

te deposits associated to spring water. *Sedimentology* 61 (1): 41-55

Pena-Poza J, Ascaso C, Sanz M, Pérez-Ortega S, Oujja M, Wierzchos J, Souza-Egipsy V, Cañamares MV, Urizal M, Castillejo M y García-Heras M. (2018). Effect of biological colonization on ceramic roofing tiles by lichens and combined laser and biocide procedure for its removal. *Int Biodeter Biodegrad* 126: 86-94.

Sanz M, Oujja M, Ascaso C, de los Ríos A, Pérez-Ortega S, Souza-Egipsy V, Wierzchos J, Speranza M y Castillejo M. (2015). Infrared and ultraviolet laser removal of crustose lichen crust dolomite heritage stone. *Appl Sur Sci* 346: 248-255.

Sanz M, Oujja M, Ascaso C, Pérez-Ortega S, Souza-Egipsy V, Fort R, de los Ríos A, Wierzchos J, Vega-Cañamares M y Castillejo M.

(2017). Wavelength effects on the laser removal of lichens on heritage stone. *Appl Sur Sci* 399: 758-768

Sohrabi M, Favero-Longo SE, Pérez-Ortega S, Ascaso C, Haghghat Z, Talebian MH, Fadaei H, de los Ríos A. (2017). Lichen colonization and associated deterioration processes in Pasargadae, UNESCO World Heritage Site, Iran. *Int Biodeter Biodegrad* 117: 171-182

Biodegradación de la lignocelulosa: una fuente de biocatalizadores para una industria sostenible

Susana Camarero, Javier Ruiz-Dueñas, Alicia Prieto, María Jesús Martínez y Ángel T. Martínez



Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC.
Ramiro de Maeztu 9, E-28040 Madrid.



Miembros del grupo (de abajo a arriba y de izquierda a derecha): Ángel T. Martínez, María Jesús Martínez, Juan Carro, María Molina, Marta Espada, Zahra Azzouz, Katrin G Kropatsch, Susana Camarero, Alicia Prieto, William D Hahn Schneider, Marta Pérez Boada, Javier Ruiz Dueñas, Jorge Barriuso, Manuel Nieto, Juan A. Mendez, Mario Saparrat, Felipe de Salas, Pablo Aza, Iván Ayuso, David Rodríguez, Gonzalo Molpeceres, Lola Linde, Laura de Eugenio, Rashid Babiker

El grupo de Biotecnología para la Biomasa Lignocelulósica (<https://bit.ly/2Fy0ITm>) liderado por los profesores María Jesús Martínez

y Ángel T. Martínez comenzó su andadura en la década de los 80 con el estudio (en colaboración con el Dr Aldo González) de los

hongos saprófitos que producen el llamado "palo podrido" (Fig. 1) en la pluvisilva chilena (Martínez *et al.*, 1995).



Figura 1. "Palo podrido": Deslignificación por *Ganoderma australe* en el Sur de Chile (foto AT Martínez)

El estudio del material degradado y de los hongos implicados llevó a demostrar que la podredumbre de la madera tenía su origen en la degradación de la lignina, un polímero aromático difícil de descomponer que actúa como soporte estructural y protege a los polisacáridos de la pared celular vegetal frente al ataque de microorganismos. Durante estos primeros años se identificaron diferentes patrones de biodegradación y se seleccionaron hongos modelo con potencial biotecnológico para el aprovechamiento de la biomasa vegetal (Camarero *et al.*, 1998). En estudios posteriores se determinó que su capacidad ligninolítica residía en la producción de oxidorreductasas extracelulares de tipo peroxidasa y oxidasa (incluyendo lacasas) capaces de actuar sinérgicamente sobre las unidades fenilpropano de la lignina y degradar también una variedad de compuestos aromáticos recalcitrantes.

El estudio de este sistema multienzimático, llevó al grupo al descubrimiento y caracterización de enzimas claves en el proceso de deslignificación de los materiales lignocelulósicos, tales como un nuevo tipo de peroxidasa ligninolítica (peroxidasa versátil) (Martínez *et al.*, 1996) o una oxidasa productora de peróxido de hidrógeno (aril-alcohol oxidasa) (Guillén *et al.*, 1992), y a demostrar la contribución de las lacasas en la oxidación de cationes metálicos y la producción de especies activas de oxígeno (Muñoz *et al.*, 1997) que, junto

con radicales de los propios productos de degradación, actúan como mediadores en la degradación oxidativa de la lignina (Cañas y Camarero, 2010).

Simultáneamente, y en paralelo con estas investigaciones básicas, el grupo ha participado en proyectos y contratos con la industria papelera y de producción de biocombustibles cuyo objetivo común es el aprovechamiento de la celulosa, previa eliminación de la lignina. Con respecto a la industria papelera, cabe destacar los buenos resultados obtenidos aplicando lacasas (en sistemas lacasa-mediador) para reducir el uso de reactivos clorados en las secuencias de blanqueo, obteniendo pastas con mayor calidad (Ibarra *et al.*, 2006). Así mismo, el empleo de lipasas (esterol esterases) contribuyó a mejorar la calidad de las pastas blanqueadas en secuencias libres de cloro, eliminando los depósitos de *pitch* originados por la acumulación de compuestos lipídicos de la madera (Calero-Rueda *et al.*, 2004). Paralelamente, con la temática de los biocombustibles, se inició el estudio de las enzimas implicadas en la degradación de los polisacáridos de la pared vegetal. Este, junto con el estudio de las lipasas versátiles, dio lugar a la línea de investigación sobre enzimas hidrolasas dirigida por las Dras. María Jesús Martínez y Alicia Prieto que pretende obtener productos de valor añadido a partir de los componentes lipídicos y polisacáridos de residuos de biomasa vegetal. En esta

línea, en los últimos años, se ha avanzado en la caracterización bioquímica, físico-química y estructural de: i) glicosidasas involucradas en la degradación/transformación de la celulosa y la hemicelulosa, y ii) lipasas versátiles capaces de actuar sobre los lípidos de la pared celular vegetal. Los estudios estructura-función de estas enzimas junto con estudios proteómicos y secretómicos, realizados en diferentes condiciones de cultivo, son esenciales para desarrollar biocatalizadores que reemplacen a los reactivos químicos en procesos industriales verdes y sostenibles. Las aplicaciones más relevantes, utilizando enzimas libres o inmovilizadas, están relacionadas con la producción de bioetanol de segunda generación (de Eugenio *et al.*, 2017) y biodiesel, de oligosacáridos prebióticos (Nieto-Domínguez *et al.*, 2017b), o de derivados de lípidos o azúcares con mayor solubilidad y actividad biológica, como ésteres de esteroides (Molina-Gutiérrez *et al.*, 2016) o nuevos glucósidos con propiedades neuroprotectoras (Nieto-Domínguez *et al.*, 2017a).

En la línea de enzimas oxidativas dirigida por los Drs. Ángel Martínez, Susana Camarero y Francisco J. Ruiz-Dueñas, durante la última década se ha profundizado en la caracterización y mejora de diferentes tipos de enzimas (peroxidasas ligninolíticas, lacasas, peroxidasas que decoloran tintes y flavo-oxidases de la familia GMC). Mediante evolución molecular dirigida o diseño racional se han obtenido enzimas recombinantes con propiedades catalíticas y/o estabilidad mejoradas. Las aproximaciones experimentales se han combinado con el diseño computacional para profundizar en el conocimiento estructura-función de dichas enzimas y al mismo tiempo contribuir al desarrollo de enzimas a la carta como biocatalizadores de reacciones de interés industrial (Pardo *et al.*, 2016; Sáez-Jiménez *et al.*, 2016; Fernández-Fueyo *et al.*, 2018). Además, estudios genómicos y secretómicos de especies de hongos cuyos genomas se han secuenciado recientemente han confirmado el papel clave de las peroxidases en la biodegradación de la lignina, fijando su origen en el Carbonífero, coincidiendo con el descenso en la acumulación de carbón en la tierra a finales de este periodo geológico (Floudas *et al.*, 2012). Así mismo, estudios paleogenéticos basados en la reconstrucción de enzimas ancestrales han permitido estudiar la evolución de las peroxidases ligninolíticas desde el Jurásico hasta

la actualidad, y han proporcionado peroxidases resucitadas de interés biotecnológico más robustas y fácilmente evolucionables (Ayuso-Fernández *et al.*, 2018).

En los últimos años, se han estudiado también nuevas enzimas fúngicas de interés, entre las que cabe destacar: i) las peroxigenasas inespecíficas, como los “biocatalizadores soñados” para reacciones de oxifuncionalización difíciles (y a veces imposibles) de llevar a cabo por procedimientos químicos; y ii) las monooxigenasas líticas de polisacáridos, como las “enzimas perdidas” en la degradación de la celulosa, por su capacidad para atacar la celulosa cristalina (Martínez *et al.*, 2017). Las primeras pueden suponer un avance cualitativo hacia una química “verde” y sostenible (Carro *et al.*, 2018), tal como se está mostrando en el proyecto europeo EnzOx2 (www.enzox2.eu) coordinado desde el grupo. Las segundas desempeñan un papel crucial en la conversión de la biomasa en la naturaleza y en la industria de las biorrefinerías. El aprovechamiento integral de la biomasa vegetal como materia prima renovable es indispensable para alcanzar el concepto de bioeconomía circular. En este contexto, si bien durante años la lignina era “el enemigo a abatir”, en los últimos años la valorización de las fracciones ricas en lignina que se generan como subproductos en la producción de bioetanol celulósico y de la industria papelera es un objetivo (bio)tecnológico prioritario. Es por eso, que uno de nuestros intereses actuales se centra en la conversión de las ligninas derivadas de la industria en productos de valor añadido (Rodríguez-Escribano *et al.*, 2017) en el marco del proyecto europeo WoodZymes (www.woodzymes.eu) coordinado desde el grupo.

- Ayuso-Fernández I, Ruiz-Dueñas FJ y Martínez AT** (2018). Evolutionary convergence in lignin degrading enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 115: 6428-33.
- Calero-Rueda O, Gutiérrez A, del Río JC, Prieto A, Plou FJ, Ballesteros A, Martínez AT y Martínez MJ** (2004). Hydrolysis of sterol esters by an esterase from *Ophiostoma piceae*: Application for pitch control in pulping of *Eucalyptus globulus* wood. *Intern J Biotechnol* 6: 367-75.
- Camarero S, Barrasa JM, Pelayo M y Martínez AT** (1998). Evaluation of *Pleurotus* species for wheat-straw biopulping. *J Pulp Paper Sci* 24: 197-203.
- Cañas AI y Camarero S** (2010). Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnol Adv* 28: 694-705.
- Carro J, Fernández-Fueyo E, Fernández-Alonso MC, Cañada FJ, Ullrich R, Hofrichter M, Alcalde M, Ferreira P y Martínez AT** (2018). Self-sustained enzymatic cascade for the production of 2,5-furandicarboxylic acid from 5-methoxymethylfurfural. *Biotechnol Biofuels* 11:86.
- de Eugenio LI, Méndez-Líter JA, Nieto-Domínguez M, Alonso L, Gil-Muñoz J, Barriuso J, Prieto A y Martínez MJ** (2017). Differential b-glucosidase expression as a function of carbon source availability in *Talaromyces amestolkiae*: a genomic and proteomic approach. *Biotechnol Biofuels* 10: 161.
- Fernández-Fueyo E, Davó-Siguero I, Almendral D, Linde D, Baratto MC, Pogni R, Romero A, Guallar V y Martínez AT** (2018). Description of a non-canonical Mn(II)-oxidation site in peroxidases. *ACS Catal* 8: 8386-95.
- Floudas D, Binder M, Riley R, Barry K, Blanchette RA, Henrissat B, Martínez AT, Otilar R, Spatafora JW, Yadav JS et al.** (2012). The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science* 336: 1715-9.
- Guillén F, Martínez AT y Martínez MJ** (1992). Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Eur J Biochem* 209: 603-11.
- Ibarra D, Camarero S, Romero J, Martínez MJ y Martínez AT** (2006). Integrating laccase-mediator treatment into an industrial-type sequence for totally chlorine free bleaching eucalypt kraft pulp. *J Chem Technol Biotechnol* 81: 1159-65.
- Martínez AT, Barrasa JM, Martínez MJ, Almendros G, Blanco M, González AE** (1995). *Ganoderma australe*: A fungus responsible for extensive delignification of some Austral hardwoods, en: Buchanan, P. K., Hseu, R. S., Moncalvo, J. M. (Eds.), *Ganoderma*. Systematics, phytopathology and pharmacology. National Taiwan University, Taipei, pp. 67-77.
- Martínez AT, Ruiz-Dueñas FJ, Camarero S, Serrano A, Linde D, Lund H, Vind J, Tovborg M, Herold-Majumdar OM, Hofrichter M et al.** (2017). Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations. *Biotechnol Adv* 35: 815-31.
- Martínez MJ, Ruiz-Dueñas FJ, Guillén F y Martínez AT** (1996). Purification and catalytic properties of two manganese-peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *Eur J Biochem* 237: 424-32.
- Molina-Gutiérrez M, Hakalin NLS, Rodríguez-Sánchez L, Prieto A y Martínez MJ** (2016). Green synthesis of b-sitostanol esters catalyzed by the versatile lipase/sterol esterase from *Ophiostoma piceae*. *Food Chem* 221: 1458-65.
- Muñoz C, Guillén F, Martínez AT y Martínez MJ** (1997). Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: Characterization, catalytic properties and participation in activation of molecular oxygen and Mn²⁺ oxidation. *Appl Environ Microbiol* 63: 2166-74.
- Nieto-Domínguez M, de Eugenio LI, Penalver P, Belmonte-Reche E, Morales JC, Poveda A, Jiménez-Barbero J, Prieto A, Plou FJ y Martínez MJ** (2017a). Enzymatic Synthesis of a Novel Neuroprotective Hydroxytyrosyl Glycoside. *J Agric Food Chem* 65: 10526-33.
- Nieto-Domínguez M, de Eugenio LI, York-Duran MJ, Rodríguez-Colinas B, Plou FJ, Chenoll E, Pardo E, Codoner F y Martínez MJ** (2017b). Prebiotic effect of xylooligosaccharides produced from birchwood xylan by a novel fungal GH11 xylanase. *Food Chem* 232: 105-13.
- Pardo I, Santiago G, Gentili P, Lucas F, Monza E, Medrano FJ, Galli C, Martínez AT, Guallar V y Camarero S** (2016). Re-designing the substrate binding pocket of laccase for enhanced oxidation of sinapic acid. *Catal Sci Technol* 6: 3900-10.
- Rodríguez-Escribano D, de Salas F, Pardo I y Camarero S** (2017). High-Throughput Screening Assay for Laccase Engineering toward Lignosulfonate Valorization. *Int J Mol Sci* 18, 1793.
- Sáez-Jiménez V, Acebes S, García-Ruiz E, Romero A, Guallar V, Alcalde M, Medrano FJ, Martínez AT y Ruiz-Dueñas FJ** (2016). Unveiling the basis of alkaline stability of an evolved versatile peroxidase. *Biochem J* 473: 1917-28.