

# Grupo de Investigación Biofactorías Fúngicas (FungalFact) Hacia el aprovechamiento de los hongos filamentosos a través de la biología sintética y la edición genética

JOSE F. MARCOS, SANDRA GARRIGUES, JUAN ANTONIO TAMAYO-RAMOS, PALOMA MANZANARES

Departamento de Biotecnología de Alimentos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), 46980 Paterna (Valencia).

✉ [jmarcos@iata.csic.es](mailto:jmarcos@iata.csic.es)



Figura 1. El grupo Biofactorías Fúngicas del IATA-CSIC.

El grupo “Biofactorías Fúngicas” (FungalFact) (Figura 1) trabaja en el departamento de Biotecnología de Alimentos del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), centro de Excelencia “Severo Ochoa” perteneciente al CSIC, y tiene su origen en el anterior grupo de péptidos bioactivos de interés agroalimentario, creado por Paloma Manzanares y Jose F. Marcos hace más de diez años. Somos expertos en biotecnología de hongos filamentosos y levaduras, microbiología de alimentos y en la identificación, producción y caracterización de enzimas, péptidos y proteínas bioactivos. Aplicamos técnicas microbiológicas, bioquímicas, biotecnológicas y de genética molecular junto con aproximaciones de biología celular y enfoques de genómica funcional y de sistemas.

Las líneas de investigación y capacidades del grupo FungalFact aparecen representa-

das en la Figura 2, y están dirigidas actualmente a tres objetivos interconectados que describimos a continuación, desde el más consolidado hasta los más recientes tras la incorporación de Sandra Garrigues y Juan Antonio Tamayo-Ramos.

## Producción biotecnológica, caracterización y diseño racional de proteínas antifúngicas (AFPs)

Hay una necesidad urgente de nuevas moléculas antifúngicas para dar respuesta a la crisis de resistencia a fungicidas y la escasez de compuestos antifúngicos. La experiencia previa del grupo en la caracterización de péptidos antimicrobianos

frente a hongos y levaduras (Marcos *et al.*, 2008), ha sido clave para la identificación de nuevas proteínas antifúngicas (AFPs).

Las AFPs son proteínas catiónicas, pequeñas (unos 50 aminoácidos) y con 3 ó 4 puentes disulfuro que les confieren una estructura compacta, estable y resistente. Las primeras AFPs (AFP de *Aspergillus giganteus* y PAF de *Penicillium chrysogenum*) se descubrieron por su abundante secreción al medio de cultivo. Esto, unido a su carácter catiónico, facilita su purificación. Nuestro grupo contribuyó a descubrir que los hongos filamentosos tienen en sus genomas un número variable de genes que codifican proteínas del tipo AFP (Garrigues *et al.*, 2016). Sin embargo, la mayoría de estas proteínas no se habían podido caracterizar porque no se han encontrado las condiciones adecuadas para su producción.

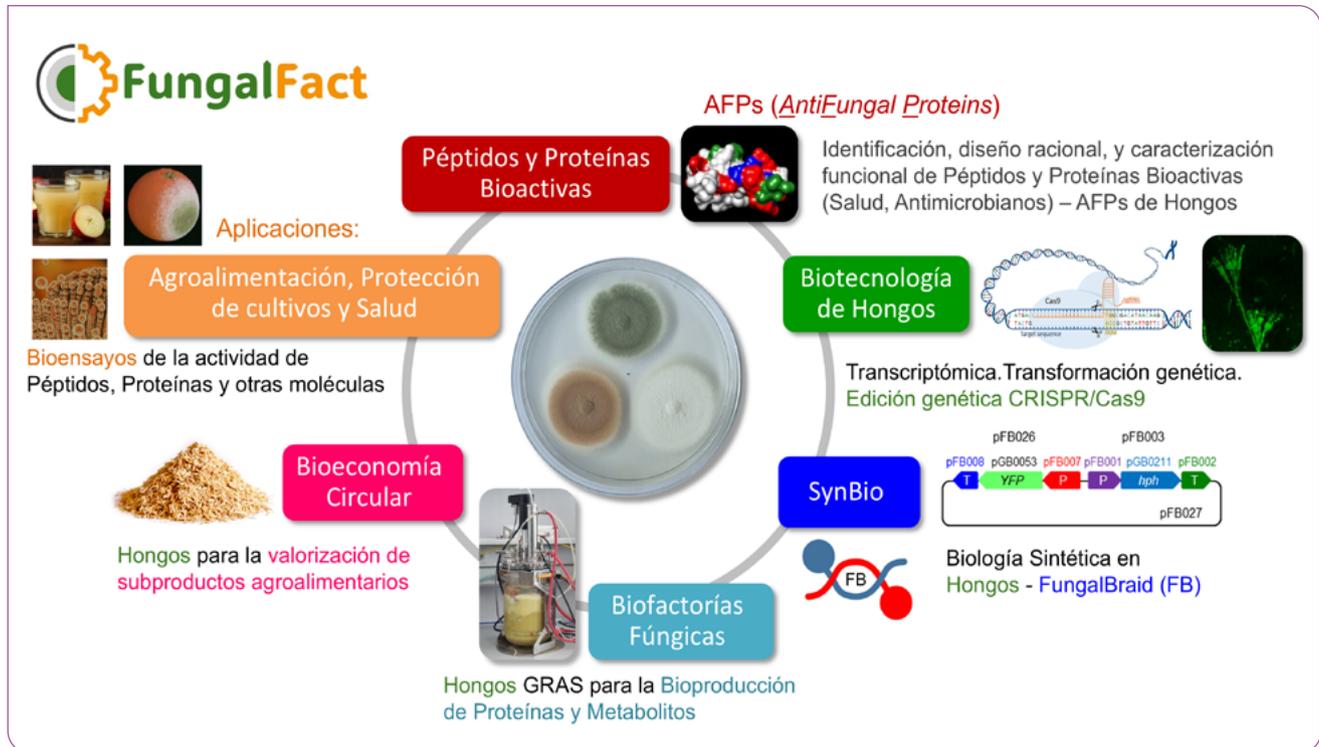


Figura 2. Las líneas de investigación y capacidades del grupo FungalFact.

En colaboración con la Dra. Florentine Marx (Medical University of Innsbruck, Austria) desarrollamos cassetes de expresión que permiten la producción recombinante de AFPs en biofactorías fúngicas seguras (Sonderregger *et al.*, 2016). Esto nos ha permitido producir biotecnológicamente y caracterizar, entre otras, las tres AFPs de *Penicillium expansum* (PeAfpA, PeAfpB y PeAfpC) (Garrigues *et al.*, 2018) y la única de *Penicillium digitatum* (PdAfpB) (Garrigues *et al.*, 2017). Las AFPs tienen actividad antifúngica específica, preferentemente sobre hongos filamentosos, y no presentan toxicidad inespecífica frente a animales o plantas. PeAfpA de *P. expansum* o PdAfpB de *P. digitatum* controlan distintas enfermedades de plantas y postcosecha de frutos en bioensayos de inoculación controlada a escala de laboratorio (Garrigues *et al.*, 2018; Bugeda *et al.*, 2025). PeAfpA es la AFP con mayor actividad antifúngica conocida y presenta actividad frente a levaduras, incluyendo patógenas de interés clínico (Giner-Llorca *et al.*, 2023b; Manzanares *et al.* 2024).

Uno de nuestros retos es la caracterización del mecanismo de acción antifúngico de diferentes AFPs mediante estudios transcriptómicos, generación de mutan-

tes y biología celular (Bugeda *et al.*, 2020; Giner-Llorca *et al.*, 2023b; Ropero-Pérez *et al.*, 2023; Giner-Llorca *et al.*, 2024). Hemos propuesto un modelo de acción en tres etapas (Bugeda *et al.*, 2020; Manzanares *et al.*, 2024): la interacción inicial de la AFP con la pared celular del hongo, su transporte hacia el interior celular (internalización), y la muerte celular. Para la unión a pared celular de PeAfpA y PdAfpB es necesaria una correcta manosiación de proteínas. En el caso de PdAfpB, la muerte intracelular presenta marcadores de muerte celular programada, incluida la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), mientras que PeAfpA no parece inducir una producción masiva de ROS.

Los datos indican que diferentes AFPs presentan potencia antifúngica, especificidad y mecanismos de acción diferenciados. Esto nos permite postular que podemos cambiar las propiedades de una AFP modificando su secuencia de aminoácidos mediante diseño racional, generando quimeras que no se encuentran en la naturaleza, pero que reúnen las mejores características de distintas AFPs. Hemos validado este concepto mejorando racionalmente PeAfpB y produciéndola en nuestras biofactorías seguras (Giner-Llorca *et al.*, 2023a).

## Implementación de la edición genética y la biología sintética en hongos filamentosos

La importancia de los hongos filamentosos para la bioproducción industrial de proteínas y metabolitos es incuestionable. Sin embargo, el uso de herramientas de biología sintética y de edición genética sigue rezagado con respecto a otros organismos, limitando la investigación, el desarrollo de cepas y la identificación de antifúngicos. En colaboración con el grupo del Dr. Diego Orzáez (IBMCP, Valencia) hemos adaptado su sistema de biología sintética GoldenBraid, originalmente diseñado para plantas, a hongos filamentosos, desarrollando el sistema de clonaje modular FungalBraid (FB) (Hernanz-Koers *et al.*, 2018; Moreno-Giménez *et al.*, 2023). FB se basa en sistemas de clonaje Golden Gate, códigos universales de cuatro nucleótidos y transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, siendo interoperativo entre plantas y hongos. FB admite un número teóricamente ilimitado de unidades transcripcionales por evento de transformación, lo que posibilita la

inserción de rutas biosintéticas completas o la modulación individualizada de la expresión múltiple de genes mediante promotores sintéticos. Esta tecnología ha permitido, entre otras aplicaciones, obtener biofactorías productoras de AFPs naturales y quiméricas (Giner-Llorca *et al.*, 2023a).

Adicionalmente, somos pioneros en España en la edición genética de hongos filamentosos del género *Penicillium* (Garrigues *et al.*, 2022). Utilizamos plásmidos no integrativos que contienen toda la maquinaria para la edición mediada por CRISPR/Cas9 y que se pueden eliminar, convirtiéndolo en un sistema reciclable que permite la reutilización de los marcadores de selección en nuevas ediciones.

## Biofactorías fúngicas para la valorización de residuos agroalimentarios

Otro de nuestros objetivos es el desarrollo de biofactorías fúngicas seguras, eficientes y sostenibles que puedan crecer sobre residuos agroalimentarios, convirtiéndolos en productos de alto valor añadido dentro de una estrategia de economía circular. Actualmente, trabajamos en la valorización del salvado de arroz para la producción sostenible de cócteles enzimáticos de interés industrial (Yélamos *et al.*, 2025) y de AFPs. También trabajamos en la valorización de residuos de industrias frutícolas para la producción de antioxidantes a partir de levaduras.

La combinación de herramientas avanzadas de biología sintética y edición genética nos permitirá mejorar la eficiencia de estos procesos, optimizando el rendimiento y la funcionalidad de las cepas fúngicas empleadas para la bioproducción de moléculas de interés agroalimentario e industrial.

## Referencias

Bugeda A, Garrigues S, Gandía M, Manzanares P, Marcos JF y Coca M (2020). The antifungal protein AfpB induces

regulated cell death in its parental fungus *Penicillium digitatum*. *mSphere* 5:15.

Bugeda A, Shi X, Castillo L, Marcos JF, Manzanares P, López-Moya JJ y Coca M (2025). High yield production of the anti-fungal proteins PeAfpA and PdAfpB by vacuole targeting in a TMV-based expression vector. *Plant Biotechnol J* (en prensa)

Garrigues S, Gandía M y Marcos JF (2016). Occurrence and function of fungal antifungal proteins: a case study of the citrus postharvest pathogen *Penicillium digitatum*. *Appl Microbiol Biotech* 100:2243-2256.

Garrigues S, Gandía M, Popa C, Borics A, Marx F, Coca M, Marcos JF y Manzanares P (2017). Efficient production and characterization of the novel and highly active antifungal protein AfpB from *Penicillium digitatum*. *Sci Rep* 7:14663.

Garrigues S, Gandía M, Castillo L, Coca M, Marx F, Marcos JF y Manzanares P (2018). Three antifungal proteins from *Penicillium expansum*: Different patterns of production and antifungal activity. *Front Microbiol* 9:2370.

Garrigues S, Manzanares P y Marcos JF (2022). Application of recyclable CRISPR/Cas9 tools for targeted genome editing in the postharvest pathogenic fungi *Penicillium digitatum* and *Penicillium expansum*. *Curr Genet* 68:515-529.

Giner-Llorca M, Gallego del Sol F, Marcos JF, Marina A y Manzanares P (2023a). Rationally designed antifungal protein chimeras reveal new insights into structure-activity relationship. *Int J Biol Macromol* 225:135-148.

Giner-Llorca M, Locascio A, Del Real JA, Marcos JF y Manzanares P (2023b). Novel findings about the mode of action of the antifungal protein PeAfpA against *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotech* 107:6811-6829.

Giner-Llorca M, Ropero-Pérez C, Garrigues S, Thomson DD, Bignell EM, Manzanares P y Marcos JF (2024). Dynamics of interaction and internalisation of the antifungal protein PeAfpA into *Penicillium*

*digitatum* morphotypes. *Int J Biol Macromol* 282:136980.

Hernanz-Koers M, Gandía M, Garrigues S, Manzanares P, Yenush L, Orzaez D y Marcos JF (2018). FungalBraid: A GoldenBraid-based modular cloning platform for the assembly and exchange of DNA elements tailored to fungal synthetic biology. *Fungal Genet Biol* 116:51-61.

Manzanares P, Giner-Llorca M, Marcos JF y Garrigues S (2024). Fighting pathogenic yeasts with plant defensins and anti-fungal proteins from fungi. *Appl Microbiol Biotech* 108:277.

Marcos JF, Muñoz A, Pérez-Payá E, Misra S y López-García B (2008). Identification and rational design of novel antimicrobial peptides for plant protection. *Annu Rev Phytopathol* 46:273-301.

Moreno-Giménez E, Gandía M, Sáez Z, Manzanares P, Yenush L, Orzáez D, Marcos JF y Garrigues S (2023). FungalBraid 2.0: expanding the synthetic biology toolbox for the biotechnological exploitation of filamentous fungi. *Front Bioeng Biotechnol* 11:1222812.

Ropero-Pérez C, Bolós B, Giner-Llorca M, Locascio A, Garrigues S, Gandía M, Manzanares P y Marcos JF (2023). Transcriptomic profile of *Penicillium digitatum* reveals novel aspects of the mode of action of the antifungal protein AfpB. *Microbiol Spectr* 11:e0484622.

Sonderegger C, Galgóczy L, Garrigues S, Fizil Á, Borics A, Manzanares P, Hegedüs N, Huber A, Marcos JF, Batta G y Marx F (2016). A *Penicillium chrysogenum*-based expression system for the production of small, cysteine-rich antifungal proteins for structural and functional analyses. *Microb Cell Fact* 15:192.

Yélamos AM, Marcos JF, Manzanares P y Garrigues S (2025). Harnessing filamentous fungi for enzyme cocktail production through rice bran bioprocessing. *J Fungi* 11:106.

.....