



Presentación del número extraordinario: Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana

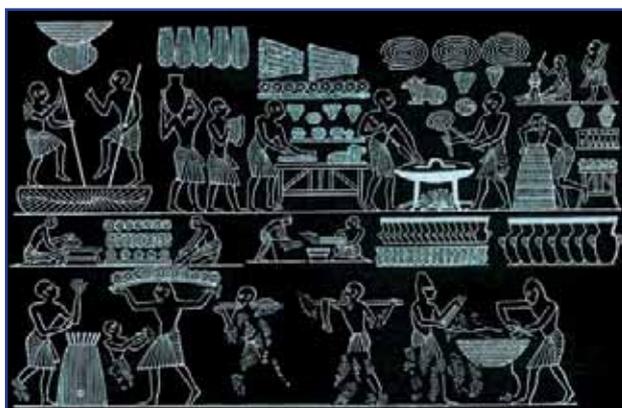
Tomás González Villa. Universidad de Santiago de Compostela. Presidente del Grupo.

A fuer de parecer irreverente me he permitido iniciar esta presentación con un pequeño párrafo que he sacado de Wikipedia al buscar para el nombre de nuestro grupo. Comienza así:

«**Microbiología industrial o biotecnología microbiana** es el ámbito de la Microbiología orientado a la producción de elementos de interés industrial mediante procesos en los cuales intervenga, en algún paso, un microorganismo. Por ejemplo, la producción de: alimentos (fermentación del vino, pan o cerveza) y suplementos dietéticos (como los cultivos de algas, vitaminas o aminoácidos); biopolímeros, como el xantano, alginato, celulosa, ácido hialurónico, polihidroxialcanoatos, bioremediación de entornos contaminados o tratamiento de desechos; así como la producción de principios activos de interés en medicina, como la insulina y hormona del crecimiento o de sustancias implicadas en el diagnóstico, como las Taq polimerasas empleadas en PCR cuantitativa».

Vemos cómo, a pesar de contener una pequeña incorrección cuando sugiere que ciertos procesos de Microbiología Industrial pueden no ser llevados a cabo por microorganismos, la sensatez del párrafo es evidente y se adapta poco más o menos a lo que cada uno de nosotros entiende por Microbiología Industrial y la proyección más moderna, sustentada en la ingeniería genética, de Biotecnología.

La Microbiología Industrial nació hace muchos miles de años con las manipulaciones de alimentos que los hombres de edades pretéritas hacían y que habían visto por incontables repeticiones prevenían la putrefacción de los mismos. Evidentemente ellos no sabían lo que ocurría pero sí aprendieron rápidamente a controlar los efectos que los microorganismos presentes en los alimentos ejercían. El capítulo de las bebidas fermentadas constituye un capítulo aparte pues su elaboración estaba ligada a aspectos especialísimos de las diferentes culturas. La cerveza y el vino comenzaron a utilizarse no hace menos de unos 9000 años y entendemos que desde Mesopotamia y Egipto se extendió a toda Eurasia. En este caso la presión selectiva que el hombre ejerció sin saberlo sobre la levadura que conduce los fenómenos fermentativos y que hoy llamamos *Saccharomyces cerevisiae* fue tal que incluso forzó la aparición de la especie taxonómica como tal.



Elaboración de pan en el Antiguo Egipto
(bajo imperio, época de Ramsés II)
(fuente. www.scientificpsychic.com).

Al principio se elaboraban vinos muy inestables debido a la mala calidad y baja acumulación de azúcar en las bayas de *Vitis* sp (de hecho los romanos recurrían frecuentemente a la adición de sal para su mantenimiento y evitar el deterioro). La selección y mejora de la vid para obtener mejores caldos ocupó mucho tiempo a los jardineros y monjes y poco a poco consiguieron nuevas variedades óptimas para la elaboración de vino. De hecho, en el siglo V ya se conocían distintos tipos de uvas y con ellas hacían los vinos blancos, tintos o dulces. La viticultura europea a partir de los siglos VI-VII, estuvo casi siempre en manos de los monasterios ya que la iglesia era una de las principales demandantes de vino para el sacramento de la Comunión. El vino era rebajado con frecuencia con agua, ya que el uso de uvas muy maduras para su elaboración daba lugar a caldos de elevada graduación (este puede ser el origen del rito cristiano de añadir agua al vino). El vino en estado puro parece que se reservaba para los bárbaros, ya que griegos y romanos pensaban que sin mezclar podía dar lugar a la aparición de enfermedades mentales.



La arqueología revela la actividad biotecnológica empírica del hombre en la antigüedad.

No cabe duda que todo lo que rodea al vino tiende a tener una gran trascendencia y no solamente por razones culturales o religiosas, sino simplemente por razones económicas ya que solamente hay una cosecha de uvas al año y si se estropeaba el caldo (o se estropea) la trascendencia a la sociedad era alta. No ocurría así con la cerveza (bebida fermentada surgida al tiempo que el vino) ya que podía prepararse en cualquier momento si se disponía de un cereal libre de aflatoxinas que pudiese germinar e iniciar así la producción de lo que con el devenir de los siglos se vino en denominar como «mosto cervecero». También en este tipo de bebida participan estirpes especiales de *S. cerevisiae* que de nuevo han sido seleccionadas por el hombre a lo largo de milenios y similares PERO diferentes de las que participan en la elaboración del vino; en este caso muchas veces resultan ser estirpes heterotálicas mientras que la mayoría de las vnicas resultan ser homotálicas. La trascendencia de esta aparentemente pequeña diferencia es, sin embargo, alta, como bien conocen todas aquellas personas que hayan trabajado con ellas. Estas pocas líneas sobre el vino que he plasmado aquí han delimitado (hoy todavía) un campo biotecnológico muy activo pues define un punto de encuentro para fisiólogos vegetales, genéticos (de plantas y levaduras), microbiólogos, bioquímicos y tecnólogos de alimentos.

Otro alimento al que no podríamos renunciar tanto cultural como nutricionalmente es el pan; a pesar de que no se sabe con exactitud los diferentes tipos de pan que se elaboran en el planeta, algunos autores lo acercan al millar, lo que sin duda da idea de la importancia que se le ha dado como alimento básico de la humanidad. Como todos sabemos éste alimento se puede catalogar en dos grandes apartados: i) panes ázimos o panes elaborados sin levadura y ii) panes elevados o fermentados. Los primeros no sufren procesos de fermentación pero los segundos se elaboran mediante el uso de las llamadas levaduras panaderas (estirpes de *S. cerevisiae*, de nuevo seleccionadas por el hombre a lo largo de milenios), capaces de fermentar oligosacáridos de las harinas de diferentes cereales y consecuentemente producir CO₂ y etanol (eliminado durante el horneado). Todas las culturas antiguas desde Mesopotamia, pasando por Egipto, Grecia y Roma conocían y guardaban

celosamente los fermentos para la elaboración del pan. Solamente en el siglo xx y lo que llevamos del actual se ha podido comprender el comportamiento bioquímico y sobre todo genético de estas estirpes de levaduras tan especiales, sin las que sin duda no dispondríamos de tantas variedades de pan. Hoy ya somos capaces, como en el caso de las bebidas fermentadas de afrontar racionalmente la mejora genética de todo este tipo de estirpes, incluso cuando se trata del dominio y mejora de caracteres poligénicos. Otro grupo de alimentos de importancia en la historia del desarrollo de la alimentación humana son los productos fermentados de la leche, denominados también derivados lácteos fermentados, debido a la acción de las bacterias del ácido láctico (BAL) tales como las especies de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* o *Leuconostoc*. El proceso origina productos con una dualidad importante, por una parte incrementa la vida útil y por otra parte mejora la digestibilidad del mismo frente a la leche. Existen evidencias que demuestran la existencia de productos fermentados de la leche ya desde hace 10.000 años. Estos aspectos de la Microbiología Industrial han generado en los últimos 50 años un campo de investigación aplicada y biotecnológica muy creativa e interesante y que como en los casos anteriores han propiciado un campo de encuentro para genéticos, expertos de producción animal, virólogos y tecnólogos de alimentos, lo que ha dado lugar a la mejora de procesos conocidos desde la antigüedad y al desarrollo de otros nuevos que han generado nuevos productos lácteos obtenidos por fermentación.

Existen muchos tipos de lácteos fermentados. Algunos de ellos son:

- Yogur
- Suero de mantequilla (EE.UU., Canadá)
- leche acidophilus (EE.UU., Canadá)
- kiselomlyako (Bulgaria)
- sauermilch o dickmilch (Alemania)
- zure melk (Países Bajos)
- lapte bătut (Rumanía)
- filmjöl o fil (Suecia)
- surmelk o kulturmelk (Noruega)
- piimä y viili (Finlandia)
- amasi (Sudáfrica)

Pero la utilidad de las BAL no acaba aquí, ya que también se utilizan en las fermentaciones secundarias de vinos (fermentación maloláctica) así como en la maduración de productos cárnicos.

El término Biotecnología -literalmente tecnología de lo vivo-, despertó en la década de los años 70, después de la reunión de Asilomar en California, un enorme interés incluso para la gente de la calle, contemplándose como una especie de piedra filosofal que iba a librarnos a los humanos de todas nuestras miserias. Sin embargo, en la última década del siglo xx comenzaron a aparecer detractores hasta alcanzar en la actualidad cotas de severo rechazo en ciertos sectores parcialmente informados de la sociedad.

ALGUNOS SECTORES DE IMPORTANCIA

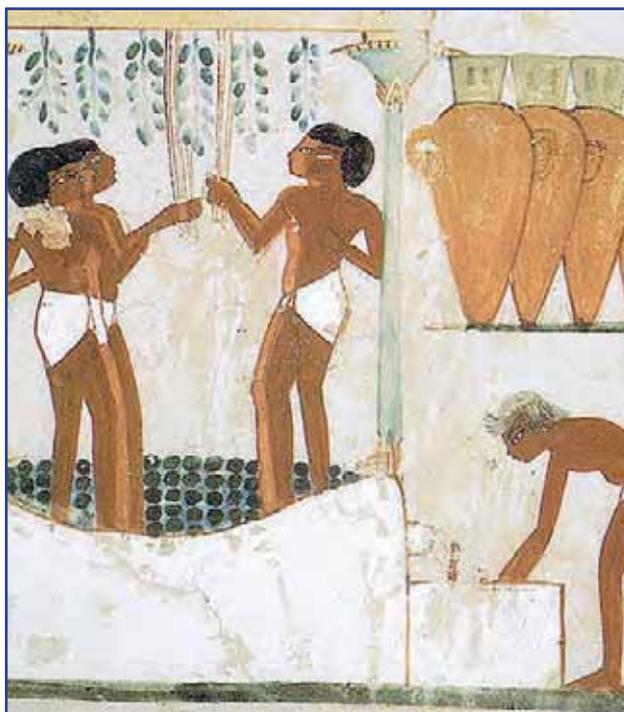
<p>Agroalimentación</p>	<p>Este es un área muy dinámica en el seno de nuestro grupo ya que posee proyecciones a medios hídricos, suelo y aire. Se pretende no solamente preservar de la mejor manera posible los ecosistemas que hemos recibido, sino de recuperar aquellos que han sido particularmente dañados (hasta hacerlos inservibles) mediante la aplicación sistemática de procesos de Microbiología Industrial y Biotecnología.</p> <p>En la actualidad se hace particular énfasis en el aprovechamiento de residuos de origen químico y de origen biológico y en el desarrollo de metodologías biológicas para la detección de contaminantes. La puesta a punto, mediante el empleo de técnicas de biología molecular, de nuevos métodos de análisis que permiten vigilar de forma continua la contaminación en los entornos naturales, así como el análisis de las comunidades microbianas y de los procesos metabólicos implicados en la eliminación de sustancias tóxicas o contaminantes están revolucionando la forma de conocer, prevenir y, en último extremo, controlar los procesos contaminantes si los hubiera.</p>
<p>Sanidad humana y animal</p>	<p>En este área los países darán prioridad a diferentes aspectos según su localización geográfica e irán encaminados a resolver los problemas relacionados con aquellas enfermedades humanas o de animales que tengan una mayor relevancia socioeconómica en las zonas en cuestión. Se desarrollarán nuevas metodologías para el diagnóstico de enfermedades, así como estrategias y métodos para la obtención de vacunas altamente protectoras de la población humana y/o animal. Por último se prevén grandes inversiones para el desarrollo de modelos para el tratamiento de enfermedades o el análisis de fármacos e identificación y caracterización molecular de dianas de acción farmacológica.</p>
<p>Medio ambiente</p>	<p>El sector agroalimentario es de especial transcendencia económica para el mundo, sin el cual no se podría alimentar a la creciente población mundial. Los países propugnan la formación en el conocimiento y adquisición de tecnologías que tienen su origen en la biología molecular y celular, con el aislamiento y caracterización de genes de interés agronómico y su utilización en el diseño de plantas transgénicas que permitan la obtención de mayor cantidad de alimentos y de nuevas estirpes capaces de colonizar ambientes degradados por la actividad industrial humana. La aplicación de las técnicas de ingeniería genética al estudio de las interacciones entre plantas y otros organismos propiciará el desarrollo de una agricultura más respetuosa con el medio ambiente. De igual manera, la utilización de técnicas de ingeniería genética en microorganismos de interés en procesos de transformación agroalimentaria así como el desarrollo de nuevas técnicas de ingeniería genética, generarán nuevas estirpes de microorganismos que presenten características de interés en la producción de alimentos, en particular en lo que hace referencia a la nutrición, estabilidad de los mismos e inocuidad.</p>

La palabra Biotecnología es en realidad vieja, a pesar de lo que normalmente se cree, ya que fue acuñada por el ingeniero húngaro Karl Ereky en 1917 para un proceso de producción en masa de cerdos, utilizando remolacha azucarera como alimento primario biotransformable. Utiliza el principal «invento» de nuestro planeta como es la célula y mediante su manipulación (microorganismos y células de plantas y animales), la Biotecnología produce bienes y servicios para la industria alimentaria, farmacéutica, química y ambiental de indudable beneficio. En el cuadro adjunto se resumen las principales ciencias convencionales que han contribuido al nacimiento de la Biotecnología, así como de macrologros del último tercio del siglo xx y perspectivas de futuro.

Un descubrimiento clave inició el cambio dramático que conocemos hoy como ingeniería genética o ADN recombinante: en 1970 Hamilton Smith y Daniel Nathans descubren una enzima (restrictrasa) capaz de reconocer y cortar el ADN en secuencias específicas, que les valió el



Diversos productos lácteos fermentados.



Premio Nobel de fisiología o medicina, compartido con Werner Arber, en 1978. Este descubrimiento (consecuencia de un hallazgo accidental, en el que los investigadores profundizaron con gran sentido) dio origen a una sucesión de nuevos descubrimientos y potenció el desarrollo de lo que hoy entendemos por Ingeniería Genética o simplemente Biotecnología que nos permite clonar cualquier gen en un virus, microorganismo, célula de animal o de plantas.

En definitiva, aunque solamente he esbozado algunos aspectos de la Microbiología Industrial y Biotecnología, que delimita el nombre de nuestro grupo especializado, no son mas que eso unas ideas para que el lector sea consciente de la amplia proyección e imbricación de la Microbiología Industrial en todas las facetas de la vida humana.

Se recogen a continuación aspectos de investigación de diversos grupos que mantienen con sus contribuciones el dinamismo de nuestro grupo.

¡Felicidades a todos!

Elaboración del vino en el antiguo Egipto en un fresco datado alrededor del 1400 A.C. (Metropolitan Museum of Art).

Fundación MEDINA - Investigación en Terapias Innovadoras a partir de Productos Naturales aislados de Microorganismos

M^a Francisca Vicente, Gerald Bills, Fernando Reyes, Olga Genilloud
Fundación MEDINA, Centro de Excelencia en Investigación de Medicamentos Innovadores en Andalucía, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avda. del Conocimiento 3, E-18100 Armilla, Granada. www.meditinaandalucia.es

La Fundación MEDINA es un consorcio público-privado sin ánimo de lucro establecido a partir de la alianza entre Merck Sharp & Dohme de España S.A. (MSD), la Junta de Andalucía y la Universidad de Granada. La Fundación está enfocada en la investigación y descubrimiento de nuevas

terapias innovadoras que permitan dar respuesta a necesidades médicas no cubiertas.

En el año 2008 la Fundación MEDINA se ha establecido en el Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud en Granada a partir del proyecto desarrollado en el antiguo Centro de In-



Miembros del grupo de la Fundación MEDINA.

investigación Básica de Merck Sharp & Dohme de España (CIBEMSD) en Madrid. El equipo actual de MEDINA procede en su gran parte de uno de los más antiguos Programas de Descubrimiento de fármacos a partir de productos naturales de la industria farmacéutica y que durante sus más de 50 años de existencia dentro la división de investigación de Merck (Merck Research Laboratories) ha contribuido como uno de los centros con mayor éxito en cuanto al número de productos en el mercado procedentes de sus líneas de investigación.

MEDINA se ha consolidado como un nuevo Centro de Excelencia para la investigación y desarrollo en el descubrimiento de fármacos sobre la base del conocimiento, la tecnología y el equipamiento transferidos desde MSD, así como sobre la experiencia de una buena parte de su personal con una larga trayectoria anterior en dicha compañía. El equipo de investigación actual de la Fundación ha sido reclutado tanto desde la empresa farmacéutica como del sector biotecnológico y del académico, y opera como un equipo multidisciplinar con amplia experiencia en biología molecular y celular, microbiología clínica e industrial, informática y automatización, gestión de librerías de compuestos, y química analítica y de productos naturales.

Esta experiencia ha podido ser complementada y enriquecida a través de las oportunidades de colaboración con empresas biotecnológicas, grupos académicos e Institutos de Investigación Sanitarios en Andalucía que ofrece el Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, una red de investigación única en Andalucía para favorecer las posibilidades de interacción y desarrollo de una investigación traslacional en la clínica.

DESCUBRIMIENTO DE FÁRMACOS A PARTIR DE PRODUCTOS NATURALES

La principal misión de la Fundación MEDINA como centro de investigación consiste en responder a necesidades

médicas no cubiertas en áreas prioritarias para la salud mediante el descubrimiento de terapias innovadoras, y en especial de nuevos candidatos a fármacos a partir de compuestos de origen microbiano. MEDINA es líder en el desarrollo de fármacos a partir de moléculas de origen microbiano, y es una referencia internacional en el campo de los productos naturales para las instituciones académicas y el sector industrial.

La Fundación MEDINA centra sus programas de descubrimiento de fármacos en diferentes áreas terapéuticas como las enfermedades infecciosas y las enfermedades olvidadas, especialmente en la búsqueda de nuevos agentes frente a bacterias Gram negativas multirresistentes, la oncología, la neurodegeneración y las enfermedades raras. MEDINA tiene una amplia experiencia en el desarrollo de campañas de cribado de alto rendimiento (*High Throughput Screening HTS*) con colecciones de extractos de productos naturales y librerías de compuestos de síntesis en una amplia variedad de formatos de ensayo automatizado. Actualmente desarrolla programas de investigación colaborativa en estas áreas a través de líneas de financiación interna y competitiva.

La Fundación MEDINA ofrece un amplio portafolio de ensayos HTS *in vitro* y en líneas celulares, y ha implementado tecnologías de vanguardia como el *High Content Bioimaging*, que van a permitir identificar nuevos candidatos a fármacos mediante una combinación de ensayos empíricos y ensayos funcionales basados en diferentes dianas terapéuticas.

MEDINA tiene una experiencia colectiva así como los vínculos históricos con fármacos comercializados desde hace años con enorme éxito (Cefoxitina, Mevacor, Imipenem, Cancidas) así como con algunos de los más importantes descubrimientos de productos naturales de las últimas décadas (entre otros, moriniafungina, parnafunginas, enfumafungina, platensimicina, platencina, lucensimicina, philipimicina, kibdelomicina).



Antagonismo entre especies de endófitos aislados de Retama sphaerocarpa, La Malahá, Granada, España.

LA COLECCIÓN DE PRODUCTOS NATURALES

La Fundación MEDINA pone a disposición del *screening* una de las mayores y más productivas colecciones de hongos filamentosos, actinomicetos y bacterias para el descubrimiento de metabolitos secundarios con actividad biológica. La Fundación invierte una gran parte de sus recursos y personal en el mantenimiento y expansión de esta colección de más de 110.000 microorganismos. La colección se ha construido para satisfacer las necesidades de una librería de productos naturales en el marco de la empresa farmacéutica, por lo que ha perseguido la incorporación de una amplia representación de actinomicetos y hongos productores de metabolitos secundarios. Dicha librería, que actualmente consta más de 100.000 extractos y fracciones enriquecidas de productos naturales, está extensamente anotada con datos químicos y biológicos.

MEDINA ofrece el acceso a los diferentes Módulos de la Librería de extractos y fracciones de productos naturales con características únicas para el descubrimiento de fármacos:

- Se caracterizan por la enorme diversidad en sus fuentes, métodos de preparación y el espacio químico único que representan.
- Están disponibles en diferentes formatos y alícuotas completamente integrados con plataformas robotizadas, lo que permite su ensayo de manera eficiente y automatizada.
- Están anotados extensivamente con datos referentes a sus características químicas y propiedades biológicas.

Sobre la base de esta experiencia en la identificación de compuestos producidos por microorganismos con potencial para su desarrollo como fármacos, se ofrecen oportunidades para el descubrimiento de nuevas estructuras no descritas a partir de librerías de compuestos generados mediante síntesis química.

Los productos naturales permiten identificar moléculas que sean el punto de partida del descubrimiento de nuevos

candidatos, y nuevas estructuras que puedan ser desarrolladas por MEDINA o en colaboración con compañías que operen en los sectores de la salud y agroquímico.

Además de estas actividades de investigación, la Fundación MEDINA pone a disposición de la comunidad científica así como de la industria farmacéutica, biotecnológica y agroquímica, una plataforma singular de descubrimiento de fármacos a partir de productos naturales derivados del enorme y diverso arsenal microbiológico que está perfectamente gestionada y optimizada para el desarrollo de nuevos programas de búsqueda de moléculas bioactivas en el laboratorio. MEDINA proporciona la experiencia y las herramientas necesarias para maximizar las posibilidades de éxito a partir del cribado de la colección.

LA PLATAFORMA DE SEGURIDAD PRECLÍNICA

La plataforma integrada de ensayos de preclínica procede del antiguo CIBE, Centro de Referencia en MSD para la evaluación temprana de candidatos a fármacos, y ha evolucionado para responder a las necesidades internas y externas de identificar los potenciales riesgos de seguridad cardiovascular y neuronal, las interacciones medicamentosas y el metabolismo de los fármacos en etapas tempranas del desarrollo de los candidatos a fármacos. Dicha plataforma ofrece la evaluación de los compuestos en diferentes ensayos de metabolismo de fármacos (ensayos de estabilidad metabólica y evaluación de la interacción medicamentosa mediada por citocromos P450), ensayos de cardiotoxicidad (interacción con canales iónicos), ensayos de neurotoxicidad (interacción con receptores de neurotransmisores), y ensayos de genotoxicidad. La calidad de los servicios de ensayo que ofrece MEDINA así como los cortos tiempos de respuesta asegurados por el grado de automatización de la plataforma de *screening* permiten tomar rápidas decisiones 'go/no-go' que conllevan a una importante reducción de los costes de desarrollo preclínico.

COLABORACIONES CIENTÍFICAS

La Fundación MEDINA está desarrollando programas de investigación derivados de sus líneas internas y de sus colaboraciones internacionales con grupos de investigación académicos en instituciones públicas europeas y de los EEUU, así como de compañías biotecnológicas y farmacéuticas. Estos proyectos se enfocan en el descubrimiento de nuevos fármacos que puedan responder a necesidades médicas no cubiertas en enfermedades infecciosas (patógenos multiresistentes Gram negativos y *Mycobacterium tuberculosis*, y tratamiento de Aspergillosis invasiva), y para el tratamiento de malaria. Además, MEDINA ha implementado un programa de investigación estratégico en cáncer dirigido a la identificación de nuevos agentes antitumorales enfocados selectivamente a determinadas rutas de señalización celular, así como un programa en medicamentos huérfanos para enfermedades raras. En este último campo está trabajando específicamente en el tratamiento de la Esclerosis Lateral Amiotrófica con potencial aplicación en enfermedades neurodegenerativas vinculadas al envejecimiento.

MEDINA tiene como objetivo establecer acuerdos de colaboración y alianzas con empresas del sector farmacéutico que puedan contribuir a llevar nuevos candidatos a fármacos hasta las fases preclínicas y a un posible desarrollo en la clínica.

PUBLICACIONES RECIENTES SELECCIONADAS

- Bills GF, Martín J, Collado J, Platas G, Overy D, Tormo JR, Vicente F, Verkleij G, Crous P. (2009).** Measuring the distribution and diversity of antibiosis and secondary metabolites in the filamentous fungi. *Society of Industrial Microbiology News* 59: 133-147.
- Bills GF, Overy DP, Genilloud O, Peláez, F. (2009).** Contributions of pharmaceutical antibiotic and secondary metabolite discovery to the understanding of microbial defense and antagonism. In *Defensive Mutualism in Microbial Symbiosis* eds. White, JF and Torres, MS. pp.257-297. Boca Raton, USA: CRC Press.
- Genilloud O, González I, Salazar O, Martín J, Tormo JR, Vicente F. (2011).** Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *J Ind Microbiol Biotechno* 38: 375-389.
- Goetz MA, Zhang C, Zink DL, Arocho M, Vicente F, Bills GF, Polishook J, Dorso K, Onishi R, Gill C, Hickey E, Lee S, Ball R, Skwish S, Donald RGK, Phillips JW, Singh SB. (2010).** Coelomycin, a highly substituted 2,6-dioxo-pyrazine fungal metabolite antibacterial agent discovered by *Staphylococcus aureus* fitness test profiling. *Journal of Antibiotics* 63: 512-518.
- Herath K, Harris G, Jayasuriya H, Zink D, Smith S, Vicente F, Bills G, Collado J, González A, Jiang B, Kahn JN, Galuska S, Giacobbe R, Abruzzo G, Hickey E, Liberator P, Xu DM, Roemer T, Singh SB. (2009).** Isolation, structure and biological activity of phomafungin, a cyclic lipopeptide from a widespread tropical *Phoma* sp. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17: 1361-1369.
- Martín MJ, Fernandez R, Francesch A, Amade P, Matos-Pita SSd, Reyes F, Cuevas C. (2010).** Plumisclerin A, a diterpene with a new skeleton from the soft coral *Plumigorgia terminosclera*. *Organic Letters* 12: 912-914.
- Monteiro MC, de la Cruz M, Cantizani J, Moreno C, Tormo JR, Mellado E, de Lucas JR, Asensio F, Valiente V, Brakhage AA, Latgé JP, Genilloud O, Vicente F. (2012).** A New Approach to Drug Discovery: High-Throughput Screening of Microbial Natural Extracts against *Aspergillus fumigatus* Using Resazurin. *J. Biomol. Screen.* En prensa.
- Parish CA, de la Cruz M, Smith SK, Zink D, Baxter J, Tucker-Samaras S, Collado J, Platas G, Bills G, Díez MT, Vicente F, Peláez F, Wilson K. (2009).** Antisense-guided isolation and structure elucidation of pan-nomycin, a substituted cis-decalin from *Geomyces pannorum*. *Journal of Natural Products* 72: 59-62.
- Peláez F, Collado J, Platas G, Overy DP, Martín J, Vicente F, González del Val A, Basilio A, de la Cruz M, Tormo JR, Fillola A, Arenal F, Villareal M, Rubio V, Baral HO, Galán R, Bills, GF. (2011).** The phylogeny and intercontinental distribution of the pneumocandin-producing anamorphic fungus *Glarea lozoyensis*. *Mycology*, 2:1-17.
- Pérez M, Crespo C, Schleissner C, Rodríguez P, Zuniga P, Reyes F. (2009).** Tartrolon D, a cytotoxic macrodiolide from the marine-derived actinomycete *Streptomyces* sp. MDG-04-17-069. *Journal of Natural Products* 72: 2192-2194.
- Phillips JW, Goetz MA, Smith SK, Zink DL, Polishook J, Onishi R, Salowe S, Wiltse Allocco J, Sigmund J, Dorso K, Lee S, Skwish S, De la Cruz M, Martín J, Vicente F, Genilloud O, Jun Lu, Ronald E. Painter, Katherine Young, Karen Overbye, Robert G.K. Donald, and Singh SB. (2011).** Discovery of Kibdelomycin, A Potent New Class of Bacterial Type II Topoisomerase Inhibitor by Chemical-Genetic Profiling in *Staphylococcus aureus*. *Chemistry & Biology* 18: 955-965.
- Reyes F, Fernández R, Rodríguez A, Francesch A, Taboada S, Avila C, Cuevas, C. (2008).** Aplicyanins A-F, new cytotoxic bromoindole derivatives from the marine tunicate *Aplidium cyaneum*. *Tetrahedron* 64: 5119-5123.
- Roemer T, Xu D, Singh SB, Parish CA, Harris G, Wang H, Davies JE, Bills GF. (2011).** Confronting the Challenges of Natural Product-Based Antifungal Discovery. *Chemistry & Biology* 18:148-164.
- Rojas JL, Martín J, Tormo JR, Vicente F, Brunati M, Ciciliato I, Losi D, Trappen SV, Mergaert J, Swings J, Marinelli F, Genilloud O. (2009).** Bacterial diversity from benthic mats of Antarctic lakes as a source of new bioactive metabolites *Marine Genomics* 2: 33-41.
- Schleissner C, Pérez M, Losada A, Rodríguez P, Crespo C, Zúñiga P, Fernández R, Reyes F, de la Calle F. (2011).** Antitumor Actinopyranones Produced by *Streptomyces albus* POR-04-15-053 Isolated from a Marine Sediment. *J. Nat. Prod.* 74: 1590-1596.
- Singh SB, Jayasuriya H, Zink D, Basilio A, Vicente F, Collado J, Bills G, Goldman ML, Motyl M, Huber J, Dezeny G, Byrne K. (2009).** Discovery and antibacterial activity of glabramycin A-C from *Neosartorya glabra* by an antisense strategy. *Journal of Antibiotics* 62: 265-269.
- Vicente F, Basilio A, Platas G, Collado J, Bills GF, González del Val A, Martín J, Tormo JR, Harris GH, Zink DL, Justice M, Kahn JN, Peláez, F. (2009).** Distribution of the antifungal agents sordarins across filamentous fungi. *Mycological Research* 113: 754-770.
- Wang J, Kodali S, Lee SH, Galgoci A, Painter R, Dorso K, Racine F, Motyl M, Hernandez L, Tinney E, Colletti SL, Herath K, Cummings R, Salazar O, González I, Basilio A, Vicente F, Genilloud O, Peláez F, Jayasuriya H, Young K, Cully DF, Singh SB. (2007).** Discovery of platencin, a dual FabF and FabH inhibitor with in vivo antibiotic properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 7612-7616.
- Wang J, Soisson SM, Young K, Shoop W, Kodali S, Galgoci A, Painter R, Parthasarathy G, Tang YS, Cummings R, Ha S, Dorso K, Motyl M, Jayasuriya H, Ondeyka J, Herath K, Zhang C, Hernandez L, Allocco J, Basilio A, Tormo JR, Genilloud O, Vicente F, Peláez F, Colwell L, Ho Lee S, Michael B, Felcetto T, Gill C, Silver LL, Hermes JD, Bartizal K, Barret J, Schmatz D, Becker JW, Cully D, Singh S.B. (2006).** Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. *Nature* 441: 358-361.

Biotecnología para la Biomasa Lignocelulósica



María Jesús Martínez y Ángel Martínez.
Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC,
c/ Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid



El grupo de Biotecnología para la Biomasa Lignocelulósica del CIB-CSIC.

El grupo de investigación «Biotecnología para la Biomasa Lignocelulósica», coordinado por los Dres. Ángel T. Martínez y M^a Jesús Martínez, forma parte del Departamento de Biología Medioambiental del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del CSIC en Madrid, uno de los centros pluridisciplinares de mayor tradición en el área de

Biología en España. El grupo comenzó su andadura el año 1985, dentro del antiguo Departamento de Microbiología Molecular del CIB, estudiando tanto los aspectos básicos de la degradación de la lignocelulosa por los hongos como el potencial de estos microorganismos y sus enzimas en diferentes aplicaciones biotecnológicas. Inicialmente los

trabajos se centraron en conocer los mecanismos enzimáticos de los hongos de podredumbre blanca, especialmente de *Pleurotus eryngii*, para degradar la lignina, un paso clave para el reciclado del carbono en la Tierra y caracterizar las enzimas extracelulares que intervenían en el proceso (lacasas, peroxidases y enzimas productoras de peróxido de hidrógeno). Todas estas enzimas presentan una amplia especificidad de sustrato, lo que ha permitido comprobar también su eficacia para degradar otros compuestos aromáticos recalcitrantes que producen problemas medioambientales (hidrocarburos aromáticos policíclicos, colorantes, residuos de producción aceite de oliva, etc.).

Inicialmente los proyectos se relacionaron con la aplicación de estos hongos y sus enzimas en el sector papelero. La introducción de tecnologías menos agresivas con el medio ambiente, como la eliminación del cloro en el blanqueo de la pasta, llevó consigo la aparición de otros problemas en el sector. En este sentido destacar que las investigaciones del grupo dieron lugar a diferentes trabajos y patentes en los que se propone que tanto la aplicación de los hongos como sus enzimas podrían contribuir a reducir estos problemas: i) las lacasas, utilizando mediadores de bajo peso molecular, y las peroxidases podían participar en el blanqueo enzimático de las pastas, manteniendo sus propiedades, ii) el pretratamiento biológico de las astillas disminuía los problemas de depósitos en las pastas y iii) estos problemas de depósitos también podrían mejorar utilizando esteroles esterases o el sistema lacasa-mediador, reduciendo o eliminando compuestos presentes en los extraíbles de las maderas e involucrados en la formación de depósitos.

Los trabajos sobre el empleo de mediadores para potenciar la actividad de la lacasa (esta enzima oxida de forma natural compuestos aromáticos fenólicos y sólo en presencia de mediadores puede degradar compuestos aromáticos no fenólicos de mayor potencial redox), llevaron a describir una nueva familia de mediadores naturales. La Dra. Susana Camarero, investigadora del grupo, fue pionera en la descripción de estos compuestos, derivados de la degradación de la lignocelulosa, y su utilización para degradar compuestos contaminantes y deslignificar materiales lignocelulósicos, experiencia que aplica en la actualidad a la ingeniería de lacasas fúngicas. Por otra parte, la incorporación al grupo de la Dra. Alicia Prieto, investigadora con gran experiencia en el estudio de polisacáridos, ha permitido abordar con más eficacia las diferentes aplicaciones de la biomasa vegetal. Finalmente hay que mencionar la aproximación genómica para la búsqueda de nuevas peroxidases y otras oxidoreductasas de interés biotecnológico que está desarrollando el Dr. Javier Ruiz-Dueñas.

La mayor parte de los proyectos vigentes en la actualidad están relacionados con el aprovechamiento de la biomasa vegetal, de acuerdo con el concepto de biorrefinería, abordando aspectos básicos y aplicados para tratar de estudiar las posibles aplicaciones biotecnológicas, entre las que se encuentran la producción sostenible de combustibles y productos químicos, junto con la utiliza-

ción de modernas técnicas analíticas (basadas en la NMR bidimensional disponible en el CIB) para el estudio de la lignina y sus usos industriales. Las líneas de investigación en curso, financiadas por proyectos nacionales, europeos y proyectos de colaboración y contratos con empresas, se resumen a continuación:

- Estudios estructura-función de oxidoreductasas involucradas en los procesos de degradación (peroxidases, lacasas y aril-alcohol oxidases), mediante mutagénesis y evolución dirigida, destinados a mejorar las propiedades físico-químicas y catalíticas de estas enzimas y su versatilidad para diferentes aplicaciones.
- Estudios bioquímicos y moleculares de esteroles esterases, enzimas capaces de realizar reacciones de hidrólisis o síntesis, dependiendo de las condiciones de reacción, con nuevas aplicaciones en el sector de los nutracéuticos.
- Estudios de celulasas y hemicelulasas para la degradación de los polisacáridos de la pared vegetal y su transformación en etanol de segunda generación.
- Estudios de lacasas y peroxidases en la degradación de compuestos recalcitrantes contaminantes de aguas y suelos y la producción de químicos derivados del tratamiento de la biomasa.

El grupo colabora con diferentes centros de investigación, universidades y empresas, tanto nacionales como internacionales y la información detallada de sus publicaciones recientes y los proyectos en curso puede encontrarse en su página WEB (www.cib.csic.es/lignina/lignina_en.html).

PUBLICACIONES RECIENTES

- Babot ED, Rico A, Rencoret J, Kalum L, Lund H, Romero J, del Río JC, Martínez AT and Gutiérrez A (2011)** Towards industrially feasible delignification and pitch removal by treating paper pulp with *Myceliophthora thermophila* laccase and a phenolic mediator. *Biores. Technol.* 102: 6717-6722.
- Camarero S, Pardo I, Cañas AI, Molina P, Record E, Martínez AT, Martínez MJ, Alcalde M (2012)** Engineering Platforms for Directed Evolution of Laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl Environ Microbiol* 78: 1370-1384.
- Faulds CB, Pérez-Boada M, Martínez AT (2011)** Influence of organic co-solvents on the activity and substrate specificity of feruloyl esterases. *Biores. Technol.* 102: 4962-4967.
- Fernandez-Fueyo E, Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P..., Martínez AT, Vicuña R, Cullen D (2012)** Comparative genomics of *Ceriporiopsis subvermispora* and *Phanerochaete chrysosporium* provide insight into selective ligninolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* (DOI: 10.1073/pnas.1119912109).
- Fernandez-Fueyo E, Ruiz-Dueñas FJ, Miki Y, Martínez MJ, Hammel KE, Martínez AT (2012)** Lignin-degrading peroxidases from the genome of the selective ligninolytic fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. *J. Biol. Chem.* DOI: 10.1074/jbc.M112.356378
- García-Ruiz E, González-Pérez D, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez AT and Alcalde M (2012)** Directed evolution of a temperature-, peroxide- and alkaline pH-tolerant versatile peroxidase. *Biochem. J.* 441: 487-498.

- Gutiérrez A, Babot ED, Ullrich R, Hofrichter M, Martínez AT and del Río JC (2011) Regioselective oxygenation of fatty acids, fatty alcohols and other aliphatic compounds by a basidiomycete heme-thiolate peroxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 514: 33-43.
- Hernández-Ortega A, Borrelli K, Ferreira P, Medina M, Martínez AT and Guallar V (2011) Substrate diffusion and oxidation in GMC oxidoreductases: an experimental and computational study on fungal aryl-alcohol oxidase. *Biochem. J.* 436: 341-350.
- Hernández-Ortega A, Ferreira P, Martínez AT (2012) Fungal aryl-alcohol oxidase: a peroxide-producing flavoenzyme involved in lignin degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93: 1395-1410.
- Hernández-Ortega A, Lucas F, Ferreira P, Medina M, Guallar V, Martínez AT (2011) Modulating O₂ reactivity in a fungal flavoenzyme: Involvement of aryl-alcohol oxidase Phe-501 contiguous to catalytic histidine. *J. Biol. Chem.* 286: 41105-14.
- Ibarra D, Monte MC, Blanco A, Martínez AT and Martínez MJ (2012) Enzymatic deinking of secondary fibers: cellulases/hemicellulases versus laccase-mediator system. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39: 1-9.
- Jurado M, Saparrat M, Martínez AT, Martínez MJ (2011) Application of White-Rot Fungi in Transformation, Detoxification, or Revalorization of Agriculture Wastes: Role of Laccase in the Processes. *Comprehen. Biotechnol.* 6: 595-603.
- Martínez AT, Rencoret J, Nieto L, Jiménez-Barbero J, Gutiérrez A, del Río JC (2011) Selective lignin and polysaccharide removal in natural fungal decay of wood as evidenced by in situ structural analyses. *Environ. Microbiol.* 13: 96-107.
- Miki Y, Calviño FR, Pogni R, Giansanti S, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Basosí R, Romero A and Martínez AT (2011) Crystallographic, kinetic, and spectroscopic study of the first ligninolytic peroxidase presenting a catalytic tyrosine. *J. Biol. Chem.* 286: 15525-15534.
- Ruiz-Dueñas FJ, Fernandez E, Martínez MJ, Martínez AT (2011) *Pleurotus ostreatus* heme peroxidases: An in silico analysis from the genome sequence to the enzyme molecular structure. *C. R. Biologies* 334: 795-805.
- Salvachúa D, Prieto A, López-Abelairas M, Lu-Chau T, Martínez AT, Martínez MJ (2011) Fungal pretreatment: An alternative in second-generation ethanol from wheat straw. *Biores. Technol.* 102: 7500-7506.
- Taboada-Puig R, Lú-Chau T, Moreira MT, Feijoo G, Martínez MJ and Lema JM (2011) A new strain of *Bjerkandera* sp. production, purification and characterization of versatile peroxidase. *World J Microbiol Biotechnol.* 27: 115-122.
- Waters DM, Murray PG, Miki Y, Martínez AT, Tuohy MG and Faulds CB (2012) A thermostable fungal acetylxylnan esterase from *Talaromyces emersonii*: Cloning, over-expression in *Escherichia coli* and characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* doi:10.1128/AEM.05659-11.

Degradación de lignocelulosa por estreptomicetos y sus implicaciones tecnológicas y medioambientales (Grupo BIODEG)

Manuel Hernández, Juana Rodríguez, Francisco Guillén, Javier Mérida, Raquel Moya, Ana Belén García, Alba Blánquez, José Manuel Molina-Guijarro, María Isabel Pérez-Leblic y María Enriqueta Arias. Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad de Alcalá. 28871 Alcalá de Henares (Madrid). E-mail: enriqueta.arias@uah.es

El grupo de investigación del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Alcalá coordinado por la Dra. M^a Enriqueta Arias Fernández, se ha centrado desde hace más de 20 años en la elucidación de los mecanismos básicos implicados en la degradación de lignocelulosa por cepas seleccionadas del género *Streptomyces*, así como en el estudio del potencial biotecnológico y medioambiental de estos microorganismos y/o sus enzimas. Nuestras investigaciones se han dirigido en una primera etapa a desentrañar los sistemas enzimá-

ticos implicados en la degradación de los componentes estructurales de los materiales lignocelulósicos por estos microorganismos, así como al análisis de las modificaciones químicas producidas, tanto en maderas como en residuos herbáceos, por cepas seleccionadas. Con este estudio se pretende a su vez satisfacer la demanda actual de determinadas industrias contaminantes (papelera, textil, petroquímica, etc.), para sustituir total o parcialmente los procesos químicos habitualmente utilizados, causando de un significativo impacto ambiental, por métodos

biológicos amigables con el medio ambiente y que a su vez puedan incrementar el ratio coste-beneficio en dichas industrias. Más recientemente, hemos iniciado una nueva línea de trabajo sobre procesos de bio-oxidación avanzada (PBOA) con microorganismos ligninolíticos seleccionados (actinobacterias y hongos), con vistas a su aplicación en la descontaminación de suelos, aguas residuales y efluentes industriales.

ESTUDIOS BÁSICOS DE DEGRADACIÓN DE LIGNOCELULOSA POR *STREPTOMYCES*

Nuestros estudios iniciales se dirigieron al aislamiento y selección de cepas de estreptomicetos de distintos habitats naturales, con objeto de conocer su capacidad para degradar distintos residuos lignocelulósicos, tanto de tipo herbáceo (paja de trigo, bagazo de maíz, cascarilla de arroz y pulpa de café) como leñoso (maderas de picea y eucalipto, entre otras).

El análisis químico de los residuos lignocelulósicos transformados por cepas seleccionadas de *Streptomyces* en condiciones de fermentación en estado sólido, puso de manifiesto que dichas cepas son capaces de atacar oxidativamente las unidades estructurales de la lignina, hasta lograr, en algunos casos, una significativa mineralización. Asimismo, se puso de manifiesto que la mayor parte de las cepas degradan el componente hemicelulolítico de los sustratos, sin atacar la celulosa.

Posteriormente, se han elucidado los sistemas enzimáticos implicados en la degradación de estos materiales. De hecho, se han purificado y caracterizado enzimas de tipo xilanasa, mananasa, esterasa, peroxidasa y lacasa, producidas en distintas condiciones de cultivo. Como fruto de los resultados obtenidos, algunas de estas cepas seleccionadas y/o sus enzimas han sido aplicadas con éxito en procesos de biopasteo y bioblanqueo de residuos lignocelulósicos y pastas químicas, respectivamente. Asimismo, hay que destacar que en nuestro grupo se ha demostrado por primera vez el potencial industrial de la cepa *Streptomyces cyaneus* CECT 3335, para ser utilizada en el pasteo biomecánico de madera de picea, debido a la capacidad de este microorganismo para deslignificar dicho sustrato, con el consiguiente ahorro energético en la etapa de desfibrado, uno de los «cuellos de botella» del pasteado mecánico. Asimismo, el pretratamiento de la madera con el microorganismo, supuso una mejora importante en los parámetros de calidad de las pastas obtenidas.

En relación al proceso de bioblanqueo, enzimas de tipo xilanasa, mananasa, peroxidasa y lacasa, producidas por distintas especies de *Streptomyces*, han demostrado su efectividad en la mejora de las propiedades físico-químicas y ópticas de distintas pastas kraft de eucalipto.

Por último, también hemos demostrado la implicación de estos microorganismos en la degradación de la lignina presente en los efluentes generados por la industria pape-



Grupo BIODEG. De izquierda a derecha, Javier Mérida, María Enriqueta Arias, Francisco Guillén, Raquel Moya, Cristina Escudero, Juana Rodríguez, María Isabel Pérez, Manuel Hernández, Ana Belén García y Alba Blázquez.

lera, lo cual conlleva una decoloración muy significativa de los mismos y una disminución del impacto ambiental causado por su vertido en las aguas continentales.

DEMOSTRACIÓN DE LA IMPORTANCIA BIOTECNOLÓGICA Y MEDIOAMBIENTAL DE LAS LACASAS DE *STREPTOMYCES* Y DE LOS SISTEMAS LACASA-MEDIADOR

Entre las enzimas purificadas y caracterizadas en nuestro grupo, presentan especial relevancia las lacasas producidas por las cepas *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 y *Streptomyces ipomoea* CECT 3341. El interés suscitado por su estudio radica, por un lado, en la corriente actual existente por 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. Así, en estos últimos años, hemos clonado y caracterizado ambas lacasas y, si bien la producida por *S. cyaneus* presenta una estructura y comportamiento similares a los de lacasas producidas por hongos filamentosos (tres dominios de cupredoxina y pH ácido de actuación), la lacasa de *S. ipomoea* es estructural y catalíticamente única. Esta

lacasa presenta sólo dos dominios de cupredoxina en su estructura y su actividad depende del pH, siendo activa sobre compuestos fenólicos a pHs alcalinos, lo que supone una gran ventaja para ser aplicada en procesos industriales tradicionalmente llevados a cabo a elevados pHs, o para degradar compuestos contaminantes presentes en efluentes alcalinos.

En cuanto al aspecto más aplicado, hemos diseñado sistemas lacasa-mediador (lo cual supuso la selección previa de mediadores de oxidación de origen natural), que han demostrado su utilidad en la degradación y detoxificación de colorantes textiles de tipo azo, cuyo vertido a las aguas continentales supone un riesgo medioambiental muy notable con consecuencias para la salud humana. La eficacia de estos sistemas también se ha puesto de manifiesto en el bioblanqueo de pastas kraft de eucalipto. Así, el tratamiento de las mismas con el sistema lacasa-acetosiringona a pH alcalino, se tradujo en un mayor grado de deslignificación y un aumento de la blancura de la pasta de papel, así como en la mejora de las propiedades ópticas (CIE $L^*a^*b^*$ y CIE L^*C^*), incluso después de un proceso de envejecimiento acelerado en laboratorio. Por otro lado, el ahorro de reactivos (peróxido de hidrógeno) en las pastas biotratadas y la posibilidad de recuperar gran parte de la actividad enzimática tras el proceso, avalan el potencial del sistema lacasa-mediador para ser utilizado a mayor escala en el bioblanqueo de pastas de papel.

BIOOXIDACIÓN AVANZADA DE COMPUESTOS Y POLÍMEROS AROMÁTICOS POR MICROORGANISMOS LIGNINOLÍTICOS Y SISTEMAS LACASA-MEDIADOR

Tal como hemos comentado, entre los mecanismos degradativos de los microorganismos ligninolíticos destacan preferentemente enzimas de tipo lacasa. La potenciación de la actividad oxidativa de estas enzimas se ha logrado merced al descubrimiento de los llamados mediadores, agentes oxidantes de bajo peso molecular y elevado potencial redox, que incrementa notablemente el rango de compuestos susceptibles de degradación.

Estos agentes incluyen radicales fenoxilo, derivados de la oxidación monovalente de los mediadores fenólicos por lacasas (sistemas lacasa-mediador o LMS), y radicales hidroxilo, generados entre otros mecanismos, mediante ciclos redox de quinonas. La aplicación de estos agentes oxidativos altamente reactivos y poco selectivos producidos por bacterias y hongos ligninolíticos a la degradación de compuestos y polímeros aromáticos, podría ser considerada como un «Proceso de Bio-Oxidación Avanzada» (PBOA).

En estudios anteriores hemos demostrado la eficacia de los sistemas lacasa-mediador en la degradación de com-

puestos xenobióticos de estructura química diversa. En la actualidad estamos desarrollando y optimizando los sistemas de producción extracelular de radicales hidroxilo a través del ciclo redox de quinonas. En este sentido, cabe destacar que se ha demostrado por primera vez la inducción de este ciclo en *Streptomyces*, resultando tan eficaz como el descrito anteriormente en el hongo filamentososo de la podredumbre blanca, *Pleurotus eyngii*. 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, poniendo de manifiesto en la mayor parte de los ensayos una completa detoxificación. Nuestro objetivo a corto plazo es ampliar el rango de aplicación de estos sistemas a una gran variedad de contaminantes emergentes (antibióticos, antiinflamatorios, disruptores endocrinos y productos de cuidado personal), es decir, los denominados PPCPs.

PUBLICACIONES RECIENTES

- Aranda E, Marco-Urrea E, Caminal G, Arias ME, García Romera I, Guillén F (2010)** Advanced oxidation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene isomers (BTEX) by *Trametes versicolor*. *J Hazardous Materials*. 181: 181-186.
- Arias ME, Rodríguez J, Pérez MI, Hernández M, Polvillo O, González-Pérez JA, González-Vila FJ (2010)** Analysis of chemical changes in *Picea abies* wood decayed by different *Streptomyces* strains showing evidences for biomechanical pulping. *Wood Science Technology*. 44: 179-188.
- Eugenio ME, Hernández M, Moya R, Martín-Sampedro R, Villar JC, Arias ME (2011)** Evaluation of a new laccase produced by *Streptomyces ipomoea* on biobleaching and ageing of kraft pulps. *BioResources*. 6: 3231-3241.
- Hernández M, Moya R, Molina-Guijarro JM, Guillén F, Arias ME (2011)**. Exploring the biotechnological applications of a halotolerant pH-versatile laccase produced by *Streptomyces ipomoea* CECT 3341. En: *Microorganisms in Industry and Environment. From Scientific and Industrial Research to Consumer Products*. A. Mendez-Vila (Ed). Pp. 350-354. ISBN: 13 978-981-4322-10-2. World Scientific Publishing Company Pte. Ltd. Singapur.
- Molina-Guijarro JM, Pérez J, Muñoz-Dorado J, Guillén F, Moya R, Hernández M, Arias ME (2009)**. Molecular and physico-chemical characterization of a novel pH-versatile and haloresistant laccase from *Streptomyces ipomoea* CECT 3341. A tool for the detoxification of azo dyes. *Int Microbiol*. 2:13-21.
- Moya R, Hernández M, García-Martín AB, Ball AS, Arias ME (2010)** Contributions to a better comprehension of redox-mediated decoloration and detoxification of azo dyes by a laccase produced by *Streptomyces cyaneus* CECT. *Bioresource Technology*. 101: 2224-2229.
- Moya R, Saastamoinen P, Hernández M, Suurnäkki A, Arias ME, Mattinen M-L (2011)** Reactivity of bacterial and fungal laccases on lignin in alkaline conditions. *Bioresource Technology*. 102: 10006- 10012.
- Orozco AL, Pérez MI, Guevara O, Rodríguez J, Hernández M, González-Vila FJ, Polvillo O, Arias ME (2008)** Biotechnological enhancement of coffee pulp residues by solid-state fermentation with *Streptomyces*. Py-GC/MS analysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 81: 247-252

Bacterias Lácticas del Vino y Otros Alimentos (Grupo BL-URV)

Albert Bordons*, **Cristina Reguant**, **Nicolas Rozès**, **Isabel Araque**, **Nair Olguin**, **Albert Hurtado**. Dpto. Bioquímica y Biotecnología, Facultad de Enología de Tarragona, Universitat Rovira i Virgili. * albert.bordons@urv.cat

Los miembros del equipo BL-URV, Albert Bordons (2ª fila, 4º por la izquierda), Cristina Reguant (2ª fila, 3ª izquierda), Nicolas Rozès (3ª fila, 1º izquierda), y las doctorandas Mar Margalef (1ª fila, 2ª izquierda) y Paloma Toraño (1ª fila, 1ª derecha), con otros componentes del grupo de Biotecnología Enológica del que forman parte.



Nuestro equipo BL-URV investiga sobre todo en las Bacterias Lácticas (BL) del vino pero también en las de otros alimentos, sobre todo de aceitunas, en la Facultad de Enología de Tarragona, de la Universitat Rovira i Virgili. El equipo está coordinado por A. Bordons, que con los otros dos profesores C. Reguant y N. Rozès, forman parte de un grupo de investigación más numeroso, llamado Biotecnología Enológica (ver foto, Figura 1). Este grupo en su conjunto, cuyo responsable es Albert Mas, es un grupo reconocido como consolidado por la Generalitat, con prestigio por la investigación en los diversos microorganismos relacionados con el vino, o sea, levaduras, bacterias lácticas y bacterias acéticas.

En 1988, coincidiendo con la puesta en marcha de los primeros estudios universitarios de Enología en Tarragona (y los primeros de España), varios profesores de esta universidad empezaron a realizar investigación en temas de enología, y en concreto entonces A. Bordons empezó a trabajar con las BL del vino. Desde entonces se han realizado 9 tesis doctorales en el equipo BL-URV, y con sus publicaciones internacionales, el equipo constituye hoy en día uno de los principales grupos de referencia sobre BL del vino en España. Cabe señalar la relevancia internacional de los grupos españoles en este ámbito, cuyas publicaciones en estos 5 últimos años constituyen un tercio de todas las del mundo (Bordons et al., 2011).

En la actualidad trabajan en el equipo BL-URV, además de los tres profesores mencionados, tres becarias predoctorales: Meritxell Bordas (no aparece en la foto, está realizando una estancia en Burdeos), Mar Margalef y Paloma Toraño, así como Isabel Araque, técnica postdoctoral (tampoco aparece en la foto, está de baja maternal). Los trabajos de nuestro equipo han sido financiados por varios proyectos del Plan Nacional (AGL) y también por empresas del sector, como las bodegas Torres o el consorcio de empresas del proyecto Deméter del programa Cenit del CDTI (2008-2012). Parte de la investigación la hemos realizado en colaboración con otros grupos de Valencia, Reus, Verona, Burdeos, Dijon, París, Túnez y Tucumán.

CARACTERIZACIÓN DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS DEL VINO

Las bacterias lácticas (BL) del vino son las que llevan a cabo la fermentación maloláctica (FML) o segunda fermentación de bastantes vinos tintos y algunos blancos y espumosos, principalmente cepas de *Oenococcus oeni* (Figura 2). La FML es la descarboxilación de L-málico a L-láctico, que conlleva un ligero descenso de la acidez. Otras ventajas que estas bacterias confieren al vino son la producción de otros metabolitos, como diacetilo a partir de cítrico,

FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA (FML)



Oenococcus oeni



Oenococcus oeni, la bacteria láctica del vino, y la fermentación maloláctica.

que también suponen mejoras organolépticas, y la estabilización microbiológica del vino, al haberse consumido durante la FML los restos de compuestos como azúcares, que podrían provocar contaminaciones posteriores en botella.

En los primeros años de trabajo del equipo BL-URV se estudió el efecto de diversos componentes del vino sobre la viabilidad y el metabolismo de *O. oeni* y sobre la cinética de la FML, como pesticidas, compuestos fenólicos y otros. Al mismo tiempo se procedió a realizar aislamientos de BL de vinos del sur de Cataluña, con lo que se ha conseguido tener un buen banco de cepas, y a partir de ellas realizar ensayos de selección para la FML. También se pusieron a punto técnicas moleculares de identificación de especie, sobre todo de *O. oeni*, y de tipificación de cepas, como una técnica multiplex (Araque et al., 2009a). Estas técnicas han permitido realizar estudios de dinámica de poblaciones de las diversas cepas, inoculadas o no, en FML en diversas condiciones.

Aparte de los beneficios comentados, algunas de las BL en ciertas condiciones pueden producir compuestos perjudiciales para la salud humana, como las aminas biógenas o el carbamato de etilo (CE), que es carcinógeno. Hemos estudiado la producción de precursores del CE, como la citrulina, a partir de arginina por la ruta ADI (arginina deiminasa) en las BL. Mediante cebadores degenerados se ha detectado la presencia de los genes *arc* de dicha ruta en diversas especies y cepas, y se ha encontrado correlación entre los genes y la degradación de arginina (Araque et al., 2009b).

ADAPTACIÓN DE OENOCOCCUS OENI A LAS CONDICIONES ESTRESANTES DEL VINO

Los enólogos saben bien que la FML a menudo tiene problemas para realizarse o para terminar, incluso aun-

que se recurra a la inoculación de cepas comerciales. El vino es un medio difícil para el desarrollo de *O. oeni*, ya que es un medio muy variable (depende de la vendimia, de la varietal de uva, de la levadura usada, etc), contiene otros microorganismos, y sobretodo, es inhóspito ya que tiene etanol (hasta 15% v/v), un pH ácido (3-4) y pocos nutrientes porque la levadura los ha agotado casi todos. Además, con el cambio climático estas dificultades se acrecientan, ya que se está constatando un aumento del grado alcohólico y una menor acidez, con menor contenido en málico, que es necesario para *O. oeni* (Reguant et al., 2010).

La principal línea de trabajo actual es el estudio de los mecanismos de respuesta de *O. oeni* para adaptarse y sobrevivir a estas condiciones estresantes. Los mecanismos pueden ser: a) modificaciones en la composición de ácidos grasos de membrana para compensar los efectos del etanol; b) activación de la ATPasa expulsando protones y al mismo tiempo generando ATPs mediante las descarboxilaciones de málico y cítrico; y c) la activación de una serie de proteínas de estrés, como chaperonas o proteínas de mantenimiento del equilibrio redox, como la tiorredoxina. Mediante PCR cuantitativa, hemos demostrado que unos de los genes que más se expresan en presencia de etanol son los de la ruta del citrato (Olguín et al., 2009), y que también se sobreexpresan genes de proteínas de estrés como *hsp18* o *clpP* (Olguín et al., 2010). También hemos conseguido analizar la expresión de estos genes más significativos extrayendo RNA directamente del vino. Actualmente estamos confirmando estos resultados mediante análisis transcriptómico con microarrays de *O. oeni*. Por otro lado, estamos viendo el papel protector del glutatión como antioxidante frente a los daños del etanol en *O. oeni*.

LAS BACTERIAS LÁCTICAS EN LA ELABORACIÓN DE LA ACEITUNA ARBEQUINA DE MESA

Las aceitunas arbequinas de mesa se consumen tradicionalmente en Cataluña. El proceso de elaboración es muy artesanal y, a diferencia de las típicas aceitunas españolas, no tiene un previo tratamiento alcalino para eliminar el amargor. Éste se elimina parcialmente en un proceso de fermentación natural, del cual no se había estudiado el proceso microbiológico, y que hemos ido caracterizando desde 2004. En los primeros días del proceso de fermentación predominan las levaduras, entre las que hemos identificado diversas especies de *Candida* y *Pichia*, pero a las pocas semanas las BL ya son prevalentes: *Lactobacillus pentosus*, *L. plantarum* y *L. paraplantarum* (Hurtado et al., 2008) y ellas son la clave del proceso para conseguir la maduración y comestibilidad de las aceitunas. Hemos aislado cepas de *L. pentosus* que pueden funcionar como estárteres (Hurtado et al., 2010) y también hemos caracterizado unos cien aislados de diferentes orígenes de las tres especies de *Lactobacillus*, relacionándolos con sus perfiles de genes de bacteriocinas (Hurtado et al., 2011b). Recientemente hemos publicado una revisión sobre el papel relevante de las BL en el proceso de fermentación de las aceitunas de mesa en general (Hurtado et al., 2012).

PRINCIPALES PUBLICACIONES RECIENTES

- Araque I, Bordons A, Reguant C. (2009a)** A multiplex PCR method for simultaneous species identification and strain typification of *Oenococcus oeni*. *World J. Microbiol. Biotech.* 25: 15-18
- Araque I, Gil J, Carreté R, Bordons A, Reguant C. (2009b)** Detection of *arc* genes related with the ethyl carbamate precursors in wine lactic acid bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 57: 1841-1847

- Araque I, Reguant C, Rozès N, Bordons A. (2011)** Influence of wine-like conditions on arginine utilization by lactic acid bacteria. *Internat. Microbiol.* 14: 225-233
- Bordons A, Reguant C, Rozès N. (2011)** Investigación de calidad en fermentación maloláctica y bacterias lácticas del vino en España. *ACEnología*, 128
- Hurtado A, Reguant C, Esteve-Zarzoso B, Bordons A, Rozès N. (2008)** Microbial population dynamics during the processing of *Arbequina* table olives. *Food Res. Inter.* 41: 738-744
- Hurtado H, Reguant C, Bordons A, Rozès N. (2009)** Influence of fruit ripeness and salt concentration on the microbial processing of *Arbequina* table olives. *Food Microbiol.* 26: 827-833
- Hurtado H, Reguant C, Bordons A, Rozès N. (2010)** Evaluation of a single and combined inoculation of a *Lactobacillus pentosus* starter for processing cv. *Arbequina* natural green olives. *Food Microbiol.* 27: 731-740
- Hurtado A, Reguant C, Bordons A, Rozès N. (2011a)** Expression of *Lactobacillus pentosus* B96 bacteriocin genes under saline stress. *Food Microbiol.* 28: 1339-1344
- Hurtado A, Ben Othman N, Chammem N, Hamdi M, Ferrer S, Reguant C, Bordons A, Rozès N. (2011b)** Characterization of *Lactobacillus* isolates from fermented olives and their bacteriocin gene profiles. *Food Microbiol.* 28: 1514-1518
- Hurtado A, Reguant C, Bordons A, Rozès N. (2012)** Lactic acid bacteria from fermented table olives (Review). *Food Microbiol.*, doi: 10.1016/j.fm.2012.01.006
- Olguín N, Bordons A, Reguant C. (2009)** Influence of ethanol and pH on the gene expression of the citrate pathway in *Oenococcus oeni*. *Food Microbiol.* 26: 197-203
- Olguín N, Bordons A, Reguant C. (2010)** Multigenic expression analysis as an approach to understanding the behaviour of *Oenococcus oeni* in wine-like conditions. *Inter. J. Food Microbiol.* 144: 88-95
- Olguín N, Alegret JO, Bordons A, Reguant C. (2011)** Beta-Glucosidase activity and *bgl* gene expression of *Oenococcus oeni* strains in model media and Cabernet Sauvignon wine. *Amer. J. Enol. Vitic* 62: 99-105
- Reguant C, Olguín N, Bordas M, Rozès N, Bordons A. (2010)** Nuevos retos para *Oenococcus oeni* como consecuencia del cambio climático. *ACEnología*, 122



Diversidad de actinomicetos y sus aplicaciones biotecnológicas

Gonzalo Cuesta. Departamento de Biotecnología. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera, 14. 46022 Valencia. Tel: 963877423 (goncueam@btc.upv.es)



Integrantes del grupo de investigación: de izquierda a derecha, Ana González (Técnico Superior de Laboratorio), Rocío Olmo (Becaria), Albert Soler (Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia), Nelson Talavera (Becario), Gonzalo Cuesta (Profesor Contratado Doctor), Alfred Fillol (Becario).

El grupo de Actinomicetos de la Universidad Politécnica de Valencia tiene una reciente historia. Comenzó en 2004 cuando el que escribe estas líneas defendió la tesis doctoral que trataba sobre el estudio de actinomicetos nocardioformes presentes en estaciones depuradoras y que ocasionan problemas de espumas biológicas. La elección del tema de dicha tesis tenía como objetivo cubrir el vacío que existía en nuestro laboratorio donde tradicionalmente se había trabajado en microbiología de alimentos. Así pues, me propusieron realizar la tesis doctoral sobre actinomicetos. Este grupo de microorganismos es muy amplio y diverso y por lo tanto había que acotar el grupo microbiano a estudiar. Después de realizar las búsquedas bibliográficas preliminares y a propuesta del que sería mi director de tesis, el Dr. José Luis Alonso Molina, me sentí atraído por un tema que no había sido estudiado en España. Se trataba de estudiar un grupo de actinomicetos que interfieren en el proceso de depuración de aguas residuales. El proceso de

depuración de aguas más frecuentemente utilizado consiste en el sistema de fangos activados, en el que el agua residual se somete a una aireación controlada para reducir la DBO (Demanda Biológica de Oxígeno) a la vez que se forma un floculo sedimentable. En este proceso intervienen una enorme diversidad de microorganismos, unos beneficiosos y otros perjudiciales. Si todo funciona correctamente, la DBO se reduce al máximo y se forman floculos de un tamaño adecuado que sedimentan en el decantador secundario, obteniéndose un efluente claro que puede ser vertido sin causar graves problemas medioambientales. Dentro de los microorganismos que interfieren en este proceso se encuentran los actinomicetos nocardioformes. Este grupo de microorganismos pertenecen al suborden *Corynebacterineae* incluido en la clase *Actinobacteria* y se caracterizan por tener ácidos micólicos en su superficie celular, lo que les confiere alta hidrofobicidad. Esta hidrofobicidad unida al hecho de que muchas especies forman filamentos rami-

ficados es la principal causa de la producción de espumas biológicas en depuradoras que interfieren en el proceso de depuración. Tradicionalmente la formación de estas espumas biológicas se ha asociado a la presencia de la especie *Gordonia amarae*. El resultado de la tesis mostró que además de *G. amarae* existen otras muchas especies de nocardioformes implicados en la formación de espumas biológicas. Por lo tanto la producción de espumas biológicas se debe a una asociación compleja de diferentes microorganismos pertenecientes al suborden *Corynebacterineae*, algo importante a tener en cuenta por el operador de planta que hasta ahora consideraba la producción de espumas vinculada casi exclusivamente a la presencia de *G. amarae* como única productora de espumas.

Como extensión a los estudios de biodiversidad de nocardioformes en depuradoras, recientemente Albert Soler Hernández defendió su tesis doctoral en la que se aislaron e identificaron más de 150 actinomicetos de diversas estaciones depuradoras. Todos estos actinomicetos se identificaron mediante taxonomía polifásica. Resulta sorprendente el resultado de esta tesis por la enorme diversidad de especies encontradas, si lo comparamos con estudios similares en plantas europeas. Se han encontrado especies de nocardioformes que nunca habían sido aisladas en estaciones depuradoras, patógenos oportunistas como *Gordonia bronchialis*, *G. sputi*, *Tsukamurella pulmonis*, *Dietzia maris* y *Williamsia maris* y un buen número de micobacterias ambientales. Además, y según los criterios que definen la especie en procariotas, nos hemos encontrado con una serie de posibles especies nuevas que generarán publicaciones en un futuro.

Uno de los aspectos prácticos que realiza nuestro grupo es el estudio de actinomicetos con capacidad de biodegradación de compuestos tóxicos. De hecho, muchos de los actinomicetos aislados de depuradoras industriales tienen la capacidad de degradar derivados aromáticos del petróleo como el fenol y el naftaleno. Esta capacidad se ha estudiado mediante cultivo en placa utilizando medios de cultivo donde la única fuente de carbono disponible es el fenol y el naftaleno. Además, para estudiar el potencial catabólico de estas cepas degradadoras hemos detectado por PCR el gen que codifica para la catecol 1,2-dioxigenasa (CatA) que es la enzima que cataliza el primer paso en la biodegradación de compuestos aromáticos. Tenemos pues unos buenos candidatos microbianos para realizar estudios de biorremediación en ambientes contaminados por derivados del petróleo, tanto acuáticos como terrestres.

Sin dejar de estudiar la biodiversidad de actinomicetos en depuradoras, hemos ampliado el estudio a otros grupos de actinomicetos y a otras fuentes de aislamiento. Una de las líneas de trabajo actuales es la búsqueda de actinomicetos aislados de diferentes tipos de compost y vermicompost con capacidad de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos. La utilidad práctica de estos estudios viene de la ob-

servación de que muchos composts tienen la capacidad de inhibir ciertas enfermedades en plantas causadas por hongos fitopatógenos. Nuestro grupo ha aislado e identificado, a partir de diferentes tipos de compost, actinomicetos con capacidad inhibitoria frente hongos fitopatógenos. Esto demuestra que la capacidad inhibitoria del compost descrita en diversas referencias se debe a los actinomicetos presentes en él y que intervienen en la fase final de maduración del proceso de compostaje. Por lo tanto, cabe la posibilidad de utilizar estas cepas de actinomicetos como inóculo en el proceso de compostaje, confiriendo al producto final la capacidad de inhibir agentes fitopatógenos.

Actualmente la actividad de nuestro grupo consiste en buscar aplicaciones biotecnológicas prácticas a los actinomicetos aislados de diferentes muestras ambientales. Entre las aplicaciones estudiadas están las actividades antibióticas frente a patógenos emergentes, hongos fitopatógenos, actividades enzimáticas diversas, degradación de compuestos derivados del petróleo, herbicidas, etc. Todos los actinomicetos con actividades interesantes se identifican mediante el análisis de las secuencias del gen 16S rDNA y por taxonomía polifásica.

PUBLICACIONES RECIENTES

- Alonso JL, Cuesta G, Ramírez GW. (2009)** Manual de Técnicas Avanzadas para la Identificación y Control de Bacterias Filamentosas. Ed. Epsar-Generalitat Valenciana. D.L.: 1157-2009. ISBN: 978-84-482-5161-1.
- Baeza A, Alonso JL, Bernácer I, Morenilla JJ, Cuesta G. (2011)** Estudio de morfotipos de *Nostocoida limicola* mediante técnica FISH asociados a problemas de espumas por *Microthrix* en EDAR. TECNOLOGÍA DEL AGUA. ISSN: 0211-8173. Dep. Legal: B. 4156-84.
- Castillo MA, Felis N, Aragón P, Cuesta G, Sabater C. (2006)** Biodegradation of the herbicide diuron by *Streptomyces* isolated from soil. International Biodegradation and Bioremediation. 58: 196-202.
- Cuesta G, García de la Fuente R, Abad M, Fornés F. (2012)** Isolation and identification of actinomycetes from a compost-amended soil with potential as biocontrol agents. Journal of Environmental Management. 95: S280-S284.
- Cuesta G, Soler A, Alonso JL, Morenilla JJ, Bernácer I. (2011)** Diversity of foaming producing nocardioform actinomycetes from wastewater treatment plants in Spain. Microorganisms in Industry and Environment. Ed. World Scientific Publishing Co. ISBN: 978-981-4322-10-2
- Cuesta G, Morales L, García de la Fuente R, Botella S, Fornés F, Abad M. (2009)** Identification of actinomycetes with antifungal activity isolated from soil amended with compost. Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Ed. World Scientific Publishing Co. ISBN: 978-981-283-754-7. Pag.: 55-58
- Soler A, Alonso JL, Cuesta G. (2009)** Diversidad de actinomicetos nocardioformes productores de espumas biológicas aislados de plantas depuradoras de aguas residuales de la Comunidad Valenciana. TECNOLOGÍA DEL AGUA. ISSN: 0211-8173. Dep. Legal: B. 4156-84

Biotecnología Microbiana para la Industria Agroalimentaria

Coordinadores: **Pilar Calo Mata y Jorge Barros Velázquez.** Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, C/Carballo Calero s/n, Campus Universitario Norte, 27002 Lugo.



Miembros del Grupo de Investigación. Delante (izqda. a dcha.): Mohamed El Sayed, Leonardo Acuña, Pilar Calo-Mata, Conchi Fernández, Karola Böhme, Sonia Caamaño, Santiago Aubourg y Minia Sanxuás; detrás (izqda. a dcha.): Marcos Quintela, Jorge Barros, José M. Gallardo, Benito Cañas e Ignacio Ortea.

Nuestro grupo comenzó su andadura hace aproximadamente 10 años. Desde entonces hemos desarrollado líneas de investigación orientadas a la caracterización de microorganismos de interés para la industria alimentaria y, por otra parte, al desarrollo de técnicas moleculares de trazabilidad de ingredientes en alimentos. En el ámbito microbiológico hemos abordado la caracterización de microorganismos de interés en procesos fermentativos y de bioconservación, así como el estudio de aquellas especies microbianas más problemáticas por su carácter patógeno o alterante de alimentos frescos e industrializados.

Dentro de este gran ámbito que representa la aplicación de herramientas biotecnológicas a la industria alimentaria, en los últimos años hemos desarrollado específicamente los siguientes proyectos:

- Desarrollo de microarrays basados en la detección de la reacción de la ligasa para la detección y cuantificación directa en alimentos de microorganismos de interés industrial.
- Definición de biomarcadores proteicos para la identificación directa de microorganismos y otros ingredientes de interés en la industria alimentaria, utilizando técnicas de espectrometría de masas MALDI-TOF y fragmentación peptídica.
- Identificación de SNPs de interés para la identificación precisa de especies filogenéticamente muy próximas y de relevancia alimentaria.

Estas líneas de investigación han requerido la confección de una amplia colección de microorganismos de interés en la industria alimentaria, las cuales han sido caracterizadas a nivel genómico y proteómico. En el ámbito de la proteómica, hemos tenido la oportunidad de colaborar desde el principio de nuestra existencia como grupo, con los equipos dirigidos por el Prof. José M. Gallardo en el IIM-CSIC y por el Prof. Benito Cañas en la UCM. En el ámbito de la tecnología de microarrays basados en la detección de la reacción de ligación, venimos colaborando desde hace varios años con el grupo dirigido por la Dra. Bianca Castiglioni en el IBBA-CNR (Milán, Italia) y con el Dr Stefano Morandi del grupo dirigido actualmente por la Dra Milena Brasca en el ISPA-CNR (Milán, Italia). Más recientemente, y gracias a la participación en un proyecto INNPACTO, tenemos la oportunidad de aplicar dicha tecnología a problemáticas específicas de la industria láctea. Dicho proyecto es posible gracias a la participación de cinco socios industriales de Madrid, País Vasco y Galicia.

Asimismo, la presente investigación ha permitido la creación de una base de datos de acceso libre, Spectrabank (www.spectrabank.org o www.spectrabank.eu), que permite acceder a los perfiles MALDI-TOF de las principales especies microbianas de interés alimentario, a sus listas de masas, etc. Dicha base de datos ha sido realizada en colaboración con la USC y el Centro de Supercomputación de Galicia, gracias a sendos proyectos financiados por el MEC y la Xunta de Galicia y representa actualmente la WEB de

acceso libre más completa a nivel internacional en el ámbito de la identificación microbiana mediante MALDI-TOF.

Esta línea de investigación, coordinada en la USC por Pilar Calo-Mata y Jorge Barros Velázquez, cuenta con la participación de los doctorandos Karola Böhme, Inmaculada Fernández No, Marcos Quintela Baluja, Sonia Caamaño Antelo y Mohammed Elsayed, así como con los alumnos de postgrado Isabel Fernández, Beatriz Toimil y David Pérez. Asimismo colabora con nosotros el investigador post-doctoral Ignacio Ortea.

Caracterización de bacterias ácido lácticas probióticas y productoras de bacteriocinas, aisladas de nuevas fuentes, tales como esponjas marinas, leche de camella, etc.

Esta línea de investigación, si bien se había iniciado en nuestro grupo con el aislamiento a partir de especies acuícolas de cepas de *Enterococcus faecium* productoras de enterocina P y con actividad probiótica, se ha visto enriquecida en los últimos años con la colaboración con diversos grupos de investigación. De entre ellos, destacar el del Dr. Stefano Morandi en el ISPA-CNR de Milán (Italia), grupo con el que se ha colaborado en el aislamiento de microbiota ácido láctica de interés para la industria láctea a partir de leche y productos lácteos de diversas regiones de Italia. Más recientemente, y gracias a diversos proyectos de la AECID, hemos venido colaborando con el INSTM de Túnez y la Universidad de Orán (Argelia). Estas colaboraciones nos han permitido acceder a organismos de la costa mediterránea norteafricana escasamente estudiados, tales como esponjas marinas, donde nuestro equipo, en colaboración con el grupo de la Prof. Monia Elbour (Túnez) ha logrado el aislamiento de cepas de enterococos multiproductoras de diversas enterocinas con actividad frente a patógenos humanos y de peces y que actualmente se están evaluando como ingredientes de piensos en la industria acuícola. En esta línea vienen trabajando las doctorandas tuncinas Ouissal Chahad y Rym El Jeni.

Por otra parte, esta línea se complementa con el aislamiento de nuevas cepas bacteriocinogénicas de *Leuconostoc mesenteroides* a partir de alimentos escasamente conocidos en Occidente, tal es el caso de la leche de camella, alimento que exhibe interesantes propiedades probióticas gracias a la presencia de ciertas especies de BAL escasamente estudiadas hasta ahora. Actualmente nos encontramos caracterizando, en colaboración con el grupo de la Prof. Zineb Benmechermene (Orán, Argelia), un nuevo tipo de mesenterocina con potencial aplicación industrial.

Asimismo, y gracias a un programa de cooperación internacional auspiciado por el Banco Santander, venimos desarrollando una colaboración con el grupo de investigación dirigido por el Prof. Augusto Bellomio del CONYCEC (Tucumán, Argentina), para la aplicación de bacteriocinas híbridas, creadas por fusión de los genes codificantes para mundticina y colicina, en la bioconservación de productos alimentarios, tema de investigación del doctorando argentino Leonardo Acuña. Desarrollo de nuevos envases laminados incluyendo extractos de algas y nuevos métodos de refrigeración basados en aceites esenciales y otros agentes antimicrobianos con actividad bioconservante y su aplicación en alimentos.

En el campo de la inhibición de la microbiota patógena y alterante en alimentos frescos, venimos colaborando con

el equipo dirigido por el Prof. Santiago Aubourg en el IIM-CSIC así como con diversas empresas del sector marino, para el desarrollo de láminas biodegradables que incluyan bioconservantes naturales. Dichas láminas, en contacto con alimentos frescos, inhiben el crecimiento microbiano de las principales especies patógenas y alterantes en alimentos, tanto Gram(+) como Gram(-), permitiendo una extensión de la vida comercial de dichos alimentos. Asimismo, esta línea se complementa con la investigación de nuevos métodos de refrigeración basados en hielo líquido y en escamas que incluyen bioconservantes y que han permitido extender la vida útil de especies marinas refrigeradas.

Esta línea de investigación cuenta con la participación de las doctorandas Minia Sanxuás y Bibiana García, así como con el alumno de postgrado Alberto Fernández.

DIEZ PUBLICACIONES DE LOS ÚLTIMOS TRES AÑOS

Böhme K, Fernández-No I, Barros-Velázquez J, Gallardo JM, Cañas B, Calo-Mata P (2010) Species differentiation of food spoilage and pathogenic Gram-negative bacteria present in seafood by MALDI TOF mass fingerprinting. *J Proteome Res* 9: 3169-3183.

Böhme K, Fernández-No I, Barros-Velázquez J, Gallardo JM, Cañas B, Calo-Mata P (2010) Comparative analysis of protein extraction methods for the identification of seafood-borne pathogenic and spoilage bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Meth* 2: 1941-1947.

Böhme K, Fernández-No I, Gallardo JM, Cañas B, Barros-Velázquez J Calo-Mata P (2011) Rapid species identification of seafood spoilage and pathogenic Gram-positive bacteria by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electrophoresis*, 32: 2951-2965.

Chahad OB, El Bour M, Calo-Mata P, Boudabous A, Barros-Velázquez J (2012) Discovery of novel preservation agents with inhibitory effects on growth of food-borne pathogens and their applications in seafood products. *Res Microbiol* 163: 44-54.

Fernández-No I, Böhme K, Calo P, Barros-Velázquez J (2011) Characterization of histamine-producing bacteria from farmed blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*) and turbot (*Psetta maxima*). *Int J Food Microbiol* 151: 182-189.

Fernández-No I, Böhme K, Calo-Mata P, Cañas B, Gallardo JM, Barros-Velázquez J (2012) Isolation and characterization of *Streptococcus parauberis* from vacuum-packaged refrigerated seafood products. *Food Microbiol*. 30: 91-97.

Fernández-No I, Böhme K, Gallardo JM, Barros-Velázquez J, Cañas B, Calo-Mata P (2010) Differential characterization of biogenic amine-producing bacteria involved in food poisoning by MALDI TOF peptide mass fingerprinting. *Electrophoresis* 31: 1116-1127.

Fernández-No I, Guarddon M, Boehme K, Cepeda A, Calo-Mata P, Barros-Velázquez J (2011) Detection and quantification of spoilage and pathogenic *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* by real-time PCR. *Food Microbiol* 28: 605-610.

Hosseini SV, Arlindo S, Böhme K, Fernández-No I, Calo-Mata P, Barros-Velázquez J (2009) Genetic and probiotic profiling of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* strains isolated from non-fermented animal foods. *J Appl Microbiol* 107: 1392-1403.

Sanjuás Rey M, García-Soto B, Fuertes-Gamundi JR, Aubourg S, Barros-Velázquez J. (2012) Effect of a natural organic acid-icing system on the microbiological quality of commercially relevant chilled fish species. *LWT-Food Science and Technology* 46, 217-223.

Grupo de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana en Santiago

Áreas de Interés: El grupo de investigación posee amplia experiencia en clonación y explotación de genes con potencial industrial en los ámbitos farmacéutico, ingeniería de procesos y tecnología de alimentos. En sus investigaciones destacan los trabajos en genética de levaduras y hongos filamentosos mediante estrategias alternativas a la ingeniería genética, basándose en conocimientos de genética clásica de microorganismos eucariotas.

Tomas González Villa.



Componentes del Grupo (de izquierda a derecha): Koke Araya-Garay, Lucía Feijoo Siota, José Manuel Ageitos Martínez, Trinidad de Miguel Bouzas, Tomas González Villa, Margarita Poza Domínguez, Patricia Veiga Crespo, Juan Vallejo Vidal y Lucía Blasco.

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Análisis y mejora del vino

La industria vinica trata de mejorar el cultivo y la calidad de las distintas variedades de uva y, también, mejorar determinados caracteres de las cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que son empleadas como «pie de cuba». Se persigue así obtener un producto de la calidad y características que demandan los consumidores. Por ello, las líneas de investigación están centradas en la mejora de cepas vnicas de *S. cerevisiae* mediante el empleo de ingeniería genética y en el análisis bioquímico del vino para establecer la edad del mismo. Por una parte se trata de facilitar el trabajo con cepas vnicas en el laboratorio reduciendo su nivel de ploidía, incrementando su capacidad de esporulación y haciéndolas heterotáticas mediante la interrupción del gen H0. El nivel de ploidía se ha reducido empleando el agente antifúngico benomilo, que

provoca pérdida cromosómica. Además se ha conseguido de esta forma, aumentar el número de ascas con cuatro esporas producidas tras varias meiosis en comparación con las obtenidas a partir de cepas en las que no se ha empleado ningún tipo de tratamiento.

También se llevó a cabo la identificación y caracterización de genes de *S. cerevisiae* implicados en la formación de espuma en el vino con la finalidad de clonarlos en levaduras cerveceras, *Saccharomyces carlsbergiensis*, para aumentar la cantidad y calidad de la espuma obtenida en la cerveza.

Utilización de enzibióticos como herramientas terapéuticas contra cepas multirresistentes

El uso abusivo de antibióticos convencionales ha provocado la aparición de microorganismos resistentes a un amplio espectro de estos fármacos, por lo que la efectividad de terapias antibacterianas se ha visto mermada.

Por esta razón se hace necesaria la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por microorganismos multirresistentes.

Estos posibles agentes terapéuticos son los enzibióticos. Los enzibióticos son enzimas líticas que emplean los virus bacteriófagos en algún momento durante su ciclo lítico. Con estas enzimas, matan y lisan las bacterias que infectan. Hay dos tipos: lisozimas y holinas. Las lisozimas son β -1,4-acetilmuramidasa que actúan rompiendo enlaces entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina del peptidoglucano que forma la pared bacteriana. Las holinas forman poros en la membrana para que las lisozimas puedan acceder a la pared bacteriana.

Aunque se conocen desde principios del siglo xx, los enzibióticos quedaron olvidados cuando se descubrieron los antibióticos convencionales, pero ahora resurgen debido a las amplias posibilidades que nos presenta la Biotecnología en la manipulación de microorganismos.

Si el concepto de enzibiótico se extiende a aquellas enzimas capaces de actuar sobre las paredes fúngicas, como las actividades glucanásicas y las quitinasas producidas por hongos como *Trichoderma harzianum* o la bacteria *Bacillus circulans*, la batería terapéutica se amplía enormemente. Este grupo de investigación, ha estado trabajando en la aplicación de las enzimas endoglucanasa para el tratamiento de enfermedades fúngicas.

Las grandes ventajas que presenta la terapia con enzibióticos son su gran especificidad hacia la especie bacteriana que causa la infección, no producen efectos secundarios, no presentan resistencias, los costes de producción son bajos y no atacan a la microflora normal debido a su gran especificidad.

PALEOMICROBIOLOGÍA: BÚSQUEDA DE MICROORGANISMOS FÓSILES Y GENES ANCESTRALES EN PIEDRAS DE ÁMBAR

El estudio de la evolución y de los orígenes de las especies ha sido y será uno de los grandes retos de la Ciencia. La gran dificultad a la hora de abordar el estudio de la evolución de los microorganismos fue localizar muestras de microorganismos fósiles no contaminadas y aisladas de las especies actuales.

El ámbar es una resina de origen vegetal, secretada principalmente por coníferas y leguminosas, como mecanismo de defensa. Durante su proceso de fosilización, esta resina forma una matriz en la que quedan embebidos los organismos presentes en la superficie del árbol durante su secreción. Este hecho convierte al ámbar en el material ideal para la búsqueda de microorganismos ancestrales. Además, el ámbar va a formar una barrera de protección del DNA ancestral frente a agentes como las radiaciones ultravioletas y el agua. Además, el ámbar facilita el proceso de datación de las muestras ya que es posible datarlo

por estratigrafía. Es posible obtener muestras de ámbar formadas durante el Mioceno, el Oligoceno o, incluso, el Cretácico.

El gran desarrollo de técnicas como la PCR ha facilitado enormemente el estudio de DNA fósil. La gran dificultad de estos trabajos radica en la contaminación con muestras recientes y la degradación del DNA ancestral. Para evitar ambos problemas es necesario el desarrollo de controles estrictos durante todo el proceso de manipulación de las muestras, un método estricto de esterilización y un estricto y crítico análisis de todos los resultados obtenidos.

Este grupo de investigación ha desarrollado un método de esterilización de la superficie de las piedras de ámbar que le ha permitido, tras estrictos análisis para evitar la contaminación con DNA actual, el aislamiento de distintos fragmentos de genes ancestrales valiéndose de herramientas tan potentes como la pirosecuenciación, que ha permitido hasta la fecha, la obtención de más de 100.000 amplicones, de los que ya se han identificado más de 500 secuencias pertenecientes a distintos organismos tanto procariotas como eucariotas.

POLIGALACTURONASAS

Las pectinas o sustancias pécticas son polisacáridos que se componen principalmente de ácidos poligalacturónicos coloides. Se hallan en los tejidos de las plantas. Las pectinas son útiles por su capacidad para formar geles o jaleas con compuestos polihidroxilados, como los azúcares o con cantidades diminutas de iones polivalentes. Sin embargo la capacidad de formar geles produce que las pulpas obtenidas de los vegetales sean muy densas, lo que dificulta su procesado.

Las poligalacturonasas rompen estas cadenas pécticas, produciendo la licuación del zumo. Las poligalacturonasas se pueden clasificar por su modo de actuación, así se habla de exopoligalacturonasas cuando la acción del enzima se realiza por los extremos de las cadenas, o endopoligalacturonasas que cortan en cualquier punto interno de las cadenas. Este último tipo tiene una actividad mucho mayor que el anterior, dado que tiene muchos más lugares donde actuar.

En el grupo de investigación se ha trabajado con las poligalacturonasas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* y *Medicago sativa*. Se han caracterizado, clonado y expresado en diferentes organismos tales como *Escherichia coli*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris* y *Arabidopsis thaliana*. Como resultado de esta experiencia se han aislado y conseguido cepas superproductoras de poligalacturonasa, tanto de modo natural como recombinante, susceptibles de aplicación industrial con excelentes resultados. Fruto de estas investigaciones, se han conseguido numerosas publicaciones y patentes, tanto españolas como internacionales. Con el fin de mejorar la actividad de la cepa productora *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 se ha conseguido un fenotipo floculante inducible por anaerobiosis para conseguir la producción continua de pectinasa y etanol.

PROTEASAS

Las proteasas son enzimas que degradan los enlaces peptídicos de las proteínas. Intervienen en gran variedad de funciones biológicas esenciales para la vida en todos los organismos. Las proteasas representan uno de los tres grandes grupos de enzimas utilizados a nivel industrial. Los microorganismos representan dos tercios de la producción comercial mundial de proteasas. Estos pueden ser cultivados en grandes cantidades en poco tiempo estableciendo procesos de fermentación. Con estos procesos de fermentación se pueden obtener las cantidades deseadas de producto. Los microorganismos recombinantes representan una excelente fuente de producción de proteasas heterólogas debido a su rápido y económico crecimiento.

En nuestro grupo de investigación se ha caracterizado y producido una proteasa procedente de *Candida caseinolytica*. Esta proteasa alcalina con amplio rango de pH podría tener interés en la industria de los detergentes o en la del cuero. Se ha trabajado con una proteasa de tipo aspártico producida por *Myxococcus xanthus*. Esta proteasa ha sido caracterizada, clonada y expresada en *E. coli* y levaduras. Este enzima tiene la capacidad de coagular leche por lo que podría tener interés en la industria láctea.

Se ha clonado y expresado la proteasa codificada por el gen *XPR2* procedente de *Yarrowia lipolytica* en *Pichia pastoris*. La proteasa codificada por este gen es una proteasa alcalina que podría ser útil en la industria de los detergentes y en la del cuero.

Se ha clonado y expresado con éxito la quimosina de *Bubalus arnee bubalis* y *Capra hircus*. Estas dos quimosinas se han comparado con las existentes en el mercado y se ha realizado un estudio bioquímico. La quimosina es una proteasa aspártica utilizada en la elaboración de quesos para coagular la leche.

En esta línea de proteasas, también se ha purificado y caracterizado una serín proteasa de *Bacillus licheniformis* con capacidad coagulante y esta serín proteasa se ha expresado con éxito en *E. coli*.

CAROTENOIDES

Los carotenoides son pigmentos naturales ampliamente distribuidos en la naturaleza, responsables del color amarillo, naranja y rojo de plantas y animales, en el mundo microbiano se encuentran en las algas, bacterias, hongos y levaduras. Se estima que la naturaleza produce aproximadamente 100 millones de toneladas de carotenoides al año.

Los carotenoides son utilizados tanto en la industria alimentaria, como colorantes, como en la industria cosmética. Se les han atribuido funciones y acciones biológicas, como la actividad de pro-vitamina A, aumento del sistema inmune y una disminución del riesgo de enfermedades degenerativas. Los pigmentos naturales actuales no son capaces de satisfacer las demandas actuales de la industria y el uso de pigmentos sintéticos cuenta cada vez con un mayor rechazo social. Se hace, pues, necesaria la búsqueda de nuevas fuentes naturales

microbianas de carotenoides así como la optimización de la producción de carotenos de las fuentes actuales.

Las líneas de investigación abordadas en nuestro grupo de investigación han sido: La bioproducción de carotenoides de origen natural mediante la construcción y utilización de cepas superproductoras de la levadura *Phaffia rhodozyma* como factorías celulares comercialmente competitivas en el campo de la producción de antioxidantes, principalmente astaxantina.

Transformación de bacterias y levaduras de interés biotecnológico para producción de moléculas antioxidantes mediante el control de los genes y las rutas de biosíntesis de carotenoides, como es el caso de *Gordonia jacobea* que es capaz de sintetizar y acumular grandes cantidades de cantaxantina.

En otra de las líneas de actuación se realizó la búsqueda, clonación y expresión de los genes ζ -caroteno desaturasa (*zds-Fc*) y licopeno β -ciclase (β -lyc-Fc) de *Ficus carica*. Finalmente, se logró por primera vez en la levadura *P. pastoris* la producción de β -caroteno y astaxantina, aportando una fuente microbiológica alternativa para la biosíntesis de carotenoides.

LAS 10 PUBLICACIONES MÁS REPRESENTATIVAS DE LOS ÚLTIMOS 10 AÑOS

- Ageitos JM, Vallejo JA, Veiga-Crespo P, Villa TG (2011)** Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Appl Microbiol Biot* 90: 1219-1227.
- Araya-Garay JM, Feijoo-Siota L, Veiga-Crespo P, Villa TG (2011)** cDNA cloning of a novel gene codifying for the enzyme lycopene β -cyclase from *Ficus carica* and its expression in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotech* 92: 769-777.
- Feijoo-Siota L, Villa TG (2011)** Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. *Food Bioprocess Tech*, 4: 1066-1088.
- Poza M, Prieto-Alcedo M, Sieiro C, Villa TG (2004)** Cloning and expression of *clt* genes encoding milk-clotting proteases from *Myxococcus xanthus* 422. *Appl Environ Microbiol* 70: 6337-6341.
- Poza M, Sestelo ABF, Ageitos JM, Vallejo JA, Veiga-Crespo P, Villa TG (2007)** Cloning and expression of the *XPR2* gene from *Yarrowia lipolytica* in *Pichia pastoris*. *J Agr Food Chem* 55: 3944-3948.
- Sieiro C, Poza M, Vilanova M, Villa TG (2003)** Heterologous expression of the *Saccharomyces cerevisiae* *PGU1* gene in *Schizosaccharomyces pombe* yields an enzyme with more desirable properties for the food industry. *Appl Environ Microb* 69: 1861-1865.
- Sieiro C, Sestelo ABF, 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.
- Vallejo JA, Ageitos JM, Poza M, Villa TG (2008)** Cloning and Expression of Buffalo Active Chymosin in *Pichia pastoris*. *J Agr Food Chem* 56: 10606-10610.
- Veiga-Crespo P, Ageitos JM, Poza M, Villa TG (2007)** Enzybiotics: a look to the future, recalling the past. *J Pharm Sci-US* 96: 1917-1924.
- Veiga-Crespo P, Fuste E, Vinuesa T, Vinas M, Villa TG (2011)** Synergism between outer membrane proteins and antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 2206-2211.

Microbiología Molecular y Biotecnología de Hongos

Jesús Manuel Cantoral, María Carbú, María Esther Rodríguez, Francisco Javier Fernández-Acero, Carlos Garrido, Eugenia Muñoz-Bernal, Victoria Eugenia González-Rodríguez, Eva Liñeiro. Dpto. Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública. Lab. Microbiología. Facultad Ciencias del Mar y Ambientales. Centro Andaluz de Investigaciones Vitivinícolas. Universidad de Cádiz. Pol. Río San Pedro, 11510. jesusmanuel.cantoral@uca.es

Nuestro grupo de investigación desarrolla su labor docente e investigadora en la Universidad de Cádiz desde hace 20 años, siendo reconocido como Grupo de Investigación de Excelencia por la Junta de Andalucía. La labor investigadora se centra fundamentalmente en el estudio de los hongos, tanto filamentosos como levaduriformes, siempre con un claro enfoque de investigación aplicada al mundo agroalimentario. En el grupo se diferencian dos áreas de investigación: la del estudio de los hongos fitopatógenos y la de microbiología enológica. En ambos casos, el objetivo principal es suministrar nuevos conocimientos que permitan desarrollar nuevas estrategias de control microbiológico y mejora en los procesos industriales.

MICROBIOLOGÍA DE HONGOS FITOPATÓGENOS

Caracterización, Diagnóstico y Estudios Proteómicos

La agricultura es históricamente una de las principales actividades del hombre. Andalucía es la primera región agrícola española gracias a su clima, a la fertilidad de sus tierras, y al continuo esfuerzo de mejora llevado a cabo por todo el sector, incluyendo sobre todo a los empresarios agrícolas, cada vez más orientados a la innovación. Sin embargo, este avance corre peligro por la aparición de nuevas enfermedades vegetales, destacando aquellas causadas por hongos filamentosos fitopatógenos.

Nuestro grupo comenzó su actividad investigadora con el estudio del hongo *Botrytis cinerea*, y posteriormente con *Colletotrichum acutatum* y *C. gloeosporioides*. Ambos géneros han sido catalogados según la revista *Molecular Plant Pathology*, entre los 10 hongos más peligrosos por las pérdidas que ocasionan en agricultura. Nuestros estudios se han centrado principalmente en los cultivos de fresa, tomate y vid, dada la importancia económica de estos cultivos en nuestra región. La investigación desarrollada ha sido financiada por proyectos de investigación europeos, nacionales y autonómicos, y por la colaboración con empresas del sector agroalimentario.



El grupo de Microbiología Molecular y Biotecnología de Hongos de la Universidad de Cádiz.

Durante estos años hemos realizado un profundo estudio de microbiología clásica con ambos hongos. Se aislaron numerosas cepas a partir de cultivos de tomate, vid y fresa, y se realizó una caracterización morfológica, permitiendo obtener en el laboratorio cada una de las fases del ciclo de vida de *B. cinerea*, así como un completo estudio morfológico del hongo *Colletotrichum* (Garrido, 2008). Todos estos trabajos han permitido disponer de una amplia Colección Micológica en la Universidad de Cádiz. También se han aislado y caracterizado compuestos procedentes de caldos de cultivo, algunos de los cuales han resultado ser toxinas claves en el ciclo de infección de estos hongos.

La caracterización se completó con la utilización de técnicas moleculares. Para ambos hongos se ha descrito el cariotipo electroforético mediante electroforesis en campo pulsante. En *B. cinerea* se demostró el alto grado de polimorfismo que presentan las cepas estudiadas; y con *C. acutatum*, se realizó la primera descripción del cariotipo hasta la fecha, determinando tamaño y número de cromo-

somas en esta especie (Garrido, 2009a). Aprovechando las ventajas de nuevas técnicas moleculares, se desarrollaron protocolos para la detección e identificación de *Colletotrichum* spp., *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* en plantas de fresa mediante Real-Time PCR. Hasta la fecha, el diagnóstico de estos hongos se realizaba mediante aislamiento, cultivo y por PCR convencional. Los protocolos desarrollados para Real-Time PCR, mejoraron los existentes del orden de 100 veces en sensibilidad de detección a partir de material vegetal asintomático (Garrido, 2009b). Actualmente, se están desarrollando estudios de biotecnología de hongos mediante la obtención de mutantes *knock-out* en búsqueda de nuevos factores de patogenicidad.

Nuestro grupo ha sido pionero en la aplicación de la proteómica al ámbito agroalimentario. Esta técnica se ha revelado como una tecnología emergente, capaz de aportar una gran información biológica relevante. Nuestro grupo desarrolló el primer mapa proteico de *Botrytis cinerea*. La naturaleza inédita de este trabajo hizo necesaria la optimización de todo el proceso, desde la extracción de proteínas hasta la identificación de las mismas (Fernández-Acero, 2006). Desde esa fecha se han identificado más de 1000 proteínas de este hongo, desarrollando diferentes aproximaciones que incluyen: estudios diferenciales con cepas de distinta virulencia (Fernández-Acero, 2007), estudio de metabolismo con diferentes fuentes de carbono (Fernández-Acero, 2009), y la caracterización de subproteomas, como el secretoma o el fosfoproteoma (Fernández-Acero, 2010). Estos estudios han aportado pruebas de la validez de la proteómica para determinar nuevos factores de patogenicidad. La utilidad de esta información para comprender el mecanismo de infección y dilucidar nuevas estrategias de control de estos patógenos ha sido una de las líneas del grupo desde entonces (Fernández-Acero, 2011), y continúa mediante la realización de nuevas aproximaciones proteómicas a la biología de *B. cinerea* y *Colletotrichum acutatum*.

MICROBIOLOGÍA ENOLÓGICA

Selección de Levaduras y Mejora de Procesos Fermentativos

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo unicelular que ha acompañado al hombre desde las primeras civilizaciones. Tradicionalmente, la mayoría de estudios moleculares se han realizado en levaduras de laboratorio, utilizadas como modelo de organismos eucariotas para investigaciones en ciencia básica. A diferencia de estas levaduras, la mayoría de las levaduras vínicas son diploides, tienen una baja frecuencia de esporulación y un elevado polimorfismo cromosómico, presentando un amplio rango de fenotipos diferentes que pueden ser aprovechados en enología.

El desarrollo de técnicas de biología molecular ha permitido identificar y caracterizar cepas de levaduras en muchas regiones productoras de vino, mostrando, i) que existe una amplia variabilidad genética dentro de una misma especie, y ii) la ecología y dinámica de poblaciones en las fermentaciones espontáneas. El conocimiento de las distintas cepas de le-

vaduras que participan durante el proceso de fermentación es muy importante para establecer las más representativas, estudiar propiedades de interés enológico y poder seleccionarlas para su utilización en bodega como cultivos iniciadores.

Nuestro grupo ha centrado sus estudios en levaduras enológicas que participan en distintos procesos de elaboración de vinos, tanto jóvenes como de crianza biológica (finos y manzanillas) colaborando con diversas Bodegas, tanto del Marco vitivinícola de Jerez, como en el marco de la D. O. Ribera del Duero. Mediante la utilización de distintas técnicas moleculares hemos llevado a cabo la caracterización y selección de un amplio número de levaduras, lo que nos ha permitido describir un original modelo de adaptación al ambiente de las levaduras de «velo de flor», así como la selección de las levaduras enológicas más adecuadas, permitiendo mejorar, tanto la eficiencia del proceso de fermentación, como la calidad de los vinos obtenidos (Cantoral, 2010; Rodríguez, 2010).

Recientemente hemos comenzado a desarrollar aproximaciones proteómicas al estudio de levaduras enológicas. Se ha estudiado que existen cambios sustanciales en los niveles de proteína durante la fermentación alcohólica, poniendo de manifiesto la relevancia que tiene su análisis para entender las adaptaciones de las levaduras vínicas durante el proceso fermentativo. Mediante distintas aproximaciones experimentales estamos poniendo de manifiesto el proteoma de *S. bayanus* var. *uvarum*, y la posible relación de las proteínas identificadas con patrones de calidad organoléptica en los vinos.

BIBLIOGRAFÍA MÁS RELEVANTE ÚLTIMOS 5 AÑOS

- Cantoral JM y Rodríguez ME. (2010).** El singular mundo de las levaduras enológicas. Actualidad-SEM 49:35-40.
- Fernández-Acero FJ, Jorge I, Calvo E, Vallejo I, Carbú M, Camafeita, E, Lopez JA, Cantoral JM y Jorriñ J. (2006).** Two-dimensional electrophoresis protein profile of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. Proteomics 16(1):88-96.
- Fernández-Acero FJ, Jorge I, Calvo E, Vallejo I, Carbú M, Camafeita LE, Garrido C, López JA, Cantoral JM y Jorriñ J. (2007).** Proteomic analysis of phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* as a potential tool for identifying pathogenicity factors, therapeutic targets and for basic research. Arch Microbiol 187:207-215.
- Fernández-Acero, FJ, Colby, T, Harzen, A, Cantoral, JM y Schmidt, J (2009).** Proteomic analysis of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* during cellulose degradation. Proteomics 9:2892-2902.
- Fernández-Acero FJ, Colby T, Harzen A, Carbú M, Wieneke U, Cantoral JM y Schmidt J. (2010).** 2-DE proteomic approach to the *Botrytis cinerea* secretome induced with different carbon sources and plant-based elicitors. Proteomics 10:2270-2280.
- Fernández-Acero, FJ, Carbú M, El-Akhal MR, Garrido C, González-Rodríguez VE y Cantoral JM (2011).** Development of Proteomics-Based Fungicides: New Strategies for Environmentally Friendly Control of Fungal Plant Diseases. Int J Mol Sci, doi:10.3390.
- Garrido C, Carbú M, Fernández-Acero FJ, Budge G, Vallejo I, Colyer A y Cantoral JM. (2008).** Isolation and pathogenicity of *Colletotrichum* spp. causing anthracnose of strawberry in south west Spain. Eur J Plant Pathol 120:409-415.

Garrido C, Carbú M, Fernández-Acero FJ, Vallejo I y Cantoral JM. (2009a). Phylogenetic relationships and genome organization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose in strawberry. Eur J Plant Pathol 125:397-411.

Garrido C, Carbú M, Fernández-Acero FJ, Boonham N, Colyer A, Cantoral JM y Budge G. (2009b). Development of protocols for detection

of *Colletotrichum acutatum* and monitoring of strawberry anthracnose using real-time PCR. Plant Pathol 58:43-51.

Rodríguez ME, Infante JJ, Molina M, Domínguez M, Rebordinos L y Cantoral JM. (2010). Genomic characterization and selection of wine yeast to conduct industrial fermentations of a white wine produced in a SW Spain winery. J Appl Microbiol 108: 1292-1302.

Enzimas Microbianas de Aplicación Industrial

Francisco Javier Pastor y Pilar Diaz. Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona. Av. Diagonal 643. 08028 Barcelona. Tel: 934034626; Fax: 934034629. fpastor@ub.edu; pdiaz@ub.edu



Grupo de Enzimas Microbianas de Aplicación Industrial. De izquierda a derecha: Fikret Uyar, Belén Inanzón, Mai Nielsen, Àngels Mateu, Mónica Estupiñán, Liliana Cerda, Francisco Javier Pastor, Pilar Diaz, Josefina Martínez, Susana Valenzuela, Silvia Cesarini y Amanda Fillat.

La aplicación de enzimas en la fabricación de productos de consumo es una práctica de creciente implementación industrial debido a las ventajas que puede suponer en los procesos productivos. La introducción de la biotecnología enzimática en la industria permite, entre otras aportaciones, minimizar la generación de contaminantes, aumentar el rendimiento de las materias primas, y hace posible la obtención de productos con propiedades y características

nuevas. El grupo de enzimas microbianas para aplicaciones industriales trabaja en el aislamiento, caracterización y producción de enzimas para el desarrollo de procesos productivos de impacto ambiental minimizado: **tecnologías sostenibles**. Los temas principales de la investigación son el estudio de la biología molecular y la bioquímica de carbohidratasa y lipasa, así como la identificación y mejora de enzimas para aplicaciones biotecnológicas en

el blanqueo y reciclado de papel, la producción de biocombustibles, la mejora de las fibras textiles, la industria alimentaria, y el desarrollo de materiales de nueva generación basados en derivados grasos o en lignocelulosa.

El grupo de investigación posee una amplia colección de cepas microbianas productoras de enzimas hidrolíticas, aisladas de suelos agrícolas y bosques tropicales. Entre ellas destaca la nueva especie *Paenibacillus barcinonensis* aislada a partir de arrozal del delta de Ebro y seleccionada por su potente actividad hidrolítica sobre polisacáridos (Sánchez *et al.*, 2005). El análisis proteómico del secretoma de esta especie ha permitido la identificación de al menos 6 xilanasas distintas, responsables de su actividad xilanolítica. Cuatro de estas **xilanasas** han sido clonadas y caracterizadas hasta el momento, mostrando diferencias tanto en actividad específica como en estructura (Valenzuela *et al.*, 2010). Entre estas enzimas cabe destacar la xilanasasa Xyn30D por pertenecer a la familia 30 de glicosil hidrolasas (inusual para xilanasas) y poseer actividad exclusiva sobre xilanos de angiospermas (glucuronoxilanos) (Valenzuela *et al.*, 2012).

El potencial de la utilización de la celulosa para la obtención de bioetanol y para la generación de nanomateriales propicia la búsqueda de nuevas celulasas con actividad y selectividad incrementadas. Entre las cepas microbianas de la colección figuran tanto bacterias como hongos con gran actividad celulolítica. A partir de ellas se han purificado y caracterizado varias **celulasas** y β -glucanasas con potencial biotecnológico tanto para la sacarificación de la celulosa y glucano como para la modificación superficial de las fibras de lignocelulosa. La gran actividad de la β -glucanasasa Cel12A de *Stachybotrys atra* sobre glucano de cebada evidencia su utilidad en la industria cervecera (Picart *et al.*, 2012). Por este motivo la enzima se ha expresado y secretado en cepas industriales de *Aspergillus* para su producción a escala.

En los últimos años se han aislado, clonado y caracterizado numerosas enzimas con actividad sobre lípidos (Prim *et al.* 2006; Bassegoda *et al.*, 2012), expresándolas con éxito en *Escherichia coli*, *Pseudomonas* o *Saccharomyces* (Mormeneo *et al.*, 2008; Bofill *et al.*, 2010). También se ha evaluado la posibilidad de utilizar las **lipasas** como dianas terapéuticas para infecciones como el acné o la úlcera pilórica (Ruiz *et al.*, 2007), y se ha llevado a cabo la modificación de algunas lipasas por diseño racional, mutagénesis iterativa o por evolución dirigida. Las variantes enzimáticas mejoradas se han inmovilizado y ensayado en procesos de química fina para la producción de compuestos quirales de interés en la industria farmacéutica y cosmética (Bassegoda *et al.*, 2010; Martínez *et al.* 2010; Torrego *et al.*, 2012), y en algunos casos se han desarrollado variantes enzimáticas con mejores propiedades para los procesos de síntesis o hidrólisis, así como para la transesterificación de aceites residuales en la producción de biodiesel.

La caracterización bioquímica de las enzimas, incluyendo el estudio de las condiciones óptimas de actividad (pH y temperatura), estabilidad, y efecto de iones metálicos y tensioactivos, permite seleccionar las enzimas más robustas para

su evaluación en procesos industriales. Las xilanasas activas y estables en las condiciones del proceso industrial papelero han sido ensayadas en el **blanqueo de la pasta de papel**, en colaboración con el grupo de Ingeniería Papelera de la Universidad Politécnica de Cataluña. Los resultados han permitido identificar xilanasas eficientes para eliminar ácidos hexenurónicos, causantes del amarillamiento de papel (Valls *et al.*, 2010), y poner de manifiesto el sinergismo entre xilanasas de las familias GH11 y GH30 en el blanqueo de la pasta de papel de eucalipto, y el ahorro de blanqueantes químicos con la consiguiente disminución en la generación de residuos tóxicos (AOX) que su uso posibilita. (Gallardo *et al.*, 2010a). Los ensayos papeleros han identificado adicionalmente la nueva celulasa modular Cel9B cuya aplicación modifica superficialmente las fibras y permite notables ahorros de energía en el proceso de **refinado del papel** (Cadena *et al.*, 2010).

La estabilidad térmica es una característica fundamental de las enzimas industriales. Con el fin de aumentar la termoestabilidad de la xilanasasa Xyn10B se ha realizado un proceso de **evolución dirigida** mediante *gene shuffling*. Se ha obtenido un doble mutante que presenta un aumento en la vida media de la enzima de más de un orden de magnitud. El análisis de la estructura del mutante muestra los cambios en la superficie de la enzima responsables de su mayor compactación (Gallardo *et al.*, 2010b). Mediante ingeniería proteica se ha obtenido también una celulasa derivada de Cel9B, conteniendo únicamente su módulo catalítico y un módulo adicional, que produce un efecto de biorefinado de las fibras superior a la enzima original, evidenciando el potencial de la ingeniería proteica en la mejora de enzimas con aplicación biotecnológica (Chiriác *et al.* 2010).

PUBLICACIONES RECIENTES

- Bassegoda A, Pastor FIJ y Diaz P. (2012).** *Rhodococcus* sp. strain CR-53 LipR, the first member of a new bacterial lipase family (family X) displaying an unusual Y-type oxyanion hole, similar to the *Candida antarctica* clan. Appl Environ Microbiol 78: 1724-1732.
- Picart P, Goedegebuur F, Diaz P y Pastor FIJ. (2012).** Expression of novel β -glucanase Cel12A from *Stachybotrys atra* in bacterial and fungal hosts. Fungal Biol 116: 443-451.
- Torrego-Solana N, Martín-Arjol I, Bassas-Galía M, Diaz P y Manresa A. (2012).** Hydroxy-fatty acid production in a *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 PHA synthase mutant generated by directed mutagenesis. Appl Microbiol Biotechnol 93: 2551-61.
- Valenzuela SV, Diaz P y Pastor FIJ. (2012).** A modular glucuronoxylan-specific xylanase with a carbohydrate binding module of family CBM35. Appl Environ Microbiol (en prensa).
- Bassegoda A, Nguyen GS, Schmidt M, Kourist R, Diaz P y Bornscheuer UT. (2010).** Rational protein design of *Paenibacillus barcinonensis* esterase EstA for kinetic resolution of tertiary alcohols. Chemcatchem 2: 962-967.
- Bofill C, Prim N, Mormeneo M, Manresa A, Pastor FIJ y Diaz P. (2010).** Differential behaviour of *Pseudomonas* sp 42A2 LipC, a lipase showing greater versatility than its counterpart LipA. Biochimie 92: 307-316.
- Cadena EM, Chiriác AI, Pastor FIJ, Diaz P, Vidal T y Torres AL. (2010).** Use of cellulases and recombinant cellulose binding domains for refining TCF krft pulp. Biotechnol Prog 26: 960-967.

- Chiriac AI, Cadena EM, Vidal T, Torres AL, Diaz P y Pastor FIJ. (2010).** Engineering a family 9 processive endoglucanase from *Paenibacillus barcinonensis* displaying a novel architecture. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:1125–1134.
- Gallardo O, Fernández-Fernández M, Valls C, Valenzuela SV, Roncero M B, Vidal T, Diaz P y Pastor FIJ. (2010a).** Characterization of a family GH5 xylanase with activity on neutral oligosaccharides and evaluation as a pulp bleaching aid. *Appl Environ Microbiol* 76: 6290-6394.
- Gallardo O, Pastor FIJ, Polaina J, Diaz P, Lysek R, Vogel P, Isorna P, González B y Sanz-Aparicio J. (2010b).** Structural insights into the specificity of Xyn10B from *Paenibacillus barcinonensis* and its improved stability by forced protein evolution. *J Biol Chem* 285: 2721-2733.
- Martínez E, Hamberg M, Busquets M, Diaz P, Manresa A y Oliw, EH. (2010).** Biochemical characterization of the oxygenation of unsaturated fatty acids by the dioxygenase and hydroperoxide isomerase of *Pseudomonas aeruginosa* 42A2. *J Biol Chem* 285: 9339-9345.
- Valenzuela SV, Diaz P y Pastor FIJ. (2010).** Recombinant expression of an alkali stable GH10 xylanase from *Paenibacillus barcinonensis*. *J Agric Food Chem* 58: 4814-4818.
- Valls C, Gallardo O, Vidal T, Pastor FIJ, Diaz P y Roncero MB. (2010).** New xylanases to obtain modified eucalypt fibres with high-cellulose content. *Bioresour Technol* 101: 7439–7445.
- Mormeneo M, Andrés I, Bofill C, Díaz P y Zueco J.(2008).** Efficient secretion of *Bacillus subtilis* lipase A in *Saccharomyces cerevisiae* by translational fusion to the Pir4 cell wall protein. *Appl Microbiol Biotechnol* 80: 437–445.
- Ruiz C, Falcocchio S, Pastor FIJ, Saso L y Diaz P. (2007).** *Helicobacter pylori* EstV: identification, cloning, and characterization of the first lipase isolated from an epsilon-proteobacterium. *Appl Environ Microbiol* 73: 2423–2431.
- Prim N, Bofill C, Pastor FIJ y Diaz P. (2006).** Esterase EstA6 from *Pseudomonas* sp. CR-611 is a novel member in the utmost conserved cluster of family VI bacterial lipolytic enzymes. *Biochimie* 88: 859–867.
- Sánchez MM, Fritze D, Blanco A, Spröer C, Tindall BJ, Schumann P, Kroppenstedt RM, Diaz P y Pastor FIJ. (2005).** *Paenibacillus barcinonensis* sp. nov., a xylanase-producing bacterium isolated from a rice field in the Ebro River delta. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 935-939.

Microbiología Industrial y Biotecnología Alimentaria en la Universidad de Vigo

Carmen Sieiro Vázquez. Grupo de Microbiología Industrial y Biotecnología Alimentaria. Edificio de Ciencias Experimentales. Universidad de Vigo. Lagoas - Marcosende. 36310 Vigo. mcsieiro@uvigo.es

El grupo de investigación en «Microbiología Industrial y Biotecnología Alimentaria» dirigido por la profesora Carmen Sieiro Vázquez pertenece al Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud de la Universidad de Vigo. Las líneas de investigación principales a las que se dedica el grupo desde su creación están relacionadas fundamentalmente con la caracterización, selección y mejora de microorganismos industriales, con particular interés en la selección y mejora de levaduras y bacterias vínicas, y con el estudio de nuevas enzimas microbianas de interés para la industria alimentaria. Estas líneas de investigación se iniciaron con el profesor Tomás González Villa en la Universidad de Santiago de Compostela de cuyo laboratorio procede la investigadora principal de este grupo. En colaboración con el grupo de la Universidad de Santiago y con la Misión Biológica de Galicia (CSIC), desde el año 2005, las investigaciones continuaron estudiando por un lado, el efecto de levaduras y bacterias vínicas y, por otro, el de diversos tratamientos enzimáticos, sobre el perfil aromático y el color de los vinos gallegos elaborados con distintas variedades de uva, por tratarse de parámetros

reconocidos como dos de los principales indicadores de calidad de los vinos. Con relación a estos dos criterios y en colaboración con distintas empresas de la región, se caracterizaron y seleccionaron distintas cepas para su uso en fermentaciones dirigidas, que originan tanto productos que mantienen la tipicidad tradicional como nuevos productos diferenciados.

Otra de las líneas de investigación en las que trabaja el grupo es la búsqueda y estudio de nuevas enzimas de interés para la industria alimentaria, centrandose en trabajos especialmente en las aplicaciones de las poligalacturonasas de levaduras en la industria enológica. En este campo se han clonado y caracterizado nuevos genes y nuevas enzimas pécticas producidas por *Kluyveromyces*, obteniéndose cepas mejoradas, hiperproductoras de las proteínas recombinantes, que permiten la explotación de las mismas a escala industrial a costes competitivos, así como producirlas en cantidad suficiente para abordar los estudios de sus posibles aplicaciones, bien empleándolas de forma individual, o en combinaciones con otras enzimas, optimizadas para las aplicaciones que se proponen.



Grupo de Microbiología Industrial y Biotecnología Alimentaria de la Universidad de Vigo.

Mediante estas investigaciones se analizó la posibilidad de utilizar las poligalacturonasas de *K. marxianus* como alternativa a los preparados pécticos comercializados con distintos fines. Los resultados demostraron la eficacia de la enzima producida por esta levadura para llevar a cabo la clarificación de zumos de frutas, incluyendo el mosto utilizado para las fermentaciones vínicas y, sobre todo, su excelente comportamiento para favorecer la extracción de precursores y potenciar de forma diferenciada, dependiendo de las concentraciones y condiciones de uso, el perfil aromático de los vinos. En la misma línea se demostró, igualmente, la idoneidad de esta enzima para incrementar significativamente el contenido en polifenoles de los vinos obtenidos, así como para intensificar el color en los mismos. La eficacia de la pectinasa de *Kluyveromyces* en estas aplicaciones resultó comparable a la de preparados que contienen mezclas enzimáticas, evitando los efectos secundarios, no deseables, que estos últimos pueden ocasionar en los productos tratados.

Todos estos trabajos se han llevado a cabo en el marco de diferentes proyectos y contratos de transferencia con empresas conseguidos en convocatorias competitivas.

Recientemente, y aprovechando su experiencia en la caracterización y producción de enzimas microbianas de interés alimentario, el grupo ha conseguido financiación para iniciar una nueva línea de investigación sobre microorganismos quitinolíticos y las quitinasas que producen. Hasta el momento se han aislado, identificado y caracterizado ya varias cepas bacterianas procedentes de distintos hábitats y asociadas a diferentes organismos, que producen nuevas enzimas quitinolíticas con diferentes propiedades y modos de acción. Además, para algunas de las cepas seleccionadas se han clonado y caracterizado los genes que codifican dichas quitinasas y construido cepas recombinantes para su producción. El objetivo es el empleo de estas enzimas para la transformación de los residuos de quitina que genera la industria alimentaria en

quitoligosacáridos que, como tales o en forma de nanomateriales, muestren diferentes actividades biológicas, con especial interés en aquellos con actividad antimicrobiana y que puedan ser utilizados como agentes de biocontrol en la industria agroalimentaria.

BIBLIOGRAFÍA

- Vilanova, M. and Sieiro, C. 2006.** Determination of free and bound terpene compounds in Albariño wine. *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 694-697.
- Vilanova, M. and Sieiro, C. 2006.** Contribution by *Saccharomyces cerevisiae* yeasts to fermentative flavour compounds in wines from cv. Albariño. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 33: 929-933.
- Vilanova, M., Zamuz, S., Vilarinho, F. and Sieiro C. 2007.** Effect of terroir on the volatiles of *Vitis vinifera* cv. Albariño. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87: 1252-1256.
- Vilanova, M., Zamuz, S., Masa, A. and Sieiro, C. 2007.** Evaluation of PFGE and mtDNA restriction analysis methods to detect genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated to *Vitis vinifera*. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 41: 155-159.
- Sieiro, C., Sestelo A.B.F. and Villa, T.G. 2009.** Cloning, Characterization and functional analysis of the *EPG1-2* gene: a new allele coding for an endopolygalacturonase in *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 8921-8926.
- Vilanova, M., Zamuz, S.A., da Silva, A.F., Masa, A. and Sieiro, C. 2011.** Intraspecific diversity of yeast associated to *Vitis vinifera* Albariño must from different vineyard ecosystems. *Journal of the Institute of Brewing* 117: 8921-8926.
- Rodríguez-Argüelles, M. C., Sieiro, C., Cao, R. and Nasí, L. 2011.** Chitosan and silver nanoparticles as pudding with raisins with antimicrobial activity. *Journal of Colloid and Surface Science* 363: 80-84.
- Sieiro, C., García-Fraga, B., López-Seijas, J., da Silva, F.A. and Villa, T.G. 2012.** Microbial pectic enzymes in the food and wine industry. In: *The Food Industrial Processes-Methods and Equipment*. InTech (ISBN 978-953-307-709-2).

Grupo de Microbiología Industrial y Biotecnología de la Universidad de León

Area de Microbiología, Universidad de León e Instituto de Biotecnología de León
Campus de Vegazana s/n 24071 León. paloma.liras@unileon.es



El grupo de investigación en 2005.

El grupo se inició en 1980 en la Universidad de León y fundó en 1991 el Instituto de Biotecnología. A lo largo de estos años se han defendido más de 90 tesis doctorales por miembros del grupo.

LINEAS DE TRABAJO EN LA ACTUALIDAD

- **Biosíntesis de penicilinas y cefalosporinas en *Penicillium chrysogenum* y *Acremonium chrysogenum*.** Se clonaron y analizaron por primera vez muchos de los genes de biosíntesis de penicilinas y cefalosporinas. Se han estudiado los mecanismos moleculares que conducen a la superproducción de estos antibióticos mediante técnicas ómicas, concretamente análisis transcriptómicos y proteómicos.
- **Metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos.** Están siendo estudiados a nivel molecular la producción del antitumoral andrastina o de las micotoxinas roquefortina y melagrina, en especies del género *Penicillium*. También se ha estudiado la producción de pigmentos por especies del género *Monascus*.
- **Biosíntesis de tacrolimus y análisis del genoma en cepas de *Streptomyces* productoras de tacrolimus.** Se ha secuenciado el genoma completo de *S. tsukubaensis*, localizándose los genes de producción de tacrolimus y analizándose la agrupación génica para su biosíntesis.

PERSONAL QUE FORMA EL GRUPO EN EL MOMENTO PRESENTE

Prof. Juan F. Martín Martín
Lic. Marta Fernández Aguado
Lic. Rebeca Domínguez Santos
Lic. Pedro Hidalgo Yañez
Prof. Antonio Rodríguez García
Dr. Fernando Santos Beneit
Lic. María Ordoñez Robles
Lic. Siomara Martín Martín
Prof. Paloma Liras Padín
Dra. Irene Santamarta Hernández
Lic. Alma Botas Muñoz
Lic. Rubén Álvarez Álvarez
Lic. Vanesa Robles Rodríguez
Lic. Yolanda Martínez Burgo

- **Control por fosfato de la biosíntesis de metabolitos secundarios en *Streptomyces*.** El nivel de fosfato es limitante para la producción de antibióticos y de otros metabolitos secundarios por especies de *Streptomyces*. El mecanismo de control está mediado por el sistema PhoR-PhoP, que ha sido estudiado mediante el análisis de la interacción del regulador PhoP con secuencias específicas de los promotores de los genes regulados.
- **Biosíntesis y genética de la producción de ácido clavulánico por *Streptomyces clavuligerus*.** Se han clonado las agrupaciones de cefamicina C y ácido clavulánico de *S. clavuligerus*, analizándose la función de sus genes mediante obtención de mutantes y/o purificación de las proteínas que codifican. Se han llevado a cabo estudios de transcriptómica y proteómica comparando la cepa silvestre y diferentes mutantes.
- **Transcriptómica y proteómica de la formación de arginina en cepas de *Streptomyces* y su correlación con la producción de metabolitos secundarios.** Dentro del estudio de los precursores del ácido clavulánico en *S. clavuligerus* se han aislado, secuenciado y analizado las agrupaciones para la utilización de glicerol y la biosíntesis de arginina. Esta última agrupación ha sido también analizada en *S. coelicolor*, microorganismo modelo, mediante transcriptómica y proteómica.

PUBLICACIONES

De las 500 publicaciones internacionales del grupo se indican algunas de las más relevantes durante los últimos 10 años:

- Ullán RV, Casqueiro J, Bañuelos O, Fernández FJ, Gutiérrez S y Martín JF** (2002) «A novel epimerization system in fungal secondary metabolism involved in the conversion of isopenicillin N into penicillin N in *Acremonium chrysogenum*». *J. Biol. Chem.* 277:46216-46225
- Hijarrubia MJ, Aparicio JF y Martín JF** (2003) «Domain structure characterization of the multifunctional α -aminoacidate reductase from *Penicillium chrysogenum* by limited proteolysis». *J. Biol. Chem.* 278: 8250-8256
- Sola-Landa A, Moura RS y Martín JF** (2003) «The two component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:6133-6138
- Recio E, Colinas A, Rumero Á, Aparicio JF y Martín JF.** (2004) «PI factor, a novel type quorum-sensing inducer elicits pimarinin production in *Streptomyces natalensis*». *J. Biol. Chem.* 279: 41586-41593.
- Santamarta I, Pérez-Redondo R, Lorenzana LM, Martín JF y Liras P** (2005) «Two different proteins bind to the butyrolactone receptor protein ARE sequence located upstream of the regulatory *ccaR* gene of *S. clavuligerus*». *Mol. Microbiol.* 56: 824-835.
- Sola-Landa A, Rodríguez-García A, Franco-Domínguez E y Martín JF** (2005) «Binding of PhoP to promoters of phosphate regulated genes in *Streptomyces coelicolor*: Identification of PHO boxes» *Mol. Microbiol.* 56: 1373-1385
- Gómez-Escribano JP, Liras P, Pisabarro A y Martín JF** (2006) An *rplK*^{029-PALG-32} mutation leads to reduced expression of the regulatory genes *ccaR* and *claR* and very low transcription of the *ceaS2* gene for clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Mol. Microbiol.* 61: 758-770.
- Ullán RV, Campoy S, Casqueiro J, Fernández FJ y Martín JF** (2007) Deacetylcephalosporin C production in *Penicillium chrysogenum* by

expression of the isopenicillin N epimerization, ring expansion, and acetylation genes. *Chem. Biol.* 14: 329-339.

- Rodríguez-García A, Barreiro C, Santos-Beneit F, Sola-Landa A y Martín JF** (2007) Genome-wide transcriptomic and proteomic analysis of the primary response to phosphate limitation in *Streptomyces coelicolor* M145 and in a *phoP* mutant. *Proteomics* 7: 2410-2429
- Godío RP, Fouces R y Martín JF** (2007) A squalene epoxidase is involved in biosynthesis of both the antitumor compound clavarinic acid and sterols in the basidiomycete *H. sublateralium*. *Chemistry & Biology.* 14: 1334-46.
- Santamarta I, López-García MT, Pérez-Redondo R, Koekman B, Martín JF y Liras P** (2007) Connecting primary and secondary metabolism: AreB, an IclR-like protein, binds the AREccA sequence of *S. clavuligerus* and modulates leucine biosynthesis and cephamycin C and clavulanic acid production. *Molecular Microbiology.* 66: 511-24.
- Sola-Landa A, Rodríguez-García A, Apel AK y Martín JF** (2008) Target genes and structure of the direct repeats in the DNA binding sequences of the response regulator PhoP in *Streptomyces coelicolor*. *Nucleic Acids Research* 36:1358-1368.
- Van den Berg MA, Albang R, Albermann K, Badger JH, Daran JM, Driessen AJ, García-Estrada C, Fedorova ND, Harris DM, Heijne WH, Joardar V, Kiel JA, Kovalchuk A, Martín JF. et al** (2008) Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. *Nat Biotechnol* 26: 1161-1168.
- Rodríguez-García A, Sola-Landa A, Apel K, Santos-Beneit F y Martín JF** (2009) Phosphate control over nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor*: direct and indirect negative control of *glnR*, *glnA*, *glnII* and *amtB* expression by the response regulator PhoP. *Nucleic Acids Research* 37: 3230-3242.
- Santos-Beneit F, Rodríguez-García A, Sola-Landa A y Martín JF** (2009) Crosstalk between two global regulators in *Streptomyces*: PhoP and AfsR interact in the control of *afsS*, *pstS* and *phoRP* transcription. *Molecular Microbiology* 72:53-68.
- Jami MS, Barreiro C, García-Estrada C y Martín JF** (2010). Proteome analysis of the penicillin producer *Penicillium chrysogenum*: Characterization of protein changes during the industrial strain improvement. *Mol Cel Proteomics*;9:1182-98.
- Martín JF y Liras P.** (2010). Engineering of Regulatory Cascades Controlling Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces* Signaling Genes. *Current Opinion in Microbiology* 13: 263-273.
- Santamarta I, López-García MT, Kurt A, Nárdiz N, Pérez-Redondo R, Álvarez-Álvarez R, Martín JF y Liras, P.** (2011). Characterization of DNA-binding sequences for CcaR in the cephamycin-clavulanic acid supercluster of *Streptomyces clavuligerus*. *Mol. Microbiol.* 81: 968-981.
- García-Estrada C, Ullán RV, Albillas SM, Fernández-Bodega MÁ, Durek P, von Döhren H, y Martín JF.** (2011). A single cluster of coregulated genes encodes the biosynthesis of the mycotoxins roquefortine C and meleagrín in *Penicillium chrysogenum*. *Chem. Biol.* 18:1499-512.
- Teixeira F, Ullán RV, Fernández-Aguado M, y Martín JF.**(2011). CefR modulates transporters of beta-lactam intermediates preventing the loss of penicillins to the broth and increases cephalosporin production in *Acremonium chrysogenum*. *Metab Eng.* 13(5):532-43.
- Teixeira F, Ullán RV, Fernández-Aguado M, y Martín JF.**(2011). CefR modulates transporters of beta-lactam intermediates preventing the loss of penicillins to the broth and increases cephalosporin production in *Acremonium chrysogenum*. *Metab Eng.* 13(5):532-43.
- Pérez-Redondo R, Rodríguez-García A, Botas A, Santamarta I, Martín JF y Liras P.** (2012). ArgR of *Streptomyces coelicolor*, is a versatile regulator. *PlosOne* 2012;7(3):e32697

Biosíntesis de compuestos bioactivos por microorganismos (BIOMIC)

**José Antonio Salas Fernández
y Carmen Méndez Fernández**

Área de Microbiología, Dpto. Biología Funcional e I.U.O.P.A. (Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias), Universidad de Oviedo.

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

El grupo de «Biosíntesis de compuestos bioactivos por microorganismos» (BIOMIC) pertenece al Área de Microbiología del Departamento de Biología Funcional y al Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (I.U.O.P.A.) de la Universidad de Oviedo. Está ubicado en la Facultad de Medicina, coordinado por los Catedráticos de Universidad, Dr. José Antonio Salas Fernández y Dra. Carmen Méndez Fernández, y forman parte del mismo el Dr. Alfredo F. Braña (Profesor Titular de Universidad), el Dr. Carlos Olano (Investigador del I.U.O.P.A.), así como varios investigadores postdoctorales y predoctorales y un técnico de laboratorio.

Las principales líneas de investigación del grupo son:

Aislamiento y caracterización de agrupaciones de genes de biosíntesis de compuestos bioactivos (antibióticos y compuestos antitumorales) producidos por actinomicetos

El grupo posee una amplia experiencia en el aislamiento y caracterización de rutas de biosíntesis de antibióticos y compuestos antitumorales sintetizados por actinomicetos. Se han aislado y caracterizado diversas rutas de biosíntesis de compuestos bioactivos pertenecientes a distintas familias de compuestos policetónicos («polyketides»), como oleandomicina, borrelidina, oviedomicina, elloramina, estefimicina, estreptolidigina, mitramicina y cromomicina. Asimismo se han caracterizado las rutas de biosíntesis de otros compuestos no policetónicos como, tiocoralina, tienamicina, rebecamicina y estaurosporina.

Utilización de la «Biosíntesis Combinatoria» para generar nuevos compuestos bioactivos

La «Biosíntesis Combinatoria» es una estrategia que permite generar nuevos compuestos bioactivos mediante la uti-

lización de técnicas de Ingeniería genética. Así, se pueden crear microorganismos recombinantes con combinaciones de genes de rutas de biosíntesis de compuestos bioactivos no existentes en la naturaleza, que potencialmente puedan dar lugar a la producción de nuevos compuestos. La purificación posterior de estos compuestos, su caracterización química y el ensayo de sus actividades biológicas (antibiótica, antifúngica, antitumoral, neuroprotectora), así como su toxicidad en ratones, permite determinar la potencialidad de los nuevos compuestos para ser patentados y desarrollados posteriormente. Utilizando esta estrategia, el grupo ha generado más de 90 nuevos compuestos derivados de compuestos bioactivos, algunos de los cuales poseen mayor bioactividad y/o menor toxicidad que los compuestos originales.

Estudio de procesos de regulación de las rutas de biosíntesis de compuestos bioactivos

Uno de los aspectos importantes en relación con las rutas de biosíntesis de compuestos bioactivos, es conocer los procesos de regulación a los que están sometidas. Este conocimiento permitirá actuar sobre los mismos y mejorar la producción de los compuestos codificados por las rutas correspondientes. En nuestro grupo se están estudiando los procesos de regulación que afectan a la biosíntesis de mitramicina, estreptolidigina y colismicina.

Aplicación de estrategias de Ingeniería metabólica a la mejora de la producción de compuestos bioactivos

Uno de los potenciales cuellos de botella que pueden existir en la producción de un compuesto por un microorganismo es la disponibilidad de los precursores metabólicos a partir de los cuales se lleva a cabo la biosíntesis del compuesto. En nuestro grupo se están aplicando estrategias de Ingeniería Metabólica (sobrexpresión y/o inactivación de genes del metabolismo primario), con el fin de potenciar la formación y la canalización de los precursores metabólicos de compuestos bioactivos hacia las rutas de

biosíntesis de interés, y mejorar de esta manera los niveles de producción de estos compuestos.

Aplicación del análisis genómico para activar rutas de biosíntesis «silenciosas» e identificar nuevos compuestos bioactivos

Los actinomicetos son un grupo de bacterias conocido por producir un gran número de compuestos bioactivos. La secuenciación de muchos genomas de actinomicetos ha puesto de manifiesto que estos contienen agrupaciones de genes para la formación de 10-30 compuestos bioactivos, que por razones desconocidas, o no se expresan o se expresan poco en condiciones de cultivo de laboratorio, lo que implica que gran parte del potencial de estos microorganismos como productores de compuestos bioactivos está por descubrir. En nuestro laboratorio, se está analizando el genoma de diferentes estreptomicetos con el fin de identificar agrupaciones de genes de biosíntesis de compuestos bioactivos desconocidas, activarlas (utilizando estrategias de Ingeniería genética) para de esta manera descubrir nuevos compuestos.

COLABORACIONES

El grupo colabora de forma continuada con varios grupos de investigación nacionales y extranjeros, además de con varias empresas:

- Prof. Jürgen Rohr. University of Kentucky. EEUU.: caracterización química de nuevos compuestos
- Prof. José Portugal. Instituto de Biología Molecular de Barcelona, CSIC. Barcelona: modo de acción de derivados de mitramicina y cromomicina
- Prof. Peter F. Leadlay. University of Cambridge. Inglaterra: colaboraciones en Biosíntesis Combinatoria
- Prof. Lutz Heide. Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Alemania: colaboraciones en Biosíntesis Combinatoria
- Prof. Andreas Bechthold. Albert-Ludwigs-Universität Freiburg. Alemania: colaboraciones en Biosíntesis Combinatoria
- Entrechem, S.L. (Asturias): ensayos bioactividad y toxicidad
- Instituto Biomar S.A. (León) y Pharmamar S.A. (Madrid): ensayos actividad antitumoral

PUBLICACIONES MÁS RELEVANTES DE LOS ÚLTIMOS AÑOS

Sánchez C, Butovich IA, Braña AF, Rohr J, Méndez C y Salas JA. (2002). The biosynthetic gene cluster for the antitumor rebeccamycin: characterization and generation of indolocarbazole derivatives. *Chem Biol.* 9: 519-531.

Trefzer A, Blanco G, Remsing L, Künzel E, Rix U, Lipata F, Braña AF, Méndez C, Rohr J, Bechthold A y Salas JA. (2002). Rationally designed glycosylated

premithramycins: hybrid aromatic polyketides using genes from three different biosynthetic pathways. *J Am Chem Soc.* 124: 6056-6062.

Rodríguez L, Aguirrezabalaga I, Allende N, Braña AF, Méndez C y Salas JA. (2002). Engineering deoxysugar biosynthetic pathways from antibiotic-producing microorganisms: a tool to produce novel glycosylated bioactive compounds. *Chem Biol.* 9: 721-729.

Menéndez N, Mohammad N, Braña AF, Rohr J, Salas JA y Méndez C (2004). Biosynthesis of the antitumor chromomycin A3 in *Streptomyces griseus*: analysis of the gene cluster and rational design of novel chromomycin analogues. *Chem Biol.* 11: 21-32.

Lombó F, Gibson M, Greenwell L, Braña AF, Rohr J, Salas JA y Méndez C (2004). Engineering biosynthetic pathway for deoxysugars: branched-chain sugar pathways and novel derivatives from the antitumor tetracenomycin. *Chem Biol.* 11:1709-1718.

Sánchez C, Zhu L, Braña AF, Salas AP, Rohr J, Méndez C y Salas JA. (2005). Combinatorial biosynthesis of antitumor indolocarbazole compounds. *Proc Nat Acad Sci U S A.* 102: 461-466.

Pérez M, Lombó F, Zhu L, Gibson M, Braña AF, Rohr J, Salas JA y Méndez C. (2005). Combining sugar biosynthesis gene cassettes to generate two glycosylated antitumor tetracenomycins. *Chem Commun.* 12: 1604-1606.

Salas AP, Zhu L, Sánchez C, Braña AF, Rohr J, Méndez C y Salas JA. (2005). Deciphering the late steps in the biosynthesis of the anti-tumor indolocarbazole staurosporine: sugar donor substrate flexibility of the StaG glycosyltransferase. *Mol Microbiol.* 58: 17-27.

Lombó F, Velasco A, Castro A, Calle F, Braña AF, Sánchez-Puelles JM, Méndez C y Salas JA. (2006). Deciphering the biosynthesis pathway of the antitumor thiocoraline from a marine actinomycete and its expression in two *Streptomyces* species. *ChemBioChem* 7: 366-376.

Sánchez C, Méndez C y Salas JA. (2006). Indolocarbazole natural products: occurrence, biosynthesis, and biological activity. *Nat Prod Rep.* 23: 1007-1045.

Salas JA y Méndez C. (2007). Engineering the glycosylation of natural products in actinomycetes. *Trends Microbiol.* 15:219-32.

Méndez C, Luzhetskyy A, Bechthold A y Salas JA (2008). Deoxysugars in bioactive natural products: development of novel derivatives by altering the sugar pattern. *Cur Top Med Chem.* 8: 710-724.

Olano C, Lombó F, Méndez C y Salas JA. (2008). Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering. *Metab Eng.* 10: 281-92.

Pérez M, Baig I, Braña AF, Salas JA, Rohr J y Méndez C. (2008). Generation of new derivatives of the antitumor antibiotic mithramycin by altering the glycosylation pattern through combinatorial biosynthesis. *ChemBioChem* 9:2295-304.

Olano C, Méndez C y Salas JA. (2009). Antitumor compounds from actinomycetes: from gene clusters to new derivatives by combinatorial biosynthesis. *Nat Prod Rep.* 26:628-660.

Salas JA y Méndez C. (2009). Indolocarbazole antitumor compounds by combinatorial biosynthesis. *Cur Opin Chem Biol.* 13: 1-9.

Olano C, Gómez C, Pérez M, Palomino M, Pineda-Lucena A, Carbajo RJ, Braña AF, Méndez C y Salas JA. (2009). Deciphering biosynthesis of the RNA polymerase inhibitor streptolydigin and generation of glycosylated derivatives. *Chem Biol.* 16:1031-1044.

Olano C, Méndez C y Salas JA (2010). Post-PKS tailoring steps in natural product-producing actinomycetes from the perspective of combinatorial biosynthesis. *Nat Prod Rep.* 27:571-616.

Sánchez-Hidalgo M, Núñez LE, Méndez C y Salas JA. (2010). Involvement of the beta subunit of RNA polymerase in resistance to streptolydigin and streptovaricin in the producer organisms *Streptomyces lydicus* and *Streptomyces spectabilis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 54:1684-92.

García I, Vior NM, Braña AF, González-Sabín J, Rohr J, Moris F, Méndez C y Salas JA (2012). Elucidating the Biosynthetic Pathway for the Polyketide-Nonribosomal Peptide Collismycin A: Mechanism for Formation of the 2,20-bipyridyl Ring. *Chem Biol.* 19:399-413.