

Denominación del Proyecto:

Producción biotecnológica de D-DIBOA mediante *E. coli*.

MEMORIA CIENTÍFICO-TÉCNICA

1. RESUMEN DE LA PROPUESTA.

Una de las posibles vías para reducir el impacto que la agricultura tiene sobre el medio ambiente es el desarrollo de nuevos herbicidas menos contaminantes y que cuente con nuevos modos de acción para evitar los fenómenos de resistencia. Una de las causas del alto grado de impacto ambiental se debe fundamentalmente a la baja degradabilidad que estos compuestos presentan, así pues, la persistencia en el medio ambiente de algunos herbicidas puede ser del orden de varios meses e incluso de hasta años (caso de las s-triazinas) (Barchańska and Baranowska, 2009). Además los fenómenos de resistencia han aumentado en la actualidad la cantidad de biotipos de malas hierbas resistentes a los herbicidas en todo el mundo hasta 372.

La sustitución de los herbicidas tradicionales por productos naturales con actividad fitotóxica podría solucionar los problemas anteriores dado su naturaleza y acción biológica específica. Dentro de los productos naturales extraídos de plantas con alta actividad, cabe destacar los ácidos benzohidroxámicos, los cuales representan uno de los grupos mayormente estudiados, dentro de la amplia variedad de compuestos aleloquímicos (>10.000) (Fomsgaard, 2004). En la actualidad, se han logrado sintetizar una amplia variedad de estos ácidos benzohidroxámicos, de entre ellos el 4-hidroxi-(2H)-1,4-benzoxacin-3(4H)-ona (D-DIBOA) que ha sido seleccionado como compuesto de mayor interés, dado su alta fitotoxicidad, alta estabilidad y alta degradabilidad en el suelo.

La síntesis de D-DIBOA se ha logrado simplificar a un proceso con dos etapas químicas partiendo de 2-nitrofenol. No obstante, su producción presenta problemas de escalamiento en la segunda etapa, ya que se trata de una reacción de catálisis heterogénea exotérmica con desprendimiento de hidrógeno, por lo que los riesgos de explosión son muy altos.

En base a las investigaciones llevadas a cabo por los grupos solicitantes se ha logrado sustituir la segunda etapa por una biotransformación empleando la bacteria *Escherichia coli* como sistema biológico/biocatalizador. Además, se ha conseguido identificar cuales son las enzimas implicadas en el proceso, lográndose un rendimiento de la biotransformación de aproximadamente el 60% mediante la sobre-expresión de éstas en *E. coli*.

En orden a mejorar estos rendimientos se enmarca el presente proyecto con el objetivo fundamental de la **optimización de la producción biotecnológica de D-DIBOA mediante *E. coli***, empleando para ello: técnicas de ingeniería genética, técnicas de optimización de las condiciones de cultivo y estudios de los modos de operación en discontinuo y realimentado, tanto a escala de laboratorio como piloto. Además, se hace necesario para optimizar todo el proceso, mejorar los rendimientos de la primera etapa química (producción del precursor), así como en los procesos de separación y concentración del producto de interés del medio de cultivo.

2. ANTECEDENTES DEL PROYECTO.

Con el desarrollo de herbicidas modernos, más selectivos y de baja dosis, se pensó que el problema de las malas hierbas estaba controlado, y por consiguiente, habría un aumento de los rendimientos y de la calidad de las cosechas. Sin embargo, la aparición del fenómeno de resistencia acabó con estas expectativas. La resistencia se define como “la capacidad heredada de una planta para sobrevivir y reproducirse después de una exposición a una dosis de herbicida que normalmente sería letal a su especie”.

Este fenómeno fue observado por primera vez a mediados de los años 60, cuando se describieron poblaciones de *Senecio vulgaris* resistentes a las s-triazinas, atrazina y simazina (Ryan, 1970). Desde entonces, se conocen 200 especies resistentes a diversos herbicidas (116 dicotiledóneas y 84 monocotiledóneas). Actualmente, hay 372 biotipos de malas hierbas resistentes a herbicidas en el mundo, con una media de aparición de nueve casos por año (Heap, 1997), pertenecientes a géneros tan problemáticos como *Amaranthus*, *Chenopodium*, *Conyza*, *Lolium*, *Avena* o *Echinochloa*, entre otros. De más reciente aparición, son los fenómenos de resistencia cruzada y múltiple que han venido a aumentar la problemática de los biotipos de malas hierbas resistentes a herbicidas. La resistencia cruzada se refiere a aquellos biotipos que son resistentes a diferentes clases de herbicidas debido a la presencia de un solo mecanismo de resistencia. La resistencia múltiple constituye el mayor problema detectado de resistencia a herbicidas, se refiere a aquellos biotipos resistentes a uno o más herbicidas debido a más de un mecanismo de resistencia.

Actualmente, los herbicidas recogidos por el Herbicide Resistance Action Committee (HRAC) se clasifican sólo en 20 modos diferentes de acción, lo que pone de manifiesto la escasez de recursos que se poseen para combatir las malas hierbas. Además, el 60% de los herbicidas se agrupan en tres de los modos de acción.

Para el modelo existente de explotación agraria el uso de los herbicidas resulta imprescindible para mantener las capacidades de producción actuales. Incluso en las técnicas integradas de control, la industria necesita de nuevas ideas y métodos para obtener nuevos herbicidas, que tengan nuevas estructuras químicas, pero sobre todo que posean **nuevos modos de acción** y sean más respetuosos con el medio ambiente.

Los productos naturales se presentan como una fuente atractiva de productos agroquímicos, no sólo por su diversidad estructural, sino por su acción biológica específica y su carácter inocuo “*a priori*” para el medio ambiente. En este sentido los pocos herbicidas comerciales basados en productos naturales (tricetonas, bialaphos y glufosinato) poseen modos de acción totalmente nuevos. Algunos de estos metabolitos juegan un papel importante en las interacciones complejas entre organismos vivos en el entorno natural. El fenómeno en el cual están involucrados se designa con el nombre de **alelopatía**. La definición de alelopatía se ha establecido por la Sociedad Internacional de Alelopatía (IAS) como “*La ciencia que estudia cualquier proceso que implique metabolitos, fundamentalmente secundarios producidos por plantas, algas, bacterias y hongos que influyan en el crecimiento y desarrollo de sistemas cultivados y biológicos*”.

Estas sustancias son “herbicidas naturales” potenciales generados por una planta para evitar el crecimiento de las que las circundan. Por otra parte, para que los resultados y observaciones de los ensayos en el laboratorio puedan tener efectos sobre su potencial aplicación como agroquímicos, este debe considerar otros factores (Muller, 1974; Romeo and Weidenhamer, 1998; Romeo, 2000) tales como:

- Presencia y subsiguiente liberación de aleloquímicos.
- Inhibición de crecimiento de la planta receptora y la interferencia de los aleloquímicos en procesos fisiológicos fundamentales.
- Destino final del aleloquímico en el suelo.
- La dinámica de este aleloquímico en el suelo y su absorción por la planta receptora.
- Reducción de la toxicidad de los aleloquímicos adsorbidos por la planta receptora.
- Efectos aleloquímicos sobre la ecología microbiana y dinámica de los nutrientes.
- Interacción de estos aleloquímicos con sustancias promotoras (nitratos), inhibidoras (ácidos fenólicos) y neutras (glucosa) en el medio.
- El efecto sobre una tercera planta que participe en detrimento de la receptora.

Tres cultivos de indudable interés agronómico como el maíz (Anaya et al., 1992; Friebe et al., 1998; Takabayashi et al., 1995; Tudings and Tumlinson, 1992) el trigo (Wu et al., 2001a, b, 2002; 2003) y la cebada (Baghestani et al., 1999; Liu and Lovett, 1993a, b) presentan numerosos antecedentes como plantas con actividad alelopática. Esta actividad ha sido atribuida a la exudación e incorporación al suelo de ácidos hidroxámicos (figura 1).

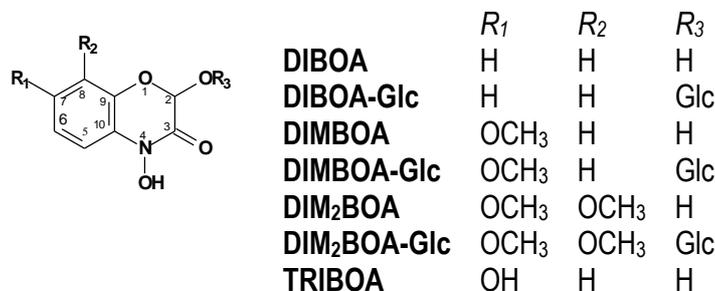


Figura 1.- Ácidos hidroxámicos aislados a partir de fuentes naturales.

Se han descrito interesantes propiedades biológicas de los ácidos benzohidroxámicos. (Duke, 1986; Macías et al., 2006b). En concreto, estos compuestos han mostrado tener un papel importante en los mecanismos de defensa química en plantas por su implicación en interacciones planta-planta (DIMBOA y DIBOA han mostrado importantes niveles de fitotoxicidad) (Niemeyer, 1988), así como en las interacciones planta-insecto como agentes disuasores de la alimentación. Además, DIMBOA, DIBOA y sus derivados han mostrado poseer actividad antifúngica (Escobar et al., 1999).

En la actualidad, se han logrado sintetizar una amplia variedad de estos ácidos benzohidroxámicos, de entre ellos el 4-hidroxi-(2H)-1,4-benzoxacin-3(4H)-ona (D-DIBOA) ha sido seleccionado como uno de los compuestos de mayor interés, dado su alta fitotoxicidad, alta estabilidad y alta degradabilidad en el suelo. De los derivados del D-DIBOA resulta de gran interés la producción de 6-Cl-D-DIBOA dada su alta actividad (Macías et al., 2006) y de 8-Cl-D-DIBOA por su alta selectividad frente a diferentes especies (Macías et al., 2009).

A pesar del interés que suscita el conocimiento del papel de estos metabolitos en la rotación de cultivos, no son muchos los trabajos encontrados en la literatura especializada sobre el comportamiento de estos compuestos y sus derivados en el suelo. En 2001, la Unión Europea concedió el proyecto FATEALLCHEM "Fate and Toxicity of Allelochemicals (Natural Plant Toxins) in Relation to Environment and Consumer", financiado por el V Programa Marco dentro del programa "Quality of Life" (QLK5-CT-2001-01967). El Grupo de Alelopatía (FQM-286)

colaboró en los estudios de degradación en suelo e incorporación de los agentes alelopáticos en las especies receptoras y en la puesta a punto de los procedimientos analíticos para analizar con fiabilidad muestras de diferente origen (suelo, planta, medios de cultivo, etc.). Su trabajo se centró en el suministro de los productos que eran necesarios para los diferentes bioensayos, tanto a nivel de laboratorio como de campo. En ese punto se detectó la necesidad de desarrollar y adaptar las actuales metodologías para la obtención de todos estos productos en cantidad suficiente para poder ensayarlos con garantía, ya que el ensayo a nivel de invernadero y campo requería pasar a la escala multigramo.

La síntesis química de obtención de ácidos benzohidroxámicos (benzoxacinonas) se lleva a cabo en dos etapas (Fig. 2). La primera de ellas consiste en una reacción de sustitución nucleofílica de los productos comerciales derivados del 2-nitrofenol con diferentes sustituyentes en el anillo bencénico. Se requiere (paso 1) de una disolución de hidróxido potásico en etanol absoluto y el producto obtenido (paso 2) se trata con bromoacetato de etilo y dimetilformamida (DMF) (Macías et al., 2006a).

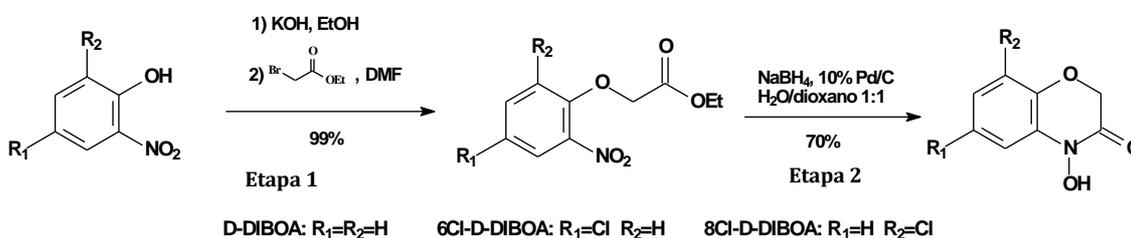


Figura 2.- Etapas de transformación química para la obtención de D-DIBOA, 6-Cl-D-DIBOA y 8-Cl-D-DIBOA a partir de compuestos derivados de 2-nitrofenol.

La etapa (2) es una reacción de reducción del grupo nitro aromático a hidroxilamino o amino con posterior ciclación por adición-eliminación intramolecular sobre el éster de la cadena lateral en un solo paso. Esta metodología procede de la optimización de trabajos previos (Macías et al., 2006c) en la obtención del esqueleto de 1,4-benzoxacin-3-ona y permite obtener estos compuestos con un alto rendimiento. Debido a las condiciones complejas en que ocurre esta etapa, ya que se trata de una reacción de catálisis heterogénea exotérmica con desprendimiento de hidrógeno (riesgos de explosión), es importante la búsqueda de nuevas alternativas.

Detectada la necesidad de obtener estos productos bioactivos en mayor cantidad para poder ser estudiados a nivel de campo, el grupo TEP105 planteó un proyecto que fue concedido por la Junta de Andalucía como Proyecto de Excelencia en 2006 y denominado "Producción biotecnológica de ácidos benzohidroxámicos bioactivos (fitosanitarios y farmacológicos)" (P06-TEP-01399). El objetivo general de dicho proyecto fue el escalamiento del proceso de síntesis de ácidos benzohidroxámicos ya desarrollado a nivel de laboratorio por el grupo FQM-286 y la sustitución de la segunda etapa de la síntesis química por un proceso biológico, además de profundizar en el conocimiento de los modos de acción de dichos compuestos para su posible aplicación como herbicidas o fármacos.

Este trabajo contó con la participación del grupo de **Alelopatía** (FQM-286) que se encargó de evaluar la actividad fitotóxica de los ácidos benzohidroxámicos sintetizados para seleccionar los de mayor actividad, colaborar en el estudio de los pasos clave de la síntesis detectando qué pasos reactivos o condiciones se podían simplificar o cambiar para su escalado posterior, suministrar el precursor de la reacción que se seleccionó como viable para ser llevada a cabo por medio de una biotransformación y realizar la extracción, aislamiento e identificación de los productos de biotransformación. El grupo "**Reactores Biológicos y Enzimáticos**" (TEP-

105) lideró los trabajos relacionados con la sustitución de una de las etapas de la síntesis consistente en una reducción química por una reducción biológica y los primeros estudios dirigidos al escalamiento de la síntesis completa, tanto la etapa química como la biológica. El grupo **“Genómica funcional del sistema inmunológico. Alteraciones inmunológicas de la reproducción y la anestesia”** (CTS-498) realizó los estudios dirigidos a la viabilidad de los productos sintetizados como agentes inmunosupresores y antitumorales.

Fruto del proyecto P06-TEP-01399 se consiguió avanzar en la síntesis de un ácido benzohidroxámico (D-DIBOA) que en estudios anteriores había demostrado que tenía una destacada bioactividad (Macías et al., 2006a; 2008; 2009). Por un lado, se simplificó la etapa 1 de la síntesis y se consiguió aumentar la escala de producción y, por otro, se logró realizar la etapa 2 por medio una biotransformación, con la utilización de *E. coli*.

La reacción de sustitución nucleofílica (etapa 1, Fig 2) fue simplificada y mejorada mediante la sustitución del etanol absoluto por metanol y de la dimetilformamida (DMF) por hidróxido potásico, ambos compuestos más económicos (Ruiz-Henestrosa, 2008). La reacción se llevó a cabo a 75°C, a reflujo con refrigeración para evitar la pérdida de disolvente y en agitación magnética durante 24 horas, evitándose el trabajo en atmósfera inerte empleado en la síntesis original, en la que se emplea argón para favorecer la mezcla. Además se consiguió realizar un avance en el escalado del proceso, pasando de emplear 1 gramo a 100 gramos de 2-nitrofenol.

Es evidente la necesidad no sólo de sustituir los reactivos por el ahorro económico que ello pueda suponer sino que este propósito debe ir unido a la búsqueda de las condiciones de operación que favorezcan el rendimiento de esta reacción. Por ello, sería interesante profundizar en el efecto de algunas condiciones de reacción (tiempo, temperatura, agitación y concentración de reactivos) con el propósito de establecer unas condiciones óptimas que permitan aumentar el rendimiento de esta etapa. Además, cuando se trata de un proceso a mayor escala resulta indispensable recuperar el producto de partida (2-nitrofenol) que queda sin reaccionar. Respecto a la recuperación del 2-nitrofenol, el grupo de Alelopatía comenzó a dar algunos pasos, en la búsqueda de compuestos que pudieran favorecer su extracción en disoluciones orgánicas. Seleccionando el hidróxido potásico como el compuesto idóneo para realizar esta operación, ya que no genera productos secundarios y es empleado en la propia síntesis. Por tanto, una vez optimizadas las condiciones de operación de esta etapa habría que profundizar en el proceso de recuperación del 2-nitrofenol que queda sin reaccionar con el fin de separarlo del precursor de la segunda etapa de la síntesis (etapa biológica) y poder reutilizarlo en el proceso.

La segunda etapa de la síntesis resulta más compleja ya que se trata de una reacción de catálisis heterogénea exotérmica con desprendimiento de hidrógeno, por lo que los riesgos de explosión son muy altos. Por tanto, el mayor logro del citado proyecto fue conseguir realizar esta segunda etapa mediante una biotransformación, es decir, se consiguió obtener de forma biológica D-DIBOA a partir del producto de la primera etapa el 2-(2'-nitrofenoxi)-acetato de etilo (precursor) (Valle et al., 2011a). Tras una selección previa y la elección de un medio de cultivo adecuado para el desarrollo de las bacterias elegidas, se trabajó con dos cepas, *Serratia marcescens* Nic2 (aislado de un depósito laterítico procedente del cepario de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana) (Marrero et al., 2007) y *E. coli* JM109 cepa de la American Type Culture Collection (ATCC-53323) tanto en condiciones aerobias como anaerobias. Mediante técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se demostró la desaparición del precursor y la aparición de varios productos de reacción uno de los cuales fue identificado como

el producto deseado D-DIBOA. En concreto, la cepa empleada de *E. coli* en condiciones aerobias permite la producción de D-DIBOA, la producción máxima se produjo a una concentración inicial del precursor de 0,5 mg/ml alcanzándose un valor del 20% en 24 h. Una vez finalizado el proyecto se continuó trabajando en el proceso de biotransformación y se logró, como se describe a continuación, mediante técnicas de sobre-expresión de enzimas aumentar este rendimiento notablemente (Valle et al., 2011b). Estos últimos resultados animan a continuar con esta línea de investigación. Actualmente hemos determinado qué enzimas están involucradas en el proceso y, por tanto, se abre una nueva puerta hacia la posibilidad de mejora del proceso.

En la actualidad las herramientas de biología molecular permiten determinar qué enzima/s son la/s causante/s, solas o en combinación, de que una determinada ruta metabólica se lleve a cabo o no. Para eliminar la función enzimática y elucidar su implicación se construyen mutantes simples del gen que expresa dicha enzima y mutantes múltiples si son más de una enzima. Una vez detectados los genes que participan en una determinada reacción, las estrategias de clonación en vectores de expresión constituyen una gran ventaja a la hora de complementar la función eliminada del mutante y corroborar su implicación en la ruta. A su vez, gracias al avance en el diseño de vectores con promotores inducibles, es posible la obtención de proteína recombinante de interés en grandes cantidades o inducir una ruta metabólica para obtener un producto secundario o de biotransformación como es en nuestro caso. Es decir, existe la posibilidad de modificar el contenido genético de una cepa microbiana sobre-expresando esos genes de forma que se pueda multiplicar su acción. Partiendo de esta idea, hemos publicado un trabajo en la revista *Applied Microbiology and Biotechnology* (F.I. de 3,28) dirigido a determinar los genes que expresan las enzimas que catalizan la biotransformación y a la clonación en vectores de expresión inducibles (Valle et al., 2011b)

Entrando en más detalle acerca de estos avances, en primer lugar se realizó una búsqueda bibliográfica y se encontró que existen ciertas enzimas nitroreductasas oxígeno-insensibles: la nitroreductasa monomérica (NfsA), la dihidropteridina reductasa monomérica (NfsB) y la N-etilmalamida reductasa (NemA). Estas enzimas se expresan a partir de los genes *nfsA*, *nfsB* y *nemA* respectivamente y catalizan la reducción de grupos nitro del TNT, molécula análoga al precursor, vía amino/hidroxilamino en la especie *E. coli*. Para determinar si estas enzimas están involucradas en la reducción del precursor a D-DIBOA y en que medida, se planteó la mutación de estos genes. Tras los experimentos de mutagénesis, se obtuvieron los mutantes simples de los genes *nfsA*, *nfsB* y *nemA* y los mutantes dobles *nfsA/nfsB*, *nfsA/nemA* y *nfsB/nemA* de forma satisfactoria, el mutante triple fue cedido por un grupo de investigación del Dr. J.L Ramos (Estación Experimental de Zaidín-CSIC, Granada) (González-Pérez et al., 2007). Posteriormente, para averiguar si estas cepas mutantes, habían perdido o no esta capacidad se realizaron experimentos de adición del precursor en cultivos líquidos. En los resultados obtenidos, se observó como en los mutantes simples *nfsA* y *nfsB* y los mutantes dobles *nfsA/nemA* y *nfsB/nemA* habían disminuido la capacidad de biotransformación con respecto a la cepa silvestre W3110, sin embargo, el mutante doble *nfsA/nfsB* y el triple *nfsA/nfsB/nemA*, fueron completamente incapaces de transformar el precursor. El mutante *nemA* no mostró diferencias significativas en la capacidad de biotransformación con respecto a la cepa silvestre. Estos datos sugirieron que las enzimas NfsA y NfsB son las únicas involucradas en la transformación del precursor en las condiciones de experimento ensayadas. Para confirmar este resultado se realizaron los estudios de complementación de la función eliminada en los mutantes simples *nfsA* y *nfsB*, mediante la clonación de las secuencias de pauta de lectura (ORF) de ambos genes en el vector de expresión inducible pBAD/His A de Invitrogen™ de los cuales se obtuvieron los vectores pBAD-NfsA y pBAD-NfsB respectivamente. En ambos casos, la

capacidad de biotransformación no sólo se recuperó a los niveles de la cepa silvestre ($6,09 \pm 0,06$ %) sino que también se produjo un incremento considerable utilizando niveles mayores de inductor (L-arabinosa) del 0,02% en la sobre-expresión de las enzimas NfsA y NfsB obteniéndose valores de $40,3 \pm 9,4\%$ y $59,7 \pm 2,0\%$ respectivamente .

En el desarrollo de este trabajo se contó con la colaboración del Dr. Bolívar, del grupo CTS-569, que cuenta con una notable experiencia en el manejo de técnicas de Ingeniería Genética en *E. coli*, con el que se mantiene una estrecha colaboración gracias al proyecto de excelencia P09-TEP-4830M **“Aprovechamiento de la glicerina por vía fermentativa: alternativa de viabilidad para la industria del Biodiesel”**, que ha permitido, una vez terminado el tiempo de desarrollo del proyecto P06-TEP-01399, realizar los estudios de detección y sobreexpresión de genes.

El siguiente paso será tratar de sobre-expresar estas enzimas en otras cepas de *E. coli* que presenten una capacidad de biotransformación notable, así como en otras, con las que ya ha trabajado el equipo investigador y que se prevé que podrían dar resultados satisfactorios.

A pesar de que los rendimientos obtenidos fueron satisfactorios, aún pueden mejorarse siguiendo otras estrategias para la mejora genética de *E. coli* en la síntesis de D-DIBOA. Como se describe ampliamente en la bibliografía, las enzimas NfsA y NfsB son NAD(P)H dependientes ya que estos cofactores son donadores de electrones en los co-sustratos (precursor) para su reducción y obtención de D-DIBOA. Como se describe en Valle et al. (2011b) los rendimientos no se incrementaban cuando la sobre-expresión de NfsA ó NfsB se llevaba a cabo en la cepa silvestre cuando eran comparados con la sobre-expresión en los mutantes simples *nfsA* y *nfsB* respectivamente. Por tanto, se concluyó que uno de los factores que puede ser limitantes en la síntesis de D-DIBOA a partir del precursor es la disponibilidad de los cofactores NADH y NADPH en células vivas.

Una estrategia que se plantea para mejorar los rendimientos es la regeneración de los cofactores mediante la modificación de determinadas rutas del metabolismo celular (Akinterinwa and Cirino, 2011; Blank et al., 2008; Buhler et al., 2008; Chin et al., 2009; Fasan et al., 2011; Walton and Stewart, 2004) para que puedan ser utilizados por las nitroreductasas. De *E. coli*, han sido publicado diferentes trabajos de regeneración de cofactores, por ejemplo, en el uso de los sistemas acoplados a enzimas, como la formato deshidrogenasa (Ernst et al., 2005; Kaup et al., 2005, 2004) o la glucosa deshidrogenasa (Eguchi et al., 1992; Heuser et al., 2007; Zhang et al., 2009), que oxidan 1 mol de formato a CO₂ ó 1 mol de glucosa a gluconato, respectivamente para la regeneración de 1 mol de NAD(P)H. Redirigir el metabolismo en una vía eficiente en la reducción de NAD(P)H es complejo, ya que estos cofactores juegan un papel importante en un gran número de reacciones en la célula (Blank et al., 2008; Holm et al., 2010). A pesar de ello, Akinterinwa and Cirino (2011) han descrito como el incremento del rendimiento de productos reducidos por glucosa (Y_{RPG}) es esencial para una mejora en la eficiencia de biotransformación en células vivas. Esta misma estrategia puede ser empleada para otros procesos NADPH-dependientes. De hecho, estos mismos autores lograron que un mutante de *E. coli* incapaz de realizar procesos de fermentación, obtuviera un Y_{RPG} de 4 mol de xilitol por mol de glucosa bajo condiciones anaerobia.

Desde el punto de vista de la aplicabilidad de estos compuestos, se realizó una búsqueda bibliográfica y se encontró que éstos son comercializados solamente a muy pequeña escala, en miligramos. Además, no se ha encontrado en la literatura ningún estudio relacionado con las biotransformaciones dirigidas a la obtención de ácidos benzohidroxámicos, únicamente estudios de degradación en el suelo mediado por microorganismos (Fomsgaard, 2004). Desde

esta perspectiva, la posibilidad de producir estos compuestos de forma biológica hace que pueda considerarse como proceso innovador. Además supondría una aportación a la industria de la biotecnología de productos que tradicionalmente se han producido de forma sintética.

En lo que concierne a la distribución de las empresas biotecnológicas por áreas de aplicación en España, destacan las empresas vinculadas a desarrollos tecnológicos (31%) y las de diagnóstico y vacunas (22%), junto con las biofarmacéuticas (18%). El segmento agroalimentario ocupa igualmente una posición destacada ostentando una cuota del 18%, mientras que solo un 6% corresponde al campo de los bioprocesos industriales. Hay que destacar que existe un notable crecimiento en estos últimos años de las empresas biotecnológicas. Sin embargo las correspondientes al campo de la agrobiotecnología, biofarmacéutica y bioprocesos industriales, siguen siendo las de menor intensidad en cuanto a volumen de facturación (http://www.gen-es.org/es/buscador_publicaciones.cfm).

Estos argumentos refuerzan la tendencia del cambio de la industria de herbicidas de origen sintético hacia los bioprocesos industriales debido a las ventajas medioambientales y económicas que éstos poseen. Este cambio de estrategia permitirá que los compuestos de origen biológico sean más competitivos en un futuro con otros tipos de herbicidas debido a su alto valor añadido.

3. OBJETIVOS DEL PROYECTO

Objetivo general

El objetivo general del proyecto que se presenta es la **producción biotecnológica de D-DIBOA mediante la mejora genética de *E. coli***, así como la **optimización global del proceso de biotransformación**.

OBJETIVO 6. Optimización de los procesos de recuperación y concentración del producto “Downstream process”

A partir del medio fermentativo final obtenido, será necesario llevar a cabo, en primer lugar, la separación de la biomasa y, en segundo lugar, la separación del producto de interés (D-DIBOA) en la forma más adecuada que permita que dicho producto pueda ser posteriormente empleado en cualquiera de sus aplicaciones.

4. METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO.

OBJETIVO 6. Optimización de los procesos de recuperación y concentración del producto “Downstream process”

Los avances realizados hasta ahora en las etapas de separación de la biomasa, la obtención del extracto crudo orgánico y purificación de D-DIBOA han sido a escala de laboratorio. La biomasa procedente de un cultivo de 100 mL crecido en presencia de 0,75 mg/mL, se retiró mediante centrifugación a 10,000 x g durante 10 min. El sobrenadante obtenido libre de células se extrajo con acetato de etilo (AcOEt) a temperatura ambiente al menos 10 veces. El solvente orgánico se eliminó de la fase orgánica mediante presión reducida con rotavapor a 35 °C. Con el extracto crudo seco, se realizó una cromatografía en columna de sílica gel usando los solventes hexano/AcOEt de forma que una vez aplicado el extracto orgánico, se iban añadiendo diferentes mezclas de solventes incrementando la polaridad de 1:4 a 1:1 v/v. De las distintas fracciones cromatográficas obtenidas, se realizó una cromatografía de capa fina (CCF) para localizar en que fracción eluida se encontraba el compuesto. Finalmente con la fracción donde el D-DIBOA fue detectado, además de la presencia de otros compuestos, se realizó una cromatografía en columna preparativa de sílica gel y se obtuvo finalmente 8 mg de producto totalmente puro (Valle et al., 2011a). Los rendimientos no fueron óptimos, pero estos ensayos previos son bastante útiles para optimizar esta etapa a mayor escala.

Tarea 6.1. Separación de la biomasa

La separación de biomasa será llevada a cabo por centrifugación, se determinarán las condiciones óptimas de tiempo, velocidad de centrifugación y temperatura. Además se empleará la filtración a vacío, se ensayarán diversos tipos de filtros comerciales determinando las condiciones óptimas de gradiente de presión y temperatura. Ambos procesos serán estudiados en el rango de concentración de biomasa que se obtenga en las etapas anteriores.

Tarea 6.2. Separación del D-DIBOA

La separación del D-DIBOA obtenido en el objetivo 4 se realizará mediante una extracción líquido-líquido con acetato de etilo. El acetato de etilo presenta numerosas ventajas tales como su baja temperatura de ebullición (77,1°C a 1 atm), baja solubilidad en agua (8,5

g/100g a 15°C) y bajo coste. La solubilidad del D-DIBOA en medio acuoso es muy baja lo cual facilita por tanto su separación, pero se hace necesario optimizar dicho proceso para minimizar el consumo de disolvente. Se estudiará el efecto de la temperatura y cantidad de disolvente, efecto del medio de cultivo clarificado y método de contacto: extracción en una sola etapa o en varias.

Tarea 6.3 Concentración del D-DIBOA

Para llegar a obtener un producto concentrado se realizará la evaporación del disolvente, se determinarán las condiciones óptimas de presión y temperatura para llevar a cabo la concentración del producto. El grado de pureza del producto será analizado mediante HPLC.

Tarea 6.1		6 meses de duración	10 meses-persona
Tarea 6.2		6 meses de duración	10 meses-persona
Tarea 6.3		9 meses de duración	10 meses-persona
Personas implicadas/ Meses-persona	TEP-105	Domingo Cantero José Manuel Gómez Empresa	3 3 24
Equipamiento disponible		Material de laboratorio y equipamiento básico necesario para el desarrollo del objetivo (estufa, cabina de flujo laminar, microscopio, rotavapor, autoclave, ...)	

Bibliografía

- Akinterinwa O and Cirino PC. Anaerobic obligatory xylitol production in *Escherichia coli* strains devoid of native fermentation pathways. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011;77(2):706-709.
- Anaya AL, Hernandezbautista BE, Jimenezestrada M and Velascoibarra L. Phenylacetic acid as a phytotoxic compound of corn pollen. *Journal of Chemical Ecology*. 1992;18(6):897-905.
- Baghestani A, Lemieux C, Leroux GD, Baziramakenga R and Simard RR. Determination of allelochemicals in spring cereal cultivars of different competitiveness. *Weed Science*. 1999;47(5): 498-504.
- Barchańska H and Baranowska I. Procedures for analysis of atrazine and simazine in environmental matrices. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 2009;200:53-84.
- Blank LM, Ebert BE, Buhler B and Schmid A. Metabolic capacity estimation of *Escherichia coli* as a platform for redox biocatalysis: Constraint-based modeling and experimental verification. *Biotechnology and Bioengineering*. 2008;100(6):1050-1065.
- Buhler B, Park JB, Blank LM and Schmid A. NADH availability limits asymmetric biocatalytic epoxidation in a growing recombinant *Escherichia coli* strain. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008;74(5):1436-1446.
- Chin JW, Khankal R, Monroe CA, Maranas CD and Cirino PC. Analysis of NADPH supply during xylitol production by engineered *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. 2009;102(1):209-220.
- Cofré O, Ramírez M, Gómez JM and Cantero D. Optimization of culture media for ethanol production from glycerol by *Escherichia coli*. *Biomass and Bioenergy*. 2012;37:275-281.
- Duke S. Naturally occurring chemical compounds as herbicides. *Review Weed of Science*. 1986;(2):15-44.
- Eguchi T, Kuge Y, Inoue K, Yoshikawa N, Mochida K and Uwajima T. NADPH regeneration by glucose dehydrogenase from *Gluconobacter sclerooides* for l-leucovorin synthesis. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 1992;56(5):701-703.
- Ernst M, Kaup B, Muller M, Bringer-Meyer S and Sahm H. Enantioselective reduction of carbonyl compounds by whole-cell biotransformation, combining a formate dehydrogenase and a (R)-specific alcohol dehydrogenase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005;66(6):629-634.
- Escobar CA, Sicker D and Niemeyer HM. Evaluation of DIMBOA analogs as antifeedants and antibiotics towards the aphid *Sitobion avenae* in artificial diets. *Journal of Chemical Ecology*. 1999;25(7):1543-1554.
- Fasan R, Crook NC, Peters MW, Meinhold P, Buelter T, Landwehr M, Cirino PC and Arnold FH. Improved product-per-glucose yields in P₄₅₀-dependent propane biotransformations using engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol and Bioengineering*. 2011;108(3):500-510.
- Fomsgaard I. Microbial transformation products of benzoxazolinone and benzoxazinone allelochemicals—a review. *Chemosphere*. 2004;54(8):1025-1038.
- Friebe A, Klever W, Sikora R and Schnabl H. Allelochemicals in root exudates of maize: effects on root lesion nematode *Pratylenchus zeae*. *Recent Advances in Phytochemistry*. 1998;(32)71-93.
- García-Ochoa F, Santos VE and Gomez E. *Stirred Tank Bioreactors*. *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*. M-Y Editor in Chief: Murray. Burlington, Academic Press. 2011;(2):179-198.
- González-Pérez MM, Pieter van D, Rolf MW and Juan LR. *Escherichia coli* has multiple enzymes that attack TNT and release nitrogen for growth. *Environmental Microbiology*. 2007;9(6):1535-1540.
- Guzman LM, Belin D, Carson MJ and Beckwith J. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P_{BAD} promoter. *Journal of Bacteriology*. 1995;177(14):4121-4130.
- Heap IM. The occurrence of herbicide-resistant weeds worldwide. *Pesticide Science*. 1997;51(3):235-243.
- Heuser F, Schroer K, Lutz S, Bringer-Meyer S and Sahm H. Enhancement of the NAD(P)(H) pool in *Escherichia coli* for biotransformation. *Engineering in Life Sciences*. 2007;7(4):343-353.

- Holm AK, Blank LM, Oldiges M, Schmid A, Solem C, Jensen PR and Vemuri GN. Metabolic and transcriptional response to cofactor perturbations in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(23):17498-17506.
- Kaup B, Bringer-Meyer S and Sahm H. D-mannitol formation from D-glucose in a whole-cell biotransformation with recombinant *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005;69(4):397-403.
- Kaup B, Bringer-Meyer S and Sahm H. Metabolic engineering of *Escherichia coli*: construction of an efficient biocatalyst for D-mannitol formation in a whole-cell biotransformation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004;64(3):333-339.
- Lee HC, Kim JS, Jang W and Kim SY. High NADPH/NADP⁺ ratio improves thymidine production by a metabolically engineered *Escherichia coli* strain. *Journal of Biotechnology*. 2010;149(1-2):24-32.
- Liu DL and Lovett JV. Biologically-active secondary metabolites of Barley 1. Developing Techniques and Assessing Allelopathy in Barley. *Journal of Chemical Ecology*. 1993a;19(10):2217-2230.
- Liu, DL and Lovett JV. Biologically-active secondary metabolites of Barley 2. Phytotoxicity of Barley Allelochemicals. *Journal of Chemical Ecology*. 1993b;19(10):2231-2244.
- Macías FA, De Siqueira JM, Chinchilla N, Marín D, Varela RM and Molinillo JMG. New herbicide models from benzoxazinones: Aromatic ring functionalization effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006a;54(26):9843-9851.
- Macías FA, Chinchilla N, Varela RM, Molinillo JM, Marín D and de Siqueira JM. Aromatic-ring-functionalised benzoxazinones in the system *Oryza sativa-Echinochloa crus-galli* as biorational herbicide models. *Pest Manag Sci*. 2009;65(10):1104-1113.
- Macías FA, Marín D, Oliveros-Bastidas A, Castellano D, Simonet AM and Molinillo JMG. Structure-activity relationship (SAR) studies of benzoxazinones, their degradation products, and analogues. Phytotoxicity on Problematic Weeds *Avena fatua* L. and *Lolium rigidum* Gaud. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006b;54(4):1040-1048.
- Macías FA, Marín D, Oliveros-Bastidas A and Molinillo JMG. Optimization of benzoxazinones as natural herbicide models by lipophilicity enhancement. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006c;54(25):9357-9365.
- Macías FA, Marín D, Oliveros-Bastidas A and Molinillo JMG. Rediscovering the bioactivity and ecological role of 1,4-benzoxazinones. *Natural Product Reports*. 2009;(26)478-489.
- Macías FA, Oliveros-Bastidas A, Marín D, Carrera C, Chinchilla N and Molinillo JMG. Plant biocommunicators: their phytotoxicity, degradation studies and potential use as herbicide models. *Phytochemistry Review*. 2008;(7)179-194.
- Miyada, CG, Stoltzfus L and Wilcox G. Regulation of the *araC* gene of *Escherichia coli*: catabolite repression, autoregulation, and effect on *araBAD* expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United State of America*. 1984;81(13):4120-4124.
- Muller C, Ed. Dr. W, Junk B. Handbook of vegetation science part VI: Vegetation and environment. The Hague. 1974.
- Niemeyer HM. Hydroxamic acids (4-Hydroxy-1,4-Benzoxazin-3-Ones), defense chemicals in the Gramineae. *Phytochemistry*. 1988;27(11):3349-3358.
- Oliveros-Bastidas A. Estudios alelopáticos en gramíneas. Benzoxacinoides como aleloquímicos. Tesis Doctoral. 2006.
- Romeo J and Weidenhamer J. Bioassays for allelopathy in terrestrial plants in: *Methods in Chemical Ecology*. Bioassay Methods. Kluwer Academia Publishing. 1998.
- Romeo JT. Raising the beam: moving beyond phytotoxicity. *Journal of Chemical Ecology*. 2000;26(9):2011-2014.
- Ruiz-Henestrosa N. Estudios de escalamiento de la obtención de ácidos benzohidroxámicos. Trabajo fin de Máster (Master en Ciencias y Tecnologías Químicas). 2008.
- Ryan G. Resistance of common groundsel to simazine and atrazine. *Weed Sci*. 1970;(18)614-616.
- Takabayashi J, Takahashi S, Dicke M and Posthumus MA. Developmental stage of herbivore *Pseudaletia separata* affects production of herbivore-Induced synomone by corn plants. *Journal of Chemical Ecology*. 1995;21(3):273-287.
- Tudings Ted CJ and Tumlinson James H. Systemic release of chemical signals by herbivore-injured corn. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(17):8399-83402.

Anexo al PPT Expdte C15-S03-16

Objetivo/Tarea 6 del Proyecto

Valle A, Cabrera G, Molinillo JMG, Gómez JM, Macias FA and Cantero D. Biotransformation of ethyl 2-(2'-nitrophenoxy)acetate to benzohydroxamic acid (D-DIBOA) by *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*. 2011a;46(1):358-364.

Valle A, Le Borgne S, Bolivar J, Cabrera G and Cantero D. Study of the role played by NfsA, NfsB nitroreductase and Nema flavin reductase from *Escherichia coli* in the conversion of ethyl 2-(2'-nitrophenoxy)acetate to 4-hydroxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (D-DIBOA), a benzohydroxamic acid with interesting biological properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011b; DOI:10.1007/s00253-011-3787-0.

Walton AZ and Stewart JD. Understanding and improving NADPH-dependent reactions by nongrowing *Escherichia coli* cells. *Biotechnology Progress*. 2004;20(2):403-411.

Wu HW, Haig T, Pratley J, Lemerle D and An M. Allelochemicals in wheat (*Triticum aestivum* L.): Production and exudation of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one. *Journal of Chemical Ecology*. 2001a;27(8):1691-1700.

Wu HW, Haig T, Pratley J, Lemerle D and An M. Biochemical basis for wheat seedling allelopathy on the suppression of annual ryegrass (*Lolium rigidum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002;50(16):4567-4571.

Wu HW, Pratley J and Haig T. Phytotoxic effects of wheat extracts on a herbicide-resistant biotype of annual ryegrass (*Lolium rigidum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003;51(16):4610-4616.

Wu HW, Pratley J, Lemerle D and Haig T. Allelopathy in wheat (*Triticum aestivum*). *Annals of Applied Biology*. 2001b;139(1):1-9.

Zerez CR, Moul DE, Gomez EG, Lopez VM and Andreoli AJ. Negative modulation of *Escherichia coli* NAD kinase by NADPH and NADH. *Journal Bacteriology*. 1987;169(1):184-188.

Zhang W, O'Connor K, Wang DIC and Li Z. Bioreduction with efficient recycling of NADPH by coupled permeabilized microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009;75(3):687-694.

Zhong JJ. Bioreactor Engineering. *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*. M-Y Editor in Chief: Murray. Burlington, Academic Press. 2011;(2):165-177.