

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

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



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



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

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

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

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

ENSAYOS REALIZADOS CON LACASAS BACTERIANAS Y SISTEMAS LACASA-MEDIADOR

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

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

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

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

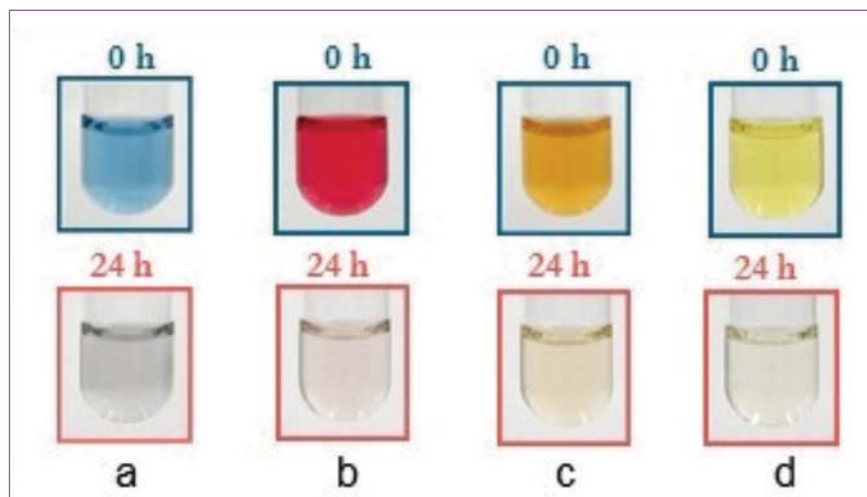


Figura 1.

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

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

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

BIO-OXIDACIÓN AVANZADA DE CONTAMINANTES

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

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

FUNCIONALIZACIÓN DE LIGNINA CON FINES BIOTECNOLÓGICOS

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



Figura 2.

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

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

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

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

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

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

BIBLIOGRAFÍA

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