

Biotecnología para la utilización de la biomasa lignocelulósica

Alicia Prieto, Susana Camarero, F. Javier Ruiz-Dueñas, Ángel Martínez y M^a Jesús Martínez

Grupo de Biotecnología para la Biomasa Lignocelulósica. Centro de Investigaciones Biológicas, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid



Nuestro grupo de investigación, coordinado por los Dres. Ángel T. Martínez y M^a Jesús Martínez, está integrado en el Departamento de Biología Medioambiental y en la Unidad IPSBB (*Integrated Protein Science for Biomedicine and Biotechnology*) del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) de Madrid, uno de los centros pluridisciplinares de mayor tradición en el área de Biología en España. El principal objetivo de nuestro trabajo es aplicar microorganismos, principalmente hongos filamentosos, y sus enzimas extracelulares, en procesos industriales destinados a la obtención de combustibles, materiales y productos químicos a partir de recursos vegetales renovables, tratando de contribuir al desarrollo sostenible de nuestra sociedad.

Estas actividades se concretan en varios proyectos de investigación, estructurados en torno a dos grandes líneas que abordan la bioconversión de distintos componentes de la biomasa vegetal. Los componentes de la pared

celular sobre los que trabajamos, por ser muy abundantes en la naturaleza, son los polisacáridos (celulosa y hemicelulosa) y la lignina. Los primeros son transformados gracias a la acción concertada de varias glicosil hidrolasas (principalmente endoglucanasas, endoxilanasas y β -gluco y xilosidasas, junto con LPMOs –lytic polysaccharide monooxygenases-), mientras que la degradación del polímero de lignina se lleva a cabo gracias a la intervención de un complejo sistema enzimático extracelular en el que las oxidoreductasas ligninolíticas (principalmente peroxidasas y lacasas) y otras enzimas auxiliares (GMC oxidasas/deshidrogenasas) juegan un papel fundamental. Los lípidos son otros de los componentes importantes en muchos residuos urbanos e industriales procedentes de biomasa vegetal y también pueden ser modificados y valorizados mediante el empleo de lipasas y esterol esterasas.

Por todo ello, el estudio de nuevas enzimas, su caracterización estructural-funcional, y la

mejora de las propiedades de las ya conocidas mediante diseño racional o evolución dirigida, con el fin de obtener compuestos químicos de base y compuestos de valor añadido que contribuyan a la valorización de la lignocelulosa y de otros residuos vegetales, es un tema de plena actualidad. Los Dres. A.T. Martínez y F.J. Ruiz-Dueñas son expertos en el campo de las peroxidasas y GMC oxidasas fúngicas (1, 2), la Dra. S. Camarero en oxidasas multicobre y mediadores redox (3, 4) y las Dras. M.J. Martínez y A. Prieto en glicosil hidrolasas y lipasas (5, 6). Nuestro trabajo comienza con la búsqueda de enzimas en fuentes naturales o en genomas fúngicos (7-9). Cabe destacar la implicación del grupo en proyectos del *Joint Genome Institute* para la anotación de estas enzimas en genomas fúngicos recientemente secuenciados.

La producción de las enzimas de interés se lleva a cabo tanto utilizando el organismo que las produce de forma natural como sistemas de expresión heteróloga, procariotas (*Esche-*



Figura 1.

Estrategias de trabajo realizadas en los laboratorios del grupo de Biotecnología para la Biomasa Lignocelulósica, CIB-CSIC, para el desarrollo de nuevos biocatalizadores de reacciones de interés industrial y medioambiental.

richia coli) y/o eucariotas (*Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*). Esta última aproximación facilita la caracterización bioquímica, físico-química y molecular de enzimas existentes o incluso de enzimas ancestrales reconstruidas (10, 11), y permite su mejora por diseño racional y/o evolución dirigida (12-16) (Figura 1). El fin último es entender los mecanismos de la biodegradación de la lignocelulosa para un mejor aprovechamiento de la biomasa vegetal (17-20) y obtener biocatalizadores aplicables en procesos biotecnológicos de interés industrial y medioambiental (21-24). Estas investigaciones se realizan en el ámbito de proyectos nacionales (MINECO), internacionales (H2O2O como EnzOx2, www.enzox2.eu) y proyectos con empresas (Retos colaboración, MINECO). Además participamos en diferentes Redes Nacionales, como la Red Lignocel, coordinada por el grupo, cuya temática es la búsqueda y aplicación de soluciones menos contaminantes y más sostenibles para el aprovechamiento de recursos agroforestales como materia prima renovable.

Nuestro equipo colabora con investigadores de diferentes centros, universidades y empresas, tanto nacionales como internacionales y la información detallada de los proyectos en curso puede encontrarse en su página web (<https://www.cib.csic.es/es/departamentos/biologia-medioambiental/biotecnologia-para-la-biomasa-lignocelulosa>).

BIBLIOGRAFÍA

- Ruiz-Dueñas FJ, Morales M, García E, Miki Y, Martínez MJ y Martínez AT (2009). Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases. *J Exp Bot* 60:441-52.
- Carro J, Serrano A, Ferreira P y Martínez AT (2016). Fungal Aryl-Alcohol Oxidase in Lignocellulose Degradation and Bioconversion. *In Microbial Enzymes in Bioconversions of Biomass. Biofuel and Biorefinery Technologies* 3: 301-22.
- Cañas AI y Camarero S (2010). Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnology Advances* 28: 694-705.
- Pardo I y Camarero S (2015). Laccase engineering by rational and evolutionary design. *Cell Mol Life Sci* 72:897-910.
- Vaquero ME, Barriuso J, Prieto A y Martínez MJ (2016). Properties, structure, and applications of the lipases from the *Candida rugosa*-like family: A review. *Biotechnol Adv* 34: 874-85.
- Barriuso J, Vaquero ME, Prieto A y Martínez MJ (2016). Structural traits and catalytic versatility of the lipases from the *Candida rugosa*-like family: A review. *Biotechnol Adv* 34: 874-85.
- Barriuso J, Prieto A y Martínez MJ (2013). Fungal genomes mining to discover novel sterol esterases and lipases as catalysts. *BMC Genomics* 14:712-20.
- Ruiz-Dueñas FJ, Lundell T, Floudas D, Nagy LG, Barrasa JM, Hibbett DS y Martínez AT (2013). Lignin-degrading peroxidases in Polyporales: an evolutionary survey based on 10 sequenced genomes. *Mycologia*, 105: 1428-44.
- Ferreira P, Carro J, Serrano A y Martínez AT (2015). A survey of genes encoding H₂O₂-producing GMC oxidoreductases in 10 Polyporales genomes. *Mycologia* 107:1105-19.
- Ayuso-Fernández I, Martínez AT y Ruiz-Dueñas FJ (2017). Experimental recreation of the evolution of lignin-degrading enzymes from the Jurassic to date. *Biotechnol Biofuels* 10: 67.
- Barriuso J y Martínez MJ (2017). Evolutionary history of versatile-lipases from *Agaricales* through reconstruction of ancestral structures. *BMC Genomics* 18:12.
- Acebes S, Fernandez-Fueyo E, Monza E, Lucas F, Almendral D, Ruiz-Dueñas FJ, Lund H, Martínez AT y Guallar V (2016). Rational enzyme engineering through biophysical and biochemical modeling. *ACS-Catalysis* 6: 1624-9.
- Linde D, Cañellas M, Coscolín C, Davó-Siguero I, Romero A, Lucas F, Ruiz-Dueñas FJ, Guallar V y Martínez AT (2016). Asymmetric sulfoxidation by engineering the heme pocket of a dye-decolorizing peroxidase: An experimental and computational study. *Catal Sci Technol* 6: 6277-85.
- Pardo I, Santiago G, Gentili P, Lucas F, Monza E, Medrano FJ, Galli C, Martínez AT, Guallar V y Camarero S (2016). Re-designing the substrate binding pocket of laccase for enhanced oxidation of sinapic acid. *Catal Sci Technol* 6:3900-10.
- Santiago G, de Salas F, Lucas F, Monza E, Acebes S, Martínez AT, Camarero S y Guallar V (2016). Computer-aided laccase engineering: Toward biological oxidation of arylamines. *ACS-Catalysis* 6: 5415-23.
- Saez-Jimenez V, Rencoret J, Rodríguez-Carvajal MA, Gutiérrez A, Ruiz-Dueñas FJ y Martínez AT (2016). Role of surface tryptophan for peroxidase oxidation of nonphenolic lignin. *Biotechnol Biofuels* 9: 198-211.
- Camarero S, Martínez MJ y Martínez AT (2014). Understanding lignin biodegradation for the improved utilization of plant biomass in modern biorefineries. *Biofuels Bioprod. Bioref.* 8:615-25.
- Fernandez-Fueyo E, Ruiz-Dueñas FJ, López-Lucendo MF, Pérez-Boada M, Rencoret J, Gutiérrez A, Pisabarro AG, Ramírez L, Martínez AT (2016). A secretomic view of woody and nonwoody lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnol Biofuels* 9: 49.
- Martínez AT (2016). How to break down crystalline cellulose. *Science* 352: 1050-1.
- Salvachúa D, Katahira R, Cleveland NS, Khanna P, Resch MG, Black BA, Purvine SO, Zink EM, Prieto A, Martínez MJ, Martínez AT, Simmons BA, Gladden JM y Beckham GT (2016). Lignin depolymerization by fungal secretomes and a microbial sink. *Green Chem.* doi: 10.1039/C6GC01531J.
- Carro J, Ferreira P, Rodríguez L, Prieto A, Serrano A, Balcells B, Ardá A, Jiménez-Barbero J, Gutiérrez A, Ullrich R, Hofrichter M y Martínez AT (2015). 5-Hydroxymethylfurfural conversion by fungal aryl-alcohol oxidase and unspecific peroxidase. *FEBS J.* 282: 3218-29.
- de Salas F, Pardo I, Salvavagione HJ, Aza P, Amourig E, Vind J, Martínez AT y Camarero S (2016). Advanced synthesis of conductive polyaniline using laccase as biocatalyst. *PlosOne* 11:e0164958.
- Nieto-Domínguez M, Prieto A, Fernández de Toro B, Cañada FJ, Barriuso J, Armstrong Z, Withers SG, de Eugenio LI y Martínez MJ (2016). Enzymatic fine-tuning for 2-(6-hydroxy-naphthyl) β-d-xylopyranoside synthesis catalyzed by the recombinant β-xylosidase BxTW1 from *Talaromyces amestolkiae*. *Microb Cell Fact* 15: 171.
- Molina-Gutiérrez M, Hakalin NLS, Rodríguez-Sánchez L, Prieto A y Martínez MJ (2017). Green synthesis of β-sitosterol esters catalyzed by the versatile lipase/sterol esterase from *Ophiotoma piceae*. *Food Chem DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.11.005*.