

# Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana: Microorganismos y productos microbianos bioactivos

Carmen Sieiro Vázquez



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



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

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

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

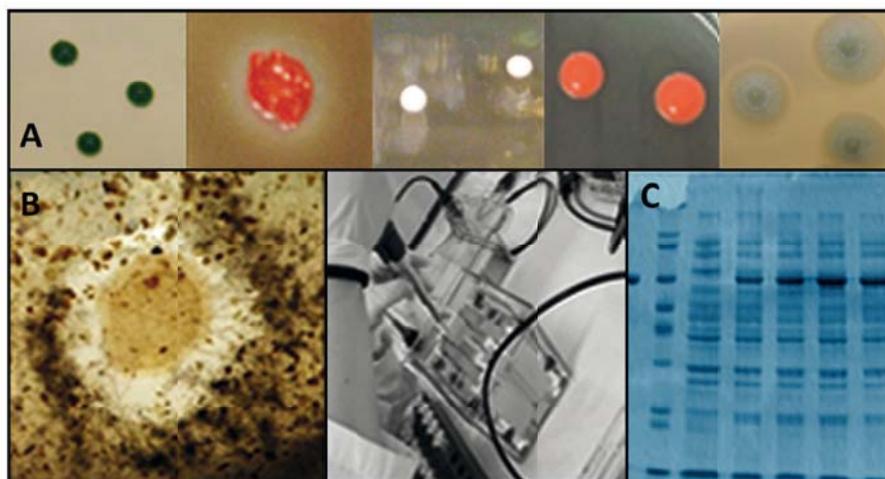
enológicas y su empleo, junto con el de las enzimas pécticas, para la mejora de la calidad de los vinos es una de las líneas de investigación desarrolladas. Estos trabajos se iniciaron con el Dr. Tomás González Villa en la Universidad de Santiago de Compostela de donde procede la investigadora principal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

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

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

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

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



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

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

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

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

## BIBLIOGRAFÍA

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

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

## NUESTRA CIENCIA

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

Informa: José Berenguer

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

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

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