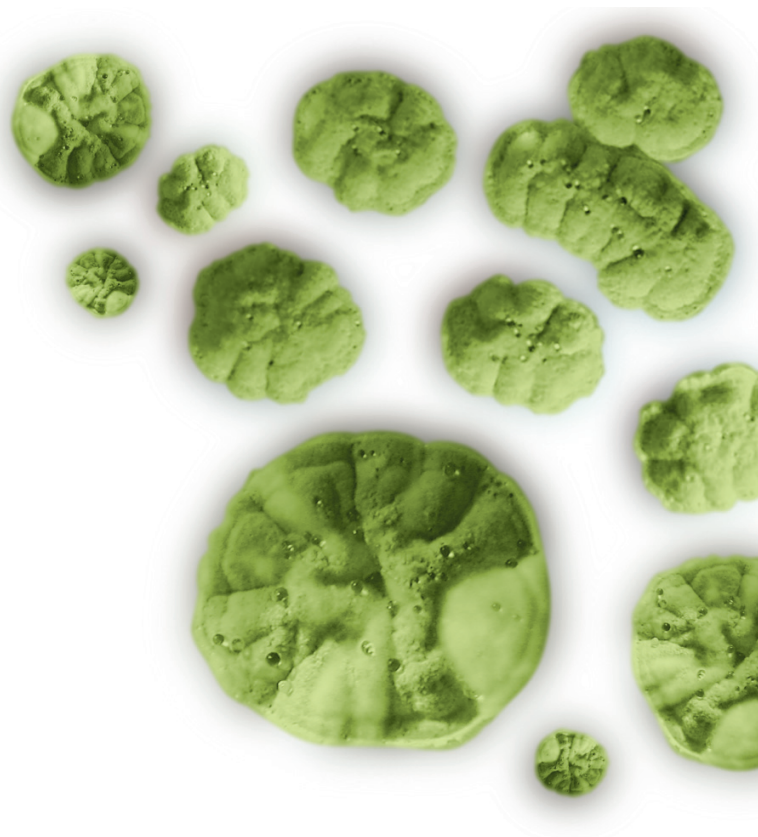




CMIBM2010

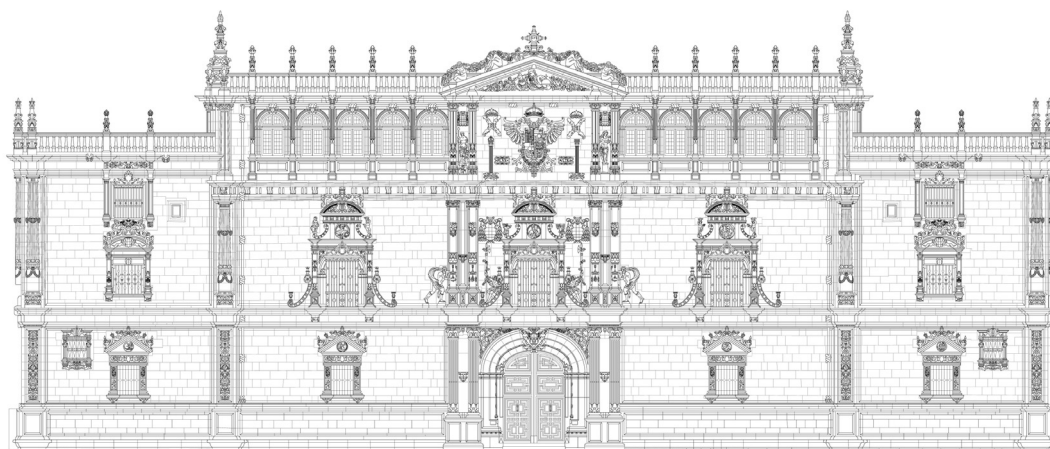
www.cmibm2010.fgua.es

III Congreso de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana

Universidad de Alcalá

Alcalá de Henares (Madrid)

17-19 de noviembre de 2010



Universidad
de Alcalá

CMIBM 2010

**III Congreso de Microbiología Industrial y
Biotecnología Microbiana**

Alcalá de Henares, 17-19 de Noviembre de 2010

Universidad de Alcalá

LIBRO DE RESÚMENES



Universidad
de Alcalá

Edita:

Fundación General de la Universidad de Alcalá

Departamento de Formación y Congresos

c/ Imagen, 1-3

28801 Alcalá de Henares. Madrid

Teléfono: 91 879 74 30

Fax: 91 879 74 55

Email: congresos@fgua.es

Web: www.fgua.es

COMITÉ ORGANIZADOR

Presidenta:

M^a Enriqueta Arias (Universidad de Alcalá)

Vocales:

Julio Abalde (Universidad de A Coruña)

Jorge Barros (Universidad de Santiago de Compostela)

Pilar Díaz (Universidad de Barcelona)

Francisco Guillén (Universidad de Alcalá)

Manuel Hernández (Universidad de Alcalá)

Javier Mérida (Universidad de Alcalá)

Francisco Javier Pastor (Universidad de Barcelona)

María Isabel Pérez (Universidad de Alcalá)

Juana Rodríguez (Universidad de Alcalá)

COMITÉ CIENTÍFICO

M^a Enriqueta Arias (Universidad de Alcalá)

Mercedes Ballesteros (CIEMAT)

Tomás González (Universidad de Santiago de Compostela)

Manuel Hernández (Universidad de Alcalá)

Juan Francisco Martín (Universidad de León)

Ángel Martínez (CIB-CSIC)

Joaquín Moreno (Universidad de Almería)

María Isabel Pérez (Universidad de Alcalá)

Daniel Ramón (BIOPOLIS, S.L.)

José Antonio Salas (Universidad de Oviedo)

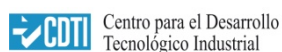
ORGANIZADO POR:



ENTIDADES PATROCINADORAS



ENTIDADES COLABORADORAS



SUMARIO

	Pág.
✓ Programa del Congreso	19
✓ Conferencia Inaugural	27
CIN-1 Biosíntesis combinatoria y generación de nuevos compuestos bioactivos en actinomicetos <i>José Antonio Salas</i>	29
✓ Sesiones Científicas:	
I. Biotecnología Agrícola y Ambiental (BAA)	31
BAA-O1 <i>Trichoderma</i> : biocontrol, genes de defensa y plantas transgénicas <i>Enrique Monte</i>	33
BAA-O2 Potencial de las bacterias rizosféricas en la eliminación de contaminantes <i>Sara Rodríguez-Conde, Alicia García, Ana Segura</i>	34
BAA-O3 Aproximaciones biotecnológicas al control de enfermedades de plantas: de las bacterias como agentes de control biológico a la agricultura ecológica tradicional <i>Antonio de Vicente, Francisco M. Cazorla, Alejandro Pérez-García</i>	35
BAA-O4 Microbiota lignocelulolítica asociada al proceso de compostaje: aplicaciones biotecnológicas <i>M^a del Carmen Vargas García, Francisca Suárez Estrella, M^a José López, Gema Guisado, Joaquín Moreno</i>	36
BAA-O5 Biooxidación avanzada de compuestos contaminantes por microorganismos <i>Francisco Guillén, Ana Belén García, Raquel Moya, Manuel Hernández, Juana Rodríguez, María Isabel Pérez, Alba Blánquez, María Enriqueta Arias</i>	38
II. Biotecnología Farmacéutica (BF)	41
BF-O1 Replicación del virus de la gripe: diseño de medidas terapéuticas y preventivas <i>Núria Jorba, Rocío Coloma, Patricia Resa-Infante, María Angeles Recuero-Checa, Noelia Zamarreño, Rocío Arranz, José M. Valpuesta, José L. Carrascosa, Jaime Martín-Benito, Óscar Llorca, Juan Ortín</i>	43
BF-O2 Investigación y desarrollo de nuevas vacunas contra la tuberculosis <i>Carlos Martín</i>	44
BF-O3 Enzibióticos y tuberculosis <i>Patricia Veiga-Crespo, Sara Tomé-García, Tomás G. Villa</i>	45

BF-O4	Descubrimiento de nuevos fármacos a partir de microorganismos marinos <i>Fernando de la Calle Verdú</i>	46
BF-O5	Genética de la producción del inmunosupresor Tacrolimus <i>Carlos Barreiro, Alberto Sola-Landa, Miriam Martínez-Castro, Carlos Prieto, Rosario Pérez-Redondo, Carlos García-Estrada, Antonio Rodríguez-García, Lorena T. Fernández-Martínez, Zahra Salehi, Elena Solera, Jesús Aparicio, Juan F. Martín</i>	48
III. Biotecnología Enzimática (EIB)		51
EIB-O1	Sistema enzimático de <i>Trametes versicolor</i> implicado en la degradación de contaminantes emergentes <i>P. Blázquez, G. Caminal, B. Castillo, C. Cruz-Morató, E. Marco-Urrea, C. Rodríguez-Rodríguez, M. Sarrà, T. Vicent</i>	53
EIB-O2	Estudio nanoscópico y electroquímico de la interacción de moléculas de lacasa con electrodos de Au(111) y HOPG <i>Katiuska González Arzola, M^a Carmen Arévalo, Alejandro González Orive, Alberto Hernández Creus, Miguel Ángel Falcón</i>	55
EIB-O3	Nuevas Xilanasas para biotecnología papelera <i>Susana V. Valenzuela, Oscar Gallardo, Cristina Valls, Teresa Vidal, M. Blanca Roncero, Pilar Díaz, F. I. Javier Pastor</i>	57
EIB-O4	Peroxidasa versátil de alto potencial redox: Estudios estructura-función dirigidos a su aplicación biotecnológica <i>Francisco J. Ruiz Dueñas, María Morales, María Jesús Martínez, Angel T. Martínez</i>	58
EIB-O5	Nuevas perspectivas para el sistema lacasa-mediador en la industria papelera <i>Jordi Garcia-Ubasart, M^a Blanca Roncero, Josep F. Colom, Teresa Vidal</i>	60
IV. Bioenergía y Biocombustibles (BB)		61
BF-O1	Tecnologías de producción de biocombustibles de segunda generación <i>Mercedes Ballesteros</i>	63
BF-O2	Retos Biotecnológicos en la Producción de Etanol Lignocelulósico <i>Pablo Gutiérrez</i>	64
BF-O3	Viejas y nuevas enzimas en el proceso de producción bioetanol de segunda generación <i>Miguel Jurado, María Jesús Martínez</i>	65
BF-O4	Desarrollo de procesos de producción de biocombustibles por métodos biológicos menos contaminantes <i>Fco. G. Ación Fernández, J.M. Fernández Sevilla, E. Molina Grima</i>	66
BF-O5	Estrategia para el desarrollo de un programa de selección de nuevas especies y cepas de microalgas con alto potencial para la producción de biodiesel <i>Laura Carmona Duarte, Héctor Mendoza Guzmán, Adelina de la Jara Valido, Karen Freijanes Presmanes, Patricia Alexandra Clemente Janeiro de Assunção</i>	67

V. Biotecnología de alimentos y bebidas (MAB)	69
MAB-O1 Selección de levaduras vínicas de interés biotecnológico en la Comunidad de Madrid <i>Teresa Arroyo</i>	71
MAB-O2 Identificación de bacterias patógenas y alterantes en alimentos de origen marino <i>Pilar Calo-Mata, Karola Böhme, Inmaculada C. Fernández-No, José M. Gallardo, Benito Cañas, Jorge Barros-Velázquez</i>	73
VI. Nuevos retos en Biotecnología (NR)	75
NR-O1 Directed Evolution of Ligninolytic Oxidoreductases <i>Miguel Alcalde</i>	77
NR-O2 <i>TriBioPlast®</i> : Producción de biopolímeros por fermentación <i>José Luis Adrio, Carmen Rochel</i>	78
NR-O3 Nuevas aproximaciones al descubrimiento de productos naturales: diversidad microbiana y potencial biosintético <i>Olga Genilloud</i>	79
NR-O4 Los bioplásticos de origen bacteriano: ficción o realidad <i>M^a Auxiliadora Prieto</i>	80
NR-O5 Levaduras humanizadas: aplicaciones en oncología molecular <i>Víctor J. Cid, Isabel Rodríguez-Escudero, Teresa Fernández-Acero, Rafael Pulido, María Molina</i>	81
✓ Conferencia de clausura (CCL-1)	83
CCL-1 El futuro de la Biotecnología Microbiana <i>Daniel Ramón</i>	85
✓ Comunicaciones en formato póster	87
BAA-P1 Degradación de PAHs por <i>Pseudomonas stutzeri</i> CECT 930 (ATCC17588) <i>Francisco J. Deive Herva, Fátima Moscoso Díaz, María A. Longo González, M. Ángeles Sanromán Braga</i>	89
BAA-P2 Biodegradación de compuestos aromáticos contaminantes de suelos por hongos soportados en residuos agroindustriales <i>Emilio Rosales, Marta M^a Pazos, Xabier Vázquez, M^a Ángeles Sanromán</i>	91
BAA-P3 Estudio operativo y microbiológico de la degradación de fenol en biorreactores de <i>spouted bed</i> de cultivo soportado <i>Bárbara Safont Resardi, Ana. I. Vitas Peman, Miriam Guivernau Ribalta, Francesc Prenafeta Boldz, Francisco J. Peñas Esteban</i>	92
BAA-P4 Estudio de biodegradación de filmes fotodegradados de polietileno por <i>Brevibacillus borstelensis</i> . Efecto de aditivos pro-oxidantes <i>J. L. Pablos, T. Corrales, J. López-Marín, I. Marín F. Catalina, C. Abrusci</i>	93
BAA-P5 Biodegradación y Toxicidad de Diuron y sus Metabolitos <i>Karina Boltes Espínola, Leticia Calvo Cabrerizo, Pedro Letón García, Eloy García Calvo</i>	94

BAA-P6	Biomasa viva de la microalga marina <i>Phaeodactylum tricornutum</i> como biosorbente natural de cadmio <i>Julio Abalde, Enrique Torres, Cristina Suárez</i>	95
BAA-P7	Biosorción de cadmio por la microalga marina <i>Tetraselmis suecica</i> <i>Enrique Torres, Cristina Suárez, Julio Abalde</i>	96
BAA-P8	Potencial de la capa S de <i>Lysinibacillus sphaericus</i> en la remoción de metales pesados <i>Lucía Cristina Lozano, Juan Alfonso Ayala, Jenny Dussán</i>	97
BAA-P9	Hacia un diseño para la biorremediación de efluentes industriales contaminados con materia orgánica y altos niveles de cromo: Aislamiento de microorganismos y caracterización de sus capacidades biorremediadoras de cromo <i>Irma Marín, Ghizlane Loulidi, Gerardo Pulido, Ana Morato, Moustafa Malki, Mohamed Merzouki, José P. Abad</i>	98
BAA-P10	Caracterización microbiana en diferentes ensayos de bioestimulación de un acuífero contaminado por alquilbencenos no sulfonados <i>Eulàlia Martínez Pascual, Georgina Vidal, Anna Maria Solanas, Marc Viñas</i>	99
BAA-P11	Ensayos de bioaumentación fúngica y/o adición de compost para el tratamiento de un suelo industrial contaminado por hidrocarburos pesados <i>Miriam Guivernau, M^a Cecilia Medaura, Francesc X. Prenafeta, Xabier Moreno-Ventas, Eduardo Ércoli, Marc Viñas</i>	100
BAA-P12	Selección de microorganismos útiles en procesos de biosorción de colorantes sintéticos <i>Gema Guisado, María José López, María del Carmen Vargas-García, Francisca Suárez-Estrella, Juan Antonio López-González, Joaquín Moreno</i>	102
BAA-P13	Utilización de nanopartículas de hierro (FeNP) en procesos de descontaminación ambiental: impacto en las poblaciones bacterianas <i>C. Fajardo, M. Martín, B. Montalbán, M. Gil-Díaz, A. Pérez-Sanz, M.C. Lobo</i>	104
BAA-P14	Evaluación del efecto del compost procedente de residuos agroindustriales sobre el crecimiento y desarrollo vegetal <i>Juan Antonio López González, Francisca Suárez Estrella, M^a del Carmen Vargas García, M^a Josefa López López, Gema María Guisado Úbeda, Joaquín Moreno Casco</i>	105
BAA-P15	Efecto del herbicida glifosato sobre las comunidades rizobacterianas de plantas de maíz NK603 tolerante a glifosato <i>Jorge Barriuso, Silvia Marín, Rafael P. Mellado</i>	107
BAA-P16	Obtención de consorcios bacterianos con actividad promotora de crecimiento en plantas de arroz mediante enriquecimientos continuos <i>Javier Vanegas, Daniel Uribe</i>	108

BAA-P17	Aplicaciones biotecnológicas de residuos agroindustriales procedentes de Nicaragua <i>Aura Lyli Orozco, Alba Blánquez, Ana Belén García, Octavio Guevara, Manuel Hernández, Juana Rodríguez, M^a Enriqueta Arias, M^a Isabel Pérez</i>	109
BAA-P18	Evaluación de la actividad biológica en un suelo de olivar tratado con estiércol porcino <i>M Gil-Díaz, A Pradas del Real, A Pérez-Sanz, M.A. Vicente, J.I. Tejerina, M.C. Lobo</i>	110
BAA-P19	Flow cytometry and kinetic models applied to viability study of isolated strains from paper industry <i>Esperanza Torres García, Patricio López Expósito, Almudena Alcon Martín, Victoria Santos Mazorra, Ángeles Blanco Suárez</i>	111
BAA-P20	Estudio de una proteasa aspártica involucrada en la interacción <i>Trichoderma</i> -planta <i>Ilanit Samolski, María Belén Suárez, Rosa Elena Cardoza, Santiago Gutiérrez, Enrique Monte</i>	112
BAA-P21	El extremo carboxilo-terminal de la proteína NrsD confiere resistencia a metales pesados en la cianobacteria <i>Synechocystis</i> <i>sp</i> PCC 6803 <i>J. Giner-Lamia, M. Roldán-Gálvez, L. López-Maury, F.J. Florencio</i>	113
BAA-P22	Análisis de la respuesta génica de <i>Trametes versicolor</i> a la presencia de TCE <i>B. Castillo, N. Gaju, G. Caminal, P. Blanquez, M. Martínez-Alonso</i>	114
BAA-P23	Obtención y caracterización de consorcios bacterianos degradadores de hidrocarburos aromáticos <i>Iván Lores Ovies, Ana Isabel Peláez, J.L. Rodríguez Gallego, María-Eugenia Guazzaroni, Manuel Ferrer, Jesús Sánchez</i>	115
BF-P1	Análisis de la regulación de la biosíntesis del antitumoral mitramicina en <i>Streptomyces argillaceus</i> <i>Ana Belén Flórez García, Felipe Lombó Brugos, Alfredo Fernández Braña, José Antonio Salas Fernández, Carmen Méndez Fernández</i>	116
BF-P2	Automated assay for <i>in vitro</i> sensitivity testing of <i>Aspergillus</i> <i>fumigatus</i> <i>M. C. Monteiro, M. de la Cruz, J. Cantizani, E. Mellado, R. Tormo, F. Vicente, O. Genilloud</i>	117
BF-P3	Búsqueda y análisis de los genes relacionados con la biosíntesis de holomicina en <i>Streptomyces clavuligerus</i> <i>Vanessa Robles-Reglero, Irene Santamarta, Rubén Álvarez-Álvarez, Paloma Liras</i>	118
BF-P4	Caracterización de los genes implicados en la modificación del amino ácido 3-metil-aspártico durante la biosíntesis de estreptolidigina <i>Dina H. Horna, Cristina Gómez, Carlos Olano, Alfredo F. Braña, Carmen Méndez, José A. Salas</i>	119
BF-P5	Diferenciación y producción de metabolitos secundarios en cultivos sumergidos de <i>Streptomyces tsukubaensis</i> productor de tacrolimus <i>Paula Yagüe Menéndez, Ángel Manteca Fernández, Ana Isabel Pelaez Andres, Miriam Martinez Castro, Jesús Sánchez Martín</i>	120

BF-P6	Diversidad de compuestos antimicrobianos producidos por Actinomicetos aislados desde hormigas cortadoras de hojas <i>Carlos Sialer, Dina H. Horna, Alfredo F. Braña, Carmen Méndez, José A. Salas</i>	121
BF-P7	Mejora de la producción del antitumoral mitramicina en <i>Streptomyces argillaceus</i> mediante ingeniería metabólica <i>Daniel Zabala Álvarez, Ana Belén Flórez García, Alfredo Fernández Braña, José Antonio Salas Fernández, Carmen Méndez Fernández</i>	122
BF-P8	Producción biotecnológica de la Dracotoxina y la Trachinina <i>J.L. Rodríguez Rama, Trinidad de Miguel, José Antonio Lamas, Antonio Reboreda, Tomás González Villa</i>	123
BF-P9	Síntesis biocatalizada de compuestos antivirales empleando enzimas inmovilizadas <i>Sara Gomez Quevedo, Jorge A. Trelles, Claudia N. Britos, Marcos Almendros, José V. Sinisterra</i>	124
BF-P10	Competición entre los reguladores GlnR y PhoP: Solapamiento en la zona de unión al promotor <i>glnA</i> de <i>Streptomyces coelicolor</i> <i>Juan F. Martín, Antonio Rodríguez-García, Rafat Amin, Wolfgang Wohleben, Alberto Sola-Landa</i>	125
BF-P11	El factor omega de la RNA polimerasa es necesario para el crecimiento completo de <i>Streptomyces coelicolor</i> y para la biosíntesis de actinorrodina y undecilprodigiosina: Unión del promotor PhoP a su región promotora <i>Fernando Santos-Beneit, Mónica Barriuso Iglesias, Miriam Martínez-Castro, Alberto Sola-Landa, Antonio Rodríguez-García, Juan F. Martín</i>	126
BF-P12	Síntesis de nutraceuticos mediada por esteroles esterasas <i>Víctor Barba Cedillo, Alicia Prieto, M^a Jesús Martínez</i>	127
BF-P13	Nuevos polienos con propiedades farmacológicas mejoradas obtenidos mediante manipulación genética en <i>Streptomyces diastaticus</i> var. 108 <i>Elena M. Seco Martín, Leticia Escudero, Trinidad Cuesta, Cristina Nieto, Francisco Malpartida</i>	128
EIB-P1	Biobleaching of sisal pulp involving Xylanase and laccase-mediator systems <i>Elisabetta Aracri, Teresa Vidal</i>	129
EIB-P2	Influencia del tipo de pasta y de distintos sistemas lacasa-mediador sobre la eficacia del proceso de bioblanqueo <i>M.E. Eugenio, R. Martín-Sampedro, R. Moya, M. Hernández, J.C. Villar, M.E. Arias</i>	130
EIB-P3	Oxidative enzymes for bleaching a non-wood pulp <i>Amanda Fillat, M. Blanca Roncero, Teresa Vidal</i>	131
EIB-P4	¿Está implicada la lacasa de <i>Streptomyces cyaneus</i> CECT 3335 en la degradación de lignina? <i>Raquel Moya, José Antonio Salas, Carmen Méndez, Alba Blánquez, Juana Rodríguez, Manuel Hernández, M^a Enriqueta Arias</i>	132

EIB-P5	Directed evolution of a high-redox potential laccase in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : improving functional expression, thermostability and kinetic properties <i>Diana Maté, Eva García-Ruiz, Mohammad Moshtaghioun, Susana Camarero, Miguel Alcalde</i>	134
EIB-P6	Caracterización de actividades glicolíticas de levaduras no- <i>Saccharomyces</i> aisladas de mosto bobal <i>Sergi Maicas Prieto, Almudena Nieto Soria, José Juan Mateo Tolosa</i>	135
EIB-P7	Identificación y caracterización de un sistema de dos componentes de <i>Streptomyces coelicolor</i> que regula la síntesis de proteínas extracelulares y dispara la “stringent response” <i>Daniel Rozas, Sonia Gullón y Rafael P. Mellado</i>	136
EIB-P8	La deficiencia en la translocación de proteínas extracelulares en <i>Streptomyces lividans</i> afecta negativamente a la esporulación <i>Sonia Gullón Blanco, Carmen Palomino del Castillo, Rafael Pérez Mellado</i>	138
EIB-P9	LysA2, la Lisina del bacteriófago A2 de <i>Lactobacillus casei</i> es una endopeptidasa activa sobre un amplio espectro de bacterias lácticas <i>Pedro Ribelles, Isabel Rodríguez, Juan E. Suárez</i>	139
EIB-P10	Represión de la actividad lisina oxidasa de <i>Marinomonas mediterranea</i> por L-tirosina <i>Luisa R. Molina-Quintero, Patricia Lucas-Elío, Antonio Sanchez-Amat</i>	140
EIB-P11	Validación de la función de ArgR en <i>Streptomyces coelicolor</i> <i>A. Botas-Muñoz, R. Pérez-Redondo, A. Rodríguez-García, C. Sanmillán-Blanco, P. Liras</i>	141
EIB-P12	Métodos de inmovilización de lacasa de <i>Myceliophthora thermophila</i> <i>M. Fernández-Fernández, M.A. Sanromán, D. Moldes</i>	142
EIB-P13	Modelización <i>in silico</i> y activación <i>in vitro</i> de la proteasa Epr de <i>Bacillus licheniformis</i> expresada en <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) <i>José Manuel Ageitos, José Luis Rodríguez-Rama, Lucía Feijoo-Siota, Juan Andrés Vallejo, Tomás G. Villa</i>	143
EIB-P14	Búsqueda de nuevas glicosidasas. Caracterización de una nueva β -fucosidasa de <i>Cellulomonas gelida</i> <i>Carlos Bayón Sánchez, Javier Tomé Alcalde, María José Hernáiz Gómez-Dégano, José Vicente Sinisterra Gago</i>	144
EIB-P15	Clonación y expresión heteróloga en <i>Escherichia coli</i> de un nuevo gen que codifica una enzima con actividad licopeno β -ciclasa <i>José Araya Garay, Lucía Blasco Otero, Sara Tomé García, Patricia Veiga Crespo, Tomás González Villa</i>	145
EIB-P16	Estudio metagenómico de actividades enzimáticas hidrolíticas en una salina solar <i>Ana B. Fernández, Lejla Pašić, Rohit Ghai, Ana-Belén Martín-Cuadrado, Cristina Sánchez-Porro, Antonio Ventosa, Francisco Rodríguez-Valera</i>	147

EIB-P17	Evolución dirigida para incrementar la termoestabilidad de la lipasa LipC de <i>Pseudomonas</i> sp. 42A2 <i>Silvia Cesarini, Cristina Bofill, Manfred Reetz, F.I. Javier Pastor, Pilar Diaz</i>	148
BB-P1	Estudio de diferentes membranas de intercambio iónico en bioceldas de combustible: efectos en la comunidad microbiana y en la electroquímica del proceso <i>A.Sotres, J. Díaz, M. Guivernau, A. Bonmatí, M. Viñas.</i>	149
BB-P2	Enrichment of methanogenic strains from marine sediments from Admiralty Bay and Bransfield Strait, King George Island, Antarctic Peninsula <i>Diego Castillo Franco, Ana Carolina Araujo, Ana Claudia Mancusi, Cristina Rossi Nakayama, Lucia Campos, Vivian Helena Pellizari</i>	151
BB-P3	Determinación de la actividad de metanógenas en la obtención de biohidrógeno <i>S. Zahedi Díaz; L.I. Romero García; D. Sales Márquez; R. Solera del Río</i>	152
BB-P4	Producción de etanol de segunda generación a partir de residuo de poda del olivo pretratado mediante explosión por vapor <i>Ignacio Ballesteros, Mercedes Ballesteros, Eulogio Castro , Felicia Sáez, Paloma Manzanares, MªJosé Negro, José Miguel Oliva</i>	153
BB-P5	Nuevas enzimas para producir etanol 2G: Inducción y caracterización de una β -glucosidasa de <i>Aspergillus japonicus</i> <i>Elda S. da Silva, Miguel Jurado, María Filomena A Rodrigues, María Jesús Martínez</i>	154
BB-P6	Búsqueda de basidiomicetos eficaces para el pretratamiento de la paja de trigo y la producción de etanol 2G <i>Davinia Salvachúa, Alicia Prieto, Ángel T. Martínez, Mª Jesús Martínez</i>	155
BB-P7	Oxidación con ozono de residuos lignocelulósicos en el proceso de obtención de bioetanol <i>M. Teresa García-Cubero, Silvia Bolado, Gerardo González-Benito, Mónica Coca</i>	156
BB-P8	Pretretamiento por extrusión de paja de cebada para la producción de azúcares fermentables mediante hidrólisis enzimática <i>A. Duque, P. Manzanares, I. Ballesteros, M.J. Negro, J.M. Oliva, A. Gonzalez, M. Ballesteros</i>	158
BB-P9	Optimización del proceso directo de producción de biodiesel a partir del hongo <i>Mucor circinelloides</i> <i>Gemma Vicente, L. Fernando Bautista, Alicia Carrero, Rosalía Rodríguez, Gonzalo L. del Peso, Fernando Prieto, Rosa A. Rodríguez-Frometa, Rosa M. Ruiz-Vazquez, Santiago Torres-Martinez, Victoriano Garre</i>	160
BB-P10	Aislamiento y caracterización de bacterias productoras de hidrógeno por fermentación ácida a partir de lodo granular anaerobio <i>Hayfa Rajhi, Monica Conthe Calvo, Emilano Díaz Portuondo, José Luis Sanz Martín</i>	162

BB-P11	Producción de bioetanol a partir de algarroba: Modelización de la inhibición del proceso fermentativo por el alcohol acumulado <i>M.E. Lima-Costa, C. Tavares, S. Raposo, C. Quintas, Galera, S., J.M. Peinado</i>	163
MAB-P1	Producción de ácido poli-γ-glutámico (PGA) mediante fermentación con sustrato sólido y <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Abert Tagliavini, Albert Roger, Jordi J. Boul</i>	164
MAB-P2	Aislamiento y caracterización de bacterias productoras de histamina aisladas de rodaballo y besugo de acuicultura refrigerados <i>Inmaculada Concepción Fernández No, Karola Böhme, Alberto Cepeda, Jorge Barros-Velázquez, Pilar Calo-Mata</i>	166
MAB-P3	Aplicación de principios bioactivos con actividad anti- <i>Listeria</i> como conservantes de alimentos <i>A. Baños, C. Núñez, M.J. Ruiz, A. Rodríguez, P. Abad, E. Guillamón</i>	167
MAB-P4	Efecto de la expresión de la región codificadora de citocromo C fusionada a diferentes regiones 3'-UTR en levaduras <i>Irma Vázquez-Chico, Silvia Seoane, M^a Angeles Freire-Picos</i>	168
MAB-P5	Estrategia para el desarrollo de una cepa de <i>S. cerevisiae</i> hipersecretante de péptidos portadores de dominio CBD <i>Sarath Gundllapalli, Isak Pretorius, Ricardo Cordero Otero</i>	169
MAB-P6	Hidrofilinas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> participan en la tolerancia al secado <i>Gema Isabel López-Martínez, Ricardo Cordero-Otero</i>	170
MAB-P7	Identification of seafood spoilage and pathogenic bacteria: 16S rRNA vs. MALDI-TOF MS fingerprinting analysis <i>Karola Böhme, Inmaculada C. Fernández-No, José M. Gallardo, Jorge Barros-Velázquez, Benito Cañas, Pilar Calo-Mata</i>	171
MAB-P8	Estudio de la actividad antimicrobiana de diferentes extractos de café frente a <i>Campylobacter jejuni</i> <i>Elisa Mingo, Jose Manuel Silván, Miriam Amigo Benavente, M^a Dolores del Castillo, Adolfo Martínez Rodríguez</i>	172
MAB-P9	Estudio de la especie vegetal <i>Ficus carica</i> como fuente de proteasas aspárticas destinadas a la industria láctea <i>Lucía Feijoo Siota, José Miguel Araya Garay, Patricia Veiga Crespo, Trinidad de Miguel Bouzas y Tomás González Villa</i>	173
MAB-P10	Selección preliminar de aislados microbianos obtenidos de quesos gallegos de leche cruda con capacidad para asimilar colesterol y/o producir ácido linoleico conjugado (CLA), empleando métodos espectrofotométricos UV/Visible <i>Elena María Balboa Alfaya, Aitana Ares-Yebra, José Ignacio Garabal Sánchez</i>	174
MAB-P11	Caracterización de la microbiota asociada a uva de Lanzarote <i>Sara Lorenzo Rodríguez, Sara S. González González, Federico Laich</i>	175

MAB-P12	Diversidad de Bacterias Acéticas en uvas sanas procedentes de las Islas Canarias <i>M^a José Valera, Diana Navarro, Federico Laich, Sara González, M^a Jesús Torija, Estibaliz Mateo, Albert Mas</i>	177
MAB-P13	Microbiota autóctona de la D. O. "Vinos de Madrid" y su potencial biotecnológico <i>Javier Tello, Gustavo Cordero-Bueso, Irene Aporta, Julia Crespo, Teresa Arroyo</i>	178
MAB-P14	Selección de levaduras de interés biotecnológico para su aplicación en la elaboración de vinos ecológicos <i>Tania Balboa-Lagunero, Teresa Arroyo, Juan M. Cabellos, Margarita Aznar</i>	180
MAB-P15	Nuevas tendencias en la industria enológica: selección de levaduras <i>No-Saccharomyces</i> de interés biotecnológico <i>Gustavo Cordero-Bueso, Juan Mariano Cabellos, Mar Gil, Teresa Arroyo</i>	182
MAB-P16	La microbiota intestinal de <i>Thorectes lusitanicus</i> <i>Noemi Hernández, Sonsoles Pacho, José Ramón Verdú, Mónica Suárez</i>	184
NR-P1	High-redox potential laccase engineered by directed evolution in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Susana Camarero, Isabel Pardo, Ana Cañas, Patricia Molina, Miguel Alcalde</i>	185
NR-P2	Improvement of a versatile peroxidase by directed molecular evolution: Functional expression and thermostabilization <i>Eva García-Ruiz, Francisco J. Ruiz-Dueñas, Ángel T. Martínez, Miguel Alcalde</i>	186
NR-P3	Oily Yeast-Oleaginous cell factories <i>Tomás G. Villa, José Manuel Ageitos, Lucia Blasco, Juan Andrés Vallejo y Patricia Veiga-Crespo</i>	187
NR-P4	pNG10A: vector para regular la expresión de genes mediada por cobre en <i>Myxococcus xanthus</i> <i>Nuria Gómez Santos, Raquel García Hernández, María Celestina Sánchez Sutil, Juana Pérez Torres, Aurelio Moraleda Muñoz, Marina Martínez Cayuela, Elena García Bravo, José Muñoz Dorado</i>	188
NR-P5	La levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo para el estudio de proteínas de virulencia bacterianas: Interacción de la proteína SopB de <i>Salmonella</i> con Cdc42 <i>Isabel Rodríguez-Escudero, Nadia L. Ferrer, Rafael Rotger, Víctor J. Cid, María Molina</i>	189
NR-P6	Toxicidad producida por los ácidos grasos de cadena media en el metabolismo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Anna Borrull, Gemma López, Zoel Salvadó, Ricardo Cordero, Nicolas Rozès</i>	190

NR-P7	Inducción de la producción extracelular de radical hidroxilo en <i>Aspergillus nidulans</i> para su aplicación en la degradación de compuestos contaminantes <i>Ana Belén García, Guillermo Ruiz, Raquel Moya, María Isabel Pérez, María Enriqueta Arias y Francisco Guillén</i>	191
NR-P8	Evaluación de la degradabilidad de tintas flexográficas mediante el sistema lacasa mediador <i>Ursula Fillat, Susana Camarero y María Jesús Martínez</i>	193
NR-P9	Optimización de la producción de proteínas en <i>Streptomyces</i> <i>Laura Sevillano, Margarita Díaz y Ramón I. Santamaría</i>	194
✓ Lista de participantes		195
✓ Índice de autores		203

PROGRAMA DEL CONGRESO

PROGRAMA

Miércoles, 17 de noviembre

15:00 - 16:00 Entrega de documentación

16:00 - 16:30 Acto de Apertura

16:30 - 17:20 **Conferencia Inaugural**

Biosíntesis combinatoria y generación de nuevos compuestos bioactivos en actinomicetos

Jose Antonio Salas (Universidad de Oviedo)

17:30 - 19:20 **Sesión Científica I**

BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA Y AMBIENTAL

Moderadores: M^a del Carmen Vargas (Universidad de Almería)

M^a Isabel Pérez (Universidad de Alcalá)

Trichoderma: biocontrol, genes de defensa y plantas transgénicas

Enrique Monte (Universidad de Salamanca)

Potencial de las bacterias rizosféricas en la eliminación de contaminantes

Ana Segura (Estación Experimental del Zaidín. Granada)

Aproximaciones biotecnológicas al control de enfermedades de plantas: de las bacterias como agentes de control biológico a la agricultura ecológica tradicional

Antonio de Vicente (Universidad de Málaga)

Microbiota lignocelulolítica asociada al proceso de compostaje: aplicaciones biotecnológicas

M^a del Carmen Vargas (Universidad de Almería)

Biooxidación avanzada de compuestos contaminantes por microorganismos

Francisco Guillén (Universidad de Alcalá)

19:20 - 20:00 Sesión de pósters

20:30 Cocktail de Bienvenida

Jueves, 18 de noviembre

09:00 - 10:50 Sesión Científica II

BIOTECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

Moderadores: Paloma Liras (Universidad de León)
Manuel Hernández (Universidad de Alcalá)

Replicación del virus de la gripe: Diseño de medidas terapéuticas y preventivas
Juan Ortín (Centro Nacional de Biotecnología. CSIC. Madrid)

Investigación y desarrollo de nuevas vacunas contra la tuberculosis
Carlos Martín (Universidad de Zaragoza)

Enzibióticos y tuberculosis
Patricia Veiga (Universidad de Santiago de Compostela)

Descubrimiento de nuevos fármacos a partir de microorganismos marinos
Fernando de la Calle (PharmaMar)

Genética de la producción del inmunosupresor Tacrolimus
Carlos Barreiro (INBIOTEC. León)

10:50 - 11:30 Pausa café y Sesión de pósters

11:30 - 13:20 Sesión Científica III

BIOTECNOLOGÍA ENZIMÁTICA

Moderadores: M^a Jesús Martínez (CIB-CSIC)
Francisco Guillén (Universidad de Alcalá)

Sistema enzimático de Trametes versicolor implicado en la degradación de contaminantes emergentes
Gloria Caminal (CSIC. Barcelona)

Estudio nanoscópico y electroquímico de la interacción de moléculas de lacasa con electrodos de Au(111) y HOPG
Miguel Angel Falcón (Universidad de La Laguna)

Nuevas xilanasas para biotecnología papelera
Susana Valenzuela (Universidad de Barcelona)

Peroxidasa versátil de alto potencial redox: Estudios estructura-función dirigidos a su aplicación biotecnológica

Francisco Javier Ruiz (CIB-CSIC. Madrid)

Nuevas perspectivas para el sistema lacasa-mediador en la industria papelera

Jordi García (Universidad Politécnica de Cataluña)

16:00 - 17:50 Sesión Científica IV

BIOENERGÍA Y BIOCOMBUSTIBLES

Moderadores: Paloma Manzanares (CIEMAT)

Juana Rodríguez (Universidad de Alcalá)

Tecnologías de producción de biocombustibles de segunda generación

Mercedes Ballesteros (CIEMAT. Madrid)

Retos biotecnológicos en la producción de etanol lignocelulósico

Pablo Gutiérrez (ABENGOA)

Viejas y nuevas enzimas en el proceso de producción bioetanol de segunda generación

Miguel Jurado (CIB-CSIC. Madrid)

Desarrollo de procesos de producción de biocombustibles por métodos biológicos menos contaminantes

Francisco Gabriel Acien (Universidad de Almería)

Estrategia para el desarrollo de un programa de selección de nuevas especies y cepas de microalgas con alto potencial para la producción de biodiesel

Laura Carmona (Instituto Tecnológico de Canarias)

17:50 - 18:10 Pausa café y Sesión de pósters

18:10 - 18:50 Sesión Científica V

BIOTECNOLOGÍA DE ALIMENTOS Y BEBIDAS

Moderadores: Tomás González (Universidad de Santiago de Compostela)

Javier Mérida (Universidad de Alcalá)

Selección de levaduras vínicas de interés biotecnológico en la Comunidad de Madrid

Teresa Arroyo (IMIDRA)

Identificación de bacterias patógenas y alterantes en alimentos de origen marino

Pilar Calo (Universidad de Santiago de Compostela)

19:00 - 20:00 Visita guiada al casco histórico de Alcalá de Henares

21:30 Cena del Congreso

Viernes, 19 de noviembre

09:00 - 11:00 Sesión Científica VI

NUEVOS RETOS EN BIOTECNOLOGÍA

Moderadores: Francisco Javier Pastor (Universidad de Barcelona)

Mª Enriqueta Arias (Universidad de Alcalá)

Directed Evolution of Ligninolytic Oxidoreductases

Miguel Alcalde (Instituto de Catálisis. CSIC. Madrid)

TriBioPlast®: Producción de biopolímeros por fermentación

Carmen Ronchel (Neuron BPh. Granada)

Nuevas aproximaciones al descubrimiento de productos naturales: diversidad microbiana y potencial biosintético

Olga Genilloud (Fundación Medina. Granada)

Los bioplásticos de origen bacteriano: ficción o realidad

Mª Auxiliadora Prieto (CIB-CSIC. Madrid)

Levaduras humanizadas: aplicaciones en oncología molecular

Victor Jiménez (Universidad Complutense de Madrid)

11:00 - 11:30 Pausa café

11:30 - 13:00 Sesión extraordinaria sobre “Investigación-Empresa: encuentros bilaterales”

Moderador: Antonio Abellán. OTRI. Universidad de Alcalá.

Servicios de la Red “Enterprise Europe Network” para el apoyo a la transferencia de tecnología para investigadores y empresas

Belén Lanuza (Asociación de Empresarios del Henares, AEDHE)

Ayudas CDTI a Proyectos de I+D

Pilar Sanz (CDTI)

Evaluación y preparación de propuestas en el Programa Marco de Investigación

Elena Domínguez (Universidad de Alcalá)

13:00 - 13:50 Conferencia de Clausura

El futuro de la Biotecnología microbiana

Daniel Ramón (Biopolis S.L. Valencia)

13:50 - 14:10 Acto de Clausura

CONFERENCIA INAUGURAL

Biosíntesis combinatoria y generación de nuevos compuestos bioactivos en actinomicetos

José Antonio Salas

Departamento de Biología Funcional e Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA), Universidad de Oviedo, 33006 Oviedo

Los actinomicetos constituyen un grupo bacteriano de gran interés industrial por su capacidad de producir una gran variedad de compuestos bioactivos con actividades biológicas de interés terapéutico, en veterinaria o en agricultura. El aislamiento de compuestos bioactivos producidos por actinomicetos ha sido llevado a cabo principalmente por la industria farmacéutica a través de programas de escrutinio mediante el aislamiento de microorganismos procedentes de distintos ambientes naturales, principalmente muestras de suelo, y la detección de la capacidad de éstos de producir nuevos compuestos. La mejora en la producción se ha realizado a través de programas de mutagénesis y selección de mutantes con alta capacidad de producción del metabolito deseado. La síntesis química ha sido también una alternativa al llevar a cabo con éxito la síntesis de muchos compuestos o participar en la generación de compuestos semisintéticos. En los últimos años, han surgido nuevas estrategias para la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos o derivados. En primer lugar, el rastreo en nichos ecológicos no bien caracterizados como los fondos marinos. En segundo lugar, la química combinatoria mediante la creación de librerías de compuestos susceptibles de ser ensayados frente a determinadas dianas celulares principalmente a través del uso de tecnologías de alto rendimiento. Una tercera estrategia implica la aplicación de la tecnología de ADN recombinante a las rutas de biosíntesis de compuestos bioactivos en microorganismos. Mediante esta tecnología es posible crear microorganismos recombinantes que contienen combinaciones génicas que no se han descrito en la naturaleza. Estos microorganismos recombinantes pueden dar lugar a la generación de nuevos compuestos con nuevas estructuras químicas, potencialmente con propiedades mejoradas con respecto al compuesto parental del que proceden. Esta tecnología se ha denominado "biosíntesis combinatoria". Mediante esta tecnología es posible introducir modificaciones químicas en compuestos bioactivos que no son fácilmente accesibles a la química orgánica. En los últimos años se han aislado, identificado y caracterizado un buen número de rutas de biosíntesis de diferentes compuestos bioactivos producidos por actinomicetos. En esta comunicación se presentan datos de la aplicación de la biosíntesis combinatoria a la generación de nuevos derivados de compuestos con actividad antitumoral.

Sesión Científica I:
BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA Y AMBIENTAL

Trichoderma: biocontrol, genes de defensa y plantas transgénicas

Enrique Monte*

Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE). Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca, Campus de Villamayor, 37185 Salamanca.

Email: emv@usal.es

Trichoderma es un género de hongos ascomicetos con múltiples aplicaciones biotecnológicas: desde la producción de celulasas y xilanasas por *T. reesei* hasta la aplicación de diferentes especies como agentes de control biológico en agricultura, constituyendo una alternativa a los productos químicos fitosanitarios. Las habilidades de *Trichoderma* spp. como agentes de control biológico se conocen desde hace más de 75 años, ya que cuentan entre sus atributos ser capaces de parasitar e inhibir el crecimiento de muchos microorganismos fitopatógenos (Monte, 2001). Estos hongos del suelo están ampliamente distribuidos en la naturaleza, son fáciles de aislar y cultivar, crecen rápidamente en muchos ambientes, no causan daños al hombre y animales, y favorecen a las plantas: activan las defensas, estimulan el crecimiento y favorecen la captación de nutrientes. Algunas cepas de *Trichoderma* han sido recientemente registradas para su aplicación comercial como productos fungicidas en agricultura por su probada eficacia de biocontrol, gran capacidad para sobrevivir en distintos ambientes, y estabilidad genética y fenotípica. Los mecanismos de acción de *Trichoderma* en interacción con la planta son: (i) una especial capacidad para parasitar hongos fitopatógenos, debida a la producción de enzimas hidrolíticas de la pared celular como glucanasas, quitinasas y proteasas, (ii) la producción de antibióticos, (iii) la competición por el espacio y los nutrientes, especialmente en la rizosfera, que implica una mayor velocidad de crecimiento, una mejor asimilación de nutrientes y la detoxificación de compuestos xenobióticos, (iv) la estimulación de las defensas de la planta, (v) la capacidad de favorecer la germinación de semillas, y promover el desarrollo de planta y raíces, (vi) la inducción en la planta de resistencia a estreses ambientales, (vii) la liberación de elicitors de respuestas beneficiosas para la planta a partir de sustratos de rizosfera y suelo, y (viii) el aumento de la captación de nutrientes y la eficacia fertilizante en la planta (Lorito y col., 2010). Algunas cepas sólo expresan uno de estos mecanismos pero las más eficientes despliegan varios de ellos, simultánea o secuencialmente, e incluso pueden ser favorecedoras de las actividades de rizobacterias y micorrizas. En los últimos años se han secuenciado los genomas de tres especies de *Trichoderma*: *T. reesei*, *T. atroviride* y *T. virens*; por lo que el número de genes implicados potencialmente en biocontrol se ha visto aumentado. Cuando se han expresado algunos de estos genes en plantas (ej.: quitinasas, glucosidasas o heat shock proteins) éstos ha servido para mejorar la capacidad de las mismas para defenderse frente a fitopatógenos o tolerar estreses térmicos, osmóticos o salinos (Lorito et al., 1998; Dana et al., 2006; Montero-Barrientos et al., 2009) Pese a que la transformación de plantas con genes de *Trichoderma* no va acompañada de reducción de su fenotipo, los cultivos transgénicos disponibles todavía esperan su explotación comercial.

Referencias:

1. Lorito M, Woo SL, Harman GE, Monte E. (2010). Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field. *Annual Review of Phytopathology* 48: 395-417.
2. Dana MM, Pintor-Toro JA, Cubero B. (2006). Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. *Plant Physiology* 142: 722-370.
3. Lorito M, Woo SL, Garcia I, Colucci G, Harman GE, et al. (1998). Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *PNAS* 95:7860-7865.
4. Monte E. (2001). Editorial paper: Understanding *Trichoderma*: Between Agricultural Biotechnology and Microbial Ecology. *International Microbiology* 4: 1-4.
5. Montero-Barrientos M, Hermosa R, Cardoza RE, Gutiérrez S, Nicolás C, Monte E. (2010). Transgenic expression of the *Trichoderma harzianum* hsp70 gene increases *Arabidopsis* resistance to heat and other abiotic stresses. *Journal of Plant Physiology* 167: 659-66

Potencial de las bacterias rizosféricas en la eliminación de contaminantes

Sara Rodríguez-Conde, Alicia García, Ana Segura*

*Grupo de degradación de tóxicos orgánicos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC.
C/ Profesor Albareda, 1, 18008 Granada (España).
Email: ana.segura@eez.csic.es*

Aunque la creciente industrialización ha mejorado la calidad de vida de los ciudadanos, también ha causado graves problemas medioambientales, entre ellos un aumento de los contaminantes en la atmósfera y los suelos. Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) son uno de los grupos de contaminantes orgánicos más ampliamente distribuidos en la biosfera y algunos de ellos son tóxicos y/o tienen propiedades carcinogénicas. En nuestro laboratorio hemos aislado varias bacterias degradadoras de fenantreno (utilizado como compuesto modelo) de la rizosfera y del suelo desnudo de zonas contaminadas. La utilización de estos microorganismos en estrategias de biorremediación es una opción biotecnológica prometedora para llevar a cabo la eliminación de los contaminantes del suelo que, sin embargo dada la complejidad de las interacciones planta-bacteria, puede resultar poco eficaz. Nosotros hemos estudiado la capacidad de colonización de raíz y semilla de estas bacterias junto con la degradación de fenantreno en la rizosfera y además hemos identificado los genes catabólicos de cada una de ellas con el fin de estudiar la expresión de los mismos en la rizosfera. Estas tres características i) que las bacterias tengan una buena capacidad de adhesión a la semilla de las plantas (como vía fácil y económica de inoculación); ii) que posean buenas propiedades como colonizadoras de raíz y que además sean competitivas frente a otras bacterias que estén ya presentes en el suelo y iii) que las rutas catabólicas estén activas en la rizosfera son fundamentales a la hora de llevar a cabo una buena biorremediación.

Estudios llevados a cabo en dos cepas de *Burkholderia* y varias cepas pertenecientes a la familia Sphingomonadaceae han demostrado que todas ellas son buenas candidatas a ser utilizadas en estrategias de biorremediación ya que son buenas colonizadoras de semillas y raíces de trébol (*Trifolium*) y tienen buenas capacidades degradativas. El principal objetivo de este trabajo es determinar la mejor combinación planta-bacteria para un diseño racional de las estrategias de biorremediación.

Aproximaciones biotecnológicas al control de enfermedades de plantas: de las bacterias como agentes de control biológico a la agricultura ecológica tradicional

Antonio de Vicente*, Francisco M. Cazorla, Alejandro Pérez-García

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea, Universidad de Málaga (IHSM-UMA-CSIC). Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Campus de Teatinos, 29071 Málaga. Email: adevicente@uma.es.

La búsqueda de estrategias para el control biológico de enfermedades de plantas mediado por microorganismos, se suele iniciar con la selección de éstos desde distintos hábitats naturales, normalmente asociados con el cultivo a proteger. Los procesos de selección de candidatos han estado orientados con frecuencia a la obtención de microorganismos con determinadas características biológicas interesantes desde el punto de vista del control, especialmente su actividad antagonista *in vitro* frente al agente fitopatógeno. Las micosis tanto aéreas como de suelo, son uno de los principales problemas fitopatológicos; en nuestro laboratorio empleamos como sistemas de estudio el oídio de cucurbitáceas y la podredumbre radicular de aguacate, modelos de enfermedad de parte aérea y de raíz, respectivamente.

Se han empleado distintas estrategias de aislamiento y selección, que han llevado a obtener varias cepas de *Pseudomonas* y *Bacillus*, con buenas propiedades como agentes de control biológico. Así hablaremos, en primer lugar, de bacterias cuya actividad de biocontrol está asociada a su antagonismo frente al patógeno, mediado por la producción de antimicrobianos. Este es el caso de cepas de *Bacillus subtilis*, donde la producción de lipopéptidos, sobre todo iturinas y fengicinas, está asociada con su capacidad de control de oídio y bacteriosis de cucurbitáceas. Igualmente, la cepa de *Pseudomonas fluorescens* PCL1606 muestra capacidad de control frente a *Rosellinia necatrix* en aguacate, mediada por la producción del antibiótico HPR. No obstante, con frecuencia, los microorganismos muestran fallos en el biocontrol cuando se aplican a escalas comerciales, debido a problemas de colonización y persistencia en el hábitat rizosférico, o la humedad requerida para su actividad en filosfera. Por esto, otra vía alternativa de selección se basa en la búsqueda de bacterias con capacidad colonizadora de la rizosfera; este es el caso de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* AVO110, cuya capacidad de protección frente a *R. necatrix* está asociada a su patrón de colonización de las raíces de aguacate y de las hifas del hongo. Por otro lado, también se ha puesto de manifiesto la utilidad de otros mecanismos basados en la búsqueda de microorganismos con actividad PGPR o de estimulación de la ISR, como en el caso de algunas cepas de *Pseudomonas* y *Bacillus*, que son capaces de proporcionar protección frente al oídio de cucurbitáceas, tras ser aplicadas en las raíces de plantas de melón.

Sin embargo, otra estrategia de control biológico nos llega desde la agricultura ecológica tradicional, y no desde la aplicación de cepas bacterianas aisladas y seleccionadas. Así, en el caso de la podredumbre radicular de aguacate, se ha ensayado la aplicación de varias enmiendas orgánicas, que han mostrado cierta capacidad supresiva frente al desarrollo de esta enfermedad. En dicho estudio, además se han analizado los cambios en la diversidad y en la actividad de la microbiota rizosférica y del suelo en relación con la aplicación de las diferentes enmiendas. De los resultados disponibles hasta el momento se deduce que son cambios sutiles en la composición de la microbiota y en particular en las actividades de la misma, los que parecen estar relacionados con la capacidad supresiva de *R. necatrix* por parte de dichas enmiendas; además del papel que puede suponer la mejora que las enmiendas inducen en el crecimiento y estado fisiológico general de las plantas.

Agradecimientos: Estos trabajos han sido subvencionados por el Plan Nacional de I+D+I del Ministerio de Ciencia e Innovación (Proyectos AGL2007-65340-C02-01 y AGL2008-05453-C02-01), cofinanciados con fondos FEDER (EU).

Microbiota lignocelulolítica asociada al proceso de compostaje: aplicaciones biotecnológicas

M^a del Carmen Vargas García^{*}, Francisca Suárez Estrella, M^a José López, Gema Guisado, Joaquín Moreno

Universidad de Almería. Área de Microbiología, Dpto. Biología Aplicada, CITE II-B, 04120 La Cañada de San Urbano, Almería. Email: mcvargas@ual.es

En las últimas décadas, el compostaje se ha convertido en una de las herramientas más eficaces en cuanto al reciclaje y valorización de residuos orgánicos. Gran parte de esa eficacia viene determinada por la riqueza microbiana existente en los materiales compostados que, a su vez, está condicionada por la naturaleza de los residuos y las características ambientales predominantes en las distintas etapas del proceso. La conjunción de ambos factores favorece la presencia de poblaciones microbianas específicamente adaptadas a las condiciones imperantes en cada caso, lo que propicia una amplia diversidad de especies potencialmente interesantes, no sólo para el propio proceso de compostaje, sino para otras muchas aplicaciones de carácter industrial y medioambiental. Entre las comunidades presentes, destaca especialmente la de las especies lignocelulolíticas, con un papel preponderante, gracias a su implicación en el ciclo del carbono y a la relativa abundancia de lignocelulosa en la naturaleza.

Desde un punto de vista aplicado, los microorganismos lignocelulolíticos también han despertado la atención de diversos sectores económicos, gracias a su capacidad para reducir el impacto ambiental o abaratar los costes de diferentes procesos industriales. Así sucede en la industria papelera, donde varias de las altamente contaminantes etapas químicas necesarias para la obtención de la pasta de celulosa, han sido parcialmente sustituidas por procesos biológicos, en los que los microorganismos lignocelulolíticos son protagonistas principales. También comienzan a ostentar un destacado papel en otro de los sectores económicos de vital importancia en una sociedad como la actual: el energético. El futuro y cercano agotamiento de los combustibles fósiles ha forzado la búsqueda de fuentes alternativas que permitan mantener un nivel de producción acorde con la demanda de una sociedad altamente tecnificada. En este sentido, los biocombustibles están llamados a desempeñar un importante papel, al igual que los microorganismos lignocelulolíticos, cuyas capacidades metabólicas hacen posible la utilización de materiales menos comprometidos en la generación de bioetanol y otros compuestos energéticos.

Otros campos en los que encuentran aplicación los microorganismos lignocelulolíticos son el de la biorremediación y el sector alimentario, así como la denominada industria química verde. En el sector ambiental, enzimas ligninolíticas tales como lacasas y peroxidasas son utilizadas en la degradación de contaminantes de naturaleza aromática, tales como hidrocarburos policíclicos, fenoles clorados, nitrocompuestos, dioxinas o colorantes sintéticos, que entran en la composición de diversos productos de uso habitual. En el sector alimentario, lacasas, xilanasas, arabinofurosidas o celulasas permiten modificar la calidad nutricional de diferentes productos, incrementar su nivel de seguridad, mejorar los procesos de producción o incluso generar nuevos productos. Finalmente, las exigencias sociales y legislativas sobre la industria química, demandando procesos con un mayor grado de sostenibilidad, han favorecido el desarrollo de una pujante industria alternativa que promueve la producción de numerosos insumos químicos a partir de los compuestos generados por la hidrólisis de materiales lignocelulolíticos.

En la actualidad, una realidad industrial basada en la biología aun resulta lejana. Sin embargo, cada vez se hace más factible, gracias a diferentes estrategias políticas que incentivan una economía con fundamento biológico. La lignocelulosa y, por tanto, los microorganismos lignocelulolíticos, han de jugar un importante papel en este futuro cercano. Al igual que los há-

bitats en los que estas poblaciones microbianas son mayoritarias, tal y como sucede con el compostaje.

Biooxidación avanzada de compuestos contaminantes por microorganismos

Francisco Guillén*, Ana Belén García, Raquel Moya, Manuel Hernández, Juana Rodríguez, María Isabel Pérez, Alba Blánquez, María Enriqueta Arias

Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Alcalá. Crta. Madrid-Barcelona Km. 33,600, 28871 Alcalá de Henares, Madrid. Email: francisco.guillen@uah.es

La creciente demanda de la sociedad para la descontaminación de aguas y suelos ha impulsado en los últimos años el desarrollo de nuevas tecnologías para su tratamiento, basadas en procesos biológicos y fisicoquímicos. Entre ellos, los que implican a microorganismos ligninolíticos y los denominados “procesos de oxidación avanzada” (POA) son, respectivamente, los que mayor atención suscitan entre investigadores y tecnólogos. La razón estriba en que los agentes biológicos o químicos involucrados en cada caso poseen dos de las propiedades más buscadas en agentes degradativos para su inclusión en estrategias de remediación de sitios contaminados, a saber: alta reactividad y baja selectividad. En efecto, la capacidad de los microorganismos ligninolíticos para degradar una gran cantidad y variedad de compuestos contaminantes se debe principalmente a la baja especificidad de sustrato de las enzimas implicadas, que no son otras que las ligninolíticas (lacasas y peroxidasas). Además, estas enzimas exhiben un mecanismo indirecto de acción por el que generan oxidantes de bajo peso molecular y alto potencial redox, lo que amplía enormemente el rango de compuestos susceptibles de oxidación. Los POA, por su parte, engloban un conjunto de tecnologías fisicoquímicas cuyo denominador común es la producción de radicales muy reactivos, principalmente hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). Gracias a su elevado potencial de reducción (2,8 V frente al electrodo estándar de hidrógeno), los radicales $\cdot\text{OH}$ oxidan casi todo compuesto orgánico con el que colisionan, pudiendo incluso llegar a mineralizarlo. A pesar de la efectividad de estos procesos, su uso se ve limitado a sitios contaminados con baja carga orgánica, ya que la alta reactividad y baja selectividad de los radicales $\cdot\text{OH}$ requiere que sean producidos de manera continua y en gran cantidad, de modo que el consumo de energía y reactivos es muy elevado. Por esta razón, los POA se están investigando como pretratamiento de procesos biológicos más baratos, en cuyo caso una oxidación parcial de los contaminantes que conduzca a la disminución de su toxicidad y al aumento de su biodegradabilidad es el objetivo perseguido.

Nuestro grupo de investigación lleva varios años estudiando la posibilidad de combinar en un único proceso la degradación de contaminantes por oxidación avanzada y por microorganismos ligninolíticos. La estrategia que estamos utilizando, y que denominamos biooxidación avanzada, se basa en la inducción de la producción extracelular de radicales $\cdot\text{OH}$ en dichos microorganismos. Estudios previos de investigadores del grupo, realizados con *Pleurotus eryngii*, habían demostrado que dicha inducción es posible mediante la incubación del hongo con una quinona y Fe^{3+} . Sucintamente, el mecanismo consiste en el establecimiento de un ciclo redox de la quinona (catalizado por deshidrogenasas intracelulares, que reducen la quinona, y las enzimas ligninolíticas, que oxidan la hidroquinona resultante en el medio extracelular), cuyos radicales semiquinona intermediarios desencadenan la formación de los reactivos de la reacción de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$). Actualmente sabemos que este mecanismo se muestra igualmente operativo en otros hongos ligninolíticos (*Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta*, *Phlebia radiata*, *Picnoporus cinnabarinus*, *Phanerochaete chrysosporium* y *Coriolopsis rigida*), así como en bacterias filamentosas productoras de lacasa (*Streptomyces cyaneus* y *Streptomyces ipomoea*) y en hongos ascomicetos que no secretan enzimas ligninolíticas (*Aspergillus nidulans*). En este último caso, la oxidación de las hidroquinonas requiere la inclusión en la mezcla de incubación de agentes oxidantes de las mismas o el uso de condiciones que favorezcan su autooxidación.

Hasta la fecha hemos comprobado la biooxidación avanzada de compuestos contaminantes con *P. eryngii*, *T. versicolor*, *S. cyaneus* y *A. nidulans*. Los compuestos que han sido degradados incluyen colorantes de tipo azo, diazo, antraquinona, triarilmetano, ftalocianina e

índigo, BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno) y compuestos alifáticos y aromáticos clorados¹. De los resultados obtenidos en estos estudios cabe destacar que, en los casos en los que ha sido analizado, se ha demostrado la mineralización de los contaminantes.

¹Estudio realizado en colaboración con Gloria Caminal (CSIC).

Sesión Científica II:
BIOTECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

Replicación del virus de la gripe: diseño de medidas terapéuticas y preventivas

Núria Jorba^{1,3}, Rocío Coloma^{1,3}, Patricia Resa-Infante^{1,3}, Maria Angeles Recuero-Checa², Noelia Zamarreño^{1,3}, Rocío Arranz¹, José M. Valpuesta¹, José L. Carrascosa¹, Jaime Martín-Benito¹, Óscar Llorca², Juan Ortín^{1,3*}

¹Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), Darwin 3, 28049 Madrid.

²Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid.

³CIBER de Enfermedades Respiratorias (ISCIII).

Los virus de la gripe tipo A contienen como genoma un conjunto de 8 segmentos de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa. Cada uno de ellos está estructurado en forma de ribonucleoproteína (vRNP) por asociación con la polimerasa, un heterotrímero formado por las proteínas PB1, PB2 y PA, y múltiples monómeros de nucleoproteína (NP). Cada una de estas RNPs es una máquina independiente de síntesis de RNA, responsable de la transcripción y replicación del segmento de RNA. La replicación tiene lugar a través de un intermedio de polaridad positiva (cRNP), mientras que la transcripción se inicia con el “robo de cap” de mRNAs celulares y termina por poliadenilación.

A pesar de la importancia de las RNPs, la información estructural sobre ellas es escasa. Nuestro grupo ha determinado la estructura tridimensional de una RNP recombinante biológicamente activa mediante criomicroscopía electrónica y reconstrucción tridimensional. La estructura muestra un anillo nonamérico de NPs con dos de los monómeros asociados a la polimerasa. El acoplamiento de la estructura atómica de la NP y de algún dominio proteico de la polimerasa, así como su análisis genético, nos ha permitido definir algunas de las interacciones de los elementos funcionales de la RNP y proponer la localización del RNA genómico. Esta estructura servirá como base para generar un modelo cuasi-atómico de esta máquina molecular que permita ensayar nuevos modelos de transcripción y replicación virales.

Para analizar los mecanismos por los que estas RNPs replican y transcriben, hemos usado sistemas recombinantes de transcripción/replicación *in vivo* y mutantes bien definidos de la polimerasa que son deficientes en replicación o transcripción viral. Con estos instrumentos experimentales nos hemos preguntado los roles de la polimerasa asociada a la RNP y de la polimerasa soluble de nueva síntesis durante estos procesos. Estos experimentos de complementación génica han mostrado que los complejos de polimerasa solubles son responsables de la replicación y el empaquetamiento del RNA de la progenie en *trans*, mientras que la polimerasa presente en la RNP es responsable de la transcripción viral en *cis*. Por ello, hemos propuesto un nuevo modelo *cis/trans* para la transcripción/replicación viral.

Para someter a prueba este modelo mediante aproximaciones estructurales hemos generado y purificado complejos mínimos de replicación de RNA viral que contienen sólo la polimerasa y un micro-RNA viral modelo de sólo 46 nucleótidos. Estos complejos se generan por replicación intracelular y son capaces de transcribir y replicar *in vitro* el RNA que contienen. Su análisis estructural mediante microscopía electrónica ha mostrado una mezcla de monómeros y dímeros que podrían interpretarse como intermedios en el proceso de replicación.

Investigación y desarrollo de nuevas vacunas contra la tuberculosis

Carlos Martín

Universidad de Zaragoza. <http://genmico.unizar.es/>

En la última década importantes esfuerzos en investigación han dado como resultado el diseño y construcción de nuevos candidatos a vacunas contra tuberculosis. La actual vacuna contra la tuberculosis, BCG, es una vacuna viva atenuada en uso desde hace más de 90 años ya que protege contra las formas mas graves de la enfermedad. La eficacia de BCG es muy variable contra las formas de tuberculosis pulmonar, por lo que la investigación y desarrollo nuevas vacunas es un reto importante para la comunidad científica. El objetivo es desarrollar una nueva generación de vacunas eficaces contra las formas respiratorias de la enfermedad, responsable de transmisión de la tuberculosis.

Nuestros trabajos iniciales mostraron que el gen *phoP* es esencial para la virulencia de *Mycobacterium tuberculosis*¹ y comenzamos la construcción de mutantes de racionalmente atenuados del bacilo de la tuberculosis mediante la inactivación de dicho gen. El mutante de *phoP*-, SO2, ha demostrado ser muy atenuado en modelos celulares y animales. SO2 es más atenuado que BCG Pasteur en ratones SCID inmunocomprometidos y proteger mejor que BCG en ensayos de protección en cobayos y primates no humanos de la infección por tuberculosis²⁻⁵. Recientes estudios del regulón PhoP muestran que este es crucial en la regulación global de la virulencia de *M. tuberculosis*⁶. Estas observaciones se utilizaron para la construcción de una nueva generación de vacunas vivas atenuadas basado en la inactivación *phoP* y generando una segunda mutación adicional que afecta a la síntesis de una familia de lípidos asociados con la virulencia de *M. tuberculosis*. La construcción final es la primera vacuna viva atenuada que cumple los requisitos del consenso de Ginebra para las vacunas vivas. La vacuna ha demostrado una excelente atenuación, perfil de seguridad y eficacia de la protección conferida por rigurosos estudios preclínicos en modelos animales pertinentes²⁻⁵. Actualmente el proyecto "vacuna tuberculosis" cuenta con un socio fabricante, CZ Veterinaria www.czveterinaria.com/, que tiene una amplia experiencia en la producción de vacunas de uso en veterinaria y recientemente ha constituido una filial para el desarrollo de vacunas para humanos BIOFABRI <http://biofabri.com/>. Nuestro plan de investigación aplicada es el desarrollo de una vacuna viva atenuada contra la tuberculosis para su evaluación clínica en humanos.

Referencias:

1. Perez *et al.* An essential role for *phoP* in *M. tuberculosis* virulence. *Mol Microbiol* 2001;41(1):179-87.
2. Martin *et al.* The live *M. tuberculosis phoP* mutant strain is more attenuated than BCG and confers protective immunity against tuberculosis in mice and guinea pigs. *Vaccine* 2006;24(17):3408-19.
3. Cardona *et al.* Extended safety studies of the attenuated live tuberculosis vaccine SO2 based on *phoP* mutant. *Vaccine* 2009;27(18):2499-505.
4. Verreck *et al.* MVA.85A boosting of BCG and an attenuated, *phoP* deficient *M. tuberculosis* vaccine both show protective efficacy against tuberculosis in rhesus macaques. *PLoS One* 2009;4(4):e5264.
5. Asensio *et al.* Live tuberculosis vaccines based on *phoP* mutants: a step towards clinical trials. *Expert Opin Biol Ther* 2008;8(2):201-11.
6. Gonzalo-Asensio *et al.* PhoP: a missing piece in the intricate puzzle of *M. tuberculosis* virulence. *PLoS ONE* 2008;3(10):e3496.

Enzibióticos y tuberculosis

Patricia Veiga-Crespo*, Sara Tomé-García, Tomás G. Villa

Universidad de Santiago de Compostela. Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia. Campus Sur s/n. Santiago de Compostela

Los casos de bacterias resistentes a antibióticos y a quimioterapias clásicas registrados en los últimos años ha sido espectacular. Paralelamente al aumento de las resistencias microbianas, la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos se ha visto mermada. Se hace, pues, necesaria la búsqueda de nuevas alternativas quimioterapéuticas.

Los enzibióticos se definen como enzimas de origen fágico capaces de actuar sobre las bacterias provocándoles la muerte celular. Estos enzimas constituyen una de las mayores alternativas en las nuevas terapias contra poblaciones microbianas resistentes a los antibióticos. Los enzibióticos ya fueron usados durante la primera mitad del siglo XX siendo su uso desechado tras el descubrimiento de la penicilina y el nacimiento de la Época Dorada de los Antibióticos. Curiosamente, es ahora, cuando la eficacia de los antibióticos está disminuyendo, que la utilidad de los fagos y sus enzimas líticas está siendo reconsiderada.

La frecuencia de los casos de tuberculosis está sufriendo un repunte en los últimos años debido, en parte, al aumento de las resistencias a los fármacos clásicos.

Mycobacterium tuberculosis es un patógeno intracelular lo que dificulta la terapia. Además, la pared bacteriana que presenta es altamente resistente debido a la presencia de los ácidos micólicos. Esta resistencia contribuye todavía más a dificultar la penetración de los fármacos. El mycobacteriofago D29 es un virus de doble cadena de DNA. Este virus es un fago lítico capaz de infectar especies de mycobacterias tanto de crecimiento rápido como de crecimiento lento. El genoma de este fago ha sido completamente secuenciado y presenta una gran similitud al bacteriofago L5. Esto ha facilitado la búsqueda de los genes codificantes para las enzimas líticas del fago D29.

El bacteriofago D29 es capaz de penetrar en los macrófagos y aparecer dentro de las bacterias en el estado intracelular. Esto aumentaría la potencialidad del fago en la terapia ya que puede ser utilizado como fuente de enzimas líticas o como vehículo de transporte de posibles fármacos.

Nuestro laboratorio ha llevado a cabo los estudios necesarios para la búsqueda y caracterización de los genes líticos del bacteriofago D29 para su utilización en la terapia contra la tuberculosis.

Descubrimiento de nuevos fármacos a partir de microorganismos marinos

Fernando de la Calle Verdú

PharmaMar. Avda. Los Reyes, 1. 28770 Colmenar Viejo. Madrid.

Email: fdelacalle@pharmamar.com

El medio marino, que representa el 95% de la biosfera, es una fuente todavía poco explorada de biodiversidad, entendida ésta como Recursos Genéticos Marinos. Desde la aparición del primer ser vivo hace más de 3.500 millones de años, la evolución ha equipado a algunos organismos vivos con sistemas químicos de defensa, depredación, señalización y comunicación inter e intracelular muchas veces desconocida. Ese arsenal químico puede, en algunos casos, ser inspiración de moléculas con actividad biológica mediante novedosos mecanismos de acción que podrían mejorar los actuales tratamientos en salud humana.

Medicamentos recientemente comercializados como Prialt®, ω -conotoxina aislada inicialmente del gasterópodo marino *Conus magus* (1) y muy efectiva para paliar dolores crónicos, o el anticancerígeno Yondelis®, cuyo compuesto activo, trabectedin, fue elucidado de extractos de la ascidia *Ecteinascidia turbinata* y actualmente producido por semisíntesis a partir de la fermentación de la *Pseudomonas fluorescens* A2-2 (2), son claros ejemplos de la utilidad de la biodiversidad marina como fuente de nuevos fármacos. Actualmente hay otros candidatos en fases clínicas para oncología, enfermedades neurodegenerativas, antiinfectivos, inmunomoduladores, etc. cuya estructura molecular ha venido inspirada de exquisitas moléculas obtenidas de diversos organismos marinos, especialmente de invertebrados como esponjas. Sin embargo, son relativamente escasos los productos microbianos marinos en ensayos clínicos con la excepción de Salinosporamide A, aislada del caldo de cultivo de la actinobacteria *Salinospora* sp. (3).

Los avances en técnicas moleculares han revolucionado el concepto clásico de biodiversidad y ahora empezamos a explorar y a entender que la inmensa mayoría de formas de vida son microorganismos no cultivados hasta el momento. Por otro lado, los fármacos que se están empleando en medicina para combatir infecciones y para quimioterapia suelen ser biosintetizados por unos sistemas enzimáticos modulares llamados *Poliketide Synthases* y *Non Ribosomal Peptide Synthetases* (PKS y NRPS) (4) y estos clusters de genes del metabolismo secundario que son muy abundantes en microorganismos (actinomicetos, cianobacterias, hongos) están muchas veces “silenciados” o no activados y necesitan inductores muy específicos (5). Estas premisas nos abren las puertas de una nueva experimentación en descubrimiento de nuevos fármacos a partir de microorganismos asociados al medio marino empleando herramientas para valorar la biodiversidad taxonómica, identificar estos genes e intentar expresarlos, así como poder descartar tan pronto como sea posible cepas productoras de compuestos activos ya descritos con anterioridad y así poder centrarnos en nuevos candidatos que reporten nueva diversidad metabólica con actividad biológica específica.

Pero no sólo los microorganismos pueden ser fuente de nuevas entidades químicas, también pueden contribuir a diseñar sistemas de producción que permitan solventar el problema del suministro de productos naturales marinos cuando la síntesis química no sea económicamente viable.

En PharmaMar estamos desarrollando programas de aislamiento, caracterización, cultivo, elucidación estructural y valoración *in vitro* e *in vivo* de moléculas con actividad antitumoral a partir de microorganismos aislados de muestras marinas para Drug Discovery.

Referencias:

1. Olivera et al.; Science, (1985) 230: 1338-1343.

2. Cuevas et al.; *Org. Lett.*, (2000) 2: 2545-2548.
3. Feling et al.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, (2003) 42: 355–357.
4. Donadio et al.; *Nat. Prod. Rev.*, (2007) 24: 1073-1109.
5. Chen et al.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (2010) 86: 19-25.

Genética de la producción del inmunosupresor Tacrolimus

Carlos Barreiro^{1*}, Alberto Sola-Landa¹, Miriam Martínez-Castro², Carlos Prieto¹, Rosario Pérez-Redondo¹, Carlos García-Estrada¹, Antonio Rodríguez-García¹, Lorena T. Fernández-Martínez¹, Zahra Salehi², Elena Solera¹, Jesús Aparicio^{1,2}, Juan F. Martín^{1,2}

¹INBIOTEC, Instituto de Biotecnología de León, Avda. Real nº. 1, Parque Científico de León, 24006 León, España. Email: c.barreiro@unileon.es

²Área de Microbiología, Departamento de Biología Molecular, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n; 24071 León. España.

La última década ha supuesto un gran cambio en las estrategias y en el manejo de inmunosupresores en el trasplante de órganos sólidos. Así, desde que en 1994 se aprobase por parte de la FDA el uso del Tacrolimus (Prograf[®], Astellas Pharma US), éste ha ido desbancando rápidamente a la Ciclosporina como tratamiento post-trasplante anti-rechazo (p. ej.: trasplantes de hígado, pulmón, riñón o páncreas), ya que presenta una actividad entre 100 y 200 veces superior. Así mismo, su aplicación se ha extendido a casos de dermatitis atópica, recubrimiento de stents (por sus propiedades anticoagulantes y anti-inflamatorias) o al uso veterinario (p. ej.: queratoconjuntivitis sicca). Este uso ha generado unas ventas superiores a los 1900 millones de dólares en el pasado año 2009 mediante las diferentes presentaciones del producto. Reflejo de estos beneficios es el número de especies productoras de tacrolimus que han sido descritas en los últimos años: *Streptomyces tacrolimicus* [anteriormente *Streptomyces* sp ATCC 55098 (Martínez-Castro *et al.*, 2010)], *Streptomyces* sp ATCC 53770 (MA 6548), *Streptomyces* sp MA 6949, *Streptomyces kanamyceticus* KCC-S0436, *Streptomyces clavuligerus* CKD1119, *Streptomyces glaucescens*, o *Streptomyces tsukubaensis*.

La metodología de secuenciación de genomas está evolucionando de manera exponencial gracias a los sistemas de secuenciación ultrarrápida. Así, existen actualmente casi 1200 genomas completos y 5201 en proceso de secuencia, de los cuales 4812 son de origen bacteriano, entre los que se encuentran 43 del género *Streptomyces*. Esta herramienta abre las puertas a la aplicación de otras técnicas –ómicas al estudio de un género, que como *Streptomyces*, produce casi el 65 % de los antibióticos que se encuentran actualmente en el mercado.

La secuenciación del genoma del microorganismo productor de tacrolimus *S. tsukubaensis* realizada en el Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC) ha mostrado un tamaño, para este genoma, de 8,06 Mb, dentro de la cual se han detectado 6653 marcos de lectura abiertos, 6 operones ribosomales, 65 ARNt y dos plásmidos circulares de más de 25 kb. Como validación del proceso de secuenciación se ha realizado en mapa de referencia del proteoma citoplasmático de este microorganismo mediante electroforesis bidimensional. En él se han detectado 1428 puntos proteicos de los cuales más del 85% han sido identificados correctamente por espectrometría de masas. Además, siguiendo el sistema de ordenamiento de librerías génicas descrito por Martínez-Castro y col. (2009), se realizó una genoteca colocada en cósmidos de '*S. tsukubaensis*' que ha permitido la secuenciación de sus extremos facilitando el ordenamiento de la misma y la aplicación de la metodología Redirect a la delección de genes.

Este proceso de secuenciación ha permitido localizar los genes biosintéticos de tacrolimus, así como otros genes relacionados con la regulación de la producción de metabolitos secundarios, como son: los receptores de gamma-butirolactonas ("hormonas bacterianas") o los genes relacionados con la regulación por fosfato. La delección de varios de estos genes, así como la optimización de los medios de producción, ha permitido conocer más profundamente la regulación génica de la producción de tacrolimus y duplicar la producción de este inmunosupresor.

Bibliografía:

1. Martínez-Castro M, Barreiro C, Romero F, Fernández-Chimeno RI, Martín JF. 2010. *Int J Syst Evol Microbiol*. IN PRESS
2. Martínez-Castro M, Solera E, Martín JF, Barreiro C. 2009. *J Microbiol Methods*. 78(2):150-4

Sesión Científica III:
BIOTECNOLOGÍA ENZIMÁTICA

Sistema enzimático de *Trametes versicolor* implicado en la degradación de contaminantes emergentes

P. Blázquez¹, G. Caminal^{2*}, B. Castillo¹, C. Cruz-Morató¹, E. Marco-Urrea¹, C. Rodríguez-Rodríguez², M. Sarra¹, T. Vicent¹

¹Departamento de Ingeniería Química. ²Laboratorio de Biocatálisis Aplicada asociado al IQAC(UAB-CSIC). Universidad Autónoma de Barcelona. 08193 Cerdanyola del Vallès.
Email: gloria.caminal@uab.cat

Se denominan contaminantes emergentes, a productos presentes en la naturaleza a muy bajas concentraciones pero persistentes, de los cuales se ha empezado a observar efectos perniciosos en los ecosistemas y además están pendientes de ser regulados próximamente. Entre ellos se encuentran fármacos, productos de cuidado personal, fragancias, retardantes de llama.

Se ha demostrado que *Trametes versicolor* puede degradar muchos de estos compuestos incluso a bajas concentraciones tanto en matrices líquidas como en sólidas. En general el primer paso es oxidativo y se ha demostrado que los enzimas implicados en el primer paso suelen ser la lacasa o el citocromo P450, aunque no siempre. La ventaja evidente de utilizar el microorganismo es sin duda que se trata de un sistema multienzimático que puede llevar a cabo múltiples reacciones consecutivas o paralelas.

Normalmente este tipo de contaminantes se encuentran en matrices muy complejas y mezclados por lo que utilizar un solo enzima difícilmente podrá resolver el problema. Tampoco tiene sentido optimizar las condiciones de degradación para cada producto.

Para estudiar la posible implicación de la lacasa en la degradación del compuesto se realizan experimentos "in vitro" utilizando lacasa comercial con y sin mediadores. En el caso del citocromo P-450 se realizan experimentos con inhibidores de este enzima (1-aminobenzotriazole i/o piperonil butóxido). Con el mismo objetivo de entender la respuesta enzimática del hongo en presencia de estos contaminantes, se está estudiando la inducción de diferentes enzimas oxidativos cuantificando el ARNm que codifica para dichas proteínas.

Demostrar que se puede degradar un determinado contaminante ya no es suficiente, y si no llega a mineralizarse hay que saber en qué se transforma, para poder estudiar su toxicidad o efectos nocivos. Por ejemplo, el ibuprofeno, este compuesto no es degradado según los resultados que hemos obtenido, ni por la lacasa ni por el citocromo P450, sin embargo es rápidamente hidroxilado y el producto resultante es el 1,2-dihidroxiibuprofeno (1). En este caso este producto dihidroxilado no se degrada y es más tóxico que su predecesor. En los pocos trabajos que hay de biodegradación, sólo se ha estudiado la desaparición y se tiene la idea que es fácilmente degradable.

Para poder estudiar estos aspectos, realizamos estudios con los compuestos puros y a altas concentraciones (ppm), para facilitar la identificación y caracterización de los productos. En muchos casos, éstos son susceptibles de ser posteriormente degradados bien llegando a la mineralización o al menos a la apertura de las estructuras aromáticas.

Se presentarán algunos de los resultados obtenidos con naproxeno (2), diclofenac (3) y ketoprofeno (4).

Finalmente, se presentarán los resultados obtenidos en la eliminación de fármacos de un lodo de depuradora, para ilustrar no solo que el hongo es capaz de degradar un contaminante puro, sino también mezclas en matrices reales.

EIB-O1

Referencias:

1. Marco-Urrea et al. Chemosphere 74, 765-772, (2009)
2. Marco-Urrea et al. Bioresource Technol 101, 2159-2166, (2010)
3. Marco-Urrea et al. J. Hazard Mater 176,836-842, (2010)
4. Marco-Urrea et al. Chemosphere 78, 474-481, (2010)

Agradecimientos

MICIN: CTM2007-60971 y MMAMRM: 010/PC08/3-04.1. Los autores forman parte del grupo 2009-SGR 656 y de la Unitat d'enginyeria bioquímica de la Xarxa de Referència en Biotecnologia (XRB) de la Generalitat de Catalunya.

Estudio nanoscópico y electroquímico de la interacción de moléculas de lacasa con electrodos de Au(111) y HOPG

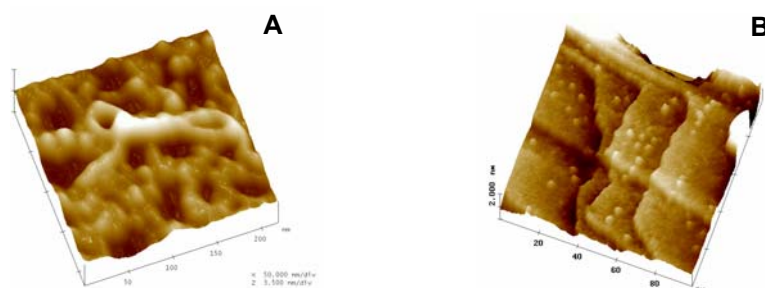
Katiuska González Arzola¹, M^a Carmen Arévalo², Alejandro González Orive², Alberto Hernández Creus², Miguel Ángel Falcón^{1*}

¹Departamento de Microbiología y Biología Celular. Facultad de Farmacia.

²Departamento de Química Física. Facultad de Química. Av. Astrofísico Fco. Sánchez s/n. Universidad de La Laguna. La Laguna 38200. Tenerife. Email: mafalcon@ull.es

La interacción lacasa-electrodos permite conocer aspectos fundamentales para la aplicación de esta enzima en diferentes campos biotecnológicos, por ejemplo en el diseño de biosensores o en la construcción de células de biodiésel. La consecución de tales aplicaciones implica, preferentemente, el uso de lacasas con altos potenciales de oxidación en su sitio T1. La aplicación de esta enzima en biotecnología implica también su inmovilización y si se trata de construir biosensores, debe conseguirse que la molécula mantenga su forma activa y su capacidad para llevar a cabo reacciones de transferencia directa de electrones (DET) con superficies tales como carbono y oro. A este respecto, debe tenerse en cuenta que el ensamblaje de proteínas sobre las superficies citadas juega un papel clave en la caracterización del electrodo, que incluye entre otros aspectos su sensibilidad, estabilidad y durabilidad. Por ello, la estructura molecular y la organización de las proteínas en dichas superficies ha recibido gran atención en los últimos años.

En este trabajo se ha llevado a cabo la caracterización nanoscópica de una lacasa de alto potencial redox (*Fusarium proliferatum*) adsorbida sobre Au(111) y HOPG, mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) y de efecto túnel (STM). Las imágenes obtenidas por AFM en aire y en medio acuoso (pH 7) revelaron que la estructura de una submonocapa de lacasa (SML) en ambas superficies fue muy diferente. En Au(111) las moléculas de lacasa formaron una capa compacta y homogénea, mientras que en HOPG dichas moléculas formaron una compleja y ramificada red que dejó grandes espacios libres. Con el fin de estudiar el tipo de interacción establecida entre la lacasa y los electrodos empleados, se realizaron medidas de AFM en presencia de KCl, lo que permitió descartar que el tipo principal de interacción entre la lacasa y ambos sustratos fuera una acción electrostática. Nuestros resultados indican que existe una interacción covalente fuerte con el oro y una interacción más débil por fuerzas de van der Waals con el HOPG. La reactividad de la lacasa en ambas superficies también fue muy diferente y dicha enzima sólo mantuvo su actividad catalítica en carbono. La pérdida de su actividad catalítica cuando está adsorbida en oro, se recupera al cubrir dicha superficie con una capa de alcanotiol, sobre la que se adsorbe la lacasa. Ello nos ha permitido elucidar sobre la importancia del mecanismo de adsorción de la enzima en los distintos electrodos usados en relación con la conservación o pérdida de su actividad en dichas superficies. Se propone que no sólo la fuerte interacción lacasa-oro sino la formación de iones hidroxilos y óxidos en dicho electrodo son los responsables de la pérdida de la actividad catalítica de dicha enzima.



EIB-O2

- A) Imagen de AFM (Tapping mode, en aire) de una submonocapa de lacasa sobre HOPG.
- B) Imagen de STM de una submonocapa de lacasa sobre Au(111).

Nuevas Xilanasas para biotecnología papelera

Susana V. Valenzuela^{1*}, Oscar Gallardo¹, Cristina Valls², Teresa Vidal², M. Blanca Roncero², Pilar Díaz¹, F. I. Javier Pastor¹

¹Dep. Microbiología, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, España. Email: fpastor@ub.edu, fono +34 93 403 46 26, Fax: +34 93 403 46 29

²Dep. Ingeniería Textil y Papelera (ETSEIAT), Univ. Politècnica de Catalunya, Colom 11, 08222 Terrassa

La aplicación de xilanasas para el blanqueo enzimáticamente asistido de la pasta de papel ha sido ampliamente estudiada y ha llegado a ser implementada industrialmente. Por lo tanto, la identificación de nuevas enzimas robustas y estables que sean capaces modificar selectivamente los xilanos de las fibras, logrando un incremento en el grado de blancura de la pasta con una mínima eliminación de xilano, resulta altamente llamativa.

El xilano, es un heteropolisacárido complejo abundante en la pared celular vegetal. Su degradación requiere una gran variedad de enzimas que actúan de manera cooperativa, siendo las xilanasas una de las enzimas clave. Las endoxilanasas cortan el esqueleto de xilano de manera aleatoria y actualmente son las enzimas más utilizadas en la industria papelera, siendo las de familia GH11 las más comunes. Las xilanasas de familia GH10 también han sido considerablemente descritas y caracterizadas, pero su utilización es menor, principalmente porque suelen ser activas a pHs neutros o ácidos y son de gran tamaño. Ambas características no son beneficiosas en procesos papeleros.

Recientemente se ha descrito una nueva familia de xilanasas, clasificadas dentro de la familia 5 de glicosil hidrolasas (GH5). Aparentemente requieren ramificaciones de metil glucurónico en el esqueleto del xilano para realizar la hidrólisis, y no son activas sobre arabinoxilanos. Su acción complementaría la acción de las xilanasas de las otras 2 familias mencionadas.

El presente trabajo presenta la identificación y caracterización de dos nuevas xilanasas de familia GH5. La primera, denominada Xyn5D, pertenece a la nueva especie xilanolítica *Paenibacillus barcinonensis*. Esta xilanasas fue identificada por métodos proteómicos (electroforesis bidimensional) acoplados a espectrometría de masas. Es capaz de degradar metilglucuronoxilanos de abedul y de haya, y además es activa sobre el xilano de *Eucalyptus* y no tiene actividad sobre oligosacáridos neutros. Presenta una actividad óptima a 50 °C y pH 6,5. La segunda, Xyn5B, perteneciente a la cepa xilanolítica *Bacillus* sp. BP-7, fue detectada por métodos tradicionales de búsqueda de clones activos a partir de una genoteca. Tiene un perfil de actuación similar a Xyn5D pero además presenta actividad sobre oligosacáridos neutros, comportamiento descrito por primera vez en esta familia. Sus condiciones óptimas de hidrólisis son 55 °C y pH 6.0.

Se realizó la evaluación de la enzima Xyn5B como agente blanqueador de pastas de papel de *Eucalyptus* y se registró también la eficiencia de la acción en conjunto con la xilanasas Xyn11A de *Bacillus* sp. BP-7, de la familia GH11. Xyn5B resultó efectiva tanto en pruebas de deslignificación y blanqueo (disminución de índice kappa e incremento de blancura de las pastas) como en la eliminación de ácidos hexenurónicos, que contribuyen negativamente a la permanencia o estabilidad cromática del papel. El efecto de Xyn5B fue menos acentuado que el producido por Xyn11A, sin embargo al aplicar las dos enzimas en conjunto apreció un efecto sinérgico de acción, capaz de incrementar la blancura de la pasta en 2.3 unidades I.S.O. sobre la pasta control (sin tratamiento enzimático).

Referencias:

1. Gallardo et al. *Characterization of a Family GH5 Xylanase with Activity on Neutral Oligosaccharides and Evaluation as a Pulp Bleaching Aid*. Appl Environ Microbiol. 2010. 76 (18):6290-4.

Peroxidasa versátil de alto potencial redox: Estudios estructura-función dirigidos a su aplicación biotecnológica

Francisco J. Ruiz Dueñas*, María Morales, María Jesús Martínez, Angel T. Martínez

CIB, CSIC. Ramiro de Maeztu 9, 28040-E Madrid, España. Email: fjruiz@cib.csic.es

Los basidiomicetos de podredumbre blanca secretan una gran variedad de peroxidasas de alto potencial redox que juegan un papel clave en el proceso de degradación de la lignina llevado a cabo por estos hongos en la naturaleza. Entre éstas peroxidasas "ligninolíticas" se incluyen la lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y peroxidasa versátil (VP). Esta última se ha descrito únicamente en cultivos de hongos de los géneros *Pleurotus* y *Bjerkandera*, aunque actualmente se están detectando genes *vp* en los genomas de otros basidiomicetos ligninolíticos, incluyendo el de *Ceriporiopsis subvermispota*. La VP se caracteriza por su capacidad para oxidar sustratos típicos de las otras peroxidasas, de alto y bajo potencial redox, producidas por los hongos basidiomicetos, además de por oxidar compuestos que ninguna de éstas es capaz de oxidar directamente. Entre estos sustratos se incluyen: (i) Mn^{2+} , sustrato de la MnP (siendo el Mn^{3+} resultante de dicha oxidación capaz de oxidar fenoles, incluyendo las unidades fenólicas de la lignina, e iniciar reacciones de peroxidación de lípidos); (ii) alcohol veratrílico (VA), sustrato típico de la LiP que puede actuar como intermediario en el proceso de oxidación de la lignina llevado a cabo por esta enzima; (iii) fenoles sencillos, que son sustratos de peroxidasas de bajo potencial redox como la peroxidasa de *Coprinopsis cinerea* (CIP); y iv) colorantes industriales de gran tamaño y elevado potencial redox, como el RB5. Esta versatilidad catalítica de la VP, unida al elevado potencial redox y a la capacidad para oxidar directamente compuestos que las otras peroxidasas solo oxidan en presencia de mediadores (Mn^{3+} y VA) hacen que esta enzima presente un gran interés biotecnológico y medioambiental.

Estudios cinéticos, espectroscópicos y cristalográficos de la VP y de diferentes variantes obtenidas por mutagénesis dirigida han demostrado que sus propiedades cinéticas se deben a la coexistencia en una única proteína de diferentes sitios catalíticos, reminiscentes de aquellos presentes en las otras familias de peroxidasas de basidiomicetos descritas anteriormente. Las estructuras cristalográficas de la VP salvaje y recombinante, y los estudios cinéticos de las variantes mutadas han revelado diferencias en el sitio de oxidación de Mn^{2+} comparado con la MnP. Entre éstas se incluye una mayor plasticidad de este sitio catalítico en la VP que se evidencia por la eficiente oxidación del Mn^{2+} en presencia de únicamente dos de los tres residuos ácidos que lo forman. Por otro lado, se ha demostrado que un triptófano expuesto al solvente es el residuo catalíticamente activo responsable de la oxidación del anillo bencénico del VA y de otros compuestos aromáticos de alto potencial redox, incluyendo el polímero de lignina, que no pueden acceder a través del canal principal de acceso al hemo hasta el centro activo de la enzima. Mediante resonancia paramagnética electrónica se ha podido detectar la formación de un radical de este triptófano en las dos formas activas del ciclo catalítico de la enzima, siendo la primera vez que se demuestra de forma directa la formación de un radical de proteína en una peroxidasa ligninolítica. Es en este radical donde se inicia una ruta de transferencia electrónica que va desde la superficie de la enzima hasta el hemo. Sin embargo, no solo el radical es importante. Su entorno también juega un papel clave en el proceso de catálisis. La modificación de forma controlada de los residuos que rodean el triptófano catalítico ha permitido introducir propiedades de tipo LiP en la VP, pudiéndose explicar de este modo las razones que determinan las diferencias catalíticas entre VP y LiP. Finalmente, se ha demostrado que la VP oxida algunos fenoles y colorantes en el borde del canal de acceso al hemo, tal y como se había observado previamente en la CIP. El aumento en el tamaño de este canal en la VP ha permitido mejorar sus propiedades catalíticas oxidando estos sustratos de bajo potencial redox.

El conocimiento actual de las relaciones estructura-función de la VP permite pensar en el diseño a medida de esta enzima para su uso en diferentes aplicaciones industriales y/o medioambientales. Entre estas se pueden citar las relacionadas con el aprovechamiento de la

biomasa lignocelulósica, así como la transformación de hidrocarburos policíclicos aromáticos, pesticidas, contaminantes aromáticos fenólicos y no fenólicos y una gran variedad de colorantes industriales.

Nuevas perspectivas para el sistema lacasa-mediador en la industria papelera

Jordi Garcia-Ubasart*, M^a Blanca Roncero, Josep F. Colom, Teresa Vidal

Universitat Politècnica de Catalunya. Colom 11, 08230 Terrassa. Email: tvidal@etp.upc.edu

El papel está formado principalmente por fibras celulósicas y también otros compuestos que tienen la función de conferirle al papel las propiedades finales deseadas, así como de mejorar la procesabilidad durante su fabricación en la máquina de papel.

El encolado interno es un proceso en la fabricación de papel que tiene como finalidad reducir la penetración del agua en la estructura de la hoja, creando una superficie hidrofóbica en la interfase fibra-agua. Hasta la actualidad se han usado agentes de encolado como la colofonia, para procesos ácidos, y el ASA (anhídrido alquénil succínico) y el AKD (dímero de alquil ceteno) para procesos alcalinos.

Se ha demostrado que el uso de enzimas en la industria de la pasta y papel puede ayudar a reducir el consumo de agentes químicos y energía en los procesos donde se aplican, tanto a nivel industrial, de planta piloto o desarrollo en laboratorio. La enzima lacasa en particular ha despertado gran interés en la investigación, especialmente en combinación con un mediador (sistema lacasa-mediador, LMS), para la deslignificación y blanqueo de pulpas madereras (Moldes y Vidal, 2008; Valls y Roncero, 2009) y no madereras (Fillat y Roncero, 2010). Algunos mediadores naturales también se han utilizado en combinación con la lacasa: en blanqueo (Fillat et al., 2010), en funcionalización de fibras celulósicas (Aracri et al., 2009) y para mejorar las propiedades de fibras con elevado contenido en lignina (Liu et al., 2009).

Hasta ahora ningún sistema enzimático se ha utilizado, como el aquí presentado, para realizar el encolado interno del papel, combinando la enzima lacasa con compuestos hidrofóbicos. El estudio se ha basado en la patente obtenida por Garcia et al. (2009). Nueve compuestos con grupos hidrofóbicos en su estructura fueron ensayados y se observó que el mayor grado de encolado de los papeles se obtuvo con el lauryl galato (LG). Con él se realizaron tratamientos con distintas dosis, tanto de enzima como de LG, y también se variaron los tiempos de reacción, en vistas a una futura optimización del sistema.

Agradecimientos: El trabajo fue realizado con el soporte económico del proyecto integrado BIORENEW (NMP2-CT-2006-026456) del Sixth Framework Program, y el proyecto FUNCICEL (CTQ2009-12904) del MICINN del Gobierno Español.

Bibliografía:

1. Aracri, E, Colom, JF, Vidal, T (2009). Application of laccase-natural mediator systems to sisal pulp: An effective approach to biobleaching or functionalizing pulp fibres? *Bioresource Technology* 100, 5911 – 5916.
2. Fillat, A., Colom, J.F., Vidal, T, (2010). A new approach to the biobleaching of flax pulp with laccase using natural mediators. *Bioresource Technology* 101, 4104 – 4110.
3. Fillat U, Roncero MB (2010). Optimization of laccase-mediator system in producing biobleached flax pulp. *Bioresource Technology*, 101: 181-187.
4. Garcia J, Roncero MB, Vidal T, Colom JF (2009). Procedimiento de fabricación de papel con encolado interno mediante un sistema enzima mediador. Spain, patent application, P200901671.
5. Liu N, Shi S, Gao Y, Qin M (2009). Fiber modification of kraft pulp with laccase in presence of methyl syringate. *Enzyme Microbial Technology*, 44: 89-95.
6. Moldes D, Vidal T (2008). Laccase-HBT bleaching of eucalyptus kraft pulp. Influence of the operating conditions. *Bioresource Technology*, 99: 8565-8570.
7. Valls C, Roncero MB (2009). Using both xylanase and laccase enzymes for pulp bleaching. *Bioresource Technology*, 100: 2032-2039.

Sesión Científica IV:
BIOENERGÍA Y BIOCOMBUSTIBLES

Tecnologías de producción de biocombustibles de segunda generación

Mercedes Ballesteros

Unidad de Biocarburantes - División de Energías Renovables - CIEMAT
Avda. Complutense, 22. 28040 Madrid. Email: m.ballesteros@ciemat.es

El transporte constituye la gran incógnita energética del futuro. Es un sector clave de nuestras economías, depende en un 98% del petróleo y es el responsable del 30% de las emisiones de CO₂ a la atmósfera en la Unión Europea. Dado que la movilidad que proporciona el transporte es esencial para el desarrollo económico y el bienestar social, los responsables de formular políticas energéticas buscan soluciones para reducir los efectos negativos del uso del transporte sin reducir sus contribuciones positivas. Entre las estrategias para la diversificación energética en el transporte, la utilización de biocarburantes derivados de productos vegetales es la opción más sencilla, efectiva y realista a corto plazo.

Bajo el término biocarburantes se recoge un amplio abanico de productos resultantes de procesos muy diversos y con un grado de desarrollo muy diferente, algunos están todavía en etapa experimental mientras que otros se comercializan desde hace décadas. Cada vez existe un mayor consenso en reconocer que los biocarburantes actuales (denominados de primera generación) son una energía de transición que únicamente podrá sustituir una parte de los derivados del petróleo debido a problemas de abastecimiento de las materias primas. Esta situación, junto con las nuevas propuestas de la Comisión Europea (1), que establecen un objetivo mínimo de sustitución obligatorio del 10% de los combustibles de transporte por renovables, ha hecho que se depositen tantas esperanzas en los biocarburantes de “segunda generación”, en otras palabras, derivados de plantas o de residuos vegetales que no entran en competencia directa con las utilizaciones alimentarias.

Para la producción de biocarburantes de segunda generación se pueden elegir entre tres grandes opciones. La primera es bioquímica y consiste en extraer los azúcares de la celulosa con la ayuda de enzimas muy activas. La segunda opción consiste en gasificar la materia prima con una mezcla de hidrógeno y de monóxido de carbono, transformando después esta mezcla en un carburante líquido pasando por una serie de etapas intermediarias. La tercera opción consiste en la obtención de un combustible líquido mediante un proceso de pirólisis o licuefacción. Aunque presentan diferente estado de desarrollo, ninguna de estas tecnologías ha alcanzado su estado comercial y necesario apoyar de manera decidida la I+D+i en este campo para hacer que los biocarburantes de segunda generación puedan desarrollarse a gran escala.

En la presentación se realizará un análisis del grado actual de desarrollo de estas tecnologías y de los instrumentos que se están desarrollando en la Unión Europea para acelerar su desarrollo comercial y alcanzar los objetivos fijados para 2020 de diversificación energética y lucha contra el cambio climático.

Referencias:

1. Directiva 2009/28/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de abril de 2009, relativa al fomento del uso de energía procedente de fuentes renovables. L 140/16, Diario Oficial de la Unión Europea: 5.6.2009.

Retos Biotecnológicos en la Producción de Etanol Lignocelulósico

Pablo Gutiérrez^{a,1}

^aAbengoa Bioenergía Nuevas Tecnologías. Teléfono: +34 954 937111.

Email: pablo.gutierrez@bioenergy.abengoa.com

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

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

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

Las segundas engloban aquellas tecnologías capaces de transformar la biomasa lignocelulósica en etanol.

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

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

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

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

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

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

Viejas y nuevas enzimas en el proceso de producción bioetanol de segunda generación

Miguel Jurado*, María Jesús Martínez

Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, C/Ramiro de Maeztu 9. 28024, Madrid.

Email: mjmartinez@cib.csic.es

El bioetanol es el alcohol etílico producido a partir de la fermentación de los azúcares que se encuentran en los productos vegetales. Aunque el almidón de las semillas de cereales, junto con la sacarosa de la caña de azúcar y la remolacha, constituyen la fuente más accesible de azúcares fermentables para la obtención del bioetanol, los materiales lignocelulósicos, tales como la paja de cereales o los residuos de origen forestal, constituyen una alternativa de futuro al no competir con la cadena alimenticia y ser suficientemente abundantes. Durante el proceso de producción de bioetanol a partir de paja de trigo es necesaria una etapa de pretratamiento que desestructure la pared celular vegetal y deje accesibles los polisacáridos para ser hidrolizados, por celulasas y hemicelulasas, hasta azúcares sencillos que puedan ser fermentados por levaduras hasta etanol. El proceso conocido como *steam explosion* es uno de los más utilizados, especialmente el que se realiza en condiciones ácidas en las que la hemicelulosa se solubiliza y queda disponible para poder ser fermentada. Sin embargo, en este tratamiento se generan inhibidores, derivados de la ruptura de los azúcares (ácidos orgánicos y distintos tipos de furfurales) y la lignina (fenoles), que disminuyen el rendimiento de las fermentaciones.

Uno de los objetivos importantes para que la obtención de etanol de segunda generación tenga éxito es encontrar complejos enzimáticos que puedan hidrolizar eficazmente los polisacáridos tras la *steam explosion*, especialmente la celulosa que es el polímero mayoritario. Aunque existen celulasas comercializadas hace muchos años, aún existen importantes barreras tecnológicas para su uso en la producción de etanol a gran escala, como su alto coste y baja actividad específica. Tras un amplio *screening* de hongos aislados de materiales lignocelulósicos en degradación y tierras agrícolas u obtenidas de diferentes colecciones de cultivo, en nuestro laboratorio estamos estudiando dos cepas de *Penicillium*, por su alta actividad exo y endo β -glucanasas y β -glucosidasa. En la actualidad se están purificando y caracterizando estas enzimas y se está tratando de incrementar los niveles de producción sometiendo a los hongos a un proceso de mutagénesis al azar (utilizando radiación UV).

Por otra parte, con la intención de incrementar los rendimientos en el proceso de obtención de bioetanol a partir de paja de trigo, hemos estudiado el papel de las lacasas fúngicas tras la *steam explosion*, realizada tanto en presencia de vapor de agua como de ácido diluido. Las lacasas polimerizan los fenoles libres disminuyendo el efecto tóxico de estos compuestos e incrementando fuertemente la producción de etanol a partir de los C6 por *Saccharomyces cerevisiae* (170% en el caso de la *steam explosion* en presencia de vapor de agua y un 100% en el caso de la *steam explosion* en condiciones ácidas). Trabajos recientes sobre el efecto de la lacasa en la fermentación de los C5 por *Pichia stipitis* indican que el tratamiento con esta enzima es esencial cuando la concentración de sólidos en la mezcla a hidrolizar es del 20% (concentración utilizada a escala piloto en las plantas de producción).

Agradecimientos: Este trabajo se está realizando en colaboración con Abengoa Bioenergía Nuevas Tecnologías, en el marco de los proyectos CENIT I+DEA (2007-1031), subvencionado por el CDTI, y Demo E-2 (PEN-120000-2009-31 financiado por el MICINN).

Desarrollo de procesos de producción de biocombustibles por métodos biológicos menos contaminantes

F.G. Acién Fernández*, J.M. Fernández Sevilla, E. Molina Grima

Dpto. Ingeniería Química, Universidad de Almería. Cañada San Urbano s/n, 04120 Almería, España. Email: facien@ual.es

El actual consumo de combustibles fósiles resulta insostenible a largo plazo debido al agotamiento de las reservas. Además está provocando serios problemas debido al cambio climático derivado de la movilización del dióxido de carbono acumulado en dicho combustibles, a la atmósfera, mediante su combustión. La alternativa a este problema pasa por una disminución en el consumo de energía, así como por la sustitución de las actuales fuentes fósiles de energía por energías renovables. Entre las diferentes energías renovables existentes, la biomasa es una de las más interesantes ya que es una fuente de energía almacenable y disponible a demanda. De estas, la biomasa rica en carbohidratos y/o lípidos es especialmente valiosa por la posibilidad de obtener a partir de la misma biocombustibles como el bioetanol y/o el biodiesel, utilizables por la actual flota de vehículos de transporte.

Dentro de las biomásas propuestas como fuente de biocombustibles se enmarcan los microorganismos fotosintéticos, microalgas y cianobacterias principalmente. La ventaja de este tipo de microorganismos frente a otros cultivos energéticos como la soja, colza, palma, etc., es que no constituyen una fuente de alimentos, enmarcándose en lo que se denomina biocombustibles de segunda generación. Además, las microalgas y cianobacterias presentan ventajas frente a estos cultivos como el que no requieren suelo fértil para su desarrollo, así como pueden utilizar agua de mar y/o aguas procedentes de otros usos (urbanos o industriales) contribuyendo así a su depuración, y consumen grandes cantidades de dióxido de carbono por lo que también permiten depurar gases industriales. Todo ello hace de la producción de biocombustibles a partir de microalgas y cianobacterias una alternativa altamente sostenible, por lo que en los últimos años grandes expectativas se han despertado a este respecto.

A pesar de estas premisas, la producción de biocombustibles a partir de microalgas y cianobacterias es hoy día sólo una hipótesis científica y técnica apenas soportada por algunos ejemplos de demostración a escala piloto. La mayor parte de las experiencias actuales se derivan de plantas de producción de pequeña escala que en los últimos años han producido biomasa de microalgas para aplicaciones de valor como alimentación animal-humana y productos nutracéuticos. La producción de biocombustibles a partir de estas experiencias es inviable por dificultades de coste y escala, siendo necesario desarrollar una reingeniería de todo el proceso, desde la célula a la obtención del biocombustible. Las expectativas para alcanzar este objetivo son buenas ya que actualmente numerosos equipos multidisciplinares financiados por organismos públicos y privados están trabajando simultáneamente en este tema, lo que sin duda favorecerá el desarrollo de la biotecnología en general y la de microalgas en particular como fuente de riqueza y progreso.

Estrategia para el desarrollo de un programa de selección de nuevas especies y cepas de microalgas con alto potencial para la producción de biodiesel

Laura Carmona Duarte*, Héctor Mendoza Guzmán, Adelina de la Jara Valido, Karen Freijanes Presmanes, Patrícia Alexandra Clemente Janeiro de Assunção

Instituto Tecnológico de Canarias. Playa de Pozo Izquierdo s/n, 35119 Santa Lucía, Gran Canaria, España. Email: lcarmona@itccanarias.org

Los biocombustibles son en la actualidad una de las más sólidas alternativas a los combustibles fósiles, entre todas las evaluadas. Pero a la demanda de biocombustibles ha sido asociado el reciente incremento de los precios en el mercado de alimentos y su competencia por recursos fundamentales, como el suelo y el agua de uso agrario. En este sentido, las microalgas se empiezan a plantear como una buena alternativa. A diferencia de la agricultura tradicional, la producción masiva y a gran escala de microalgas no requiere ni de suelo fértil ni de agua de uso agrario, al poder emplearse agua de mar o aguas residuales, por tanto no compete con estos recursos. Por otro lado, algunas especies de microalgas presentan niveles de eficiencia fotosintética superiores en un orden de magnitud a las especies agrícolas tradicionales, pudiendo alcanzar contenidos en grasas superiores al 20% peso seco.

En la actualidad se conocen más de 30.000 especies de microalgas, sin embargo sólo han sido estudiados los usos de no más de un 10% y no más de 10 especies se mantienen en cultivo a gran escala. Este hecho convierte a las microalgas en un grupo de organismos aún por explorar, haciendo de los trabajos de “screening” un eje básico de cualquier planteamiento de investigación aplicada. Los trabajos de caracterización han de proporcionar la información básica sobre la cual fundamentar la selección de especies y de cepas con mayor potencial productivo, al igual que deben de ser rápidos, económicos y a la vez precisos, haciendo posible el análisis de un gran número de muestras y, por tanto, aumentando las posibilidades de éxito de los trabajos de “screening”. En este sentido, la citometría de flujo y los microcultivos son una válida alternativa a los sistemas de “screening” tradicionales. Los citómetros permiten disponer en cuestión de minutos de una gran cantidad de datos a nivel celular (tamaño, complejidad, vitalidad, composición, ratio de insaturación y contenido relativo de ácidos grasos poliinsaturados, etc), lo que permite una imagen casi en tiempo real del estado de cultivo, siendo posible la efectiva definición de indicadores celulares sobre los cuales basar un programa de “screening” masivo y automatizado. Por otra parte, los microcultivos permiten reproducir con cierto grado de aproximación las condiciones de crecimiento en los grandes cultivos masivos, sin las limitaciones derivadas de la necesidad de manejar grandes volúmenes. Otro parámetro importante como la extractabilidad de las grasas, nos permitirá evaluar de una forma más certera el potencial productor de biodiesel.

La combinación de todos estos parámetros permitiría desarrollar una estrategia óptima para el desarrollo de un programa de selección de nuevas especies y cepas de microalgas con alto potencial para la producción de biodiesel.

Sesión Científica V:
BIOTECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS Y BEBIDAS

Selección de levaduras vínicas de interés biotecnológico en la Comunidad de Madrid

Teresa Arroyo

IMIDRA. Departamento de Investigación agroalimentaria. Finca "El Encín". A2 Km 38,2. 28800 Alcalá de Henares, Madrid. Email: teresa.arroyo@madrid.org

La biotecnología es la aplicación de los principios científicos y de la ingeniería a la transformación de los materiales mediante células, organismos vivos o enzimas (catalizadores biológicos), para producir bienes o servicios. Las levaduras constituyen un grupo de microorganismos de importancia fundamental y enorme interés en procesos biotecnológicos, entre los que se incluye la elaboración del vino. La fermentación espontánea del mosto de uva se caracteriza por la participación secuencial de diferentes especies de levaduras procedentes de los racimos de uva y del propio entorno de la bodega; en las primeras etapas de la fermentación predominan especies no-*Saccharomyces* de metabolismo oxidativo o escaso poder fermentativo que, a medida que las condiciones del medio se modifican, dan paso a diversas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* capaces de finalizar la fermentación. Esta biodiversidad microbiana responsable de la fermentación contribuye a la producción de vinos de mayor calidad y tipicidad aromática. Como contrapartida, la dinámica de la fermentación espontánea es con frecuencia impredecible y puede aportar aspectos indeseables al vino, llegando incluso a alterar su composición. Los riesgos asociados a este tipo de fermentaciones implican lentitud o incluso parada de la fermentación y proliferación de levaduras contaminantes, y por este motivo los elaboradores recurren con frecuencia a cultivos de levaduras secas activas para iniciar la fermentación. Actualmente la búsqueda de vinos con características propias y personales, que reflejen el origen de la zona de procedencia ha puesto de manifiesto que el uso continuado de cepas comerciales seleccionadas de *S. cerevisiae* conlleva a una colonización de las bodegas donde son utilizadas, con la consecuente disminución de la biodiversidad microbiana de las mismas. Esta pérdida de biodiversidad natural se traduce en la ausencia de tipicidad y originalidad de los vinos de una región o zona de producción determinada. En estos casos se considera una buena opción la selección de cepas autóctonas de levaduras para su empleo como cultivos iniciadores, por lo que la caracterización de cepas de levaduras es esencial para aquellos elaboradores que quieran establecer control microbiológico de sus fermentaciones y sacar ventaja del potencial de su zona o región de producción para conseguir nuevos y mejores productos. En el caso de la Comunidad de Madrid, el sector productor adscrito a la D.O. Vinos de Madrid demanda la disponibilidad de cepas de levaduras locales y bien adaptadas a las condiciones de elaboración tanto en condiciones tradicionales como en elaboraciones ecológicas, en un intento de tipificar y diversificar sus productos. Como medida de actuación se plantea la recuperación de las poblaciones de levaduras autóctonas, cada vez menos presentes en las bodegas de elaboración, mirando hacia el viñedo como un posible reducto de levaduras autóctonas de interés biotecnológico, ya que el viñedo constituye hoy día el hábitat ideal donde se debe preservar e incluso favorecer la presencia de especies fermentativas de levaduras. Al mismo tiempo, existe un creciente interés por el uso de cepas indígenas de *S. cerevisiae* en cultivos iniciadores mixtos, dirigidos a reflejar la biodiversidad de una región determinada. De este modo, se vienen realizando extensos estudios ecológicos tanto en bodegas como más recientemente en viñedos, utilizando métodos moleculares de identificación, con el propósito de seleccionar las levaduras mejor adaptadas a condiciones de fermentaciones locales y que aporten personalidad y tipicidad a los vinos. Estos trabajos han mostrado que en la microbiota fermentativa encontrada en el viñedo existe una gran diversidad de patrones genéticos que, junto a las cepas de levaduras locales aisladas en bodegas a lo largo de 20 años y mantenidas en la colección de levaduras del IMIDRA, están siendo caracterizadas para su selección en base a propiedades biotecnológicas de interés para cada zona y tipo de elaboración de los vinos de la D.O. "Vinos de Madrid". Entre los resultados obtenidos cabe destacar la disponibilidad de dos cepas de *S. cerevisiae*, patentadas y depositadas en la CECT para la producción de vinos blancos. También se han

MAB-O1

seleccionado dos cepas de *S. cerevisiae* con buenas características para mejorar la calidad aromática de vinos ecológicos. Al mismo tiempo se han encontrado propiedades enzimáticas en levaduras no-*Saccharomyces* que han demostrado ser potencialmente aptas para su utilización como cultivos iniciadores junto a cepas de *S. cerevisiae*.

Identificación de bacterias patógenas y alterantes en alimentos de origen marino

Pilar Calo-Mata^{1,*}, Karola Böhme¹, Inmaculada C. Fernández-No¹, José M. Gallardo², Benito Cañas³, Jorge Barros-Velázquez¹

¹Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela. Rúa Carballo Calero s/n, Campus Universitario, E-27002 Lugo, España; ²Departamento de Tecnología de los Alimentos, Instituto de Investigaciones Marinas (IIM-CSIC), Consejo Superior de Investigaciones Científicas. C/ Eduardo Cabello 6, E-36208 Vigo, España; y ³Departamento Química Analítica, Facultad de Química, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid, España
Email: p.calo.mata@usc.es

La detección e identificación de las bacterias patógenas y alteradoras de los alimentos es importante para asegurar una mayor calidad y una vida útil más larga de estos productos. Los métodos de identificación bacteriana usados habitualmente en identificación de especies patógenas y alterantes de la calidad de los alimentos, aunque miniaturizados y automatizados, se siguen basando en principios similares a las pruebas de identificación clásicas. Las metodologías de identificación deberían ser rápidas, sencillas, fiables y de fácil implementación. Las técnicas de biología molecular, tanto genómicas como proteómicas, representan una atractiva alternativa a los tediosos métodos tradicionales. Por otra parte, dichas técnicas han experimentado un gran desarrollo en los últimos años presentando un enorme potencial para la implantación de nuevas herramientas para una rápida identificación de las distintas especies. Los métodos actuales de identificación que se están desarrollando para la identificación de especies patógenas y alterantes se basan en la amplificación del ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posterior análisis del ADN amplificado mediante secuenciación, RFLPs, etc. Otras técnicas basadas en la PCR tales como PCR en tiempo real, permiten una rápida identificación y un fácil manejo. En los últimos años, las técnicas proteómicas basadas en espectrometría de masas con desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) con analizador de tiempo de vuelo (TOF) han adquirido gran importancia en la identificación de especies debido a su sencillez, rapidez y relativamente asequible implementación. En nuestro estudio, mediante técnicas de PCR se amplificó el ADN extraído de diferentes especies patógenas y alterantes aisladas de productos marinos, pertenecientes tanto a bacterias Gram-positivas como a Gram-negativas, que posteriormente fue secuenciado. Las secuencias fueron analizadas y comparadas con las publicadas en las bases de datos y se establecieron las relaciones filogenéticas. Por otra parte, todas las especies fueron analizadas mediante MALDI-TOF de proteínas de bajo peso molecular, extraídas de células bacterianas intactas mediante un método rápido y sencillo. Se construyó una base de datos de los espectros de todas las especies consideradas y se estudiaron las relaciones filogenéticas. Los resultados filogenético y filoproteómico mostraron una buena correlación (próximo a 100% en el género y más del 90% en la especie). Cabe destacar que el método filoproteómico permitió una mejor identificación en el caso de algunas especies tales como las pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*. La tecnología MALDI-TOF MS permite la identificación de los microorganismos a partir de extractos celulares obtenidos a partir de colonias crecidas en placa de cultivo en apenas unos minutos con una metodología extremadamente simple y rápida (unas dos horas), y sin apenas consumibles.

Sesión Científica VI:
NUEVOS RETOS EN BIOTECNOLOGÍA

Directed Evolution of Ligninolytic Oxidoreductases

Miguel Alcalde

Institute of Catalysis, ICP, CSIC, Madrid, Spain.

Email: malcalde@icp.csic.es

High-redox potential laccases (HRPLs) and versatile peroxidases (VPs) secreted by white rot fungi are a clear example of generalists biocatalysts that make a virtue of their substrate promiscuity. These ligninolytic enzymes transform hundreds of substrates of different nature and complexity, ranging from xenobiotic (e.g. pesticides, industrial dyes, PAHs) to biopolymers (lignin, starch). Hence, HRPLs and VPs have potential applications in bioremediation, finishing of textiles, pulp-paper biobleaching, biofuels, organic synthesis, the engineering of 3D-nanobiodevices and many other processes. Unfortunately their practical design by directed evolution has hitherto been hampered by the lack of appropriate approaches to circumvent the complex problems of their functional expression along with their poor stability.

Our laboratory has been working for years in the improvement of these biocatalysts by directed evolution. We are using *Saccharomyces cerevisiae* as heterologous host, not only for the enzyme functional expression but also for recreating new ways of diversity. I will discuss these laboratory's efforts to expand the range of applications of these ligninolytic oxidoreductases engineered by directed evolution and *semi*-rational approaches.

TriBioPlast®: Producción de biopolímeros por fermentación

José Luis Adrio, Carmen Ronchel*

División NEURON BioIndustrial, NEURON BPh, S.A., Avd. de la Innovación, 1, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, BIC-Granada 2-211, 18100 Armilla, Granada.

Los polihidroxialcanoatos (PHA) son un tipo de poliésteres naturales producidos por numerosos microrganismos. Constituyen uno de los grupos más fascinante y numeroso de polímeros termoplásticos conocidos, con más de cien tipos diferentes producidos a partir de una enorme diversidad de monómeros.

Esta diversidad química se traduce en un amplio rango de propiedades que abarcan desde materiales rígidos, que se asemejan al polipropileno, hasta otros que son totalmente elásticos. A diferencia de otros biopolímeros, los PHA son totalmente biodegradables por lo que representan una ventaja desde el punto de vista medioambiental. Estos poliésteres pueden utilizarse para el desarrollo de aplicaciones tan diversas como: embalajes, industria textil, química fina, implantes y material biomédico, sistemas de transporte de fármacos e, incluso, biocarburantes.

Utilizando Microbiotools® hemos desarrollado TriBioPlast®, una plataforma tecnológica para la producción de PHA. Mediante diferentes métodos de selección se han identificado cepas súper productoras de estos poliésteres. A partir de diversas materias primas, fundamentalmente subproductos industriales, se han obtenido numerosos PHA con características muy diferentes. Uno de estos polímeros se seleccionó, en base a sus propiedades físico-químicas, iniciándose la optimización tanto del proceso de producción en biorreactores, como del proceso de downstream (separación, extracción y purificación). Con el fin de determinar su posible utilización en el sector biomédico, se están realizando varios estudios (biodegradabilidad, citotoxicidad y biocompatibilidad) cuyos resultados indican que este PHA es un buen candidato para el desarrollo de ese tipo de aplicaciones

Nuevas aproximaciones al descubrimiento de productos naturales: diversidad microbiana y potencial biosintético

Olga Genilloud

Fundación Medina. Parque Tecnológico Ciencias de la Salud. Granada.

Los productos naturales de origen microbiano han sido durante décadas una de las principales fuentes de aislamiento de nuevas moléculas con actividad biológica y potencial desarrollo de candidatos a fármacos. La enorme diversidad química de estas moléculas está en gran medida determinada por la diversidad de los organismos productores y la posibilidad de manipular su capacidad de biosíntesis asegurando la producción de nuevos compuestos.

La Fundación Medina es un nuevo Centro de Investigación nacido de la alianza de Merck Sharp and Dohme de España, la Junta de Andalucía y la Universidad de Granada enfocada en la investigación en medicamentos innovadores, tomando como punto de partida la transferencia de una experiencia de más de 50 años de investigación de MSD en el descubrimiento de nuevas moléculas a partir de productos naturales de origen microbiano. Uno de los elementos claves y determinantes del éxito de los programas de descubrimiento de fármacos desarrollados actualmente por los investigadores de la Fundación MEDINA han sido y siguen siendo la puesta en escena de iniciativas que asegurasen la mayor diversidad de las cepas de los grupos de microorganismos seleccionados para los programas de screening, uno de los elementos claves y puntos de partida para la biosíntesis de estas moléculas. La diversificación de las metodologías empleadas para acceder a una mayor diversidad de poblaciones microbianas, así como la introducción de herramientas que permitan identificar dentro de estos grupos aquellos con un mayor potencial biosintético han sido determinantes a la hora de garantizar la producción y caracterización de una de las colecciones de extractos con la mayor diversidad de nuevas entidades químicas con actividad biológica.

Los bioplásticos de origen bacteriano: ficción o realidad

M^a Auxiliadora Prieto*

Centro de Investigaciones Biológicas-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CIB-CSIC). C/ Ramiro de Maeztu, 9, 28045 Madrid. España. Email: auxi@cib.csic.es

El problema de contaminación medioambiental que ha generado el uso del plástico convencional ha provocado un enorme interés en el estudio e implantación de procesos de tipo sostenible que permitan utilizar la enorme cantidad de carbono que se acumula en forma de biomasa, (residuos denominados “crudos” o sin refinar), para generar productos de alto consumo como son los polímeros plásticos. Uno de los materiales que se están considerando más seriamente como material plástico alternativo son los poliésteres bacterianos o polihidroxialcanoatos (PHAs). Los PHAs se acumulan en el interior celular de algunas bacterias cuando las condiciones de cultivo no son óptimas para el crecimiento. Estos biopolímeros son biodegradables y las bacterias los sintetizan a partir de fuentes renovables como la glucosa, la fructosa o los ácidos grasos que forman parte de los aceites vegetales. Desde su descubrimiento hasta nuestros días se ha investigado mucho sobre este tema, no sólo desde el punto de vista de la ingeniería química, para desarrollar procesos de fermentación eficaces para la producción sostenible de estos polímeros, sino también desde el punto de vista de la microbiología molecular, ya que se han identificado en numerosas especies bacterianas los genes responsables de la síntesis de estas macromoléculas. Actualmente se tiene un amplio conocimiento sobre los procesos bioquímicos implicados en el metabolismo del PHA llegando incluso a la producción de PHAs en plantas.

Los PHA también han atraído considerable atención debido a su potencial uso como fuentes de monómeros quirales o sintones, ya que son de gran utilidad como precursores en la industria farmacéutica, y son difíciles de conseguir en estado puro mediante los procesos químicos convencionales. Además y dado su carácter biocompatible, los PHAs se están empleando en aplicaciones biomédicas y farmacéuticas, como implantes en ingeniería de tejidos y en sistemas de liberación controlada de fármacos.

La síntesis de PHA de nueva composición sigue siendo de gran interés, en especial los poliésteres con grupos funcionales en su cadena lateral que son susceptibles de ser modificados químicamente tras el proceso de biosíntesis. Las propiedades estructurales resultantes de los PHAs funcionalizados que se pueden obtener mediante el diseño de bacterias recombinantes están dando lugar a los PHAs de segunda y tercera generación.

Levaduras humanizadas: aplicaciones en oncología molecular

Víctor J. Cid¹, Isabel Rodríguez-Escudero¹, Teresa Fernández-Acero¹, Rafael Pulido², María Molina¹

¹Dpto. Microbiología II. Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense. Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid.

²Centro de Investigación Príncipe Felipe. Valencia.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es uno de los organismos modelo por excelencia en investigación básica, dado que el enorme conocimiento que poseemos de las bases genéticas y moleculares de su fisiología. Al igual que otras células eucarióticas más complejas, *S. cerevisiae* utiliza lípidos de membrana como segundos mensajeros en rutas de señalización celular. Entre ellos, las distintas especies fosforiladas de fosfatidilinositol actúan en la regulación de la dinámica del citoesqueleto y el tráfico de membranas. En concreto, el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) constituye un lípido esencial para la morfogénesis, endocitosis y secreción polarizada en la levadura. Sin embargo, *S. cerevisiae* carece de actividad fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) de clase I, la enzima que convierte este lípido en fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (PIP₃), un segundo mensajero implicado en diversas rutas de señalización en células superiores. En concreto, la señalización dependiente de PIP₃ está involucrada en el control de la proliferación celular, la apoptosis, la regulación de procesos inflamatorios, la respuesta a insulina, etc., lo que convierte a esta ruta en una diana terapéutica de enorme interés. La sobreexpresión de la subunidad catalítica de la PI3K de mamíferos en levadura resulta letal como consecuencia de la eliminación de PIP₂ de la membrana. Esta toxicidad de la PI3K heteróloga se puede suprimir mediante la co-expresión del supresor de tumores PTEN, una fosfatidilinositol 3-fosfatasa cuya mutación es la principal causa de la activación de esta ruta oncogénica en cánceres humanos. Nuestros resultados muestran que este sistema de “levadura humanizada” es útil para el análisis del potencial oncogénico de mutaciones tanto en PTEN y PI3K, así como en el principal efector de la ruta, la proteína quinasa B (Akt). En el caso de PTEN hemos realizado un análisis mutagénico exhaustivo, tanto de manera dirigida como al azar, definiendo la contribución individual a la función de múltiples residuos dentro de la región catalítica. Una aplicación de este sistema es su adaptación para la realización de ensayos de inhibición sobre compuestos químicos. Hemos validado el sistema mediante el uso de inhibidores comerciales, comprobando que son capaces de restaurar el crecimiento de las células de levadura que expresan PI3K heteróloga. Esto implica que el sistema podría utilizarse en la búsqueda y evaluación de nuevos compuestos con potencial actividad antitumoral.

CONFERENCIA DE CLAUSURA

El futuro de la Biotecnología Microbiana

Daniel Ramón

Biopolis, S.L.

Hace 30 años pisé por primera vez el suelo de un laboratorio de Microbiología de la mano del que fue mi maestro y amigo, el Profesor Federico Uruburu. Supongo que no podía sospechar todo lo que iba a venir después gracias a la enorme generosidad de Don Federico y a la de mis compañeros del Departamento de Microbiología de la Universitat de València. Lo que recuerdo bien es que me fascinaron ellos y la microbiología, tanto que decidí dejar la tradición del negocio familiar de la carnicería y dedicarme al mundo de la investigación microbiana. Pocos años más tarde, tras mi paso por el Departamento de Genética Molecular de Antibióticos S.A. y mi relación con mi segundo maestro, el Profesor Miguel Angel Peñalva, decidí centrarme en la microbiología industrial. Fue sin duda la decisión más acertada de toda mi vida profesional.

Ahora, esta conferencia de clausura del III Congreso de Microbiología Industrial me da la oportunidad de mirar atrás en el tiempo y ver donde estábamos y hacia donde va el futuro de la microbiología industrial. Quedan lejanos los días en los que teníamos que purificar las mezclas líticas para sacar protoplastos o los enzimas de restricción, donde todas las semanas había que pasar una tarde en la biblioteca para repasar el Biological Abstracts o el Current Contents, y donde tener un ordenador de 640 kb con una pantalla de fósforo verde era tener un tesoro. Quién diga que cualquier tiempo pasado fue mejor miente, incluso si se está refiriendo a la investigación científica. Las herramientas de las que ahora disponemos (equipamiento sofisticado, oferta amplia de fungible de laboratorio, repertorios bibliográficos en Internet) hace que podamos centrar nuestras neuronas en la generación de nuevo conocimiento y que no perdamos tiempo en labores rutinarias. Es más, esas herramientas nos han dado en apenas veinte años un aluvión de conocimientos básicos sobre como funciona una célula microbiana. Quizás el único pero sea la fascinación desmesurada por estas nuevas tecnologías y la falta de solidez en lo básico: la bioquímica, la fisiología y la genética de los microorganismos. Probablemente este ritmo vertiginoso ha llevado a algunos a olvidar que por mucho que hoy dispongamos de herramientas sofisticadas (ingeniería metabólica, secuenciación de genomas y metagenomas, transcriptómica y metabolómica) el fin de la microbiología industrial sigue siendo el mismo: entender porque y para qué un determinado microorganismo decide producir un metabolito de interés como respuesta a una serie de estímulos externos. La pregunta clave que hacer al microorganismo sigue siendo la misma: ¿dime por qué sólo lo produces en estas condiciones? Sólo si tenemos la respuesta lograremos diseñar el proceso industrial optimizado.

Aprendí de mi abuelo materno, un fabricante de cinturones, una máxima: “no mires hacia atrás ni para tomar impulso”. No era original suya pero la aplicaba en todos y cada uno de los actos de su vida. Le haré caso a mi abuelo, por eso, en esta conferencia sólo hablaré del pasado para rastrear el brillante futuro de la microbiología industrial. Como uno debe hablar de lo que sabe, lo haré con una mayoría de ejemplos del mundo de la microbiología de alimentos que es el campo en donde desarrollo la mayor parte de mi quehacer diario. Espero convencer al auditorio de que lo que hemos avanzado no es nada en comparación con lo que viene. Y, sobre todo, espero convencer a los jóvenes presentes que no puede haber una decisión más acertada que centrar tu futuro profesional en la microbiología industrial, una disciplina científica cuyos logros, a diferencia de otras, tienen un impacto inmediato en nuestra vida cotidiana.

COMUNICACIONES EN FORMATO POSTER

Degradación de PAHs por *Pseudomonas stutzeri* CECT 930 (ATCC17588)

Francisco J. Deive Herva*, Fátima Moscoso Díaz, María A. Longo González, M. Ángeles Sanromán Braga

Universidad de Vigo. Departamento de Ingeniería Química. Edificio Isaac Newton. Campus As Lagoas Marcosende 36310 Vigo.

Email: deive@uvigo.es

En los últimos años, la aparición en el medio ambiente de sustancias persistentes y altamente contaminantes, como son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), debido a diversidad de actividades de origen antropogénico, ha generado una gran preocupación e interés en el estudio de tecnologías de tratamiento de este tipo de compuestos. Una de las alternativas más atractivas por su bajo coste e impacto ambiental es la biorremediación, que consiste principalmente en la utilización de diferentes organismos (plantas, levaduras, hongos, bacterias, etc.) del medio para neutralizar sustancias tóxicas, bien transformándolas en compuestos menos nocivos bien convirtiéndolas en inocuas para el medio ambiente y la salud humana [1].

Para la realización de este estudio se ha seleccionado la bacteria *Pseudomonas stutzeri* (CECT 930; ATCC 17588), capaz de degradar compuestos aromáticos de hasta 5 anillos. Como contaminante modelo se ha elegido el fenantreno, compuesto aromático de tres anillos, que presenta como factor limitante, al igual que el resto de los PAH's, su baja solubilidad en agua [2].

Inicialmente se ha comprobado la eficacia de esta técnica a escala matraz, en las condiciones óptimas de operación, pH 8 y 37°C [3]. Asimismo, se ha comprobado la necesidad de adicionar al medio surfactantes no iónicos, como el Tween 80, que favorece tanto la solubilidad del contaminante en el medio acuoso de cultivo, como su biodisponibilidad [4]. Los prometedores resultados de biorremediación (85% de reducción en siete días), permitieron abordar el estudio de la utilización de este contaminante a escala reactor de laboratorio. Para ello, se ha utilizado un reactor de tanque agitado de 5 L, con un volumen de trabajo de 3 L, que permitió establecer el uso de una agitación de 300 rpm y una aireación de 0,17 vvm que evitasen la aparición de problemas operacionales que dificultasen el proceso biológico. Los valores obtenidos son similares a los alcanzados a escala matraz (62% de eliminación de la concentración de fenantreno y 30% de reducción de la DQO tras una semana de tratamiento).

En vista de los resultados obtenidos se han realizado ensayos mezclando tres PAH's diferentes, uno de tres anillos aromáticos (fenantreno) y dos de cuatro (pireno y benzoantraceno) obteniéndose valores de eliminación superiores a escala de reactor que en matraz tras una semana de operación: 50% para el contenido en fenantreno y 40% tanto para el pireno como el benzoantraceno.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (Proyecto CTQ2008-0359).

Referencias:

1. Cao B., Naagarajan K., Loh K. (2009) "Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches" *App.Microbial Biotechnol* 85: 207-228.
2. Avramova T., Sotivora A., Galabova D., Karpenko E. (2008) "Effect of Triton X-100 and rhamnolipid PS-17 on the mineralization of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. cell" *International Biodeterioration & Biodegradation* 562: 415-420
3. Zhao H., Wu Q., Wang L. Zhao X., Gao H. (2009) "Degradation of phenanthrene by bacterial strain isolated from soil in oil refinery fields in Shanghai China" *Journal of Hazardous Materials* 164: 863-869.

BAA-P1

4. Bautista F., Sanz R., Molina C., González N., Sanchez D. (2009) "Effect of different non-ionic surfactants on the biodegradation of PAH's by diverse aerobic bacteria" *International Biodeterioration & Biodegradation* 63:913-922

Biodegradación de compuestos aromáticos contaminantes de suelos por hongos soportados en residuos agroindustriales

Emilio Rosales*, Marta M^a Pazos, Xabier Vázquez, M^a Ángeles Sanromán

Universidade de Vigo. Departamento de Ingeniería Química. Edificio Isaac Newton. Campus As Lagoas Marcosende 36310 Vigo.

Email: emiliorv@uvigo.es

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) son considerados como contaminantes xenobióticos persistentes en suelos, lodos y aire. Debido a la presencia en su estructura de dos o más anillos aromáticos, dichos compuestos pueden presentar efectos tanto cancerígenos como mutagénicos [1]. Su persistencia en el medioambiente es principalmente debida a su baja solubilidad en agua y a su estable estructura aromática [2]. Es por ello, que los suelos contaminados con estas sustancias presentan riesgos tanto para la salud humana como para el medioambiente y, como consecuencia, las legislaciones de distintos países están reduciendo sus valores límites admitidos. Para la resolución de esta problemática, en los últimos años se han desarrollado diversas técnicas de tratamiento *in situ*: fitorremediación, oxidación química, remediación electrocinética, biorremediación,.. de entre ellas esta última es una de las más prometedoras.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la biorremediación de un suelo contaminado con PAHs mediante hongos de podredumbre blanca (*Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus*). Inicialmente se llevaron a cabo estudios mediante cultivos en estado sólido con objeto de evaluar la capacidad degradativa de PAHs (fenantreno y pireno) por parte de los microorganismos. Las variables de proceso analizadas fueron: tipo de residuo agroindustrial (salvado de cebada, monda de naranja), humedad, concentración de PAHs y tiempo de tratamiento. Posteriormente, se procedió a la biorremediación del suelo contaminado en las condiciones optimizadas en los ensayos previos.

Los resultados evidencian la elevada capacidad degradativa de ambos hongos aunque los mejores niveles se obtuvieron con *P. ostreatus*. Operando con este hongo cultivado sobre monda de naranja, se alcanzaron los mayores niveles de degradación tanto para fenantreno como pireno (≈85-90%). El estudio de este sistema para la recuperación de suelos contaminados ambos PAHs demostró la aplicabilidad del proceso diseñado en el presente trabajo.

Agradecimientos: esta investigación fue financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación (Proyecto CTQ2008-0359).

Referencias:

1. Decontamination of soils containing PAHs by electroremediation: A review. Pazos, M., Rosales, E., Alcántara, T., Gómez, J., Sanromán, M.A. 2010. Journal of Hazardous Materials 177 (1-3), pp. 1-11
2. In vivo and in vitro polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by *Lentinus (Panus) tigrinus* CBS 577.79. Covino, S., Svobodová, K., Křesinová, Z., Petruccioli, M., Federici, F., D'Annibale, A., Čvančarová, M., Cajthaml, T. 2010. *Bioresource Technology* 101 (9), pp. 3004-3012

Estudio operativo y microbiológico de la degradación de fenol en biorreactores de *spouted bed* de cultivo soportado

Bárbara Safont Resardi^{*1}, Ana. I. Vitas Pemán², Míriam Guivernau Ribalta³, Francesc Prenafeta Boldú³, Francisco J. Peñas Esteban¹

¹Dpto. de Química y Edafología. Universidad de Navarra, C/Irunlarrea s/n, 31008 Pamplona. Email: bsafont@alumni.unav.es

²Dpto. de Microbiología y Parasitología. Universidad de Navarra, C/Irunlarrea s/n, 31008 Pamplona.

³Área de Innovación de Procesos. GIRO Centre Tecnològic, Rambla Pompeu Fabra 1, 08100, Mollet del Vallès (Barcelona).

El objetivo del presente estudio es el de desarrollar un sistema innovador para el tratamiento biológico aerobio de agua residual contaminada con fenol, para conseguir una alta eficacia de degradación con un bajo coste económico. La configuración del biorreactor consiste en un lecho en surtidor con tubo central (*spouted bed*) donde el cultivo microbiano está soportado en partículas de polímero de β -ciclodextrina [1]. La baja densidad de las partículas de este polímero, así como el propio diseño del reactor, permite un ahorro de energía de bombeo, haciéndose innecesaria la recirculación del efluente habitualmente imprescindible en reactores con lecho móvil [2]. Se han desarrollado dos tipos de biorreactores de *spouted bed* con distintos sistemas de aireación. Uno de ellos implementa un dispositivo de aireación lateral en la base, que proporciona una mejor eficacia de transferencia de oxígeno. En este trabajo, se han estudiado las diferencias en la distribución de las comunidades bacterianas entre ambos reactores debido al efecto de la aireación lateral y la eficacia de depuración del sistema. Las variables operativas fueron la carga y la concentración de fenol alimentadas, así como la disponibilidad de oxígeno disuelto. Se investigó la evolución de las poblaciones microbianas de cada biorreactor a partir del perfilado molecular en electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) [3]; y la identificación de los genotipos predominantes mediante la secuenciación del ADN. Las técnicas moleculares fueron complementadas con métodos tradicionales de aislamiento y se realizó la identificación de las cepas obtenidas mediante tinción DAPI. Se observó una clara diferencia en la distribución poblacional entre ambos biorreactores, siendo la *Delftia* sp. (Comamonadaceae, Burkholderiales, Beta Proteobacteria) la cepa dominante en el reactor sin aireación lateral y *Ralstonia basilensis* (Ralstoniaceae, Burkholderiales, Beta Proteobacteria) en el reactor con aireación lateral. También se encuentran diferencias en términos de densidad poblacional entre la biomasa soportada y la biomasa suspendida en ambos biorreactores. Aunque los sistemas no mostraron diferencias claras en las cargas orgánicas eliminadas, sí se apreció una oxigenación mejorada en el biorreactor con aireación lateral y un diferente patrón de biodegradación. Actualmente se está analizando el comportamiento de las principales cepas presentes en el biorreactor con aireación lateral ante diversas combinaciones de nutrientes, oxigenación y concentración de fenol, para decidir en qué condiciones de operación del biorreactor se podría optimizar la biodegradación del fenol.

Referencias:

1. Dabhade, Madhukar A.; Saidutta, M.B.; and Murthy, D.V.R. (2008) Modeling of phenol degradation in spouted bed contactor using artificial neural network (ANN), *Chemical Product and Process Modeling*, 3(2).
2. Sevillano, X.; Romo, A.; Peñas, F.J. (2008) Feasibility study of degradation of phenol in a fluidized bed birreactor with cyclodextrin polymer as biofilm carrier, *Biodegradation*, 19(4), 589-597.
3. Chena Y.M., Lina T.F., Huangb Chih, Linc J.C.; Hsiehc F.M. (2007) Degradation of phenol and TCE using suspended and chitosan-bead immobilized *Pseudomonas putida*, *Journal of Hazardous Materials*, 148,3, 660-670.

Estudio de biodegradación de filmes fotodegradados de polietileno por *Brevibacillus borstelensis*. Efecto de aditivos pro-oxidantes

J. L. Pablos^{a*}, T. Corrales^a, J. López-Marín^c, I. Marín^b, F. Catalina^a, C. Abrusci^b

^aDepartamento de Fotoquímica, Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros, CSIC, Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid.

^bDepartamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid.

^cDepartamento de Hortofruticultura, Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario. Mayor 1, 30150 La Alberca, Murcia.

La biotecnología de los filmes agrícolas oxo-biodegradables en el medio ambiente constituye un tema de investigación de gran actualidad que comprende el estudio de la degradación abiótica y su posterior biodegradación microbiana^{1,2}. En el presente Trabajo, se estudia la biodegradación de filmes de acolchado agrícola (25µm) basados en polietileno de baja densidad (LDPE) previamente fotodegradados en envejecimiento acelerado. En los filmes también se han incorporado estearatos de hierro y calcio como aditivos pro-oxidantes por su drástico efecto acelerante de la fotooxidación³. Para el estudio se ha empleado la bacteria *Brevibacillus borstelensis* por el interés biotecnológico que ha despertado recientemente en la biodegradación de polietilenos⁴. La biodegradación se ha llevado a cabo a 30°C y 45°C por ser ésta última una temperatura límite en la aplicación de acolchado. Se estudió la formación de biofilmes mediante espectroscopia electrónica de barrido, espectroscopia FTIR-ATR y medidas de ángulo de contacto. El seguimiento de la fotodegradación se ha realizado también por otras técnicas como extracción y análisis de productos de bajo peso molecular por GC-MS, determinación de pesos moleculares por GPC y estudio de oxidación por medidas de la emisión de quimioluminiscencia (QL). La biodegradación de los materiales por *B. borstelensis* y su mineralización se han estudiado empleando la técnica de medidas Indirectas de Impedancia para la valoración del dióxido de carbono producido en el metabolismo microbiano⁵. Los resultados han puesto de manifiesto el aumento drástico de la biodegradación en los materiales altamente fotooxidados y de menor peso molecular⁶.

Referencias:

1. F. Catalina, T. Corrales, C. Abrusci, "Biodegradación de Polímeros en el Medioambiente", Cap.14 en "Biotecnología y medioambiente" Eds. I. Marín, J.L. Sanz, R. Amils, Ed. Ephemera, ISBN: 84-609-7344-1, Madrid 2005.
2. Chiellini, E., Corti, A., D'Antone, S., 2007. Oxo-biodegradable full carbon backbone polymers – biodegradation behaviour of thermally oxidized polyethylene in an aqueous medium. *Polymer Degradation and Stability* 92, 1378–1383
3. J.L. Pablos, C. Abrusci, I. Marín, J. López-Marín, F. Catalina, E. Espí, T. Corrales. Photodegradation of polyethylenes: Comparative effect of Fe and Ca-stearates as pro-oxidant additives. *Polymer Degradation and Stability* 95 (2010) 2057-2064
4. Hadad, D., Geresh, S., Sivan, A., 2005. Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *Brevibacillus borstelensis*, *Journal of Applied Microbiology* 98, 1093-1100.
5. Abrusci, C., Marquina, D., Santos, A., Del Amo, A., Corrales, T., Catalina, F., 2009. Biodeterioration of cinematographic cellulose triacetate by *Sphingomonas paucimobilis* using indirect impedance and chemiluminescence techniques. *International Biodeterioration and Biodegradation* 63, 759-764.
6. C. Abrusci, J. L. Pablos, T. Corrales, J. López-Marín, I. Marín, F. Catalina. Biodegradation of photodegraded mulching films based on polyethylenes and stearates of calcium and iron as pro-oxidant additives. *International biodeterioration and biodegradation*. Aceptado para publicación.

Biodegradación y Toxicidad de Diuron y sus Metabolitos

Karina Boltes Espínola^{*1}, Leticia Calvo Cabrerizo¹, Pedro Letón García¹ y Eloy García Calvo²

¹Departamento de Química Analítica e Ingeniería Química, Universidad de Alcalá, 28771 Alcalá de Henares. Email: karina.boltes@uah.es

²Instituto Madrileño de Estudios Avanzados. IMDEA-Agua. C/ Punto Net 4, Edificio ZYE, 2ª planta. Parque Científico Tecnológico de la Universidad de Alcalá. 28805 Alcalá de Henares.

El Diuron, N-(3,4-diclorofenil) N, N-dimetilurea, es un herbicida derivado de la urea que ha sido utilizado desde la década de 1950 en muchos cultivos agrícolas y también en áreas no cultivadas. Este compuesto está considerado como relativamente persistente en el medio ambiente (de un mes a un año) y debido a sus características químicas puede encontrarse en el suelo, los sedimentos de las aguas subterráneas y aguas superficiales [1]. El Diuron se ha incluido como sustancia prioritaria en la Directiva Marco del Agua. Por otra parte, hay algunos estudios que han demostrado la alta toxicidad para el fitoplancton e invertebrados acuáticos.

En primer lugar, se ha determinado la ecotoxicidad de este compuesto así como la de los posibles metabolitos que puede generar mediante su degradación en el medio, ya sea de manera aerobia, obteniéndose DCPMU, DCPU y/o DCA, o en condiciones anaerobias, obteniéndose el CPDMU. Como resultado se ha obtenido que el Diuron es el más tóxico de todos ellos, seguido del CPDMU, así como la DCA, mientras que los otros dos metabolitos no presentan toxicidad. El ensayo utilizado de ecotoxicidad es un test de toxicidad aguda que emplea algas pertenecientes a *Pseudokirchneriella subcapitata*. Cabe destacar que no se han encontrado referencias bibliográficas relacionadas con el análisis de la toxicidad para CPDMU.

Por otro lado, tampoco hay estudios de toxicidad para mezclas de los diferentes metabolitos. Se considera importante llevar a cabo un estudio en este sentido, dada la segura coexistencia de estos compuestos en el medio. Se realiza un estudio de los posibles efectos sinérgicos y/o antagónicos que se puedan producir entre ellos, para lo que se usan mezclas de los mismos tanto de manera proporcional a los valores de EC50 de cada compuesto, como sin proporcionalidad de la relación de muestra. Para valores de concentración bajos en las mezclas binarias proporcionales a su EC50 de Diuron con CPDMU y Diuron con DCA, predomina el efecto sinérgico, evolucionando a un fuerte antagonismo según aumenta su concentración. Por el contrario, la combinación de CPDMU y DCA mantiene un efecto antagónico en todo el rango de concentraciones. La mezcla ternaria de Diuron, CPDMU y DCA posee un carácter antagónico muy fuerte. Cabe destacar un aumento de la toxicidad de las muestras respecto del efecto esperado, cuando se combina DCA y Diuron sin una relación constante de sus concentraciones, para bajos valores de DCA cuando aumentan las de Diuron.

Por último se ha realizado un estudio de la biodegradación de Diuron, tanto en condiciones aerobias, en las que la degradación es lenta y con pequeña producción de metabolitos, como anaerobias, cuyos rendimientos de mineralización del compuesto son menores de los esperados, siendo el principal metabolito generado el CPDMU. Se ha determinado la evolución del contaminante y sus metabolitos durante los ensayos de biodegradación, en los que se ha empleado la bacteria *Variovorax* sp. [2].

Referencias:

1. Field, J.A., Reed, R.L., Sawyer, T.E., Griffith, S.M., Wigington, P.J., 2003. Diuron occurrence and distribution in soil and surface and ground water associated with grass seed production. J. Environ. Qual. 32, 171-179.
2. Sorensen, S.R., Albers, C.N., Aamand, J., (2008). Rapid mineralization of the phenylurea herbicide diuron by *Variovorax* sp. Strain SRS16 in pure culture and within a two-member consortium. Applied & Environmental Microbiology. 74, 2332-2340.

Biomasa viva de la microalga marina *Phaeodactylum tricornutum* como biosorbente natural de cadmio

Julio Abalde, Enrique Torres, Cristina Suárez

Laboratorio de Microbiología. Departamento de Biología Celular y Molecular. Universidad de La Coruña. Campus A Zapateira, s/n. 15071. La Coruña.

La contaminación por metales de los medios acuáticos es uno de los graves problemas ambientales que existen en nuestros días. Diferentes tecnologías se han desarrollado para retirar estos elementos. La mayoría de ellas son procesos químicos costosos, poco eficientes y poco ecológicos. Actualmente se están desarrollando sistemas biológicos como una alternativa que esta ganando gran interés. La biomasa muerta o viva de muchos microorganismos ha demostrado tener una gran capacidad para retener grandes cantidades de metal. En este trabajo se estudia la capacidad de biosorción de cadmio por la biomasa viva de la microalga marina *Phaeodactylum tricornutum*.

Se establecieron una serie de cultivos de la microalga expuestos a un rango de concentraciones de cadmio de 1-100 mg L⁻¹ durante 96 h. Con una densidad celular inicial de 25 x 10⁴ cels mL⁻¹ (equivalente a solo 5.75 µg mL⁻¹ de material biosorbente seco) esta microalga llegó a retirar un 13.38 % del cadmio añadido cuando la concentración de metal en el medio era de 1 mg L⁻¹. Los menores porcentajes de cadmio retirado fueron del 0.23 %, aunque en este caso la concentración de metal en el medio era de 100 mg L⁻¹. Los resultados obtenidos sugieren que esta microalga, como biomasa viva, puede ser usada eficientemente para retirar cadmio cuando el rango de concentraciones de este metal en el medio es bajo.

Biosorción de cadmio por la microalga marina *Tetraselmis suecica*

Enrique Torres, Cristina Suárez, Julio Abalde

Laboratorio de Microbiología. Departamento de Biología Celular y Molecular. Universidad de La Coruña. Campus A Zapateira, s/n. 15071 La Coruña.

La utilización de microorganismos como biosorbentes de metales pesados ofrece una alternativa ecológica y eficaz a los métodos ya existentes para la destoxificación y recuperación de metales tóxicos o valiosos presentes en los medios acuáticos. Actualmente, los procesos tecnológicos mas usados suelen ser químicos. Sin embargo, estos procesos son costosos y contaminantes, la alternativa mediante el uso de diferentes biomasas microbianas parece tener un gran potencial de futuro. Así, muchas microalgas tienen la capacidad de concentrar metales a partir de soluciones acuosas diluidas y de bioacumularlos en el interior celular.

En este trabajo se ensayó la retirada de cadmio por células vivas de la microalga marina *Tetraselmis suecica* expuesta a un rango de concentraciones de $0.6\text{--}45\text{ mg L}^{-1}$ del metal durante 72 horas. La cantidad inicial de biosorbente fue de $46\text{ }\mu\text{g}$ peso seco mL^{-1} . Tanto el modelo de Langmuir como el de Freundlich fueron adecuados para describir matemáticamente el proceso de biosorción de cadmio mediante esta microalga, obteniéndose valores de los coeficientes de determinación (R^2) de 0.993 y 0.995, respectivamente. La máxima capacidad de biosorción de cadmio por medio de esta microalga, deducida del modelo Langmuir, fue de $40.22\text{ mg Cd g}^{-1}$ después de 72 horas. Los resultados sugieren que la biomasa de esta microalga puede ser efectivamente aplicada en la retirada de cadmio.

Potencial de la capa S de *Lysinibacillus sphaericus* en la remoción de metales pesados

Lucía Cristina Lozano*, Juan Alfonso Ayala, Jenny Dussán

Centro de Investigaciones Microbiológicas, Universidad de los Andes. Cra 1 E No. 18A-10 lab. J207. Bogotá, Colombia. Email: lulozano@uniandes.edu.co, jdussan@uniandes.edu.co
Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" Lab. 108. C/ Nicolás Cabrera 1. Campus UAM. Cantoblanco 28049. Madrid. Email: jayala@cbm.uam.es

La remoción de metales pesados constituye uno de los mayores retos de descontaminación de ambientes a nivel mundial, debido a que entre las fuentes de contaminación se encuentran los procesos de extracción de recursos naturales como el carbón, minería e industria petrolera también se ha reportado contaminación por procesos industriales como fabricación de baterías, pinturas, revestimientos soldaduras y curtimbres.

La capa S es una estructura paracristalina presente en la superficie de las células de eubacterias, está constituida por monómeros de proteína o glicoproteína, que son secretados y se ensamblan formando una estructura de dos dimensiones simétrica y porosa que sirve como interfase entre la célula y el ambiente por lo tanto su función no es única para todas las bacterias, se ha asociado con intercambio de moléculas con el ambiente, adhesión celular, reconocimiento superficial, factores de virulencia, lugar de anclaje de enzimas y unión de metales pesados.

En este estudio se evaluó el potencial de la proteína de la capa S de *Lysinibacillus sphaericus* para la remoción de metales pesados. Primero se evaluó el crecimiento a concentraciones bajas en medio de sales con arsenato de sodio, dicromato de potasio o acetato de plomo de 64 aislamientos de *Lysinibacillus sphaericus* que presentaron la proteína de capa S; después se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) a las 37 cepas preseleccionadas. De los *L. sphaericus* evaluados 4 presentaron valores bajos de CMI, 14 presentaron tolerancia media y 11 cepas fueron clasificadas como de alta tolerancia puesto que crecieron a la mayor concentración evaluada de arsénico y cromo, a su vez la concentración mínima inhibitoria en plomo fue de 5 mM por lo tanto fueron seleccionadas para realizar la extracción de la proteína de la capa S.

Se evaluó la capacidad de unión de la proteína de la capa S, aislada de 11 cepas de *L. sphaericus* a cromo hexavalente, para lo cual se recrystalizó la proteína con cloruro de calcio en interfase líquido-aire y se adicionaron 200 ppm de Cr(VI) a las 48 horas se obtuvo una remoción variable del metal. La capa S purificada de *L. sphaericus* IV(4)10 y CBAM5 fueron las que presentaron mayor unión del metal pesado con una biosorción de 228,8 y 229,9 mg de Cr(VI) por gramo de proteína respectivamente.

Por microscopía electrónica de transmisión se corroboró que la capa S con unión a cromo forma una monocapa en la interfase líquido-aire. Adicionalmente la proteína de la capa S purificada fue digerida con tripsina para su identificación por perfil peptídico utilizando espectrometría de masas MALDI-TOF, La búsqueda en bases de datos utilizando dieron resultados significativos con la proteína de capa S de las cepas C3-41, 1593, IAB881, 2317-2 y SSII-1 de *Lysinibacillus sphaericus*.

Los resultados indican que la proteína de capa S de *Lysinibacillus sphaericus* IV(4)10 y CBAM5 se pueden considerar como una buena alternativa para futuros programas de biorremediación de aguas contaminadas con cromo.

Hacia un diseño para la biorremediación de efluentes industriales contaminados con materia orgánica y altos niveles de cromo: Aislamiento de microorganismos y caracterización de sus capacidades biorremediadoras de cromo

Irma Marín*, Ghizlane Loulidi¹, Gerardo Pulido, Ana Morato, Moustafa Malki, Mohamed Merzouki¹, José P. Abad

Dpto. de Biología Molecular. Facultad de Ciencias-Edif. Biología. Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid. Email: jpabad@cbm.uam.es

¹Laboratoire de Biotechnologie. Dpt. de Biologie. Faculté des Sciences Dhar El Mahraz. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah. Fes. Marruecos

Diversas industrias utilizan sales de cromo y deben eliminar aguas que contienen este metal altamente tóxico. Entre éstas se encuentran las curtidurías de pieles. Los efluentes de estas industrias contienen altos niveles de materia orgánica y de cromo por lo que son difíciles de tratar por medios de depuración habituales. En esta comunicación mostramos la puesta en marcha de un reactor para la eliminación de materia orgánica de los efluentes altamente contaminados con cromo, así como el aislamiento de microorganismos resistentes a este metal y que puedan tener capacidad de eliminar el cromo de los efluentes. Para ello se ha partido de muestras procedentes de las aguas de tratamiento de pieles de las curtidurías de Fez (Marruecos), de las que se han aislado varios microorganismos resistentes a cromo (III) y a cromo (IV). Uno de estos microorganismos, que se ha identificado molecularmente como perteneciente al género *Acinetobacter*, ha sido caracterizado en cuanto a su velocidad de eliminación de cromo (VI) de una solución, resultando que puede eliminar el 75 % del metal al cabo de 3 días. Estudios preliminares de microscopia electrónica parecen indicar que la eliminación del cromo que esta bacteria lleva a cabo se debe a un proceso de bioadsorción superficial del mismo. Por otro lado, también se han encontrado hongos resistentes a cromo que pueden crecer en presencia de concentraciones de cromo más elevadas que las máximas a las que crecen las bacterias, aunque su capacidad de eliminar cromo de la solución es inferior a la de éstas. A la vista de estos resultados se está diseñando un proceso de tratamiento de los efluentes de industrias que utilizan cromo basado en tres etapas: i) eliminación de cromo por hongos, ii) eliminación de cromo por bacterias, y iii) eliminación final de materia orgánica utilizando lodos de depuradoras urbanas adaptados a la presencia de cromo.

Caracterización microbiana en diferentes ensayos de bioestimulación de un acuífero contaminado por alquilbencenos no sulfonados

Eulàlia Martínez Pascual¹, Georgina Vidal², Anna Maria Solanas¹, Marc Viñas³

¹*Departament de Microbiologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, E-08028 Barcelona.*

²*D'ENGINY biorem S.L. Madrazo 68. E-08006 Barcelona.*

³*GIRO Centre Tecnològic. Rambla Pompeu Fabra, 1. E-08100 Mollet del Vallès.*

Los alquilbencenos lineales de cadena larga (LABs) son un precursor de los alquilbencenos sulfonados (LAS), unos de los surfactantes aniónicos mayormente utilizados tanto en aplicaciones domésticas como industriales. Los LABs se caracterizan por estar formados por un anillo bencénico al cual van unidas cadenas alifáticas de distintas longitudes (C10-C14) en diferentes posiciones. El emplazamiento objeto de estudio es un terreno industrial, cuyas aguas subterráneas se contaminaron a partir de la rotura de un antiguo tanque de almacenamiento de una mezcla de alquilbencenos de entre 10 y 14 carbonos. Para evaluar la viabilidad de la aplicación de tecnologías de bioremediación, se llevaron a cabo ensayos de bioestimulación y biodegradabilidad del producto. Para ello se estudiaron parámetros fisicoquímicos, hidrogeológicos y las concentraciones de LABs en diferentes puntos de muestreo del acuífero, y se realizó una batería de ensayos de bioestimulación a escala de laboratorio.

El potencial redox y la baja concentración de nitratos encontrada en los pozos con presencia de LABs indicaban una posible atenuación natural en condiciones de desnitrificación. Los resultados obtenidos a escala de laboratorio llevados a cabo en distintas condiciones redox (aerobio, aerobio-anaerobio, anaerobio) confirman esta hipótesis. La mayor biodegradación se alcanzó en condiciones aerobias en presencia de nutrientes, seguida de la obtenida en incubación secuencial aerobia/anaerobia, ésta en condiciones desnitrificantes y finalmente la anaerobia en condiciones desnitrificantes. Todas ellas en presencia de nutrientes.

En el presente estudio se han caracterizado las poblaciones microbianas (NMP degradadores de LABs, PCR-DGGE 16SrRNA y proporción de desnitrificantes en base al ratio 16SrRNA/nosZ) a lo largo del proceso de biodegradación de los LABs en los mencionados ensayos de biostimulación.

Ensayos de bioaumentación fúngica y/o adición de compost para el tratamiento de un suelo industrial contaminado por hidrocarburos pesados

Miriam Guivernau^{1*}, M^a Cecilia Medaura², Francesc X. Prenafeta¹, Xabier Moreno-Ventas³, Eduardo Ércoli², Marc Viñas¹

¹GIRO Centro Tecnológico. Rambla Pompeu Fabra, 1. E-08100 Mollet del Vallès. España

²Universidad Nacional de Cuyo. Parque gral. San Martín s/n. Argentina

³Universidad de Cantabria. Avd. Los Castros s/n 39005 Santander. España

*Autor de contacto: miriam.guivernau@giroct.irta.cat

Las técnicas clásicas de bioestimulación aplicadas a suelos contaminados afectados por matrices complejas de hidrocarburos, generalmente permiten una biodegradación de las fracciones hidrocarbonadas más ligeras (rango C₁₀-C₂₀ y HAPs de hasta 3 anillos aromáticos). Sin embargo, la fracción alifática y aromática más pesada, en muchos casos no puede ser biodegradada hasta valores inferiores a los fijados por la legislación vigente (RD 9/2005), en la que se establecen los umbrales para evitar riesgo potencial para la salud humana.

La utilización de inóculos fúngicos autóctonos del mismo suelo industrial con actividad polifenoloxidasa, se presenta como una estrategia de elevado potencial para el tratamiento de las fracciones pesadas de hidrocarburos de 4 o más anillos aromáticos. Asimismo, la utilización de compost vegetal como enmienda orgánica del suelo, también puede ser beneficiosa para la bioestimulación de la actividad degradadora autóctona y la bioaumentación con hongos alóctonos con actividad ligninolítica, siendo así, una tecnología alternativa/complementaria a tener en cuenta. La adición del compost mejora la estructura y aireación del suelo, por ser una fuente alternativa de nutrientes y co-sustratos, además de aportar una elevada biodiversidad microbiana relacionada con la biodegradación de sustratos lignocelulósicos.

En el presente estudio se ha evaluado el efecto de la bioaumentación fúngica en microcosmos de un suelo industrial de una refinería de petróleo Argentina, utilizando hongos autóctonos del suelo en los que previamente se había verificado actividad polifenoloxidasa (*Fusarium* sp. y *Alternaria* sp.). Estos experimentos se realizaron con o sin la adición de compost vegetal, como estrategia para mejorar la biodegradación de hidrocarburos pesados (fracción alifática y aromática). Los tratamientos descritos han sido comparados con un ensayo de bioestimulación clásica con aireación y fuente de N y P. Los resultados comparativos, se han obtenido a partir de una caracterización química del proceso de biodegradación (TNRCC 1005, EPA 418 y EPA 8270D), una caracterización microbiana de la interacción de la población fúngica y bacteriana (PCR-DGGE y qPCR de genes 16SrRNA y región ITS1), y una caracterización ecotoxicológica (MicrotoxTM).

El suelo utilizado se caracteriza por haber sido tratado previamente *in-situ* por *landfarming*, y por estar expuesto a una elevada salinidad, sequedad y oscilación térmica. Presenta un contenido de hidrocarburos muy elevado (45.000 mg TPH · kg⁻¹ suelo) y unos valores de HAPs superiores a los valores objetivo de la legislación Argentina. Los resultados obtenidos muestran que la estrategia de bioaumentación fúngica combinada con la adición de compost promovió una mayor biodegradación de los TPH (65% biodegradación). En relación a la biodegradación de HAPs, la mejor estrategia fue la bioaumentación fúngica, con una biodegradación del 90% para HAPs de 3-4 anillos y un 28-45% para los HAPs de 5-6 anillos.

El estudio molecular evidenció la existencia, en el suelo original, de hongos potencialmente degradadores de hidrocarburos, la mayoría ascomicetos pertenecientes a los géneros *Thielavia*, *Fusarium* y *Exophiala*. La adición de compost, potenció la presencia de hongos saprotrófico como ascomicetos celulolíticos pertenecientes a *Stachybotrys*, *Chaetomium*, *Fusarium* y *Aspergillus*, que se caracterizan por ser resistentes a ambientes contaminados.

Es importante destacar que tanto la adición de compost vegetal y de biomasa fúngica mejoraron la biodegradación final de las fracciones pesadas de hidrocarburo del suelo, así como la toxicidad del mismo, en comparación con estrategias de bioestimulación estándares. Sin embargo aún es necesario un mayor conocimiento sobre la interacción entre las poblaciones fúngica y bacteriana, y las condiciones ambientales del suelo, los cuales condicionan los procesos de biodegradación.

Selección de microorganismos útiles en procesos de biosorción de colorantes sintéticos

Gema Guisado*, María José López, María del Carmen Vargas-García, Francisca Suárez-Estrella, Juan Antonio López-González, Joaquín Moreno

Área de Microbiología. Departamento de Biología Aplicada. Universidad de Almería. CITE II-B. La Cañada de San Urbano s/n. 04120 Almería. Email: gmaria@ual.es

El carácter sintético de numerosos colorantes de uso industrial, así como su diversidad y su complejidad estructural, hace que estos xenobióticos tengan una baja biodegradabilidad y dota a los efluentes que los contienen de un elevado potencial contaminante. El tratamiento de estos efluentes con agentes adsorbentes como carbón activo o bentonita, puede llevar a una reducción significativa de su color y, por tanto, de su toxicidad, pero suele implicar una importante inversión económica. Por este motivo, en los últimos años se ha llevado a cabo la investigación exhaustiva de adsorbentes de bajo coste y alta efectividad; llegándose a considerar a la biomasa microbiana, especialmente aquella de origen fúngico, una de las mejores alternativas a estas sustancias tradicionalmente empleadas [1].

Debido a lo anteriormente expuesto, el principal objetivo del presente trabajo de investigación fue el estudio de los niveles de decoloración por biosorción de Poly R-478, Poly S-119 y Remazol Brilliant Blue R (RBBR), desarrollados por la biomasa muerta de cada uno de los integrantes de una colección de microorganismos ambientales, con el fin de seleccionar aquellos aislados con mayor potencial para ser empleados como agentes biosorbentes de dichos colorantes sintéticos.

Para evaluar la capacidad de biosorción de la colección de microorganismos aislados a partir de material vegetal en distintas etapas del proceso de compostaje [2], se cuantificó la decoloración de medios de cultivo adicionados de Poly R-478, Poly S-119 o RBBR (200 mg/l) tras permanecer 48 horas en contacto con la biomasa muerta de cada uno de los integrantes de esta colección. La decoloración mediada por biosorción se expresó como el porcentaje de absorbancia perdido en los medios con colorante una vez tratados con la biomasa muerta, considerando la absorbancia inicial como el 100% [3].

De los 20 integrantes de la colección de microorganismos estudiada (19 aislados fúngicos y 1 aislado bacteriano), 4 cepas fúngicas (HM2, HM3, HM7 y HM9) fueron seleccionadas por provocar una decoloración por biosorción superior al 50% para los colorantes poliméricos Poly R-478 y Poly S-119. La biomasa muerta del hongo mesófilo HM7, identificado como *Aspergillus flavus* 931422, mostró adicionalmente una capacidad similar para decolorar RBBR (colorante de tipo antraquinónico).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, la biomasa de los 4 microorganismos seleccionados presenta potencial para ser empleada como agente biosorbente en procesos de decoloración de efluentes dónde colorantes de tipo polimérico o antraquinónico estén presentes, como es el caso de los generados por la industria papelera o textil. Estos nuevos biosorbentes demuestran la capacidad inherente de la biomasa microbiana para la descontaminación de efluentes coloreados y podrían constituir la base para el diseño de biotratamientos más económicos y efectivos de los mismos.

Referencias:

1. Srinivasan, A. y Viraraghavan, T. 2010. Decolorization of dye wastewaters by biosorbents: A review. *J. Environ. Manage.* 91: 1915-1929.
2. López, M.J., Guisado, G., Vargas-García, M.C., Suárez-Estrella, F. y Moreno, J. 2006. Decolorization of industrial dyes by ligninolytic microorganisms isolated from composting environment. *Enzyme Microb. Technol.* 40: 42-45.

3. Guisado, G. 2008. Aislamiento y selección de microorganismos de interés industrial y/o ambiental a partir de materiales sometidos a compostaje. Tesis Doctoral. Departamento de Biología Aplicada, Universidad de Almería, Almería, España.

Utilización de nanopartículas de hierro (FeNP) en procesos de descontaminación ambiental: impacto en las poblaciones bacterianas

C. Fajardo¹, M. Martín¹, B. Montalbán², M. Gil-Díaz¹, A. Pérez-Sanz², M.C. Lobo²

¹F. Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Avd. Puerta de Hierro s/n 28040 Madrid.

Email: carmen.fajardo@vet.ucm.es

²IMIDRA. Finca "El Encin" A-2 Km 38,2 28800 Alcalá de Henares (Madrid)

En las últimas décadas, la utilización de materiales a nanoescala en la estabilización *in situ* de contaminantes, está permitiendo disponer de una novedosa y eficaz tecnología que puede proporcionar soluciones eficaces a costes competitivos en procesos de descontaminación ambiental. Diferentes estudios han demostrado la eficacia de las FeNP en la transformación y detoxificación de una amplia gama de frecuentes contaminantes ambientales, tanto orgánicos como inorgánicos. La incorporación de NP en los sistemas naturales implica su interacción con diferentes organismos, tanto unicelulares como pluricelulares. Además, la interacción de los nanomateriales con los contaminantes puede tanto aumentar como disminuir la toxicidad de éstos sobre los organismos, por lo que es necesario clarificar y profundizar en el conocimiento del impacto de estos nuevos tratamientos sobre el suelo, aguas y organismos vivos.

Los objetivos específicos de este trabajo son: (1) estudiar la eficacia de nanopartículas comerciales de hierro para la inmovilización de metales pesados (Pb); y (2) desarrollar una metodología molecular que permita evaluar el impacto de estos materiales en su interacción con los contaminantes y las comunidades microbianas del suelo. Los ensayos preliminares han mostrado la capacidad de las nanopartículas de Fe para inmovilizar más del 90 % de Pb en 24 horas a la dosis de 5mg/l. En relación al efecto en la actividad biológica, no se observaron diferencias significativas en las condiciones del estudio, aunque si se observan variaciones en el efecto sobre diferentes poblaciones.

Evaluación del efecto del compost procedente de residuos agroindustriales sobre el crecimiento y desarrollo vegetal

Juan Antonio López González*, Francisca Suárez Estrella, M^a del Carmen Vargas García, M^a Josefa López López, Gema María Guisado Úbeda, Joaquín Moreno Casco

Área de Microbiología, Departamento de Biología Aplicada, Universidad de Almería, La Cañada de San Urbano, 04120 Almería. Email: lopez_gonzalez_juan@hotmail.com

La agricultura protegida bajo plástico es una actividad que genera importantes ingresos y se encuentra muy arraigada en determinadas zonas de la geografía española, destacando el sudeste peninsular entre otras. Este tipo de agricultura intensiva produce una gran cantidad de residuos vegetales que, unidos a los residuos orgánicos producidos por las industrias agroalimentarias situadas en la zona y los residuos generados por los núcleos de población circundantes, pueden ocasionar problemas ambientales de considerable importancia.

Entre las posibles gestiones de estos residuos orgánicos destaca el compostaje, que se presenta como una solución respetuosa en términos ambientales y permite la obtención de un producto final, el compost, apto para su empleo en agricultura. Este compost contiene una microbiota que está implicada en el desarrollo y la producción vegetal, así como, agentes de control biológico frente a enfermedades vegetales. Estas enfermedades, en el caso de agricultura protegida, cobran una especial importancia debido a factores como el de la homogeneidad genética de las plantas empleadas, o la intensificación de los cultivos, que inducen al incremento de la susceptibilidad hacia los fitopatógenos y pueden resultar en importantes pérdidas económicas para el agricultor.

De acuerdo a todo lo anterior, el objetivo planteado en esta investigación fue el de evaluar el carácter biopesticida frente a microorganismos fitopatógenos y el carácter biofertilizante en hortalizas de compost elaborados con residuos de la industria agroalimentaria y la agricultura intensiva, previamente inoculados con cepas de conocida capacidad antagonista (carácter biopesticida) y cepas implicadas en los ciclos del nitrógeno y el fósforo (carácter biofertilizante). Para lograr esto, se cuantificaron los grupos microbianos implicados en la capacidad biofertilizante y se realizó una comparativa de la capacidad biopesticida *in vitro* de los compost inoculados con cepas de *Trichoderma harzinaum* y *Bacillus pumilus* y frente a los patógenos *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*, *Pythium ultimum*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* y *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, que fueron seleccionados por su importante incidencia en la agricultura protegida. Una vez concluido lo anterior, se realizó un análisis del efecto supresivo *in vivo* a partir de los compost seleccionados frente a *F. oxysporum* f.sp. *melonis* y *X. campestris* pv. *vesicatoria* en plantas hortalizas cuyo sustrato contaba con compost inoculados con microorganismos de supuesta capacidad supresiva, así como una caracterización microbiológica de estos compost.

Los resultados obtenidos reflejaron escasas diferencias entre los niveles de grupos microbianos implicados en la capacidad fertilizante, sobre todo relacionadas con la composición de las mezclas iniciales. En cuanto a la supresividad frente a fitopatógenos *in vitro*, todos los compost mostraron supresividad frente a *F. oxysporum* f.sp. *melonis*. En cambio, frente a *P. syringae* pv. *tomato*, se detectó una mayor supresividad en compost previamente inoculados con *Trichoderma harzianum*. Los ensayos frente a *X. campestris* pv. *vesicatoria* mostraron niveles inferiores de inhibición, y tan sólo cinco compost originaron cierto efecto supresivo. Ninguno de los tres fitopatógenos anteriores presentó inhibición en las muestras de compost estériles, aunque para *P. ultimum*, la supresividad parece tener un origen tanto biológico como físico-químico.

Para evaluar la capacidad biofertilizante, algunos de los compost estudiados se inocularon con *Azotobacter vinelandii* y *Aspergillus niger* y se determinaron las actividades fijadora de nitrógeno, nitrificante, amonificante y solubilizadora de fosfatos. En todos los casos, estas

BAA-P14

actividades mostraron valores mayores que en los compost empleados como control (sin inocular).

Puede concluirse, por tanto, que el empleo de composts inoculados con cepas seleccionadas por su capacidad supresora o biofertilizante origina productos adecuados para su uso en agricultura protegida y se muestra como una estrategia de interés para el agricultor ya que establece unas condiciones adecuadas para el desarrollo y crecimiento vegetal.

Efecto del herbicida glifosato sobre las comunidades rizobacterianas de plantas de maíz NK603 tolerante a glifosato

Jorge Barriuso*, Silvia Marín, Rafael P. Mellado

Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), c/ Darwin 3, Campus de la Universidad Autónoma, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain.

Email: jbarriuso@cnb.csic.es

La rizosfera de plantas alberga una gran diversidad de microorganismos responsables de multitud de procesos metabólicos que afectan directamente el crecimiento de la planta. Una práctica común en la agricultura extensiva es el uso de herbicidas para evitar el crecimiento de malas hierbas y así mejorar el rendimiento de la cosecha. Las comunidades rizobacterianas pueden, potencialmente, verse afectadas por el uso de herbicidas que, en su mayoría, tienen una considerable actividad biocida, bien directa, o indirectamente a través de exudados de la raíz (Fang *et al.* 2005).

Se ha determinado el efecto del herbicida Roundup®Plus, cuyo principio activo es glifosato, aplicado en post-emergencia sobre las comunidades rizobacterianas de plantas de maíz modificado genéticamente (evento NK603) para tolerar el herbicida glifosato (Cerdeira *et al.* 2006), y se ha comparado con el efecto de un herbicida de uso habitual, aplicado en pre-emergencia, Harness®GTZ, cuyos principios activos son acetocloro y terbutilazina,

El efecto de ambos herbicidas se ha evaluado mediante amplificación, clonaje y secuenciación de ADN del suelo que codifica para el gen del ARNr 16S, mediante hibridación de ADN total de suelo en microarrays comerciales con el genoma completo de *Streptomyces coelicolor* (Val *et al.* 2009), y mediante pyrosecuenciación de la región hipervariable V6 del gen del ARNr 16S (Barriuso *et al.* 2010).

Los resultados sugieren que ambos herbicidas tienen un impacto sobre la estructura de las comunidades rizobacterianas del maíz transgénico, siendo mucho menos agresivo el herbicida que contiene glifosato que el que contiene acetocloro y terbutilazina (Barriuso *et al.* 2010).

Bibliografía:

1. Barriuso, J. Marín, S. and Mellado, R. P. (2010) Effect of the herbicide glyphosate on glyphosate-tolerant maize rhizobacterial communities: a comparison with pre-emergency applied herbicide consisting of a combination of acetochlor and terbutylazine. *Environmental Microbiology* 12(4):1021-1030
2. Cerdeira, A.L., and Duke, S.O. (2006) The current status and environmental impacts of glyphosate-resistant crops: a review. *Journal of Environmental Quality* 35:1633–1658
3. Fang, M., Kremere, R.J., Motavalli, P.P., and Davis, G. (2005) Bacterial diversity in rhizospheres of nontransgenic and transgenic corn. *Applied Environmental Microbiology* 71:4132–4136
4. Val, G., Marín, S., and Mellado, R.P. (2009) A sensitive method to monitor *Bacillus subtilis* and *Streptomyces coelicolor*-related bacteria in maize rhizobacterial communities: the use of genome-wide microarrays. *Microbial Ecology* 58:108–115.

Obtención de consorcios bacterianos con actividad promotora de crecimiento en plantas de arroz mediante enriquecimientos continuos

Javier Vanegas*, Daniel Uribe

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Cra 30 No 45 Ciudad Universitaria. Email: jvanegasq@unal.edu.co y duribev@unal.edu.co

La actividad individual de cepas promotoras de crecimiento vegetal se ha logrado potenciar a través de mezclas bacterianas. Sin embargo, no todas las mezclas evaluadas en la literatura han sido exitosas. En parte por un desconocimiento de las interacciones bacteria-bacteria para promover el crecimiento vegetal. El objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad promotora de consorcios bacterianos provenientes de enriquecimientos continuos en medio libre de nitrógeno (Nfb) para fijar nitrógeno, producir ácido indolacético y promover el crecimiento en plantas de arroz. Los consorcios bacterianos se obtuvieron a través de suelo rizosférico de plantas de arroz en floración provenientes de 12 cultivos de las zonas de mayor producción del cereal en Colombia. Dicho inóculo fue sometido a 10 pases consecutivos cada 7 días en medio Nfb. Se encontró que el 58% y el 50% de los consorcios aumentaron la actividad nitrogenasa y la producción de ácido indolacético con el paso de las generaciones, respectivamente. Bajo condiciones de invernadero se encontró que 2 consorcios de la quinta generación incrementaron el peso seco de raíces entre el 65,62 y 193,16% frente a los controles no inoculados. Igualmente, un consorcio de la primera generación aumento el peso seco del vástago frente al control en un 43,52%. Para cada consorcio se desarrollaron series de dilución y plaqueó en medio Luria-Bertani, Nfb y medio Nfb suplementado con 1g/l de extracto de levadura para aislar los miembros del consorcio. Por medio de una electroforesis en gel con gradiente denaturante (DGGE) se determinó un perfil molecular para cada uno de los aislamientos purificados de los consorcios. Esto permitió establecer mezclas bacterianas que presentaron los mayores incrementos en la promoción de crecimiento y recapitularon la actividad promotora de los consorcios bacterianos. Adicionalmente, se encontraron 12 cepas con producciones de ácido indolacético por encima de 100 µg/ml que promovieron el crecimiento en plantas de arroz. La metodología empleada permitió la obtención de consorcios bacterianos promotores de crecimiento en plantas de arroz y la recuperación de la actividad promotora por medio de mezclas bacterianas lo que constituye una valiosa herramienta para el avance del desarrollo de poli-inóculos.

Aplicaciones biotecnológicas de residuos agroindustriales procedentes de Nicaragua

Aura Lyli Orozco², Alba Blázquez^{1*}, Ana Belén García¹, Octavio Guevara², Manuel Hernández¹, Juana Rodríguez¹, M^a Enriqueta Arias¹, M^a Isabel Pérez¹

¹Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad de Alcalá. 28871 Alcalá de Henares. Madrid

²Departamento de Biología. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. León. Nicaragua.

*Email: alba.blanquez@alu.uah.es

El aprovechamiento biotecnológico de residuos agroindustriales es un objetivo prioritario de muchos grupos de investigación nacionales e internacionales. Entre los residuos agroindustriales que se producen en Nicaragua destacan por su abundancia la pulpa de café, cascarilla de arroz, hojas de yuca, hojas y tallos de banano y la paja de trigo, todos ellos de naturaleza lignocelulósica. La utilización de estos residuos, sin valor comercial *per se*, para la obtención de enzimas y de otros productos de alto valor añadido, para la producción de hongos comestibles y como enmiendas de suelos degradados, podría contribuir tanto en el desarrollo tecnológico del país, como en la disminución del impacto ambiental que la acumulación de estos residuos causa en el medio natural.

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos de la utilización de distintos residuos agrícolas (pulpa de café, cascarilla de arroz, yuca y paja de trigo) procedentes de comunidades rurales de León (Nicaragua) en distintos procesos de interés industrial y ambiental.

Dada la experiencia de nuestro grupo de investigación en la degradación de residuos lignocelulósicos por actinomicetos, se llevó a cabo la fermentación en estado sólido (SSF) de pulpa del café por cepas seleccionadas de *Streptomyces*. Los resultados obtenidos demostraron la capacidad de las cepas ensayadas para colonizar el residuo y para producir enzimas hidrolíticas de interés biotecnológico, tales como xilanasas, mananasas, amilasas y lipasas. Así mismo, mediante la aplicación de la técnica de pirólisis asociada a cromatografía de gases y espectrometría de masas (Py-GC/MS), se analizaron los componentes principales del residuo fermentado, poniéndose de manifiesto la capacidad de los microorganismos ensayados para reducir la toxicidad del residuo, al disminuir el contenido en polifenoles del mismo. Además, las cepas de *Streptomyces* produjeron un incremento significativo del nitrógeno proteico de la pulpa de café después de 10 días de incubación, lo que puede resultar interesante para la posible utilización de este residuo en la alimentación animal.

La utilización de los residuos agroindustriales de Nicaragua para el cultivo de hongos comestibles del género *Pleurotus* ha sido el segundo de los objetivos de este estudio. Así, para la producción de las setas se utilizaron distintas mezclas de pulpa de café, cascarilla de arroz y paja de trigo, y la cepa *Pleurotus ostreatus* CBS-411.71, siempre bajo condiciones ambientales y nutricionales controladas. De las mezclas ensayadas, el porcentaje de eficiencia biológica más elevado se alcanzó en la que contenía pulpa de café y cascarilla de arroz (131 %). Además, es importante tener en cuenta que las setas que se obtuvieron en las diferentes mezclas ensayadas, presentaron valores nutricionales similares a las obtenidas por otros autores con otros residuos agrícolas.

Por último, los residuos fermentados por las cepas de *Streptomyces* seleccionadas y los procedentes del cultivo de *P.ostreatus* fueron aplicados como enmiendas orgánicas a suelos degradados. Este estudio se llevó a cabo en condiciones de invernadero, utilizando *Phaseolus vulgaris* como planta indicadora de la mejora de la productividad de los suelos. La adición de las enmiendas orgánicas al suelo (especialmente las procedentes del cultivo de *P.ostreatus*) produjo una mejora sustancial de algunas de las propiedades físico-químicas, microbiológicas y bioquímicas del mismo, así como un aumento en el rendimiento del cultivo de *P. vulgaris*.

Evaluación de la actividad biológica en un suelo de olivar tratado con estiércol porcino

M Gil-Díaz¹, A Pradas del Real², A Pérez-Sanz², M.A. Vicente², J.I. Tejerina², M.C. Lobo²

¹*Facultad de Veterinaria. Univeridad Complutense de Madrid. Avd. Puerta de Hierro s/n 28040 Madrid. Email: mar.gil.diaz@vet.ucm.es*

²*IMIDRA. Finca "El Encin" A-2 Km 38,2 28800 Alcalá de Henares, Madrid*

La aplicación de estiércoles animales constituye una práctica habitual en los sistemas agrícolas por su efecto positivo sobre las características del suelo, así como sobre la producción de los cultivos. Sin embargo, estos materiales orgánicos pueden contener, en función de su procedencia concentraciones de metales pesados, fármacos veterinarios y patógenos que pueden suponer un foco de contaminación para el suelo. De ahí el interés en evaluar la incidencia de estas enmiendas sobre el medio edáfico, no sólo desde el punto de vista de la mejora de su fertilidad, sino también por su influencia sobre la actividad biológica del suelo, que va a condicionar la funcionalidad del mismo.

El experimento se ha llevado a cabo en un suelo de olivar, localizado en la Finca "La Chimenea" en Aranjuez (Madrid), donde se aplicó estiércol porcino procedente de una explotación ubicada en la misma Finca. La dosis de aplicación fue de 4,7 kg/m², calculada en función de las necesidades nitrogenadas del olivar.

Se evaluó el efecto de la enmienda sobre las características del suelo, haciendo especial hincapié en su incidencia sobre actividades enzimáticas, ureasa y fosfatasa, relacionadas con los ciclos de nutrientes así como sobre la respiración del suelo.

Los resultados indican un incremento significativo de la actividad respiratoria, que se mantiene 3 meses después de la incorporación del estiércol. Estos resultados concuerdan con el aumento de la concentración de materia orgánica y nutrientes aportados por la enmienda que inducen una rápida respuesta de las poblaciones microbianas.

La actividad ureasa presenta un incremento significativo en los primeros días tras la aplicación, debido al elevado input de nitrógeno, sin embargo la elevada capacidad de transformación del material, hace que después de 60 días, disminuya hasta los valores iniciales debido a las pérdidas de nitrógeno por lixiviación. La actividad fosfatasa presenta un significativo incremento a partir de los 60 días como consecuencia de la liberación de sustrato tras la transformación de la materia orgánica.

En conclusión, a la dosis de aplicación, la incorporación de la enmienda supone una práctica adecuada para el suelo de olivar, al mejorar las propiedades físico-químicas y estimular la actividad biológica del suelo.

Flow cytometry and kinetic models applied to viability study of isolated strains from paper industry

Esperanza Torres García*, Patricio López Expósito, Almudena Alcon Martín, Victoria Santos Mazorra, Ángeles Blanco Suárez

Chemical Engineering Department. Faculty of Chemistry. Complutense University of Madrid.
28040 Madrid. Spain.

The presence of biofilm forming microorganisms in the water circuits of the paper industries has a negative impact on both the paper manufacturing process and the quality of the final product that may lead to great economic losses. This effect has become even more relevant in the past few years due to the lower water consumption and emissions, which increase the temperature and the organic load of process waters, two aspects that favour microbial growth and biofouling. Biofilm formation begins with the deposition of organic and inorganic compounds present in process water. This deposition leads to the formation of a conditioning layer onto which a colony of primary polysaccharide segregating bacteria attaches itself. The process culminates in a mature biofilm resulting from the attachment and subsequent growth of a secondary bacterial colony on the formed layer. Microorganisms present in the biofilm can generate volatile compounds (e.g. organic acids, sulphur compounds, amine compounds etc.) that cause nuisance odours as result of their metabolism. Moreover, mature biofilms eventually detach from the surface causing disruptions in the production.

Most studies on biofilm in the paper industry have been focused on the characterization of its physical structure and microbial composition as well as on the effects of antimicrobial agents (biocides, enzymes and dispersing) on sessile and planktonic cells. These studies provide information about the importance of certain microorganisms in the early stages of biofilm formation and on the type of polysaccharide that some of them produce.

These initiatives are driving research to be focused on those microorganisms considered the most problematic for their high production of polysaccharides, since they are key for the eventual development of microbial control products to prevent biofilm formation. To have a good understanding of the growth of problematic microorganisms it is essential to have precise measurements of the cells physiological state and their proliferation along with qualitative information on the dynamics through which the transitions and the interaction between cellular states take place. The measurements must be carried out in a controlled environment with isolated biofilm forming microorganisms so as to avoid out the effects that the changes in process waters may have on the physiological state of cells. The most common techniques used to monitor the proliferation of microorganisms in industrial control programmes, such as dry cell weight, culture medium turbidity (optical density) or ATP measurements, fail to provide information on aspects such as cell viability or resistance.

The main objectives of this work was to study the physiological state dynamics of two biofilm forming bacteria (*Brevundimona vesicularis* and *Enterobacter cloacae*) isolated from the water circuits of two paper mills through the analysis of bacterial subpopulations with flow cytometry and to elaborate predictive models with the data obtained. Results allow us to differentiate cellular states, namely living, non cultivable and dead bacteria when a combination of Propidium Iodide and Tiazole Orange markers are used, enabling to quantitatively monitor the changes in the three subpopulations.

A segregated model describing growth dynamics in the bioreactor for the two microorganisms was proposed and calibrated with experimental data. In both cases, the model presents a good agreement with the experimental data. These models may be useful in the development of microbial control programs in the paper industry. In addition, the good results obtained by Flow Cytometry prove that this technique may constitute a useful and reliable tool to study bacterial populations dynamics.

Estudio de una proteasa aspártica involucrada en la interacción *Trichoderma*-planta

*Ilanit Samolski¹, María Belén Suárez², Rosa Elena Cardoza¹, Santiago Gutiérrez¹, Enrique Monte¹

¹Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Universidad de Salamanca, Spain.

²Instituto de Microbiología-Bioquímica (IMB), CSIC/Universidad de Salamanca, Spain.

Email: ilanit@usal.es

El biocontrol y la biofertilización son elementos clave para el desarrollo de una agricultura sostenible, que requiera un menor uso de pesticidas y fertilizantes químicos. En este sentido, muchas especies de hongos del género *Trichoderma* son utilizadas comercialmente en el campo debido a su eficacia en el control de enfermedades.

Hoy en día, se sabe que muchas especies de *Trichoderma*, además de antagonizar organismos fitopatógenos, también interactúan directamente con las raíces de las plantas. Esta interacción, estimula los sistemas de defensa de las plantas y su crecimiento comportándose así *Trichoderma* como un simbiote oportunista.

Entender cómo actúa *Trichoderma* a nivel molecular y qué factores intervienen en el establecimiento del diálogo con la planta resulta fundamental para favorecer la rápida identificación de cepas efectivas y sus aplicaciones y para poner de manifiesto el potencial de mejora genética de las cepas naturales.

En un trabajo previo se desarrolló un *microarray* de oligonucleótidos de alta densidad, para examinar la respuesta transcripcional de *T. harzianum* CECT 2413 en contacto con plantas de tomate. Mediante este, se identificaron numerosos genes sobreexpresados durante las primeras horas de contacto con la planta hospedadora.

Entre estos se seleccionó una proteasa aspártica extracelular, *p6281*, particularmente interesante porque a pesar de ya haber sido descrita en esta cepa, nunca antes se le relacionó con la interacción directa *Trichoderma*-planta.

p6281 fue asociada con la actividad micoparasítica de *T. harzianum*. A diferencia de otras proteasas de esta cepa relacionadas con micoparasitismo, se induce específicamente durante el contacto con raíces de plantas y superficies inertes como fibras de nailon.

Con la finalidad de caracterizar este gen y estudiar su implicación durante la asociación *Trichoderma*-planta, se construyeron mutantes sobreexpresados y silenciados de *p6281*.

El extremo carboxilo-terminal de la proteína NrsD confiere resistencia a metales pesados en la cianobacteria *Synechocystis sp* PCC 6803

J. Giner-Lamia*, M. Roldán-Gálvez, L. López-Maury, F.J. Florencio

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Universidad de Sevilla-CSIC, 41092 Sevilla, España.

Email: joaquin.giner@ibvf.csic.es, mrgalvez@ibvf.csic.es, lmaury@ibvf.csic.es, Floren@us.es

Las cianobacterias son el único grupo de eubacterias capaces de realizar fotosíntesis oxigénica similar a la de plantas superiores. Esto las convierte, desde un punto de vista biotecnológico, en factorías celulares capaces de producir, gracias a la energía del sol, diversos productos, como biocombustibles, alimentos y otros biomateriales de manera sostenible. Además, debido a que su hábitat mas frecuente es el medio acuoso, tienen un alto potencial en el campo de la bioremediación[1].

Los metales tienen un papel importante en la fisiología celular ya que son cofactores esenciales para muchas enzimas debido a sus propiedades redox. Sin embargo, por encima de ciertas concentraciones reaccionan con la materia orgánica de forma inespecífica afectando a procesos tan vitales como la respiración y la fotosíntesis. Por lo tanto, los seres vivos necesitan sistemas capaces de sensar y regular finamente las concentraciones intracelulares de los metales. En los últimos años se ha acelerado la liberación de metales pesados al medio ambiente, en especial a los ríos, debido al aumento en la actividad industrial en todo el planeta, y esto se ha convertido en un problema medioambiental debido a su difícil eliminación del medio.

Con anterioridad en nuestro grupo de investigación, se identificó y caracterizó en la cianobacteria *Synechocystis sp* PCC 6803 un grupo de genes implicado en la resistencia al níquel, compuesto por dos operones *nrsSR* y *nrsBACD*. *NrsSR* forman un sistema de dos componentes que regula la expresión del operón *nrsBACD*. Los genes *nrsB*, *nrsA* y *nrsC* codifican para un sistema BCA de resistencia a metales y el gen *nrsD* presenta homología con la superfamilia de transportadores de membrana MFS (Major Facilitator Superfamily). El análisis bioinformático de la proteína NrsD reveló una región carboxiterminal rica en histidinas y metioninas. Para estudiar esta región se purificó una proteína de fusión GST-NrsD-Ct y se llevaron a cabo ensayos *in vitro* de unión a columnas cargadas con metales divalentes (Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}). Estos ensayos mostraron que esta proteína presentaba una alta afinidad por dichos metales.[2]

Con el objeto de estudiar este péptido *in vivo*, se han generado estirpes de *Synechocystis* que expresan la proteína NrsD-Ct bajo los promotores de los genes *trxA* y *glnA* de *Synechocystis* y el promotor *trc* del plásmido pTrc99A. Estas estirpes han mostrado niveles mayores de tolerancia a cobre y cobalto, mientras que en el caso del níquel y el zinc la tolerancia fue similar a la estirpe silvestre.

Referencias:

1. Hsin-Ho Huang, Daniel Camsund, Peter Lindblad, and Thorsten Heider. Design and characterization of molecular tools for a Synthetic Biology approach towards developing cyanobacterial biotechnology. *Nucleic Acid research*. 2010 May; 38(8): 2577–2593.
2. L. López-Maury, M. García-Domínguez, F.J. Florencio, J.C. Reyes (2002). A two-component signal transduction system involved in nickel sensing in the cyanobacterium *Synechocystis sp* . PCC 6803. *Molecular Microbiology* 43(1): 247-256.

Análisis de la respuesta génica de *Trametes versicolor* a la presencia de TCE

B. Castillo^{*1}, N. Gaju², G. Caminal³, P. Blanquez¹, M. Martínez-Alonso²

¹Departamento de Ingeniería Química, ²Departamento de Genética y Microbiología ³Laboratorio de Biotecnología Aplicada asociado al IQAC (UAB-CSIC). Universidad Autónoma de Barcelona. 08193 Cerdanyola del Vallès. Email: mariabelen.castillo@uab.cat

El tricloroetileno (TCE) es un hidrocarburo alifático que ha sido ampliamente utilizado en la industria y es considerado un contaminante peligroso por su toxicidad y su carácter recalcitrante. El hongo de podredumbre blanca *Trametes versicolor* degrada un amplio rango de contaminantes, entre ellos el TCE, mediante su potente sistema enzimático (Marco-Urrea 2008).

Con el objetivo de estudiar la expresión génica del hongo en respuesta a la presencia del contaminante, se ha puesto a punto una metodología para extraer el material genético de *T. versicolor*, desde la disrupción de la pared celular hasta la obtención del RNA total purificado. Asimismo, se han diseñado diferentes oligonucleótidos específicos para los genes de interés, en este caso una lacasa y un citocromo P450, para su amplificación y cuantificación mediante RT-PCR a tiempo real. Finalmente esta metodología se ha acoplado a experimentos de degradación, para comparar la expresión génica de estos enzimas en presencia y ausencia del contaminante clorado.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el sistema experimental para analizar la expresión de los genes es adecuado. Por otro lado los experimentos de degradación, muestran que el TCE comienza a degradarse a partir de las 24 horas llegando a un porcentaje de degradación del 60% a las 72h. Paralelamente, se observa un incremento de la actividad lacasa extracelular que se inicia a la 48h, llegando a su máxima actividad (119 UA/L) a las 72h. Este resultado concuerda con el obtenido mediante RT-PCR, donde se observa un incremento significativo del gen lacβ a las 24h del inicio del contacto entre el hongo y el contaminante. Respecto al gen del otro enzima estudiado, el citocromo P450, también se observa un incremento de su expresión a las 24h. Así pues, la respuesta de *T. versicolor* a la exposición al TCE es un incremento de la expresión de ambos genes a las 24h, poniendo de manifiesto la activación del sistema oxidativo del hongo, esté el enzima involucrado (citocromo) o no (lacasa) en el primer paso de la degradación. Por lo tanto, la simple inducción enzimática no implica que el enzima en cuestión esté involucrado en la degradación del contaminante.

Referencias:

1. Marco-Urrea et al. (2008) Chemosphere 70, 404-410.
2. Marco-Urrea et al. (2008) J Chem Technol Biotechnology 83, 1190-1196.

Agradecimientos: B. Castillo disfruta de una beca FPI. Este trabajo está financiado por los proyectos MICIN: CTM2007-60971 y MMAMRM: 010/PC08/3-04.1. Los autores ¹ y ³ forman parte del grupo 2009-SGR 656 y de la Unitat d'enginyeria bioquímica de la Xarxa de Referència en Biotecnologia (XRB) de la Generalitat de Catalunya. Los autores ² forman parte del grupo 2009-SGR 01379 de la Generalitat de Catalunya.

Obtención y caracterización de consorcios bacterianos degradadores de hidrocarburos aromáticos

Iván Lores Ovies^{1(*)}, Ana Isabel Peláez¹, J.L. Rodríguez Gallego², María-Eugenia Guazzaroni³, Manuel Ferrer³, Jesús Sánchez¹

¹Área de Microbiología, Departamento de Biología Funcional e Instituto de Biotecnología, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo, 33006 Oviedo.

²Área Prospección e Investigación Minera. Universidad de Oviedo, 33600 Mieres.

³Instituto de Catálisis, CSIC, 28049 Madrid, Spain.

(*)Email: ivan.lores.ovies@gmail.com

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son estructuras formadas por dos o más moléculas de benceno fusionadas. Su presencia como contaminantes en el medio ambiente afecta negativamente a la calidad del suelo y agua (1). Los microorganismos juegan un papel muy importante en la eliminación de los HAPs, de tal forma que las capacidades metabólicas de las poblaciones microbianas para degradar esos compuestos constituyen uno de los fundamentos críticos que sustentan las técnicas de biorremediación. Bien mediante bioestimulación (potenciación de las actividades microbianas autóctonas) o bioaumentación, las bacterias del suelo contribuyen decisivamente a la desaparición de los HAPs. En este último caso, los microorganismos, una vez seleccionados, pueden utilizarse de forma efectiva para potenciar la degradación.

A partir de un suelo con una larga historia de contaminación (con naftaleno y una amplia variedad de HAPs) cercano a la localidad de Lugones (Asturias), hemos obtenido, mediante técnicas de enriquecimiento, diferentes consorcios bacterianos con capacidad de degradar naftaleno y otros HAPs, que estamos aplicando en técnicas de bioaumentación en "bioslurry" (un tratamiento controlado del suelo en biorreactor) (2). La eficiencia de estos consorcios para degradar HAPs está relacionada con el mantenimiento de capacidades y relaciones metabólicas en y entre los distintos miembros (3). Por lo tanto, el conocimiento detallado de esas funciones es muy útil para optimizar los procesos de descontaminación. En esta comunicación se describe la caracterización de esos consorcios. La estabilidad de los consorcios tras sucesivos pases de enriquecimiento ha sido analizada por técnicas de DGGE. Para estudiar la filogenia y el significado funcional de esas bacterias en los consorcios se procedió al análisis de las poblaciones cultivables y totales mediante aproximaciones metagenómicas. Además se estudiaron las capacidades degradadoras de las bacterias aisladas. Los resultados anteriores aportan datos interesantes sobre las complejas interrelaciones y plasticidad metabólica de las poblaciones implicadas en la degradación de naftaleno y otros HAPs.

Referencias:

1. Doyle E, Muckian L, Hickey AM, Clipson N. (2008). Microbial PAH degradation. Adv. Appl. Microbiol. 65, 27-66.
2. Gallego, J.R., García-Martínez, M.J., Llamas, J.F., Belloch, C., Peláez, A.I. and Sánchez, J. (2007). Biodegradation of oil tank bottom sludge using microbial consortia. Biodegradation 18, 269-281.
3. Sánchez, J. y Gallego, J.L.R. (2005). Biorremediación: conceptos esenciales y ámbitos de aplicación. En "Biotecnología y Medioambiente". I. Marín, J.L. Sanz, R. Amils (Eds), pp. 61-75. Ephemera. Madrid.

Análisis de la regulación de la biosíntesis del antitumoral mitramicina en *Streptomyces argillaceus*

Ana Belén Flórez García*, Felipe Lombó Brugos, Alfredo Fernández Braña, José Antonio Salas Fernández, Carmen Méndez Fernández

Departamento de Biología Funcional e Instituto Universitario de Oncología (I.U.O.P.A.), Universidad de Oviedo. Campus del Cristo. c/ Julián Clavería sn. 33006 Oviedo.
Email: florezana@uniovi.es

El grupo del ácido aureólico comprende varios compuestos con actividad antitumoral que son producidos por estreptomicetos y cuya estructura posee un aglicón tricíclico al que se unen dos cadenas oligosacáridicas y una cadena lateral hidrocarbonada. La mitramicina, conocida comercialmente como Plicamicina®, y la cromomicina A3 son los miembros más representativos de esta familia y ambos compuestos poseen una estructura muy similar, residiendo las diferencias entre ellos a nivel de la composición de los oligosacáridos que contienen. En los últimos años se ha demostrado que la mitramicina es efectiva frente a distintos tipos de cáncer, así como en el control de procesos de hipercalcemia en pacientes con metástasis en los huesos y enfermedad de Paget. En nuestro grupo se ha clonado y secuenciado los genes que participan en la biosíntesis de la mitramicina en el microorganismo *Streptomyces argillaceus* ATCC12956, y de la cromomicina A3 en el microorganismo *Streptomyces griseus subsp. griseus* ATCC 13273. A pesar de la alta similitud estructural entre estos compuestos, la organización de las agrupaciones génicas que las codifican es muy diferente entre sí.

La agrupación de genes de biosíntesis de mitramicina contiene 34 pautas abiertas de lectura y mediante la generación de mutantes en diferentes genes y la purificación y caracterización de los compuestos acumulados en estos se han podido identificar aquellos genes implicados en la biosíntesis y modificación del aglicón policetídeo, biosíntesis, modificación y transferencia de los distintos desoxiazúcares. Además, se han identificado dos posibles genes reguladores: el gen *mtmR*, que codifica para una proteína activadora tipo SARP, y el gen *mtrY* que presenta similitud con proteínas reguladoras del tipo PadR. La inactivación y la sobreexpresión del gen *mtmR* han confirmado el papel del mismo como gen activador de la biosíntesis de mitramicina (1). El agrupamiento génico contiene además un gen *mtmA* que codifica para proteína con dos dominios que poseen gran similitud con la S-adenosilmetionina sintetasa y con la N⁵, N¹⁰-metilentetrahidrofolato reductasa, y por otro lado el gen *mtmH* que codifica una proteína similar a la S-adenosil-L-homocisteina hidrolasa que parecen tener un papel en la regulación de la biosíntesis de mitramicina.

En la presente comunicación se muestran los resultados obtenidos en el estudio de los procesos de regulación de la biosíntesis de mitramicina mediante la obtención de mutantes en genes específicos y la sobreexpresión de dichos genes en la cepa silvestre. La caracterización de la regulación específica se realizó mediante un análisis transcripcional de RT-PCR de los genes de la ruta de biosíntesis de mitramicina en la cepa salvaje de *S. argillaceus* en comparación con las cepas mutantes para los genes *mtmR*, *mtrY* y *mtmAH*.

Referencias:

1. Lombó F, Braña AF, Méndez C, Salas JA. 1999. The mithramycin gene cluster of *Streptomyces argillaceus* contains a positive regulatory gene and two repeated DNA sequences that are located at both ends of the cluster. *J Bacteriol.* 181(2):642-7.

Automated assay for *in vitro* sensitivity testing of *Aspergillus fumigatus*

M. C. Monteiro*, M. de la Cruz, J. Cantizani, E. Mellado, R. Tormo, F. Vicente, O. Genilloud

Fundación MEDINA, Centro de Excelencia en Investigación de Medicamentos Innovadores en Andalucía. Avda. del Conocimiento, 3. Edif. Centro de Desarrollo Farmacéutico. Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud. 18100 Armilla (Granada), Spain.

Email: mcandida.monteiro@medinaandalucia.es

The opportunistic human pathogen *Aspergillus fumigatus* is one of the most widely-spread airborne fungi. *A. fumigatus* causes various diseases in humans of which invasive aspergillosis (IA) deserves a very special clinical consideration. In the last decade, the incidence of IA has increased three-fold. Consequently, IA is considered, nowadays, as one of the major causes of death in immunocompromised patients.

Various methods have been developed for testing the antifungal susceptibility of *A. fumigatus*. However, the reproducibility of and endpoint determination by the standard broth microdilution susceptibility method for testing of compounds against *Aspergillus* species are poor.

In this work, we have developed an easy automated fluorometric method compatible with microtiter plate readers to identify new antifungal compounds, as well as synergists compounds with antifungals used for the clinical treatment of IA. In this liquid growth inhibition assay, rezasurin, an oxidation-reduction indicator of eukaryotic cell viability, is used for identification of antifungal activity. Rezasurin is a non-fluorescent blue dye that by reduction is converted to the pink colored highly red fluorescent resorufin.

Firstly, the parameters optimization was established for the inoculum spore concentration, the antifungal concentration range, the incubation time and data analyses. Secondly, the reproducibility and sensitivity of this assay was validated for three antifungal agents: caspofungin, amphotericin B and itraconazole. Finally, conditions were defined for high throughput screening (HTS), in 96- and 384-well plates, in order to identify novel antifungal compounds, as well as compounds showing a synergistic effect with caspofungin, from a library containing 80,000 natural microbial extracts.

From this collection of microbial extracts, we have assayed so far 12,000 samples (6,000 actinomycetes extracts and 6,000 fungal extracts). HTS was performed with two strains, *A. fumigatus* ATCC46645 (wild-type strain) and *A. fumigatus* $\DeltaakuB^{KU80}$ (lacking the non-homologous end joining pathway), generally used in genetic manipulation experiments. Results have shown that 3.8% of the extracts analyzed present antifungal activity against the wild-type strain *A. fumigatus* ATCC46645 (inhibition cut-off $\geq 60\%$), from which 75% correspond to actinomycetes extracts. In addition, 0.75% of the 12,000 assayed extracts showed synergism with caspofungin in both tested strains, *A. fumigatus* ATCC46645 and *A. fumigatus* $\DeltaakuB^{KU80}$, being 86% of this type of activities produced by fungal cultures.

Búsqueda y análisis de los genes relacionados con la biosíntesis de holomicina en *Streptomyces clavuligerus*

Vanessa Robles-Reglero^{1,2,*}, Irene Santamarta^{1,2}, Rubén Álvarez-Álvarez^{1,2}, Paloma Liras^{1,2}

¹Área de Microbiología. Departamento de Biología Molecular. Universidad de León. Campus de Vegazana 24071 León. España. Email: vrobregl@unileon.es

²Instituto de Biotecnología de León INBIOTEC. Parque Científico de León. Avda. Real, 1.24006 León. España.

Streptomyces clavuligerus es un actinomiceto productor de una variedad de metabolitos secundarios con diferentes actividades biológicas. Se aisló inicialmente como productor del compuesto β -lactámico cefamicina C, y en la actualidad se utiliza industrialmente para producir el inhibidor de β -lactamasas ácido clavulánico. Este microorganismo produce además otros compuestos entre los que se encuentra la holomicina, un antibiótico de tipo pirrotina.

La holomicina, de color amarillo característico, fue aislada por primera vez en *S. clavuligerus* por Kenig y Reading en 1979 (1). Posee actividad antibiótica frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, como inhibidor de la RNA polimerasa, así como actividad antifúngica y antitumoral. En su estructura presenta un enlace disulfuro que la incluye dentro del grupo de las ditiopirrolonas, aunque su ruta biosintética permanece sin dilucidar. Nuestro grupo de investigación dispone de una cepa mutante, denominada *S. clavuligerus oppA2::aph* (2), sobreproductora de holomicina que facilita los estudios realizados, ya que la cepa silvestre *S. clavuligerus* ATCC 27064 sólo produce trazas de dicho compuesto.

El análisis del proteoma de distintos mutantes de *S. clavuligerus* realizados en nuestro grupo de investigación permitió identificar una serie de proteínas diferencialmente expresadas en mutantes de alta producción de holomicina. Sus genes codificantes se encuentran agrupados secuencialmente en el genoma y fueron empleados como sondas para el rastreo de una genoteca en cósmidos de *S. clavuligerus* ATCC 27064. De este modo se localizó la agrupación génica, que consta de 13 genes (*orf83* y *orf85* a *orf96*) a la que denominamos agrupación *hol*.

Se ha analizado mediante RT-PCR la expresión génica de estos marcos de lectura observándose una expresión muy superior de los genes en la cepa sobreproductora de holomicina, *S. clavuligerus oppA2::aph*, respecto de la cepa silvestre.

La delección de algunos de los marcos de lectura de la agrupación *hol* ha dado lugar a fenotipos no productores de holomicina, como es el caso de la delección de *orf89*. La cepa *S. clavuligerus oppA2::aph Δorf89* muestra un descenso drástico de la producción de holomicina demostrable mediante bioensayo y HPLC de los cultivos del mutante.

La introducción de la hipotética agrupación de holomicina en la cepa no productora de antibióticos ni pigmentos *Streptomyces coelicolor* M1154 (3), para su expresión heteróloga, ha permitido obtener el mutante *S. coelicolor* M1154 [pVR-*hol*] capaz de producir holomicina, lo que confirma que los genes *hol* codifican las enzimas y proteínas necesarias para la producción de este compuesto.

Referencias:

1. Kenig M., Reading C. (1979). Holomycin and an antibiotic (MM 19290) related to tunicamycin, metabolites of *Streptomyces clavuligerus*. *J Antibiot* (Tokio). 32, 549-554.
2. Fuente A de la, Lorenzana L.M., Martín J.F., Liras P. (2002). Mutants of *Streptomyces clavuligerus* with disruptions in different genes for clavulanic acid biosynthesis produce large amounts of holomycin: possible cross-regulation of two unrelated secondary metabolic pathways. *J Bacteriol* 184: 6559–6565.
3. Flinspach K., Westrich L., Kaysser L., Siebenberg S., Gomez-Escribano J.P., Bibb M., Gust B., Heide L. (2010). Heterologous expression of the biosynthetic gene clusters of coumermycin A1, clorobiocin and caprazamycins in genetically modified *Streptomyces coelicolor* strains. *Biopolymers*. 93, 823-832.

Caracterización de los genes implicados en la modificación del amino ácido 3-metil-aspártico durante la biosíntesis de estreptolidigina

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

Departamento de Biología Funcional e Instituto Universitario de Oncología (I.U.O.P.A), Universidad de Oviedo. Julián Clavería s/n, C.P 33006, Oviedo.

Email: heidi206@hotmail.com

La estreptolidigina es un antibiótico perteneciente a la familia de los ácidos tetrámicos (Schobert y Schlenk, 2008) producido por *Streptomyces lydicus* y reconocido por ser un potente inhibidor de la subunidad β de la ARN polimerasa bacteriana (Sánchez-Hidalgo et al., 2010), exhibiendo una limitada resistencia cruzada con rifampicina. Además la estreptolidigina ha demostrado ser un potente inhibidor del enzima deoxinucleotidil transferasa terminal, enzima encontrada en gran cantidad en leucocitos de pacientes con leucemia linfoblástica aguda o en raros casos de leucemia mielocítica crónica (Dicioccio et al., 1980).

Estudios biosintéticos usando precursores marcados han demostrado la incorporación de propionato, acetato, metionina y ácido glutámico (probablemente en forma de metil-aspártico) en la formación de la estructura principal del antibiótico (Chen y Harrison, 2004; Chen et al., 2006). Estos estudios apuntan a un sistema híbrido policétido sintasa-sintetasa de péptidos no ribosomales para la biosíntesis de estreptolidigina, lo cual se ha confirmado con el reciente aislamiento y caracterización del agrupamiento génico responsable de la biosíntesis del antibiótico (Olano et al., 2009). Dentro de la ruta se han identificado genes encargados de la regulación y secreción del antibiótico y otros genes que codifican proteínas involucradas en el aporte y modificación final del precursor aminoacídico. Entre estos genes, *slgZ* y *slgM* codifican para una asparagina sintetasa y una metiltransferasa respectivamente, lo que apunta a su participación en la modificación del amino ácido 3-metil aspártico durante la biosíntesis de estreptolidigina. En esta comunicación se presentan los experimentos de inactivación y expresión de los genes *slgZ* y *slgM*, que demuestran su participación en la biosíntesis del antibiótico, así como la generación de un nuevo compuesto derivado de estreptolidigina.

Bibliografía:

1. Chen and Harrison, 2004, Org. Lett. 6: 4033-4036.
2. Chen et al., 2006, Org. Lett. 8: 5329-5332.
3. Dicioccio et al., 1980, Biochem. Pharmacol. 29: 2001-2008.
4. Olano et al., 2009, Chem. Biol. 16: 1031-1044.
5. Sánchez-Hidalgo et al., 2010, Antimicrob. Agents Chemother. 54: 1684-1692.
6. Schobert and Schlenk, 2008, Bioorg. Med. Chem., 16, 4203-4221.

Diferenciación y producción de metabolitos secundarios en cultivos sumergidos de *Streptomyces tsukubaensis* productor de tacrolimus

Paula Yagüe Menéndez^{1(*)}, Ángel Manteca Fernández¹, Ana Isabel Pelaez Andres¹, Miriam Martinez Castro², Jesús Sánchez Martín¹

¹Área de Microbiología, Departamento de Biología Funcional e Instituto de Biotecnología, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo, Julián Clavería sn, 33006 Oviedo, España.

²Instituto Biotecnología de León, Parque Científico de León, Avenida Real nº 1, 24006 León, España.

Streptomyces es una bacteria gram positiva que posee un ciclo de desarrollo complejo en el que se incluyen procesos de esporulación y muerte celular programada (MCP). Esta bacteria tiene gran importancia biotecnológica, ya que produce dos tercios de los antibióticos de interés en biomedicina y veterinaria, así como gran cantidad de inductores e inhibidores de los procesos de diferenciación de células eucariotas. El ciclo de desarrollo tradicional de *Streptomyces* en cultivos sólidos, se inicia con la germinación de las esporas y el posterior desarrollo de un micelio vegetativo que crece dentro del medio de cultivo (micelio sustrato); dicho micelio, sufre un proceso de MCP, comienza a sintetizar cubiertas hidrofóbicas, y a crecer en el aire (micelio aéreo); finalmente, el micelio aéreo se compartimentaliza y forma esporas; ambos micelios, sustrato y aéreo son multinucleados (1). La mayoría de las fermentaciones industriales se realizan en cultivos líquidos (grandes biorreactores), condiciones en las cuales no hay esporulación ni formación de las cubiertas hidrofóbicas; por lo que se asume que no existe diferenciación.

Hemos elaborado en nuestro grupo de investigación un nuevo modelo de desarrollo para el género *Streptomyces*, tanto en cultivos sólidos (esporulantes) como líquidos (no esporulantes). Un micelio joven completamente compartimentalizado (MI) que no había sido descrito con anterioridad, sufre procesos de MCP muy ordenados; posteriormente, los segmentos de este MI que permanecían viables comienzan a alargarse y crecer como un micelio multinucleado (MII) (sin tabiques) (2). En cultivos sólidos existen además dos tipos de MII en función de la ausencia (desarrollo temprano) o la presencia (desarrollo tardío) de las cubiertas hidrofóbicas características de las hifas aéreas. El llamado micelio sustrato (vegetativo) en el ciclo de desarrollo tradicional se corresponde con el MII multinucleado temprano que carece de las cubiertas hidrofóbicas. El desarrollo del MII está precedido por una detención transitoria del crecimiento y MCP, además de ser el encargado de la producción de antibióticos. La identificación de la estructura productora de los metabolitos secundarios no es trivial, y está teniendo repercusiones en las fermentaciones industriales que utilizan esta bacteria (3).

En este trabajo, hemos analizado la relación entre diferenciación y producción de metabolitos secundarios en una cepa de interés industrial como es *Streptomyces tsukubaensis*, productora del inmunosupresor tacrolimus. El objetivo es desarrollar nuevas aproximaciones metodológicas para promover la diferenciación en los medios de fermentación, y en consecuencia la producción de metabolitos secundarios.

Referencias:

1. Manteca, A., Fernandez, M., Sanchez, J. (2006). Cytological and biochemical evidence for an early cell dismantling event in surface cultures of *Streptomyces antibioticus*. Res. Microbiol. 157,143-152.
2. Manteca, A., Alvarez, R., Salazar, N., Yagüe, P. Sanchez J. (2008). Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*. Appl. Environ. Microbiol. 74, 3877-3886.
3. Yagüe P., Manteca A., Simon De Dios A., Diaz Gracia M.E., Sanchez J. (2010). A new method for monitoring programmed cell death and differentiation in submerged cultures of *Streptomyces*. Appl. Environ. Microbiol. 76, 3401-3404.

Diversidad de Compuestos Antimicrobianos producidos por Actinomicetos aislados desde hormigas cortadoras de hojas

Carlos Sialer *, Dina H. Horna, Alfredo F. Braña, Carmen Méndez, Jose A. Salas

Departamento de Biología Funcional. Instituto Universitario de Oncología (I.U.O.P.A).
Universidad de Oviedo. Julián Clavería s/n, 33006 Oviedo.

Email: csialer@hotmail.com

Las hormigas cortadoras de hojas cuyo habitat se ubica en América, son consideradas los insectos más evolucionados debido principalmente a que practican la agricultura y micofagia, cultivando hongos (fungicultura) de la familia Lepiotaceae, cuyos cuerpos fructíferos (gongilidias), constituyen la base nutritiva fundamental de la colonia (Currie, et al. 1999; Mueller and Gerardo. 2002; Mueller and Rabelling, 2008)

En la actualidad se asume que tal coevolución llevó consigo el desarrollo evolutivo al mismo tiempo de otro hongo *Escovopsis* (Ascomycota: Hypocreales) (Taerum et al. 2007), que cumple el papel de plaga para el cultivo y por otro lado de bacterias pertenecientes a los actinomicetos que crecen en el tegumento externo de las hormigas (Currie et al, 1999, 2006) cuyos metabolitos secundarios cumplen un papel antagónico frente al hongo no deseado, a modo de protección de los cultivos (North et al., 1997; Schultz and Brady, 2008).

A partir de estas hormigas del género *Acromyrmex octospinosus*, aislamos 197 cepas cuya filogenia fue construida a partir del análisis de la región γ del 16SrDNA; los cuales en su mayoría pertenecieron al género *Streptomyces* (96%), seguidas de *Prauseria* (4%) y *Nocardia* (0,5%).

La diversidad de compuestos identificados a través de cromatografía líquida mostraron homología estructural con antibióticos de la familia de las antraquinonas, macrólidos, compuestos alcaloides, bipiridínicos, hidroxibenzoazoles, aliciclos aromáticos, lactonas, pironas, estructuras peptídicas como heteropéptidos, depsipéptidos y péptidos cíclicos. Los extractos de todas estas cepas además mostraron actividad contra bacterias gram-positivas un 77% de los aislados, gram-negativas un 42%, organismos alcohol ácido resistentes un 55%, hongos levaduriformes un 21%, hongos filamentosos un 51% y actividad antitumoral un 24%; mostrando un 36% actividad antimicrobiana de amplio espectro.

De esta manera nuestros resultados ponen en evidencia la prevalencia del género *Streptomyces* (Currie et al., 1999) en esta fuente exótica al igual que en el suelo, cuya variedad de compuestos identificados se relaciona con una gran diversidad de especies pertenecientes a este género (Cafaro and Currie. 2005; Kost et al., 2007; Haeder et al., 2009) que coloniza dicha fuente.

Referencias:

1. Cafaro and Currie. 2005. Can. J. Microbiol. 51:441–446.
2. Currie et al., 1999. Nature.vol. 398.701-704pp
3. Currie et al., 2006. Science 311:81–83.
4. Haeder et al.,2009. PNAS. vol. 106.Nº 12. 4742–4746
5. Kost et al.2007. Naturwissenschaften. 94:821–828
6. North et al., 1997. Trends in Eco & Evol. 12, 386–389.
7. Taerum et al. 2007.Proc. R. Soc. B 274, 1971–1978
8. Mueller and Gerardo. 2002. PNAS vol. 99 .Nº 24.15247–15249
9. Mueller and Rabelling, 2008. PNAS. vol. 105.Nº 14. 5287–5288.
10. Schultz and Brady, 2008. PNAS. vol. 105.Nº 14. 5435–5440

Mejora de la producción del antitumoral mitramicina en *Streptomyces argillaceus* mediante ingeniería metabólica

Daniel Zabala Álvarez*, Ana Belén Flórez García, Alfredo Fernández Braña, José Antonio Salas Fernández, Carmen Méndez Fernández

Departamento de Biología Funcional e Instituto Universitario de Oncología (I.U.O.P.A.), Universidad de Oviedo. Campus del Cristo. c/ Julián Clavería s/n. 33006 Oviedo.

Email: danizabala85@hotmail.com

La mitramicina (MTM), marca registrada Plicamicina, es un compuesto antitumoral perteneciente a la familia del ácido aureólico y producida por el microorganismo *Streptomyces argillaceus*. Su actividad antitumoral reside en la capacidad de interaccionar con el surco menor del ADN en regiones con alto contenido GC causando la inhibición de la replicación y la transcripción, motivo por el cual, este compuesto posee aplicación clínica en el tratamiento de distintos tipos de cáncer, control de procesos de hipercalcemia en pacientes con metástasis en los huesos y enfermedad de Paget. En nuestro laboratorio, se ha clonado y caracterizado la agrupación de genes de biosíntesis de MTM a partir del microorganismo productor y se han generado más de 28 nuevos compuestos derivados de MTM, mediante el empleo de la estrategia denominada "Biosíntesis Combinatoria" (1). Muchos de estos nuevos compuestos presentan una actividad antitumoral más elevada que la MTM pero los niveles de producción por los microorganismos productores en algunos casos son bajos, motivo por el cual se hace necesaria una mejora en los niveles de producción.

La Ingeniería Metabólica se emplea en la actualidad como una de las estrategias de mejora de producción de compuestos y consiste en aumentar y/o canalizar los precursores del metabolismo primario hacia la ruta de biosíntesis del compuesto de interés. La ruta de biosíntesis de MTM se inicia por la condensación de 1 molécula de acetil-CoA y 9 de malonil-CoA para dar lugar al aglicón, al que se le adicionarán en etapas posteriores cinco desoxiazúcares sintetizados a partir de glucosa-1-P. El malonil-CoA procede de acetil-CoA, en una reacción catalizada por el complejo enzimático Acetil-CoA Carboxilasa (ACC), mientras que la glucosa-1-P procede de la glucosa-6-P, en una reacción catalizada por el enzima reversible Fosfoglucomutasa (Pgm). Además, la glucosa-1-P es precursor de polisacáridos de reserva como el glucógeno, para lo cual es activada a ADP-glucosa en una reacción catalizada por la ADP-glucosa pirofosforilasa (GlgC).

En esta comunicación se muestran datos sobre la mejora de la producción de MTM en el microorganismo productor mediante el incremento y canalización de los precursores metabólicos malonil-CoA y glucosa-1-P hacia la ruta de biosíntesis del compuesto. Para este fin se han abordado de forma individual y combinada distintas estrategias de ingeniería metabólica consistentes en (i) la sobreexpresión de los genes *ovmGHI* procedentes de la agrupación de genes de biosíntesis de oviedomicina (2) que codifican el complejo enzimático ACC; (ii) la sobreexpresión del gen *SCO7443* de *S. coelicolor* que codifica el enzima Pgm; (iii) la sobreexpresión conjunta de los genes *ovmGHI* y *pgm*; (iv) la inactivación del gen *glgC* de *S. argillaceus*.

Referencias:

1. Lombó et al., 2004, ChemBiochem 5: 1181-1187.
2. Lombó et al., 2006, Appl. Microbiol. Biotechnol. 73: 1-14.

Producción biotecnológica de la Dracotoxina y la Trachinina

J.L. Rodríguez Rama^{1*}, Trinidad de Miguel¹, José Antonio Lamas², Antonio Reboreda², Tomás González Villa¹

¹Departamento de Microbiología e Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela. Campus Vida, 15782 Santiago de Compostela.

Email: jose Luis.rodriguez.rama@usc.es

²Departamento de Biología Funcional e Ciencias da Saúde. Facultad de Biología. Universidad de Vigo. Campus Lagoas-Marcosende, 36310 Vigo.

Nuestro trabajo se centra en la purificación, clonación y expresión en vectores bacterianos y eucariotas (*Escherichia coli* y *Pichia pastoris*), de la Dracotoxina y Trachinina. Estas toxinas son las responsables de parte los efectos del veneno de los peces conocidos como faneca brava, salvariego o araña (nombres coloquiales que comprenden las especies *Echiichtys vipera* y *Trachinus draco*).

Las Dracotoxina es una proteína de 105kD, obtenida del *Trachinus draco*; mientras que la Trachinina es una homoproteína tetramérica de 81 kD cada subunidad, obtenida del *Echiichtys vipera*. Ambas proteínas presentan capacidad para afectar la respuesta eléctrica de las células, insertando canales en la membrana o bien afectando a canales iónicos presentes en la misma.

A nivel farmacéutico, nuevas drogas que actúen sobre canales iónicos son de alto interés, no sólo por su aplicación en el tratamiento del dolor, sino para tratar un gran número de enfermedades.

Un gran número de toxinas de origen animal han sido purificadas para su uso como fármacos, la mayoría obtenidas de animales terrestres como las serpientes, arañas, abejas. Sin embargo cada vez se está prestando más atención a las toxinas animales de origen marino.

Las toxinas marinas, suelen presentar una gran especificidad en su mecanismo de acción lo que las convierte en excelentes candidatas para el tratamiento de dolencias que tienen que ver con canales iónicos. Ejemplo de esto es el Ziconotide (Prialt®), un potente analgésico que bloquea selectivamente los canales iónicos de calcio de tipo N presinápticos y que es una versión sintética de la ω -conotoxina MVIIA, péptido obtenido a partir del veneno de la caracola marina piscívora *Conus magus*. El Ziconotide es más potente que la morfina y es particularmente efectivo en modelos de dolor persistente y crónico.

En nuestro laboratorio hemos extraído el veneno de las glándulas de *E. vipera* y *T. draco* y su actividad sobre los canales iónicos ha sido ensayada en neuronas de ratón. Empleando técnicas cromatográficas hemos obtenido diferentes fracciones proteicas de los extractos de las glándulas y ensayado su actividad.

El objetivo es aislar las proteínas Dracotoxina y Trachinina, comprobar su actividad, obtener su secuencia y clonarla y expresarla en microorganismos. Una vez obtenido un nivel de producción suficiente y una pureza adecuada de las toxinas se podrán llevar a cabo estudios profundos de su mecanismo de acción para determinar sus aplicaciones médicas.

Bibliografía:

1. Boada, C.; Lemus, J.N.; *La picadura del pez araña*. Medifam, Vol. 11, N° 6, pp.342-345, Jun. 2001.
2. McGivern J.; *Ziconotide: a review of its pharmacology and use in the treatment of pain*. Neuropsychiatr Dis Treat. Vol. 3, N°1, pp.69-85, Feb. 2007.

Síntesis biocatalizada de compuestos antivirales empleando enzimas inmovilizadas

Sara Gomez Quevedo^{1(*)} Jorge A. Trelles^{1,2,3}, Claudia N. Britos¹, Marcos Almendros¹ José V. Sinisterra¹

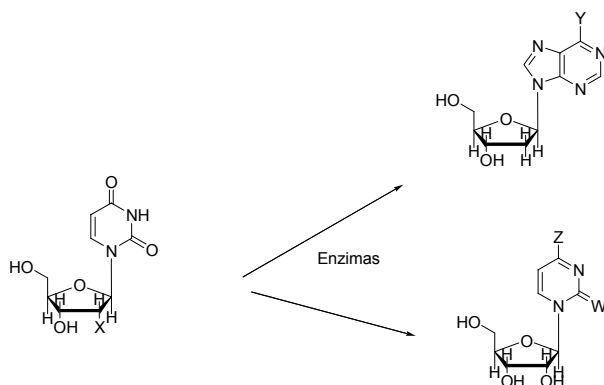
¹Servicio de Biotransformaciones (SBI) del Parque Científico de Madrid. - C/ Santiago Grisolia, 28760 Tres Cantos, Madrid, España. www.fpcm.es

²Universidad Nacional de Quilmes. Roque Saenz Peña 352, Bernal (B1868BXD), Argentina. www.unq.edu.ar

³Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Avda. Rivadavia 1917, Ciudad de Buenos Aires (C1033AAJ), Argentina. www.conicet.gov.ar

Los nucleósidos son compuestos lábiles y polifuncionales cuya síntesis química requiere muchos pasos, el uso de grupos protectores y de disolventes generándose muchos subproductos y residuos. El empleo de biocatalizadores ha significado un avance en el desarrollo de la síntesis sostenible de estos compuestos y de sus análogos¹. Desde hace varios años hemos descrito la síntesis de análogos de nucleósidos empleando nucleósido fosforilasas² y N-desoxiriboxiltransferasas³ de microorganismos mesófilos. Recientemente se aislaron y caracterizaron tres enzimas a partir de una cepa de *T. thermophilus*, que presentaban actividad en la síntesis de nucleósidos en un único paso y en agua⁴. Las enzimas son termoestables y pueden trabajar en presencia de disolventes orgánicos miscibles con agua⁴.

En la presente comunicación se presentan los resultados obtenidos en la inmovilización-estabilización de las enzimas sobre distintos soportes comerciales. Se ha determinado el pH óptimo de trabajo, la carga enzimática del biocatalizador, la estabilidad térmica y la vida media. Los catalizadores se han empleado en las síntesis de distintos nucleósidos naturales y no naturales



Referencias:

1. Sinisterra J.V., Alcántara A.R., Almendros M., Hernaiz M.J., Sanchez-Montero J.M., Trelles J.A. Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology, M. C. Flickinger (ed), Wiley & Sons Inc. pp.1-25 (2010)
2. Trelles J.A., Fernandez M., Leewkowitz E.S., Iribarren A., Sinisterra J.V. *Tetrahedron Letters*. 44,2605-2609(2003).
3. Fernandez-Lucas J., Acebal C.; Sinisterra J.V., Arroyo M.; De La Mata I. *Applied Environmental Microbiology*, 76(5), 1462 -1470 (2010)
4. Almendros M., Sinisterra J.V., Berenguer J. *Molecules* 14, 1279-1287(2009)

Competición entre los reguladores GlnR y PhoP: Solapamiento en la zona de unión al promotor *glnA* de *Streptomyces coelicolor*

Juan F. Martín^{1,2}, Antonio Rodríguez-García^{1,2}, Rafat Amin³, Wolfgang Wohlleben³, Alberto Sola-Landa^{1,*}

¹INBIOTEC, Instituto de Biotecnología de León, Avda. Real nº. 1, Parque Científico de León, 24006 León, Spain

²Área de Microbiología, Departamento de Biología Molecular, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n; 24071 León, Spain

³Interfakultäres Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin, Mikrobiologie/Biotechnologie, Eberhard-Karls-Universität, Auf der Morgenstelle 28, 72076 Tübingen, Germany

La interacción de las redes reguladoras del metabolismo en bacterias es un tema de gran interés. El control por fosfato del metabolismo de *Streptomyces* está mediado por el sistema de dos componentes PhoR-PhoP. De forma similar, la utilización de diferentes fuentes de nitrógeno es controlada por el regulador de respuesta GlnR. Los análisis transcriptómicos y bioquímicos revelaron que la expresión de *glnA* (que codifica la glutamina sintetasa) y de otros genes del metabolismo del nitrógeno está bajo el control de PhoP y de GlnR. Experimentos de unión a DNA demostraron que PhoP se une también a los promotores de varios otros genes regulados mediante nitrógeno (SCO0255, SCO01863 y *ureA*). Mediante la utilización del promotor del gen *glnA* como modelo, observamos que PhoP y GlnR compiten por la misma zona de unión en la región promotora: GlnR tiene mayor afinidad que PhoP por esta región y produce una reducción significativa de la unión de PhoP. Utilizando un total de 14 secuencias de unión de GlnR (50 unidades de repeticiones directas, DRU1) hemos establecido dos modelos (information based) que establecen la caja de GlnR como formada por dos repeticiones directas de 11-nt cada una, con claras diferencias con respecto a la caja PHO solapante. Los estudios de unión del DNA de distintos mutantes en el promotor *glnA* mostraron que la caja GlnR está localizada en la cadena codificante mientras que la caja PHO está ubicada en la no-codificante. El control por PhoP de los genes del metabolismo del nitrógeno ayuda a mantener el balance P/N en las células.

El factor omega de la RNA polimerasa es necesario para el crecimiento completo de *Streptomyces coelicolor* y para la biosíntesis de actinorhodina y undecilprodigiosina: Unión del promotor PhoP a su región promotora

Fernando Santos-Beneit^{1,2}, Mónica Barriuso Iglesias^{1,2}, Miriam Martínez-Castro^{1,2}, Alberto Sola-Landa¹, Antonio Rodríguez-García^{1,2}, Juan F. Martín^{1,2,*}

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

²Área de Microbiología, Departamento de Biología Molecular, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n; 24071 León, España

El factor omega (ω) de la RNA polimerasa (RNAP) de bacterias forma un complejo con el núcleo $\alpha_2 \beta$ de esta enzima. Hemos caracterizado el gen *rpoZ* de *Streptomyces coelicolor* que codifica una pequeña proteína (90 aa). La delección (por REDIRECT) del gen *rpoZ* originó cepas mutantes con una velocidad de crecimiento reducida aunque son todavía capaces de esporular. La biosíntesis de actinorhodina y, en particular, la de undecilprodigiosina fueron drásticamente reducidas en el mutante $\Delta rpoZ$, lo que sugiere que la expresión de los genes de biosíntesis de metabolitos secundarios es dependiente de la presencia de RpoZ en el complejo de la RNAP. La complementación del mutante $\Delta rpoZ$ con el alelo *rpoZ* de la cepa silvestre restauró el fenotipo y la capacidad de producir antibióticos. El gen *rpoZ* se expresa durante el crecimiento vegetativo y su expresión disminuye tras la fase de transición que se correlaciona con el agotamiento del fosfato. La expresión del gen testigo *luxAB* a partir del promotor del gen *rpoZ* se estimuló por la adición de fosfato inorgánico. El gen *rpoZ* contiene una caja PHO en su región promotora. Los tests de unión a DNA mediante ensayos de movilidad electroforética (EMSA) mostraron que el regulador de respuesta PhoP se une al promotor de *rpoZ*, como era previsible, lo que sugiere que la expresión de *rpoZ* y, en consecuencia, la expresión de los genes para el metabolismo secundario está regulada por fosfato probablemente a través de la unión de PhoP al promotor de *rpoZ*. Sin embargo, la unión de PhoP al promotor de *rpoZ* es débil y proponemos que dicha unión requiere un factor transcripcional adicional o un efector de bajo peso molecular.

Síntesis de nutraceuticos mediada por esteroles

Víctor Barba Cedillo*, Alicia Prieto, M^a Jesús Martínez

CIB-CSIC. Ramiro de Maeztu 9. 28040 Madrid. Email: mjmartinez@cib.csic.es

Los niveles elevados de colesterol LDL en sangre suponen un factor de riesgo para el desarrollo de lesiones ateroscleróticas que pueden conducir a infartos o derrames cerebrales. Los esteroides vegetales (fitosteroides) y sus ésteres, añadidos a alimentos que se toman de forma cotidiana, pueden contribuir a disminuir el colesterol LDL en sangre al impedir la absorción previa de éste a nivel intestinal¹. Estos compuestos que contribuyen a prevenir, o incluso tratar, algunas enfermedades reciben el nombre de nutraceuticos. La adición de esteroides libres en alimentos se ve limitada por su baja solubilidad y elevado punto de fusión², por lo que el estudio de enzimas capaces de esterificar estos compuestos ha despertado gran interés.

Las esteroles esterases o carboxilester lipasas pueden ser consideradas biocatalizadores versátiles capaces de llevar a cabo reacciones de hidrólisis en condiciones acuosas o de síntesis en presencia de solventes orgánicos. El hongo *Ophiostoma piceae* secreta una esteroles esterase que se está estudiando por su potencial aplicación en la industria papelera para reducir tanto los problemas de *pitch* en pastas de frondosas y coníferas³, como los problemas de *stickies* en la producción de papel reciclado⁴. En este trabajo estudiamos la esterificación del ácido láurico con distintos fitosteroides utilizando las enzimas nativa y recombinante de *O. piceae* (esta última expresada en *Pichia pastoris*) y una preparación de la esteroles esterase de *Candida rugosa* (Sigma). En las reacciones de esterificación se han estudiado la influencia de la concentración de sustratos, la dosis de enzima y el tipo de solvente. A las 48 horas de reacción se obtuvieron los máximos porcentajes de esterificación, siendo éstos ligeramente mayores con las esteroles esterases de *O. piceae* (~ 80%) incluso utilizando menores dosis de enzima.

Los resultados logrados ponen de manifiesto la capacidad de las enzimas de *O. piceae* de catalizar reacciones de síntesis de compuestos de alto interés que pueden ser utilizados como nutraceuticos.

Referencias:

1. De Jong, A., Plat, J., Bast, A., Godschalk, R.W.L., Basu, S. y Mensink, R.P., 2008. *Effects of plant sterol and stanol ester consumption on lipid metabolism, antioxidant status and markers of oxidative stress, endothelial function and low-grade inflammation in patients on current statin treatment. European Journal of Clinical Nutrition* 62: 263-273.
2. Thompson, G.R. y Grundy, S.M., 2005. *History and development of plant sterol and stanol esters for cholesterol-lowering purposes. American Journal of Cardiology* 96: 3D-9D.
3. Calero-Rueda, O., Gutiérrez, A., del Río, J.C., Muñoz, C., Plou, F.J., Martínez, A.T. y Martínez, M.J., 2002. *Method for the enzymatic control of pitch deposits formed during paper pulp production using an esterase that hydrolyses triglycerides and sterol esters. Patent (International) WO 02/075045 A1.*
4. Barba, V., Prieto, A., Martínez, Á.T. y Martínez, M.J., 2010. *Fungal sterol esterases: versatile biocatalysts for different biotechnological applications. Abstract. Biotec2010 Congress on Biotechnology, Pamplona, September 29-October 1.*

Nuevos polienos con propiedades farmacológicas mejoradas obtenidos mediante manipulación genética en *Streptomyces diastaticus* var. 108.

Elena M. Seco Martín, Leticia Escudero, Trinidad Cuesta, Cristinta Nieto, Francisco Malpartida

CNB-CSIC. Darwin 3, Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid.

Email: eseco@cnb.csic.es

Existe una necesidad urgente de nuevas drogas capaces de combatir infecciones sistémicas por hongos que ponen en peligro la vida de enfermos inmunodeprimidos, así como el éxito de otras terapias tales como trasplantes de órganos o aplicaciones de drogas como antitumorales. El uso de macrólidos polienos como fungicidas presenta la ventaja de que prácticamente no genera formas resistentes. Sin embargo, los problemas ocasionados como consecuencia de su toxicidad son elevados. Tal es el caso de anfotericina B, que lleva usándose clínicamente desde hace más de 30 años. Derivados semisintéticos de anfotericina B han concluido que modificaciones en el grupo carboxilo libre y/o amino del azúcar micosamina incrementan la toxicidad selectiva hacia células que contienen ergosterol (hongos, parásitos...), reduciéndose la toxicidad hacia células que contienen colesterol en sus membranas (células de mamíferos).

La manipulación genética en *Streptomyces diastaticus* var. 108, una cepa aislada de suelos y productora de dos tetraenos estructuralmente relacionados (CE-108 y rimocidina), ha permitido generar compuestos con sustitución del grupo carboxilo libre por un grupo amida (1). Se ha aislado la actividad enzimática responsable, no asociada al *cluster* de biosíntesis, tratándose de una amidotransferasa dependiente de ATP/Mg⁺ que utiliza glutamina como donador y el polieno carboxilado como sustrato dando lugar a polienos amidados con propiedades farmacológicas mejoradas respecto a los carboxilados parentales (2). Recientemente, se ha aislado el gen *pcsA* que codifica dicha actividad (3).

La interrupción de un gen en el *cluster* biosintético que codifica una crotonyl-CoA reductasa ha puesto de manifiesto una capacidad de reconocimiento relajada de unidades iniciadoras y/o elongadoras por parte de la poliquétido sintasa (PKS) implicada en su biosíntesis, obteniéndose así nuevos polienos carboxilados. La expresión del gen *pcsA* en esta cepa manipulada genéticamente ha permitido la obtención de nuevos polienos amidados con propiedades farmacológicas interesantes.

Referencias:

1. Seco, E. M., T. Cuesta, et al. (2005). "Two polyene amides produced by genetically modified *Streptomyces diastaticus* var. 108." *Chem Biol* 12(5):535-43.
2. Seco, E. M., S. Fotso, et al. (2005). "A tailoring activity is responsible for generating polyene amide derivatives in *Streptomyces diastaticus* var. 108." *Chem Biol* 12(10): 1093-101.
3. Seco, E. M., D. Miranzo, et al. (2010). "The *pcsA* gene from *Streptomyces diastaticus* var. 108 encodes a polyene carboxamide synthase with broad substrate specificity for polyene amides biosynthesis." *Appl Microbiol Biotechnol* 85(6): 1797-807. Epub 2009 Aug 26.

Biobleaching of sisal pulp involving xylanase and laccase-mediator systems

Elisabetta Aracri*, Teresa Vidal

Universitat Politècnica de Catalunya, Textile and Paper Engineering Department, Colom 11, E-08222 Terrassa, Spain.

Email: elisabetta.aracri@etp.eupc.edu

This work was conceived to investigate the effectiveness of a combined use of xylanase and laccase for aiding lignin removal from sisal pulp fibres. Xylanase (X) and laccase (L) treatments were used in a XLQP sequence (where Q denotes a chelant stage and P an alkaline peroxide multi-step treatment) applied to pulp in order to attain high delignification degrees and brightness values. The results of the XLQP sequence were compared with those of an LQP sequence. Previous works showed sinapyl aldehyde (SLD) to be the best candidate for aiding pulp delignification among several p-hydroxycinnamic compounds assayed as natural mediators of laccase. Thus, it was selected for further investigation in the present work and applied in the L treatment at conditions determined as optimal in a preliminary study. SLD was compared to the efficient synthetic mediator violuric acid (VA) in terms of effects produced on pulps and effluents resulting from each stage of the bleaching sequence. When LQP sequence was applied, L treatment in the presence of SLD resulted in 25% increase of kappa number with respect to laccase control (pulp treated under identical conditions but without mediator), caused by the fraction of mediator physically adsorbed and/or covalently bound through radical reactions onto fibres. However, a significant delignification effect was observed at the end of the P stage, yielding a kappa number 14% lower than control value. Pulp brightness experimented a marked drop after L-SLD treatment due to the formation of a pronounced amount of chromophore species; however, a noticeably important gain was obtained after the P stage, with a final value almost twice higher than the initial one and 4 %ISO points over the laccase control. VA showed better delignification performance than SLD, particularly in the initial stage, where it caused 20% kappa number decrease with respect to laccase control. Final kappa number was only slightly inferior to the one obtained with the sequence involving SLD. When VA was used, brightness was significantly improved in all stages with respect to both control samples and SLD-treated pulps. The xylanase pretreatment resulted in considerable brightness enhancement in the sequence performed with VA, and kappa number reduction in both sequences involving SLD and VA, which yielded a similar final kappa number value. A significant amount of xylans was determined by carbohydrate analysis of sisal pulp, accounting for the beneficial effects of the X treatment. In the present work we intend to gain an insight into the overall effect exerted by the joint action of xylanase and laccase, by analyzing pulp fibres and effluents properties at each stage of XLQP and LQP sequences. A comparative study of the efficiency of SLD and VA in aiding lignin removal will be also provided.

Keywords: biobleaching, hexenuronic acids, laccase, sisal, xylanase.

Acknowledgments: This work was supported by a Spanish MICINN project FUNCICEL (CTQ2009-12904) and a European Integrated Project from the Sixth Framework Program BIORENEW (NMP2-CT-2006-026456) and a MICINN FPU Research grant.

Influencia del tipo de pasta y de distintos sistemas lacasa-mediador sobre la eficacia del proceso de bioblanqueo

M.E. Eugenio^a, R. Martín-Sampedro^a, R. Moya^b, M. Hernández^b, J.C. Villar^a, M.E. Arias^b

^aINIA-CIFOR, Ctra. de la Coruña km. 7,5 C.P. 28040 Madrid

^bDepartamento de Microbiología y Parasitología. Universidad de Alcalá. 28871 Alcalá de Henares. Madrid

Actualmente, el sistema lacasa-mediador (SLM) está siendo considerado por diferentes autores como estrategia de pretratamiento a un blanqueo químico convencional, ya que se ha demostrado en algunos casos, que aumenta la eficacia del mismo sin alterar significativamente las características de las pastas blanqueadas. Sin embargo, uno de los principales problemas asociados al uso del SLM, radica en que la mayoría de las lacasas que lo constituyen no son estables a los valores de pH y temperatura que se requieren a nivel industrial. Por ello, la búsqueda de nuevas enzimas que cumplan tal requisito es una de las líneas principales de investigación en dicho campo. Paralelamente, también resulta interesante considerar el efecto que las características de la pasta de partida puedan ejercer sobre dichos tratamientos enzimáticos y por lo tanto, sobre la efectividad del blanqueo químico posterior.

En estudios recientes se ha descrito la producción de lacasas bacterianas que resisten altos valores de pH y temperatura, lo que ha abierto la posibilidad de utilizar estas enzimas junto con mediadores seleccionados en el bioblanqueo de pastas químicas. Así, en el presente trabajo se ha planteado el estudio de la eficacia de un SLM, formado por la lacasa de *Streptomyces ipomoea* CECT 3341 (SiIA) y acetosiringona como mediador, sobre una pasta kraft de eucalipto. Paralelamente, se contempló llevar a cabo un tratamiento similar usando lacasa comercial para comparar ambos sistemas. La nueva lacasa bacteriana SiIA fue clonada, sobreexpresada y caracterizada en el laboratorio, resultando su especificidad de sustrato dependiente del pH. Por otro lado y con objeto de conocer la influencia del estado inicial de las pastas de partida en la eficacia del proceso de blanqueo, los ensayos se realizaron sobre dos tipos de pastas: pastas kraft de *Eucalyptus globulus* y de *Hesperaloe funifera*, con un tratamiento de "steam explosion" previo a la cocción y pastas kraft sin dicho tratamiento (controles). Asimismo, se realizó un pretratamiento a las pastas usando un SLM formado por la lacasa comercial y acetosiringona.

Tras todos los tratamientos enzimáticos (L) realizados en el trabajo, se llevó a cabo una etapa de extracción alcalina (E) y una etapa de blanqueo con peróxido de hidrógeno (P). Las características de las pastas bioblanqueadas tras las secuencia LEP, se compararon con las correspondientes a las pastas obtenidas en los ensayos controles realizados para todos los casos.

Todos los tratamientos ensayados disminuyeron el índice kappa y aumentaron la blancura de las pastas tratadas, en comparación con sus respectivos controles, sin apreciar cambios significativos en la viscosidad. También se observó en todos los casos un ahorro de reactivos químicos. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que la lacasa comercial blanqueó más eficazmente la pasta kraft de eucalipto que la lacasa bacteriana. Sin embargo, hay que tener en cuenta que esta mejora no supondría una mayor viabilidad de uso industrial de dicha lacasa, puesto que fue realmente la bacteriana la que se aplicó en las condiciones más apropiadas para tal fin. Será necesario optimizar en estudios posteriores las condiciones de aplicación de la lacasa bacteriana para poder obtener la máxima eficacia en el bioblanqueo. Por otro lado, se observó que el pretratamiento de las pastas mediante "steam explosion" facilitó el posterior bioblanqueo, aunque de forma más acusada en la pasta de *Eucalyptus globulus*. Este hecho puede ser explicado teniendo en cuenta que *Hesperaloe funifera* es una materia prima con estructura más abierta y por tanto los efectos del pretratamiento con "steam explosion" no resultan tan significativos.

Oxidative enzymes for bleaching a non-wood pulp

Amanda Fillat, M. Blanca Roncero, Teresa Vidal

Universitat Politècnica de Catalunya, Textile and Paper Engineering Department, Colom 11, E-08222 Terrassa, Spain. Email: amanda.fillat@etp.upc.edu

The efficiency of fungal laccases in the presence of mediators to delignify different types of pulps has been demonstrated, being the laccase-mediator system (LMS) the most promising enzymatic system for environmentally friendly pulp bleaching. In order to introduce a LMS stage in a bleaching sequence of flax pulp, two different laccases were used in combination with some mediators: a non-commercial laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* (PcL) was assayed together with a synthetic mediator (violuric acid –VA-) and a natural one (syringaldehyde –SA-) and a commercial enzyme from Novozymes (*Myceliophthora thermophila* laccase- MtL-) was tested with methyl syringate (MS, a natural mediator).

This LMS stage (L) was incorporated in the following bleaching sequence: LQPo (where Q denotes a chelant stage and Po a pressurized alkaline peroxide multi-step treatment). After an acidic washing, pulps were submitted to this sequence and pulp (kappa number, viscosity and optical properties) and effluents (COD, colour, residual activity and toxicity) properties were measured after each bleaching stage. Simultaneously, hexenuronic acid content of pulp was determined to evaluate the effect of different enzymatic systems on their integrity.

The best LMS combination in terms of improvement of pulp properties was PcL+VA, resulting in a final brightness of 81% ISO and a final kappa number of 1.3 (a very significant enhancement with respect to the laccase control sequence). Although this comparative study showed that all the LMS succeeded in increasing the delignification rate compared to the controls. These results could justify an up-scaling of a biobleaching sequence of flax pulps.

Acknowledgements: This work was supported by two Spanish MICINN projects: TECHFIBER (CTQ2007-68003-C02-01) and FUNCICEL (CTQ2009-12904), a European Integrated Project from Sixth Framework Programme: BIORENEW (NMP2-CT-2006-026456) and a UPC research grant. The authors are grateful to CELESA (Tortosa, Spain) for providing the starting pulp and to INRA (Marseille, France) and Novozymes (Denmark) for kindly supplying the laccases.

¿Está implicada la lacasa le *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 en la degradación de lignina?

Raquel Moya^{1*}, José Antonio Salas², Carmen Méndez², Alba Blánquez¹, Juana Rodríguez¹, Manuel Hernández¹, M^a Enriqueta Arias¹

¹Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad de Alcalá. 28871. Alcalá de Henares. Madrid. Email: raquel.moya@uah.es

²Departamento de Biología Funcional. Área de Microbiología. C/. Julián Clavería, s/n 33006 Oviedo

Aunque las lacasas (EC 1.10.3.2) se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, la mayor parte del conocimiento existente sobre estas enzimas deriva del estudio del sistema ligninolítico de los hongos que causan la podredumbre blanca de la madera. Su función en estos microorganismos parece clara ya que, salvo raras excepciones, la producción de lacasa es una característica común entre estos organismos degradadores de la lignina.

Durante los últimos años se ha demostrado que estas enzimas, aunque en un número limitado de especies, también están presentes en bacterias tales como, *Azospirillum lipoferum*, *Marinomonas mediterranea*, *Bacillus subtilis*, *Myxococcus xanthus*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces cyaneus* y *Streptomyces ipomoea*. El estudio de la función biológica de estas lacasas bacterianas, a excepción de la lacasa de *S. cyaneus*, se ha realizado en un contexto diferente al de la degradación de la lignina y su función se ha implicado en procesos de movilidad (*Azospirillum*), esporulación (*Bacillus*), resistencia al cobre (*Myxococcus*) y dentro del género *Streptomyces*, en procesos de esporulación y morfogénesis.

En el presente trabajo se ha pretendido elucidar la posible función de la lacasa producida por la cepa *Streptomyces cyaneus* CECT 3335, tanto en su ciclo de diferenciación como en la degradación de la lignina. Para ello, se obtuvo una cepa mutante para la actividad lacasa (*S. cyaneus* LM) y posteriormente se realizó un estudio morfológico comparativo entre la cepa silvestre y la cepa mutante. Posteriormente, se ha realizado un ensayo comparativo de ambas cepas sobre su capacidad para degradar una lignina comercial (Indulin AT).

La mutagénesis del gen que codifica para la lacasa de *S. cyaneus* se llevó a cabo utilizando la técnica de disrupción génica. Para ello, se amplificó un fragmento del gen y se clonó en el vector pOJ260. La construcción final (pOJ260-scyA) se utilizó para conjugar esporas silvestres de *S. cyaneus* con la cepa *Escherichia coli* ET12567 portadora del plásmido conjugativo pUB30. Los mutantes fueron seleccionados por su resistencia al antibiótico Apramicina, conferida por el plásmido pOJ260. La ausencia de actividad lacasa se comprobó mediante el cultivo de las cepas mutante y silvestre en el medio Soja-Manitol utilizando 2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico] (ABTS) como sustrato de la enzima. Los resultados obtenidos mostraron que la cepa mutante no produjo lacasa en medio sólido ni en cultivo sumergido. Además, para comprobar la presencia de la mutación a nivel molecular se realizó una hibridación con el ADN cromosómico de la cepa mutante mediante la técnica de Southern Blot, empleando como sonda la construcción génica utilizada en los experimentos de conjugación. Así, en el ADN cromosómico de la cepa mutante se pudo detectar el gen en una banda con un tamaño de aproximadamente 8 kb a diferencia de la cepa silvestre (2,3 kb), indicando la inserción de la construcción en el ADN cromosómico mediante sobrecruzamiento sencillo.

Una vez obtenida la cepa mutante, se realizó un estudio morfológico, al microscopio óptico y al microscopio electrónico de barrido, a lo largo del ciclo de desarrollo de las cepas silvestre y mutante. Las observaciones realizadas pusieron de manifiesto que no existen diferencias significativas en el desarrollo micelial ni en el proceso de esporulación de las mismas, observándose únicamente ausencia de color en la esporas de la cepa mutante. Por último, el ensayo de degradación de la lignina Indulin AT, en medio mínimo suplementado con glicerol y sulfato amónico, demostró que la cepa silvestre produce una mayor degradación de la lignina

polimérica, en comparación con la cepa carente de la actividad lacasa. Aunque estos resultados son preliminares, apuntan a que la lacasa de *S. cyaneus*, a semejanza de lo que ocurre con las lacasas fúngicas, tiene un papel relevante en la degradación de lignina.

Directed Evolution of a high-redox potential laccase in *Saccharomyces cerevisiae*: improving functional expression, thermostability and kinetic properties

Diana Maté^{1*}, Eva García-Ruiz^{1,2}, Mohammad Moshtaghioun¹, Susana Camarero², Miguel Alcalde¹

¹Department of Biocatalysis, Institute of Catalysis, CSIC, Cantoblanco, 28049, Madrid, Spain.

²Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, 28040, Madrid, Spain.

Corresponding author: malcalde@icp.csic.es; malcalde@cheme.caltech.edu

Laccase (EC 1.10.3.2) is a multicopper oxidase which catalyses the oxidation of various aromatic and some inorganic compounds with the concomitant reduction of dioxygen to water. Laccases can find dozens of biotechnological applications due to their natural promiscuity towards different substrates along with their ability to oxidize redox mediators. For this reason, this enzyme is of great interest in many fields of research, such as green biodegradation of xenobiotics and development of oxygen cathodes in biofuel cells (1, 2). Unfortunately basidiomycete laccases (those with the highest redox potentials and therefore with better oxidative capabilities) are difficult to express in *Saccharomyces cerevisiae*, an important requisite for directed laccase evolution.

This work describes the laboratory evolution of the high redox potential laccase PM1 (3) in *S. cerevisiae* for enhancing the laccase total activity and thermostability. After replacing the native signal sequence with the α -factor prepro-leader to regulate heterologous protein trafficking, the fusion protein was subjected to eight rounds of directed evolution in combination with rational approaches. Over 50,000 clones were explored in eight rounds of directed evolution and site directed mutagenesis culminating in the selection of the OB-1 mutant, with a total activity improvement (TAI) over α -PM1 of 34,000-fold (4, 5). This final variant is readily exportable in soluble, active and stable forms, and it constitutes a valuable starting point for further laboratory evolution experiments to tailor custom-made HRPLs with desired properties.

References:

1. Gianfreda, L., Xu, F. and Bollag, J. M. (1999) *Bioremediation J.* 3: 1-25.
2. Kunamneni, A., Camarero, S., García-Burgos, C., Plou, F. J., Ballesteros, A., and Alcalde, M. (2008) *Microb. Cell Fact.* 7: 32.
3. Coll, P.M., Fernández-Abalos, J.M., Villanueva, J. R., Santamaría, R., and Pérez, P. (1993) *Applied and Environmental Microbiology.* 59: 2607-2613.
4. Maté, D., García-Burgos, C., García-Ruiz, E., Ballesteros, A. O., Camarero, S. and Alcalde, M. (2010) *Chemistry and Biology*, 17: 1030-1041.
5. García, E., Maté, D., Ballesteros, A., Martínez, A. T. and Alcalde, M. (2010) *Microb. Cell Fact.* 9: 17.

Caracterización de actividades glicolíticas de levaduras no-*Saccharomyces* aisladas de mosto bobal

Sergi Maicas Prieto*, Almudena Nieto Soria, José Juan Mateo Tolosa

Department de Microbiologia i Ecologia. Universitat de València. Dr. Moliner 50, E-46100 Burjassot (València). Email: sergi.maicas@valencia.edu

Se aislaron levaduras no-*Saccharomyces* a partir de uva de la variedad Bobal, se identificaron en función de sus características fisiológicas y moleculares, y fueron asignadas a un género fúngico (*Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Pichia* o *Torulaspora*).

En una segunda fase, se realizaron ensayos sobre estos aislados para determinar la presencia de actividades β -glucosidasa, β -xilosidasa, α -arabinosidasa y α -ramnosidasa. Como resultado de estos ensayos se escogieron cinco cepas con elevada potencialidad enzimática.

Se observó que todas las actividades enzimáticas se inducían por la presencia de glicósidos como única fuente de carbón en el medio. Este aspecto parece ser una característica intrínseca de la levadura aislada.

Así mismo, y con posterioridad, se caracterizaron diferentes parámetros de interés enológico, como son el pH, las cantidades de etanol presentes en el medio, la temperatura del ensayo o la presencia de agentes quelantes y otros inhibidores de actividad

Identificación y caracterización de un sistema de dos componentes de *Streptomyces coelicolor* que regula la síntesis de proteínas extracelulares y dispara la “stringent response”

Daniel Rozas*, Sonia Gullón y Rafael P. Mellado

Centro Nacional de Biotecnología (CSIC). c/ Darwin 3. Campus de la Universidad Autónoma. Cantoblanco. 28049 Madrid. Spain. E-mail: drozas@cnb.csic.es.

El sistema de dos componentes DegS-DegU de *Bacillus subtilis* regula de forma positiva la producción de proteínas hidrolíticas extracelulares y de algunos genes relacionados con la producción de sustancias biocidas, típicas del metabolismo secundario bacteriano. [1-2]

Este sistema de dos componentes ha sido recientemente denominado, junto a Spo0A y ComA como uno de los tres reguladores principales en *B. subtilis*, los cuales determinan el desarrollo morfológico y metabólico en dependencia de las condiciones reinantes en el entorno [3].

Streptomyces coelicolor es una bacteria del suelo, Gram positiva y eficiente secretora como *B. subtilis*, cuyo genoma tiene un alto contenido en G+C, que, como *B. subtilis*, es ampliamente utilizada para la producción industrial de enzimas degradativas extracelulares y metabolitos con actividad biocida de interés y aplicación industrial.

Se ha identificado en *S. coelicolor* el sistema de dos componentes, SCO5784-SCO5785, con aparente similitud con el sistema DegS-DegU.

Mediante análisis transcripcionales con micromatrices de ADN de genoma completo y PCR cuantitativa en tiempo real, además de análisis proteómico diferencial del secretoma de estirpes sobreproductoras y deficientes en el regulador SCO5785, nos ha permitido inferir que este sistema regula la expresión de proteínas extracelulares, incluyendo la proteasa extracelular mayoritaria, así como interviene en los procesos de producción de antibióticos y de compuestos del metabolismo secundario.

Como contrapunto funcional, se ha observado una implicación del regulador SCO5785 en la parada del metabolismo primario, siguiendo el patrón de la llamada “stringent response” producida ante estados de carestía nutricional y más concretamente ante la falta de aminoácidos para la síntesis proteica [4]. Esto produce una disminución en la síntesis de la maquinaria ribosomal, así como la represión de rutas centrales del metabolismo de crecimiento activo.

Todo ello parece indicar que la función de este sistema se basa en la preparación de la colonia para afrontar estados de escasez, modificando el metabolismo de la bacteria desde un ámbito de crecimiento activo debido a la abundancia nutricional, hasta un situación de escasez donde se hace necesario la degradación de nuevos compuestos que aporten la energía necesaria para la consecución del desarrollo de esporas, como último paso en el desarrollo morfológico de *S. coelicolor*.

El sistema SCO5784-SCO5785 se perfila como un regulador central en las etapas de desarrollo morfológico y metabólico en *S. coelicolor*.

Referencias:

1. Ogura, M., et al., DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* DegU, ComA and PhoP regulons: an approach to comprehensive analysis of *B. subtilis* two-component regulatory systems. Nucleic Acids Res, 2001. 29(18): p. 3804-13.
2. Mader, U., et al., *Bacillus subtilis* functional genomics: genome-wide analysis of the DegS-DegU regulon by transcriptomics and proteomics. Mol Genet Genomics, 2002. 268(4): p. 455-67.

3. Lopez, D. and R. Kolter, *Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in Bacillus subtilis*. FEMS Microbiol Rev, 2010. 34(2): p. 134-49.
4. Hesketh, A., et al., *The global role of ppGpp synthesis in morphological differentiation and antibiotic production in Streptomyces coelicolor A3(2)*. Genome Biol, 2007. 8(8): p. R161.

La deficiencia en la translocación de proteínas extracelulares en *Streptomyces lividans* afecta negativamente a la esporulación

Sonia Gullón Blanco*, Carmen Palomino del Castillo, Rafael Pérez Mellado

Centro Nacional de Biotecnología (CSIC). C/ Darwin 3. Campus de la Universidad Autónoma. Cantoblanco. 28049 Madrid. Email: sgullon@cnb.csic.es

Streptomyces lividans es una bacteria del suelo Gram positiva que produce y secreta una gran cantidad de proteínas extracelulares y además presenta la ventaja de tener una baja actividad en la restricción de ADN. Estas características han hecho que *S. lividans* sea un buen candidato para la producción de proteínas homólogas y heterólogas a nivel industrial. Sin embargo, es necesario caracterizar las respuestas celulares a distintas condiciones de estrés en microorganismos industriales para tratar de conseguir o bien mejorar la producción de esas proteínas.

Se ha caracterizado la respuesta al estrés celular en *S. lividans* por deficiencia en la translocación de proteínas extracelulares bien por alteración del translocón o por deficiencia en el procesado del péptido líder de proteínas extracelulares.

Se han utilizado dos estirpes, *S. lividans* Y62 que presenta una mutación en *sipY* que codifica para la peptidasa señal mayoritaria necesaria la eliminación del péptido líder (Escutia y col., 2006 y Palacín y col., 2002), y *S. lividans* Δ secG (Palomino y col., 2008) deficiente en la proteína SecG que forma parte del complejo de translocación. Ambas estirpes presentan una disminución de la secreción de proteínas extracelulares, así como una deficiencia en la esporulación.

Los análisis transcripcionales utilizando tanto micromatrices de genoma completo como RT-PCR en tiempo real, así como el análisis proteómico utilizando espectrometría de masas en tandem (LC-ESI-MS/MS) de ambas estirpes, revelan un grupo de genes cuya expresión se encuentra afectada en ambos casos que están relacionados con la cascada “bald”, a su vez implicada en la regulación de la esporulación en *Streptomyces* (Chater 2001). Análisis adicionales han permitido determinar que las deficiencias en la esporulación son resultado en ambas estirpes de la disminución de la expresión de los genes *bldG*, *bldN* y *bldM*.

La mayoría de los genes regulados de la misma manera en ambas estirpes se han podido relacionar directa o indirectamente con la cascada “bald”, sugiriendo la implicación de esta cascada en la respuesta celular a las deficiencias relativas en la secreción de proteínas extracelulares de ambas estirpes mutantes.

Bibliografía:

1. Escutia M.R., Val G., Palacín A., Geukens N., Anné J., Mellado R.P. (2006). Compensatory effect of the minor *Streptomyces lividans* type I signal peptidases on the SipY major signal peptidase deficiency as determined by extracellular proteome analysis. *Proteomics* 6: 4137-4146
2. Palacín A., Parro V., Geukens N., Anné J., Mellado R.P. (2002). SipY is the *Streptomyces lividans* type I signal peptidase exerting a major effect on protein secretion. *J. Bacteriology* 184: 4875-4880
3. Palomino C., Mellado R.P. (2008) Influence of a *Streptomyces lividans* SecG functional analogue on protein secretion. *International Microbiology* 11: 25-31
4. Chater, KF (2001) Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex? *Curr Opin Microbiol* 4: 667-673.

LysA2, la Lisina del bacteriófago A2 de *Lactobacillus casei* es una endopeptidasa activa sobre un amplio espectro de bacterias lácticas

Pedro Ribelles*, Isabel Rodríguez, Juan E. Suárez

Area de Microbiología, / Instituto Universitario de Biotecnología, Universidad de Oviedo.
Facultad de Medicina, Julián Clavería 6, 33006 Oviedo. Email: ce81pr@hotmail.com

Las bacterias del ácido láctico (BAL) son cocos y bacilos Gram positivos que se caracterizan por tener un metabolismo estrictamente fermentativo de los glúcidos, produciendo mayoritariamente dicho ácido como producto final. Resultan ser esenciales para la industria de fermentación alimentaria, especialmente para la de transformación de productos lácteos. Los bacteriófagos son el principal problema de la industria porque retrasan o incluso detienen la fermentación debido a la lisis de las BAL usadas como iniciadores. Esto ha estimulado el interés por el estudio de los fagos de las BAL. Ahora bien, el uso controlado de los fagos y de sus lisinas podría ser beneficioso, ya que podría inducir la lisis de los iniciadores en el requesón y la liberación de las enzimas intracelulares, acelerándose así la maduración del queso. Como un paso necesario para probar esta hipótesis se clonó y expresó el gen de la lisina (*lysA2*) del bacteriófago A2 de *Lactobacillus casei* en *Escherichia coli*. La enzima purificada hidrolizó específicamente el peptidoglicano de las BAL que presentan ácido aspártico como puente entre las cadenas adyacentes de los tetrapéptidos (peptidoglicano de tipo A4 α). Entre ellas están la mayoría de los lactobacilos, *Lactococcus lactis* y *Pediococcus pentosaceus*. Este rango de actividad es mucho más amplio que el del fago A2, que solo infecta a *L. casei*. LysA2 se une específicamente a la pared de sus bacterias diana y no lo hace a las paredes de aquellas que no son sustrato del enzima, como se observó mediante su fusión a la proteína verde fluorescente (GFP). LysA2 mostró ser una endopeptidasa que hidroliza el enlace entre la D-Alanina terminal de uno de los tetrapéptidos de la pared celular y el ácido aspártico puente. Esto provoca la pérdida de viabilidad y la lisis de los cultivos sensibles (10^{-3} en 50 min en condiciones estándar). La enzima presenta actividad óptima entre 25 y 43°C, un rango de pH de entre 4,5 y 6 y una gran resistencia a la incubación a pHs extremos; su actividad no depende de la presencia de cationes divalentes y actúa como un monómero. Todas estas propiedades concuerdan con las esperables en un enzima extracelular destinado a hidrolizar la pared de una bacteria que vive en un ambiente ácido y la hacen muy apropiada para su uso en ensayos de maduración acelerada de alimentos fermentados.

Represión de la actividad lisina oxidasa de *Marinomonas mediterranea* por L-tirosina

Luisa R. Molina-Quintero*, Patricia Lucas-Elío, Antonio Sanchez-Amat

Departamento de Genética y Microbiología, Universidad de Murcia. 30100.

Email: luisaraquel.molina@um.es

M. mediterranea es una bacteria Gram-negativa, marina y melanogénica que expresa diferentes actividades oxidasa de interés biotecnológico. Así, posee todas las polifenol oxidasa (PPO) conocidas, ya que expresa dos cuproproteínas diferentes. La primera, conocida como PpoA, es una lacasa de membrana y la segunda, PpoB, es una tirosinasa implicada en la síntesis de melaninas. *M. mediterranea* también sintetiza una proteína (LodA) con actividad L-lisina- ϵ -oxidasa (LOD) (EC 1.4.3.20). La oxidación catalizada por LodA es la siguiente:



Por lo tanto, LodA oxida la L-lisina en posición épsilon y genera peróxido de hidrógeno, lo que le confiere propiedades antimicrobianas (2). LodA está codificada en un operón junto a un segundo gen, denominado *lodB*, de función desconocida pero que es necesario para su expresión (3).

El estudio de la regulación de la expresión del operón *lodAB* puede ofrecer información sobre su relevancia fisiológica. Resultados obtenidos recientemente por nuestro grupo revelan que la actividad LOD es inducida a nivel post-transcripcional, tanto en presencia de L-lisina como por dos compuestos de estructura similar como son la L-arginina y el ácido diaminopimélico (DAP), siendo estos dos últimos de gran interés, puesto que a diferencia de la L-Lys, no son sustratos de LOD (4). Por otra parte, se observó que la actividad LOD es mayor en medios de cultivo químicamente definidos que en medios complejos, lo que indica que en estos últimos podrían existir compuestos represores de dicha actividad. Los resultados presentados en este trabajo muestran que en presencia del aminoácido L-tirosina la actividad LOD disminuye, mientras que las actividades PPO no están afectadas. La detección de los niveles proteicos mediante Western blot reveló que la disminución en la actividad LOD se debe a un descenso de los niveles de la proteína LodA.

Un estudio más detallado del tipo de regulación que ejerce la L-tirosina, mediante el uso de fusiones transcripcionales con el gen *lacZ*, mostró que la represión de la actividad LOD en medios de cultivo con L-tirosina se ejerce a nivel transcripcional. Por el contrario la expresión del promotor *PppoB* no se ve afectada en las mismas condiciones, indicando que la L-tirosina podría intervenir de manera específica en la regulación de L-lisina- ϵ -oxidasa disminuyendo su síntesis y por tanto la actividad enzimática LOD.

Referencias:

1. Gómez, D., P. Lucas-Elío, A. Sanchez-Amat and F. Solano. 2006. Biochim Biophys Acta. 1764:1577-1585.
2. Lucas-Elío, P., D. Gómez, F. Solano and A. Sanchez-Amat. 2006. J. Bacteriol. 188: 2493-2501.
3. Gómez, D., P. Lucas-Elío, F. Solano and A. Sanchez-Amat. 2010. Mol. Microbiol. 75: 462-463.
4. Molina-Quintero, L., P. Lucas-Elío and A. Sanchez-Amat. 2010. Appl. Environ. Microbiol. 76:6141-6149.

Validación de la función de ArgR en *Streptomyces coelicolor*

A. Botas-Muñoz^{*2}, R. Pérez-Redondo², A. Rodríguez-García^{1,2}, C. Sanmillán-Blanco², P. Liras^{1,2}

¹Área de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad de León. Campus de Vegazana s/n, 24071 León.

²Instituto de Biotecnología de León INBIOTEC. Avda. Real 1, 24006 León.

Email: * ambotm@unileon.es

Este trabajo se inició en nuestro laboratorio para conocer la función reguladora de la proteína ArgR en la expresión génica de *S. coelicolor*. Para ello, se construyó el mutante *S. coelicolor* $\Delta argR$ y se realizaron experimentos de transcriptómica. Se vio que en *S. coelicolor* $\Delta argR$ afecta al metabolismo de arginina, de aminoácidos, de pirimidinas, del nitrógeno y a la biosíntesis de metabolitos secundarios.

Estos resultados de micromatrices requieren validación experimental, lo que se abordó mediante 3 técnicas experimentales distintas: RT-PCR, expresión de un promotor acoplado a un gen testigo y EMSA.

En primer lugar se corroboró la expresión diferencial entre las cepas silvestre y mutante de diecinueve genes mediante RT-PCR. Para cada uno de los genes estudiados se diseñó una pareja de oligonucleótidos específicos que usó como molde RNA de *S. coelicolor* $\Delta argR$ y *S. coelicolor* M145, aislado de medio líquido MG y MG con L-arginina. En todos los casos se realizaron los controles negativos que permitiesen asegurar que la amplificación observada era debida a RNA mensajero y no a trazas de DNA total. Para un análisis semi-cuantitativo y evitar la comparación de señales saturadas, se realizaron ensayos con distinto número de ciclos de amplificación en la PCR.

Ya que disponemos de una cepa carente de *argR*, *S. coelicolor* $\Delta argR$, y de la cepa silvestre, *S. coelicolor* M145, podemos medir y comparar *in vivo* el efecto de ArgR utilizando un sistema de gen testigo. Doce promotores en estudio se acoplaron a los genes *luxAB* de *Vibrio harveyi* y a través de un plásmido integrativo, pLUXAR-neo, las construcciones se integraron en los cromosomas de ambas cepas de *Streptomyces*. Se realizó una fermentación en medio MG con y sin adición de L-arginina, tomando muestras a distintos tiempos, de las cuales se midió su luminiscencia en un luminómetro Luminoskan.

Por último, los ensayos de retraso se realizaron con la proteína ArgR. Para ello se clonó en un vector inducible por IPTG y se introdujo en una cepa de expresión. Tras la inducción se purificó dicha proteína por columna de afinidad. Mediante EMSA se observó a qué promotores se une ArgR y, por tanto, sobre qué genes ejerce una regulación directa.

En este trabajo se muestra que la proteína ArgR controla directamente la transcripción de los genes de biosíntesis de arginina *argH*, *argC*, *argG* y *arcB*; de un gen de biosíntesis de leucina codificado por *leuA* y del gen de función desconocida SCO1086. Sin embargo, la expresión de *nrdA*, *pyrA*, *pyrB* y *pyrR* del metabolismo de pirimidinas, *amtB* del metabolismo del nitrógeno, *hisD* y *pyk1* del metabolismo primario, y *whiB* del metabolismo secundario, aunque es dependiente de ArgR, podría estar mediada por algún otro factor, ya que no hemos podido detectar interacción entre la proteína ArgR y los promotores de los genes citados.

Métodos de inmovilización de lacasa de *Myceliophthora thermophila*

M. Fernández-Fernández*, M.A. Sanromán, D. Moldes

Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Vigo. Campus Lagoas Marcosende. 36310 Vigo. Teléfono: +34 986 812 304 Fax: +34 986 812 380 Email: mariafdez@uvigo.es

El objetivo principal del presente trabajo es la evaluación de diversas técnicas de inmovilización de lacasa de *Myceliophthora thermophila* (Novozym 51003) con objeto de incrementar su estabilidad y selectividad para su aplicación en procesos industriales ⁽¹⁾.

Inicialmente, se desarrolló la técnica de inmovilización por atrapamiento en diversos geles de alginato (calcio, zinc y cobre) ⁽²⁾. Los resultados demostraron que alrededor del 98% de la proteína fue inmovilizada, independientemente del porcentaje de alginato empleado (4 o 6%), alcanzando los mayores niveles de actividad para las bolas de zinc-alginato. El análisis del comportamiento de las biopartículas a lo largo del tiempo revelan que existe una pérdida de actividad en todas las bolitas asociada a la inactivación del enzima y principalmente a la liberación de proteína al medio. Cabe destacar los resultados obtenidos al emplear la matriz zinc-alginato, ya que con esta matriz se logra los mayores niveles de actividad así como de pérdida de actividad a lo largo del tiempo.

Tras los resultados obtenidos, se procedió a aplicar la técnica de inmovilización de forma covalente en soportes de sílica ⁽³⁾, con objeto de mejorar los resultados obtenidos mediante la técnica de atrapamiento en gel. Para estos experimentos se utilizó el soporte comercial CPC-silica (Carrier Silane Coated) y se evaluaron diversas variables del procesos como la concentración de glutaraldehído y la relación proteína/soporte utilizadas en la inmovilización.

En el rango de concentraciones de glutaraldehído ensayadas (0,5, 1, 5 y 10%) no se detecta variaciones en la cantidad de enzima retenida, sin embargo si se observa una elevada influencia según la relación proteína/soporte empleada. Así, los mayores valores de proteína inmovilizada (87%) y actividad teórica inmovilizada (74%) en el soporte se obtuvieron con un bajo ratio proteína/soporte. En todos los casos no se alcanzó la actividad teórica y sólo se alcanzó alrededor de un 4% de la actividad real. Este hecho puede deberse a que la lacasa comercial utilizada no es pura, por lo que otras proteínas inmovilizadas estarían afectando a la actividad de la misma. Estos resultados de actividad real inmovilizada coinciden con los reflejados en la bibliografía ⁽⁴⁾.

Por último, se realizó un estudio comparativo de la estabilidad de la lacasa a distintas temperaturas y condiciones de pH. Con respecto a la termoestabilidad, se observó que la lacasa libre es más estable que la lacasa inmovilizada. No obstante, la estabilidad de la lacasa inmovilizada frente a pH ácidos es mayor que la lacasa libre, aunque esta relación cambia en cuanto el pH se hace más básico, donde la lacasa libre presenta una mayor estabilidad. Estos resultados nos llevan a concluir que con las tecnologías de inmovilización ensayadas no se ha logrado la mejora en la estabilidad de la lacasa una vez inmovilizada como se esperaba.

Referencias:

1. Durán N., Rosa M., D'Annibale A., Gianfreda L. *Enzyme and Microbial Technology* 31, 907-931 (2002)
2. Phetsom, J. et al. *Journal of Biological Sciences* 9, 573-583 (2009)
3. Cabana, H. et al. *Bioresource Technology* 100, 3447-3458 (2009)
4. Champagne P, Ramsay J. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77, 819-823 (2007)

Agradecimientos: María Fernández y Diego Moldes agradecen a la Xunta de Galicia la financiación de sus contratos María Barbeito e Isidro Parga Pondal respectivamente. El trabajo presentado se ha financiado con los proyectos CTQ2009-13651 y HP2008-0022 del Ministerio de Ciencia e Innovación y 09TMT012E de la Xunta de Galicia.

Modelización *in silico* y activación *in vitro* de la proteasa *Epr* de *Bacillus licheniformis* expresada en *Escherichia coli* BL21(DE3)

José Manuel Ageitos*, José Luis Rodríguez-Rama, Lucia Feijoo-Siota, Juan Andrés Vallejo, Tomás G. Villa

Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela. Campus Vida. 15782 Santiago de Compostela.

Email: josemanuel.ageitos@usc.es

La proteasa *Epr* de *Bacillus licheniformis* es una proteinasa extracelular que tiene un papel en la motilidad y el diferenciamiento celular. Esta proteasa está descrita como la causante de la actividad coagulante de la leche de la cepa USC13. La proteasa menor extracelular *Epr* se expresa en forma de prepropeptido, con un péptido señal Sec (PS) que comprende la secuencia aminoacídica 1-27. La pre*Epr* presenta un propeptido (28-103 aa.) que cumple una función inhibitoria I9 (24-95 aa.) y una función de ayuda al plegado. La región catalítica mínima se extiende entre los aminoácidos 104-383. La región C-terminal 384-591 está implicada y es imprescindible en el fenómeno de movimiento agregado conjunto en *B. subtilis*. El dominio inhibitorio facilita el plegado de la proteasa e impide su funcionamiento en el interior de la célula. A través de la modelización informática de la secuencia aminoacídica de la proteasa *Epr* se ha llegado a un sistema de activación y plegado *in vitro* basándose en la homología encontrada con la tk-subilisina 2e1p de *Thermococcus kodakarensis*. Esta proteasa, al igual que la *Epr* necesita calcio para su plegado y posterior autoprocesado hasta una forma activa. A partir de los datos obtenidos se ha desarrollado un protocolo para la renaturalización a partir de cuerpos de inclusión de la proteasa expresada en *Escherichia coli* y su posterior activación.

Bibliografía:

1. Ageitos J, Vallejo J, Sestelo A, Poza, M and Villa, TG (2007), Purification and characterization of a milk-clotting protease from *Bacillus licheniformis* strain USC13. J Appl Microbiol, 103: 2205–2213
2. Li Y, Hu Z, Jordan F, Inouye M (1995) Functional analysis of the propeptide of subtilisin E as an intramolecular chaperone for protein folding. Refolding and inhibitory abilities of propeptide mutants. J Biol Chem. 270:25127-25132.
3. Pulido M, Saito K, Tanaka S, Koga Y, Morikawa M, Takano K, Kanaya S (2006) Ca²⁺-Dependent Maturation of Subtilisin from a Hyperthermophilic Archaeon, *Thermococcus kodakaraensis*: the Propeptide Is a Potent Inhibitor of the Mature Domain but Is Not Required for Its Folding. Appl Environ Microbiol 72: 4154-4162

Búsqueda de nuevas glicosidasas. Caracterización de una nueva β -fucosidasa de *Cellulomonas gelida*

Carlos Bayón Sánchez^{a,b,*}, Javier Tomé Alcalde^a, María José Hernáiz Gómez-Dégano^{a,b}, José Vicente Sinisterra Gago^a

^aServicio de Biotransformaciones Industriales. Parque Científico de Madrid. C/ Santiago Grisolia 2. PTM. 28760 Tres Cantos. Madrid.

^bGrupo de Biotransformaciones. Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica. Facultad Email: c.bayon@farm.ucm.es

Los oligosacáridos y glicoconjugados presentes en la superficie celular juegan un importante papel en los procesos de reconocimiento biológico¹. Para obtener estas biomoléculas se han utilizado diversas metodologías. Entre ellas la síntesis catalizada por glicosidasas que permiten controlar la regio- y estereoselectividad, y evitar los numerosos pasos sintéticos de la química de carbohidratos^{2,3}. Esto permite realizar un proceso mas sostenible de síntesis⁴.

Las glicosidasas, EC 3.2, son un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace glicosídico en el catabolismo de hidratos de carbono. Estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido aislados de microorganismos, plantas y animales. Las glicosidasas microbianas han recibido una atención especial debido a sus aplicaciones industriales y a su gran accesibilidad⁵.

Se llevó a cabo una búsqueda selectiva de microorganismos productores de glicosidasas partiendo de la colección de bacterias del Parque Científico de Madrid. Se probaron diferentes sustratos para la detección de la actividad: galactosa, galactosamina, glucosa, fucosa, manosa y derivados. Se encontraron diversas cepas que contienen actividades de interés. Entre las más importantes: β -fucosidasa, β -galactosidasa, α -glucosidasa y β -glucosaminidasa

Se descubrió una nueva β -fucosidasa en la bacteria celulolítica *Cellulomonas gelida*. Los valores de su K_m y V_{max} se determinaron midiendo la liberación de 4-nitrofenol en la reacción con 4-nitrofenil- β -D-fucopiranosido. Se establecieron las condiciones óptimas de pH y temperatura de la reacción, así como la termoestabilidad de la enzima en el tiempo. Se utilizaron diferentes disacáridos para provocar la inducción de la enzima y aumentar su producción: celobiosa, lactosa, maltosa, melibiosa y sacarosa.

Se ha puesto a punto un protocolo de purificación mediante precipitación con sulfato amónico, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión molecular. Su peso molecular fue calculado mediante electroforesis de proteínas y la reacción con 4-metilumbiferil- β -D-fucopiranosido.

Referencias:

1. Varki A.. *Glycobiology* 1993, 3, 97.
2. Bertozzi C. R.. Kiessling L.L.. *Science* 2001, 291, 2357.
3. Trincone A., Giordano A. *Curr. Org. Synthe.* 2006, 10, 1163-1193
4. Sinisterra J.V., Muñoz Siles, J. Linhardt R. J., Gabius H. J.; Sabine, A *Green Chemistry* 11(3), 373-379 (2009)
5. Daines, A. M., Maltman, B. A., Flitsch, S. L. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2004. 8, 106-113

Clonación y expresión heteróloga en *Escherichia coli* de un nuevo gen que codifica una enzima con actividad licopeno β -ciclase

José Araya Garay, Lucía Blasco Otero, Sara Tomé García, Patricia Veiga Crespo, Tomás González Villa

Universidad de Santiago de Compostela, Departamento de Microbiología y Parasitología
Avenida de las Ciencias s/n. Campus Sur. 15782 Santiago de Compostela.

Email: josemiquel.araya@rai.usc.es

Los carotenoides son pigmentos ampliamente distribuidos en la naturaleza, pueden ser biosintetizados por plantas superiores, algas, hongos y bacterias. En las plantas los carotenoides determinan la coloración de frutos, flores, etc., y son parte indispensable del aparato fotosintético, actuando como transportadores de oxígeno en la célula vegetal y absorbiendo y transmitiendo a la clorofila la energía procedente de determinadas radiaciones luminosas. Además, presentan funciones y acciones biológicas, como la actividad de pro vitamina A y una disminución del riesgo de enfermedades degenerativas tales como cáncer, enfermedad cardiovascular y degeneración macular.

La ruta de biosíntesis de carotenoides es un sistema metabólico secundario enorme y complejo. La reacción inicial de la ruta de biosíntesis es la condensación de dos moléculas de GGPP para el formar fitoeno, esta reacción es catalizada por la enzima fitoeno sintetasa. Cuatro reacciones de desaturaciones y/o isomerización convierten al fitoeno en licopeno vía fitoflueno, ζ -caroteno y neurosporeno.

La ruta de biosíntesis de carotenoides en plantas superiores se bifurca en la ciclación del licopeno y es un paso clave en la síntesis y regulación de la composición de carotenoides en plantas. Dependiendo del tipo de ciclación que sufran los extremos de la molécula de licopeno lineal, pueden producirse dos tipos de anillos, ϵ - ó β -, ambos originados por dos diferentes enzimas bajo el control de dos diferentes genes. En plantas superiores se han identificado dos tipos: β -LCY, que cataliza la formación de anillos β - y ϵ -LCY que introduce anillos ϵ -. La enzima β -LCY puede actuar secuencialmente sobre ambos extremos de la molécula de licopeno dando lugar al β -caroteno como producto final y γ -caroteno como intermediario. Sin embargo, ϵ -LCY únicamente puede introducir un anillo en uno de los dos extremos de la molécula de licopeno, originándose δ -caroteno. La actuación de β -LCY sobre el extremo lineal del δ -caroteno da lugar al α -caroteno.

En este estudio, se utilizó RT-PCR y RACE-PCR para aislar y clonar el cDNA completo de un nuevo gen con actividad β -LCY, denominado Fc-Lcy β de *Ficus carica* (Higuera), el cual presentó un marco de lectura abierto de 1488 pb que codifica un polipéptido de 496 aminoácidos.

Para el análisis de la actividad licopeno ciclase de la proteína se realizaron ensayos de complementación de color. Este tipo de ensayos, utilizados con éxito en otros trabajos, se basa en las diferencias de coloración entre los distintos carotenoides, así el licopeno (sustrato de las LCYs) es rojo mientras que el β -caroteno (producto de la β -LCY) es amarillo-naranja. Para llevar a cabo estos ensayos se transformó la cepa BL21(DE3) de *E. coli* con el plásmido pACCRT-EIB (cedido amablemente por el Dr. Misawa), generando una cepa productora de licopeno que se denominó BL-pACC. Las colonias de la cepa de *E. coli* BL-pACC presentaron, tras la incubación, coloración rojiza debido a la acumulación de licopeno. La cepa BL-pACC transformada con el plásmido pET21-lcy β portador de la región codificante correspondiente al gen licopeno β -ciclase de *Ficus carica* (Fc-Lcy β), presentó colonias de coloración amarillo-anaranjada. El cambio de color de las colonias de *E. coli* BL-pACC portadora del plásmidos pET21-lcy β indicó conversión de licopeno a otros carotenoides. La identificación y cuantifica-

EIB-P15

ción de los carotenoides individuales se realizó por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detector de fotodiodos (HPLC-PDA) y por LC MS. El análisis de la composición de los carotenoides presentes en el cultivo de BL-pACC portadores del plásmido *pET21-lcy β* , reveló la existencia de un carotenoide único, cuyo espectro de absorción y tiempo de retención coincidieron con los del estándar del β -caroteno. Estos resultados indican que la enzima codificada por el gen *FcLyc- β* actúa sobre el licopeno, ciclando ambos extremos de la molécula en anillos β - dando lugar al β -caroteno. La actividad β -LCY, evaluada como porcentaje de conversión de licopeno a β -caroteno presentó valores entre el 80% y el 90%, y no se detectó γ -caroteno en ninguno de los análisis.

Estudio metagenómico de actividades enzimáticas hidrolíticas en una salina solar

Ana B. Fernández¹, Lejla Pašić^{2,3}, Rohit Ghai², Ana-Belén Martín-Cuadrado², Cristina Sánchez-Porro, Antonio Ventosa^{1*}, Francisco Rodríguez-Valera²

¹Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, 41012 Sevilla, España. Email: ventosa@us.es

²Grupo de Genómica Evolutiva, División de Microbiología, Universidad Miguel Hernández, 03550 Alicante, España

³Department of Biology, University of Ljubljana, Večna pot 111, 1000 Ljubljana, Slovenia

En los ambientes hipersalinos existe una diversidad de microorganismos halófilos pertenecientes tanto a las arqueas como bacterias que han sido objeto de numerosos estudios con la finalidad de determinar, entre otros, su biodiversidad, actividades metabólicas y aplicaciones en diversos procesos biotecnológicos. Los estudios realizados en salinas, lagos hipersalinos, suelos salinos y otros ambientes y productos salinos han permitido el aislamiento y caracterización taxonómica de muchas nuevas especies, que constituyen un excelente material biológico para estudios posteriores en este grupo de microorganismos. De hecho mucho de estos microorganismo son productores de compuestos de interés industrial, tales como solutos compatibles, polímeros o enzimas extracelulares. Al igual que otros microorganismos extremófilos, los microorganismo halófilos son capaces de crecer en condiciones extremas, en este caso de salinidad de manera que las enzimas extracelulares producidas por los mismos poseen actividad no solo en un amplio rango de NaCl sino también, en muchos casos, de temperatura y valores de pH. Así se han estudios en detalles diversas bacterias y arqueas productoras de enzimas extracelulares.

Se estima que en la mayoría de ambientes tan solo se aísla en condiciones de cultivo de laboratorio una mínima proporción de la microbiota (entre 0,1 y 1% del total). Así pues, las técnicas clásicas de aislamiento de microorganismos productores de enzimas en cultivos puros permiten el análisis de solo un subconjunto del total de la microbiota de la muestra ambiental.

El objetivo del presente estudio es determinar las actividades hidrolíticas de la comunidad microbiana a nivel genómico de la columna de agua de una salina solar marina localizada en la provincia de Alicante. Una salina consiste de una serie de estanques poco profundos unidos entre sí de manera que el agua del mar va gradualmente concentrándose hasta precipitar el cloruro sódico principalmente y otras sales. La diversidad procariota varía a lo largo de este gradiente ambiental con poblaciones especializadas de microorganismos halófilos que desplazan a las poblaciones marinas en aquellos estanques de las salinas que poseen unas 4 ó 5 veces la media de la salinidad del agua de mar. Para este estudio se selecciono un estanque concentrador de una salina solar localizada en Santa Pola, Alicante, con una concentración total de sales del 19% (w/v), la concentración total de NaCl es 5 veces mayor que la media del agua del mar y en este ambiente coexisten y compiten dos grupos de microorganismos predominantes que son los halófilos moderados y los halófilos extremos. Para el estudio se obtuvo el ADN total y posteriormente se secuenció mediante pirosecuenciación 454 (Roche), obteniéndose un metagenoma de 475 Mb constituido con secuencia con un tamaño medio de 361 bp. Para el presente estudio dicho metagenoma se analizó mediante la herramienta clásica BLAST. En la secuencia de datos metagenómica se han estudiado actividades hidrolíticas, fundamentalmente actividad amilasa, proteasa, DNasa y lipasa. Estas actividades hidrolíticas son realizadas principalmente por las siguientes especies microbianas: la arquea halófila extrema *Haloquadratum walsbyi* y la bacteria halófila extrema *Salinibacter ruber*.

Tras el análisis de las actividades hidrolíticas presentes en dicho metagenoma estamos procediendo a la construcción de una genoteca de fósidos que nos permitirá el estudio de aquellas enzimas que puedan tener un interés biotecnológico.

Evolución dirigida para incrementar la termoestabilidad de la lipasa LipC de *Pseudomonas* sp. 42A2

Silvia Cesarini^{1,*}, Cristina Bofill¹, Manfred Reetz², F.I. Javier Pastor¹, Pilar Diaz¹

¹Departamento de Microbiología, Universidad de Barcelona. Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona.

²Max-Planck-Institut für Kohlenforschung. Kaiser-Wilhelm-Platz 1, 45470 Mülheim an der Ruhr, Germany

Email: silviacesarini@ub.edu

LipC es una lipasa de *Pseudomonas* sp. 42A2, dependiente de la foldasa (LipH), que presenta un interesante comportamiento psicrófilo; de hecho su temperatura óptima se encuentra entre 4 y 20°C [1]. Sin embargo esta enzima posee sólo una moderada resistencia a elevadas temperaturas, mostrando un 8% de actividad residual tras 15 minutos a 60°C. Con objeto de aumentar la termoestabilidad de LipC, sin menoscabo de su psicrofilicidad, se utilizaron técnicas de evolución dirigida basadas en mutagénesis por diseño racional. Las enzimas termoestables son generalmente rígidas, así que mediante el programa B-fitter [2], y en base al modelo de homología en 3D de LipC, se eligieron los residuos con mayor flexibilidad como *targets* óptimos para la mutagénesis. Sobre los *targets* seleccionados se diseñaron 8 librerías utilizando distintos sistemas de degeneración de codones. El número de clones necesarios para saturar cada posición a mutar se determinó mediante la hoja de cálculo CASTER [2]. La mutagénesis se realizó por *QuickChange* PCR [4] sobre el plasmido pBBliClipH, que contiene la construcción en *cis* de la lipasa mas su foldasa y las moléculas mutadas se electroporaron en la cepa PABST7.1 de *Pseudomonas* deficiente en la copia genómica para la lipasa LipA y la foldasa LipH [5]. Los mutantes que mostraron halo de degradación en placas de agar con tributirina se analizaron mediante un sistema de *highthroughput* para identificar las variantes con mayores termoestabilidad. Se analizó la actividad lipasa sobre *pNP*-caprilado del sobrenadante de más de 3000 clones mutantes antes y después de una exposición de 15 minutos a 60°C, comparando la actividad residual con la del control negativo representado por el clon con la enzima original. Se seleccionaron sólo los mutantes con un actividad residual después del *heatshock* superior al 20% respecto al control. Los 7 mejores clones en cuanto a incremento de la termoestabilidad se analizaron individualmente estandarizando los resultados por concentración de proteína y efectuando el análisis de secuencias para identificar las mutaciones introducidas. Entre ellos se seleccionó, el clon D2H8, que mostró un aumento de termoestabilidad respecto al enzima original del 48%, manteniendo al mismo tiempo su temperatura optima entre 4 y 20°C. Este mutante fue utilizado como molde para una segunda ronda de mutagénesis para la cual se generaron dos nuevas librerías de clones. Con el mismo criterio de selección se identificaron otros 9 candidatos cuya termoestabilidad era superior al 20% respecto al clon D2H8 obtenido en la primera ronda. Los ensayos individuales de termoestabilidad y psicrofilicidad condujeron a la selección de tres mutantes cuya secuencia se está determinando para identificar los cambios conformacionales aportados a la proteína.

Referencias:

1. Bofill et al. Biochimie, 2010 (92)307-316
2. Reetz & Carballeira Nat.Prot, 2007 (2)891-903
3. Stratagene, La Jolla California, 2003
4. Jaeger et al. Annu.Rev.Microbio, 1999 (53)315-351

Estudio de diferentes membranas de intercambio iónico en bioceldas de combustible: efectos en la comunidad microbiana y en la electroquímica del proceso

A.Sotres*, J. Díaz, M. Guivernau, A. Bonmatí, M. Viñas

GIRO Centro Tecnológico. Rambla Pompeu Fabra, 1. 08100 Mollet del Vallés. Barcelona

*Autor de contacto: ana.sotres@giroct.irta.cat

Una celda de combustible microbiana (MFC), es un reactor bioelectroquímico que convierte la energía química, contenida en los residuos orgánicos, en electricidad, mediante un proceso de catálisis biológica. La tecnología de las MFC permite combinar la generación directa de electricidad con el tratamiento biológico de aguas residuales, tanto urbanas como industriales, deyecciones animales y otros residuos orgánicos biodegradables [1,2]. La población microbiana situada en el compartimento anódico actúa como catalizador, liberando electrones y protones procedentes del metabolismo oxidativo de los compuestos orgánicos. Estos electrones son transferidos mediante estrategias de contacto directo, o mediante la utilización de moléculas de intercambio electrónico (*shuttles redox*) al ánodo, donde se transfieren a través de un circuito externo hacia la cámara catódica reduciendo el aceptor final de electrones, típicamente el oxígeno.

Entre otros factores, el elevado coste de las membranas de intercambio de protones (PEM), limita la aplicación práctica de esta nueva biotecnología, y es por esta razón que el desarrollo de nuevos tipos de membranas de bajo coste es especialmente relevante.

En el presente estudio se probaron, en MFC de dos celdas (10 ml/celda) (Figura 1), tres tipos de membranas PEM comerciales: Nafion N-117 (Dupont, Co., Delaware, USA) y Ultrex CMI-7000 y AMI-7000 (Membranes International, USA), utilizando un inóculo procedente de un digestor anaerobio con elevada carga en nitrógeno.

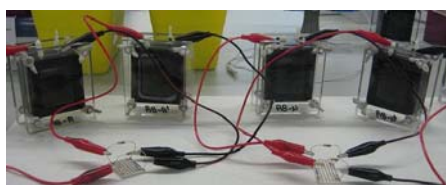


Figura 1: Montaje experimental de los reactores.

Se ha estudiado como afectan diferentes membranas PEM, tanto a nivel electroquímico como en la comunidad microbiana.

La caracterización electroquímica se ha realizado mediante un seguimiento del voltaje (mV) y mediante curvas de polarización, variando la resistencia externa del circuito (rango 0 a 30.000 Ω), donde se determinó la densidad de potencia máxima, intensidad y voltaje máximo de los reactores (Tabla 1).

Tabla 1: Valores de rendimiento máximo obtenido en los reactores.

	V (mV)	P (mW/m ²)
D.A (AMI-7000)	201	15
D.A (CMI-7000)	340	44
D.A (Nafion)	433	71

Asimismo se ha estudiado la comunidad microbiana, tanto de eubacterias como de arqueas, mediante electroforesis en geles de gradiente desnaturalizante (DGGE), para determinar el efecto de las diferentes membranas en la comunidad microbiana.

BB-P1

El enfoque multidisciplinar presentado permite una mejora en el conocimiento de la evolución de la comunidad microbiana implicada en reactores MFC en función de su rendimiento electroquímico y de los materiales de membrana utilizados, para su posterior escalado

Bibliografía:

1. Logan, B. E, Bert Hamelers, Rene A. Rozendal, Uwe Schroder, Jurg Keller, Stefano Freguia, Peter Aelterman, Willy Verstraete and Korneel Rabaey. Microbial Fuel Cells: Methodology and technology. Environmental Science and Technology. 2006. 40:5181-5192.
2. Rabaey, K.; Boon, N.; Hofte, M.; Verstraete, W. Microbial phenazine production enhances electrontransfer in biofuel cells. Environ. Sci. Technol. 2005. 39:3401-3408.

Enrichment of methanogenic strains from marine sediments from Admiralty Bay and Bransfield Strait, King George Island, Antarctic Peninsula

Diego Castillo Franco^{*1}, Ana Carolina Araujo¹, Ana Claudia Mancusi¹, Cristina Rossi Nakayama,¹ Lucia Campos.², Vivian Helena Pellizari¹

¹Laboratory of Microbial Ecology, Oceanographic Institute, São Paulo University, Sao Paulo, Brazil

²Institute of Biology, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Email: diecasfranco@gmail.com

Methanogenic archaea are strictly anaerobic microorganisms that produce methane from compounds such as acetate, formate and CO₂. These microorganisms are abundant and active in many different anaerobic environments such as freshwater and marine sediments. Methanogenic communities in sediments from Admiralty Bay and Bransfield Strait, Antarctic Peninsula, are being characterized by both molecular and cultured-dependent techniques. Sediments from five different depths (100, 300, 500, 700 and 1100 m) were sampled with a box corer, subsampled on board in 60mL polypropylene syringes for cultivation studies and in whirl packs for molecular analysis, and kept at 4 and -20°C, respectively until further processing. DNA was extracted and DGGE analysis performed with archaeal 16S rRNA primers 344f and 915r. Sediments from depths 100 and 1100 m were also inoculated in media for the enrichment of methanogenic strains and incubated at 15°C. DGGE revealed complex band patterns for all five sites, indicating high archaeal diversity. However, little difference between fingerprintings was observed, suggesting that depth have little influence on diversity of archaeal communities. Archaea 16S rRNA clone libraries are under construction to better characterize the archaeal communities in these sediments. Enrichment cultures of 100 and 1100m sediments produced 1.35 and 1.31 mmol methane respectively after 4 months of incubation at 15°C. UV-microscopy revealed that similar methanogenic morphologies were enriched in both cultures, with the predominance of small rods. Longer rods and cocci also occurred in both cultures. Molecular characterization is being carried out in order to identify methanogenic groups present in the cultures.

Keywords: Methanogenic *Archaea*, Antarctic Peninsula, biodiversidade, methane

Acknowledgements: this work is part of the MABIREH project, coordinated by Dr. Lucia Campos, CAML, CNPq, Proantar.

Determinación de la actividad de metanógenas en la obtención de biohidrógeno

S. Zahedi Díaz^{1*}, L.I. Romero García², D. Sales Márquez¹, R. Solera del Río¹

¹*Departamento de Tecnologías del Medio Ambiente. Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales (CASEM). Universidad de Cádiz. Pol. Río San Pedro s/n, 11510 Puerto Real (Cádiz), España*

²*Departamento de Ingeniería Química y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Ciencias. Universidad de Cádiz. Pol. Río San Pedro s/n, 11510 Puerto Real (Cádiz), España*
Email: soraya.zahedi@uca.es

Los microorganismos metanogénicos son uno de los grupos principales que intervienen en el proceso de degradación anaerobia. Estos se dividen a su vez en dos subgrupos, por un lado están las metanógenas acetoclásticas que son capaces de producir metano y dióxido de carbono a partir del acetato y por otro las utilizadoras de hidrógeno, que lo producen a partir del hidrógeno y del dióxido de carbono que provienen del metabolismo de las bacterias acidogénicas y acetogénicas.

Para el estudio de la determinación de la actividad de metanógenas en la obtención de biohidrógeno a partir del proceso de degradación anaerobia de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos, se realizó un ensayo discontinuo en rango termofílico de temperatura (55°C) en una batería de 4 reactores con un volumen útil en cada reactor de 2,3 litros. Como fuente de inóculo se utilizaron lodos anaerobios termofílicos de depuradora, el porcentaje de inoculación en todos los casos fue del 10 %. A cada uno de los reactores se le aplicó un tratamiento diferente con objeto de inhibir a la población metanogénica y así fomentar la productividad de biohidrógeno. Los tratamientos aplicados fueron, acidificación, choque térmico, sobrecarga y adición de inhibidor, 2- Bromo etano-sulfonato sódico (BESA). Para la cuantificación de los diferentes grupos microbianos (Eubacterias, metanógenas acetoclásticas y metanógenas utilizadoras de hidrógeno) se utilizó la técnica FISH. La mayor actividad de metanógenas acetoclásticas y de utilizadoras de hidrógeno se observó en el reactor de sobrecarga, este tratamiento fue el que presentó una mayor producción acumulada de metano (15 ml) y una mayor productividad de metano (0,51 ml de CH₄ acumulado/gDQOs), la actividad de las metanógenas acetoclásticas fue de 5,55 ml de CH₄/10¹⁰ células de metanógenas acetoclásticas y la de las utilizadoras de hidrógeno fue de 5,52 ml de CH₄/10¹⁰ células de metanógenas utilizadoras de hidrógeno. Los tratamientos que presentaron una menor actividad metanogénica fueron el tratamiento con inhibidor químico y el de choque térmico, ambos presentaban una producción acumulada de metano de 2 ml y una productividad de 0,07 ml de CH₄/g DQOs. La actividad de metanógenas en el tratamiento de choque térmico fue de 1,13 ml de CH₄/10¹⁰ células de metanógenas acetoclásticas y de 0,80 ml de CH₄/10¹⁰ células de metanógenas utilizadoras de hidrógeno y en el tratamiento de acidificación la actividad fue de 0,91 ml de CH₄/10¹⁰ células de metanógenas acetoclásticas y de 1,43 ml de CH₄/10¹⁰ células de metanógenas utilizadoras de hidrógeno.

Producción de etanol de segunda generación a partir de residuo de poda del olivo pretratado mediante explosión por vapor

Ignacio Ballesteros^a, Mercedes Ballesteros^a, Eulogio Castro^b, Felicia Sáez^a, Paloma Manzanares^a, M^aJosé Negro^{a*}, José Miguel Oliva^a

^aUnidad de Biocarburantes. DER-CIEMAT. Avda. Complutense 22, 28040 Madrid

^bDepartamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales. Universidad de Jaén. Campus Las Lagunillas, 23071 Jaén

El aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica en general, y de los residuos agrícolas en particular, como fuente de materia prima para la producción de bioetanol de segunda generación es una opción interesante para reducir la dependencia de los combustibles fósiles. El residuo resultante de la poda del olivo puede utilizarse como materia prima para la producción de bioetanol. La conversión de los carbohidratos contenidos en este residuo en etanol requiere tres etapas principales: pretratamiento, cuyo objetivo es alterar la estructura lignocelulósica para mejorar la accesibilidad de las enzimas; hidrólisis enzimática (obtención de azúcares a partir de la celulosa y la hemicelulosa) y fermentación, transformación de los azúcares a etanol.

El objetivo de este trabajo es evaluar el fraccionamiento de la biomasa lignocelulósica de residuo de la poda del olivar mediante un pretratamiento de explosión por vapor, para la producción de azúcares fermentables a etanol mediante un proceso de fermentación y sacarificación simultánea.

La biomasa del residuo de ramón de olivo previamente sometida a una etapa previa de extracción fue pretratada en una planta piloto de explosión por vapor, con un reactor de 2 litros de capacidad. Se planteó un diseño de composición central (2^2 + puntos estrella, tres repeticiones en el punto central). El pretratamiento se evaluó considerando la recuperación total de azúcares, tanto en la etapa de pretratamiento, como en la etapa posterior de hidrólisis enzimática.

El estudio de optimización permitió seleccionar unas condiciones de pretratamiento (187°C 30 minutos) con las que se puede obtener el 84% de la xilosa y el 80% de la glucosa contenidas en la materia prima. La poda de olivo pretratada en las condiciones óptimas se ha utilizado como sustrato en la hidrólisis enzimática utilizando diferentes preparados enzimáticos comerciales de celulasas y xilanasas. Se ha probado además la incorporación de agentes tensoactivos durante la hidrólisis enzimática.

Los resultados obtenidos mostraron que la incorporación de xilanasa mejora la hidrólisis enzimática, mientras que la incorporación de tensoactivos no iónicos mejora los rendimientos de hidrólisis únicamente a tiempos cortos.

La utilización de una etapa de presacarificación previa a la sacarificación y fermentación simultánea mejora la producción de etanol cuando se añade xilanasa en el medio, lo que se atribuye a una mayor producción de glucosa en la hidrólisis enzimática.

Agradecimientos: Este trabajo se ha realizado gracias a la subvención concedida por el Ministerio de Ciencia e Innovación (Proyecto Ref. ENE2008-06634-C02-01)

Nuevas enzimas para producir Etanol 2G: Inducción y caracterización de una β -Glucosidasa de *Aspergillus japonicus*

Elda S. da Silva¹, Miguel Jurado², María Filomena A Rodrigues¹, María Jesús Martínez²

¹Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), São Paulo (Brasil); ²Centro de Investigaciones Biológicas (CIB, CSIC), Madrid (España). Email: mjmartinez@cib.csic.es

La mayor parte del bioetanol que se produce en el mundo procede de cultivos de caña de azúcar (Brasil) y maíz (USA), representando más del 72% de la producción mundial. En Europa la producción de bioetanol, favorecida en los últimos años por las políticas de la UE, procede de la fermentación de azúcares de cereales (granos de trigo o cebada). Sin embargo, el uso de biomasa lignocelulósica para producir etanol de segunda generación (2G), especialmente el que procede de residuos agrícolas, ha despertado gran interés porque se trata de un material abundante que no compite con la cadena alimentaria. Para llevar a cabo este proceso es necesario desestructurar la pared celular vegetal para que los polisacáridos, celulosa y hemicelulosa, puedan ser hidrolizados por cócteles de enzimas eficaces y a precios competitivos. En la actualidad existen comercializados diferentes cocteles con actividad celulasa (endo- y exo-celulasas y β -glucosidasas), que proceden generalmente de cultivos de hongos del género *Trichoderma* suplementados con β -glucosidasas de otros hongos. Cabe destacar que la β -glucosidasa (EC 3.2.1.21) es una enzima clave en el proceso ya que hidroliza la celobiosa y otros oligómeros de la pared celular vegetal a glucosa para que pueda ser fermentada por las levaduras a etanol.

En este trabajo se estudia la β -glucosidasa secretada por una cepa de *Aspergillus* aislada de una plantación de caña de azúcar en Brasil. Este hongo fue seleccionado en un amplio *screening* por los altos niveles de β -glucosidasa que producía en un medio basal suplementado con avicel (niveles mayores que los detectados en *Trichoderma reesei* RUTC 30). Este hongo se ha identificado como una cepa de *Aspergillus japonicus* basándonos en su morfología y la secuencia ITS de su ADN. La inducción de β -glucosidasa secretada por este hongo se ha estudiado en diferentes medios suplementados con "corn steep solids" (CSS), avicel, bagazo de caña de azúcar y salvado de trigo (28 °C y 200 rpm). Los mejores resultados se obtuvieron en el medio CSS suplementado con salvado de trigo y un medio con bagazo de caña de azúcar. También se obtuvieron altos niveles de β -glucosidasa en un medio mineral, suplementado con 0,3% CSS. La β -glucosidasa secretada por este hongo es estable en un rango de pH entre 4-7 y a 30-70°C al menos durante 24h. La enzima se ha purificado utilizando columnas de intercambio iónico y exclusión molecular con el fin de estudiar sus propiedades catalíticas.

Agradecimientos: Elda S. da Silva agradece al Gobierno de Brasil a través de IPT la ayuda concedida para su estancia en el Centro de Investigaciones Biológicas.

Búsqueda de basidiomicetos eficaces para el pretratamiento de la paja de trigo y la producción de etanol 2G

Davinia Salvachúa, Alicia Prieto*, Ángel T. Martínez, M^a Jesús Martínez

Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC). C/ Ramiro de Maeztu, n°9, 28040 Madrid.

Email: mjmartinez@cib.csic.es

El bioetanol es un combustible obtenido como resultado de la fermentación de materias vegetales ricas en carbohidratos y es una de las alternativas que se está considerando para reducir nuestra dependencia de los combustibles fósiles y las emisiones de CO₂ a la atmósfera. Para evitar la competencia con los recursos alimentarios se está promoviendo el uso de biomasa lignocelulósica, principalmente de residuos agrícolas, como la paja de trigo, por ser más baratos y abundantes que otras materias primas. Sin embargo, para que los azúcares de los polisacáridos de la pared celular vegetal puedan llegar a ser fermentados se requieren 3 etapas: pretratamiento, hidrólisis enzimática y fermentación. El pretratamiento es imprescindible para desestructurar el material lignocelulósico y facilitar el acceso de las enzimas hidrolíticas a los carbohidratos. La mayoría de los métodos descritos (físicos y/o químicos) son costosos y generan inhibidores que interfieren negativamente en el proceso. En este trabajo se evalúa si el pretratamiento biológico, con hongos basidiomicetos capaces de degradar la lignina, puede ser una alternativa viable y respetuosa con el medio ambiente.

Se realizó un *screening* con 21 hongos basidiomicetos, utilizando paja de trigo esterilizada y con un contenido de humedad del 66%. Los cultivos se incubaron en condiciones de fermentación en estado sólido (SSF) a 25-30°C y se evaluaron a los 7, 14, 21 días analizando: a) las actividades enzimáticas implicadas en la degradación de la lignocelulosa y azúcares presentes en la fracción hidrosoluble y b) la pérdida de peso, lignina Klason, composición en azúcares y digestibilidad de la fracción sólida. La digestibilidad se evaluó tras hidrolizar la paja biopretratada con celulasas y xilanasas (cedidas por Novozymes) y el etanol, producido, tras la fermentación del hidrolizado con *Saccharomyces cerevisiae*, por cromatografía de gases.

La mayoría de los hongos degradaron poco la lignina de la paja de trigo, ocasionando altas pérdidas de carbohidratos y/o baja digestibilidad, por lo que su utilización en estos procesos quedó descartada. Sin embargo, *Irpex lacteus*, *Poria subvermispora*, *Phlebia radiata*, *Panus tigrinus*, *Phellinus robustus*, *Polyporus alveolaris* y *Pleurotus eryngii* produjeron, a los 21 días de SSF, un rendimiento final de recuperación de azúcares (glucosa y xilano) del 62, 61, 52, 50, 50, 50 y 41% respectivamente, mayor que en el control realizado con paja sin inocular (35%), incubado en las mismas condiciones. Los niveles de celulasas y xilanasas secretadas por los hongos seleccionados fueron muy bajos y los de lacasas y peroxidasas encontrados indican que estos no se correlacionan siempre con un incremento de la digestibilidad de la paja. Finalmente, la determinación de etanol a partir del material biopretratado con estos hongos indicó que la conversión de glucosa durante la fermentación fue prácticamente total, lo que sugirió que durante la SSF no se generaron inhibidores que afectaran el rendimiento del proceso.

Según estos resultados el pretratamiento biológico del material lignocelulósico puede ser una alternativa viable para obtener bioetanol 2G. Aunque el rendimiento global del proceso es alrededor de un 20% menor que el obtenido con tratamientos físico/químicos, los resultados son esperanzadores y se continúan los ensayos para optimizar los tiempos y condiciones de cultivo con el fin de incrementar la recuperación final de azúcares.

Agradecimientos: Este trabajo se está realizando en colaboración con Abengoa Bioenergía Nuevas Tecnologías, en el proyecto CENIT I+DEA (2007-1031), subvencionado por el CDTI.

Oxidación con ozono de residuos lignocelulósicos en el proceso de obtención de bioetanol

M. Teresa García-Cubero, Silvia Bolado, Gerardo González-Benito, Mónica Coca*

Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente, Universidad de Valladolid. Dr. Mergelina s/n, 47011 Valladolid, España. Email: monica@iq.uva.es

Los residuos lignocelulósicos generados en las actividades agrícolas y forestales suponen una interesante alternativa para su uso como materias primas en la obtención de biocombustibles. Estos residuos requieren una etapa previa a la hidrólisis enzimática para aumentar su digestibilidad y mejorar el rendimiento en la producción de azúcares. Con esta finalidad se pueden utilizar diferentes pretratamientos. Dentro de los pretratamientos de tipo químico, la oxidación con ozono es una alternativa que presenta importantes ventajas. El ozono es un oxidante que reacciona de forma selectiva con la lignina dando lugar a compuestos solubles de menor peso molecular. El proceso tiene lugar a presión y temperatura ambiente, por lo que se evita la degradación de la celulosa y hemicelulosa y la formación de inhibidores. Este trabajo se plantea con el objetivo de analizar la influencia de la etapa de pretratamiento con ozono en la degradación de lignina y en la producción de azúcares fermentables durante la posterior etapa de hidrólisis enzimática. Como materias primas se utilizaron distintos tipos de paja: centeno, trigo, avena y cebada, cultivos de especial relevancia en Castilla y León.

En los ensayos de ozonización se utilizó un reactor de lecho fijo a temperatura ambiente. Se operó en las condiciones óptimas previamente establecidas: 40% de humedad, tamaño de partícula 3-5 mm y 1,8 g O₃/h en un flujo de aire de 60 L/h. Los ensayos de hidrólisis se realizaron con una mezcla de celulasas y β -glucosidasas de Novozymes a 50 °C durante 96 h.

En primer lugar se realizaron unos ensayos con paja de trigo para seleccionar un tiempo adecuado de ozonización. Se observó que con 2,5 h de reacción, el contenido en lignina ácida insoluble (LAI) disminuye del 22 al 12%, mientras que el de lignina ácida soluble (LAS) aumenta del 3 al 8%. Prolongar el tiempo de reacción no mejora estos resultados. El consumo de ozono fue 0,1 g O₃/g paja seca. Para el resto de materias primas se observó un comportamiento similar, de forma que, en función del tipo de materia prima usada, el contenido en LAI disminuye del 20-24% hasta el 11-13% y el de LAS aumenta del 3-4% al 7-8%.

Respecto a la etapa de hidrólisis enzimática se observó que el pretratamiento con ozono aumenta la producción de azúcares fermentables (glucosa y xilosa). En el caso de paja de centeno y cebada, la producción de glucosa mejoró un 54-59%, respectivamente, respecto a la materia prima sin pretratar. Estas dos materias primas son las que presentan mayor contenido inicial de LAI (27 y 23%). Con paja de trigo la producción de glucosa mejoró un 40% mientras que con paja de avena sólo se consigue mejorar la producción de glucosa un 19%. Por otra parte, el pretratamiento con ozono también mejora la producción de xilosa un 31-34% para todas las materias primas, excepto para paja de avena (15%). El rendimiento en la producción de xilosa es menor, pero hay que señalar que sólo se utilizaron enzimas del tipo celulasa y glucosidasa.

Por lo tanto, el pretratamiento químico con ozono mejora la producción de glucosa y xilosa en la etapa de hidrólisis enzimática, sin causar pérdidas de azúcares ni producir inhibidores. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando paja centeno y cebada, aunque con paja de trigo también se consiguieron buenos resultados.

Bibliografía:

1. García-Cubero, M.T., González-Benito, G., Indacochea, I., Coca, M., Bolado, S. (2009). Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw. *Bioresource Technology* 100, 1608-1613.

2. Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro M.J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review *Bioresource Technology* 101, 4851-4861

Pretretamiento por extrusión de paja de cebada para la producción de azúcares fermentables mediante hidrólisis enzimática

A. Duque*, P. Manzanares, I. Ballesteros, M.J. Negro, J.M. Oliva, A. Gonzalez, M. Ballesteros

Unidad de Biocarburantes. División de Energías Renovables-CIEMAT. Avda. Complutense 22, 28040 Madrid. España. Email: aleta.duque@ciemat.es

El fraccionamiento de la biomasa es un paso esencial previo al uso de carbohidratos presentes en la misma para la producción de etanol y otros productos de alto valor añadido. Se han propuesto numerosos pretratamientos de biomasa en condiciones de alta temperatura y presión, que han demostrado ser eficaces en su fraccionamiento, pero que sin embargo, requieren un elevado input energético y altos costes de operación. Además, las altas temperaturas utilizadas en estos pretratamientos normalmente conllevan una cierta degradación de los azúcares contenidos en la biomasa, lo que impide maximizar el rendimiento global del proceso. En comparación, la extrusión, una técnica ampliamente utilizada en la industria alimentaria y del plástico, puede aplicarse al pretratamiento de la biomasa en condiciones mucho más suaves. El proceso de extrusión se basa en la ruptura mecánica de la matriz de la biomasa gracias a las fuerzas de rozamiento producidas por el giro de un tornillo ajustado dentro de una carcasa con control de temperatura. En el interior del módulo del extrusor el material se somete a calentamiento, mezcla y fuerzas de rozamiento, lo cual conduce a cambios físicos y químicos del mismo.

El objetivo de este estudio es evaluar la eficacia del proceso de extrusión, usando NaOH como catalizador, como método para fraccionar la biomasa de paja de cebada y mejorar su digestibilidad por enzimas celulolíticas, para su utilización como sustrato en un proceso de conversión biológica a etanol. Para ello se estudiaron los cambios en la composición química del sustrato (componentes mayoritarios celulosa, hemicelulosa, lignina y cenizas) y en su digestibilidad enzimática mediante ensayos de laboratorio con enzimas comerciales, en función de las variables temperatura de extrusión y la concentración de catalizador.

Se utilizó un equipo de extrusión de doble tornillo, de 25 mm de diámetro, el cual está compuesto por seis módulos, de 100 mm de longitud cada uno, con control de temperatura. El catalizador empleado fue NaOH, en una disolución acuosa de 10% en peso. Se calculó una proporción entre la disolución de NaOH y la paja de cebada, de forma que la relación NaOH/materia seca variase entre 2,5 y 7,5%. El intervalo de temperatura se estableció entre 50 y 100°C.

El efecto de las variables de proceso temperatura y relación sosa/materia seca se analizó usando un método de superficie respuesta, de acuerdo con un diseño de experimentos 2³. Los parámetros analizados para evaluar la efectividad del pretratamiento de extrusión con NaOH fueron el contenido en celulosa, hemicelulosa y lignina en el material extrusado, y el rendimiento de hidrólisis enzimática, basado en la glucosa y la xilosa liberadas en ensayos estándares de laboratorio con enzimas comerciales.

Los resultados muestran un importante efecto de la relación NaOH/materia seca y, en menor medida, de la temperatura, en los parámetros estudiados. A partir de los resultados obtenidos del diseño de experimentos se determinaron las condiciones óptimas para una máxima respuesta de glucosa y xilosa liberada por hidrólisis enzimática y se validó experimentalmente este resultado. El sustrato pretratado en estas condiciones óptimas se sometió a diversos ensayos de hidrólisis en laboratorio, con el fin de mejorar la eficiencia del proceso de hidrólisis enzimática en cuanto a la dosis de enzima empleada.

Agradecimientos: Este trabajo se ha realizado gracias a la subvención concedida por el 7º Programa Marco de la Unión Europea (Proyecto ref. nº 2274989).

Optimización del proceso directo de producción de biodiesel a partir del hongo *Mucor circinelloides*

Gemma Vicente^{1*}, L. Fernando Bautista¹, Alicia Carrero¹, Rosalía Rodríguez¹, Gonzalo L. del Peso¹, Fernando Prieto¹, Rosa A. Rodríguez-Frometa², Rosa M. Ruiz-Vazquez², Santiago Torres-Martínez², Victoriano Garre²

¹Departamento de tecnología Química y Energética, ESCET, Universidad Rey Juan Carlos, c/ Tulipán s/n. 28933 Móstoles (Madrid), España. Email: gemma.vicente@urjc.es

²Departamento de Genética y Microbiología (Unidad asociada al IQFR-CSIC), Facultad de Biología, Universidad de Murcia, 30071 Murcia, España.

En la actualidad, la mayor parte del biodiésel se produce a partir de aceites vegetales de distinta procedencia [1]. Debido al coste de producción de biodiésel a partir de estos aceites y a la necesidad de grandes extensiones de cultivo, se están investigando nuevas materias primas alternativas para sustituir a los aceites convencionales [2]. En este sentido, los microorganismos oleaginosos constituyen una fuente de lípidos para la producción de biodiesel, que ha sido muy poco explorada. Concretamente, aquéllos que han demostrado una importante capacidad de acumular estos lípidos y, además, pueden manipularse genéticamente para mejorar u optimizar su acumulación. Basándose en esta idea, el Departamento de Energía de los Estados Unidos (DOE) lleva ya algún tiempo financiando distintos programas, entre lo que se encuentra "Genomics to Life", que se dedica a secuenciar genomas de organismos que pudieran ser importantes en la producción de biocarburantes. Dentro de este programa, el DOE ha seleccionado al hongo *Mucor circinelloides*.

La comunicación que se presenta se centra en la optimización del proceso de producción directo de biodiesel [3,4], sin etapa de extracción de lípidos previa, a partir del hongo *Mucor circinelloides* con un contenido en lípidos totales del 19% [5]. A su vez, el contenido en lípidos susceptibles de ser transformados en biodiesel (lípidos saponificables y ácidos grasos) es del 99,7 %. El catalizador empleado fue ácido sulfúrico, debido al elevado contenido en ácidos grasos libres (7,7 %) de la fracción lipídica extraída.

El rendimiento de biodiesel en el proceso fue semejante si se utiliza la mezcla cloroformo metanol (19,3 %), o solo metanol (19,0 %). Por tanto, el metanol actúa como disolvente de extracción y como reactivo de manera simultánea, lo que permite la simplificación del proceso de obtención de biodiesel. El contenido en éster aumentó con el tiempo, cumpliendo la especificación correspondiente de la normativa europea UNE-EN 14214 a partir de la segunda hora. La cantidad de catalizador influyó notablemente en la composición del biodiesel. El máximo contenido en éster (96,7 %) se obtuvo para una relación catalizador/hongo de 0,6. Las relaciones de catalizador/hongo superiores no resultan adecuadas, porque el ácido sulfúrico ataca el biodiesel producido. A mayor temperatura, se produjo una mayor conversión de la materia saponificable y los ácidos grasos que contiene el microorganismo, observándose que a 65 °C la mayor parte de estos lípidos se han transformado en esteres metílicos. Por último, según aumentó la relación metanol/hongo, las conversiones a esteres metílicos fueron mayores. El biodiesel obtenido con las condiciones óptimas cumple con las normativas UNE-EN 14214 y ASTM D6751-08.

Referencias:

1. Vicente, G.; Martínez, M.; Aracil, J.; 2006. A Comparative Study of Vegetable Oils for Biodiesel Production in Spain. *Energy & Fuels* 20, 394-398.
2. Meng, X.; Yang, J.; Xu, X.; Zhang, L.; Nie, Q.; Xian, M.; 2009. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy* 34, 1-5.
3. Vicente, G.; Bautista, L. F.; Rodríguez, R.; Gutiérrez, F. J.; Sadaba, I.; Ruiz-Vázquez, R. M.; Torres-Martínez, S.; Garre, V., 2009. Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. *Biochemical Engineering Journal* 48, 22-27.

4. Vicente, G.; Bautista, L. F.; Rodríguez, R.; Gutiérrez, F. J.; Martínez, V.; Rodríguez-Frometa, R.; Ruiz-Vázquez, R. M.; Torres-Martínez, S.; Garre, V, 2010. Direct Transformation of Fungal Biomass from Submerged Cultures into Biodiesel. *Energy & Fuels* 24, 3173–3178.
5. Folch, J.; Lees, M.; Stanley, G.H.S.; 1957. A simple methd for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226, 497-509.

Aislamiento y caracterización de bacterias productoras de hidrógeno por fermentación ácida a partir de lodo granular anaerobio

Hayfa Rajhi^{1*}, Monica Conthe Calvo¹, Emilano Díaz Portuondo², José Luis Sanz Martín¹

¹Dpto. de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid

²MyGen, Parque tecnológico, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid

Email: hayfa_rajhi@yahoo.fr; monica_conthe@hotmail.com; eediaz@mygen.es;

jose-luis.sanz@uam.es

La crisis energética actual y el agotamiento de combustibles fósiles están llevando a la búsqueda y empleo de fuentes de energía alternativas. El hidrógeno (H₂) es una fuente de energía alternativa prometedora y la fermentación ácida (u oscura) llevada a cabo por microorganismos a partir de residuos es una aproximación atractiva, barata y ecológica para su obtención. Sin embargo, para que la implementación de la fermentación ácida a gran escala sea factible, es fundamental la mejora de los rendimientos de hidrógeno obtenidos. La producción de H₂ puede ser llevada a cabo tanto por cultivos puros de bacterias fermentadoras como por cultivos mixtos enriquecidos. El lodo granular (forma que adopta la biomasa en los reactores anaerobios UASB), posee una enorme biodiversidad - incluyendo bacterias productoras de H₂ - por lo que es un buen inóculo tanto para su aislamiento como para la consecución de cultivos enriquecidos.

Mediante técnicas de enriquecimiento, dilución y siembra en placa, se han aislado tres cepas de microorganismos altamente productores de H₂. Mediante estudios en *batch*, usando un medio rico en azúcares y péptidos, se optimizaron los parámetros físico-químicos (temperatura y pH) para la producción de H₂, tanto de los cultivos puros como de un cultivo enriquecido.

Los tres microorganismos aislados pertenecen a diferentes especies del género *Clostridium*: *C. saccharobutylicum* H1, *C. beijerincki/acetobutylicum* H5, *C. butyricum* H17. Los tres cultivos liberan H₂ como subproducto de la fermentación de azúcares y, en menor medida, péptidos. Los principales metabolitos generados son los típicos de la fermentación acidogénica de azúcares: butirato, acetato, propionato y, en menor medida, etanol. En *C. butyricum* H17 se detectó también la presencia de lactato. Aunque la relación butirato:acetato de los productos de fermentación es mayor de la esperada (hay una desviación hacia la producción de butirato), los valores de producción de H₂ obtenidos se ajustan bien a los valores de rendimiento teóricos. La DQO consumida varió entre 25-30%, próxima al valor teórico (1/3 de la DQO suministrada). Las tendencias de producción acumulada de H₂, pH y crecimiento celular observadas en cultivos en *batch* muestran que tanto las especies de *Clostridium* estudiadas como el cultivo enriquecido, realizan fermentación acetobutírica, produciendo H₂, CO₂, acetato y butirato durante la fase de crecimiento exponencial inicial (fase acidogénica), resultando en un descenso del pH hasta valores de 4-4,5. No se detectó el cambio a fermentación solventogénica.

Cada uno de los tres cultivos se comporta de manera diferente en el rango de pH estudiado (5-7,5), manteniéndose constante la actividad productora de H₂ para la cepa H1, mientras que aumenta linealmente para H17. Por lo que se refiere a la temperatura, no parecen existir diferencias significativas entre 25-35°C, disminuyendo en todos los casos para 40°C. Comparando la capacidad productora de H₂ de los cultivos puros se puede concluir que *C.sp* H5 es el mejor productor en el medio y condiciones utilizadas.

Producción de bioetanol a partir de algarroba: Modelización de la inhibición del proceso fermentativo por el alcohol acumulado

M.E. Lima-Costa^a, C. Tavares^a, S. Raposo^a, C. Quintas^b, S. Galera^{c*}, J.M. Peinado^c

^aCentre for Marine and Environmental Research –CIMA - Faculty of Sciences and Technology University of Algarve - Campus de Gambelas, 8005-139 Faro. Portugal.

^bInstitute of Engineering, University of Algarve, 8005-139 Faro. Portugal.

^cFacultad de Biología, Dep. Microbiología III, Universidad Complutense, 28040 Madrid.

Email: peinado@bio.ucm.es

La producción de bioetanol de primera generación, un proceso industrial bien establecido, plantea el problema de la competición por los sustratos utilizados, fundamentalmente cereales, con la industria alimentaria. Muchos sustratos alternativos no utilizables como alimentos, como celulosas y lignina, presentan dificultades tecnológicas para obtener a partir de ellos los azúcares fermentables, lo que está limitando su implantación industrial. La algarroba, con un 50% de su peso constituido por azúcares fácilmente fermentables (sacarosa, glucosa y fructosa), es un buen candidato como sustrato alternativo para obtener etanol de segunda generación, especialmente en países como Portugal y España, donde por sus características (crecimiento en suelos pobres y secos, escaso mantenimiento y buena productividad) es un cultivo tradicional en las zonas de clima mediterráneo. Por todo ello, en la Universidad del Algarve se iniciaron estudios para evaluar y optimizar la producción de bioetanol a partir de los residuos de la algarroba procedentes de una industria local que extrae de este fruto otros productos de interés industrial. Los primeros resultados demostraron las potencialidades industriales del sustrato y también permitieron identificar las limitaciones del proceso. En un extracto acuoso de algarroba pulverizada, suplementado con una fuente de nitrógeno y otros nutrientes, el 100% de los azúcares eran fermentados y transformados en etanol con un rendimiento cercano al máximo (0,49 g/g). La única limitación del proceso era la acumulación de etanol que inhibía y finalmente paraba el proceso cuando se alcanzaban los 100 g/L aproximadamente. Como se ha encontrado también en otras ocasiones, la fermentación fue más tolerante que el crecimiento (1,2).

En este trabajo analizamos la cinética de la inhibición del proceso fermentativo aplicando dos modelos matemáticos alternativos. El primero considera que todas las células tienen idéntica tolerancia al etanol y establece dos fases de la inhibición. En la primera fase, el etanol no produciría ningún efecto hasta que se alcanzara una concentración crítica. En ese momento comenzaría la inhibición, que aumentaría exponencialmente con la acumulación de etanol (3). El modelo alternativo considera que cada célula tiene su propia tolerancia y que esta heterogeneidad puede ser descrita por una distribución tipo Weibull. Ambos modelos describen razonablemente bien la cinética de inhibición, aunque la bondad del ajuste es mejor para el modelo Weibull. Además, hemos comprobado la hipótesis de la heterogeneidad celular con experimentos independientes, estudiando el estado fisiológico de células individuales utilizando un espectrofotómetro Bioscreen. Los resultados confirman que la población es heterogénea y por tanto los modelos matemáticos más adecuados para describir, analizar y procurar aumentar la tolerancia a etanol deben estar basados en distribuciones estadísticas, como la de Weibull, que incorporen esta heterogeneidad al modelo.

Referencias:

1. S. Raposo, J. M. Pardão, I. Díaz, M.E. Lima-Costa (2009) "Kinetic modelling of bioethanol production using agro-industrial by-products". International Journal of Energy and Environment. 3 (1): 1-8;
2. M.E. Lima-Costa, C. Tavares, S. Raposo^a, C. Quintas, J.M. Peinado (2010) "Kinetics of sugars consumption and bioethanol production in carob pod fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*" 5th International Meeting on Biotechnology. Pamplona. Abstract Book p.128.
3. N. van Uden, C. Leao, J.M. Peinado.(1986) "Efectos tóxicos del etanol y otros alcoholes en levaduras. Mecanismos subyacentes". In S. Ochoa, L.F. Leloir, J. Oro y A. Sols, "Bioquímica y Biología Molecular". Editorial Salvat.

Producción de ácido poli- γ -glutámico (PGA) mediante fermentación con sustrato sólido y *Bacillus licheniformis*

Albert Tagliavini, Albert Roger, Jordi J. Bou*

Departamento de Ingeniería Química, ETSEIB. Universidad Politécnica de Cataluña Diagonal, 647, 08028 Barcelona.

*Email: jordi.bou@upc.edu

El PGA es un polímero extracelular no tóxico producido por varias bacterias del género *Bacillus*, y con potenciales aplicaciones en la cosmética, la medicina, la industria alimentaria o en el tratamiento de aguas [1].

Tradicionalmente se ha obtenido el PGA por fermentación en fase líquida. Una alternativa interesante es la producción de PGA mediante la fermentación con sustratos sólidos como la soja texturizada o residuos de patata.

En este estudio se ha producido PGA empleando distintos sustratos sólidos con *Bacillus licheniformis* ATTC 9945A. Los sustratos sólidos son de alto contenido proteico, algunos de los cuales no habían sido probados hasta ahora, como son la soja texturizada, soja, levadura de cerveza, piñones, judías, garbanzos, lentejas rojas, azuki, germen de trigo y semillas de calabaza. También se ha estudiado el efecto de la L-glutamina y del ácido 2-ketoglutarico en el rendimiento final de la fermentación. Como condiciones de cultivo se han utilizado las propuestas por Bajaj et al. [2], con una concentración inicial de la mezcla del 60%.

Las fermentaciones han durado 3 días. Al finalizar éstas, las mezclas fermentadas se han filtrado, se han disuelto en 10 volúmenes de agua destilada (basado en el peso inicial del sustrato seco) y se han separado las células por centrifugación.

Para separar el PGA formado, que se encontraba disuelto en el sobrenadante, la disolución se vertió sobre 4 volúmenes de etanol. El PGA precipitado se recogió y se puso en un desecador al vacío hasta peso constante.

Resultados:

La cantidad de PGA obtenida en casos seleccionados es la indicada en la tabla siguiente:

	Soja texturizada	Levadura	Piñones	Germen de trigo	Judías	Lentejas
mg de PGA/g de sustrato	69.8	71.4	27.1	0	0	0
% de proteína en sustrato	46.6	50.0	24	23.5	22.3	23.0

Los resultados dependientes de la presencia de L-glutamina o ácido 2-ketoglutarico son:

	Condiciones de cultivo					
	L-Glutamina (%)			Ácido 2-ketoglutarico (%)		
	0.067	0.27	0.33	0.507	0.67	3.33
mg de PGA/g de sustrato	110.5	130.5	144.3	149.5	155.7	0

Conclusiones:

Los resultados indican que es posible la producción de PGA mediante fermentación en estado sólido con altos rendimientos y que la biosíntesis del PGA está favorecida por aquellos medios ricos en proteínas. En el caso de la presencia de sustancias potenciadoras, se observa un aumento de la producción de PGA. En ambos casos, puede aprovecharse la metodología para la producción piloto del biopolímero ácido poliglutámico.

Referencias:

1. Bou JJ, Almajano MP, Calafell M, Marques-Calvo M, Cerda-Cuellar M, Biosynthesis of poly-g-glutamic acid by fermentation in non regular media. New Biotechnology 2009, 25S, S201.
2. Bajaj IB, Lele SS, Singhal RS. Enhanced production of poly (γ -glutamic acid) from *Bacillus Licheniformis* NCIM 2324 in solid state fermentation. Ind Microbiol Biotechnol 2008,

Aislamiento y caracterización de bacterias productoras de histamina aisladas de rodaballo y besugo de acuicultura refrigerados

Inmaculada Concepción Fernández No*, Karola Böhme, Alberto Cepeda, Jorge Barros-Velázquez, Pilar Calo-Mata

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria. Universidad Santiago de Compostela Campus Universitario Norte, E-27002 Lugo, Spain
Email: jorge.barros@usc.es

El rodaballo (*Psetta maxima*) y el besugo (*Pagellus bogaraveo*) se encuentran entre las más importantes especies piscícolas en Galicia. La seguridad alimentaria durante la comercialización de ambas especies en refrigeración puede verse comprometida por la presencia y desarrollo de bacterias productoras de histamina, capaces de biosintetizar y secretar histidin Descarboxilasa al medio extracelular. El objetivo de este estudio fue investigar por primera vez la identidad de las principales especies bacterianas productoras de histamina en rodaballo y besugo procedentes de la acuicultura en Galicia. Para ello se utilizó el bioensayo de Niven y la técnica de HPLC para el cribado y confirmación de la presencia de cepas productoras de histamina, respectivamente. La identificación de las cepas productoras se realizó mediante amplificación y secuenciación de una región de 834 pb del gen 16S rDNA. De las 25 cepas bacterianas, 13 de rodaballo refrigerado y 12 de besugo refrigerado, seleccionadas preliminarmente, sólo dos cepas fueron confirmadas como productores prolíficos de histamina mediante HPLC. Así, *Pseudomonas fragi* (aislada de rodaballo) y *Pseudomonas syringae* (aislada de besugo) produjeron 272 ppm y 173 ppm de histamina respectivamente. Las secuencias presentaron una homología del 99% con respecto a otras cepas de *Pseudomonas* de su misma especie depositados en el GenBank. Además se han obtenido sus espectros de masas mediante análisis MALDI-TOF MS observando espectros específicos que permitieron su clasificación. Este trabajo confirma que el principal riesgo de formación de aminas biógenas en rodaballo y besugo de acuicultura, lo constituyen especies del género *Pseudomonas*.

Aplicación de principios bioactivos con actividad anti-listeria como conservantes de alimentos

A. Baños^{a*}, C. Núñez^a, M.J. Ruiz^a, A. Rodríguez^a, P. Abad^b, E. Guillamón^b

DMC Research Center. ^aDpto. Microbiología; ^bDpto. Química de los productos naturales. Camino de Jayena s/n. 18620 Alhendín, Granada (España). Email: abarjona@dmcrc.com

La listeriosis se ha convertido en los países desarrollados en una de las principales enfermedades emergentes de transmisión alimentaria. Es producida por *Listeria monocytogenes*, una bacteria gram-positiva ampliamente distribuida en la naturaleza, caracterizada por su especial habilidad para sobrevivir y proliferar a temperaturas de refrigeración, ambientes con reducida actividad de agua y altas concentraciones de sal.

Normalmente esta enfermedad cursa en forma de brotes asociados a la ingesta de diversos alimentos, como leche, queso, fiambres, embutidos o vegetales crudos. Su gravedad y alta letalidad exige un estricto control higiénico tanto en las instalaciones como en los productos susceptibles de ser contaminados con esta bacteria.

Las Autoridades sanitarias de la UE y EEUU recomiendan la aplicación de procesos y tratamientos que reduzcan al mínimo la presencia de *Listeria* en los alimentos. Sin embargo, actualmente no existe en el mercado una solución totalmente eficaz que asegure el control de *L. monocytogenes* en la industria. Por otro lado, la mayor demanda por parte de los consumidores de alimentos listos para su consumo, naturales y con menos aditivos químicos, obliga al sector de la conservación de alimentos a desarrollar nuevos conservantes de origen natural, inocuos y más efectivos frente a los microorganismos emergentes.

En el presente trabajo, se evaluó la actividad anti-listeria de una formulación basada en una mezcla de dos principios bioactivos: CYC-P1 y CYC-N5. Ambos productos, de naturaleza proteica, son obtenidos por síntesis microbiana en un proceso fermentativo de grado alimentario desarrollado por DMC Research Center. Además se evaluó el posible efecto sinérgico de la combinación de este formulado con extractos vegetales con actividad antimicrobiana demostrada.

Mediante la metodología *Challenge Test* se comprobó la efectividad del formulado frente a un *pool* de 30 cepas de *Listeria monocytogenes* inoculadas en distintos sistemas alimentarios: jamón cocido loncheado, chistorra fresca, queso gorgonzola y leche desnatada. Las concentraciones de partida en los alimentos fueron aproximadamente de 10^3 ufc/g. El producto se dosificó tanto en masa como en superficie mediante pulverización. Para monitorizar la evolución de *Listeria* tras los tratamientos se programó un plan de muestreo analítico a distintos tiempos establecidos y a una temperatura de conservación de 4°C.

Los datos obtenidos demostraron la eficacia de los tratamientos ensayados en el control de *Listeria monocytogenes*, tanto en aplicación en masa como en la superficie de los alimentos. En el jamón cocido se encontraron reducciones significativas de hasta 4 unidades logarítmicas respecto a los lotes control. Similares resultados se observaron en chistorra fresca con reducciones de 2 unidades logarítmicas respecto al lote sin tratar.

La aplicación de esta formulación en sistemas lácteos resultó especialmente eficaz en el control de *Listeria*, con recuentos por debajo del límite de detección de la técnica para el queso gorgonzola y ausencia completa en leche desnatada a partir de la primera semana de conservación. En todos los casos, se demostró además el efecto sinérgico de la combinación de los principios activos con los extractos naturales seleccionados.

Estos resultados demuestran que el uso de los principios bioactivos CYC-P1 y CYC-N5, solos o en combinación con extractos naturales vegetales, puede representar una excelente alternativa en el control de *Listeria monocytogenes* en la industria alimentaria.

Efecto de la expresión de la región codificadora de citocromo C fusionada a diferentes regiones 3'-UTR en levaduras

Irma Vázquez-Chico, Silvia Seoane, M^a Angeles Freire-Picos*

Facultad de Ciencias, Area de Bioquímica. Universidade da Coruña. Rua da Fraga 10, 15008 A Coruña.

Email: mafreire@udc.es

Uno de los puntos más importantes al utilizar microorganismos de cara a su aplicación biotecnológica es la posibilidad de modificar la expresión de sus genes a fin de conseguir efectos que van desde un aumento de la biomasa hasta la obtención de células recombinantes con nuevas propiedades, o la producción de un determinado fármaco.

Nuestro grupo trabaja en la modificación de la expresión génica en levaduras mediante la expresión de regiones codificadoras con variaciones de regiones 3'-UTR (3'-*UnTranslated*, o 3'-no traducidas). Utilizando como gen modelo *KICYC1*, que codifica para citocromo C en la levadura *Kluyveromyces lactis*, conseguimos modular la expresión de la proteína en función de la fase de cultivo y de modo independiente de la fuente de carbono utilizando dos porciones distintas (proximal y distal) de su propia UTR (1).

También hemos conseguido delecciones de las porciones de región 3'-UTR que afectan al los niveles de mRNA al expresarlos en una cepa carente de citocromo C de *Saccharomyces cerevisiae*, pero no afectan a la capacidad de crecimiento en medios no fermentables (2). Estas variaciones en la capacidad de crecimiento en medios no fermentables, se correlacionan tanto con los menores niveles de mRNA como con el menor nivel de proteína citocromo C determinada mediante espectros diferenciales (1). Por otro lado hemos identificado consensos en la región 3'-UTR proximal de *K. lactis* que afectan a la estabilidad del mRNA en fase logarítmica del cultivo (3).

Lo anteriormente expuesto indica que la modulación de la expresión de la región codificadora de *KICYC1* con las citadas variaciones de UTR en unos casos tiene efecto claro tanto en los niveles de mRNA como en los de proteína pero, en otros casos, las disminuciones drásticas de mRNA no se correlacionan con la expresión de proteína en *Saccharomyces*. Estos resultados reflejan la complejidad de las regiones 3'-UTR en su capacidad para modular la expresión génica. El estudio del efecto sobre metabolismo respiro-fermentativo y regulación por fase de cultivo, de las mutaciones de la 3'-UTR de *KICYC1* cuyos efectos caracterizamos en *S. cerevisiae*, expresadas en *K. lactis*, será el objeto de la discusión.

Referencias:

1. Seoane S. *et al.*, (2005) Journal of Biotechnology 118:149-156.
2. Seoane S. (2006) Tesis Doctoral, Universidade da Coruña.
- 3- Seoane *et al.*, (2008) Process Biochemistry 43: 1153-1157.

Estrategia para el desarrollo de una cepa de *S. cerevisiae* hipersecretante de péptidos portadores de dominio CBD

Sarath Gundllapalli, Isak Pretorius¹, Ricardo Cordero Otero^{2*}

¹The Australian Wine Research Institute, Adelaide, Australia

²Universidad Rovira i Virgili, Departamento de Bioquímica y Biotecnología, Tarragona, España.
Email: ricardo.cordero@urv.cat

En un estudio anterior mostramos que la fusión del dominio de unión a la celulosa (CBD2) de la celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei* a una beta-glucosidasa (BGL1) de *Saccharomycopsis fibuligera* dificultó considerablemente su expresión y secreción en *Saccharomyces cerevisiae*. Esto sugiere que la baja producción y secreción de enzimas heterólogas celulolíticas en *S. cerevisiae* se pudiera atribuir al mal procesamiento del dominio CBD presente en estas enzimas. El objetivo de este estudio fue aumentar la producción extracelular de una enzima quimérica CBD2-BGL1 (CBGL1) en *S. cerevisiae*. Para lograr este objetivo, CBGL1 fue usado como enzima reportera para seleccionar cepas mutagenizadas de *S. cerevisiae* que muestren un incremento en la secreción de enzimas fusionadas al CBD2, como se presenta en las enzimas celulolíticas de origen fúngico. Uno de los mutantes aislados presentó una actividad total de 200 U·L⁻¹. Esta actividad es tres veces superior a la que se detectó en la cepa silvestre de referencia, pero con un 50% de la actividad en la fracción intracelular. Los parámetros bioquímicos de las enzimas producidas por la cepa de referencia y por la cepa mutagenizada presentaron variaciones cinéticas poco significativas.

Hidrofilinas de *Saccharomyces cerevisiae* participan en la tolerancia al secado

Gema Isabel López-Martínez, Ricardo Cordero-Otero*

Facultad de Enología, Universidad Rovira i Virgili. C/ Marcel·li Domingo s/n, Campus Sescelades, 43007 Tarragona, España.

Email: ricardo.cordero@urv.es

Casi todas las industrias alimenticias que utilizan levaduras han ido adoptando el uso de levadura seca activa (LSA), debido a su mayor estabilidad genética a temperatura ambiente, reduciendo así costos de transporte y almacenamiento. Sin embargo, su bajo nivel de actividad demanda un mayor consumo para obtener inóculos de alta calidad. Así pues, es necesario desarrollar LSA robustas para satisfacer las exigencias de los nuevos retos de las industrias del sector. Nuestro principal tema de estudio es la tolerancia a la deshidratación por parte de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Entre los genes esenciales para superar el proceso de secado y rehidratación celular, anteriormente caracterizados en nuestro grupo, 6 de ellos pertenecen al grupo de proteínas muy hidrófilas conocidas como hidrofilinas. Las cepas mutantes *knock out* de dichos genes mostraron una baja tolerancia significativa a la deshidratación con valores de viabilidad del 30% por debajo de la cepa de referencia BY4742. De la sobreexpresión de todos los genes que codifican para hidrofilinas propias de la levadura solamente *STF2*, *SIP18*, *GRE1* y *NOP6* mostraron un incremento desde el 30% hasta el 60% de tolerancia a la deshidratación respecto a BY4742. La evaluación de los marcadores de apoptosis celular durante la imposición del estrés muestra un aumento del 30% en las células rehidratadas que acumulan compuestos ROS para las cepas BY4742 y $\Delta stf2$. Sin embargo la cepa sobreexpresante *STF2* con una viabilidad del 65% refleja una acumulación del 5% de células ROS durante el proceso de estrés. Evaluaciones posteriores sugieren que *STF2* actúa como un agente antioxidante previniendo la mortalidad celular causada por la acumulación de compuestos ROS.

Identification of seafood spoilage and pathogenic bacteria: 16S rRNA vs. MALDI-TOF MS fingerprinting analysis

Karola Böhme^{1*}, Inmaculada C. Fernández-No¹, José M. Gallardo², Jorge Barros-Velázquez¹, Benito Cañas³, Pilar Calo-Mata¹

¹Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, School of Veterinary Sciences, University of Santiago de Compostela, Rúa Carballo Calero s/n, E-27002 Lugo, Spain.

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

³Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University Complutense of Madrid, Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid, Spain.

Email: karolaboehme@gmx.de

Foodborne intoxications caused by the consumption of fish and other products of marine origin contaminated with bacterial pathogens are an ever-present threat, either due to bacteria and/or its metabolites. In addition, the rapid spoilage of seafood due to microbial activity, results in high economic losses. In order to control and minimize the microbiological hazard of foodborne pathogens and to predict and enhance shelf-life of seafood products, pathogenic and spoilage bacteria need to be identified in a rapid and unequivocal way.

In the present study, a collection of the main pathogenic and spoilage bacterial species with importance in seafood safety and quality was compiled. Bacterial strains, including reference strains from culture collections, as well as strains isolated from commercial seafood products, were analyzed by means of both, genomic and proteomic tools.

An approximately 800 bp fragment of the 16S rRNA gene was amplified by PCR and sequenced. For species identification, the obtained sequences were searched against the Genbank database (NCBI) and phylogenetic relations were studied.

Simultaneously, all strains were analyzed by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). Highly specific spectral fingerprints were obtained and final peak mass lists, containing 10-35 peak masses, were extracted. The web-based application SPECLUST was used to cluster the peak mass lists, with the aim to classify and differentiate the studied strains and to demonstrate phyloproteomic relations.

The clustering analysis by MALDI-TOF MS fingerprinting concurred with the results obtained by the genomic approach. However, we observed that, when applying genomic tools, some strains could not be identified on species level. Thus, in the case of the genera *Pseudomonas* and *Bacillus*, species identification was not always possible by sequencing the 16S rRNA gene, due to the high similarity of sequences of various species of the same genus. In contrast, the analysis by MALDI-TOF MS exhibited enough spectral differences to allow the classification of *Pseudomonas* strains, as well as *Bacillus* strains, into different groups. As a conclusion, for some bacterial species, the analysis by MALDI-TOF MS resulted to be more discriminating than the analysis based on genomic tools.

This work opens the way to the use of MALDI-TOF MS fingerprinting as an adequate, rapid and cost-effective method for the rapid identification of food pathogenic and spoilage bacteria potentially present in seafood.

Estudio de la actividad antimicrobiana de diferentes extractos de café frente a *Campylobacter jejuni*

Elisa Mingo*, Jose Manuel Silván, Miriam Amigo Benavente, M^a Dolores del Castillo, Adolfo Martínez Rodríguez

Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), CSIC-UAM. c/ Nicolás Cabrera, 9. Campus de la Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid.
Email: elisa.m@csic.es

La campilobacteriosis es, hoy en día, una de las enfermedades bacterianas asociadas al consumo de alimentos más comunes y extendidas a nivel mundial (1), lo que ha generado la necesidad de buscar nuevas estrategias sostenibles para la eliminación del patógeno responsable, *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*), de la cadena alimentaria. Entre estas estrategias, resultan especialmente atractivas aquellas que plantean el uso de compuestos fenólicos presentes en frutas y extractos vegetales (2,3). Estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación han indicado la efectividad del ácido caféico frente a *C. jejuni* (4). Investigaciones recientes sugieren que los extractos de café presentan propiedades antibacterianas frente a diferentes microorganismos patógenos atribuibles principalmente al ácido clorogénico, los derivados que de éste compuesto, que se generan durante el tostado del grano de café, y su precursor el ácido caféico (5,6). Sin embargo, en nuestro conocimiento no existen estudios previos que en los que se evalué el efecto del ácido clorogénico y de extractos ricos en este compuesto obtenidos a partir de de café verde, café tostado y cascarilla de café tostado sobre el crecimiento de *C. jejuni* que es el objeto fundamental de la presente investigación.

Los resultados obtenidos indican que el ácido clorogénico afecta el crecimiento de *C. jejuni*, de un manera dosis dependiente y que los derivados que se generan a partir de este compuesto durante el proceso de tostado del grano de café ejercen un efecto antibacteriano frente al patógeno. Investigaciones futuras permitirán identificar los compuestos generados durante el procedimiento de tostado con efecto frente a *C. jejuni*; así como, determinar la contribución individual de estos compuestos a la actividad antibacteriana total de extractos complejos de café procedentes de grano de café tostado y cascarilla de café.

Referencias:

1. Levin, R.E. (2007). *Food Biotechnol.*, 21: 271-347
2. Puupponen-Pimia et al. (2005). *J. Appl. Microbiol.* 98: 991-1000.
3. Mokbel M.S. et al. (2006). *Eur. Food Res. Tech.* 224: 39-47.
4. Ganan, M. et al. (2009). *Food Control* 20: 739-742.
5. Almeida, P. A. et al. (2006). *J. Agric. Food Chem.*, 54: 8738-8743.
6. Daglia, M. et al. (2002). *J. Agric. Food Chem.*, 50: 1225-1229.

Estudio de la especie vegetal *Ficus carica* como fuente de proteasas aspárticas destinadas a la industria láctea

Lucía Feijoo Siota*, José Miguel Araya Garay, Patricia Veiga Crespo, Trinidad de Miguel Bouzas, Tomás González Villa

Universidad de Santiago de Compostela. Dpto Microbiología. Facultad de Farmacia. Campus Sur, s/n. 15782 Santiago de Compostela.

Email: lucia.feijoo@usc.es

En nuestro laboratorio estamos buscando fuentes alternativas de enzimas coagulantes de leche procedentes de especies vegetales para su aplicación en la industria láctea. Hoy en día quesos elaborados con coagulante vegetal se pueden encontrar sobre todo en países del Mediterráneo, oeste de África y sur de Europa, siendo especialmente conocidos los quesos elaborados con flores secas de cardos del género *Cynara cardunculus* tanto en España (Casar de Cáceres, Torta del Casar, La Serena, Los Pedroches, Los Ibores, Flor de Guía) como en Portugal (Serra da Estrela, Serpa Azeitao, Nisa, Castelo Branco, Évora). El empleo de coagulantes vegetales en la elaboración de quesos produce en estos aromas, sabores y texturas novedosos, totalmente diferentes a los elaborados en las mismas condiciones con coagulantes animales o microbianos.

La mayoría de las enzimas utilizadas en la elaboración de masas queseras pertenecen al grupo de las proteasas aspárticas (EC 3.4.23). Estas proteasas son sintetizadas como preproteínas inactivas y convertidas a su forma activa por eliminación proteolítica de la preproseuencia.

Entre las especies objeto de nuestro estudio se encuentra *Ficus carica*. A pesar de que figura en la definición de coagulante vegetal: "producto de origen vegetal cuyo componente activo tiene actividad coagulante y está constituido por una o varias proteinasas, procedentes de las especies de cardo (*Cynara cardunculus*, *Cynara humilis*) e higuera (*Ficus carica*)", no hay descrita ninguna proteasa aspártica de esta especie.

Para obtener las secuencias codificantes de proteasas aspárticas de *Ficus carica* diseñamos oligonucleótidos degenerados basándonos en el alineamiento de secuencias de otras proteasas aspárticas de origen vegetal mediante el programa informático BLAST. Mediante la técnica de la RACE-PCR obtuvimos una secuencia completa de cDNA que fué analizada mediante diferentes programas bioinformáticos, verificándose que presentaba todas las características propias de proteasas aspárticas de origen vegetal. Esta secuencia, sin el fragmento correspondiente al péptido señal fue clonada en el vector de expresión bacteriano pET-21a y se inició el estudio de su expresión.

Agradecimientos: Este estudio forma parte de un proyecto de investigación que lleva por título "Reactivación de la quesería tradicional gallega mediante el uso biotecnológico de enzimas coagulantes de origen vegetal" y que está subvencionado por el Plan INCITE de la Xunta de Galicia

Selección preliminar de aislados microbianos obtenidos de quesos gallegos de leche cruda con capacidad para asimilar colesterol y/o producir ácido linoleico conjugado (CLA), empleando métodos espectrofotométricos UV/Visible

Elena María Balboa Alfaya*, Aitana Ares-Yebra, José Ignacio Garabal Sánchez

Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo, Consellería do Medio Rural, Xunta de Galicia, Apdo. 10, 15080 A Coruña. Email: jose.ignacio.garabal.sanchez@xunta.es.

El consumo excesivo de grasas saturadas causa concentraciones elevadas de colesterol en sangre, constituyendo un factor de riesgo de enfermedades coronarias y obesidad. Los productos lácteos contienen importantes cantidades de colesterol y grasa, pero también pueden aportar grasas de interés para la salud. El ácido linoleico conjugado (CLA) es un ácido graso presente en estos productos en bajas concentraciones, al que se le atribuyen acciones beneficiosas sobre la salud (acción anticarcinogénica, acción antiaterogénica, inmunomodulación y regulación de la grasa corporal). Por otra parte, aunque las cantidades de colesterol aportadas en la dieta parecen influir poco en la cantidad de colesterol total sanguíneo, una reducción de su ingesta se considera muy beneficiosa.

La modificación de la concentración de CLA en la leche o derivados puede realizarse mediante la incorporación de microorganismos capaces de producirlo durante la fase de crecimiento activo, o durante la fase estacionaria. Así mismo, los microorganismos también pueden metabolizar o modificar el colesterol de manera que éste no consiga pasar a la sangre. La inclusión de microorganismos durante la elaboración de productos lácteos fermentados o la administración como probióticos para su producción “in situ” en el huésped resulta en este sentido de gran interés. El objetivo del presente trabajo fue determinar la capacidad de producción de CLA y/o asimilación de colesterol junto con el estudio de la actividad hidrolasa de sales biliares (BSH) en 263 microorganismos aislados de quesos gallegos de leche de vaca cruda.

Los microorganismos fueron inoculados en caldos de cultivo MRS-cisteína (MRSm)/ MYGP suplementados con ácido linoleico (25 µg/mL), y en caldos MRSm-Oxgall / MYGP-Oxgall suplementados con colesterol (100 µg/mL), incubándose durante 48h a 30°C. Mediante espectrofotometría UV/Visible se cuantificó el CLA total (233 nm), así como la asimilación de colesterol (550 nm) en los sobrenadantes de cultivo de los microorganismos. Los porcentajes de conversión de ácido linoleico a CLA variaron entre las cepas desde 0 hasta 23 %. Niveles máximos de isomerización superiores al 15% fueron observados en los sobrenadantes bacterianos de *Lactococcus* spp (3), *Lactobacillus paracasei* (1), *Lb. plantarum* (1) y *Staphylococcus xylosus* (1). Mediante cromatografía de gases (GC-FID) se confirmó en los aislados con mayor grado de isomerización del ácido linoleico, la producción de las isoformas del CLA (CLA1: *cis*-9, 11-*trans* y CLA2: 10-*trans*, 12-*cis*). La suplementación de los medios bacteriológicos con colesterol originó una ligera precipitación espontánea del mismo, pero permitió detectar 34 aislados que se caracterizaron por retirar una mayor cantidad de colesterol de los sobrenadantes bacterianos; entre ellos, dos aislados (*Lc. lactis* y *Lb. plantarum*) mostraron además un buen crecimiento en presencia conjunta de 0,3% Oxgall y 0,2% de tioglicolato sódico. En ninguno de los aislados ensayados se evidenció la actividad BSH en medios bacteriológicos sólidos. En función de los datos obtenidos, se ha realizado una selección de microorganismos para ser empleados en posteriores estudios de caracterización, y con potencialidad en el desarrollo de productos funcionales con mayores contenidos de CLA y/o menor contenido en colesterol.

Agradecimientos: Este estudio ha sido financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) (proyecto RTA 2008-00117). E.M. Balboa agradece la recepción de la beca de la Xunta de Galicia durante la realización del presente trabajo.

Caracterización de la micobiota asociada a uva de Lanzarote

Sara Lorenzo Rodríguez¹, Sara S. González González², Federico Laich^{1*}

¹Instituto Canario de Investigaciones Agrarias. Ctra. El Boquerón s/n. 38270 Valle Guerra.

²Bodegas Insulares de Tenerife S. A. c/Vereda del Medio, 8B. 38350 Tacoronte. Santa Cruz de Tenerife. *Email: flaich@icia.es

Lanzarote es la isla más oriental del archipiélago Canario. Se trata de una isla volcánica, de clima árido y desértico. Junto con Fuerteventura, son las islas que poseen la menor variedad de ecosistemas. Actualmente, se distinguen ocho pisos bioclimáticos diferentes, de los 32 que se reconocen en todo el archipiélago Canario. Las diferencias entre los pisos bioclimáticos de Lanzarote se manifiestan principalmente por los valores pluviométricos, debido a que las variaciones térmicas son escasas y afectan en menor medida al bioclima. En este contexto se realiza una importante labor agrícola de secano, entre las que se destaca el cultivo de la vid. Las tres zonas vitivinícolas principales son: La Geria, Tinajo y Ye.

Durante el crecimiento de la viña, muchos hongos filamentosos pueden desarrollarse sobre las uvas. Actualmente, existe una amplia referencia bibliográfica con respecto a la distribución de los hongos potencialmente micotoxigénicos en diferentes regiones productoras de vinos del mundo. Sin embargo, en Canarias no se ha realizado hasta el momento ningún estudio de este tipo. Por tal motivo el objetivo de este trabajo fue: identificar y caracterizar la micobiota presente en uva procedente de viñedos localizados en diferentes regiones bioclimáticas de Lanzarote. Para ello se obtuvieron diez racimos al azar de Listán Negro y diez de Malvasía, a partir de ocho fincas ubicadas en las zonas vitivinícolas mencionadas anteriormente y en dos pisos bioclimáticos diferentes; inframediterráneo superior desértico oceánico árido superior (4) e inframediterráneo superior xérico oceánico semiárido inferior (5). Cada uno de los racimos se estrujó y se homogeneizó por separado, y una alícuota del mosto obtenido se sembró en placas de Petri con Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol. Se aislaron todas las colonias de hongos filamentosos que presentaron diferencias morfológicas. A cada una de ellas se le asignó un código, y se registró su presencia o ausencia en cada racimo para determinar su frecuencia de aislamiento. La identificación a nivel de género se realizó por caracteres morfológicos utilizando claves taxonómicas. En el caso del género *Aspergillus* se realizó la identificación a nivel específico a través de la secuenciación del gen de la beta-tubulina. Asimismo, se realizó una caracterización genotípica de los aislamientos de este género a través de microsatélites (ISSR).

Se obtuvieron un total de 589 aislamientos. En todas las fincas muestreadas y en ambas variedades de uva, se detectaron los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*. Asimismo *Alternaria* fue registrada en el 85% de las fincas, mientras que *Curvularia*, *Hyphopichia*, *Rhizopus*, *Neosartorya* y *Cunninghamella* se observaron en menor proporción (entre el 10 y el 45%). A través del cálculo de la frecuencia de aislamiento en cada una de las variedades, se pudo observar que *Penicillium* presentó una distribución relativamente homogénea en todas las zonas muestreadas y, asimismo, fue el género más frecuente (90% en uva tinta y 78% en uva blanca). *Alternaria* presentó una distribución similar, aunque con valores de frecuencia generalmente inferiores, detectándose en todas las zonas analizadas a excepción de las muestras de Listán Negro obtenidas en la zona de Yaiza (sur de La Geria) y de Malvasía en la zona de Ye. *Aspergillus* se observó con una alta frecuencia, aunque menor a *Penicillium*, en todas las fincas ubicadas en el piso bioclimático 4 y en ambas variedades, sin embargo, en las fincas ubicadas en el piso 5 no superó el 30%, manifestando su mayor adaptación a zonas más secas. Con respecto a este género, y a través de la secuenciación del gen de la beta-tubulina, se identificaron cinco especies; *A. carbonarius*, *A. fumigatus*, *A. tubingensis*, *A. niger* y *A. flavus*. Estas dos últimas especies se aislaron únicamente a partir del piso bioclimático 4. *A. tubingensis* fue la especie en la que se detectó la mayor variabilidad morfológica (en CYA y MEA) y genotípica (7 patrones diferentes a través del análisis por microsatélites). El resto de los géneros identificados, no presentaron ningún tipo de asociación entre la frecuencia de ais-

MAB-P11

lamiento y el bioclima, zona, o variedad de la uva, a excepción del género *Hyphopichia*, detectado únicamente en fincas ubicadas en el piso bioclimático 5 (ambiente más húmedo).

Diversidad de Bacterias Acéticas en uvas sanas procedentes de las Islas Canarias

M^a José Valera^{*1}, Diana Navarro¹, Federico Laich², Sara González³, M^a Jesús Torija¹, Estibaliz Mateo¹, Albert Mas¹

¹Universitat Rovira i Virgili, C/ Marcel·lí Domingo, s/n. Campus Sescelades. Tarragona.

²Instituto Canario de Investigaciones Agrarias. Ctra Boqueron s/n. Valle de Guerra. Santa Cruz de Tenerife. ³Bodegas Insulares S. A. Vereda del Medio, 8 Tacoronte, Santa Cruz de Tenerife.

Email: estibaliz.mateo@urv.cat

Las Islas Canarias tienen larga tradición en viticultura. El aislamiento entre islas, su edad y el hecho de estar situadas junto a la costa oeste del desierto de Sahara confiere a este entorno un alto grado de endemismo que ha sido ampliamente estudiado en cuanto a flora y fauna. Sin embargo, la población de bacterias acéticas (BA) asociadas a uvas sanas no ha sido estudiada con anterioridad. Las muestras se recogieron durante la vendimia de 2008 y 2009, en diferentes viñedos de Lanzarote, Tenerife y La Palma. Estas tres islas han sido durante siglos zonas de tradición vitícola y hoy en día es donde se concentran la mayoría de productores vinícolas del archipiélago. Además, estas islas representan una gran diversidad de hábitats, atendiendo a la población, orografía, clima y tamaño.

En el presente estudio se pretende hacer un análisis en profundidad para identificar y caracterizar genéticamente la población de BA presente en uvas sanas y que aparecen de manera detectable durante la fermentación. Las fermentaciones se realizaron en volúmenes pequeños, a partir de racimos de uvas obtenidos asépticamente de las viñas de diferentes regiones del archipiélago canario. Las variedades que se analizaron fueron Listán Blanco, Listán Negro y Malvasía. Cada microfermentación se llevó a cabo con uvas de la misma variedad y procedencia. Se tomaron muestras en diferentes momentos de fermentación recuperándose las BA por crecimiento en placa.

Se obtuvieron 513 aislamientos como posibles pertenecientes al grupo de las BA. Sólo 395 se identificaron posteriormente como BA. Todas ellas procedían de las muestras tomadas al final de las microfermentaciones.

Se identificaron colonias de seis especies diferentes. En Tenerife todas las BA pertenecían al género *Acetobacter* (*A. tropicalis*, *A. malorum*, *A. cerevisiae* y *A. pasteurianus*) y *Gluconacetobacter* (*G. saccharivorans*). En Lanzarote y La Palma no se recuperaron aislamientos de la especie *G. saccharivorans* y, además de las especies del género *Acetobacter* antes mencionadas, también se identificaron aislamientos correspondientes a la especie *Gluconobacter japonicus*. La diversidad específica calculada utilizando el índice de Simpson fue de 0,54 para el conjunto de las islas.

Para analizar la diversidad genotípica se emplearon las técnicas de tipificación ERIC-PCR y (GTG)₅-rep-PCR considerando como diferentes, aquellas colonias que presentasen un patrón distinto según una u otra técnica. El número total de patrones que se recuperaron de todas las islas fue de 64. En Tenerife se encontraron, en 2008, 10 patrones diferentes (72 aislamientos analizados), 6 aparecieron en más de un viñedo y 4 procedían exclusivamente de un viñedo. En la misma isla, en 2009, la diversidad aumentó a 32 patrones (153 aislamientos analizados) de los cuales sólo 4 se encontraron en más de un viñedo, y 28 resultaron aparecer exclusivamente en una ubicación. En Lanzarote se identificaron 4 patrones diferentes (60 aislamientos analizados) que procedían de viñedos distintos. Por último, en La Palma, se detectaron 18 patrones (110 aislamientos analizados) de los cuales sólo 2 patrones se aislaron en más de un viñedo.

Microbiota autóctona de la D. O. “Vinos de Madrid” y su potencial biotecnológico

Javier Tello*, Gustavo Cordero-Bueso, Irene Aporta, Julia Crespo, Teresa Arroyo

Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario. Autovía A2, km 38,2. 28800 Alcalá de Henares, Madrid, España. Email: teresa.arroyo@madrid.org

El uso de levaduras seleccionadas de *Saccharomyces cerevisiae* con características y comportamientos fermentativos conocidos ha mejorado el control sobre los procesos de elaboración y la calidad de los vinos. No obstante, su uso continuado ha llevado a la colonización de las bodegas donde se emplean y a la consecuente disminución de la biodiversidad microbiana autóctona de las mismas, dando como resultado una pérdida de tipicidad de los vinos producidos [1]. Por otro lado, es más que conocido que el carácter final de un vino no es sólo fruto de la acción de este microorganismo, sino que se ve modificado por la acción metabólica de diversas especies no-*Saccharomyces*, que, a su vez, pueden llegar a mejorar el proceso tecnológico a través de la síntesis de ciertas enzimas (pectinasas, proteasas, etc.) [2,3]. Así, en algunas zonas vinícolas se han llevado tareas de aislamiento y selección de cepas autóctonas con posible aptitud para la elaboración de vinos de elevada calidad y personalidad definida. En este sentido, en el presente trabajo se ha realizado el aislamiento, identificación y selección de levaduras locales con posible interés enológico en las subzonas correspondientes a la Denominación de Origen “Vinos de Madrid”.

Se han muestreado cuatro bodegas pertenecientes a la denominación “Vinos de Madrid”: una bodega ecológica situada en la subzona de San Martín, una convencional de la subzona de Navalcarnero y dos de la subzona de Arganda, una convencional y otra ecológica. Se aislaron levaduras en cinco momentos diferentes del proceso: FI (uvas), FF1 (fermentación de dichas uvas en condiciones controladas de laboratorio), FF2 (fermentación inicial en bodega), FF3 (mitad del proceso fermentativo en bodega) y FF4 (final de fermentación en bodega), obteniéndose un total de 750 aislados. La identificación a nivel molecular se llevó a cabo mediante técnicas de PCR-RFLP de la región de ITS del ADN ribosómico [4], llegándose a identificar el 90.5% de los aislados. Así, se han atribuido un total de 327 aislados a géneros no-*Saccharomyces* (*Zygosaccharomyces fermentati*, *Pichia anomala*, *Pichia toletana*, *Torulaspora delbrueckii*, *Kluyveromyces thermotolerans* y *Rhodotorula mucilaginosa*), y 352 a la especie *Saccharomyces cerevisiae*. A estas últimas se las sometió a un análisis de los microsatélites multiplex (SSR) de tres loci de microsatélites altamente polimórficos: SCR132X, YOR267C y SCPTSY7 [5] con el fin de determinar la diversidad a nivel de cepa. Los distintos genotipos encontrados fueron analizados mediante electroforesis capilar (ABI 3130 Genetic Analyzer) para determinar el tamaño de sus alelos. Estos análisis revelaron un número limitado de cepas, identificándose 27 genotipos distintos de *S. cerevisiae*. De ellos, 3 se aislaron en más de una bodega de la D.O., 21 se encontraron de manera exclusiva en alguna de las bodegas estudiadas, 2 pertenecieron a cepas comerciales que, utilizadas en distintas campañas, han llegado a colonizar la bodega, y un último genotipo perteneciente a una variedad comercial extendida por distintas zonas de la región estudiada.

En este estudio se observa la evolución de especies de levaduras a lo largo del proceso fermentativo, con predominio de la especie *S. cerevisiae*. Se han encontrado cepas que, presentes inicialmente en el viñedo, han sido capaces de dominar el proceso fermentativo frente a levaduras comerciales, lo que denota su mayor adaptación a las características de la zona. Las distintas cepas de *S. cerevisiae* y las distintas especies no-*Saccharomyces* obtenidas en esta investigación entrarán a formar parte de la colección de levaduras del IMIDRA, ampliando el banco de recursos genéticos de la región. Además, serán objeto de futuras investigaciones que incidan en su potencial enológico y tecnológico para la industria alimentaria.

Referencias:

1. Francesca *et al.*, 2010. World J. Microbiol. Biotechnol. 26, 337-351;
2. Esteve-Zarzoso *et al.*, 1998. Int. Microbiol. 1, 143-148;
3. Strauss *et al.*, 2001. J. Appl. Microbiol. 91, 182-190;
4. Granchi *et al.*, 1999. J.Appl.Microbiol. 24, 403-412;
5. Vaudano y García Moruno, 2008. Food Microbiol. 25, 56-64.

Selección de levaduras de interés biotecnológico para su aplicación en la elaboración de vinos ecológicos

Tania Balboa-Lagunero^{1*}, Teresa Arroyo¹, Juan M. Cabellos¹, Margarita Aznar^{1,2}

¹Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA), Finca "El Encín" A2 Km 38,2, 2880 Alcalá de Henares, Madrid. Email: tania.balboa@madrid.org

²Departamento de Química Analítica, grupo GUIA, Universidad de Zaragoza, M^a de Luna 3, 50018 Zaragoza.

La elaboración de vino se ha realizado durante siglos gracias a las levaduras procedentes de la superficie de las uvas y del ambiente de las bodegas. Este tipo de vinificaciones podrían garantizar una mayor tipicidad del vino, pero gracias al uso de cepas de levaduras seleccionadas se puede conseguir una mayor estandarización del proceso; ofreciendo a su vez, la exaltación de características determinadas deseables; tales como poseer capacidad de fermentar a temperaturas bajas, conducir fermentaciones con cortas fases de latencia, ser tolerantes al etanol o evitar la formación de aromas no deseados (1,2).

Los vinos ecológicos son más susceptibles de sufrir degradaciones oxidativas debido a las restricciones establecidas en su elaboración, estabilización y conservación; siendo especialmente destacable la limitación en las dosis de empleo del antiséptico y antioxidante dióxido de azufre (SO₂). Esta reducción favorece la formación de aromas de "evolución-oxidación" y la pérdida de aromas frutales y florales lo cual lleva a la disminución de su calidad organoléptica final. Los estudios de Escudero *et al.* (3) y Silva Ferreira *et al.* (4) han determinado que compuestos tales como el metional y el fenilacetaldehído, asociados a la oxidación de los vinos blancos, podían ser sintetizados bien por peroxidación directa de sus alcoholes, o bien por degradación vía Strecker de sus aminoácidos de origen; apuntando a la degradación vía Strecker como vía principal de formación; siendo, por tanto, un factor muy importante en la formación de aromas la concentración de aminoácidos presentes en los vinos.

Para mejorar y asegurar la calidad y favorecer el mercado de los vinos ecológicos, se ha iniciado, como posible alternativa, la búsqueda de levaduras que expresen propiedades de interés biotecnológico. En este sentido es de interés y objetivo principal de este estudio la selección de cepas de levaduras cuyo metabolismo minimice la producción de aminoácidos precursores de aromas negativos.

Se utilizaron 21 cepas de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* autóctonas de la D.O. "Vinos de Madrid" de la colección del IMIDRA preseleccionadas por su calidad enológica. Se realizaron fermentaciones en condiciones controladas de laboratorio en mosto sintético. Posteriormente se seleccionaron 5 cepas en base a la concentración de aminoácidos residuales, medida según el método de Hernández-Orte *et al.* (5) mediante HPLC con detección de fluorescencia y se ensayaron por triplicado mediante el mismo procedimiento de fermentación sobre mosto natural esterilizado de uva blanca. Se realizó la cuantificación de compuestos aromáticos siguiendo el protocolo de Ortega *et al.* (6) por GC-FID, de las muestras tras la fermentación alcohólica y a tiempos de 1 y 3 meses de evolución a temperatura ambiente y aireación periódica, para simular un proceso de oxidación natural. A su vez se realizó un análisis sensorial para descriptores específicos de oxidación. Tras el estudio de los resultados obtenidos se consideraron dos cepas (CLI 271 y CLI 87) como óptimas, en cuanto a la reducción de aminoácidos precursores de aromas negativos: metionina y fenilalanina y a la menor oxidación de los vinos producidos por ellas, contrastada por el análisis de su composición aromática y sensorial. Estas 2 cepas, junto con una cepa de levadura seca activa, fueron ensayadas a escala de bodega piloto con la obtención de interesantes resultados.

Referencias:

1. Carrascosa, A.V.; Muñoz, R.; González, R. *Microbiología del vino*. AMV ediciones: Madrid, 2005; 19-56.
2. Zironi R. *Vignevini* 1999, 10, 48-50.
3. Escudero, A.; Hernandez-Orte, P.; Cacho, J.; Ferreira, V. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 4268-4272.
(4) Silva Ferreira, A.; Guedes de Pinho, P.; Rodrigues, P.; Hogg, T. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 5919-5924.
4. Hernandez-Orte, P.; Ibarz, M.J.; Cacho, J.; Ferreira, V. *Chromatographia* 2003, 57, 1-7.
5. Ortega, C.; López, R.; Cacho, J.; Ferreira, V. *J. Chromatogr. A* 2001, 923, 205-214.

Nuevas tendencias en la industria enológica: selección de levaduras *No-Saccharomyces* de interés biotecnológico

Gustavo Cordero-Bueso¹, Juan Mariano Cabellos¹, Mar Gil¹, Teresa Arroyo^{1*}

¹Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural Agrario y Alimentario, Autovía A2, km. 38,2. 28800 Alcalá de Henares, Madrid, España. Email: teresa.arroyo@madrid.org

El hecho de que las levaduras no-*Saccharomyces* sean ecológicamente y metabólicamente distintas frente a los componentes del mosto, se traduce en una funcionalidad enológica propia y una incidencia importante en la composición del vino. Algunos estudios otorgan un papel significativo en el aroma del vino a las levaduras no-*Saccharomyces*, que han sido descritas como productoras de ácido acético, glicerol, acetoína y ésteres de acetato [1]. Otros autores demuestran la capacidad de estas levaduras de producir enzimas extracelulares como pectinasas o β -glucosidasas [2]. La tendencia actual se dirige hacia el uso de cultivos mixtos de levaduras seleccionadas dando lugar a vinos de calidad. Debido a esto, se requiere un profundo conocimiento de estas poblaciones, con el objetivo de evitar las posibles consecuencias indeseadas, así como explotar los beneficios que pueden contribuir en la industria alimentaria, especialmente en la enológica.

Este estudio se llevó a cabo durante cuatro años (2005-2009) con uvas de la variedad Airén de un viñedo de la D.O. "Vinos de Madrid" (España). El mosto obtenido se distribuyó en cinco depósitos de acero inoxidable de 100 litros de capacidad. Se llevó a cabo la fermentación espontánea y control de la temperatura. Las muestras para el aislamiento de levaduras se extrajeron del centro de los depósitos a diferentes valores de densidad (1090, 1085, 1060, 1030, 1010, 990 g L⁻¹). Se aislaron 30 levaduras por muestra. La identificación genética de cepas de levaduras aisladas se realizó mediante técnicas de biología molecular PCR-RFLP y PFGE [3,4]. Posteriormente se llevaron a cabo microvinificaciones en 400 ml de mosto estéril por triplicado, inoculando las cepas de las levaduras no-*Saccharomyces* previamente aisladas e identificadas a razón de 10⁶ UFC mL⁻¹. La marcha fermentativa se evaluó siguiendo la pérdida de CO₂. Una vez que la fermentación se consideró finalizada, se procedió a la determinación de diversos parámetros generales, ácidos orgánicos y análisis mediante cromatografía de gases los componentes volátiles mayoritarios y minoritarios así como la glicerina y el 2,3-butanodiol [5] así como pruebas enzimáticas [2].

Se aislaron un total de 720 colonias de levaduras, 650 correspondieron al género *Saccharomyces* y 70 a no-*Saccharomyces*. Se obtuvo un total de 13 especies pertenecientes a los géneros *Saccharomyces*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Torulaspora*, *Debaryomyces*, *Schizosaccharomyces* y *Zygosaccharomyces*. El poder fermentativo más elevado se asoció a las especies *S. pombe*, *Z. fermentati* y *T. delbrueckii*. Los valores de acidez volátil encontrados eran bajos, a excepción de *H. guilliermondii*. El glicerol formado se situó en torno a los 4 g L⁻¹ para el conjunto de las levaduras ensayadas. Las cepas que presentaron valores más elevados de 2,3-butanodiol y acetaldehído correspondieron a aquellas con mayor poder fermentativo. Las levaduras con menor capacidad fermentativa fueron generalmente las que formaron cantidades más bajas de compuestos volátiles tanto mayoritarios como minoritarios. La caracterización enológica de las cepas de levaduras aisladas indica que las levaduras no-*Saccharomyces* inciden positivamente en las características organolépticas de los vinos, a excepción de *H. guilliermondii* que eleva la acidez volátil y el acetato de etilo, entre otros compuestos. *T. delbrueckii* resultó ser una levadura apta para la fermentación y su aportación a la calidad aromática del vino para los compuestos estudiados. Cabe destacar la aportación de enzimas extracelulares de interés por parte de cepas con baja capacidad fermentativa siendo beneficiosas para la calidad del producto final.

Referencias:

1. Rojas et al., 2003. *Int. J. Food. Microbiol* 86, 181-188;
2. Arroyo et al. 2010. In: Blank et al. (Ed.), *Exp. Multidisc. Flav. Sci.* pp. 359-362.;
3. Granchi et al., 1999. *J.Appl.Microbiol* 24, 403-412;
4. Carle y Olson, 1985. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 3756-3760;
5. Gil et al., 2006. *Analy. Chim. Acta* 563, 145-153.

La microbiota intestinal de *Thorectes lusitanicus*

Noemi Hernández, Sonsoles Pacho, José Ramón Verdú, Mónica Suárez

Facultad de Veterinaria, UCM, Departamento de Sanidad Animal. Avenida Puerta de Hierro s/n, CP 28040 Madrid. Email: noherman@vet.ucm.es

Los insectos son un grupo biológico con una gran diversidad dentro de nuestro planeta. Debido a la variedad de comportamientos y hábitos de alimentación casi no existe una fuente de alimento que se escape al consumo por alguna de las especies. El estudio de la microbiota intestinal nos puede ayudar a descubrir nuevos biocatalizadores útiles para la destrucción de la biomasa, o incluso especies con enzimas interesantes en biorremediación.

En el presente trabajo se ha estudiado la microbiota de un Orden de insectos, los coleópteros, en particular la especie *Thorectes lusitanicus*. Estos escarabajos se encuentran en los bosques mediterráneos del sur de España, donde abundan los alcornoques y bellotas. Durante el otoño alterna en su dieta heces de herbívoros y bellotas. Se partió de 10 muestras de intestino de *Thorectes lusitanicus* de 1,12 g de peso medio que se homogeneizaron y se diluyeron en solución salina. Las diluciones seriadas se sembraron por duplicado en medios ricos en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis. Las placas se incubaron a 28° C durante 24-48 h. De las colonias aisladas se realizó la extracción de ADN mediante lisis por calor o bien kit de extracción *QIAmp DNA Mini Kit (50)* de *Qiagen*. Con el ADN extraído se realizó una PCR cualitativa usando primers específicos y universales del gen rRNA 16S (*forward*, 5' AAgAgTTTgATCATggCTCA y *reverse*, 5' gTTgCgCTCgTTgCgggACT).

Además, se utilizaron métodos moleculares para poder comparar la diversidad entre los individuos de las dos poblaciones, diferenciándose así las que se alimentan de excrementos y las que se alimentan de bellotas. Las técnicas elegidas fueron la electroforesis en gradiente desnaturalizante (DGGE gradiente del 30 al 70% de formamida/urea) y el clonaje (kit *Topo PCR cloning, Invitrogen*), con el fin de obtener una biblioteca de clones con el gen rRNA 16S y poder diferenciar de ese modo las diferentes especies de bacterias que habitan en el intestino. Para ello se extrajo el ADN de cada una de las muestras por el método fenol/cloroformo. Para el clonaje se utilizaron primers universales de 16S denominados 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y 1492R (5'-GGTACCTTACCTTGTTACGACTT).

Comparaciones de las 374 secuencias obtenidas con ambos métodos de investigación, nos permitieron identificar 75 especies bacterianas diferentes. Por lo tanto, las especies bacterianas mayoritarias que habitan el intestino de coleópteros pertenecen a los filos: Proteobacterias (66,3%), Firmicutes (17,1%), Bacteroidetes (9,6%) y Actinobacterias (4,3%). Entre estas bacterias analizadas se encontraron patógenos oportunistas humanos, bacterias que degradan sustancias como queratinas, compuestos aromáticos policíclicos, aceites, polisacáridos insolubles y bacterias con un alto nivel de resistencia a antimicrobianos. Ello hace que estos microorganismos resulten muy interesantes desde el punto de vista de la ecología microbiana, o incluso desde el punto de vista industrial en la depuración de aguas residuales. Además, se observaron especies que eran comunes a los dos tipos de dieta y algunas que eran específicas. La DGGE concluyó que aquellos individuos que se alimentan de excrementos poseen mayor diversidad en su microbiota intestinal.

El estudio de la microbiota intestinal de *Thorectes lusitanicus* nos indica que convive en simbiosis con bacterias que son de interés en la agricultura y en la biodegradación de ácidos orgánicos. Éste sería el caso de *Arthrobacter protophormiae*, cuya existencia se justifica por el alto contenido en compuestos aromáticos de las bellotas, pero que a su vez es capaz de degradar sustancias contaminantes como son los pesticidas.

High-redox potential laccase engineered by directed evolution in *Saccharomyces cerevisiae*

Susana Camarero^{*1,2}, Isabel Pardo², Ana Cañas^{1,2}, Patricia Molina^{1,2}, Miguel Alcalde¹

¹Instituto de Catálisis y Petroleoquímica and ²Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, Spain. *Email: susanacam@cib.csic.es

Fungal laccases, and particularly high-redox potential laccases, constitute green biocatalysts of great interest for a number of biotechnological applications due to their oxidative versatility along with their low catalytic requirements. However, their difficult expression in heterologous hosts to provide high levels of recombinant laccases⁽¹⁾, and the requirements of the industrial processes (to attain active and stable laccases under the operational conditions) have to be accomplished to achieve their implementation at industrial level.

Directed molecular evolution constitutes a powerful tool for enzyme engineering that resembles in the laboratory the key processes of natural evolution (mutation, recombination and selection). The enzyme can be evolved towards a certain property by creating complex libraries from the parental gene/s (by random mutagenesis and recombination techniques) that have to be expressed in adequate hosts. The indispensable high-throughput approach for selecting the best mutants throughout the consecutive evolution rounds is provided by means of suitable screening assays.

Here we describe the molecular engineering of the high-redox potential laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* fungus by directed molecular evolution (using *Saccharomyces cerevisiae* as host). To overcome the main bottlenecks of the process (the functional laccase expression by the yeast) the native signal peptide was replaced by the pre-proleader signal sequence of the alpha factor from *S. cerevisiae* and the whole fusion gene (α -PcL) was targeted to the evolution process⁽²⁾. The main objective of our laboratory evolution approach was to rise up the functional expression of laccase by the yeast. However, simultaneously, our strategy included the enhancement of the oxidative activity of the enzyme as a general biocatalyst. Thus, different colorimetric assays (with ABTS and 2,6-dimethoxyphenol) were tuned and validated with the aim to avoid the upgrading of laccase only for one substrate^(2,3).

After six evolution rounds total laccase activity in *S. cerevisiae* micro-cultures was remarkably improved (up to 8000-fold), including both better expression yields and enhancement of the catalytic efficiency of the enzyme, due to the successive accumulation of beneficial mutations, both in the α -factor pre-proleader and mature protein. Conserved mutations of the α -factor pre-proleader were responsible for the improvement of the functional expression of laccase in yeast. Alternatively, some beneficial mutations in the mature protein might be related either to a better secretion of laccase by *Saccharomyces* whereas others, located in the vicinity of Cu T1 site, would be responsible for the notable enhancement of the catalytic activity.

Referencias:

1. Kunamneni A., Ghazi I., Camarero S., Ballesteros A.O., Plou F.J. and Alcalde M. (2008). Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers. *Process Biochemistry* 43: 169-178.
2. Camarero S, Alcalde M, Cañas AI, Martínez AT, Martínez MJ, Plou FJ, Ballesteros A, Record E, Asther M (2008) Lacasas de alto potencial redox obtenidas por evolución dirigida (High redox-potential laccases obtained by directed evolution). Patent (Spain) application P200803322.
3. Maté D, García-Burgos C, García-Ruiz E, Ballesteros AO, Camarero S, Alcalde M (2010) Laboratory Evolution of High Redox Potential Laccases. *Chem Biol.* (in press).

Improvement of a versatile peroxidase by directed molecular evolution: functional expression and thermostabilization

Eva García-Ruiz^{1,2*}, Francisco J. Ruiz-Dueñas², Ángel T. Martínez², Miguel Alcalde^{1**}

¹Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, ICP, CSIC. Marie Curie, 2, E-28049 Madrid. Spain.

²Centro de Investigaciones Biológicas, CIB, CSIC. Ramiro de Maeztu, 9, E-24040 Madrid Spain.

****Corresponding author:** Email malcalde@icp.csic.es

Versatile Peroxidase (VP) from *Pleurotus eryngii* is a high redox potential ligninolytic enzyme which is known for exhibiting a huge catalytic promiscuity. Therefore, VP shows an enormous biotechnological potential and thus, this enzyme finds industrial applications in paper and textile processing, bioremediation, organic synthesis, nanobiotechnology and more.

The functional expression and stability of VP are desirable properties for its industrial implementation. Despite numerous efforts, the functional expression has not been successfully achieved yet. We have tackled the heterologous functional expression of VP in *Saccharomyces cerevisiae* by combining different approaches: i) replacement of the native signal leader by *S. cerevisiae* alpha-factor signal pre-proleader (generating the fusion protein α -VP), ii) optimization of fermentation conditions and iii) directed evolution of the whole fusion polypeptide α -VP to improve both secretion and thermostability. During the first four rounds of evolution, the α -VP libraries were screened for total activity enhancement (which represents the joint improvement in expression levels and specific activity). The thermostability screening assay [1] was introduced from the fourth round of evolution onwards. Two mutants were selected in the 4th generation: R4 mutant (the best total activity variant) and 24E10 mutant (the starting point for the thermostability evolution). Three further cycles of evolution were accomplished to enhance thermostability (the thermostability was assessed by the determination of the T_{50} which was defined as the temperature at which the enzyme loses 50 % of its activity following incubation for 10 min). The T_{50} was finally shifted up to 7 °C giving rise to the 2-1B mutant (with a T_{50} ~ 65°C).

Mutations accumulated through six rounds of molecular evolution culminated in several α -VP mutants with much larger improved functional expression and higher thermostability than parent type [2]. The system engineered in this work is a valuable tool to tailor novel functions in the VP by directed evolution and rational approaches.

References:

1. García-Ruiz, E., Maté, D., Ballesteros, A., Martínez, A.T., and Alcalde, M. (2010). Evolving thermostability in mutant libraries of ligninolytic oxidoreductases expressed in yeast. *Microb. Cell Fact.* 9, 17.
2. García E, Martínez MJ, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez AT, Alcalde M (2009). High redox potential peroxidases engineered by directed evolution. Patent PCT/ES2010/070316

Oily Yeast-Oleaginous cell factories

Tomás G. Villa*, José Manuel Ageitos, Lucia Blasco, Juan Andrés Vallejo, Patricia Veiga-Crespo

Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela. Campus Vida. 15782 Santiago de Compostela.

Email: tomas.gonzalez@usc.es

Oily yeasts have been described that are able to accumulate lipids more than 20% of their cellular dry weight, these yeasts represent a minor proportion, only 5% of studied yeast have been characterized as able to accumulate more than 25% of lipids. Generally, typical identified oily yeast include species belonging to the genera:

Yarrowia, Candida, Rhodotorula, Rhodosporidium, Cryptococcus, Trichosporon and *Lipomyces*. More specifically, illustrative oleaginous yeast include: *Lipomyces starkeyi*, *Rhodosporidium turuloides*, *Rhodotorula glutinis*, and *Yarrowia lipolytica*.

Yeasts do exhibit advantages for lipid production over other biological options, namely, their duplication times is usually lower than a hour, are by far less affected by season or climate than plants and are more easy scaled up than microalgae. Oily yeast can accumulate oil up to 80 % of their dry weight, these microorganisms can originate lipids from different carbon sources or lipids present in the culture media and in fact may vary their lipid composition by replacing the fatty acids included in the triglycerides, thus directly incorporating those present in the growing medium, such as those present in oil fish or conjugated oleic acid. Due to the diversity of microorganisms and growth conditions the oily yeast may be useful for the production of triglycerides, surfactants or polyunsaturated fatty acids.

References:

1. Ratledge C (2004) Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie* 86:807-815.
2. Li Q, Du W, Liu D (2008) Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol* 80:749-756.
3. Papanikolaou S, Chevalot I, Komaitis M, Aggelis G & Marc I (2002) Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* 58:308-312

pNG10A: vector para regular la expresión de genes mediada por cobre en *Myxococcus xanthus*

Nuria Gómez Santos*, Raquel García Hernández, Maria Celestina Sánchez Sutil, Juana Pérez Torres, Aurelio Moraleda Muñoz, Marina Martínez Cayuela, Elena García Bravo, José Muñoz Dorado

Universidad de Granada. Facultad de Ciencias, Departamento de Microbiología. Avda. Fuentenueva s/n. 18071 Granada.

Email: jdorado@ugr.es

El vector pNG10A ha sido diseñado para controlar la expresión de genes en *M. xanthus* mediante la adición de cobre a los medios de cultivo. Este vector es un derivado del pUC19, con un marcador de resistencia a tetraciclina y el promotor del gen *cuoA*, que controlará la expresión de los genes clonados en el vector.

La expresión de *cuoA* incrementa con la concentración de cobre, alcanzando un máximo con 800 μM de cobre durante el crecimiento vegetativo y con 60 μM de cobre durante el ciclo de desarrollo. Además, la expresión de estos genes aumenta proporcionalmente con el tiempo de incubación, obteniéndose el máximo de expresión y una meseta a las 24 horas de incubación aproximadamente (1).

Con este sistema, la expresión de un gen determinado se puede controlar y aumentar en la medida deseada incrementando la concentración de cobre en el medio de cultivo. Incluso permite determinar si un gen es esencial, ya que se puede construir un mutante de delección en fase manteniendo una copia única del gen deseado bajo el control del promotor de *cuoA*. Esta cepa será viable únicamente en presencia de cobre, y su fenotipo se puede analizar variando las concentraciones de cobre en el medio de cultivo.

Referencias:

1. Sánchez-Sutil, M.C., Gómez-Santos, N., Moraleda-Muñoz, A., Martins, L.O., Pérez, J., and Muñoz-Dorado, J. (2007) Differential expresión of the three multicopper oxidases from *Myxococcus xanthus*. J Bacterial 189, 4887-4898.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo para el estudio de proteínas de virulencia bacterianas: Interacción de la proteína SopB de *Salmonella* con Cdc42

Isabel Rodríguez-Escudero, Nadia L. Ferrer, Rafael Rotger, Víctor J. Cid, María Molina

Dpto. Microbiología II. Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense. Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid.

La levadura *S. cerevisiae* constituye un sistema eucariótico modelo para el estudio de proteínas heterólogas por su gran versatilidad, la existencia de un gran número de herramientas genéticas y su fácil manipulación. En nuestro laboratorio hemos utilizado dicho organismo para la expresión y estudio de proteínas implicadas en enfermedades humanas, como son factores de virulencia bacterianos y proteínas de la ruta de la fosfatidilinositol quinasa (PI3K), relacionada con procesos cancerosos. Dentro de los efectores bacterianos que hemos estudiado mediante su expresión heteróloga en levadura figura la fosfatidilinositol fosfatasa de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SopB. En este sistema celular, hemos descrito una interacción entre SopB y la GTPasa Cdc42, la cual se manifiesta cuando se elimina la actividad fosfatasa de la proteína bacteriana mediante mutación de residuos implicados en la catálisis. Dicha interacción implica una inhibición de la GTPasa que conduce a un bloqueo en el proceso de gemación y, por tanto, una notable toxicidad resultante de la expresión de SopB catalíticamente inactivo en la célula de levadura. La GTPasa Cdc42 humana, aunque no Rac1, también copurifica con SopB tanto cuando se coexpresan en el modelo de levadura como *in vitro*. Además, dicha interacción es independiente del estado de activación de la GTPasa puesto que ocurre igualmente sobre las versiones mutantes de Cdc42 no activable y constitutivamente activa. Aprovechando el sistema de levadura, hemos acotado la mínima región de SopB suficiente para la interacción a los 143 aminoácidos del extremo N-terminal. Además, hemos realizado una selección de mutantes puntuales de pérdida de función mediante mutagénesis al azar. Los residuos afectados en estos mutantes de SopB, correspondientes a leucinas entre las posiciones 52 y 84, se hallan conservados en IpgD, la proteína ortóloga en *Shigella/E.coli*. Dichas mutaciones puntuales impiden la unión con Cdc42 pero no afectan a la actividad fosfatasa de SopB *in vivo*. Además observamos que SopB es ubiquitinado en la célula de levadura específicamente cuando se coexpresa con Cdc42, mientras que los mutantes obtenidos pierden la capacidad de ubiquitinarse. Mediante experimentos de infección *in vitro* en líneas celulares de mamíferos, hemos observado que la replicación intracelular de las bacterias que portan dichas mutaciones en *sopB* se reduce considerablemente. Esto sugiere que la interacción de SopB con Cdc42 está implicada en la supervivencia intracelular de *Salmonella* durante el proceso infeccioso.

Toxicidad producida por los ácidos grasos de cadena media en el metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*

Anna Borrull¹, Gemma López¹, Zoel Salvadó, Ricardo Cordero¹, Nicolas Rozès^{*1}

¹Bioteχνologia Enològica, Dpt. Bioquímica i Bioteχνologia, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Campus Sescelades, C/Marcel·lí Domingo, s/n, 43007 Tarragona, Spain. Telf: 977558463. Email: nicolasrozes@urv.cat

La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, en condiciones de aerobiosis produce principalmente ácidos grasos largos insaturados y saturados. En cambio, en condiciones de anaerobiosis, con el fin de mantener su estructura celular, la levadura aumenta la producción de ácidos grasos de cadena media en sustitución de los ácidos grasos insaturados cuya síntesis está inhibida. Este hecho puede causar toxicidad celular aunque se trate de una molécula propia, e inducir una mortalidad elevada de las células.

Utilizando un lector de microplacas ELISA se caracterizó el crecimiento de la levadura sometida a distintas concentraciones de ácidos grasos de cadena media en diferentes pH. A continuación, se determinó la actividad metabólica de las células bajo los diferentes tratamientos mediante la cuantificación del CO₂ producido en un BacTrac. Estudiamos los límites de toxicidad a diferentes pH de los ácidos grasos de 6, 8, 10 y 12 carbonos. Observamos que los ácidos hexanoico y dodecanoico no causaban prácticamente toxicidad en altas concentraciones (250 mg/L), mientras que el octanoico y decanoico afectaban significativamente las células. El MIC (máxima concentración inhibitoria) y el NIC (máxima concentración no inhibitoria) obtenidos para el ácido octanoico fueron 35mg/L y 125mg/L respectivamente y para el ácido decanoico 25mg/L y 80mg/L. La mayor toxicidad se observó en los valores de pH que se corresponden con el pK de cada especie química (C8, 4,8 y C10, 4,9), disminuyendo esta para valores más alcalinos o ácidos del pK respectivo. El análisis de vitalidad celular mostró para el MIC del ácido octanoico como el decanoico una reducción de la producción de CO₂ respecto del tratamiento control del 22,2% y el 46.6% respectivamente. Sorprendentemente, la combinación de ambos ácidos restauraba la vitalidad celular a los valores de las células no tratadas.

Actualmente estamos trabajando para poder definir el mecanismo de toxicidad y de prevención de la misma en relación con los ácidos grasos de cadena media en *Saccharomyces cerevisiae*.

Inducción de la producción extracelular de radical hidroxilo en *Aspergillus nidulans* para su aplicación en la degradación de compuestos contaminantes

Ana Belén García*, Guillermo Ruiz, Raquel Moya, Maria Isabel Pérez, Maria Enriqueta Arias, Francisco Guillén

Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad de Alcalá. NII, Km. 33.6, 28871 Alcalá de Henares, Madrid. Email: anabelen.garciam@uah.es

Entre los agentes oxidantes generados en procesos fisicoquímicos, los radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) destacan por poseer un potencial de reducción muy superior al de otras especies reactivas de oxígeno. Este hecho, unido a su baja selectividad, hacen de él uno de los agentes degradativos más potentes, utilizado en la eliminación de numerosos compuestos contaminantes. La posibilidad de inducir la producción extracelular de radicales $\cdot\text{OH}$ en microorganismos ha sido demostrada recientemente en distintos hongos y bacterias ligninolíticos. La estrategia solo requiere la incubación de los microorganismos con una quinona y Fe^{3+} convenientemente quelado. En estas condiciones, la cooperación de reductasas intracelulares (QR) y enzimas ligninolíticas (lacasa y peroxidasas) lleva al establecimiento de ciclos redox de quinonas que desencadenan la producción de $\cdot\text{OH}$ en el medio extracelular. A su vez, los niveles de $\cdot\text{OH}$ generados pueden ser cuantitativamente controlados variando las condiciones de incubación como el pH, tipo de quinona o quelante del Fe^{3+} . Asimismo se ha demostrado que la estrategia descrita incrementa la capacidad degradativa de los microorganismos (Gómez-Toribio *et al.*, 2009, Appl. Environ. Microbiol. 75: 3944-3962).

En este trabajo nos propusimos comprobar la existencia de este mecanismo de producción de $\cdot\text{OH}$ en microorganismos no ligninolíticos. Concretamente, el estudio se centró en el ascomiceto *Aspergillus nidulans*. Para determinar si es posible inducir en este hongo la producción de radical $\cdot\text{OH}$ mediante un ciclo redox de quinonas, se llevó a cabo un primer experimento para comprobar si éste producía las enzimas necesarias para catalizarlo. Se realizó un cultivo de 9 días en el que se detectó únicamente la producción de QR, alcanzándose los mayores niveles a los 3 días de crecimiento. Dado que bajo las condiciones de cultivo utilizadas el hongo no produjo ninguna de las enzimas ligninolíticas, para inducir la producción de $\cdot\text{OH}$ fue necesario añadir a la mezcla de incubación un agente oxidante de las hidroquinonas que supiera la actividad de dichas enzimas. En primer lugar, se seleccionó el complejo Fe^{3+} -oxalato, que es capaz de oxidar las hidroquinonas. Como control negativo de los ensayos se utilizó el complejo Fe^{3+} -EDTA. En incubaciones de hongo de 3 días en tampón fosfato a pH 5 con 2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona (DBQ) y Fe^{3+} -oxalato se observó producción de $\cdot\text{OH}$. Experimentos similares con hongo de distintos días revelaron que la edad del cultivo no es un factor que influya en los niveles de $\cdot\text{OH}$ generados. Teniendo en cuenta estos resultados se seleccionó el tercer día de cultivo para inducir la generación de dichos radicales, por ser el día de máxima producción de QR. En segundo lugar, se optó por subir el pH de la incubación ya que a valores de pH superiores a 6 la oxidación de la 2,6-dimetoxi-1,4-benzohidroquinona (DBQH_2) se produce vía autooxidación. Así, se realizó una incubación de micelio de 3 días en tampón fosfato a pH 7 con DBQ y Fe^{3+} -EDTA. En estas incubaciones los niveles de $\cdot\text{OH}$ generados fueron mayores que cuando se utilizó oxalato como quelante del hierro.

Una vez determinado el día de cultivo y los parámetros óptimos para la inducción en *A. nidulans* de la producción de $\cdot\text{OH}$, se utilizó esta estrategia para degradar contaminantes. Para ello, se seleccionaron 8 colorantes de tipo azo como compuestos modelo de degradación. Tras una hora de tratamiento en incubaciones del hongo a pH 7 con DBQ, Fe^{3+} -EDTA y los distintos colorantes, se alcanzaron tasas de decoloración comprendidas entre el 22 y 64%. En las incubaciones blanco realizadas en ausencia de DBQ no se produjo la decoloración de ninguno

NR-P7

de los colorantes ensayados. Estos resultados permiten concluir que la inducción de $\cdot\text{OH}$ en el ascomiceto *A. nidulans* es una buena estrategia para aumentar su capacidad degradativa.

Evaluación de la degradabilidad de tintas flexográficas mediante el sistema lacasa mediador

Ursula Fillat, Susana Camarero, María Jesús Martínez

¹Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Ramiro de Maeztu 9, Madrid 28040. Spain.

El sector del papel reciclado ha experimentado un gran desarrollo en los últimos años por presentar tanto ventajas económicas como medioambientales. La mayor dificultad en el proceso de producción es la eliminación de las tintas, usualmente realizada mediante procesos de flotación y lavado¹. Aunque estos procesos son eficientes en el destintado de papel impreso con tintas offset, las nuevas tecnologías de impresión, como las tintas flexográficas, presentan problemas en el reciclado debido a su carácter hidrofílico^{2,3}. Las lacasas son enzimas que utilizan O₂ como aceptor de electrones y, bien directamente o a través de la oxidación de mediadores de baja masa molecular, pueden oxidar una gran variedad de compuestos recalcitrantes que producen problemas medioambientales⁴. El objetivo de este trabajo es evaluar el potencial de las lacasas de *Trametes villosa* y *Myceliophthora termophyla* (cedidas por Novozymes), en la degradación de diferentes tipos tintas flexográficas (Blue 1, Red 48, Violet 3 y Flexiprint Magenta HX-E, cedidas por Quimovil y Flint Group), utilizando mediadores sintéticos (HBT y ABTS) y naturales (siringaldehído, acetosiringona y ácido *p*-cumárico). Los tratamientos se han realizado a una actividad lacasa de 1 U/mL y una concentración de mediador de 500 µM, a pH 4 (tratamiento con lacasa de *T. villosa*) y pH 6 (con lacasa de *M. termophyla*).

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la mayor capacidad de la lacasa de *T. villosa* para degradar las tintas frente a la de *M. termophyla* (de menor potencial redox). La efectividad del sistema lacasa mediador va a depender tanto del mediador como del tipo de tinta. El tratamiento más efectivo correspondió a la tinta Blue 1 con lacasa de *T. villosa* y HBT (60% de degradación en 2 días). Todas las tintas ensayadas se degradaron mejor con HBT aunque con los mediadores naturales también se obtuvieron buenos resultados en las tintas Blue1 y Violet 3. En este momento se están optimizando las condiciones de tratamiento (dosis de enzimas y mediadores) con el fin de aplicar estos sistemas en los tratamientos de papel reciclado.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto PROLIPAPEL II S-2009AMB-1480 (Comunidad de Madrid). Los autores agradecen a Novozymes las muestras de lacasas y a Quimovil SA y Flint Group Iberia SA las tintas flexográficas.

Referencias:

1. Vyas, S., Lachke, A. Biodeinking of mixed office waste paper by alkaline active cellulases from alkalotolerant *Fusarium sp.* Enzyme and Microbial Technology 32 (2003) 236-245.
2. INGEDE International Association of the Deinking Industry. Facts about paper recycling. Publications by the Technical Committee Deinking 2008. En: <http://www.ingede.com/digital/digideink-publications.html> (Acceso en septiembre 2010).
3. Alesse, V., Belardi, G., Cozza, C. Deinking recycled paper with a high flexographic ink content. 2001 Tappi Journal Peer Review. 1-15.
4. Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, M. J., Martínez, A. T. (2004). Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. Appl. Environ. Microbiol. 71, 1775-1784.

Optimización de la producción de proteínas en *Streptomyces*

Laura Sevillano, Margarita Díaz y Ramón I. Santamaría*

Instituto de Microbiología Bioquímica/Departamento de Microbiología y Genética. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)/ Universidad de Salamanca, Edificio Departamental. Campus Miguel de Unamuno. 37007 Salamanca, Spain.

Email: santa@usal.es

Los microorganismos del género *Streptomyces* poseen una elevada capacidad de secreción de proteínas que puede ser empleada para producir proteínas heterólogas de interés biotecnológico. El desarrollo de este sistema no intenta substituir otros sistemas de expresión bacterianos empleados como son *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis*. Sin embargo, puede ser muy útil cuando los genes a expresar contengan alto contenido GC y cuando se requiera obtener proteínas activas en el sobrenadante. Esto se debe a *Streptomyces* no forma cuerpos de inclusión como ocurre en *E. coli* y además su actividad proteolítica es menor que en *B. subtilis*.

El objetivo de nuestro trabajo es desarrollar un conjunto de vectores estables que nos permitan la expresión óptima de las proteínas de interés en *Streptomyces*. Para ello hemos empleado distintos promotores, modificaciones de péptidos señales y varias cepas hospedadoras de *S. lividans* para optimizar el sistema. La mayor expresión de las proteínas empleadas como reporter se obtuvo con el promotor de una xilanasasa y con el promotor que controla el operón pst. El promotor pst responde a la falta de fosfato en el medio de cultivo y además ambos promotores responden a la presencia de distintas fuentes de carbono.

El empleo de cepas de *S. lividans* alteradas en la regulación catabólica así como de cepas que presentan una morfología fragmentada permitió incrementar la producción de proteínas en este organismo. Los resultados obtenidos indican que el sistema puede ser una buena plataforma de expresión para proteínas de interés industrial.

LISTA DE PARTICIPANTES

LISTA DE PARTICIPANTES

Abalde, Julio (julio.abalde@udc.es)
Abrusci, Concepción (cabrusci@cbm.uam.es)
Acién, Francisco Gabriel (facien@ual.es)
Ageitos, José Manuel (josemanuel.ageitos@gmail.com)
Alcalde, Miguel (malcalde@icp.csic.es)
Araya, José Miguel (knautico@yahoo.es)
Arias, M^a Enriqueta (enriqueta.arias@uah.es)
Arroyo, Teresa (teresa.arroyo@madrid.org)
Balboa, Elena M^a (elenamba@hotmail.com)
Balboa, Tania (taniabalboa@yahoo.es)
Ballesteros, Mercedes (m.ballesteros@ciemat.es)
Baños, Alberto (abarjona@domca.com)
Barba, Víctor (vbarba@cib.csic.es)
Barreiro, Carlos (c.barreiro@unileon.es)
Barriuso, Jorge (jbarriuso@cnb.csic.es)
Barros, Jorge (jorge.barros@usc.es)
Bautista, Luis Fernando (fernando.bautista@urjc.es)
Blánquez, Alba (alba.blanquez@gmail.com)
Böhme, Karola (karolaboehme@gmx.de)
Boltes, Ana Karina (karina.boltes@uah.es)
Borrull, Anna (anna.borrull@urv.cat)
Botas, Alma María (ambotm@unileon.es)
Bou, Jordi (jordi.bou@upc.edu)
Cabellos, Juan Mariano (jmcc6558@gmail.com)
Calo, Pilar (p.calo.mata@usc.es)
Camarero, Susana (susanacam@cib.csic.es)
Caminal, Gloria (gloria.caminal@uab.cat)
Carmona, Laura (lcarmona@itccanarias.org)
Casas, Beatriz (bcasas@cib.csic.es)
Castillo, María Belén (mariabelen.castillo@uab.cat)

Cesarini, Silvia (silviacesarini@ub.edu)
Coca, Mónica (monica@iq.uva.es)
Cordero, Gustavo (gustavo.cordero@madrid.org)
Cordero, Ricardo (ricardo.cordero@urv.cat)
de la Calle, Fernando (fdelacalle@pharmamar.com)
de la Cruz, Mercedes (mercedes.delacruz@medinaandalucia.es)
de Miranda, Bianca (biaperes04@gmail.com)
de Vicente, Antonio (adevicente@uma.es)
Deive, Francisco Javier (deive@uvigo.es)
del Peso, Gonzalo Lázaro (gonzalol.delpeso@urjc.es)
Díaz, Pilar (pdiaz@ub.edu)
Duque, Aleta (aleta.duque@ciemat.es)
Eugenio, M^a Eugenia (mariaeugenia@inia.es)
Falcón, Miguel Ángel (mafalcon@ull.es)
Feijoo, Lucía (feijoosiota@gmail.com)
Fernández, Inmaculada Concepción (ifernandezno@yahoo.es)
Fernández, María (mariafdez@uvigo.es)
Fillat, Amanda (amanda.fillat@etp.upc.edu)
Fillat, Úrsula (ufillat@cib.csic.es)
Filus, Heloisa (helo.galbiati@gmail.com)
Flórez, Ana Belén (florezana@uniovi.es)
Freire, M^a Ángeles (mafreire@udc.es)
Galera, Sara (sary_g@hotmail.com)
Garabal, José Ignacio (jose.ignacio.garabal.sanchez@xunta.es)
García, Ana Belén (anabelen.garciam@uah.es)
García, Eva (evagarcia@icp.csic.es)
García, Jordi (jordi.garcia@etp.upc.edu)
Genilloud, Olga (olga_genilloud@wanadoo.es)
Giner, Joaquín (ginerorama@gmail.com)
Gómez, Nuria (ngomez@ugr.es)
Gómez, Sara (sara.gomez@fpcm.es)
González, David (dgperez@cbm.uam.es)

González, Tomás (tom.villa@gmail.com)
Guillén, Francisco (francisco.guillen@uah.es)
Guisado, Gema M^a (gmaria@ual.es)
Guivernau, Miriam (miriam.guivernau@giroct.irta.cat)
Gullón, Sonia (sgullon@cnb.csic.es)
Gutiérrez, Pablo (pablo.gutierrez@bioenergy.abengoa.com)
Hernández, Manuel (manuel.hernandez@uah.es)
Hernández, Noemi (noe_herarranz@hotmail.com)
Horna, Dina Heidi (heidi206@hotmail.com)
Jiménez, Víctor (vicjcid@farm.ucm.es)
Jurado, Miguel (mjurado@cib.csic.es)
Laich, Federico (flaich@icia.es)
Lima-Costa, M. Emília (mcosta@ualg.pt)
Liras, Paloma (paloma.liras@unileon.es)
López, Gemma Isabel (gemmaisabel.lopez@estudiants.urv.cat)
López, Juan Antonio (lopez_gonzalez_juan@hotmail.com)
Lores, Iván (ivan.lores.ovies@gmail.com)
Lozano, Lucía Cristina (lulozano@uniandes.edu.co)
Maicas, Sergi (sergi.maicas@valencia.edu)
Manzanares, Paloma (p.manzanares@ciemat.es)
Marín, Irma (imarin@cbm.uam.es)
Márquez, M^a del Carmen (cmarquez@us.es)
Martín, Carlos (carlos@unizar.es)
Martín, Juan Francisco (jf.martin@unileon.es)
Martín, Raquel (martin.raquel@inia.es)
Martínez, Ángel (atmartinez@cib.csic.es)
Martínez, Eulalia (laia.martinez.pascual@gmail.com)
Martínez, José (peinado@bio.ucm.es)
Martínez, M^a Jesús (mjmartinez@cib.csic.es)
Maté, Diana (diana.mate@icp.csic.es)
Mérida, Javier (javier.merida@uah.es)
Mingo, Elisa (elisa.m@csic.es)
Molina, Luisa Raquel (luisaraquel.molina@um.es)

Montalbán, Blanca (ciber_blanca@hotmail.com)
Monte, Enrique (emv@usal.es)
Monteiro, Maria Candida (mcandida.monteiro@medinaandalucia.es)
Moreno, Joaquín (jcasco@ual.es)
Moya, Raquel (raquel.moya@uah.es)
Negro, María José (mariajose.negro@ciemat.es)
Orjuela, Estefanía (tefi_900129@hotmail.com)
Ortín, Juan (jortin@cnb.csic.es)
Oyanguren, Íñigo (ioyanguren@guserbiot.com)
Pablos, Jesús Luis (jesusl@ictp.csic.es)
Pastor, Francisco Javier (fpastor@ub.edu)
Pérez, M^a Isabel (misabel.perez@uah.es)
Pradas, Ana Elena (ana.elena.pradas@madrid.org)
Prieto, Alicia (aliprieto@cib.csic.es)
Prieto, M^a Auxiliadora (auxi@cib.csic.es)
Rajhi, Hayfa (hayfa_rajhi@yahoo.fr)
Ramón, Daniel (daniel.ramon@biopolis.es)
Robles, Vanesa (vanythor@hotmail.com)
Rodríguez, Isabel (Isabelre@farm.ucm.es)
Rodríguez, José Luis (joseluis.rodriguez.rama@usc.es)
Rodríguez, Juana (juana.rodriguez@uah.es)
Ronchel, Carmen (cronchel@neuronbp.com)
Rosales, Emilio (emiliiorv@uvigo.es)
Rozas, Daniel (drozas@cnb.csic.es)
Ruiz, Francisco Javier (fjruiz@cib.csic.es)
Safont, Bárbara (bsafont@alumni.unav.es)
Salas, José Antonio (jasalas@uniovi.es)
Santamaría, Ramón (santa@usal.es)
Santos-Beneit, Fernando (fsanb@unileon.es)
Seco, Elena M^a (eseco@cnb.csic.es)
Segura, Ana (ana.segura@eez.csic.es)
Sialer, Carlos Alberto (csialer@hotmail.com)
Sotres, Ana (ana.sotres@giroct.irta.cat)

Suárez, Juan Evaristo (evaristo@uniovi.es)
Temes, Carlos (carlos.temes@bruker.es)
Tobajas, M^a José (tobajasmj@cib.csic.es)
Tomé, Javier (javier.tome@fpcm.es)
Torres, Claudia Esperanza (cettorres@quim.ucm.es)
Torres, Enrique (torres@udc.es)
Valenzuela, Susana Valeria (susanavalenzuela@ub.edu)
Valera, María José (mariajose_valera_martinez@hotmail.com)
Vanegas, Javier (jvanegasg@unal.edu.co)
Vaquero, M^a Eugenia (m_e_vaquero@hotmail.com)
Vargas, M^a del Carmen (mcvargas@ual.es)
Veiga, Patricia (patricia.veiga@usc.es)
Ventosa, Antonio (ventosa@us.es)
Vicente, Gemma (gemma.vicente@urjc.es)
Vicente, María Francisca (francisca.vicente@medinaandalucia.es)
Vidal, Teresa (tvidal@etp.upc.edu)
Viñas, Marc (marc.vinas@giroct.irta.cat)
Yagüe, Paula (paula.yague@gmail.com)
Zabala, Daniel (danizabala85@hotmail.com)
Zahedi, Soraya (soraya.zahedi@uca.es)
Zumarraga, Miren (miren@guserbiot.com)

ÍNDICE DE AUTORES

INDICE DE AUTORES

Abad, J.P.	BAA-P9
Abad, P.	MAB-P3
Abalde, J.	BAA-P6, BAA-P7
Abrusci, C.	BAA-P4
Acién, F. G.	BB-O4
Adrio, J.L.	NR-O2
Ageitos, J.M.	EIB-P13, NR-P3
Alcalde, M.	NR-O1, EIB-P5, NR-P1, NR-P2
Alcon, A.	BAA-P19
Almendros, M.	BF-P9
Álvarez-Álvarez, R.	BF-P3
Amigo, M.	MAB-P8
Amin, R.	BF-P10
Aparicio, J.	BF-O5
Aporta, I.	MAB-P13
Aracri, E.	EIB-P1
Araujo, A.C.	BB-P2
Araya, J.M.	EIB-P15, MAB-P9
Ares-Yebra, A.	MAB-P10
Arévalo, M.C.	EIB-O2
Arias, M.E.	BAA-O5, BAA-P17, EIB-P2, EIB-P4, NR-P7
Arranz, R.	BF-O1
Arroyo, T.	MAB-O1, MAB-P13, MAB-P14, MAB-P15
Ayala, J.A.	BAA-P8
Aznar, M.	MAB-P14
Balboa, E.M.	MAB-P10
Balboa-Lagunero, T.	MAB-P14
Ballesteros, I.	BB-P4, BB-P8
Ballesteros, M.	BB-O1, BB-P4, BB-P8

Baños, A.	MAB-P3
Barba, V.	BF-P12
Barreiro, C.	BF-O5
Barriuso, J.	BAA-P15
Barriuso, M.	BF-P11
Barros-Velazquez, J.	MAB-O2, MAB-P2, MAB-P7
Bautista, L.F.	BB-P9
Bayón, C.	EIB-P14
Blanco, A.	BAA-P19
Blánquez, A.	BAA-O5, BAA-P17, EIB-P4
Blánquez, P.	EIB-O1, BAA-P22
Blasco, L.	EIB-P15, NR-P3
Bofill, C.	EIB-P17
Böhme, K.	MAB-O2, MAB-P2, MAB-P7
Bolado, S.	BB-P7
Boltes, K.	BAA-P5
Bonmatí, A.	BB-P1
Borrull, A.	NR-P6
Botas-Muñoz, A.	EIB-P11
Bou, J. J	MAB-P1
Britos, C.N.	BF-P9
Cabellos, J.M.	MAB-P14, MAB-P15
Calo-Mata, P.	MAB-O2, MAB-P2, MAB-P7
Calvo, L.	BAA-P5
Camarero, S.	EIB-P5, NR-P1, NR-P8
Caminal, G.	EIB-O1, BAA-P22
Campos, L.	BB-P2
Cantizani, J.	BF-P2
Cañas, A.	NR-P1
Cañas, B.	MAB-O2, MAB-P7

Cardoza, R.E.	BAA-P20
Carmona, L.	BB-O5
Carrascosa, J.L.	BF-O1
Carrero, A.	BB-P9
Castillo, B.	EIB-O1, BAA-P22
Castillo, D.	BB-P2
Castro ,E.	BB-P4
Catalina, F.	BAA-P4
Cazorla, F.M.	BAA-O3
Cepeda, A.	MAB-P2
Cesarini, S.	EIB-P17
Cid, V.J.	NR-O5, NR-P5
Coca, M.	BB-P7
Colom, J.F.	EIB-O5
Coloma, R.	BF-O1
Conthe , M.	BB-P10
Cordero-Bueso, G.	MAB-P13, MAB-P15
Cordero-Otero, R.	MAB-P5, MAB-P6, NR-P6
Corrales, T.	BAA-P4
Crespo, J.	MAB-P13
Cruz-Morató, C.	EIB-O1
Cuesta, T.	BF-P13
Da Silva, E. S.	BB-P5
De la Calle, F.	BF-O4
De la Cruz, M.	BF-P2
De la Jara, A.	BB-O5
De Miguel, T.	BF-P8, MAB-P9
De Vicente, A.	BAA-O3
Deive, F.J.	BAA-P1
Del Castillo, M.D.	MAB-P8

Del Peso, G.L.	BB-P9
Díaz, E.	BB-P10
Díaz, J.	BB-P1
Díaz, M.	NR-P9
Díaz, P.	EIB-O3, EIB-P17
Duque, A.	BB-P8
Dussán, J.	BAA-P8
Ércoli, E.	BAA-P11
Escudero, L.	BF-P13
Eugenio, M.E.	EIB-P2
Fajardo, C.	BAA-P13
Falcón, M.A.	EIB-O2
Feijoo-Siota, L.	EIB-P13, MAB-P9
Fernández, A.	BF-P1, BF-P4, BF-P6, BF-P7
Fernández, J.M.	BB-O4
Fernández, A.B.	EIB-P16
Fernández-Acero, T.	NR-O5
Fernández-Fernández, M.	EIB-P12
Fernández-Martínez, L.T.	BF-O5
Fernández-No, I.C.	MAB-O2, MAB-P2, MAB-P7
Ferrer, M.	BAA-P23
Ferrer, N.L.	NR-P5
Fillat, A.	EIB-P3
Fillat, U.	NR-P8
Florencio, F.J.	BAA-P21
Flórez, A.B.	BF-P1, BF-P7
Freijanes, K.	BB-O5
Freire-Picos, M.A.	MAB-P4
Gaju, N.	BAA-P22
Galera, S.	BB-P11

Gallardo, J.M.	MAB-O2, MAB-P7
Gallardo, O.	EIB-O3
Garabal , J.I.	MAB-P10
García, E.	NR-P4
García, E.	BAA-P5
García, A.	BAA-O2
García, A.B.	BAA-O5, BAA-P17, NR-P7
García, R.	NR-P4
García-Cubero, M.T.	BB-P7
García-Estrada, C.	BF-O5
García-Ruiz, E.	EIB-P5, NR-P2
Garcia-Ubasart, J.	EIB-O5
Garre, V.	BB-P9
Genilloud, O.	NR-O3, BF-P2
Ghai, R.	EIB-P16
Gil, M.	MAB-P15,
Gil-Díaz, M.	BAA-P13, BAA-P18
Giner-Lamia, J.	BAA-P21
Gómez, C.	BF-P4
Gómez, N.	NR-P4
Gómez, S.	BF-P9
González, A.	EIB-O2, BB-P8
González, K.	EIB-O2
González, S.	MAB-P11, MAB-P12
González Villa, T.	BF-O3, BF-P8, EIB-P13, EIB-P15, MAB-P9,NR-P3
González-Benito, G.	BB-P7
Guazzaroni, M.E.	BAA-P23
Guevara, O.	BAA-P17
Guillamón, E.	MAB-P3
Guillén, F.	BAA-O5, NR-P7

Guisado, G.	BAA-O4, BAA-P12, BAA-P14
Guivernau, M.	BAA-P3, BAA-P11, BB-P1
Gullón, S.	EIB-P7, EIB-P8
Gundllapalli, S.	MAB-P5
Gutiérrez, P.	BB-O2
Gutiérrez, S.	BAA-P20
Hernáiz, M.J.	EIB-P14
Hernández, A.	EIB-O2
Hernández, M.	BAA-O5, BAA-P17, EIB-P2, EIB-P4
Hernández, N.	MAB-P16
Horna, D.H.	BF-P4, BF-P6
Janeiro de Assunção, P.A.C.	BB-O5
Jorba, N.	BF-O1
Jurado, M.	BB-O3, BB-P5
Laich, F.	MAB-P11, MAB-P12
Lamas, J.A.	BF-P8
Letón, P.	BAA-P5
Lima-Costa, M.E.	BB-P11
Liras, P.	BF-P3, EIB-P11
Llorca, O.	BF-O1
Lobo, M.C.	BAA-P13, BAA-P18
Lombó, F.	BF-P1
Longo, M.A.	BAA-P1
López, P.	BAA-P19
López, J.A.	BAA-P12, BAA-P14
López, G.	NR-P6
López, M.J.	BAA-O4, BAA-P12, BAA-P14
López-Marín, J.	BAA-P4
López-Martínez, G.I.	MAB-P6
López-Maury, L.	BAA-P21

Lorenzo, S.	MAB-P11
Lores, I.	BAA-P23
Loulidi, G.	BAA-P9
Lozano, L.C.	BAA-P8
Lucas-Elío, P.	EIB-P10
Maicas, S.	EIB-P6
Malki, M.	BAA-P9
Malpartida, F,	BF-P13
Mancusi, A.C.	BB-P2
Manteca, A.	BF-P5
Manzanares, P.	BB-P4, BB-P8
Marco-Urrea, E.	EIB-O1
Marín, I.	BAA-P4, BAA-P9
Marín, S.	BAA-P15
Martín, C.	BF-O2
Martín, J.F.	BF-O5, BF-P10, BF-P11
Martín, M.	BAA-P13
Martín-Benito, J.	BF-O1
Martin-Cuadrado, A.B.	EIB-P16
Martínez, M.	BF-O5, BF-P5, BF-P11
Martínez, E.	BAA-P10
Martínez, A.	MAB-P8
Martínez, A. T.	EIB-O4, BB-P6, NR-P2
Martínez, M.J.	EIB-O4, BB-O3, BF-P12, BB-P5, BB-P6, NR-P8
Martínez, M.	NR-P4
Martínez-Alonso, M.	BAA-P22
Martín-Sampedro, R.	EIB-P2
Mas, A.	MAB-P12
Maté, D.	EIB-P5
Mateo, E.	MAB-P12

Mateo, J.J.	EIB-P6
Medaura, M.C.	BAA-P11
Mellado, E.	BF-P2
Méndez, C.	BF-P1, BF-P4, BF-P6, BF-P7, EIB-P4
Mendoza, H.	BB-O5
Merzouki, M.	BAA-P9
Mingo, E.	MAB-P8
Moldes, D.	EIB-P12
Molina, E.	BB-O4,
Molina, M.	NR-O5, NR-P5
Molina, P.	NR-P1
Molina-Quintero, L.R.	EIB-P10
Montalbán, B.	BAA-P13
Monte, E.	BAA-O1, BAA-P20
Monteiro, M. C.	BF-P2
Moraleda, A.	NR-P4
Morales, M.	EIB-O4
Morato, A.	BAA-P9
Moreno, J.	BAA-O4, BAA-P12, BAA-P14
Moreno-Ventas, X.	BAA-P11
Moscoso, F.	BAA-P1
Moshtaghioun, M.	EIB-P5
Moya, R.	BAA-O5, EIB-P2, EIB-P4, NR-P7
Muñoz, J.	NR-P4
Navarro, D.	MAB-P12
Negro, M.J.	BB-P4, BB-P8
Nieto, A.	EIB-P6
Nieto, C.	BF-P13
Núñez, C.	MAB-P3
Olano, C.	BF-P4

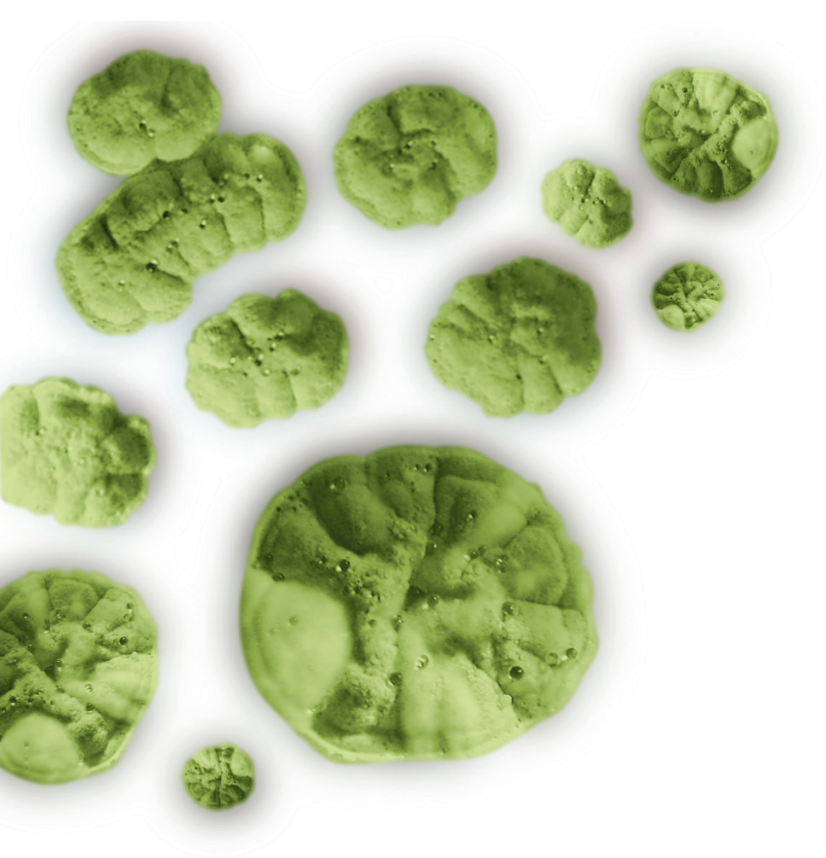
Oliva, J.M.	BB-P4, BB-P8
Orozco , A.L.	BAA-P17
Ortín, J.	BF-O1
Pablos , J. L.	BAA-P4
Pacho, S.	MAB-P16
Palomino del Castillo, C.	EIB-P8
Pardo, I.	NR-P1
Pašić, L.	EIB-P16
Pastor, F.I.J.	EIB-O3, EIB-P17
Pazos, M.M.	BAA-P2
Peinado, J.M.	BB-P11
Peláez, A.I.	BAA-P23, BF-P5
Pellizari, V.H.	BB-P2
Peñas, F.J.	BAA-P3
Pérez Mellado, R.	BAA-P15, EIB-P7, EIB-P8
Pérez, J.	NR-P4
Pérez, M.I.	BAA-O5, BAA-P17, NR-P7
Pérez-García, A.	BAA-O3
Pérez-Redondo, R.	BF-O5, EIB-P11
Pérez-Sanz, A.	BAA-P13, BAA-P18
Pradas del Real, A	BAA-P18
Prenafeta, F.X.	BAA-P3, BAA-P11
Pretorius, I.	MAB-P5
Prieto, A.	BF-P12, BB-P6
Prieto, C.	BF-O5
Prieto, F.	BB-P9
Prieto, M.A.	NR-O4
Pulido, G.	BAA-P9
Pulido, R.	NR-O5
Quintas, C.	BB-P11

Rajhi, H.	BB-P10
Ramón, D.	CCL-1
Raposo, S.	BB-P11
Reboreda, A.	BF-P8
Recuero-Checa, M.A.	BF-O1
Reetz, M.	EIB-P17
Resa-Infante, P.	BF-O1
Ribelles, P.	EIB-P9
Robles-Reglero, V.	BF-P3
Rodríguez-Conde, S.	BAA-O2
Rodrigues, M.F.A.	BB-P5
Rodríguez, J.L.	BAA-P23
Rodríguez Rama, J.L.	BF-P8, EIB-P13
Rodríguez, A.	MAB-P3
Rodríguez, I.	EIB-P9
Rodríguez, J.	BAA-O5, BAA-P17, EIB-P4
Rodríguez, R.	BB-P9
Rodríguez-Escudero, I.	NR-O5, NR-P5
Rodríguez-Frometa, R.A.	BB-P9
Rodríguez-García, A.	BF-O5, BF-P10, BF-P11, EIB-P11
Rodríguez-Rodríguez, C.	EIB-O1
Rodríguez-Valera, F.	EIB-P16
Roger, A.	MAB-P1
Roldán-Gálvez, M.	BAA-P21
Romero, L.I.	BB-P3
Roncero, M.B.	EIB-O3, EIB-O5, EIB-P3
Ronchel, C.	NR-O2
Rosales, E.	BAA-P2
Rossi, C.	BB-P2
Rotger, R.	NR-P5

Rozas, D.	EIB-P7
Rozès, N.	NR-P6
Ruiz , M.J.	MAB-P3
Ruiz, F.J.	EIB-O4, NR-P2
Ruiz, G.	NR-P7
Ruiz-Vazquez, R.M.	BB-P9
Sáez, F.	BB-P4
Safont, B.	BAA-P3
Salas, J.A.	CIN-1, BF-P1, BF-P4, BF-P6, BF-P7, EIB-P4
Salehi, Z.	BF-O5
Sales, D.	BB-P3
Salvachúa, D.	BB-P6
Salvadó, Z.	NR-P6
Samolski, I.	BAA-P20
Sánchez, J.	BAA-P23, BF-P5
Sánchez, M.C.	NR-P4
Sánchez-Amat, A.	EIB-P10
Sánchez-Porro, C.	EIB-P16
Sanmillán-Blanco, C.	EIB-P11
Sanromán, M.A.	BAA-P1, BAA-P2, EIB-P12
Santamaría, R.I.	NR-P9
Santamarta, I	BF-P3
Santos V.	BAA-P19
Santos-Beneit, F.	BF-P11
Sanz, J.L.	BB-P10
Sarrà, M.	EIB-O1
Seco, E.M.	BF-P13
Segura, A.	BAA-O2
Seoane, S.	MAB-P4
Sevillano, L.	NR-P9

Sialer, C.	BF-P6
Silván, J.M.	MAB-P8
Sinisterra, J.V.	BF-P9, EIB-P14
Sola-Landa, A.	BF-O5, BF-P10, BF-P11
Solanas, A.M.	BAA-P10
Solera del Río, R.	BB-P3
Solera, E.	BF-O5
Sotres, A.	BB-P1
Suárez, F.	BAA-O4, BAA-P12, BAA-P14
Suárez, C.	BAA-P6, BAA-P7
Suárez, J.E.	EIB-P9
Suárez, M.B.	BAA-P20
Suárez, M.	MAB-P16
Tagliavini, A.	MAB-P1
Tavares, C.	BB-P11
Tejerina, J.I.	BAA-P18
Tello, J.	MAB-P13
Tomé, J.	EIB-P14
Tomé-García, S.	BF-O3, EIB-P15
Torija, M.J.	MAB-P12
Tormo, R.	BF-P2
Torres, E.	BAA-P6, BAA-P7
Torres, E.	BAA-P19
Torres-Martínez, S.	BB-P9
Trelles, J.A.	BF-P9
Uribe, D.	BAA-P16
Valenzuela, S.V.	EIB-O3
Valera, M.J.	MAB-P12
Vallejo, J.A.	EIB-P13, NR-P3
Valls, C.	EIB-O3

Valpuesta, J.M.	BF-O1
Vanegas, J.	BAA-P16
Vargas, M.C.	BAA-O4, BAA-P12, BAA-P14
Vázquez, X.	BAA-P2
Vázquez-Chico, I.	MAB-P4
Veiga-Crespo, P.	BF-O3, EIB-P15, MAB-P9, NR-P3
Ventosa, A.	EIB-P16
Verdú, J.R.	MAB-P16
Vicent, T.	EIB-O1
Vicente, F.	BF-P2
Vicente, G.	BB-P9
Vicente, M.A.	BAA-P18
Vidal, G.	BAA-P10
Vidal, T.	EIB-O3, EIB-O5, EIB-P1, EIB-P3
Villar, J.C.	EIB-P2
Viñas, M.	BAA-P10, BAA-11, BB-P1
Vitas, A.V.	BAA-P3
Wohlleben, W.	BF-P10
Yagüe, P.	BF-P5
Zabala, D.	BF-P7
Zahedi, S.	BB-P3
Zamarreño, N.	BF-O1



ORGANIZADO POR:



ENTIDADES PATROCINADORAS:



ENTIDADES COLABORADORAS:

