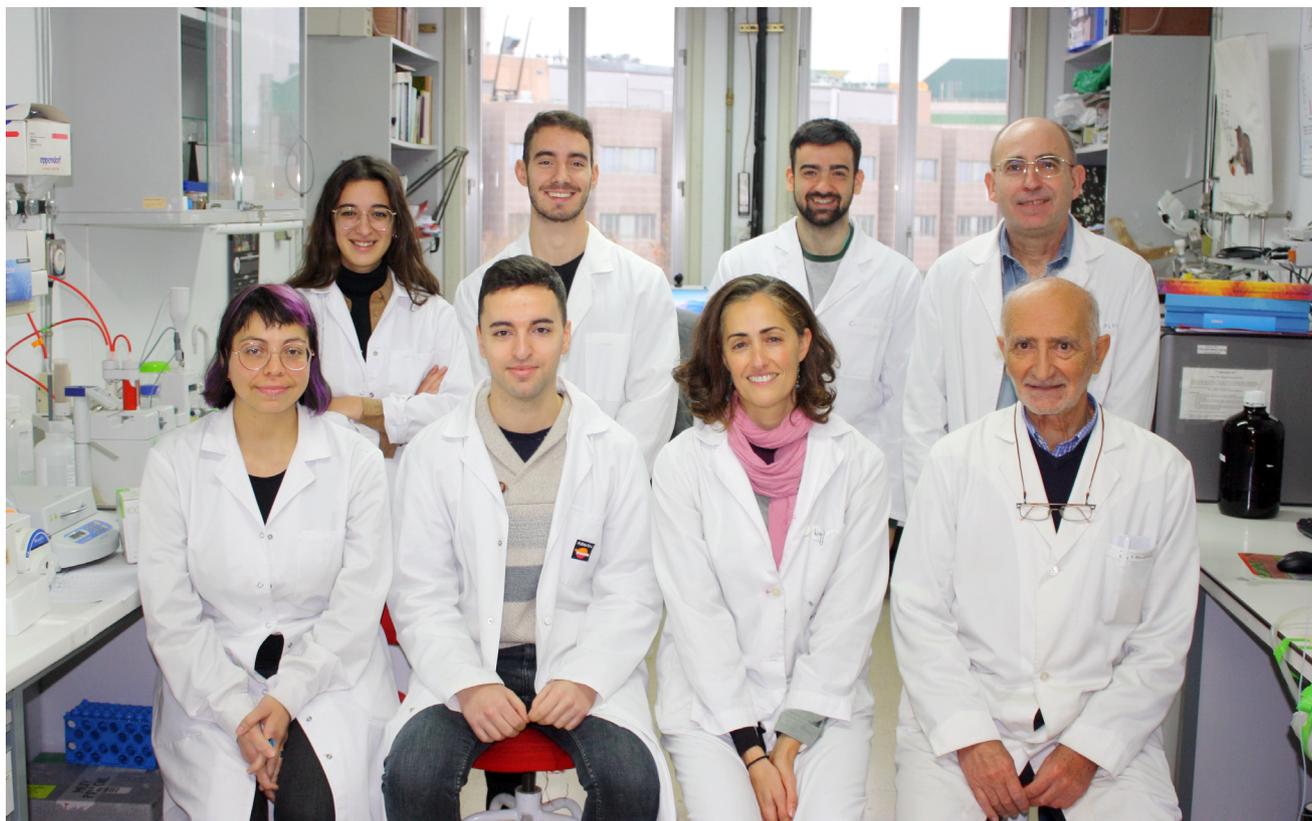


Grupo de Biocatálisis Aplicada (ICP-CSIC)

FRANCISCO J. PLOU

Instituto de Catálisis y Petroleoquímica (ICP), CSIC, Marie Curie 2, 28049 Madrid.

✉ fplou@icp.csic.es



Grupo de Biocatálisis Aplicada del ICP-CSIC. En la fila de arriba (de izda. a derecha): Marina Minguet Lobato (contratada predoctoral FPI), David Fernández Polo (contratado predoctoral FPU), Carlos Uceda Domínguez (Técnico de Laboratorio Comunidad de Madrid), Francisco J. Plou Gasca (Profesor de Investigación). En la fila de abajo (de izda. a derecha): Fadia Cervantes Domínguez (contratada postdoctoral), José Luis González Alfonso (contratado postdoctoral), Lucía Fernández Arrojo (Titulada Superior CSIC), Antonio Ballesteros Olmo (Profesor de Investigación ad honorem).

Introducción

El Grupo de Biocatálisis Aplicada (ABG) del ICP-CSIC fue fundado hace más de cinco décadas por el Dr. Antonio Ballesteros Olmo, y actualmente lo dirige el Dr. Francisco J. Plou. Nuestro objetivo es el estudio de biotransformaciones enzimáticas para la síntesis de compuestos bioactivos con potencial aplicación en la industria química,

farmacéutica, nutracéutica y/o cosmética. En los últimos años, el grupo ha concentrado su esfuerzo en la aplicación de **enzimas glicosídicas** (fundamentalmente glicosidasas y glucosiltransferasas), aunque siempre ha mantenido cierta actividad en el campo de las **lipasas**.

La actividad del Grupo de Biocatálisis Aplicada, así como sus publicaciones y

proyectos recientes, se pueden consultar en la página web: <http://www.franciscoploulab.eu>. Un aspecto fundamental de nuestro grupo es la participación en el consorcio GLICOENZ (<http://www.glicoenz.org>), que nos ha permitido colaborar de forma directa con varios grupos especializados en la búsqueda de nuevas enzimas glicosídicas en hongos y levaduras (Dra. María Fernández Lobato, CBMSO),

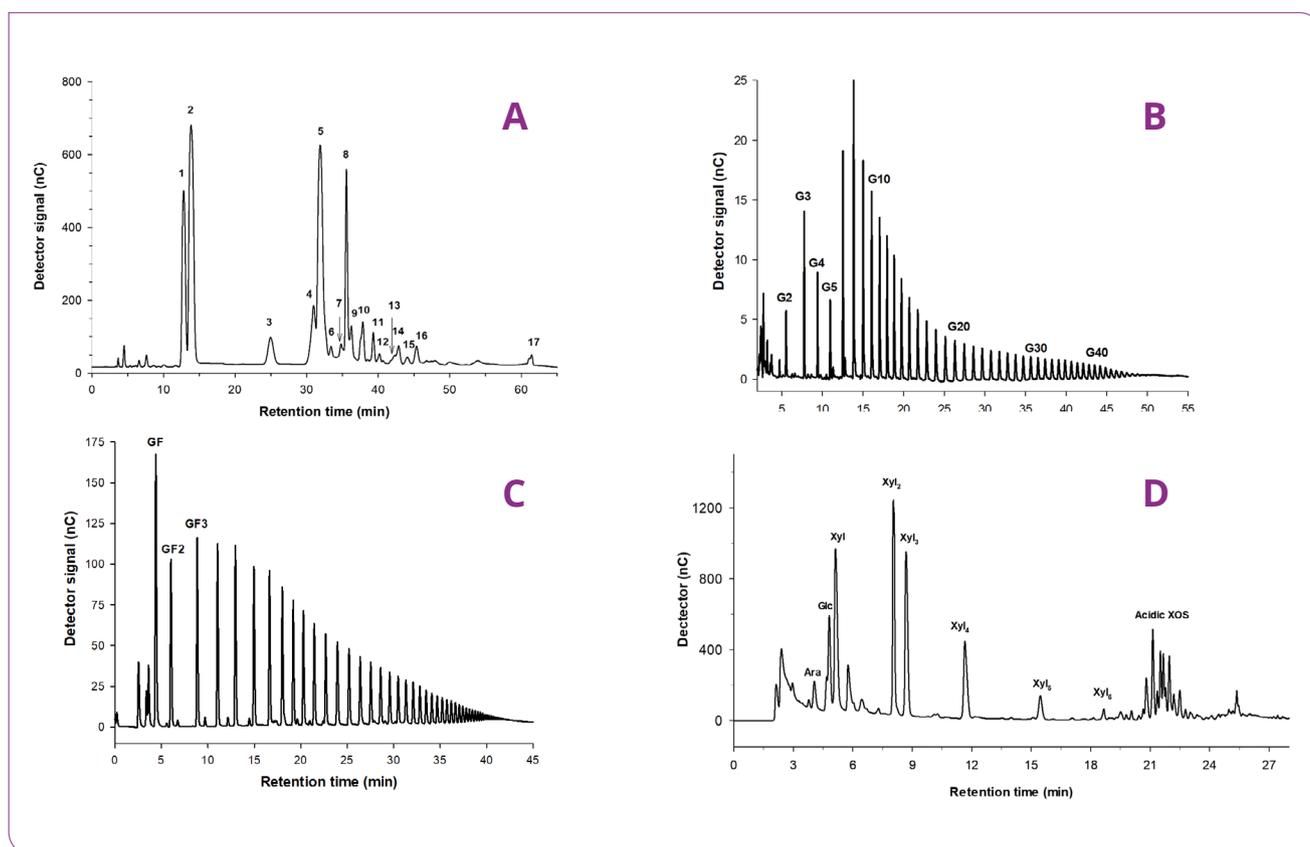


Figura 1. Análisis por HPAEC-PAD de diversas mezclas de carbohidratos: A) Galactooligosacáridos (GOS) sintetizados a partir de lactosa mediante la β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* (Urrutia et al., 2013); B) Almidón de patata parcialmente hidrolizado; C) Inulina de achicoria; D) Hidrolizado enzimático de xilano de haya, donde se muestran los xilooligosacáridos (XOS) lineales y ramificados (Míguez et al., 2022).

su manipulación genética (Dr. Julio Polaina, IATA-CSIC) y la elucidación de los aspectos moleculares que determinan el comportamiento de estas enzimas (Dra. Julia Sanz Aparicio, IQF-CSIC). La complementariedad de los distintos grupos nos ha permitido afrontar retos que no hubieran sido abordables en un esquema de trabajo individual.

Nuestro grupo dispone de una amplia experiencia en técnicas analíticas, en particular en cromatografía líquida de alta resolución con diferentes detectores (fotodiodos, índice de refracción, amperométrico de pulsos, evaporativo de dispersión de luz, etc.), cromatografía *flash*, cromatografía de gases, espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear, etc. También resultan fundamentales las metodologías para la evaluación de la actividad enzimática.

Nuestras líneas de investigación se pueden estructurar en dos grandes temáticas que se describen a continuación.

1. Producción enzimática de oligosacáridos bioactivos

Nuestro objetivo es transformar azúcares sencillos (sacarosa, lactosa, etc.) o polisacáridos (inulina, hemicelulosa, quitosano, ácido hialurónico, etc.) en oligosacáridos bioactivos, utilizando estrategias tanto de transglucosilación como de hidrólisis. En particular, nos interesa producir oligosacáridos prebióticos (con capacidad de modular la microbiota colónica), aunque también estudiamos otras propiedades como la actividad antiinflamatoria o antiviral.

Nuestros primeros trabajos se centran en la transformación de sacarosa en fructooligosacáridos (FOS) (Gimeno-Pérez et al., 2015), y de lactosa (a partir de lactosuero) en galactooligosacáridos (GOS)

(Plou et al. 2016) (Figura 1A). Después ampliamos a los polisacáridos, cuyas reacciones de degradación implican gran dificultad debido a la baja solubilidad de los sustratos y a la heterogeneidad de las mezclas de reacción que se obtienen, siendo muy difícil la caracterización de los productos formados. Por ello fue necesario desarrollar metodologías analíticas mediante HPAEC-PAD (Figura 1B-D). Durante el reciente proyecto europeo **Fish4Fish**, cuyo objetivo era el desarrollo de envases bioactivos para alimentos a partir de residuos de crustáceos, colaboramos en la hidrólisis enzimática de quitosano para dar lugar a quitoooligosacáridos (COS), compuestos con actividad antimicrobiana (Míguez et al. 2021).

Las técnicas de inmovilización enzimática permiten la reutilización de las enzimas o su empleo en reactores continuos, aspecto que puede ser esencial para que un proceso biocatalítico sea industrialmente viable. La inmovilización también prote-

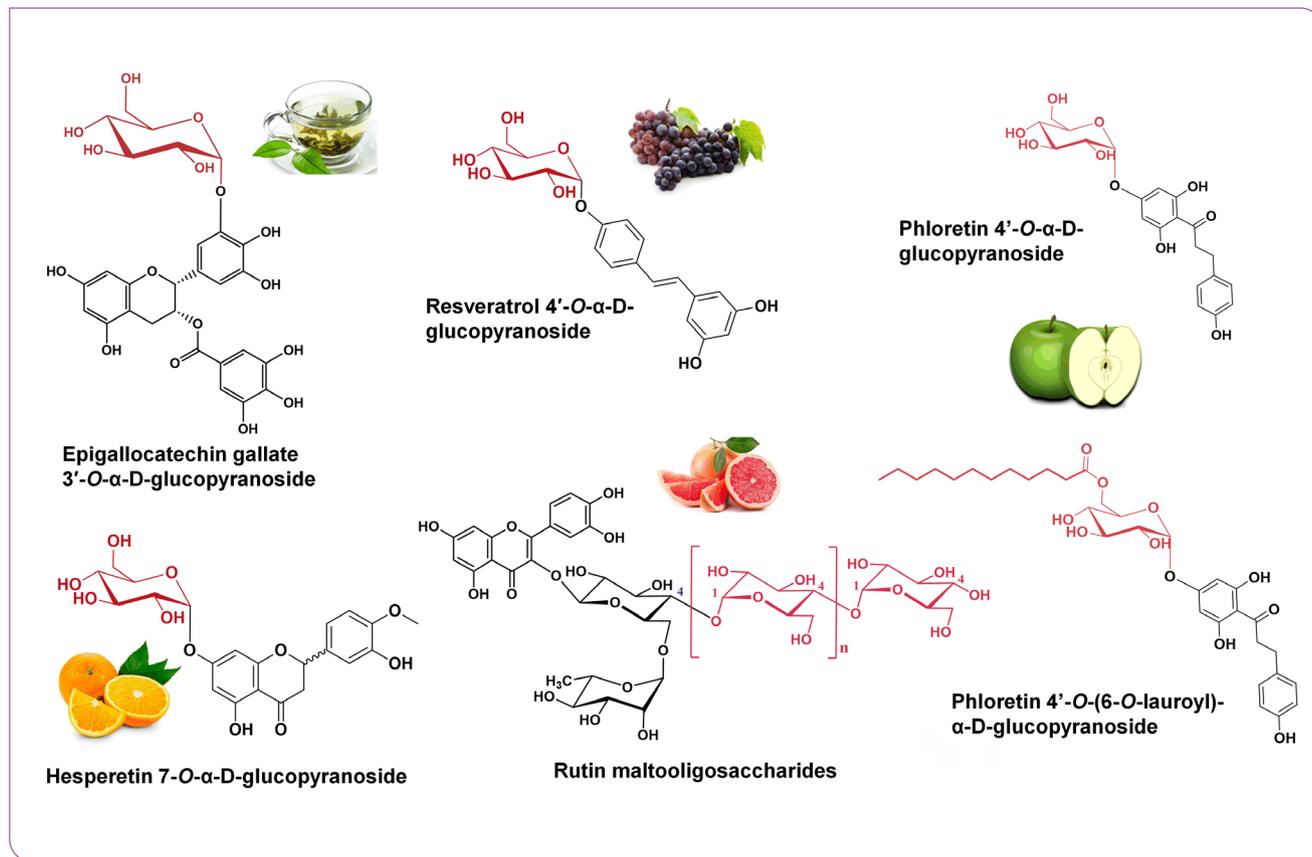


Figura 2. Algunos de los derivados de polifenoles obtenidos en nuestro laboratorio empleando procesos enzimáticos con la CGTasa de *Thermoanaerobacter sp.* o la sacarosa fosforilasa de *T. thermosaccharolyticum*. Se muestra en color rojo el resto glucosilo o acil-glucósido introducido en las moléculas.

ge a las enzimas de la inactivación a pH extremos, altas temperaturas o presencia de disolventes. En nuestro grupo hemos optimizado diferentes métodos de inmovilización para obtener oligosacáridos bioactivos, tanto por técnicas de unión covalente a soportes como de atrapamiento. Así, hemos diseñado biorreactores en lecho fijo que han mostrado una productividad y estabilidad operacional excelentes (Fernández-Arrojo *et al.*, 2013, Santos-Moriano *et al.*, 2016).

2. Producción enzimática de polifenoles modificados

Los polifenoles son compuestos ampliamente distribuidos en el reino vegetal; dentro de esta familia, cobran especial interés los flavonoides, que abarcan varias

subclases como flavonas, flavonoles, flavanonas, isoflavonas y antocianinas. Los polifenoles protegen las células de los efectos dañinos de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y otros radicales libres (Andrés-Juan *et al.*, 2021), lo cual explica su interés para prevenir enfermedades relacionadas con procesos oxidativos y daño celular, como el cáncer, procesos neurodegenerativos, inflamación, diabetes o artritis. No obstante, numerosos polifenoles se absorben mal en el organismo, lo que resulta en una concentración muy baja en el torrente circulatorio. La modificación química de los polifenoles, mediante reacciones de glicosilación o acilación, altera sus propiedades fisicoquímicas (p. ej. solubilidad y coeficiente de partición), su estabilidad y por ende en su biodisponibilidad.

La regioespecificidad de las enzimas es fundamental para sintetizar derivados de polifenoles en condiciones suaves. En nuestros primeros trabajos utilizamos la ciclodextrina glucanotransferasa (CGTasa)

de *Thermoanaerobacter sp.*, con la que conseguimos glucosilar resveratrol, pterostilbeno, galato de epigallocatequina, hesperetina o rutina (González-Alfonso *et al.* 2018, 2021) (**Figura 2**).

Gracias a la colaboración con el Dr. Tom Desmet de la Universidad de Gante, hemos tenido acceso a un mutante (R134A) de la sacarosa fosforilasa de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* diseñado para aceptar polifenoles. En particular, hemos centrado nuestro trabajo en la floretina, un flavonoide presente en las manzanas con propiedades antidiabéticas y anticancerígenas (González-Alfonso *et al.* 2021).

La lipofilicidad de un polifenol es también un factor crucial en su capacidad para atravesar barreras biológicas como las membranas celulares, la barrera hematoencefálica o la piel, compuestas principalmente de lípidos. Recientemente hemos patentado una estrategia para

obtener derivados acilados de la floretina (Plou *et al.*, 2022) basada en la incorporación de una glucosa (usando el mutante de la sacarosa fosforilasa) seguida de la acilación en el 6-OH del azúcar con la lipasa de *Thermomyces lanuginosus*.

En definitiva, disponemos de una batería de compuestos cuya actividad biológica está siendo evaluada en colaboración con distintos laboratorios especializados, aunque siempre estamos dispuestos a abrir nuevas colaboraciones.

Publicaciones seleccionadas (de los últimos 10 años)

- Fernandez-Arrojo L, Rodriguez-Colinas B, Gutierrez-Alonso P, Fernandez-Lobato M, Alcalde A, Ballesteros AO and Plou FJ.** (2013). Dried alginate-entrapped enzymes (DALGEEs) and their application to the production of fructooligosaccharides. *Proc. Biochem.* 48: 677-82.
- Gimeno-Pérez M., Linde, Fernandez-Arrojo L, Plou FJ and M. Fernandez-Lobato.** (2015). Heterologous overproduction of beta-fructofuranosidase from yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*, an enzyme producing prebiotic sugars. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99: 3459-67.
- González-Alfonso JL, Leemans L, Poveda A, Jiménez-Barbero J, A. Ballesteros AO and Plou FJ.** (2018). Efficient α -glucosylation of epigallocatechin gallate catalyzed by cyclodextrin glucanotransferase from *Thermoanaerobacter* sp. *J. Agric. Food Chem.* 66: 7402-8
- González-Alfonso JL, Poveda A, Arribas M, Hirose Y, Fernández-Lobato M, Ballesteros AO, Jiménez-Barbero J and Plou FJ.** (2021). Polyglucosylation of rutin catalyzed by cyclodextrin glucanotransferase from *Geobacillus* sp.: optimization and chemical characterization of products. *Ind. Eng. Chem. Res.* 60: 18651-59
- Gonzalez-Alfonso JL, Ubiparip Z, Jimenez-Ortega E, Poveda A, Alonso C, Coderch L, Jiménez-Barbero J, Sanz-Aparicio J, Ballesteros AO, Desmet T and Plou FJ.** (2021). Enzymatic synthesis of phloretin α -glucosides using a sucrose phosphorylase mutant and its effect on solubility, antioxidant properties and skin absorption. *Adv. Synth. Catal* 363: 3079-3089.
- Andrés-Juan C, Pérez de la Lastra JM, Plou FJ and Pérez-Lebeña E.** (2021). The chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) revisited: outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. *Int. J. Mol. Sci.* 22: 4642.
- Míguez N, Fernández-Polo D, Santos-Moriano P, Rodríguez-Colinas B, Poveda A, Jiménez-Barbero J, Ballesteros AO and Plou FJ.** (2022). Enzymatic bioconversion of beechwood xylan into the antioxidant 2'-O- α -(4-O-methyl-D-glucuronosyl)-xylobiose. *Biomass Conv. Bioref.*, <https://doi.org/10.1007/s13399-022-03240-3>
- Míguez N, Kidibule P, Santos-Moriano P, Ballesteros AO, Fernandez-Lobato M and Plou FJ.** (2021). Enzymatic synthesis and characterization of different families of chitooligosaccharides and their bioactive properties. *Appl. Sci.* 11: 3212.
- Plou FJ, González-Alfonso JL, Ballesteros AO, Alonso C, Coderch L, Poveda A, Jiménez-Barbero J, Desmet T and Ubiparip Z.** (2022). A novel acylated derivative of phloretin and its use as antioxidant. Patente EP22382582.9.
- Plou FJ, Polaina J, Sanz-Aparicio J and Fernández-Lobato M.** (2016). β -Galactosidases for lactose hydrolysis and galactooligosaccharide synthesis. In: *Microbial Enzyme Technology in Food Applications* (Ray RC and Rosell CM, Eds.). CRC Press, pp. 123-146.
- Santos-Moriano P, Woodley JM and Plou FJ.** (2016). Continuous production of chitooligosaccharides by an immobilized enzyme in a dual-reactor system. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 133: 211-7.
- Urrutia P, Rodríguez-Colinas B, Fernández-Arrojo L, Ballesteros AO, Wilson L, Illanes A and Plou FJ.** (2013). Detailed analysis of galactooligosaccharides synthesis with beta-galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *J. Agric. Food Chem.* 61: 1081-1087.