

# Aplicaciones microbianas para la economía circular y el valor añadido

**MANUEL HERNÁNDEZ CUTULI, JUANA RODRÍGUEZ BULLIDO, FRANCISCO GUILLÉN CARRETERO, JOSÉ MANUEL MOLINA GUIJARRO, CARMEN FAJARDO ADÁN, GABRIELA DOMÍNGUEZ RUÍZ Y MARÍA ENRIQUETA ARIAS FERNÁNDEZ.**

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

✉ [manuel.hernandez@uah.es](mailto:manuel.hernandez@uah.es)



**Grupo MICRO4+VALUE de la Universidad de Alcalá.** De izquierda a derecha: Carmen Fajardo Adán, Juana Rodríguez Bullido, Manuel Hernández Cutuli, José Manuel Molina Guijarro y Gabriela Domínguez Ruíz.

El grupo de investigación del Departamento de Biomedicina y Biotecnología de la Universidad de Alcalá ha centrado su investigación, desde sus inicios hace más de 20 años, en la selección de microorganismos lignocelulolíticos y de sistemas enzimáticos capaces de aumentar el valor biotecnológico de residuos agroforestales y de mejorar procesos industriales, todo ello acompañado de una disminución del impacto ambiental. Durante todo este tiempo, ha sido dirigido por la Prof. María Enriqueta Arias Fernández bajo el nombre de "Degradación Microbiana de

Lignocelulosa: Aplicaciones Tecnológicas y Medioambientales" (grupo MICRODEG). Recientemente ha cambiado su nombre a "Aplicaciones Microbianas para la Economía Circular y el Valor Añadido" (MICRO4+VALUE), que refleja mejor las líneas de investigación que aborda en la actualidad. A lo largo de estos años se han establecido los mecanismos básicos implicados en la degradación de lignocelulosa por actinobacterias del género *Streptomyces*, habiéndose aislado y caracterizado los sistemas enzimáticos degradadores de dos de sus polímeros mayoritarios

(lignina y hemicelulosas). Entre estas enzimas se han caracterizado bioquímica y genéticamente xilanasas y lacasas, cuyo potencial biotecnológico y medioambiental se ha puesto de manifiesto en distintas áreas de importancia industrial. Así, se ha demostrado su utilidad para la producción de pastas de celulosa y papel (biopasteo y bioblanqueo) así como para resolver problemas de contaminación ambiental derivados de las industria textil y petroquímica y derivados de actividades antropogénicas (presencia de contaminantes emergentes en aguas).



Figura 1. Esquema de trabajo del Grupo MICRO4+VALUE.

En la actualidad, el grupo continúa desarrollando investigación básica, centrada principalmente en la elucidación de la acción de las lacasas de *Streptomyces* sobre la lignina, e investigación aplicada, considerando la posibilidad de reutilizar residuos agrícolas y ligninas funcionalizadas para obtener productos de alto valor añadido.

En relación con los aspectos básicos de nuestra investigación, los últimos estudios que hemos llevado a cabo con la lacasa SilA de *Streptomyces ipomoeae* CECT 3341 nos han permitido elucidar su función biológica, además de demostrar por primera vez, la implicación de las lacasas en la degradación de la lignina por actinobacterias (Arias *et al.*, 2016; Blázquez *et al.*, 2017).

Recientemente en colaboración con la Dra. Eugenio y el Dr. Ibarra del CIFOR-INIA, estudios comparativos de la acción de las lacasas de *Myceliophthora* y de *Streptomyces* sobre lignina kraft utilizando Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (NMR), nos han permitido comprobar que ambos tipos de enzimas oxidan la lignina fenólica, lo que lleva a la escisión de los enlaces entre las unidades de la lignina y, en consecuencia, a la despolimerización de este polímero. Simultáneamente, los radicales fenoxilo formados por la acción de las lacasas sobre las unidades fenólicas, experimentan un acoplamiento radical-radical a través de fenil éter-carbono y enlaces carbono-carbono, lo que resulta

en nuevas estructuras condensadas y en polimerización (García-Fuentevilla *et al.*, 2023; Ibarra *et al.*, 2023).

En el aspecto aplicado, nuestro interés por proporcionar valor añadido a las enzimas bacterianas, nos ha llevado a estudiar la utilidad de la lacasa SilA de *S. ipomoeae* para degradar diversos contaminantes emergentes, tales como antibacterianos de tipo fluoroquinolona, como modelo representativo de PPCPs (Pharmaceuticals and Personal Care Products) y por su abundancia en aguas continentales. Los resultados del análisis cromatográfico (UHPLC-DAD) y de la evaluación de la toxicidad de los productos de degradación obtenidos tras la aplicación del sistema lacasa mediador (LMS) constituido por SilA y acetosiringona, pusieron de manifiesto la eficacia de esta enzima como herramienta de descontaminación de este tipo de fármacos (Blázquez *et al.*, 2016). Además, se evaluó el potencial del LMS constituido por la lacasa SilA y distintos mediadores (acetosiringona, siringaldehído y siringato de metilo), para la degradación de tintes textiles de gran diversidad estructural. Los resultados pusieron de manifiesto que tras el empleo del sistema SilA-siringato LMS se lograron niveles de degradación superiores al 90 % para los grupos de colorantes con estructuras azo, diazo e índigo (Blázquez *et al.*, 2018).

Recientemente, hemos abordado la utilidad de la lacasa SilA para la mejora del

rendimiento de sacarificación de sustratos lignocelulósicos para la producción de bioetanol. Se ensayó la eficacia para la deslignificación y la sacarificación de paja de trigo pretratada mediante “steam explosión” de la lacasa bacteriana SilA frente a la lacasa fúngica de *Trametes villosa*. Los resultados obtenidos mostraron la mayor eficacia de SilA en la etapa de pre-sacarificación del sustrato, produciendo una mayor liberación de glucosa y xilosa (de la Torre *et al.*, 2023). Por último, también se ha comprobado la idoneidad de una mananasa de *S. ipomoeae* para mejorar la hidrólisis enzimática de madera blanda pretratada durante el proceso de producción de bioetanol. La adición de mananasa durante la hidrólisis enzimática del extracto dio lugar a un notable incremento de hexosas fermentables como glucosa y manosa (Eugenio *et al.*, 2023).

Como se ha comentado anteriormente, una de las principales líneas de investigación de nuestro grupo es dar valor añadido a ligninas de origen agroforestal y/o industrial, para la obtención biotecnológica de aditivos para piensos, plásticos biodegradables, adhesivos, oleogeles, bioespesantes, bioabsorbentes etc.

En un Proyecto MINECO coordinado con la Dra. Valencia de la Universidad de Huelva se desarrollaron nuevos agentes espesantes amigables con el medio ambiente obtenidos a partir de fracciones lignocelulósicas derivadas de residuos agrícolas fer-

mentados mediante SSF con *Streptomyces* y lignina kraft funcionalizada con SilA. A través de modelos multivariantes se establecieron las condiciones óptimas para cultivo en SSF y para funcionalización de lignina kraft mediante la SilA, lo que nos ha permitido seleccionar las mejores condiciones operativas para procesos biotecnológicos y poder así discriminar entre las variantes implicadas en el proceso (condiciones de cultivo y/o reacción, características físico-químicas y mecánicas del producto final, etc). Sobre la base de las condiciones óptimas estimadas por el modelo estadístico, se comprobó la viabilidad del paja de trigo y de cebada transformadas como espesante de oleogeles para la fabricación de grasas lubricantes. Además, se formularon oleogeles a partir de ligninas lignina kraft funcionalizada con la lacasa SilA, abriendo una nueva vía para la obtención de otros materiales de interés industrial y que cumplen a su vez, las demandas actuales de sostenibilidad y reducción del impacto ambiental. En ambos casos, los oleogeles estudiados mostraron una evolución de las características reológicas similar y, en algún caso, mejoradas respecto a las grasas lubricantes estándar con base de litio. El efecto positivo observado en estos oleogeles, les otorga características competitivas con los lubricantes comerciales, constituyendo una alternativa ventajosa a tener en cuenta para su aplicación industrial (Borrero-López *et al.*, 2018; Domínguez *et al.*, 2021; Blánquez *et al.*, 2022).

Por último, se comprobó la ecotoxicidad y la biodegradabilidad de estas grasas lubricantes formuladas con lignocelulosa en comparación con la grasa industrial comercial. El proceso de biodegradación de la grasa de base lignocelulósica fue significativamente superior al de la grasa comercial con espesante de litio. Además, los ensayos de ecotoxicidad mostraron que grasas con base lignocelulósica no suponen ningún riesgo para la biota del suelo, ya que no se observaron perturbaciones marcadas en el perfil filogenético bacteriano. Se demostró también un impacto fitotóxico nulo y solo ligeramente sobre *C. elegans*. Por lo tanto, estos resultados avalan el gran potencial del uso de lignocelulosa en la elaboración de oleogeles para reemplazar las grasas comerciales proporcionando un enfoque innovador para obtener biopolímeros mediante la mejora de residuos agrícolas y/o industriales sin impacto negativo en la ambiente. Ambos logros se ajustan bien a la creciente demanda social de

protección ambiental tecnologías amigables y requisitos de economía circular (Fajardo *et al.*, 2022).

Actualmente, el grupo de investigación está desarrollando un nuevo proyecto cuyo objetivo es el desarrollo de películas nanocompuestas de materiales poliméricos (PLA, PLA+lignina) con propiedades funcionales y antibacterianas que garanticen la conservación y seguridad de los alimentos, y que sean medioambientalmente sostenibles.

## Bibliografía

- Arias ME, Blánquez A, Hernández M, Rodríguez J, Ball AS, González-Pérez JA, Jiménez-Morillo NT, y González-Vila, F.J.** (2016). Role of a thermostable laccase produced by *Streptomyces ipomoeae* in the degradation of wheat straw lignin in solid state fermentation. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 122: 202-208.
- Blánquez A, Ball AS, González Pérez JA, Jiménez-Morillo NT, González-Vila F, Arias ME, y Hernández M.** (2017). Laccase SilA from *Streptomyces ipomoeae* CECT 3341, a key enzyme for the solubilization of lignin from agricultural residues? *PLOS ONE*. Vol 12 no 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187649>
- García-Fuentevilla L, Domínguez G, Martín-Sampedro R, Hernández M, Arias ME, Santos JI, Ibarra D, y Eugenio ME.** (2023). Enzyme-Catalyzed Polymerization of Kraft Lignin from *Eucalyptus globulus*: Comparison of Bacterial and Fungal Laccases Efficacy. *Polymers*, 15, 513. <https://doi.org/10.3390/polym15030513>
- Ibarra D, García-Fuentevilla L, Domínguez G, Martín-Sampedro R, Hernández M., Arias ME, Santos JI, y Eugenio ME.** (2023). NMR Study on Laccase Polymerization of Kraft Lignin Using Different Enzymes Source. *Int. J. Mol. Sci.* 24: 2359. <https://doi.org/10.3390/ijms24032359>
- Blánquez A, Guillén F, Rodríguez J, Arias ME y Hernández M.** (2016). The degradation of two fluoroquinolone based antimicrobials by SilA, an alkaline laccase from *Streptomyces ipomoeae*. *World J. of Microbiol. Biotechnol.* 32: 52-59. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2032-5>
- Blánquez A, Rodríguez J, Brissos V, Mendes S, Martins LO, Ball AS, Arias ME, y Hernández M.** (2018). Decolorization and detoxification of textile dyes using a versatile *Streptomyces* laccase-natural mediator system *Saudi J. Biol. Sci.* 26(5): 913-920. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.05.020>
- de la Torre M, Martín-Sampedro R, Fillat Ú, Eugenio ME, Blánquez A, Hernández M., Arias ME y Ibarra D.** (2017). Comparison of the efficiency of bacterial and fungal laccases in delignification and detoxification of steam-pretreated lignocellulosic biomass for bioethanol production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 44: 1561-1573.
- Eugenio ME, Domínguez G, Molina-Guijarro JM, Hernández M, Arias ME, y Ibarra D.** (2023). Boosting enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood by laccase and endo- $\beta$ -mannanase enzymes from *Streptomyces ipomoeae* CECT 3341. *Wood Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1007/s00226-023-01481-7>
- Borrero-López AM, Blánquez A, Valencia C, Hernández M, Arias ME, Eugenio ME, Fillat Ú, y Franco, JM.** (2018). Valorization of Soda Lignin from Wheat Straw Solid-State Fermentation: Production of Oleogels. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 6(4): 5198-5205. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b04846>
- Blánquez A, Borrero-López AM, Domínguez G, Valencia C, Molina-Guijarro JM, Eugenio ME, Ibarra D, y Hernández M.** (2022). Solid-State Fermentation with *Streptomyces* as an Eco-friendly Route to Tune Lignin Properties and Its Use as a Binder in Adhesive Formulation *ACS Sustain. Chem. Eng.* 10: 10403-10416. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.2c03523>
- Domínguez G, Blánquez A, Borrero-López AM, Valencia C, Eugenio ME, Arias ME, Rodríguez J, y Hernández M.** 2021. Eco-friendly oleogels from functionalized kraft lignin with laccase SilA from *Streptomyces ipomoeae*: an opportunity to replace commercial lubricants. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 9: 4611-4611. <https://dx.doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c00113>
- Fajardo C, Blánquez A, Domínguez, G, Borrero-López AM, Valencia C, Hernández M, Arias ME y Rodríguez J.** (2021). Assessment of Sustainability of Bio Treated Lignocellulose-Based Oleogels. *Polymers*, 13, 267. <https://doi.org/10.3390/polym13020267>