fernando
Botas, Alma M ^a	Felpeto-Santero, Carmen	González-Benjumea, Alejandro
Braña, Alfredo	Fernández Cañón, José Manuel	González-García, Sandra
Calo Mata, Pilar	Fernández De la Hoz, Jorge	González-López, Óscar
Caminero, Alberto	Fernández González, Cristina	Gonzalez-Menendez, V.
Campelo, M ^a Piedad	Fernández, Domingo	González-Quiñonez, Nathaly
Campillo-Brocal, Jonatan C.	Fernandez, Julia	González-Rodríguez, María José
Cánovas, David	Fernández, Lorena	González-Rodríguez, Victoria E.
Cantoral, Jesús M.	Fernández, Rogelio	Gonzalo, Alfonso
Carbú, María	Fernández-Cabezón, Lorena	Gross, Harald
Cardoza, R.E.	Fernández-Fueyo, Elena	Gutiérrez, Santiago
Carrasco, Aída	Fernández-Lobato, María	Gutiérrez, Sergio
Carro-Hueriga, Guzmán	Fernández-Morales, Ana	Gutiérrez-Corvo, Camino
Casqueiro, Javier	Ferrazza, Rosane Elvira	Guzmán, María
Casquero, Pedro Antonio	Ferreres, Guillem	Hermosa, Rosa
Castañeda, Mayra	Ferrero, Miguel Ángel	Hernández Benítez, Ruth Elena
Cerda, Liliana	Freitas, Ana C.	Ibáñez, Ana
Cobos, Rebeca	Fresno, José María	Ibarra, D
Collado, I.G.	G. Barreales, Eva	Ibero, Juan
Cordero-Bueso, Gustavo	G. Fernández-Bolaños, José	Iglesias-Blázquez, Cristina
Cortés, Jesús	G. Malmierca, Mónica	Inui, Masayuki



Izquierdo-Bueno, I.	Menéndez, Nuria	Rodríguez-Aparicio, Leandro B.
Javier Pastor, Francisco I.	Mercado Blanco, Jesús	Rodríguez-Colinas, Bárbara
Jensen , Ole N	Miedes, Eva	Rodríguez-González, Álvaro
Jordá, Lucía	Molina, Antonio	Rodríguez-Torres, Cristina
Kacar, Dina	Molloy, Brian	Rogowska-Wrzesinska, Adelina
Koning, Roman I.	Moncalián , Gabriel	Rosas-Pérez, Tania
Kosalková, Katarina	Monte, Enrique	Rubio Coque, Juan José
Koster, Abraham J.	Morán, Alfredo	Rubio, José Antonio
Lacret , Rodney	Morcillo, M ^a Ángeles	Rubio, María Belén
Latorre, Amparo	Moreno, A D	Ruiz, Marina
Lázaro, Beatriz	Moreno, Rubén	Ruiz-Deuñas, Francisco Javier
Lindo, L.	Morís, Francisco	Sacristan, Soledad
Llop, Pablo	Mourenza, Álvaro	Sáez-Jiménez, Verónica
López, Óscar	Mulas, Rebeca	Salas, José A.
López-García, María Teresa	Muñoz, Antonio	Salor, José María
Lopez-Iglesias, Carmen	Muñoz-Benavent, Maria	Sánchez Barrionuevo, Leyre
Lorenzana, Alicia	Nistal, Esther	Sánchez-Amat, Antonio
Lorenzo, L.	Núñez, Luz Elena	Sánchez-Cao, Manuel
Lucas-Elio, Patricia	O. Ballesteros, Antonio	Sánchez-Hidalgo, Marina
Luengo Rodríguez, José María	Olano, Carlos	Santamaría, Ramón. I.
Maicas, S.	Olego, Miguel Angel	Santos-Merino, María
Manresa, M Ángeles	Orejas , Margarita	Sanz, David
Manteca, Ángel	Ortega de los Ríos, Lidia	Schumacher, Julia
Marcos, Laura	Oves-Costales, Daniel	Serra, Ana Teresa
Marín, Patricia	P. Gomes, Ana M.	Sevillano, Laura
Marinelli, Flavia	Palomares, I.	Shliaha, Pavel V.
Marqués, Silvia	Pastor, F. I. Javier	Solsona, Marta
Martin, J.	Pastor, Francisco Javier	Sopeña, Sara
Martín-Arevalillo, Raquel	Pastor-Bueis, Raquel	Swami, Sanjay
Martínez, E. J.	Peretó, Juli	T. Martínez, Ángel T.
Martínez, Igor Martínez	Pérez-Andrés, Jenifer	Tomás-Pejó, Elia
Martínez, Josefina	Pérez-Escuredo, Jhudit	Torija, M ^a Jesús
Martínez-Blanco, Honorina	Pérez-Pertejo, Yolanda	Tormo, J.R.
Martirani von Abercron, Sophie Marie	Picazo, Cecilia	Tornadizo, M ^a Eugenia
Mas, Albert	Pisciotta, Annalisa	Torres, Miguel Angel
Matallana, Emilia	Plou, Francisco J.	V. Valenzuela, Susana
Mateo, J.J.	Punin y Nistan, Fernando María	van Wezel, Gilles P.
Mateos, Luis M.	R. Herrán, Alexandra	Vicente, Cláudia M.
Maya, Inés	Ramón , Daniel	Vicente, Isabel
Mayo, Baltasar	Reyes , F.	Villanueva, Soledad
Mayo, Sara	Rioseras, Beatriz	Willemse, Joost
McCormick , S.P.	Rodrigues, Dina Rodrigues	Yagüe, Paula
Mélida, Hugo	Rodríguez Rama, José Luis	Ye, Suhui
Mellado, Encarnación	Rodríguez, Carlos Nicolás	
Méndez, Carmen	Rodríguez, M. Esther	



ENTIDADES COLABORADORAS

