

Enzimas Microbianas de Aplicación Industrial

Francisco Javier Pastor y Pilar Díaz



Departamento de Genética, Microbiología y Estadística. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona. Av. Diagonal 643. 08028 Barcelona. Tel 934034626



De arriba a abajo y de izquierda a derecha: Pau Soteras, Guillem Mas, Rubén Reina, Susana Valenzuela, Gerard Margalef, Alejandro Costa, Maddalen Rodríguez, Mónica Estupiñán, Javier Pastor, Belén Infanzón, Josefina Martínez, Cristina Valls y Pilar Díaz

El grupo de investigación “Enzimas Microbianas de Aplicación Industrial” pertenece a la Sección de Microbiología, Virología y Biotecnología del recién estrenado Departamento de Genética, Microbiología y Estadística de la Universidad de Barcelona, ubicado en la Facultad de Biología de dicha Universidad. Está coordinado por los profesores Francisco Javier Pastor y Pilar Díaz, y forman parte del mismo la profesora titular Josefina Martínez, las profesoras asociadas doctoras Susana Valenzuela y Mónica Estupiñán, así como varios estudiantes de Doctorado, Máster y Grado.

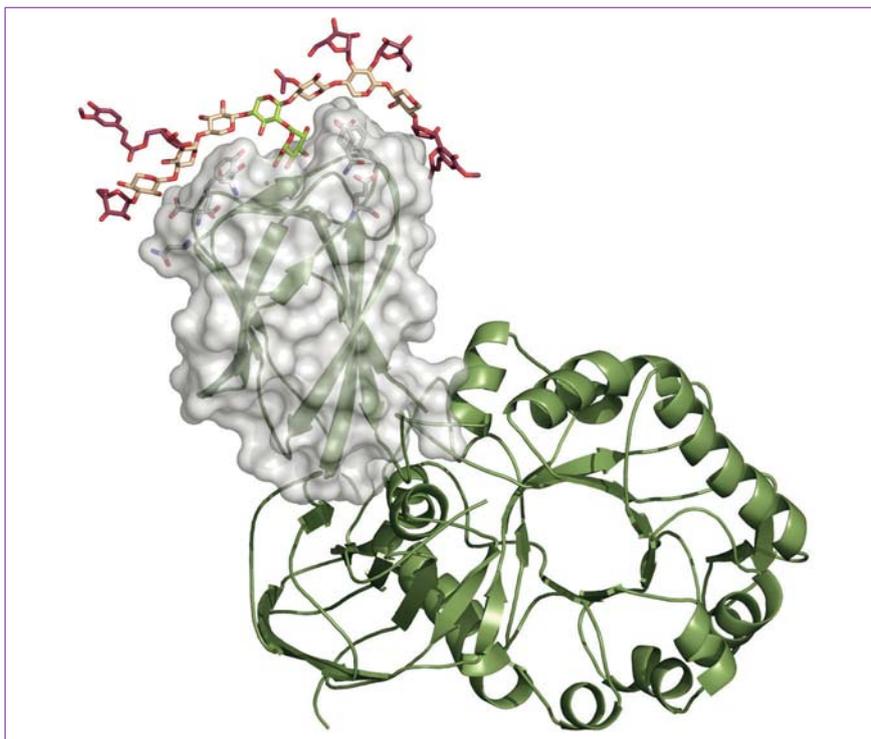
El objetivo y temática principal de investigación es la identificación y estudio de enzimas con actividad despolimerizante o modificadora de la biomasa, tanto de materiales lignocelulósicos como de naturaleza lipídica. Aparte del estudio de la biología molecular de estas enzimas, se evalúa la aplicación

de las mismas en procesos industriales de transformación de la biomasa en productos de consumo. Uno de los principales retos es el desarrollo y diseño de enzimas que minimicen el impacto ambiental de la actividad industrial, cuya introducción en los procesos productivos permita reducir la generación de contaminantes, aumente el rendimiento de las materias primas y/o posibilite la obtención de nuevos productos con propiedades y características novedosas. En definitiva, se persigue la puesta punto de Tecnologías Sostenibles mediante el uso de enzimas.

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE HIDROLASAS

La caracterización bioquímica y genética de nuevas hidrolasas con actividad sobre carbohidratos y lípidos es un aspecto fun-

damental del trabajo investigador. El grupo ha identificado y clonado numerosas carbohidratasas y lipasas a partir de cepas de la colección propia de organismos degradadores de materia orgánica. Entre las enzimas estudiadas con mayor profundidad destacan las xilanasas, de las que se dispone de una gran variedad de tipos de diferentes familias enzimáticas, estructura molecular y actividad. Recientemente se han identificado y caracterizado varias xilanasas de la familia 30 de glicosil hidrolasas (GH30), familia reciente de xilanasas, con muy pocos ejemplos descritos. La característica más notoria de las mismas es su especificidad por el glucuronoxilano, xilano de maderas duras con ramificaciones de ácido glucurónico. Los análisis cristalográficos de las xilanasas GH30 muestran el requerimiento de residuos laterales de ácido glucurónico en el xilano para su unión al centro activo de las enzimas. Los productos de hidrólisis generados por las mismas son



Estructura de la xilanasa Xyn30D de *Paenibacillus barcinonensis*. Constituida por un módulo catalítico de la familia GH30 y un módulo de unión a carbohidratos CBM35. Se muestra la unión de un xilooligosacárido ramificado.

xilooligosacáridos ácidos, de gran potencial biotecnológico como productos bioactivos. Las celulasas son un segundo grupo de carbohidratasas objeto de estudio. Se han clonado y caracterizado varias endoglucanasas y celobiohidrolasas, muchas de las cuales han mostrado un elevado sinergismo en la despolimerización de la celulosa cristalina. También, con el fin de disponer de un mayor rango de posibilidades para la obtención de productos de valor añadido a partir de materiales lignocelulósicos, recientemente se ha abordado el estudio de enzimas con actividad sobre celulosa distinta a la hidrolítica. En este campo se han identificado varias monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMOs), enzimas que rompen los enlaces glucosídicos por oxidación, y varias enzimas no despolimerizadores que modifican la superficie e interacción entre las fibras de celulosa, las denominadas expansinas.

Una clase distinta de enzimas estudiadas por el grupo de la Universidad de Barcelona son las enzimas modificadoras de lípidos, lipasas y esterases. En esta gran clase de enzimas se dispone de un gran número de ejemplos, muchos de ellos provenientes

de microorganismos aislados de hábitats tropicales o volcánicos. Como ejemplo, se han identificado dos lipasas como miembros de nuevas familias no descritas anteriormente. Además, se han realizado estudios de mejora con objeto de utilizarlas tanto en la producción de fármacos a través de la resolución enantiomérica de alcoholes terciarios como en la síntesis enzimática de biodiesel. En este sentido, un aspecto a destacar es la modificación de la especificidad de sustrato de las lipasas mediante mutagénesis por saturación, la obtención de variantes termoresistentes de lipasas por evolución dirigida, o la modificación del bolsillo catalítico (*oxyanion hole*) de dos esterases por mutagénesis dirigida. Asimismo, mediante mutagénesis por diseño racional, se ha estudiado el significado de los residuos implicados en el inusual *oxyanion hole* de tipo Y. Por último, la introducción de estudios *in silico* sobre aspectos estructurales o evolutivos de las lipasas aisladas ha permitido la identificación de dominios estructurales, regiones funcionales y motivos conservados que permiten obtener una visión acerca de los procesos evolutivos de las diferentes enzimas, considerando sus hábitats de aislamiento.

En relación a otro tipo de enzimas que actúan sobre sustratos lipídicos, se ha estudiado en profundidad el sistema diol-sintasa de *P. aeruginosa*, exclusivo de esta especie y nunca antes descrito en bacterias. Se trata de dos enzimas codificadas en un mismo operón que actúan de manera secuencial sobre el ácido oleico, generando hidroperóxido, que a su vez es convertido en el correspondiente diol. Estudios evolutivos realizados *in silico* sugieren que las dos enzimas derivan de un evento de duplicación génica con posterior neofuncionalización de una de las dos enzimas, y permiten su asignación a una nueva subfamilia de di-hemo citocromo c peroxidasas. Ello se ha confirmado mediante mutagénesis dirigida, pudiéndose identificar los residuos implicados en la actividad catalítica.

APLICACIONES EN BIOTECNOLOGÍA DE LA LIGNOCELULOSA

La evaluación del potencial biotecnológico de las enzimas caracterizadas en la modificación de la lignocelulosa permite identificar aquellas con mayor aplicabilidad industrial para la mejora de tecnologías de producción y en la obtención de productos de valor añadido a partir de la biomasa.

En este contexto se han caracterizado varias enzimas con aplicación en tecnología de fabricación de papel. Dos de las xilanasas evaluadas han mostrado elevada eficiencia en el proceso de blanqueo de pasta de papel, tanto de eucalipto como de fibras agrícolas. Es de destacar que, conjuntamente con la disminución en el consumo de blanqueantes químicos contaminantes y el aumento de blancura de las pastas, la aplicación de xilanasas puede disminuir el contenido en ácidos hexenurónicos de las pastas y por tanto contribuir a ralentizar el envejecimiento del papel. Adicionalmente a la disminución en la generación de desechos tóxicos, la aplicación de enzimas puede disminuir el consumo energético del proceso de fabricación. En concreto, se han caracterizado una endoglucanasa y una celobiohidrolasa que modifican superficialmente las fibras papeleras facilitando el refinado mecánico y permitiendo elaborar papeles menos densos pero de mayor resistencia mecánica.

La aplicación de enzimas puede facilitar la funcionalización de las fibras promoviendo

la unión de compuestos de distinto carácter y dando lugar a papeles con propiedades completamente nuevas. La modificación enzimática de las pastas papeleras posibilita la introducción de grupos funcionales para el acoplamiento de sustancias hidrofóbicas o antioxidantes que darían lugar a una nueva generación de productos basados en celulosa. En este campo se ha ensayado con éxito la obtención de papeles antimicrobianos de gran potencial en el embalaje de productos alimenticios.

BIOTRANSFORMACIÓN DE LÍPIDOS

La modificación del *oxyanion hole* de dos esterasas identificadas por el grupo ha permitido su aplicación para la resolución de mezclas racémicas de alcoholes terciarios, elementos clave para la producción de fármacos. En este sentido, se obtuvieron diversas variantes para cada una de las esterasas, que se ensayaron sobre un gran número de alcoholes terciarios. Entre las variantes enzimáticas ensayadas se encontraron dos mutantes con valores de enantioselectividad de $E > 100$, capaces de resolver complejos acetatos de alcoholes terciarios propargílicos con aplicación farmacológica.

Otra aplicación de las lipasas desarrollada recientemente hace referencia a la producción enzimática de biodiesel. Para ello se han ensayado diversas lipasas, tanto solubles como inmovilizadas, sobre sustratos de distinto origen y con calidades y composiciones variables. Se obtuvieron ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) con resultados variables en función de la enzima y las materias primas utilizadas. Cabe destacar también los resultados obtenidos en cuanto a producción de FAMES cuando se ensayaron materias primas alternativas como aceites de res-

tauración o aceites derivados de hongos. En estos casos, aunque con una productividad inferior, se pudo obtener un buen porcentaje de FAMES. Este sistema fue mejorado con la introducción de fosfolipasas, que permiten llevar a cabo el desgomado de las materias primas en la misma reacción de transesterificación, permitiendo así la implementación de un sistema de producción enzimática de biodiesel en un solo paso. Este proceso, más económico y sostenible que los existentes, ha sido adoptado actualmente por dos compañías norteamericanas (Viesel y Blue Sun) para la producción de biodiesel a escala comercial.

PUBLICACIONES SELECCIONADAS DE LOS ÚLTIMOS 5 AÑOS

Cerda-Mejía L, Valenzuela S, Frías C, Díaz P y Pastor FIJ. (2017). A bacterial GH6 cellobiohydrolase with a novel modular structure. *Appl Microbiol Biotechnol* 101: 2943-2952.

Cesarini S, Haller RF, Díaz P, Nielsen PM. (2014). Combining phospholipases and a liquid lipase for one-step biodiesel production using crude oils. *Biotechnol Biofuels* 7.

Cesarini S, Pastor FIJ, Nielsen PM y Díaz P. (2015). Moving towards a Competitive Fully Enzymatic Biodiesel Process. *Sustainability* 7: 7884-7903.

Chiriac AI, Pastor FIJ, Popa VI, Aflori M y Ciolacu D. (2014). Changes of supramolecular cellulose structure and accessibility induced by the processive endoglucanase Cel9B from *Paenibacillus barcinonensis*. *Cellulose* 21: 203-219.

Ciolacu D, Chiriac AI, Pastor FIJ y Kokol V. (2014). The influence of supramolecular structure of cellulose allomorphs on the interactions with cellulose-binding domain, CBD3b from *Paenibacillus barcinonensis*. *Bioresour Technol* 157: 14-21.

Estupiñán M, Alvarez-García D, Barril X, Díaz P y Manresa A. (2015). In Silico/In Vivo Insights into the Functional and Evolutionary Pathway of *Pseudomonas aeruginosa* Oleate-Diol Synthase. Discovery of a New Bacterial Di-Heme Cytochrome C Peroxidase Subfamily. *Plos One* 10.

Estupiñán M, Díaz P y Manresa A. (2014). Unveiling the genes responsible for the unique *Pseudomonas*

aeruginosa oleate-diol synthase activity. *BBA-Mol Cell Biol L* 1841: 1360-1371.

Fillat A, Romea P, Pastor FIJ, Urpi F y Díaz P. (2015). Kinetic resolution of esters from secondary and tertiary benzylic propargylic alcohols by an improved esterase-variant from *Bacillus* sp. BP-7. *Catal Today* 255: 16-20.

Fillat A, Gallardo O, Vidal T, Pastor FIJ, Díaz P y Roncero MB. (2012). Enzymatic grafting of natural phenols to flax fibres: Development of antimicrobial properties. *Carbohydr Polym* 87: 146-152.

García-Ubasart J, Torres AL, Vila C, Pastor FIJ y Vidal T. (2013). Biomodification of cellulose flax fibers by a new cellulase. *Ind Crop Prod* 44: 71-76.

Infanzón B, Valenzuela SV, Fillat A, Pastor FIJ y Díaz P. (2014). Unusual carboxylesterase bearing a GGG(A) X-type oxyanion hole discovered in *Paenibacillus barcinonensis* BP-23. *Biochimie* 104: 108-116.

Martínez E, Estupiñán M, Pastor FIJ, Busquets M, Díaz P y Manresa A. (2013). Functional characterization of ExFadLO, an outer membrane protein required for exporting oxygenated long-chain fatty acids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* 95: 290-298.

Panizza P, Cesarini S, Díaz P y Rodríguez-Giordano S. (2015). Saturation mutagenesis in selected amino acids to shift *Pseudomonas* sp acidic lipase Lip I.3 substrate specificity and activity. *Chem Commun* 51:1330-1333.

Sainz-Polo MA, González B, Menéndez M, Pastor FIJ y Sanz-Aparicio J. (2015). Exploring multimodularity in plant cell deconstruction. Structural analysis of Xyn10C containing the CBM22-1-CBM22-2 tandem. *J Biol Chem* 290: 17116-17130.

Sainz-Polo M A, Valenzuela SV, Pastor FIJ, González B y Sanz-Aparicio J. (2014). Structural analysis of glucuronoxylan-specific Xyn30D and its attached CBM35 domain gives insights into the role of modularity in specificity. *J Biol Chem* 289: 31088-31101.

Valenzuela SV, Ferreres G, Margalef G, y Pastor FIJ. (2017). Fast purification method of functional LPMOs from *Streptomyces ambofaciens* by affinity adsorption. *Carbohydr Res* in press.

Valenzuela SV, López S, Biely P, Sanz-Aparicio J y Pastor FIJ. (2016). The glycoside hydrolase family 8 reducing-end xylose-releasing exo-oligoxylanase Rex8A from *Paenibacillus barcinonensis* BP-23 is active on branched xylooligosaccharides. *Appl Environ Microbiol* 82: 5116-5124.

Valenzuela SV, Valls C, Roncero MB, Vidal T, Díaz P y Pastor FIJ. (2014). Effectiveness of novel xylanases belonging to different GH families on lignin and hexenuronic acids removal from specialty sisal fibres. *J Chem Technol Biot* 89: 401-406.